

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilište u Dubrovniku
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Dunja Šamec

FITOKEMIJSKA I GENETSKA ISTRAŽIVANJA ENDEMIČNIH VRSTA
Teucrium arduini, Moltkia petraea, Micromeria croatica i Rhamnus
intermedia

Doktorski rad

Zagreb, 2013

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilište u Dubrovniku
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Dunja Šamec

FITOKEMIJSKA I GENETSKA ISTRAŽIVANJA ENDEMIČNIH VRSTA
Teucrium arduini, Moltkia petraea, Micromeria croatica i Rhamnus
intermedia

Doktorski rad predložen

Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije
zbog stjecanja akademskog stupnja doktora molekularnih bioznanosti - modul biologija
biljaka

Zagreb, 2013

Doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za kemijsku biologiju, Zavod za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr.sc. Jasenke Piljac Žegarac i dr.sc. Branke Salopek Sondi. Laboratorijska istraživanja financirana su projektom MZOŠ "Molekularna regulacija biljnog razvitka" voditeljice dr.sc. Branke Salopek Sondi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: prirodne znanosti
Znanstveno polje: biologija

FITOKEMIJSKA I GENETSKA ISTRAŽIVANJA ENDEMIČNIH VRSTA *Teucrium arduini*, *Moltkia petraea*, *Micromeria croatica* i *Rhamnus intermedia*

Dunja Šamec

Rad je izrađen u: Laboratoriju za kemijsku biologiju, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković

Mentorice: dr. sc. Jasenka Piljac Žegarac i dr. sc. Branka Salopek Sondi

Kratki sažetak doktorskog rada:

U ovom radu određen je sastav fitokemikalija iz skupine polifenola, genetska varijabilnost te biološka aktivnost endemičnih biljnih vrsta *Teucrium arduini* L., *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb., *Micromeria croatica* (Pers.) Schott i *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst. s obzirom na različite lokalitete rasta u Republici Hrvatskoj. Fitokemijski sastava i antioksidacijska aktivnost određeni su primjenom triju spektrofotometrijskih metoda (DPPH, ABTS i FRAP), i cikličkom voltametrijom. Statističkom analizom glavnih komponenata (PCA) te hijerarhijskom klaster analizom (HCA) određen je odnos između analiziranih polifenolnih grupa i antioksidacijskih aktivnosti. Na osnovu rezultata antioksidacijske aktivnosti iz pojedinog testa izračunat je ukupni antioksidacijski indeks za svaki biljni uzorak. Na uzorcima s najvišim vrijednostima antioksidacijskog indeksa ispitana je potencijalna zaštitna uloga od oksidacije na razini makromolekula (DNA, lipida, proteina), te antimikrobna i citotoksična aktivnost. Najviši antioksidacijski indeks dobiven je za ekstrakt lista *T. arduini* s lokaliteta Učka koji je ujedno inhibirao lipidnu peroksidaciju te pokazao zaštitno djelovao na molekule DNA i citotoksičnu aktivnost prema stanicama karcinoma grkljana. Istražene su korelacije između različitih parametara (genetska varijabilnost i lokalitet, te sastav polifenola i biološka aktivnost s obzirom na biljnu vrstu, lokalitet i biljni organ).

Broj stranica: 175; **Broj slika:** 39; **Broj tablica:** 25; **Broj literaturnih navoda:** 228

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biološka aktivnost, fitokemikalije, *Micromeria croatica* (Pers.) Schott, *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb., *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst, *Teucrium arduini* L.

Datum obrane: 12. prosinca 2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr.sc. Sanja Martinez, redovita profesorica Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, predsjednica
2. Dr. sc. Branka Salopek Sondi, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković, mentor 2
3. Prof. dr.sc. Vera Cesar, redovita profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, član
4. Dr. sc. Dario Kremer, voditelj botaničkog vrta "Fran Kušen" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, član
5. Prof. dr.sc. Ksenija Durgo, izvanredna profesorica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, član
6. Prof. dr.sc. Gordana Rusak, redovita profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, zamjena člana

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: natural sciences

Scientific Field: biology

PHYTOCHEMICAL AND GENETIC INVESTIGATION OF ENDEMIC SPECIES *Teucrium arduini*, *Moltkia petraea*, *Micromeria croatica* and *Rhamnus intermedia*

Dunja Šamec

Thesis performed at: Laboratory for Chemical Biology, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute

Supervisors: Jasenka Piljac Žegarac, PhD and Branka Salopek Sondi, PhD

Short abstract:

Four endemic plant species: *Teucrium arduini* L., *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb., *Micromeria croatica* (Pers.) Schott and *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst, were evaluated phytochemically and genetically with respect to their growing regions in Croatia. Antioxidant activity of plant extracts were determined using three spectrophotometric assays (DPPH, FRAP, ABTS), and cyclic voltammetry. The relationship between the content of polyphenolic compounds and antioxidant activity was evaluated using multivariate statistical analysis (PCA and HCA). The results from individual antioxidant activity assays were used to calculate the overall antioxidant composite indices of plant extracts. Those extracts with high antioxidant composite indices were tested for potential protective effects on DNA, lipids and proteins. The leaf extract of *T. arduini* grown on Učka mountain showed the best antioxidant capacity as well as DNA protective effects, inhibition of lipid peroxidation and cytotoxic activity in the human laryngeal carcinoma cell line (HEp2). Correlations were drawn between the genetic variability and growing region, as well as between the polyphenolic content and plant species and organs of accumulation on one side, and biological activity on the other side.

Number of pages: 175; Number of figures: 39; Number of tables: 25; Number of references: 228

Original in: croatian

Key words: biological activity, phytochemicals, *Micromeria croatica* (Pers.) Schott, *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb., *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst, *Teucrium arduini* L.

Date of the thesis defense: 12th December 2013.

Reviewers:

1. Prof. Sanja Martinez, PhD, Full Professor, Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb, president of commission
2. Branka Salopek Sondi, PhD, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute in Zagreb, mentor 2
3. Prof. Vera Cesar, PhD, Full Professor Department of biology, J.J. Strossmayer University of Osijek, member
4. Dario Kremer, PhD, head of the botanical garden "Fran Kušen", Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, member
5. Prof. Ksenija Durgo, PhD, Associate Professor, Faculty of Food Technology and biotechnology, University of Zagreb, member
6. Prpf. Gordana Rusak, PhD, Full Professor, Faculty of Science, Universiti of Zagreb, supstitute member

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Hvala mojim mentoricama dr.sc. Jasenki Piljac Žegarac i dr. sc. Branki Salopek Sondi na ukazanom povjerenju, strpljenju i stručnom vodstvu prilikom izrade ovog rada.

Dr. sc. Piljac Žegarac zahvaljujem što me potaknula da se počnem baviti znanošću i na postavljenim čvrstim znanstvenim temeljima koji će mi zasigurno pomoći u budućem znanstvenom radu.

Dr. sc. Salopek Sondi posebno hvala što je bila uz mene i pružala mi stručnu ali i moralnu potporu u trenucima kada se činilo da je teško i da ne ide dalje.

Hvala članovima povjerenstva za obranu teme, ocijenu i javnu obranu doktorata, Prof. dr. sc. Veri Cesar, dr.sc. Dariju Kremeru, Prof. dr. sc. Sanji Martinez i Prof. dr. sc. Kseniji Durgo, na komentarima i savjetima za poboljšanje rada.

Posebna zahvala dr. sc. Dariju Kremeru na identifikaciji i prikupljanju biljnog materijala korištenog u ovom radu. Velika hvala dr. sc. Lidiji Valek Žulj na pomoći oko cikličke voltometrije, dr. sc. Andreji Leboš Pavunc na određivanju antimikrobne aktivnosti, Prof. dr. sc. Kseniji Durgo na staničnim testovima te dr. sc. Marijani Radić Stojković na snimanjeu UV i CD spektara. Bez Vas ovaj rad ne bi bio kompletan!

Hvala svim ostalim kolegama znanstvenicima, koje nisam spomenula, a s kojima sam imala prilike surađivati do sada. Nadam se uspješnoj suradnji i u budućnosti!

Hvala Ivi, Jeleni, Zrinki, Ani te ostalim bivšim i sadašnjim članovima Laboratorija za kemijsku biologiju! Uz pozitivnu i kolegijalnu atmosferu sve se čini lakše ☺

Hvala mojim roditeljima i bratu što su me školovali, uvažavali moje želje i odluke, te mi omogućili da se u životu bavim onim što volim.

Hvala Branimiru na podršci i potpori.

Dunja

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. UPORABA LJEKOVITIH BILJAKA U SVIJETU	1
1.2. ENDEMIČNE I MEDICINSKI ZANIMLJIVE BILJKE U HRVATSKOJ	2
1.2.1. <i>Teucrium arduini</i> L.....	3
1.2.2. <i>Moltkia petraea</i> (Tratt.) Griseb.....	5
1.2.3. <i>Micromeria croatica</i> (Pers.) Schott	6
1.1.4. <i>Rhamnus intermedia</i> Steud. et Hochst	7
1.3. SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI	8
1.3.1. Polifenoli.....	11
1.3.2. Sinteza polifenola u biljkama	14
1.3.3. Polifenoli u kemotaksonomiji	16
1.3.4. Polifenoli i zdravlje	17
1.4. <i>IN VITRO</i> TESTOVI ZA MJERENJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI BILJNIH EKSTRAKATA	19
1.4.1. Spektrofotometrijske metode	19
1.4.2. Elektrokemijske metode.....	22
1.5. CILJEVI I HIPOTEZE.....	23
2. MATERIJALI I METODE	24
2.1. MATERIJALI	24
2.1.1. Kemikalije	24
2.1.2. Komercijalni kompleti, proteini i plazmidi	26
2.1.3. Standardi duljine odsječka DNA i molekularne mase	26
2.1.4. Biljni materijal	27
2.2. METODE	29
2.2.1. Određivanje genetske varijabilnosti RAPD markerima	29
2.2.1.1. Izolacija genomske DNA.....	29
2.2.1.2. RAPD marker.....	30
2.2.2. Određivanje sastava fitokemikalija	31
2.2.2.1. Ekstrakcija.....	31
2.2.1.2. Određivanje ukupnih fenola.....	31

2.2.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida.....	32
2.2.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavanola.....	32
2.2.2.5. Određivanje proantocijanidina.....	33
2.2.2.6. Određivanje pojedinačnih fenolnih kiselina UPLC-MS/MS metodom.....	33
2.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata.....	36
2.2.3.1. FRAP metoda.....	36
2.2.3.2. DPPH metoda.....	37
2.2.3.3. ABTS metoda.....	38
2.2.3.4. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	39
2.2.3.5. Antioksidacijski indeks.....	41
2.2.4. Ispitivanje potencijalne zaštitne uloge ekstrakta na nivou makromolekula.....	42
2.2.4.1. Priprema ekstrakata.....	42
2.2.4.2. Metoda zaštite DNA.....	42
2.2.4.3. Metoda zaštite proteina.....	44
2.2.4.3.1. Mjerenje karbonilacije proteina.....	44
2.2.4.3.2. Provjera oksidacije proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE).....	45
2.2.4.4. Metoda zaštite lipida.....	46
2.2.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti	48
2.2.5.1. Mikroorganizmi i hranjive podloge.....	48
2.2.5.2. Priprema uzoraka.....	48
2.2.5.3. Metoda s rupicama u agaru („agar well assay“).....	48
2.2.5.4. Metoda s filter diskovima („filter disk assay“).....	49
2.2.5.5. Turbidimetrijska metoda.....	49
2.2.6. Djelovanje biljnih ekstrakata na tumorske stanične linije	50
2.2.6.1. Nasađivanje, uzgoj te priprema stanica iz subkonfluentnog monosloja.....	50
2.2.6.2. Određivanje citotoksičnosti Neutral Red metodom.....	50
2.2.6.3. Određivanje reaktivnih kisikovih skupina DCFH-DA fluorimetrijskim testom.....	51
2.2.7. Statistička obrada podataka	52
2.2.7.1. Genetičke studije.....	52
2.2.7.2. Kemometrijska obrada podataka.....	52
2.2.7.2.1. Univarijantna statistička analiza.....	52

2.2.7.2.2. Multivarijantna statistička analiza.....	52
3. REZULTATI	54
3.1. GENETSKA VARIJABILNOST BAZIRANA NA RAPD MARKERIMA.....	54
3.2. POLIFENOLNE GRUPE SPOJEVA ODREĐENE SPEKTROFOTOMETRIJSKIM METODAMA	62
3.2.1. <i>Teucrium arduini</i>	62
3.2.2. <i>Moltkia petraea</i>	64
3.2.3. <i>Micromeria croatica</i>	66
3.2.4. <i>Rhamnus intermedia</i>	68
3.3. PROFIL FENOLNIH KISELINA ODREĐEN UPLC-MS/MS METODOM.....	70
3.3.1. <i>Teucrium arduini</i>	70
3.3.2. <i>Moltkia petraea</i>	75
3.3.3. <i>Micromeria croatica</i>	77
3.3.4. <i>Rhamnus intermedia</i>	78
3.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST.....	80
3.4.1. FRAP metoda	80
3.4.2. DPPH metoda.....	82
3.4.3. ABTS metoda.....	84
3.4.4. Ciklička voltometrija	86
3.4.5. Antioksidacijski indeks.....	91
3.5. KEMOMETRIJSKE ANALIZE.....	92
3.5.1. Korelacije	92
3.5.2. Hijerarhijska klaster analiza	96
3.5.3. Analiza glavnih komponenti	98
3.6. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA NA RAZINI MAKROMOLEKULA	102
3.6.1. Zaštita DNA	102
3.6.2. Zaštita od oksidacije proteina.....	104
3.6.2.1. Metoda mjerenja stupnja karbonilacije proteina.....	104
3.6.2.2. Provjera zaštitne uloge biljnih ekstrakata na oštećenje proteina elektroforezom u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE).....	105
3.6.3. Zaštita od oksidacije lipida.....	106
3.7. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST	107
3.8. STANIČNI TESTOVI.....	108

3.8.1. Test citotoksičnosti	108
3.8.2. Prooksidativno/antioksidativno djelovanje.....	109
4. RASPRAVA	111
4.1. GENETSKA ISTRAŽIVANJA	111
4.1.1. Izolacija i pročišćavanje DNA iz uzoraka bogatih sekundarnim metabolitima.....	111
4.1.2. RAPD analize	114
4.2. POLIFENOLI: SASTAV I ZASTUPLJENOST S OBZIROM NA BILJNU VRSTU, BILJNI ORGAN I LOKALITET RASTA	115
4.2.1. <i>Teucrium arduini</i>	116
4.2.2. <i>Moltkia petraea</i>	118
4.2.3. <i>Micromeria croatica</i>	119
4.2.4. <i>Rhamnus intermedia</i>	120
4.2.5. Međusobna usporedba ispitanih biljnih vrsta s obzirom na sastav polifenolnih spojeva	122
4.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST.....	124
4.3.1. FRAP metoda	124
4.3.2. DPPH metoda.....	125
4.3.3. ABTS metoda.....	126
4.3.4. Ciklička voltometrija	127
4.3.5. Antioksidacijski indeks.....	129
4.4. KEMOMETRIJSKE ANALIZE.....	130
4.4.1. Korelacije	130
4.4.2. Hijerarhijska klaster analiza	132
4.4.3. Analiza glavnih komponenata (PCA analiza)	133
4.5. DJELOVANJE EKSTRAKATA NA RAZINI MAKROMOLEKULA	134
4.5.1. Zaštitna uloga ekstrakata na molekulu DNA	134
4.5.2. Zaštitna uloga biljnih ekstrakata od oksidacije proteina	135
4.5.3. Zaštitna uloga biljnih ekstrakata od lipidne peroksidacije	136
4.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST	137
4.7. STANIČNI TESTOVI.....	138
5. ZAKLJUČCI.....	138
6. REFERENCE	137

7. SAŽETAK	164
8. SUMMARY	168
9. ŽIVOTOPIS	170

1. UVOD

1.1. UPORABA LJEKOVITIH BILJAKA U SVIJETU

Zapisi o uporabi biljaka u liječenju bolesti i ublažavanju različitih tegoba sežu još iz vremena srednjeg paleolitika (Fabricant i Farnsworth, 2001), a njihova uporaba još i danas zauzima važno mjesto u suvremenom, a osobito u tradicionalnim društvima. Prema procijenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) još uvijek oko 65% svjetske populacije koristi tradicionalnu medicinu kao primarni oblik zdravstvene zaštite. Većina tradicionalnih medicina, kao što su Ajurveda, Kineska, Unani, Tibetanska, Amazonska i Afrička, uporabu biljaka u liječenju (fitoterapiju) uvrštavaju u svoju doktrinu (WHO, 2007). Uporaba biljaka za liječenje nije raširena samo u nerazvijenim zemljama već se biljke sve više ponovno koriste i u razvijenim zemljama gdje je dostupna suvremena medicina. Razlog porastu uporabe biljaka vjerojatno leži u činjenici da se sa razvojem farmaceutske industrije i novih lijekova javlja i sve više negativnih nuspojava zbog njihovog pretjeranog korištenja. Stoga se sve više ljudi okreće „prirodnim“ proizvodima i lijekovima. No, iako je upotreba biljaka veoma raširena udio fitokemikalija i njihova biološka aktivnost sa znanstvenog stajališta veoma je malo istražena. Prema podacima od prije desetak godina u samo 15% od ukupnog broja biljaka na Zemlji određen je sastav fitokemikalija, a u njih samo 6% biološka aktivnost (Verpoorte, 2000). Zbog toga i WHO ističe važnost istraživanja na biljkama, posebice onima koje se koriste u tradicionalnoj medicini (WHO, 2005).

Fitokemikalije, osim zbog svoje biološke aktivnosti, u novije se vrijeme sve više istražuju i kao kultivarano ili regionalno specifični biomarkeri s važnom ulogom u taksonomiji, odnosno kemotaksonomiji. Istraživanje ljekovitih biljaka od interesa najčešće obuhvaća istraživanja u području fitokemije, farmakognozije te hortikulture (Briskin, 2000). U području fitokemije u biljkama se određuju potencijalno bioaktivni spojevi i analizira se njihova struktura. U području farmakognozije, ispituje se njihova biološka aktivnost i mehanizmi djelovanja. Također, istraživanje ljekovitih biljaka uključuje ispitivanja u području hortikulture koja su fokusirana na određivanje optimalnih uvijeta rasta biljaka, genetičku raznolikost i sl. To je posebno važno za biljke koje nisu kultivirane te je važno odrediti njihovu genetsku varijabilnost, optimalne uvijete te područje rasta.

1.2. ENDEMIČNE I MEDICINSKI ZANIMLJIVE BILJKE U HRVATSKOJ

Zbog specifičnog geografskog položaja te karakterističnih ekoloških, klimatskih i geomorfoloških uvjeta, Hrvatska ima velik broj biljnih vrsta i podvrsta, te značajan broj endema. Od ukupnog broja biljnih svojiti u Hrvatskoj, koji se procjenjuje na oko 8 871, njih 5,90% je endemičnih, a 3,96% ugroženo (Radović i sur., 2009). Najveći broj endema rasprostranjen je na jadranskim otocima i planinskim masivima poput Velebita i Biokova. Mnogi od njih razvili su se na nepristupačnim mjestima, te se pretpostavlja da oko 15% svojiti hrvatske flore još uvijek nije zabilježeno (Radović i sur., 2009). Zbog ograničenih podataka o genetskoj varijabilnosti svojiti česta su i pogrešna svrstavanja biljaka u zajedničke/zasebne vrste i podvrste.

Uvjeti rasta biljaka u Hrvatskoj, a posebno mediteranska klima, pogoduju rastu vrsta s povećanim udjelom sekundarnih metabolita. Stoga, takve se biljke često koriste u medicinske i kozmetičke svrhe. Upraba biljaka na hrvatskim prostorima datira još od vremena neolitika, a od 13. stojeća postoje i zapisi o njihovoj uporabi u terapijske svrhe (Nikolić i Rešetnik, 2007). Kroz povijest, veliki broj znanstvenika na našem području se bavio istraživanjem biljaka i njihovom primjenom, a od početka 21. stoljeća po prvi je puta i *on-line* dostupna kompletna baza flore Hrvatskog područja- *Flora Croatica Database* (Nikolić i sur., 2001) koja daje cjelokupan popis biljnih vrsta na području Republike Hrvatske s podacima o njihovoj taksonomskoj pripadnosti, rasprostranjenosti i uporabi. Analizom ove baze podataka Nikolić i Rešetnik (2007) objavili su da se čak 25,3% navedenih vrsta koristi u medicinske svrhe. Oko 735 različitih vrsta koristi se u tradicionalnoj medicini i to za poboljšanje probave i smetnji urinarnog i reproduktivnog trakta, liječenje infekcija, bolesti kože, respiratornih smetnji, ozljeda i sl. Biljke koje se koriste u medicinske svrhe najčešće pripadaju porodicama *Rosaceae* (54 vrste), *Asteraceae* (52 vrste), *Lamiaceae* (49 vrste), *Apiaceae* (36 vrsta), *Ranunculaceae* (34 vrsta), *Fabaceae* (33 vrste) i *Brassicaceae* (31 vrsta). U navedene porodice ubraja se 40% svih medicinskih biljaka u Hrvatskoj. Ovi podaci prvenstveno se odnose na uporabu ovih vrsta u tradicionalnoj medicini, no znanstveni dokazi o njihovoj biološkoj aktivnosti i sastavu fitokemikalija slabo su dostupni. U ovom radu istražene su četiri endemične i medicinski potencijalno interesantne biljne vrste: *Teucrium arduini* L., *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb, *Micromeria croatica* (Pers.) Schott i *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst.

1.2.1. *Teucrium arduini* L.

Naziv: *Teucrium arduini* L.

Red: *Lamiales*

Porodica: *Lamiaceae*

Rod: *Teucrium* L.

Narodno ime: Arduinov dubačac, metvica planinska, klasnati dubačac



Slika 1. *Teucrium arduini* L. Fotografija D. Kremer.

Rod dubačac (*Teucrium* L.) obuhvaća oko 200 vrsta rasprostranjenih većinom na sjevernoj hemisferi. U mediteranskoj regiji registrirano je oko 140 vrsta (Wielgorskaya, 1995). Vrste roda *Teucrium* trajne su zeljaste biljke ili polugrmovi, često veoma aromatični. Neke od njih koriste se u narodnoj medicini za opuštanje mišića, kao diuretik, antidiijabetik, analgetik, antireumatik, antiseptik, antipiretik, stimulans, protiv upala, kao i u liječenju probavnih tegoba (Šamec et al., 2010). Kremer i sur. (2011a) navode osam vrsta roda *Teucrium* rasprostranjenih u Hrvatskoj i pet vrsta u Bosni i Hercegovini.

Arduinov dubačac (*Teucrium arduini* L.) endemična je ilirsko-balkanska vrsta rasprostranjena u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, Srbiji i sjevernoj Albaniji. Raste na vapnenačkom tlu na visinama do 1600 m. Poludrvenasti je, razgranati patuljasti grm visine od 10 cm do 40 cm sa specifičnim cvatovima koji mogu narasti i do 16 cm. Kao infuz koristi se za liječenje bolesti želuca (Redžić, 2007). Posljednjih nekoliko godina pronađeni su i novi lokaliteti rasta u Hrvatskoj na Učki, Velebitu, Biokovu i Sniježnici (Kremer i sur., 2011b).

Biljke Arduinovog dubačca s različitih lokaliteta u Srbiji i Crnoj Gori istražene su s obzirom na morfološko-anatomske razlike (Lakušić i sur., 2007; Lakušić i sur., 2010). Također, istražene su mikro i makromorfološke značajke vrste *T. arduini* sa šest lokaliteta u Hrvatskoj (Kremer i sur., 2011a). Jurišić-Grubešić i sur. (2007) također su opisali različite tipove trihoma Arduinovog dubačca kao mikromorfološku značajku.

Osim morfoloških istraživanja, u nekoliko je radova određen i sastav sekundarnih metabolita u vrste *T. arduini*. U radu Kremera i sur. (2011a) spektrofotometrijski određen je postotak nekih grupa fenolnih spojeva u listu, cvatu i stabljici Arduinovog dubačca sa šest lokaliteta. Sadržaj ukupnih fenola kreće se u rasponima od 5,42% do 13,55%, tanina od 0,76% do 6,81%, flavonoida od 0,06% do 0,40% te ukupnih fenolnih kiselina od 1,46% do 5,07%, ovisno o lokalitetu i biljnom organu. Uspoređivan je i udio ukupnih fenola, tanina, β -fitosterola i gorkih komponenti u sedam kultiviranih i divljih vrsta roda *Teucrium* (Jurišić-Grubešić i sur., 2012). U Arduinovom dubačcu nisu pronađene značajne razlike u razini ispitivanih komponenti između divljih i kultiviranih biljka (Jurišić-Grubešić i sur., 2012). U našoj prethodnoj studiji (Šamec et al., 2010) određeni su ukupni polifenoli spektrofotometrijski te pojedinačne fenolne kiseline UPLC-MS/MS metodom u vodenim ekstraktima biljke *T. arduini* sa šest različitih lokaliteta u Hrvatskoj. Također, polifenolni spojevi vrste *T. arduini* s područja Hrvatske istraživani su spektrofotometrijski te HPLC-DAD metodom (Kremera i sur., 2013). Nadalje, ukupni fenoli i flavonoidi određeni su, spektrofotometrijski u vrste *T. arduini* s područja Srbije i Crne Gore te je njihova razina značajno ovisila o ekstrakcijskom otapalu (Stanković i sur., 2012). Najviša razina određena je u metanolnim ekstraktima, a iznosila je $86,39 \pm 0,52$ mg CA/g za ukupne fenole i $79,89 \pm 0,89$ mg RU/g za flavonoide.

Vodeni ekstrakti biljke *T. arduini* pokazali su značajnu antioksidacijsku aktivnost mjerenu metodama ABTS, DPPH i FRAP. U antimikrobnim testovima vodeni ekstrakti lista pokazali su antibakterijsku aktivnost prema bakterijskoj vrsti *Staphylococcus aureus* (Šamec i sur., 2010). Također, u studiji Stanković i sur. (2012) metanolni, acetatni i etil-acetatni ekstrakti vrste *T. arduini* pokazali su antibakterijsko djelovanje prema bakterijama *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* dok su etanolni ekstrakti u radu Kremer i sur. (2013) pokazali antimikrobnu aktivnost prema *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis*, dok je *Microsporium gypseum* bio rezistentan.

1.2.2. *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb

Naziv: *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb

Red: *Boraginales*

Porodica: *Boraginaceae*

Rod: *Moltkia*

Narodno ime: modro lasinje



Slika 2. *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb (Flora Croatica Database, Nikolić i sur., 2001).

Rod lasinje (*Moltkia*) obuhvaća 5 vrsta od kojih je samo *M. petraea* (Tratt.) Griseb. rasprostranjena u Hrvatskoj i ubraja se u endemične ilirsko-balkanske vrste. U Hrvatskoj je možemo naći duž Jadranske obale, od centralne Dalmacije prema jugu uključujući otoke Korčulu, Mljet i Šipan. Osim u Hrvatskoj rasprostranjena je i u Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, Albaniji, Makedoniji i Grčkoj. Raste na liticama i stijenama od razine mora do 1500 m nadmorske visine, a u Crnoj gori pronađena je na planini Durmitor i na visini od 2000 m (Trinajstić, 1974). Raste kao gusti, patuljasti, do 40 cm visok grm. Listovi su joj 5 cm dugi i 0,6 cm široki, linearni do naopako suličasti sa zavrnutim rubovima. Cvjetovi su ljubičasto-plave boje, cjevasti. Cvjeta u kasno proljeće i ljeti (Zovko-Končić i sur., 2010).

Do sada je vrsta *M. petraea* većinom bila istraživana s botaničkog aspekta, te su opisane njene lokacije rasprostranjenosti na području Grčke (Georgiou, 2000) i Crne Gore (Budak i sur., 2001). Genetičkim istraživanjima određen je broj kromosoma u vrsti *M. petraea* $2n=16$ (Aquaro et al., 2007).

Sastav fitokemikalija modrog lasinja i njihova biološka aktivnost veoma je malo istražena. Dostupan je samo rad autora Zovko-Končić i sur. (2010) u kojem je određena antioksidacijska i antimikrobna aktivnost te količina polifenolnih spojeva u vodenim ekstraktima vrste *M. petraea*.

1.2.3. *Micromeria croatica* (Pers.) Schott

Naziv: *Micromeria croatica* (Pers.) Schott

Red: Lamiales

Porodica: *Lamiaceae*

Rod: *Micromeria* Benth.

Narodno ime: hrvatska bresina, hrvatski
vršić



Slika 3. *Micromeria croatica* (Pers.) Schott (Flora Croatica Database, Nikolić i sur., 2001).

Rod bresina (*Micromeria* Benth.) obuhvaća oko 70 vrsta, od čega je 21 vrsta pronađena u Europi, a devet u Hrvatskoj (Kremer i sur., 2011b). Hrvatska bresina endemična je ilirsko-balkanska vrsta rasprostranjena u alpskom i subalpskom području na visini od 150m do 2000 m, a u Hrvatskoj je zabilježena na području Kalnika, Kleka, Samarskih stijena, Risnjaka, Velebita, Poštaka, Dinare, Like, Krbave te u donjem dijelu kanjona Cetine. Zanimljivo je da nalazišta na Kalnika, Samarskim stijenama i Risnjaku u novije vrijeme nisu potvrđena. Višegodišnja je biljka s 5 cm do 30 cm dugim stabljikama, dlakavim lišćem bez petiljke te ružičastoljubičastim cvjetovima (Kremer i sur., 2011b).

Vrste roda *Micromeria* bogate su eteričnim uljima te je dosada veliki broj istraživanja bio usmjeren upravo na određivanje sastava eteričnih ulja (Marinković i sur., 2003; Kostadinova i sur., 2007) U hrvatskoj bresini također je određen sastav eteričnih ulja (Slavkovska i sur., 2005; Kremer i sur., 2012) i njihova biološka aktivnost (Marinković i sur., 2003; Vuko, 2012). Sastav eteričnih ulja pokazao se značajnim i za kemotaksonomske studije (Slavkovska i sur., 2005; Kremer i sur., 2012).

Antioksidativna aktivnost i polifenolni spojevi u tri vrste roda *Micromeria* istraženi su u radu Vladimir-Knežević i sur. (2011). Vrsta *M. croatica* pokazala je najviši udio ukupnih fenola, tanina i fenolnih kiselina.

1.2.4. *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst

Naziv: *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst

Red: *Rhamnales*

Porodica: *Rhamnaceae*

Rod: *Rhamnus* L.

Narodna imena: srednja krkavina, primorska krkavina, vmesna krhlika, smrdiličje, orehovac



Slika 4. *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst (Flora Croatica Database, Nikolić i sur., 2001).

Rod krkavina (*Rhamnus* L.) obuhvaća od 125 do 200 vrsta rasprostranjenih većinom na sjevernoj hemisferi te u Brazilu i Južnoj Africi. U Europi je opisano 13 vrsta od kojih 8 vrsta raste u Hrvatskoj: *R. alaternus* L., *R. cathartica* L., *R. fallax* Boiss., *R. intermedia* Steud. et Hochst., *R. orbiculata* Bornm., *R. pumila* Turra, *R. saxatilis* Jacq. i *R. tinctorius* W. K. (Maleš, 2010). Jedna od njih je i srednja krkavina (*Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst), endemična ilirsko-balkanska vrsta rasprostranjena u mediteranskoj i sub-mediteranskoj regiji u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori te Albaniji. Vrsta *R. intermedia* razgranati je listopadni gram visine do 0,8 m. Listovi su jajasti do okruglasti, dugi od 0,9 cm do 1,5 cm, široki od 0,5 cm do 1 cm. Plodovi, koji se koriste u tradicionalnoj medicini, promjera su od 4 mm do 5 mm i crne boje (Šilić, 2005).

Kora i plodovi vrsta roda *Rhamnus*, pa tako i srednje krkavine, stoljećima se koriste za pročišćavanje organizma. U novije vrijeme postoje podaci o sastavu fitokemikalija prisutnih u kori vrsta roda *Rhamnus*. Određen je udio ukupnih fenola, glukofrangulina, tanina te fenolnih kiselina u šest vrsta roda *Rhamnus*, među kojima je vrsta *R. intermedia* pokazala najviši udio fenolnih kiselina (Maleš i sur., 2010a). Nadalje, dokazano je da biljke iz roda *Rhamnus* sadrže antrakinone, sekundarne metabolite s izrazitom biološkom aktivnošću (Locatelli i sur., 2011; Locatelli i sur., 2012; Genovese i sur., 2012), a koji su bili istraživani i u vrsti *R. intermedia* (Kosalec i sur., 2013).

1.3. SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI

Rast i razvoj biljke, kao i njezin opstanak te komunikacija s okolinom regulirani su velikim brojem molekula sintetiziranih u biljci, poznatih pod nazivom biljni metaboliti. Biljni metaboliti dijele se u dvije skupine: na primarne i sekundarne metabolite (Kliebenstei i Osbourn, 2012). Primarni metaboliti omogućuju osnovne funkcije u biljci i prisutni su u svim biljkama. To su šećeri, masne kiseline, aminokiseline i nukleinske kiseline. Sekundarni biljni metaboliti su spojevi sintetizirani u biljkama te sudjeluju u interakciji biljke s okolinom, a produkt su sekundarnog metabolizma. Dugo se smatralo da oni nisu neophodni za rast i razvoj biljaka, no novija istraživanja sve više potvrđuju njihovu esencijalnu ulogu u razvoju biljaka, a posebno u prilagodbi i preživljavanju u nepovoljnim uvjetima (Kliebenstein i Osbourn, 2012). Jedan od najvećih problema u istraživanju sekundarnih metabolita jest nedostatak metoda za njihovu detekciju, kao i detekciju njihovih prekursora i derivata te nedostatak komercijalno dostupnih standarada. U posljednjih nekoliko godina veliki je napredak postignut u razvoju novih metoda visoke razlučivosti i osjetljivosti. Nažalost, u biljkama postoji veliki broj sekundarnih metabolita prisutnih u količinama koje su još uvijek ispod granice detekcije postojećih modernih uređaja što otežava istraživanja njihovih biosintetskih puteva (Bednarek i Osbourn, 2009). Osim važnih uloga u biljci, upravo su mnogi sekundarni metaboliti odgovorni za blagotvoran i pozitivan učinak biljaka na zdravlje ljudi, stoga ih se često naziva i bioaktivnim komponentama, fitokemikalijama i nutraceuticima. Do sada je otkriveno oko 100 000 različitih bioaktivnih spojeva, a ta se brojka gotovo svakodnevno povećava (Ribera i Zuniga, 2012).

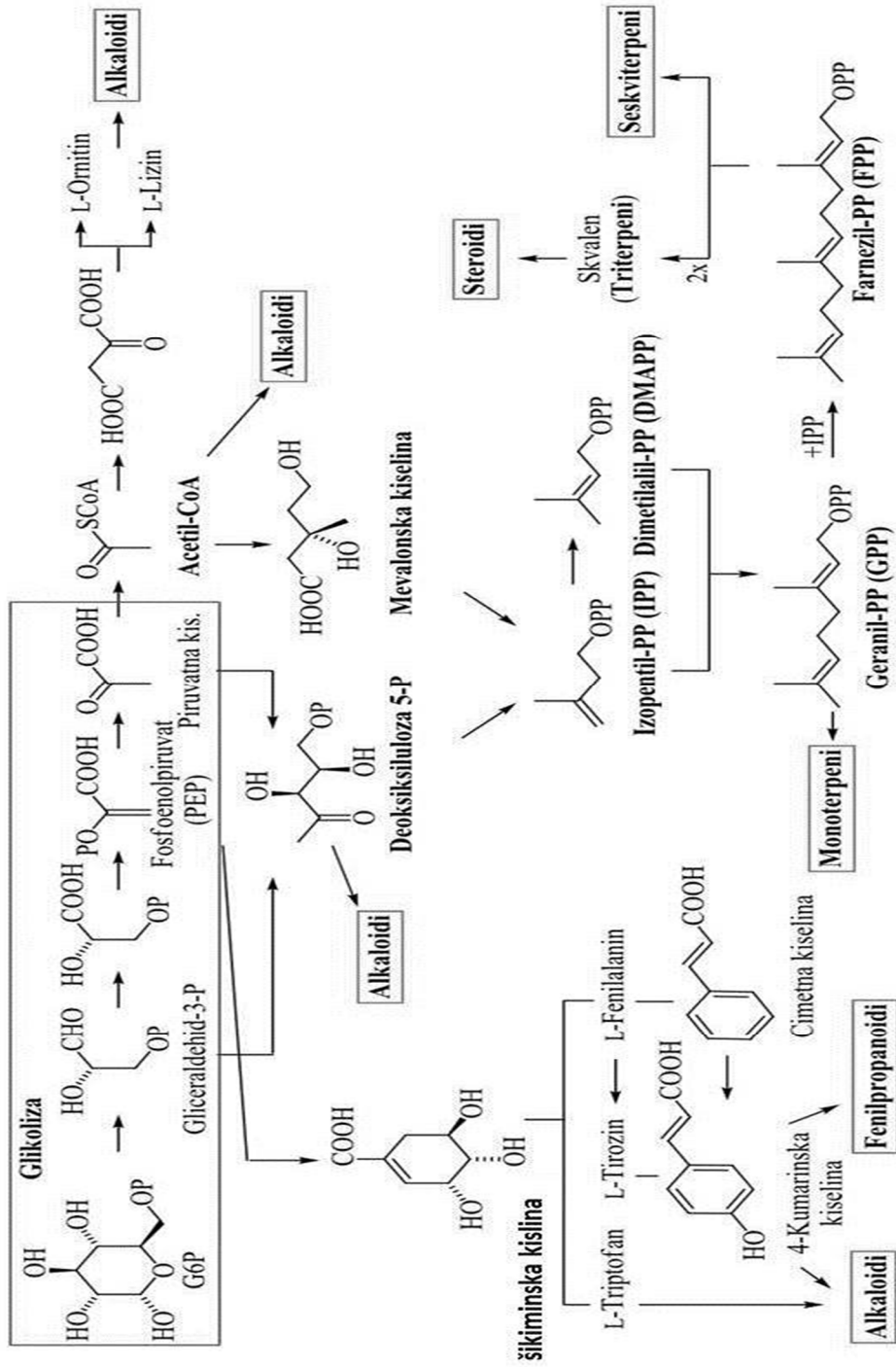
Sekundarni biljni metaboliti dijele se na tri velike skupine: fenole, terpene te spojeve s dušikom (alkaloide, glukozinolate i cijanohidrate) (Bourgauđ i sur., 2001; Crozier i sur. 2006) (Tablica 1.).

Tablica 1. Podjela sekundarnih metabolita na skupine i podskupine (Crozier i sur., 2006).

Polifenoli	<u>Flavonoidi:</u> flavonoli flavoni flavan-3-oli antocijani flavanoni izoflavoni
	<u>Neflavonoidi:</u> fenolne kiseline hidroksicinamati stilibeni
Spojevi sa sumporom	Glukozinolati Izotiocijanati
Terpeni	Monoterpeni Diterpeni Seskviterpeni Triterpeni Karotenoidi
Alkaloidi	Benzilzokvinolini Tropan alkaloidi Nikotin Terpenoid indol alkaloidi Purinski alkaloidi Pirrolizidinski alkaloidi Kvinolizidinski alkaloidi Steroidal glikoalkaloidi Konini Betalaini

Predstavници iz skupine polifenola prisutni su u svim biljkama dok su npr. alkaloidi puno specifičniji za pojedinu vrstu ili kultivar (Bourgaud i sur., 2001) što ponajprije ovisi o njihovoj ulozi u samoj biljci. Polifenoli su npr. uključeni u sintezu lignina, koji je prisutan u svim biljnim vrstama, dok se alkaloidi koji imaju puno specifičnije uloge sintetiziraju u specifičnim uvjetima i samo u pojedinim vrstama ili kultivarima. Još nije u potpunosti razjašnjeno zašto samo u nekim biljkama dolazi do sinteze specifičnih sekundarnih metabolita. Novija istraživanja upućuju na to da su odgovorni određeni geni čija je regulacija ekspresije još nedovoljno istražena (Kliebenstein i Osbourn, 2012). Nadalje, mjesto sinteze sekundarnih metabolita u biljci nije ujedno i mjesto njihovog nakupljanja. Tako se hidrofilni spojevi najčešće akumuliraju u vakuolama dok su lipofilni pretežno prisutni u smolnim kanalima, uljnim stanicama, trihomama te kutikuli (Engelmeier i Hadacek, 2006). Iako detaljni procesi biosinteze sekundarnih metabolita u biljkama još uvijek nisu razjašnjeni,

poznato je da biosinteza većine metabolita proizlazi iz putova šikiminske kiseline, acetil koenzima A, mevalonske kiseline te deoksisiluloze 5-P (Dewick, 2002) (Slika 5.).



Slika 5. Biosintetski put sekundarnih metabolita prema Dewick (2002) (preuzeto i prilagođeno iz disertacije Cakić, 2012).

1.3.1. Polifenoli

Polifenoli su najveća skupina sekundarnih metabolita. Do sada ih je otkriveno oko 8000, a obuhvaćaju jednostavne spojeve poput fenolnih kiselina, ali i velike polimerizirane spojeve kao što su kondenzirani tanini. Sastoje se od jednog ili više aromatskih prstenova koji posjeduju jednu ili više hidroksilnih grupa (Dai i Mumper, 2010). Iako se polifenoli najčešće spominju kao spojevi s fenolnim prstenom oni su zapravo veoma raznolika skupina sekundarnih metabolita zbog čega su u literaturi prisutni mnogi načini njihove klasifikacije: prema strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, na temelju biološke aktivnosti, biosintetskog puta i sl. (Tsao, 2010). Neke od skupina i podskupina polifenolaprikazane su u Tablici 2.

Začetnici istraživanja polifenola bili su britanski fitokemičari E. C. Bate-Smith i Tony Swain sredinom 20.-og stoljeća, dok su intenzivnija istraživanja u tom području započela devedesetih godina prošlog stoljeća (Haslam, 2007).

Istraživanja na polifenolima mogu se podijeliti u pet glavnih područja u posljednjih 50 godina (Boudet, 2007):

- Karakterizacija enzima uključenih u biosintetski put.
- Uporaba molekularne biologije u ispitivanju gena povezanih s promjenom metabolizma.
- Primjena funkcionalne genomike radi određivanja funkcije gena/enzima.
- Uporaba genetičkog inženjeringa radi optimizacije količine polifenola od interesa u biljkama.
- Epidemiološke studije koje podupiru hipotezu o pozitivnom učinku polifenola na ljudsko zdravlje.

Tablica 2. Podjela polifenola (Fuss i sur., 2003; Chong i sur., 2009; Stalikas, 2010).

Flavonoidi	
Neflavonoidi	
<p>hidroksibenzojeve kiseline</p>	<p>Fenolne kiseline</p> <p>←</p>
<p>$R_1, R_2, R_3 = H, OH, OCH_3$</p>	<p>hidroksicimetne kiseline</p>
<p>Stilibeni</p> <p>$R_3, R_5, R_3'', R_4'' = H, OH, OCH_3, OGl u$</p>	<p>Lignani</p> <p>primjer: (+) - eterolakton</p>
Kondenzirane forme polifenola	
<p>Kondenzirani tanini</p> <p>Polimeri</p>	<p>Oligomeri</p> <p>Ostale kondenzirane forme</p>

U novije vrijeme, polifenoli se kao skupina sekundarnih biljnih metabolita istražuju multidisciplinarnim pristupima koji uključuju istraživanja u biljnoj biologiji te fiziologiji, analitičkoj kemiji, farmakologiji, medicini, prehrambenoj tehnologiji, nutricionizmu i agronomiji. Ovi spojevi nisu više samo predmet istraživanja biljnih biologa već su to komponente s brojnim učincima i potencijalnom primjenom u širokoj sferi ljudskih i komercijalnih interesa (Quideau i sur., 2011).

Razvijene su mnoge analitičke i instrumentalne metode za detekciju i identifikaciju polifenola. Za njihovo kvantitativno određivanje u biljnom tkivu često se koriste spektrofotometrijske metode, dok se za točnu identifikaciju koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti povezana sa spektrometrom masa (LC-MS). U posljednjih nekoliko godina sve se više razvijaju i metode tekućinske kromatografije koje koriste ultra visoke tlakove (UPLC) povezane sa spektrometrima masa (MS) (Gruz i sur., 2008; Prokudina i sur., 2012) koje omogućuju veću rezoluciju i brzu kvantifikaciju.

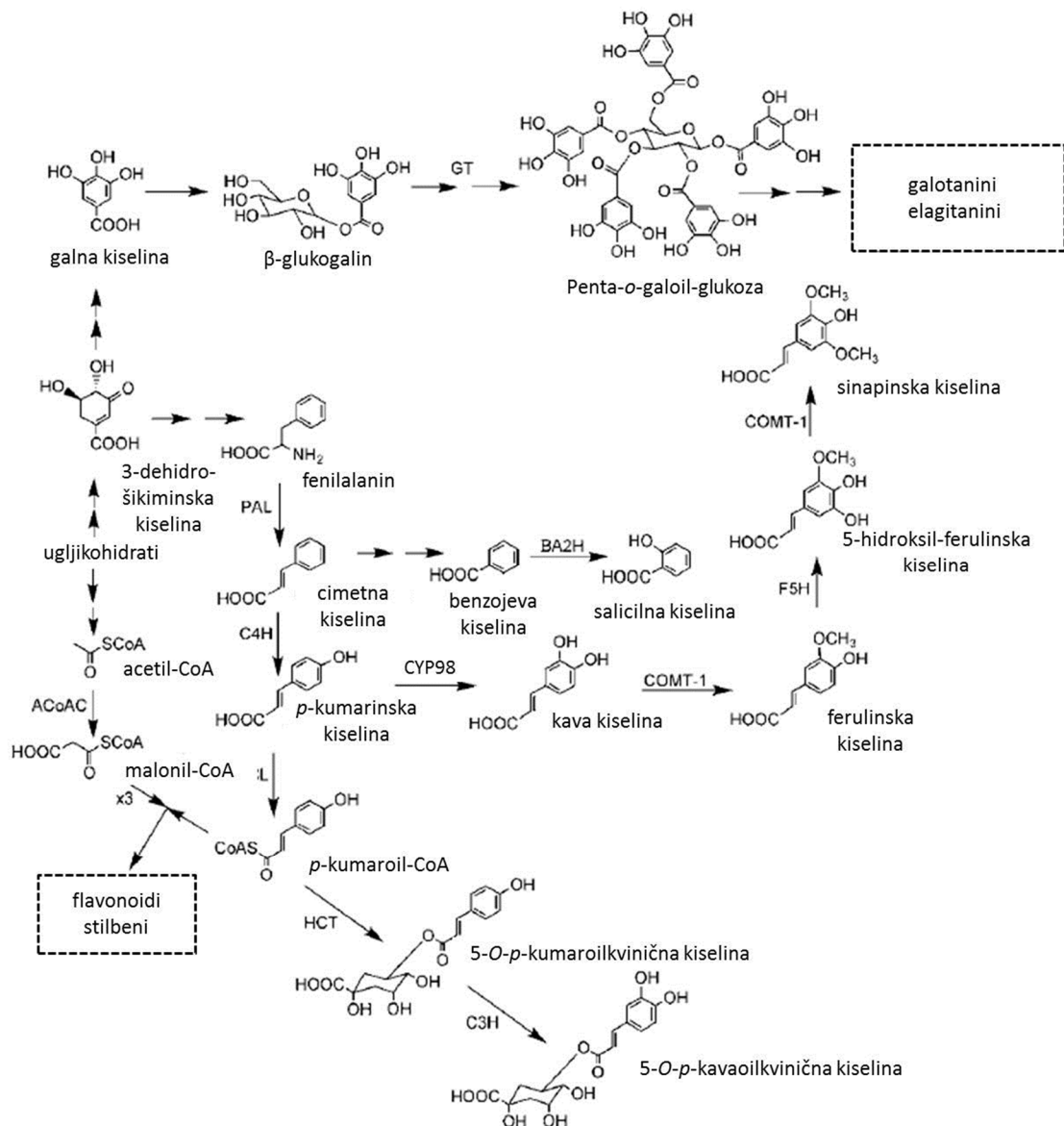
U biljci spojevi iz skupine polifenola imaju različite uloge, kao sastavnice podupirajućih i zaštitnih tkiva, obrambeni su signali, sudjeluju u razmnožavanju jer kao atraktanti privlače oprašivače, djeluju kao aleopatski agensi, štite biljku od ultraljubičastog zračenja te su signalne molekule u interakciji biljke s okolinom (Jaganath i Crozier, 2010). Najčešće se u biljkama nalaze u obliku glikozida različitih šećera. Flavonoidi kao podskupina polifenola obuhvaćaju preko 4000 do sada otkrivenih spojeva i zauzimaju prvo mjesto među istraživanim sekundarnim metabolitima (Scalbert i sur., 2005). Veliki interes za flavonoide, prvenstveno je potaknut njihovim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje.

1.3.2. Sinteza polifenola u biljkama

Biosintetski put polifenola u biljci uključuje putove šikiminske kiseline, fenilpropanoide i flavonoida (Slika 6.). Kao što je spomenuto, polifenoli podrazumijevaju veliku skupinu sekundarnih metabolita. Iako se u posljednjih nekoliko godina intenzivno istražuju, detaljni koraci biosintetskih putova nisu još uvijek potpuno razjašnjeni te se u literaturi često nailazi na oprečne rezultate. Većina fenolnih kiselina su derivati *trans*-cimetne kiseline formirane deaminacijom L-fenilalanina uz pomoć L-fenilalanin amonij liaze (PAL). Enzim PAL povezuje primarni (biosintetski put šikiminske kiseline) sa sekundarnim metabolizmom (fenil propanoidni biosintetski put), te ima ključnu ulogu u regulaciji sinteze fenolnih sekundarnih metabolita zbog čega je godinama upravo PAL bio najviše istraživani biljni enzim (Boudet, 2007). U biosintetski put polifenola uključeno je više od šesnaest enzima iz skupine citokroma P450 monooksigenaza. Prva među njima je izolirana cinamat 4-hidroksilaza (C4H), a njezina inaktivacija u transgeničnim biljkama uzrokuje smanjenje količine klorogenske kiseline, flavonoida i lignina (Ruegger i Chapple, 2001; Reddy i sur., 2005). Enzimi 3-hidroksilaze su uključene u sintezu kava kiseline iz *p*-kumarinske kiseline (Schoch i sur., 2001; Nair i sur., 2002; Franke i sur., 2002), a važne su kod sinteze klorogenske (Mahesh i sur., 2007) i ružmarinske kiselinu (Morant i sur., 2007). Među 5-hidroksilazama važna je ferulat 5-hidroksilaza (F5H) koja ima centralnu ulogu u sintezi lignina (Reddy i sur., 2005). Također, u sintezi lignina sudjeluju i *p*-kumarat-CoA ligaze (4CL), a enzimi iz te porodice sudjeluju i u biosintezi flavonoida (Hu i sur., 1998). U biosintetskom putu polifenola važnu ulogu imaju i dvije cinamil alkohol dehidrogenaze: CAL1 i CAL2 koje su uključene u biosintezu lignina i lignana (Damiani i sur., 2005).

Osim PAL enzima, polifenol oksidaza (PPO) i polifenol peroksidaza (PPD), dva su enzima važna za regulaciju razine polifenola u biljci zbog uloge u oksidativnoj degradaciji fenolnih komponenata, što je bitno kod uporabe biljaka bogatih polifenolima u prehrambenoj industriji (Tomas-Barberan i Espin, 2001). PPO je lokalizirana u plastidima viših biljaka te uz prisutnost kisika katalizira hidroksilaciju monofenola u *o*-difenole i oksidaciju *o*-difenola u *o*-kinone koji zatim spontano bez djelovanja enzima polimeriziraju u heterogene crne, smeđe ili crvene pigmente poznate pod nazivom melanini. Takvi procesi su bitni kod ozljede biljnog tkiva gdje dolazi do aktivacije PPO koja stvarajući spomenute polimerizirane pigmente zatvara mjesto ozljede te na taj način sprečava daljnje oštećenje tkiva ili ulazak

insekata (Stevenson i Hurst, 2007). PPO može djelovati i kao promotor POD koji u prisutnosti vodikova peroksida katalizira oksidaciju polifenolnih komponenata. Aktivnost PAL, PPO i POD ovisi o različitim vanjskim čimbenicima koji utječu na razinu polifenolnih komponenata u biljci (Tomas-Barberan i Espin, 2001).



Slika 6. Biosintetski put polifenola s ključnim enzimima (PAL, fenilalanin amonij liaza; BA2H, 2-hidroksilaza benzoilne kiseline; C4H, cinamat 4-hidroksilaza; COMT-1, *O*-metiltransferaza kava/5 hidroksiferulinske kiseline; 4CL, *p*-kumarat-CoA ligaza; F5H, ferulat 5-hidroksilaza; GT, galoiltransferaza; AcoAC, acetilCoA karboksilaza) (Jaganath i Crozier, 2010).

1.3.3. Polifenoli u kemotaksonomiji

Polifenoli su mnogobrojna i diferencirana skupina sekundarnih metabolita prisutna u svim biljkama, iako njihova količina i sastav ovisi o raznim unutarnjim i vanjskim čimbenicima (Dai i Mumper, 2010). Kako polifenoli sudjeluju u komunikaciji biljke s okolinom njihova količina uvelike ovisi o vanjskim uvjetima rasta. U biljkama se povećava udio polifenolnih komponenata uslijed stresnih uvjeta (Lule i Xia, 2005). Prijašnja istraživanja pokazala su da lokalitet rasta utječe na razinu polifenola u ljekovitom i endemičnom bilju (Šamec et al., 2010; Zovko Končić et al., 2010).

Zbog činjenice da sastav i razina polifenola u nekoj biljci značajno ovisi o porodici kojoj pripada, u novije vrijeme polifenoli se sve češće koriste kao biomarkeri u kemotaksonomskim istraživanjima (Kremer i sur., 2011c; Jurišić Grubešić i sur., 2012). Malo je studija koje istovremeno istražuju korelacije između profila fitokemikalija i genetske varijabilnosti u biljkama ovisno o lokalitetu rasta. Rezultati takvih istraživanja ovise o biljnim vrstama i korištenim metodama te su često oprečni. Istraživanja na vrstama *Teucrium flavum* L., *Teucrium polium* L. i *Teucrium scorodonia* L. pokazala su da varijacije u sastavu i razini eteričnih ulja više ovise o genetičkoj podlozi nego o lokalitetu rasta (Djabou et al., 2011; Djabou et al., 2012a; Djabou et al., 2012b). Smelcerovic i sur. (2006) su istražujući genetsku varijabilnost RAPD i SSR markerima te profil polifenola u 6 vrsta roda *Hypericum* dobili bolju korelaciju polifenola s RAPD u odnosu na SSR markere. Suprotno tome, Grass i sur. (2006) nisu dobili pozitivnu korelaciju između sastava sekundarnih metabolita i genetske varijabilnosti kod jesenskog maslačka (*Leontodon autumnalis* L) uzorkovanog na 24 lokaliteta u centralnoj Europi. Genetsku varijabilnost istražili su koristeći RAPD markere dok je sastav flavonoida, fenolnih kiselina i seskveterpenoida određen tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC). Nadalje, istraživanja na divljem hmelju (*Humulus lupulus* L.) nisu pokazala korelaciju između genetska varijabilnost i sastava polifenola (Patzak et al., 2010). Polifenoli kao markeri u kemotaksonomiji uspješno su korišteni u istraživanju 89 divljih i kultiviranih svojti čajevca (*Camellia sinensis* L.) gdje je pokazana dobra korelacija između razine polifenola i genetske varijabilnosti (Li et al., 2010). Zbog oprečnosti literaturnih podataka utjecaj genetske varijabilnosti na sintezu polifenola unutar neke vrste još nije u potpunosti razjašnjen i zahtjeva dodatna istraživanja.

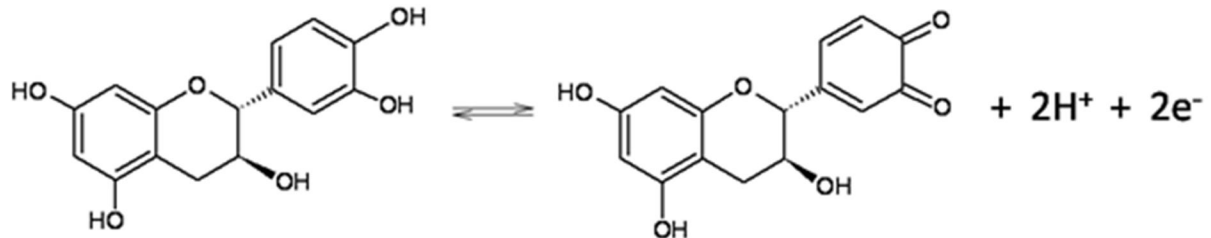
1.3.4. Polifenoli i zdravlje

Polifenoli, a posebno flavonoidi postali su najviše istraživana skupina sekundarnih metabolita sredinom devedesetih godina prošlog stoljeća zbog njihove biološke aktivnosti i pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Sve je više znanstvenih studija koje podupiru hipotezu da prehrana bogata polifenolima ima preventivnu ulogu u nastajanju kardiovaskularnih bolesti, nekih vrsta karcinoma, dijabetesa tipa 2, bolesti probavnog trakta i sl. Polifenoli u prehrani su u visokim koncentracijama zastupljeni u voću (Piljac-Žegarac i Šamec, 2011; Šamec i Piljac-Žegarac, 2010) i povrću (Šamec i sur., 2011) te njihovim prerađevinama (Piljac-Žegarac i sur., 2009; Piljac-Žegarac i sur., 2012), ali i u biljnim napitcima. Posebno se ističu ljekovite biljke i njihovi infuzi kao bogat izvor polifenola (Katalinić i sur., 2006; Surveswaran i sur., 2007; Li i sur., 2008).

Veliki broj biokemijskih procesa u našem organizmu potiče stvaranje slobodnih radikala (engl. *reactive oxygen species*- ROS). To je skupina veoma reaktivnih molekula koje uključuju reaktivne kisikove vrste (ROS), superoksida (O_2^{\bullet}), hidroksila (HO^{\bullet}), peroksila (ROO^{\bullet}), vodikov peroksid (H_2O_2), slobodni kisik (O_2), dušikove okside (NO^{\bullet}), peroksinitrate ($ONOO^{\bullet}$) i hipokloride ($HOCl$) (Noorhajati i sur., 2012). U normalnim uvjetima, homeostaza slobodnih radikala regulirana je antioksidansima prisutnim u organizmu. U specifičnim uvjetima, uslijed izloženosti negativnim vanjskim čimbenicima ili bolesti ta je homeostaza narušena. U tom slučaju u organizmu nastaje višak slobodnih radikala koji mogu oštetiti lipide, proteine, ugljikohidrate ili DNA, te na taj način izazvati različita patološka stanja (Zhao i sur., 2005). Proces lipidne oksidacije uključen je u procese starenja jer lipidi koji ulaze u sastav kože reagiraju sa slobodnim radikalima i prelaze u lipidne peroksida koji ubrzavaju starenje (Lee i sur., 2001). Nadalje, oštećenja staničnih membrana lipidnom oksidacijom i/ili oštećenja DNA izazvana slobodnim radikalima povezana su i sa nastajanjem mnogih bolesti kao što su neke vrste karcinoma, ateroskleroza i neurodegenerativne bolesti (Deng i sur., 2005). Uslijed povećane razine slobodnih radikala povećava se razina lipoproteina male gustoće (engl. *low density lipoprotein*- LDL) koji uzrokuju nakupljanje kolesterola što dovodi do razvoja kardiovaskularnih oboljenja (Noorhajati i sur., 2012).

U situaciji kada je ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidansa u organizmu narušena potrebno je unositi antioksidanse hranom. Jedni od najjačih antioksidansa

prisutnih u hrani upravo su polifenoli koji zbog svoje specifične kemijske strukture imaju sposobnost prekidanja lančanih reakcija doniranjem atoma vodika ili elektrona slobodnom radikalu (Slika 7.), dok sami poprimaju stabilne, nereaktivne konformacije



Slika 7. Reakcija oksidacije katehina pri čemu dolazi do otpuštanja dva elektrona i dva vodikova protona (Piljac i sur., 2004).

Kemijska struktura molekule polifenola osnova je njezinog djelovanja kao antioksidansa. U slučaju npr. fenolnih kiselina antioksidativno djelovanje ovisi o broju i poziciji hidroksilnih skupina u odnosu na karboksilne skupine (Balasundram i sur., 2006). Monohidroksibenzojeve kiseline s $-OH$ skupinom na *orto* ili *para* poziciji u odnosu na $-COOH$ skupinu ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost, dok *m*-hidroksibenzojeve kiseline imaju antioksidativni učinak. Općenito, antioksidativno djelovanje fenolnih kiselina raste s povećanjem broja hidroksilnih grupa, iako fenolne kiseline koje imaju na poziciji 3- i 5- metoksilne grupe imaju smanjenu aktivnost. Hidroksicimetne kiseline pokazuju jaču aktivnost u usporedbi s hidroksibenzojevim kiselinama jer posjeduju $CH=CH-COOH$ grupu koja lakše donira H atome nego $-COOH$ skupina prisutna u hidroksibenzojevim kiselinama (Rice-Evans i sur., 1996). Antioksidacijsko djelovanje flavonoida u ovisnosti o kemijskoj strukturi nešto je složenije nego ono kod fenolnih kiselina, a ovisi ponajprije o značajkama i prirodi supstituenata na B i C prstenu kod osnovne strukture flavonoida (Tablica 2.) (Balasundram i sur., 2006).

U ljudskom organizmu antioksidansi djeluju na tri načina (Noorhajati i sur., 2012):

- spečavaju ili inhibiraju nastanak lipidnih peroksida
- neutraliziraju slobodne radikale
- popravljaju štetu izazvanu djelovanjem slobodnih radikala

Kako bi se moglo lakše odrediti koja nam hrana ili biljni pripravci mogu pomoći kod prevencije gore opisanih stanja razvijen je čitav niz metoda koje mjere antioksidacijsku

aktivnost u *in vitro* uvjetima. Mnoge studije potvrđuju da biljni ekstrakti s izrazitom aktivnošću u *in vitro* testovima pokazuju aktivnost i u *in vivo* uvjetima (Alam i sur., 2012), te se *in vitro* metode sve više koriste kao prvi korak u ispitivanju potencijalne antioksidacijske aktivnosti nekog biljnog spoja.

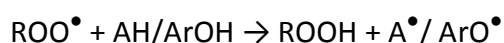
1.4. IN VITRO TESTOVI ZA MJERENJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI BILJNIH EKSTRAKATA

Istraživanja u području biljnih antioksidansa, posebno polifenola, veoma su raširena posljednjih godina. Baza podataka *Web of Science* pokazuje 2809 radova s ključnim riječima "polyphenols+antioxidant", dok je u bazi podataka *Scopus* pronađeno 2686 takvih radova tijekom 2011. i 2012. godine (13. svibnja 2013). Kako je to intenzivno istraživano područje već se dugi niz godina vode rasprave da se neka metoda preporuči kao standardna metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti jer različiti autori koriste različite metode (Frankel i Finley, 2008). Međunarodna organizacija AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) 2012. godine (AOAC, 2012) je preporučila ORAC metodu za mjerenje antioksidacijske aktivnosti u hrani kao standardnu metodu, no za istraživanja u biljnoj biologiji još se uvijek koriste različite metode. U mjerenju antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata najčešće se koriste spektrofotometrijske (Karadag i sur., 2009) i fluorimetrijske metode, no u novije vrijeme sve se češće koriste i elektrokemijske metode (Piljac-Žegarac i sur., 2010; Barros i sur., 2011) te FT-IR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy Technique*) spektroskopske tehnike (Lu i sur., 2011).

1.4.1. Spektrofotometrijske metode

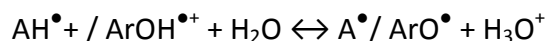
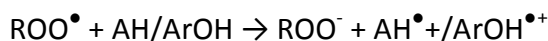
Spektrofotometrijske metode mogu se podijeliti u dvije skupine: metode bazirane na prijenosu vodikovih atoma i metode bazirane na prijenosu elektrona (Apak i sur., 2007).

Metode bazirane na prijenosu vodikova atoma mjere sposobnost antioksidansa prisutnog u biljnom ekstraktu da neutralizira negativno djelovanje slobodnog radikala donirajući vodikov (H) atom. Mehanizam u kojem se donira vodikov atom (Ar-H) slobodnom radikalu (ROO^\bullet) može se pojednostavljeno prikazati formulom (Apak i sur., 2007):



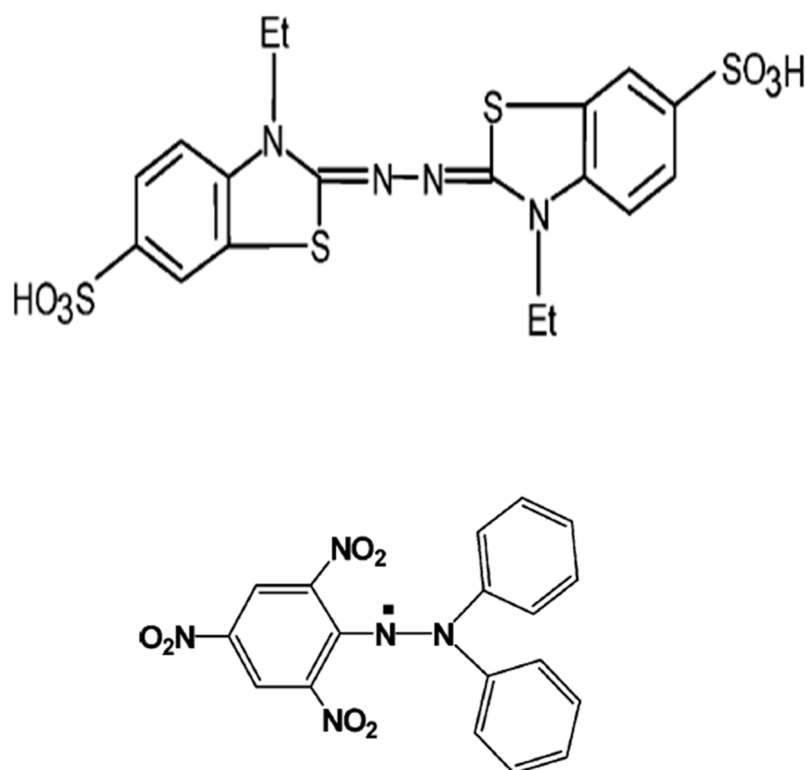
gdje je ArO^\bullet ariloksilni radikal stabiliziran rezonancijom. U metodama mjerenja antioksidacijske aktivnosti baziranim na prijenosu vodikovih atoma, i fluorescentne probe i antioksidansi reagiraju s ROO^\bullet , a antioksidacijska aktivnost se određuje mjerenjem kinetike reakcije gubitka fluorescencije uz prisutnost i bez prisutnosti antioksidansa te integriranjem površine ispod krivulja. Ove metode često nisu ovisne o otapalu i pH vrijednosti te su brze, praktične i zbog toga često korištene (Prior, 2005). Najčešće korištena metoda bazirana na prijenosu vodikovih elektrona jest ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) gdje se kao izvor slobodnih radikala najčešće koristi AAPH (engl. *2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride*) (Prior et al. 2003), a osim fluorimetrijski reakcija se može pratiti i spektrofotometrijski. Ostale metode bazirane na prijenosu vodikovih atoma su TRAP (engl. *Radical Trapping Antioxidant Parameter*) (Wayner i sur., 1985) te metode izbjeljivanja krokina (Bors i sur., 1984) ili β -karotena (Burda i sur., 2001).

Metode bazirane na prijenosu elektrona nešto su sporije od metoda baziranih na prijenosu vodikovih atoma te su vrlo osjetljive na promjenu otapala i pH otopine (Apak i sur., 2007). Mehanizam metode prikazan je shematski:



U većini metoda koje mjere antioksidacijsku aktivnost zasnovanu na prijenosu elektrona antioksidans reagira s obojenom probom umjesto slobodnog radikala što izaziva promjenu boje te se može detektirati spektrofotometrom. Koncentracija antioksidansa prisutnih u uzorku proporcionalna je intenzitetu promjene boje. Najraširenija metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti bazirana na prijenosu elektrona jest FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) (Benze i Strain, 1996) gdje se mjeri redukcija žuto obojenog TPTZ-a (željezo 2,4,6-tripiridil-s-triazina) u plavo obojeni produkt. Nadalje, CUPRAC (engl. *Copper Reduction Assay*) kao varijacija FRAP metode koja umjesto željeza koristi bakar bazirana je također na prijenosu elektrona (Prior i sur., 2005).

Osim spektrofotometrijskih metoda koje su bazirane samo na prijenosu elektrona ili vodikovih atoma, postoje metode koje uključuju i prijenos elektrona i prijenos vodikovih atoma. Najraširenije metode iz te skupine su TEAC (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metoda, često nazivana i ABTS metoda, te DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) metoda (Prior i sur., 2005). Obje metode bazirane su na sposobnosti antioksidansa od interesa da neutraliziraju djelovanje slobodnog radikala: $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Slika 8a.) kod TEAC metode ili DPPH^{\bullet} (Slika 8b.) u DPPH metodi.

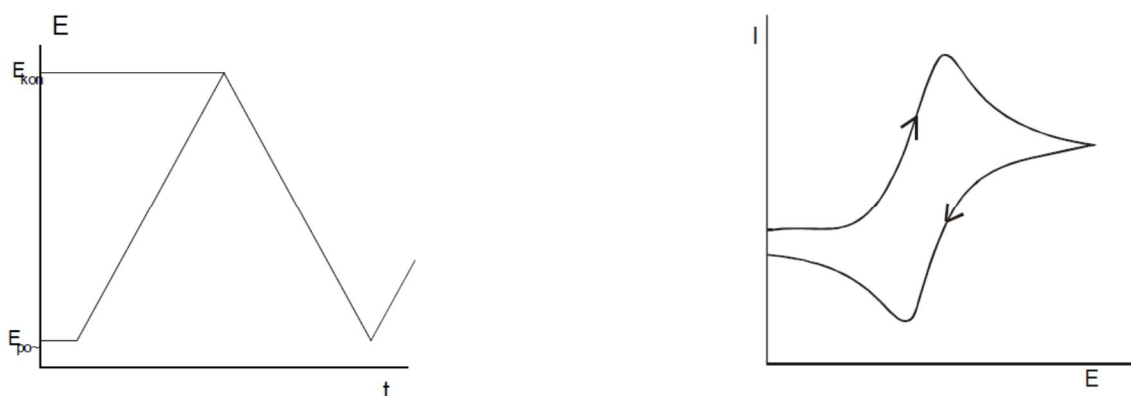


Slika 8. Kemijska struktura: a) $\text{ABTS}^{\bullet+}$ te b) DPPH^{\bullet} radikala.

Spektrofotometrijske metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti su i metode koje mjere količinu produkta oksidacije sa i bez prisutnosti testiranog ekstrakta. Takve metode su npr. metoda mjerenja zaštitne uloge od oštećenja proteina koja mjeri količinu nastalih karbonila (Mayo i sur., 2003) ili metoda s amonij tiocijanatom (Yen i Hsien, 1998) koja mjeri količinu nastalih lipidnih peroksida u emulziji linolne kiseline inkubirane sa i bez prisutnosti biljnih ekstrakata

1.4.2. Elektrokemijske metode

Primjena elektrokemijskih metoda u istraživanju antioksidacijske aktivnosti temelji se na sposobnosti antioksidansa da se ponaša kao reducirajući agens na elektrodi. Najčešća elektrokemijska metoda koja se koristi jest ciklička voltometrija koja omogućuje brzo dobivanje podataka o termodinamici redoks procesa, kinetici heterogenih procesa prijenosa elektroda ili adsorpcijskim procesima. Sama se metoda temelji na analizi vala anodne struje (I_a) koji je funkcija redukcijskog potencijala određenog spoja u uzorku. Osnovni princip na kojem se metoda zasniva je da se potencijal radne elektrode linearno mijenja s vremenom i to od početnog potencijala, $E_{poč}$, do konačnog potencijala, E_{kon} , i natrag (Slika 9.). Rezultat ovakve linearne trokutaste pobude, elektrokemijska je reakcija na elektrodi, a registrira se kao krivulja struja-potencijal (I - E krivulja). Brzina promjene potencijala (posmika) može se mijenjati u širokom rasponu potencijala, pa se ovom tehnikom mogu ispitivati kako spore tako i vrlo brze elektrodne reakcije.



Slika 9. Signal pobude i odziva u cikličkoj voltametriji.

Redukcija antioksidansa na elektrodi prati se u obliku vala na I - E krivulji. Iz analize vala, te površine ispod anodnog vala mogu se dobiti podaci o djelovanju komponente kao antioksidansa.

1.5. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Ciljevi:

- odrediti sastav polifenolnih komponenti u endemičnim vrstama (*Teucrium arduini*, *Moltkia petraea*, *Micromeria croatica* i *Rhamnus intermedia*) s obzirom na geografsko podrijetlo, te usporediti njihov sastav u različitim biljnim organima.
- istražiti genetsku varijabilnost vrsta od interesa s obzirom na različito geografsko podrijetlo.
- odrediti biološku aktivnost biljnih ekstrakata s posebnim naglaskom na antioksidacijsku aktivnost.

Hipoteze:

- endemične biljne vrste bogate su fitokemikalijama te pokazuju biološku aktivnost.
- geografsko podrijetlo utječe na genetsku varijabilnost, sintezu sekundarnih metabolita te biološku aktivnost.
- kod mjerenja antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata potrebno je koristiti nekoliko metoda paralelno jer izmjerena vrijednost ovisi o korištenoj metodi.

4. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Kemikalije

- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 2,4,6- tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 2,4-dinitro-fenil-hidrazin (DNPH) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (Ellmanov reagens), (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, SAD)
- 2',7'diklorfluorescein-diacetat (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, SAD)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- agaroza (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- akrilamid otopina 30% (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- aluminijev klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- amonij ev peroksodisulfat (APS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- amonijev tiocijanat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- askorbinska kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- bakrov sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- bromfenol plavilo (Fischer Scientific, New Jersey, SAD)
- cetrimonium bromid (CTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Coomassie plavilo (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)
- dinatrijhidrogenfosfat-2-hidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Dulbeccov medij s 4500 mg/L glukoze, NaHCO₃ i piridoksinom, (Imunološki zavod, Zagreb)
- etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etidijev bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- etil-acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etilendiamintetraoctena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- galna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- glicerol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- glicin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- GlutaMAX (100X, 2 mM) (Gibco, Grand Island, NY, SAD)
- gvanidin hidroklorid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- izoamilni alkohol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- izopropanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev persulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- katehin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- kava kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- kloridna kiselina (Riedel-de Haen, Seelze, Savezna Republika Njemačka)
- kloroform (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kvercetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- linolna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- litijev perklorat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev nitrat (Laphoma, Skopje, Makedonija)
- natrijev dihidrogenfosfat-dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- natrijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Neutral red (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Newborn calf serum, heat inactivated (Gibco, Grand Island, NY, SAD)
- obilježeni standardi za UPLC-MS/MS (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, SAD)
- octena kiselina (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Penicilin/streptomycin otopina (10000 U/mL penicilina i 10 mg/ml streptomicina) (Gibco, Grand Island, NY, SAD)
- polivinilpirolidon (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- standardi fenolnih kiselina za UPLC-MS/MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- tetrametiletilendiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

- trikloroctena kiselina (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- vanilin (Merck, Darmstadt, Savezna Republika Njemačka)
- vodikov peroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- željezov (III)-sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- željezov klorid heptahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- β -merkaptoetanol (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

2.1.2. Komercijalni kompleti, proteini i plazmidi

Pri izradi ovog rada korišteni su sljedeći komercijalni kompleti i proteini:

- set deoksiribonukleotida: dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Fermentas, St. Leon-Rot, Njemačka)
- rekombinantna Taq DNA polimeraza (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Njemačka)
- albumin goveđeg seruma (Serva, Heidelberg, Njemačka)
- komplet za izolaciju biljne (DNA DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Njemačka)
- plazmid ϕ X174 RF1 DNA (Termo Scientific, St. Leon-Rot, Njemačka)

2.1.3. Standardi duljine odsječka DNA i molekularne mase

Kao standard duljine odsječka DNA korišteni su:

- Smjesa odsječaka DNA 100 do 3000 bp (GeneRuler 100bp Plus DNA marker 100 do 3000bp, (Fermentas, St. Leon-Rot, Njemačka)
- Smjesa odsječaka 500 do 8000 bp (500 bp DNA marker, (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, SAD)

Kao standard molekulske mase pri analizi proteina metodom SDS-PAGE korištena je:

- Smjesa proteina niskih molekularnih masa od 20,4 do 96 kDa za elektroforezu u denaturirajućim uvjetima (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Velika Britanija)

2.1.4. Biljni materijal

Predmet istraživanja u ovom radu su četiri endemične biljne vrste Hrvatske prikupljene na različitim lokalitetima tijekom 2010 godine (Tablica 3., Slika 10.). Na svakom lokalitetu uzorci su prikupljeni po principu slučajnosti s nekoliko desetaka biljaka u vrijeme pune cvatnje te determinirane u Botaničkom vrtu "Fran Kušen" pri Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu uz pomoć dr.sc. Darija Kremera. Uzorci su osušeni na zraku u tamnoj prostoriji pri sobnoj temperaturi i čuvani u papirnatim vrećicama do analize.

Tablica 3. Popis istraživanih vrsta, analizirani biljni organi te lokaliteti rasta.

Ispitivana vrsta	Dio biljke	Lokaliteti
<i>Teucrium arduini</i>	list	Učka
	stabljika	Šušanj
	cvat	Vaganac
		Sveti Jure
		Višac
<i>Moltkia petraea</i>	list	Sniježnica
	stabljika	Dinara
	cvat	Orebić
<i>Micromeria croatica</i>	list	Stupačinovo
	stabljika	Bojinac
	cvat	Bačić Kuk
<i>Rhamnus intermedia</i>	list	Dundović Podi
	kora	Bojinac



Slika 10. Lokaliteti rasta ispitivanih biljnih vrsta a) *T. arduini*, b) *M. petraea*, c) *M. croatica*, d) *R. intermedia*.

2.2. METODE

2.2.1. Određivanje genetske varijabilnosti RAPD markerima

RAPD (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*) je metoda nasumičnog umnažanja polimorfne DNA koja koristi univerzalne početnice za sve biljne vrste (Welsh i McClelland, 1990). U usporedbi s ostalim metodama za određivanje genetske varijabilnosti brza je, jednostavna, razmjerno jeftina i zahtjeva malu količinu DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*). Zbog toga je veoma pogodna u istraživanjima rijetkih endemskih biljnih vrsta gdje nije dostupna velika količina biljnog materijala (Artyukova i sur., 2004).

2.2.1.1. Izolacija genomske DNA

Za DNA analize tkivo lista usitnjeno je u tekućem dušiku u prah te po 50 mg tkiva odvagano u tubice od 2 mL. Izolacija DNA u većini uzoraka izvršena je prema izmijenjenoj CTAB metodi (Doyle i Doyle, 1987). U uzorak je dodano po 1000 μ L ekstrakcijskog pufera (20mM Na₂EDTA pH 8,0, 100 mM Tris- HCl, 1,5M NaCl, 2% CTAB), na vrhu špatule polivinilpirolidona i 40 μ L β - merkaptoetanola. Tubice su dobro izmiješane i inkubirane 60 min na 70°C u termobloku (Bio TDB-100, Biosan, Latvija) uz povremeno lagano miješanje. Nakon inkubacije tubice su ohlađene na ledu te je u svaku dodano po 1000 μ L smjese kloroform-izoamilni alkohol (24:1). Svaki uzorak je lagano promiješan, a potom su uzorci centrifugirani 10 min na 13 000 rpm (Centrifuge 5415, Eppendorf, Njemačka). Nakon centrifugiranja odvojena je vodena faza te je postupak ponovljen još dva puta. Nakon trećeg ispiranja odvojenoj vodenoj fazi je dodano 0,6 volumena hladnog izopropanola te je DNA taložena tijekom 45 min na -20°C. Tubice su centrifugirane na 9 000 rpm u trajanju od 10 min nakon čega je vodena faza odbačena. Talog DNA ispran je dva puta s 70% etanolom te su nakon ispiranja ostaci etanola uklonjeni pomoću vakuuma u uređaju Speedvac (DNA 120 SpeedVac Concentrator, Thermo, SAD). Taloci su zatim otopljeni u 100 μ L 1 \times TE pufera.

Kvaliteta DNA provjerena je horizontalnom elektroforezom u 0,8% gelu agaroze koristeći uređaj RunOne Electrophoresis Cell (EmbiTec, San Diego, CA, SAD) u 1 \times TAE puferu pri 50V. Gel je obojan u 100 mM otopini etidijeva bromida te vizualiziran pod UV transiluminatorom (G-Box, Syngene, UK). Količina DNA kvantitativno je određena pomoću spektrofotometra (BioSpec Nano, Shimadzu, Japan). Također, snimljeni su UV (Varian Cary

100 Bio, US) te CD (cirkularni dikroizam) (Jasco J-815, Great Dunmow, Essex, UK) spektri dobivenih izolata DNA te provedeno "mekšanje" DNA.

2.2.1.2. RAPD markeri

RAPD metoda provedena je korištenjem devet različitih komercijalno dostupnih početnica (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) koje su prikazane u Tablici 4.

Tablica 4. Popis korištenih početnica.

Početnica	Sijed nukleotida
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-07	5'-GAAACGGGTG3'
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPB-06	5'-TGCTCTGCCC-3'
OPB-10	5'-CTGCTGGGAC-3'
OPC-03	5'-GGGGTCTTT-3'
OPC-06	5'-GAACGACTC-3'
OPD-15	5'-CATCCGTGCT-3'
OPE-04	5'-GTGACATGCC-3'

Nasumično umnažanje DNA fragmenata lančanom reakcijom polimeraze (PCR) provedeno je u volumenu od 25 μ L koji je sadržavao 25 ng DNA kalupa, 2,5 μ L 10 \times PCR pufera, 1,5 μ L 25 mM MgCl₂, 2 μ L 2,5 mM dNTPmix, 1,5 U TaqDNA polimeraze i 15 nmol početnice. PCR reakcija je provedena u uređaju GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, SAD) prema sljedećem temperaturnom rasporedu: 94°C 5 min; 45 ciklusa na 94°C 1 min, 37°C 1 min i 72°C 2 min. Program je završen s elongacijskim periodom od 7 min na 72°C i inkubacijom na 4°C.

Ulomci dobiveni PCR reakcijom razdvojeni su u 1,5% gelu agaroze horizontalnom elektroforezom u 1 \times TAE puferu pri 50V te vizualizirani pod UV transiluminatorom nakon bojenja s etidijevim bromidom.

2.2.2. Određivanje sastava fitokemikalija

2.2.2.1. Ekstrakcija

Osušeni biljni materijal usitnjen je uz pomoć tekućeg dušika u prah te je po 60 mg uzorka odvagano u tubice volumena 2 mL. U svaku tubicu dodano je 2 mL 80% metanola, tubice su dobro zatvorene te stavljene u ultrazvučnu kupelj 15 min. Nakon toga uzorci su ekstrahirani na rotacionom homogenizatoru tijekom 2 h (brzina okretaja: 15 rpm), te centrifugirani 15 min na 13 000 rpm nakon čega je supernatant odvojen i korišten za određivanje antioksidacijske aktivnosti (spektrofotometrijskim i elektrokemijskim metodama) i polifenolnih komponenti spektrofotometrijski i kromatografskim metodama. Za spektrometrijska mjerenja korišten je Bio-Spec-1601 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.2.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određeni su metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965) prilagođenom za male volumene. Po 20 µL ekstrakta pomiješano je sa 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa i 300 µL zasićene otopine natrijeva karbonata te je volumen dopunjen destiliranom vodom do 2 mL. Apsorbancija je mjerena nakon 2h pri valnoj duljini 760 nm u odnosu na slijepu probu (reakcijska smjesa uz 80% metanol). Za izradu baždarne krivulje korištena je otopina galne kiseline (0-1200 mg/L), a količina preračunata prema baždarnom pravcu:

$$y = 0,00011x, R^2 = 0,9994$$

Sadržaj ukupnih fenola izražen je u miligramima ekvivalenta galne kiseline (engl. *gallic acid equivalents*) po gramu suhe mase uzorka (mg GAE/g sm).

2.2.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi određeni su metodom s aluminijevim kloridom (Zhishen i sur. 1999) uz male promjene. Po 20 μL uzorka dodano je u 880 μL destilirane vode. Reakcija je započeta dodavanjem 60 μL natrijeva nitrata (5% w/v), a 5 minuta kasnije i 60 μL aluminijeva klorida (10% w/v). Nakon 6 minuta dodano je 400 μL 1M otopine natrijeva hidroksida te volumen nadopunjen do 2 mL destiliranom vodom. Apsorbancija je mjerena na 510 nm, a baždarena krivulja izrađena otopinom katehina (0-300 mg/L). Jednadžba baždarnog pravca:

$$y = 0,0031x, R^2 = 0,9991$$

Rezultati su izraženi u miligramima katehin ekvivalenta (engl. *catechin equivalents*) po gramu suhe mase uzorka (mg CE/g sm).

2.2.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli izmjereni su u uzorcima metodom Howarda i sur. (2003). 250 μL ekstrakta razrijeđenog pet puta u 80% metanolu pomiješano je s 250 μL 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavanola apsorbancija je mjerenja na 320 i 360 nm. Za izradu baždarne krivulje za hidroksicimetne kiseline korištena je kava kiselina (0-1000 mg/L), a za flavonole kvercetin (0-500 mg/L).

Jednadžba baždarnog pravca za kava kiselinu:

$$y = 0,0019x, R^2 = 0,9998$$

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin:

$$y = 0,0016x, R^2 = 0,9988$$

Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina izražen je kao miligram ekvivalenta kava kiseline (engl. *caffeic acid equivalents*) po gramu suhe mase uzorka (mg CAE/g sm), dok je sadržaj flavonola izražen u miligramu ekvivalenta kvercetina (engl. *quercetin equivalents*) po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g sm).

2.2.2.5. Određivanje proantocijanidina

Proantocijanidini su određeni vanilin-HCl metodom (Sun i sur., 1998). Po 1,5 ml otopine vanilina (4%) u metanolu pomiješano je s 250 µL ekstrakta i 750 µL koncentrirane kloridne kiseline. Nakon 15 min inkubacije izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Katehin (0-2000 mg/L) je korišten kao standard za izradu baždarne krivulje s jednadžbom:

$$y = 0,0010x, R^2 = 0,9958$$

Rezultati su izraženi kao miligrami katehin ekvivalenta (engl. *catechin equivalents*) po gramu suhe mase uzorka (mg CE/g sm).

2.2.2.6. Određivanje pojedinačnih fenolnih kiselina UPLC-MS/MS metodom

UPLC-MS/MS je vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koji koristi ultra visoke pritiske i spektrometar masa s trostrukim kvadripolom. UPLC (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*) je napredniji sustav tekućinske kromatografije od standardnog HPLC (engl. *High-performance liquid chromatography*) sustava jer koristi kolone s vrlo malim promjerom čestica od oko 1,7 µm i izrazito visoke pritiske čime se povećava rezolucija, smanjuje retencijsko vrijeme te se povećava osjetljivost metode (Yu i sur., 2006).

U ovom istraživanju korišten je uređaj ACQUITY Ultra Performance LCTM system (Waters, Milford, MA, USA) povezan paralelno na PDA 2996 detektor (Waters, Milford, MA, USA) i *Micromass Quattro microTM API* stolni trostruko kvadriploni maseni spektrometar (Waters MS Technologies, Manchester, UK), opremljen s elektronskim ionizatorom (ESI). MassLynxTM program (verzija 4.0, Waters, Milford, MA, USA) korišten je za kontrolu instrumenta i obradu podataka.

Fenolne kiseline određene su prema metodi Gruz i sur. (2008). Biljni ekstrakti su prije analize filtrirani centrifugiranjem (3 500 rpm, 5 min) kroz 0,2 µm najlonske membranske filtere (Micro-SpinTM, Alltech, Deerfield, IL, USA) te su im kao interni standardi dodani deuterijem obilježena 4-hidroksibenzojeva i salicilna kiselina (Cambridge Isotope Laboratories, MA, USA) u konačnoj koncentraciji od 10⁻⁵ mol/L. Uzorci su injektirani u BEH C₈ kolonu (1,7 µm, 2,1 x 150 mm, Waters, Milford, MA) zagrijanu na 30 °C. Mobilna faza se

sastojala od acetonitrila (otopina B) i 7,5 mM mravlje kiseline (otopina A). Protok je bio 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ a gradijent: 5% B 0,8 min, 5–10% B do 0,4 min, izokratično 10% B do 0,7 min, 10–15% B do 0,5 min, izokratično 15% B 1,3 min, 15–21% do 0,3 min, izokratično 21% B 1,2 min, 21–27% B do 0,5 min, 27–50% B do 2,3 min, 50–100% B do 1 min, i završno 100–5% B do 0,5 min. Na kraju je kolona ekvilibrirana na početne uvijete 2,5 min. Pritisak se kretao između 4000 i 8000 psi. Uzorci su nakon kolone paralelno detektirani na PDA detektoru te odvedeni do izvora elektrona s negativnom ionizacijom. Temperatura ionizacije bila je viša od 100°C, a kapilarni napon iznosio je 2,5 kV.

Fenolne kiseline te deuterirani interni standardi detektirani su u MRM modu (engl. *multiple reaction monitoring*) na temelju raspona između gornje i donje granice m/z koji se može odrediti spektrometrom masa. Fenolne kiseline su identificirane uspoređujući masene spektre uzoraka s masenim spektrima standarda. Koncentracija analita u uzorcima određena je iz omjera analita i srednje vrijednosti površine internog standarda prema jednadžbi:

$$\text{koncentracija analita} = I_{sc} \times \text{nagib} \times A \times 2(I_{S1} + I_{S2})^{-1} + c$$

I_{sc} = koncentracija internog standarda

A - površina pika analita

I_{S1} - površina ispod pika za deuterijem obilježenu 4-hidroksibenzojevu kiselinu

I_{S2} - površina ispod pika za deuterijem obilježenu salicilnu kiselinu

c - parametri linearne regresije prikazani u Tablici 5.

Parametri UPLC-MS/MS analize fenolnih kiselina (retencijsko vrijeme, vrijeme zadržavanja, MRM prijelaz (m/z), fragmentacija, limit, nagib te parametri linearnosti su u Tablici 5.

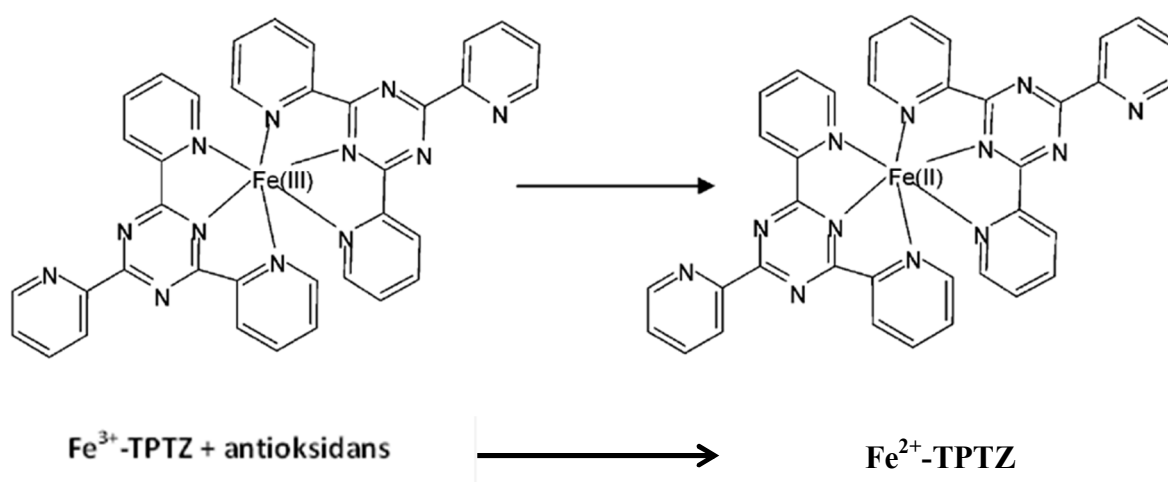
Tablica 5. Retencijsko vrijeme (min), vrijeme zadržavanja (s), MRM prijelaz (m/z), fragmentacija, limit, te parametri linearnosti za ispitivane fenolne kiseline.

Fenolne kiseline	Vrijeme (min)	Vrijeme zadrž (s)	MRM (m/z)	Fragmenti	Nagib	c	R ²
galna	2,59	0,5	169>125		0,149	-0,859	0,9990
protukatehinska	3,86	0,5	153>109		0,285	0,452	0,9994
klorogenska	4,49	0,5	353>191	217	0,296	4,235	0,9983
gentistična	4,79	0,15	153>109		0,114	-3,301	0,9969
4-hidroksibenzojeva	4,99	0,15	137>93		0,671	0,907	0,9999
kava	5,31	0,15	179>135	161	0,532	-5,687	0,9990
vanilinska	5,44	0,15	167>108	152, 123	0,056	-0,548	0,9994
siringična	5,55	0,15	197>123	182, 167	0,042	0,036	0,9997
3-hidroksibenzojeva	5,96	0,5	137>93		0,300	0,133	1,0000
4-kumarinska	6,62	0,15	163>119		1,026	-3,298	0,9979
sinapinska	6,92	0,15	223>164	208, 149	0,083	-0,836	0,9995
ferulinska	7,04	0,15	193>134	178, 149	0,322	-0,863	0,9996
3-kumarinska	7,57	0,5	163>119		1,536	1,956	0,9998
2-kumarinska	8,13	0,15	163>119		0,841	-1,485	0,9995
salicilna	8,25	0,15	137>93		0,764	1,228	0,9987
<i>trans</i> -cimetna	9,19	0,5	147>103		0,051	-0,966	0,9975

2.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata

2.2.3.1. FRAP metoda

Mehanizam FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*) metode temelji se na prijenosu elektrona, a kompleks željeza s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom – $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}^3$ koristi se kao oksidans (Benzie i Strain, 1999) (Slika 11.). Redukcijom žuto obojenog kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) u prisutnosti antioksidansa i pri niskom pH reakcijska smjesa mijenja boju u plavo čiji je maksimum apsorpcije na valnoj duljini 593 nm.



Slika 11. Mehanizam djelovanja FRAP reakcije (Benze i Strain, 1996).

Kod mjerenja aktivnosti FRAP metodom 50 μL uzorka pomiješano je sa 950 μL prethodno pripremljenog FRAP reagensa te je mjerena apsorbanija na 593 nm nakon točno 4 min (Benzie i Strain, 1999). FRAP reagens se priprema miješanjem acetatnog pufera (300 mM, pH 3,6), otopine TPTZ (10 mM u 40 mM kloridnoj kiselini) te željezo (II) klorida (20 mM) u omjeru 10:1:1.

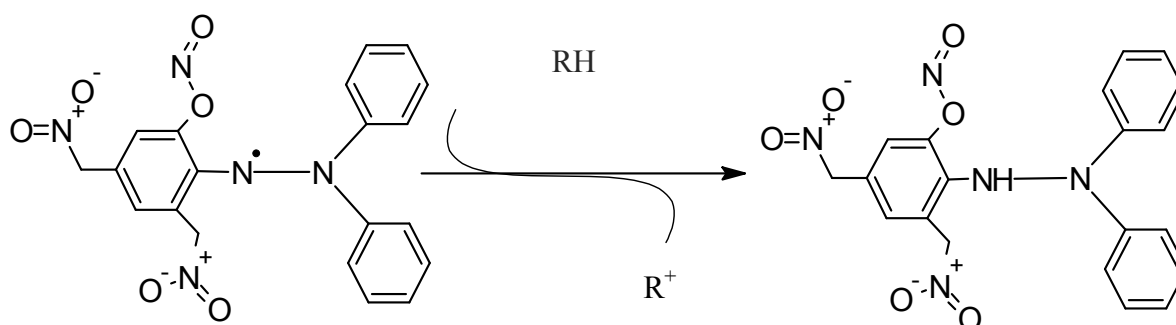
Za pripremu baždarnog pravca korišten je željezo-sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0-1000 μM):

$$y = 0,0009x, R^2 = 0,9941$$

Rezultati su izraženi u mikromolima željezo sulfata po gramu suhe mase uzorka ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g sm}$).

2.2.3.2. DPPH metoda

Metoda DPPH temeljena je na „gašenju“ slobodnih DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala antioksidansom, odnosno na doniraju atoma vodika ili elektrona od strane antioksidansa radikalu pri čemu se radikal reducira. To dovodi do promjene boje otopine slobodnih radikala od izrazito ljubičaste do žute (Slika 12.). Promjena boje detektira se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 515 nm.



Slika 12. Mehanizam reakcije DPPH[•] radikala s antioksidansom (Brand-Williams i sur.,1995)

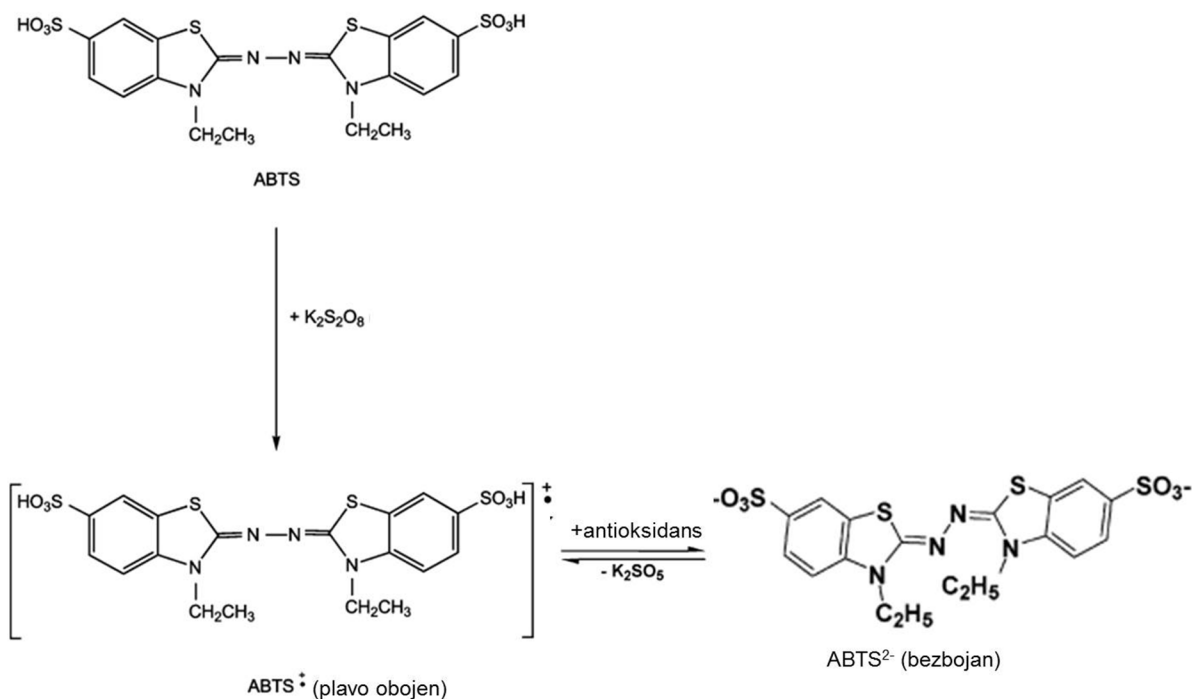
Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom korištena je malo izmijenjena metoda Brand-Williams i sur. (1995). Po 5 μ L metanolnog biljnog ekstrakta pomiješano je sa 995 μ L svježe pripremljenog 0,0094 mmol/L DPPH otopljenog u metanolu. Nakon točno 30 min mjerena je apsorbancija na 515 nm u odnosu na čisti metanol, a kao slijepa proba reakcijska smjesa s 80% metanolom umjesto uzorka. Za konstruiranje baždarnog pravca korišten je Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) (0-0,5 mM), a na os y nanosi se promjena apsorbancije u odnosu na slijepu probu:

$$y=0,523x, R^2=0,9940$$

Rezultati su izraženi u ekvivalentima Troloxa po gramu suhe mase biljke (μ g TE/g sm).

2.2.3.3. ABTS metoda

Mehanizam ABTS metode sličan je mehanizmu DPPH metode ali se ovdje kao radikal koristi plavo-zeleno obojeni radikal-kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline koji se formira oksidacijom otopine ABTS-a. Dodatak antioksidansa izaziva gubitak boje, a ta se promjena detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini 736 nm (Slika 13.).



Slika 13. Mehanizam oksidacije ABTS radikala i reakcija s antioksidansom (Re i sur. 1999).

Mjerenje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom izvedeno je prema metodi Re i sur. (1999). Volumen od 20 μ L biljnog ekstrakta pomiješan je s 2 mL otopine ABTS^{•+} radikala te je točno nakon 6 min inkubacije mjerena apsorbancija pri valnoj duljini 734 nm. Otopina ABTS radikala priprema se tako da se 7 mM otopina ABTS-a oksidira s 140 mM otopinom kalijevog peroksodisulfata. Na dan analize otopina se razrjeđuje s etanolom da joj apsorbancija na 736 nm bude oko 0,700. Za konstruiranje baždarenog pravca korišten je Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilokroman-2-karboksilne kiseline) (0-2 mM), a na os y nanosi se razlika u apsorbanciji između uzorka i slijepe probe:

$$y = 0,3093x, R^2 = 0,9983$$

Rezultati su izraženi kao Trolox ekvivalenti po gramu suhe mase biljke (μ g TE/g sm).

2.2.3.4. Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti

Ciklička voltametrij (CV) se kao elektrokemijska metoda za mjerenja antioksidacijske aktivnosti počela primjenjivati krajem 90-ih godina (Chevion, 1997) prošlog stoljeća. Ona omogućuje dobivanje informacija o ukupnom antioksidacijskom kapacitetu bez specifičnog određivanja doprinosa pojedine komponente. Metoda se temelji na analizi vala anodne struje koji je funkcija redukcijskog potencijala određenog spoja u uzorku. Ova metoda prethodno je već uspješno primijenjena na mjerenje antioksidacijske aktivnosti vina (Piljac i sur., 2004), sokova (Piljac-Žegarac i sur., 2009) te voćnih čajeva (Piljac-Žegarac i sur., 2010). Mjerenja su provedena na potenciostatu (PAR Potenciostat/Galvanostat Model 263 A) koji je analogno-digitalnim pretvornikom spojen na računalo (Slika 14.). Sva mjerenja provedena su u troelektrodnoj ćeliji koja se sastoji od radne, referentne i protu elektrode (Slika 15.). Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika, kao referentna zasićena kalomel elektroda dok je kao protuelektroda korišten platinski lim. Kako bi se uklonili produkti elektrokemijske reakcije adsorbirani na površini elektrode, prije svakog mjerenja radna elektroda od staklastog ugljika mehanički je obrađena poliranjem Al_2O_3 prahom veličine čestica 1 μm ; 0,3 μm ; 0,05 μm . Elektroda je odmašćena etanolom u ultrazvučnoj kupelji te isprana redestiliranom vodom. Protuelektroda je prije svakog mjerenja žarena i također isprana redestiliranom vodom.

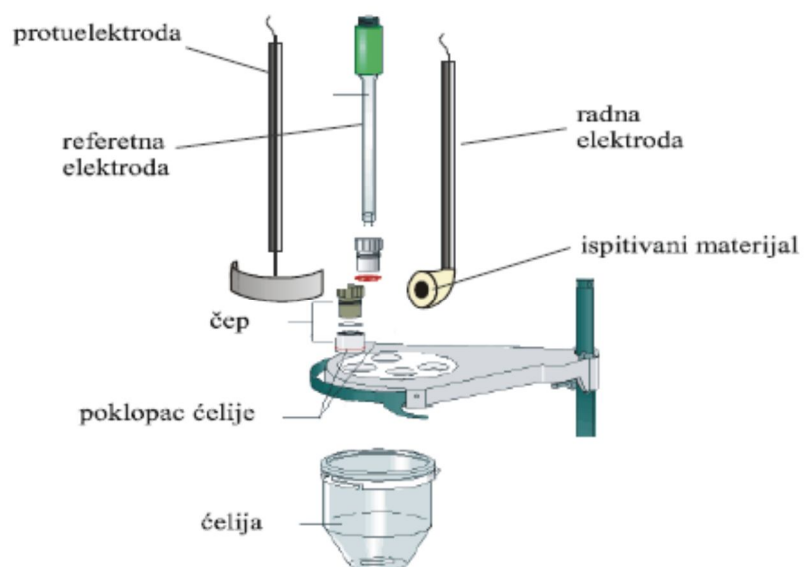
Uzorci su razrijeđeni u 80% metanolu te im je dodana LiClO_4 do koncentracije 0,1 M u svrhu povećanja vodljivosti. Mjerenja su provedena u širokom rasponu potencijala od -200 do 900 mV brzinom promjene potencijala 100 mVs^{-1} . Konačni voltamogram dobiven je oduzimanjem struja pozadinskog signala 80% otopine metanola uz dodatak LiClO_4 od struja voltamograma dobivenog u ispitivanom uzorku. Iz tih su cikličkih voltamograma očitani potencijali (E_k , E_a) i jakosti struja (I_k , I_a) anodnih i katodnih strujnih valova te naboj ispod voltametrijskog vala (Q_{900}) koji je ekvivalentan koncentraciji analita, odnosno antioksidansa. Baždarna krivulja je konstruirana uz pomoć Trolox-a (10-100 μM) i prikazuje ovisnost Q_{900} o koncentraciji. Rezultati su preračunati prema baždarnoj krivulji:

$$y = -0,3899 + 0,1454x, R^2 = 0,9721$$

Rezultati su izraženi kao ekvivalenti Troloxa po gramu suhe mase ($\mu\text{g TE/g sm}$).



Slika 14. Aparatura za mjerenje antioksidacijske aktivnosti cikličkom voltametrijom.



Slika 15. Troelektrodna ćelija korištena za elektrokemijska mjerenja.

2.2.3.5. Antioksidacijski indeks

Rezultate antioksidacijske aktivnosti izmjerene različitim metodama teško je međusobno uspoređivati, prvenstveno zbog različitih mehanizama djelovanja i zbog različitih mjernih jedinica koje se koriste za izražavanje rezultata. Da bismo rezultate antioksidacijske aktivnosti dobivene različitim metodama sveli na međusobno usporedive vrijednosti izračunali smo ukupni antioksidacijski indeks (ACI; engl. *Antioxidant Composite Index*). Najvišoj vrijednosti za svaki set mjerenja u pojedinoj metodi dana je vrijednost 100, dok su za ostale uzorke antioksidacijski indeksi (ACI uzorka) računati prema formuli:

$$\text{ACI uzorka} = \frac{\text{vrijednost za uzorak}}{\text{vrijednost za uzorak sa najvišom aktivnosti}} \times 100$$

Ukupni antioksidacijski indeks nekog uzorka izražen je kao srednja vrijednost ACI-a uzoraka za sve četiri metode.

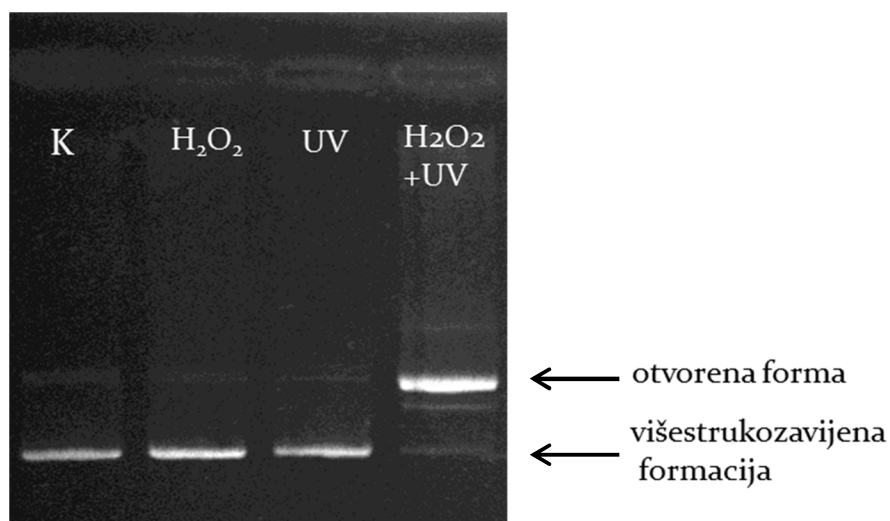
2.2.4. Ispitivanje potencijalne zaštitne uloge ekstrakta na nivou makromolekula

2.2.4.1. Priprema ekstrakata

Za mjerenje zaštitne uloge ispitivanih ekstrakata na razini makromolekula ekstrakti su pripremljeni kao što je opisano u poglavlju 4.2.1. uz modifikaciju. Nakon odvajanja supernatanta uzorci su upareni u struji tekućeg dušika, a ostatak vode uklonjen je u liofilizatoru Lyovac GT 2 (Steris GmbH, Njemačka). Preostali talozi su otopljeni u 100% metanolu do koncentracije od 10 mg suhog ekstrakta/mL otapala te skladišteni na -20°C do provođenja analiza.

2.2.4.2. Metoda zaštite DNA

Metoda se temelji na izazivanju oštećenja cirkularne DNA (plazmida) UV zračenjem sa i bez prisutnosti biljnih ekstrakata. Uslijed izloženosti ultraljubičastom zračenju uz prisutstvo vodikova peroksida stvaraju se slobodni kisikovi radikali koji razmotavaju plazmidnu DNA u otvorenu formu. Ta se promjena može pratiti elektroforezom u gelu agaroze (Slika 16.).



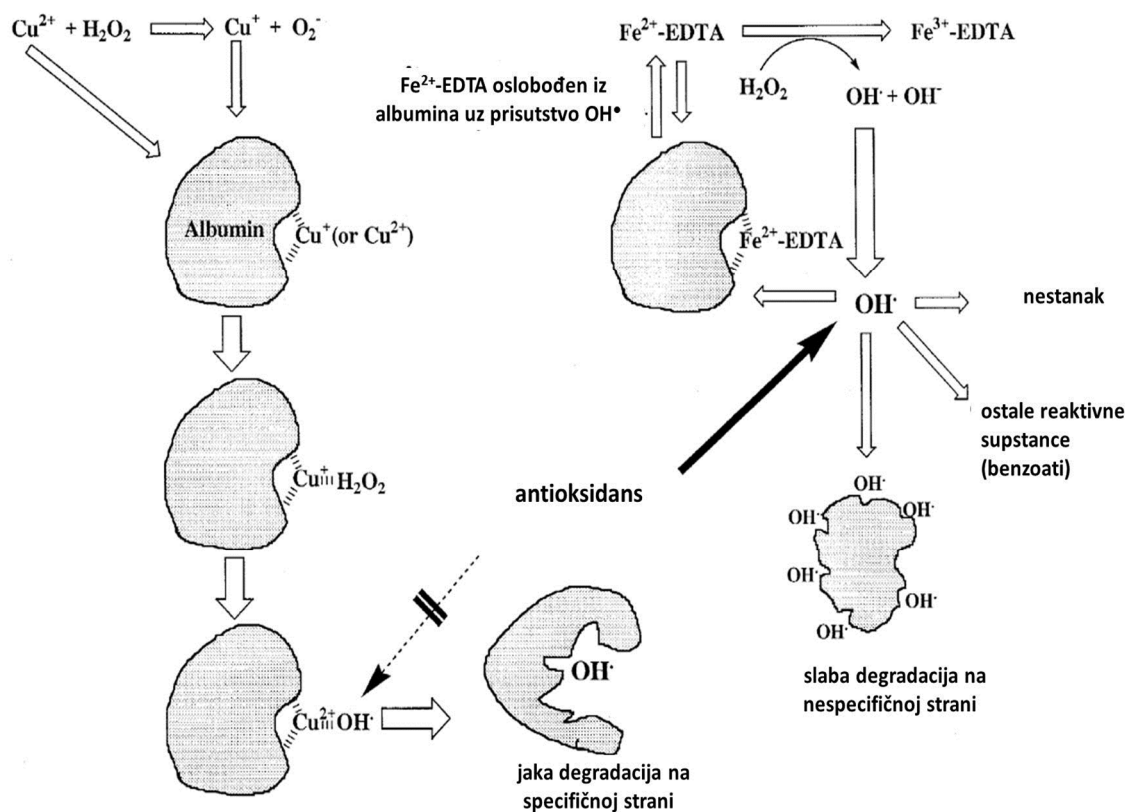
Slika 16. Reprezentativni primjer promjene konformacije DNA plazmida ϕ X174 RF1 uslijed djelovanja slobodnih kisikovih radikala: u nativna forma plazmida (K), nakon djelovanja H₂O₂, nakon UV zračenja ti nakon kombinacije djelovanja H₂O₂ i UV zračenja.

U našem eksperimentu korišten je plazmid ϕ X174 RF1 (Termo Scientific, St. Leon-Rot, Njemačka). Metoda je prilagođena po Keum i sur. (2000). Reakcijska smjesa (30 μ L) sadržavala je pufer TE (10 mM Tris-HCl i 1 mM EDTA pH 8.0), DNA plazmid ϕ X174 RF1 (0,3 μ g), vodikov peroksid (0,03M) i finalne koncentracije ekstrakta 1, 10, 100, 500 i 1000 μ g/mL. Vodikovi radikali generirani su ultraljubičastom svjetlošću kroz 2 min izloženosti zračenju od 48 μ J/cm² po sekundi u Hoefer UVC Crosslinker-u (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, SAD). Nakon 15 min inkubacije na sobnoj temperaturi produkti su provjereni elektroforezom u 0,8% gelu agaroze te vizualizirani transiluminatorom nakon bojanja u etidijevom bromidu.

Kao što je prikazano na Slici 16, DNA plazmida ϕ X174 RF1 uglavno egzistira kao višestruko zavijena forma (90%). Uslijed izloženosti plazmida UV zračenju uz prisutnost H₂O₂ molekula DNA prelazi u otvorenu formu. Ukoliko ispitivani biljni ekstrakt pokazuje zaštitnu ulogu od oštećenja DNA, otvaranje DNA plazmida će biti spriječeno te će plazmid ostati u višestruko zavijenoj formi.

2.2.4.3. Metoda zaštite proteina

Metoda se bazira na oštećenju proteina BSA oksidacijom uz prisutnost Fe^{2+} ili Cu^{2+} te praćenju promjene na BSA proteinu s ili bez prisutnosti ispitivanih ekstrakata. Mehanizam oštećenja BSA proteina (Kocha i sur., 1997) prikazan je na Slici 17.



Slika 17. Predloženi mehanizam oštećenja proteina BSA oksidacijom metalima (Kocha i sur., 1997)

2.2.4.3.1. Mjerenje karbonilacije proteina

Metoda se temelji na mjerenju količine karbonila nastalih uslijed direktne oksidacije aminokiselinskog bočnog lanca. Zagrijavanjem reakcijske smjese u prisutnosti metala i vodikova peroksida potiče se oksidacija BSA proteina, te se prati količina nastalih karbonila u smjesama bez ili uz prisutnosti biljnog ekstrakta.

Reakcijska smjesa je sadržavala 4 mg/mL BSA, 0,05 mM FeCl_3 , 0,1 mM askorbinsku kiselinu, 1 mM H_2O_2 te biljni ekstrakt u rasponu koncentracija (10, 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g/mL}$).

Kao pozitivna kontrola korišten je komercijalni antioksidans BHT istih koncentracija, a kao negativna kontrola 100% metanol. Ukupni volumen reakcija bio je 600 μ L. Smjesa je inkubirana 30 min na 37°C u termobloku (Bio TDB-100, Biosan, Latvija).

Količina nastalih karbonila određena je spektrofotometrijski (Mayo i sur., 2003). Nakon inkubacije smjesi je dodan 1 mL otopine DNPH (10 mM) te je otopina inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga u uzorak je dodan 1 mL 10%-tne otopine trikloroetene kiseline (TCA) te je otopina inkubirana 15 min na ledu nakon čega su uzorci centrifugirani 5 min na 13 000 g. Supernatant je odbačen, talog je ispiran 3 puta s 2 mL etil acetata. Nakon posljednjeg centrifugiranja talozi su otopljeni u 6M gvanidin-HCl-a u 2 N HCl (pH 2) vorteksiranjem i inkubiranjem na 37 °C. Nakon što su talozi potpuno resuspendirani prebačeni su u kivete pogodne za mjerenje u ultravioletnom dijelu spektra te im je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 370 nm. Rezultati su izraženi u % oksidacije u odnosu na slijepu probu:

$$\% \text{ oksidacije} = \frac{\text{apsorbancija uzorka na 370 nm}}{\text{apsorbancija slijepe probe na 370 nm}} \times 100$$

2.2.4.3.2. Provjera oksidacije proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)

Oksidacija proteina također je praćena elektroforezom u denaturirajućim uvjetima u poliakrilamidnom gelu (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate– PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). Metoda se temelji na sposobnosti SDS-a da u prisutnosti reagensa za razaranje disulfidnih veza, otopi, denaturira i disocira većinu proteina u pojedinačne polipeptidne lance. Elektroforetsko razdvajanje ovisi o efektivnom promjeru molekule koji odgovara relativnoj molekulskoj masi (Balen i sur., 2011).

Reakcijska smjesa sadržavala je 0,5 mg/mL BSA, 0,1 mM CuSO₄, 2,5 mM H₂O₂ i različite koncentracije ispitivanih biljnih ekstrakata (10, 25, 50, 100, 250 μ g/mL) i inkubirana 30 min na 37°C.

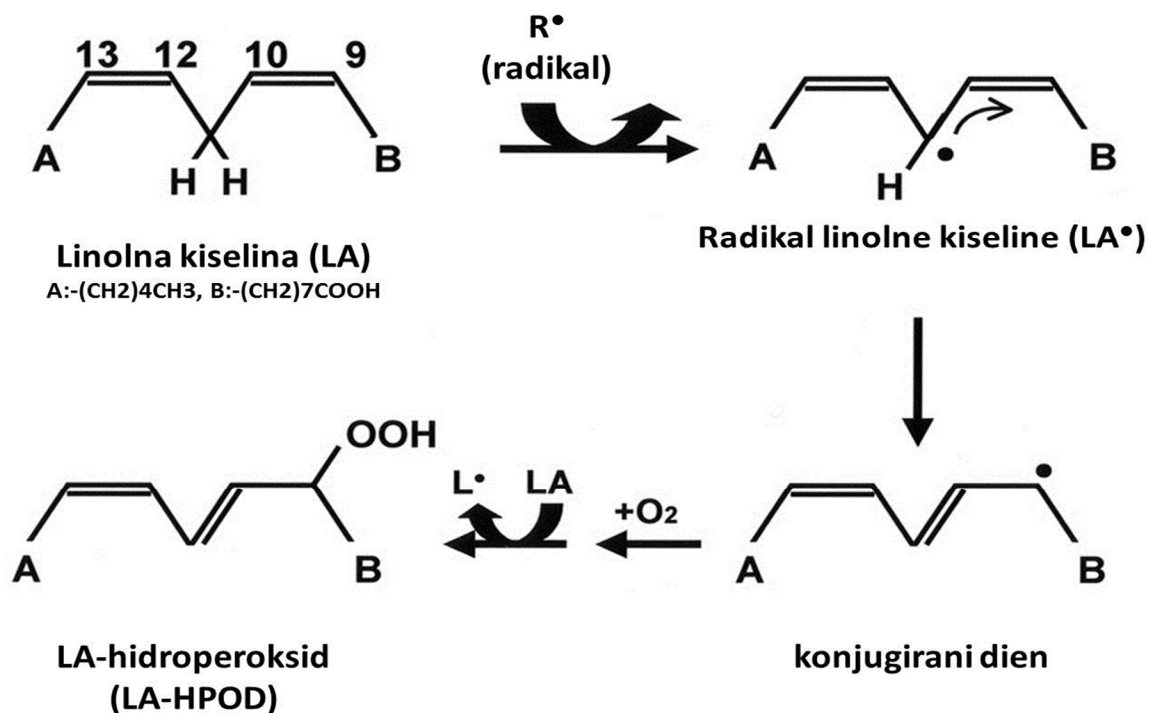
Za elektroforetske analize pripremljeni su gelovi poliakrilamida koristeći sustav proizvođača BioRad (Hercules, CA, SAD): gel za sabijanje uzorka 5% i gel za razdvajanje

proteina 12,5% (Laemmli, 1970). Nakon inkubacije uzorci su ohlađeni na ledu te je 10 μ L uzorka pomiješano s 20 μ L pufera za nanošenje (0,062M Tris, pH 6,8, 10% glicerol, 2% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) β -merkaptoetanol, 0,05% (w/v) bromfenol plavo). Smjesa je grijana 10 min na 95°C u termobloku kako bi se proteini denaturirali. Analizirano je po 15 μ L uzorka. Elektroforeza je provedena u kadici za vertikalnu elektroforezu (BioRad, Hercules, CA, SAD) u 1 \times puferu za elektroforezu (25 mM Tris, 14,5% (w/v) glicin, 10% (w/v) SDS, pH 8.3) pri konstantnom naponu od 180V. Elektroforeza je zaustavljena nakon što je boja bromfenolplavo došla do ruba gela.

Po završetku elektroforeze gelovi su obojani u otopini koja je sadržavala 0,1% Coomassie plavilo R-250, 40% metanol te 10% ledenu octenu kiselinu. Gelovi su obezbojeni u vrućoj destiliranoj vodi.

2.2.4.4. Metoda zaštite lipida

Za mjerenje zaštitne uloge ekstrakata na razini lipida korištena je metoda s amonijevim tiocijanatom (Yen i Hsien, 1998). Ova se metoda temelji na mjerenju količine nastalih peroksida nakon inkubacije linolne kiseline bez i uz dodatak antioksidansa. Proces oksidacije linolne kiseline prikazan je na Slici 18. Linolna kiselina sadrži dvije dvostruke veze te je zbog toga podložna oksidaciji. Antioksidansi iz biljnog ekstrakta uklanjaju slobodan radikal u prvom koraku te se na taj način prekida reakcija oksidacije linolne kiseline i dolazi do stvaranja manjeg broja peroksida. Amonijev tiocijanat reagira s peroksidima tvoreći crveno obojeni kompleks čiji se intenzitet može odrediti mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 500 nm.



Slika 18. Proces peroksidacije linolne kiseline (Furuki i sur., 2009)

Emulzija linolne kiseline pripravljena je tako da je 155 μL linolne kiseline resuspendirano u 25 mL natrij fosfatnog pufera (0,02 M, pH 7,0) uz dodatak detergenta Tween-20. U reakcijsku smjesu dodano je po 625 μL prethodno pripravljene emulzije linolne kiseline, 625 μL Na-fosfatnog pufera te po 125 μL biljnog ekstrakta (1 mg/mL) ili standarda. Kao standard korišten je komercijalni antioksidans BHT i Trolox. Za praćenje tijekom oksidacije bez prisutnosti antioksidansa korištena je smjesa u koju je umjesto ekstrakata ili standarda dodan metanol (100%). Smjesa je inkubirana 5 h u termobloku na 37 °C nakon čega je iz smjese izuzeto 50 μL uzorka te pomiješano s 2 mL etanola (75%) i 50 μL amonijeva tiocijanata (30%). Na kraju je dodano 50 μL željezova (II) sulfata (0,02 M) u kloridnoj kiselini (3,5%) te je nakon točno 3 min mjerena apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Postotak inhibicije lipidne peroksidacije izračunati je prema formuli:

$$\% \text{ oksidacije} = \left(1 - \frac{\text{apsorbancija uzorka na 500 nm}}{\text{apsorbancija slijepe probe na 500nm}} \right) \times 100$$

2.2.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti

2.2.5.1. Mikroorganizmi i hranjive podloge

Ispitivanje antimikrobnog djelovanja biljnih ekstrakata provedeno je na sljedećim test-mikroorganizmima: *Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* FP1 i *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Navedene kulture preuzete su iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Test-mikroorganizmi su čuvani na temperaturi od -80°C u hranjivim podlogama uz dodatak 15% glicerola kao krioprotektora. Prije provođenja eksperimenta, sojevi su precijepljeni u svježe hranjive podloge i inkubirani na 37°C tijekom 18 sati.

Hranjive podloge (tekuće i krute) (Biolife, Milano, Italija) su prije uporabe sterilizirane. Sastav tekuće hranjive podloge (g/L destilirane vode):

- pepton 5
- mesni ekstrakt 3
- pH podloge 7,3

Kruta hranjiva podloga dodatno je sadržavala agar (18,0 g/L).

2.2.5.2. Priprema uzoraka

Metanolni ekstrakti biljaka, koncentracije 10 mg/mL su prvo razrijeđeni u tekućoj hranjivoj podlozi na najvišu ispitivanju koncentraciju (500 µg/mL), a zatim su napravljena serijska dvostruka razrjeđenja u rasponu koncentracija od 7,8 do 500 µg/mL.

2.2.5.3. Metoda s rupicama u agaru („agar well assay“)

Metoda je provedena prema Šušković i sur., (1993). Otopljeni hranjivi agari (12 mL) je naciepljen s 100 µL suspenzije koja sadrži 10⁶ CFU/mL (engl. *Colony Forming Units per mL*) pojedinog test-mikroorganizma, dobro promješan i izliven u Petrijeve zdjelice. Nakon skrtnjivanja podloge, pomoću metalnog bušača izbušene su rupice u podlozi (d = 8 mm) u koje je ukapano po 50 µL odgovarajućih koncentracija metanolnih ekstrakata biljaka. Kao negativna kontrola korišten je metanol u tekućoj hranjivoj podlozi koncentracije 500 µL/ml. Petrijeve zdjelice su stavljene na +4°C tijekom 2 sata zbog olakšane difuzije, a zatim

inkubirane na 37°C tijekom 24 sata nakon čega su očitani rezultati. Bistra zona oko rupica s ekstraktom označava njihovo antimikrobno djelovanje.

2.2.5.4. Metoda s filter diskovima („filter disk assay“)

Otopljeni hranjivi agar (12 mL) također je nacijepljen sa po 100 µL suspenzije koja sadrži 10⁶ CFU/mL pojedinog test-mikroorganizma, izmiješan i izliveni u Petrijeve zdjelice. Nakon skrutnjivanja na površinu agara položeni su filter diskovi na koje je nakapano 40 µL biljnih ekstrakata koncentracije 10 mg/mL. Kao negativna kontrola korišteni su filter diskovi natopljeni metanolom, a kao pozitivna kontrola filter diskovi s 10 µg antibiotika streptomicina. Ploče su inkubirane pri 37°C tijekom 24 h nakon čega je uslijedilo očitavanja rezultata pri čemu bistra zona oko filter diskova s ekstraktima označava njihovo antimikrobno djelovanje.

2.2.5.5. Turbidimetrijska metoda

Turbidimetrijska metoda je provedena prema Leboš i sur., (2008) s modifikacijama prema Gulluce i sur., (2007). Metoda je provedena s različitim koncentracijama metanolnih ekstrakata biljaka (7,8 – 500 µg/mL) u mikrotitarskim pločicama. U bunariće pločice nacijepljeno je po 95 µL tekuće hranjive podloge, 5 µL suspenzije pojedinog test-mikroorganizma i 100 µL pojedine koncentracije ekstrakata. Kao slijepa proba korištena je tekuća hranjiva podloga ili hranjiva podloga uz dodatak odgovarajućeg volumena metanola. Kontrola rasta pojedinog test-mikroorganizma provedena je inokulacijom 5 µL suspenzije test-mikroorganizma u 195 µL hranjive podloge, a za negativnu kontrolu je ispitan rast test-mikroorganizama (5 µL) u odgovarajućim koncentracijama (7,8 – 500 µg/mL) metanola u hranjivoj podlozi. Mikrotitarske pločice su inkubirane pri 37°C tijekom 24 h nakon čega je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 620 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (LKB 5060-006, “GDV”, Italija).

2.2.6. Djelovanje biljnih ekstrakata na tumorske stanične linije

2.2.6.1. Nasađivanje, uzgoj te priprema stanica iz subkonfluentnog monosloja

U ovom radu korištena je stanična linija karcinoma grkljana (HEp2) koja je rasla kao jednoslojna kultura u kompletiranom Dulbeccovom modificiranom Eaglovom mediju (DMEM, Imunološki zavod). Zamrznuta stanična kultura (s 10 % glicerola) otopljena je u vodenoj kupelji na 37°C, te je centrifugiranjem (100 rpm/5 minuta) uklonjen supernatant koji sadrži ostatke medija i glicerola te im dodan 1 mL svježeg medija zagrijanog na 37 °C. Stanice su resuspendirane, ponovo centrifugirane te nasađene u Petrijevu zdjelicu. Nakon 24 sata stanice se nasađuju u T-bočicu većeg volumena i uzgajaju do subkonfluentnog stanja, kada se mogu koristiti za eksperiment.

Sa stanica u T-bočicama uklonjen je medij te su stanice isprane s PBS-a puferom te je na njih dodana minimalna količina 0,025%-tne otopine EDTA-tripsina potrebna da pokrije dno T-bočice. Iz stanične suspenzije uzorkovano je po 20 µL te je broj stanica određen u Türken-Bürkovoj komorici uz pomoć mikroskopa.

2.2.6.2. Određivanje citotoksičnosti Neutral Red metodom

Princip „neutral red“ metode je da slaba kationska boja „neutral red“ neionskom difuzijom ulazi u živuće stanice, te se veže na lizosomski matriks. Stanice čija je plazma odnosno lizosomalna membrana oštećena uslijed djelovanja određenog ispitivanog ksenobiotika, ne može zadržati boju „neutral red“, te se stoga boja može vezati samo na živuće stanice. Uslijed toga, količina vezane, a potom ponovno oslobođene boje „neutral red-a“ je proporcionalna količini živih stanica, koje su preživjele tretman određenim ksenobiotikom (Babich i sur., 1991).

Po 180 µL stanične suspenzije (10^5 stanica/mL) nasađeno je u mikrotitarske pločice te inkubirano 24h na 37°C pri 5% CO₂. Nakon prihvaćanja stanica za dno mikrotitarske pločice, sa stanica je uklonjen medij te im je dodano po 200 µL novog medija u kojem su otopljeni ekstrakti pri koncentracijama 1, 10, 50 i 100 µg/mL. Kao kontrola dodana je jednaka količina otapala u kojem su ekstrakti otopljeni (metanol+medij). Nakon tretmana od 24 h stanice su isprane sa 100 µL PBS-a te im je dodano po 100 µL prethodno pripremljene otopine boje „neutral red“. Otopina boje "neutral red" (10%) dobivena je razrjeđivanjem matične otopine

(5 mg/mL u etanolu) u mediju za uzgoj stanica. Stanice s bojom inkubirane su 60 min na 37°C nakon čega su isprane sa 100 µL PBS-a te im je dodano po 100 µL otopine za odbojavanje. Intenzitet obojenja mjeren je pri valnoj duljini od 450 nm u Microtiter reader-u (Cecil Instruments Ltd, Technical Centre Cambridge). Postotak preživljenja izračunat je prema formuli:

$$\% \text{preživljenja} = \frac{A_{450 \text{ nm istraživanog ekstrakta}}}{A_{450 \text{ kontrole}}} \times 100$$

2.2.6.3. Određivanje reaktivnih kisikovih skupina DCFH-DA fluorimetrijskim testom

Određivanje reaktivnih kisikovih skupina (ROS- engl. *Reactive Oxygen Species*) temelji se na prelasku nefluorescirajućeg spoja 2',7'-diklorofluorescein-diacetata (DCFH-DA) u fluorescirajući derivat fluorescein. Naime, neionski i nepolarni DCFH-DA prolazi staničnu membranu gdje se uslijed djelovanja staničnih esteraza hidrolizira u 2',7'-diklorofluorescein (DCFH), koji je polaran te se stoga zadržava u stanici, te u kontaktu sa reaktivnim kisikovim skupinama (ROS) prelazi u fluorescentni spoj fluorescein. Na taj način se preko intenziteta fluorescencije može odrediti količina reaktivnih kisikovih skupina u stanici (Yang i sur, 1998).

Po 180 µL stanične suspenzije (10^5 stanica/mL) nasadeno je u crne mikrotitarske pločice koje su potom inkubirane 24h na 37°C pri 5% CO₂. Nakon toga medij je uklonjen te su stanice tretirane s po 100 µL ekstrakta biljaka koncentracije 1, 10, 50 i 100 µg/mL. Kao negativna kontrola korištena je otopina medija i metanola. Paralelno, na druge stanice je nakon ukljanjanja medija stavljeno po 100 µL vodikovog peroksida (250 µM) kako bi se inducirao nastanak slobodnih radikala. Nakon 30 min inkubacije na stanice je dodano po 100 µL ekstrakta. Nakon 24h inkubacije sa stanica se uklanja medij, stanice se ispiru s PBS-om te im je dodano po 100 µL DCFH-DA (50 µM). Nakon inkubacije 30 minuta pri 37°C i 5% CO₂ i ukljanjanja DCFDA, na stanice je dodano 100 µL PBS-a koji sadrži i 1% goveđeg serum albumina, te je mjeren intenzitet fluorescencije na fluorimetru (Cecil Instruments Ltd, Technical Centre Cambridge) pri valnoj duljini za ekscitaciju od 485 nm, te 528 nm za emisiju. Nakon mjerenja fluorescencije, stanice su isprane te tretirane bojom "neutral red" te je ponovno određen broj živih stanica. Rezultati se izražavaju kao odnos intenziteta fluorescencije x kvocijent preživljenja tretiranih stanica i kontrole.

2.2.7. Statistička obrada podataka

Sva mjerenja izvršena su u triplikovima te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Statistička obrada obavljena je u Microsoft Office Excel 2010 programu nadograđenim s XLSTAT (ver. 2011.5.01.) programom.

2.2.7.1. Genetičke studije

Gelovi s produktima PCR reakcije u RAPD metodi su analizirani te je svaka vrpca označena sa jedan (1) ukoliko je bila vidljiva ili sa nula (0) ukoliko je nedostajala. Izračunati je ukupan broj vrpca, broj polimorfnih vrpca te udio polimorfnih vrpca.

Od dobivenih podataka kreirana je matrica genetske sličnosti prema Dico-evom koeficijentu (Nei i Li, 1979). Ta matrica korištena je za izradu UPGMA (engl. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) dendrograma.

2.2.7.2. Kemometrijska obrada podataka

2.2.7.2.1. Univarijantna statistička analiza

Rezultati su prikazani tablično i grafički te su im izračunate parametre opisne (deskriptivne) statistike: aritmetička sredina i standardna devijacija.

Da bi se odredila statistički značajna razlika između uzoraka korištena je test univarijantna analiza varijance (*One-way ANOVA*) uz primjenu *post hoc Tukey's HSD* testa. Homogenost uzoraka ispitana je Levene's testom. Statistički značajnim smatrale su se razlike na razini značajnosti (pouzdanosti) $p \leq 0,05$. Također, izračunat je Pearsonov indeks korelacije te koeficijent determinacije.

2.2.7.2.2. Multivarijantna statistička analiza

Metoda analize glavnih komponenti (engl. *principal component analysis- PCA*) korištena je kako bi se vizualizirao odnos između sastava analiziranih polifenolnih komponenti, antioksidacijske aktivnosti i ispitivanih uzoraka. Ova metoda temelji se na korelaciji između varijabli te grupira uzorke u glavne komponente (engl. *principal components PCs*). Metoda daje opis odnosa između varijabli te nam omogućuje vizualizaciju njihovog odnosa, tj. dali su one slične ili različite. Objekti koji su slični jedan drugome

grupirat će se zajedno, dok će oni različiti biti udaljeniji. PCA je primijenjena na set podatka nakon standardizacije (rezultat za svaki uzorak je oduzet od srednje vrijednosti te podijeljen sa standardnom devijacijom) da bi sva mjerenja sveli na međusobno usporedive vrijednosti.

Također s ciljem svrstavanja analiziranih uzoraka u grupe provedena je i klaster analiza gdje su uzorci smješteni u grupe (skupine) prema sastavu polifenolnih komponenti i biološkoj aktivnosti. Spajanje dvaju grana temelji se na sličnosti između najudaljenijih članova grupe.

3. REZULTATI

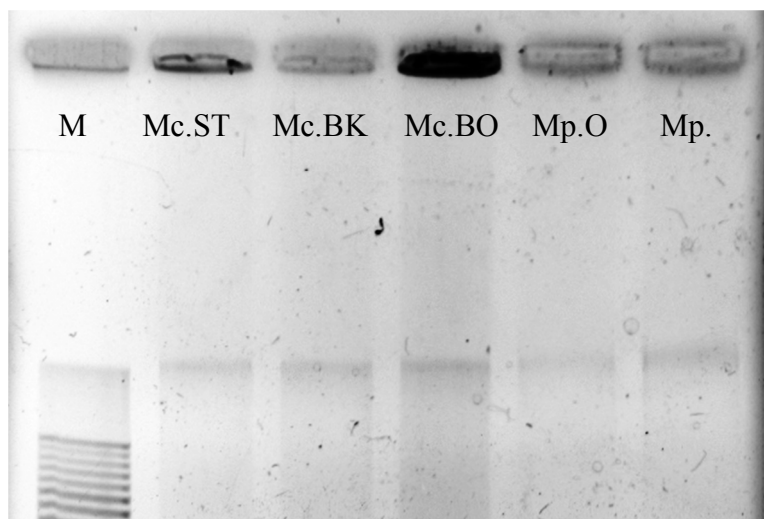
3.1. GENETSKA VARIJABILNOST BAZIRANA NA RAPD MARKERIMA

Genetska varijabilnost biljaka od interesa ispitana je s obzirom na lokalitet rasta koristeći metodu nasumično amplificiranih odsječaka DNA (RAPD). DNA je uspješno izolirana iz svih biljnih uzoraka. Koncentracije i čistoća izolirane DNA prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6. Koncentracija i čistoća genomske DNA izolirane iz vrsta *T. arduini*, *M. petraea*, *M. croatica* i *R. intermedia* sa ispitivanih lokaliteta.

Uzorak	Koncentracija DNA (ng/ μ L)	OD _{260/280}
Ta.SJ	100,00	2,32
Ta.VG	89,09	2,11
Ta.U	105,13	2,05
Ta.S	98,80	2,10
Ta.SŠ	68,44	2,00
Mp.O	263,22	1,41
Mp.D	145,83	1,34
Mc.ST	121,69	1,62
Mc.BO	125,59	1,63
Mc.BK	194,91	1,71
Ri.DP	124,42	1,79
Ri.BO	99,05	1,56

Kvaliteta DNA provjerena je elektroforezom u gelu agaroze. Primjer agaroznog gela sa izoliranom DNA prikazan je na Slici 19.



Slika 19. Primjer elektroforetske slike genomske DNA izolirane iz vrsta *M. croatica* i *M. petraea* (na gel naneseo po 15 μ L izolata DNA i 3 μ L boje).

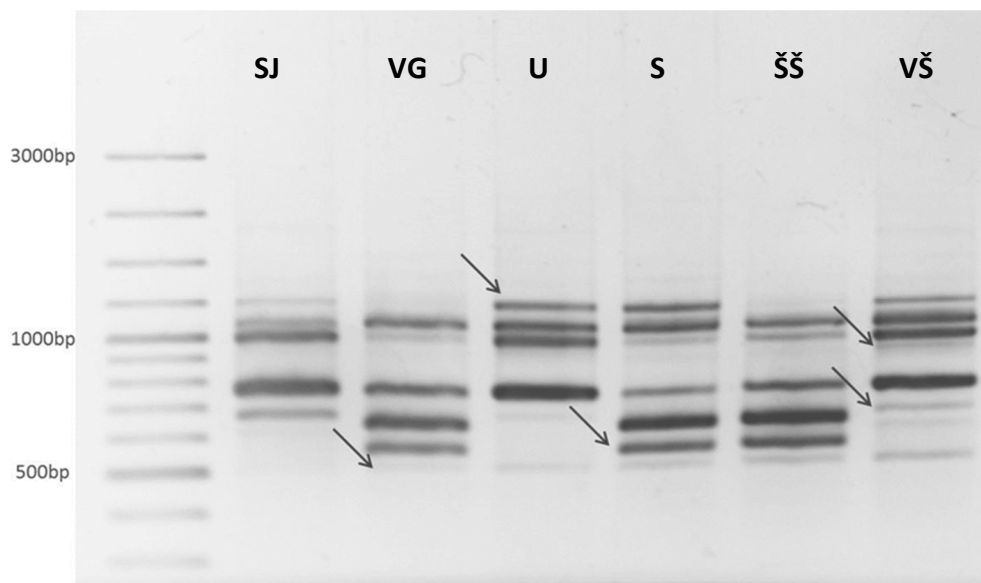
PCR reakcije provedene su za sve ispitivane biljke koristeći devet komercijalno dostupnih početnica prikazanih u Tablici 7. Ukupan broj umnoženih odsječaka i broj polimorfnih vrpca prikazan je u Tablici 7.

Tablica 7. Ukupan broj odsječaka te broj i postotak polimorfnih vrpca dobivenih PCR reakcijom koristeći navedene početnice za vrstu *T. arduini*.

Početnice	Ukupan broj odsječaka	Broj polimorfnih odsječaka	% polimorfnih odsječaka
OPA-07	6	5	83
OPA-13	9	5	56
OPA-02	4	1	25
OPB-06	7	4	57
OPB-10	12	11	92
OPC-03	4	3	75
OPC-06	15	15	100
OPD-15	12	11	92
OPE-04	6	5	83
Ukupno	75	60	80

RAPD analiza za biljnu vrstu *T. arduini* sa šest različitih lokaliteta koristeći devet početnica rezultirala je sveukupno s 75 umnoženih odsječaka, od čega ih je 60 (80%) polimorfnih. Primjer agaroznog gela elektroforetske analize s produktima PCR reakcije za

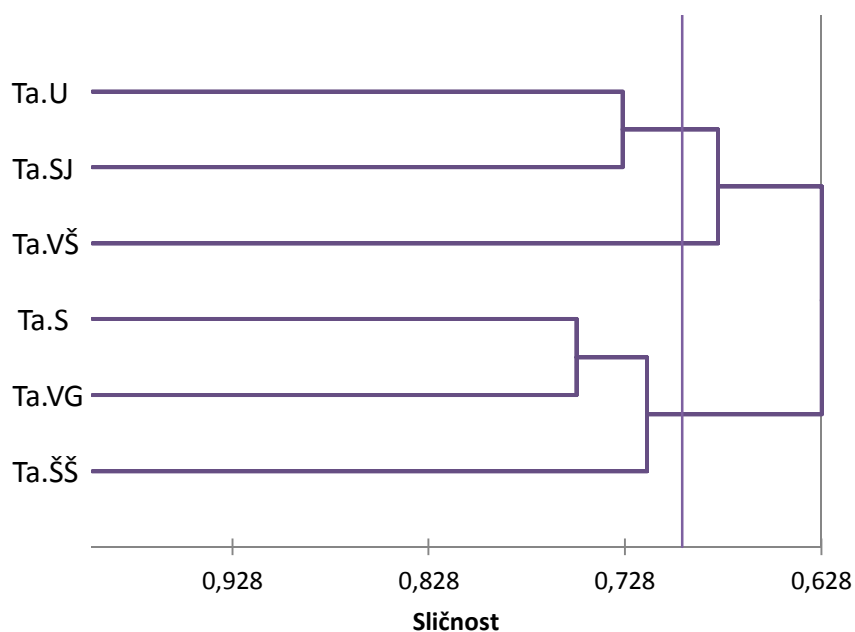
početnicu OPA-13 prikazan je na Slici 20. Za većinu početnica odsječki su bili veličine između 300 i 2000 parova baza, dok je uz korištenje početnice OPC-06 prisutan i odsječak od 3000 parova baza. S većinom početnica (osim OPA-02) dobiveno je više od 50% polimorfnih odsječaka, a najveći broj polimorfnih odsječaka dobiven je uz korištenje početnice OPC-06. Od dobivenih podataka kreirana je matrica genetske sličnosti bazirana na Dice-ovom koeficijentu koja je prikazana u Tablici 8. Najveću genetsku sličnost prema Dice-ovom koeficijentu pokazuju uzorci s lokaliteta Vaganac i Sniježnica (0,753), dok najveću različitost pokazuju uzorci s Učke i Šušnja (0,556). Također, s obzirom na dobivene rezultate konstruiran je UPMG dendrogram koji je prikazan na Slici 21. Prema prikazanom dendrogramu ispitivani uzorci su se odijelili u tri grupe. U prvoj se nalaze uzorci s lokaliteta Učka i Sveti Jure, drugoj uzorak s lokaliteta Vošac, dok su u trećoj grupi uzorci s lokaliteta Sniježnica, Vaganac i Šušanj.



Slika 20. Primjer elektroforetske analize produkta PCR reakcije s početnicom OPA-13 za vrstu *T. arduini* sa šest različitih lokaliteta: SJ- Sveti Jure, VG- Vaganac, U- Učka, S- Sniježnica, ŠŠ- Šušanj, VŠ- Vošac. Polimorfni odsječki označeni su strelicama.

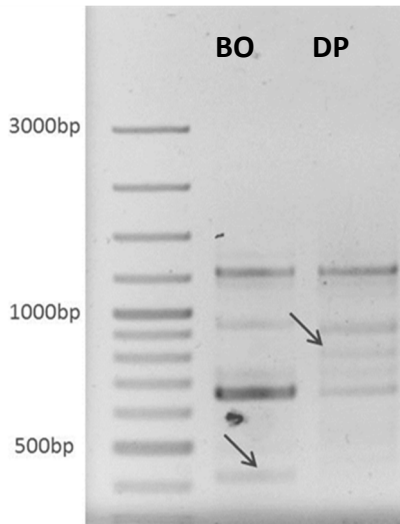
Tablica 8. Matrica genetičke sličnosti izračunata prema Diceo-ovom koeficijentu za uzorke vrste *T. arduini* sa šest različitih lokaliteta

	Ta.SJ	Ta.VG	Ta.U	Ta.S	Ta.ŠŠ	Ta.VŠ
Ta.SJ	1					
Ta.VG	0,614	1				
Ta.U	0,729	0,690	1			
Ta.S	0,627	0,753	0,610	1		
Ta.ŠŠ	0,575	0,720	0,556	0,714	1	
Ta.VŠ	0,688	0,695	0,674	0,689	0,600	1



Slika 21. UPGMA dendrogram za uzorke vrste *T. arduini* sa šest različitih lokaliteta temeljem matrice genetske sličnosti izračunate Dico-ovim koeficijentom.

U vrste *R. intermedia* ispitivani su uzorci s dva lokaliteta: Orebić i Dundović podi. Sve početnice osim OPC-03 rezultirale su produktima u reakcijama PCR. Broj odsječaka kao i broj polimorfnih odsječaka prikazan je u Tablici 9.



Slika 22. Primjer elektroforetske analize produkata PCR reakcije korištenjem početnice OPA-02 za vrstu *R. intermedia* s dva različita lokaliteta: B- Bojinac; DP-Dundović podi. Polimorfni odsječci označeni su strelicama.

Tablica 9. Ukupan broj odsječaka, broj i postotak polimorfnih odsječaka dobivenih PCR reakcijom s navedenim početnicama za vrstu *R. intermedia*.

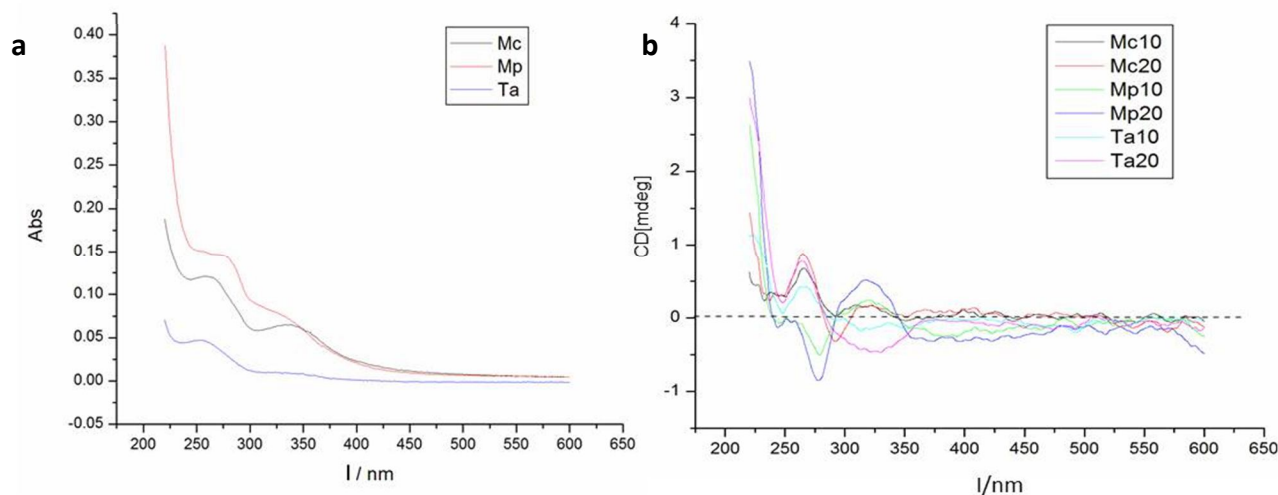
	Ukupan broj odsječaka	Broj polimorfnih odsječaka	% polimorfnih odsječaka
OPA-07	7	3	43
OPA-13	9	2	22
OPA-02	7	2	29
OPB-06	6	4	67
OPB-10	5	5	100
OPC-06	3	3	100
OPD-15	4	2	50
OPE-04	5	3	60
Ukupno	46	24	52

Kako se radi o uzorcima sa samo dva lokaliteta ukupan broj odsječaka je mali, no više od 50% je polimorfnih. Primjer gel elektroforeze za vrstu *R. intermedia* s početnicom OPA-02 koja daje 7 odsječaka od kojih su 2 polimorfna prikazan je na Slici 22. Za navedena dva lokaliteta također je izračunati Dico koeficijent koj iznosi 0,647.

Kod vrsta *M. croatica* i *M. petraea* iako je DNA uspješno izolirana metodom sa CTAB-om (Slika 19.), nakon višestrukih pokušaja i modifikacija, PCR reakcija nije dala nikakvih produkata ni s jednom od korištenih početnica. Da bismo odbacili mogućnost da ni jedna od isprobanih početnica nije adekvatna, PCR reakcija je provedena i s početnicama specifičnim za gen koji kodira za protein fotosintetskog aparata (TROL) koji je konzerviran u svim biljkama (Jurić i sur., 2000). PCR reakcija ni uz navedenu početnicu nije rezultirala produktima kod vrsta *M. petraea* i *M. croatica*. Da bismo odbacili mogućnost problema s polimerazom ili nekim drugim komponentama potrebnim za reakciju PCR-a, kao pozitivna

kontrola u slučaju problematičnih uzoraka poslužila je reakcija u kojoj je kao kalup korištena DNA vrsta *T. arduini*, *R. Intermedia* ili *Brassica rapa* L. kod kojih je redovito utvrđen pozitivan ishod amplifikacije uz korištene početnice. Nažalost, uzorci vrsta *M. croatica* i *M. petraea* nisu rezultirali amplificiranim odsječcima niti u jednoj modifikaciji izvođenja reakcije PCR-a (modifikacije u izolacijama DNA, količini kalupa DNA, količini polimeraze, variranju $MgCl_2$).

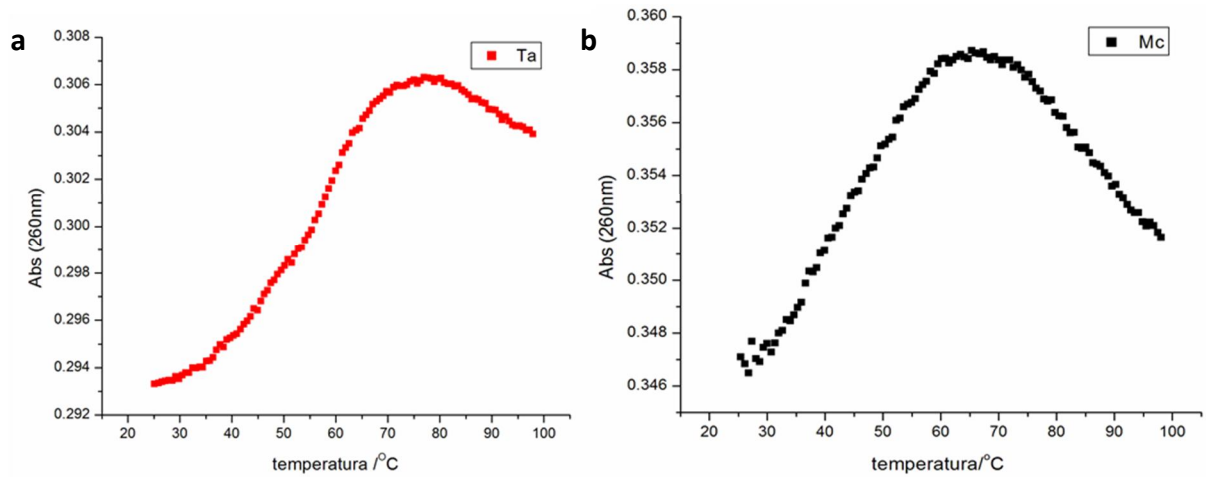
S obzirom na probleme s amplifikacijom odsječaka DNA u slučaju vrsta *M. croatica* i *M. petraea* napravljene su, u prvom redu, brojne modifikacije prilikom izolacije DNA kako bi se uzorak dodatno pročistio. Tako su korišteni različiti deterdženti (različite koncentracije SDS-a, CTAB-a, kombinacija SDS-a i CTAB-a), različite koncentracije NaCl-a te ponovno taloženje s natrij-acetatom. Isprobana je i izolacija za biljke sušene na zraku gdje je moguće da ima više oštećene DNA (Al-Judy i Jaladet, 2008), te metode za problematične biljke bogate polifenolima i polisaharidima (Khanuja i sur., 1999; Angeles i sur., 2005; Moyo i sur., 2008; Vural, 2009; Japelaghi i sur., 2011; Borse i sur., 2011; Maltas i sur., 2011) koje su uključivale dodatna pročišćavanja. Također, isprobana je izolacija uz pomoć komercijalnog kompleta za izolaciju biljne DNA (Dneasy Plant Mini kit, Qiagen), sa i bez dodatnog pročišćavanja sa smjesom izopropanola i izoamilnog alkohola kao i uz dodavanje β -merkaptetanola. Svi navedeni načini izolacije dali su DNA različite kvalitete i koncentracije koja je bila vidljiva na agaroznom gelu no PCR reakcije nisu rezultirale produktima. Primjećeno je, nadalje, da DNA tih vrsta nakon provedene elektroforeze u gelu agaroze zaostaje u jažicama. Nadalje, izvedena je preparativna elektroforeza DNA sa svrhom dodatnog pročišćavanja. Ta metoda je dala mali prinos DNA i nažalost bez pozitivnog rezultata u PCR reakciji. Svi navedeni pokušaji neuspjele PCR reakcije upućivali su na činjenicu da je tijekom izolacije ili već prilikom sušenja uzoraka došlo do vezivanja neke komponente za DNA što onemogućava uspješnost amplifikacije DNA odsječaka u reakciji polimerazom. Drugi potencijalni problem može biti da je, i nakon intenzivnih pročišćavanja DNA uzoraka u ekstraktu prisutna neka komponenta koja inhibira polimerazu te sprečava umnažanje odsječaka prilikom PCR reakcije. Navedeni problemi poznati su u literaturi (Khanuja i sur., 1999; Sharma i sur., 2002). Kako bismo utvrdili dali je došlo do vezivanja neke komponente na DNA molekulu snimljeni su UV i CD spektri uzoraka DNA izoliranih iz vrsta *M. petraea* i *M. croatica* te *T. arduini* kao pozitivne kontrole, tj. uzorka kod kojeg nismo imali problema s umnažanjem DNA. UV i CD spektar prikazani su na Slici 23. a i b.



Slika 23. UV (a) i CD (b) spektar DNA izolata iz vrste *M. croatica*, *M. petraea* i *T. arduini*.

UV spektar molekule DNA izolirane iz vrste *T. arduini* snimljen u području 200-600 nm (Slika 23.a) pokazuje maksimum apsorbancije na 255 nm što odgovara apsorbanciji DNA. CD (cirkularni dikroizam) spektar omogućuje nam dobivanje podataka o strukturi molekule te smo navedenom metodom pokazali da je iz vrste *T. arduini* izolirana dobro strukturirana dvolančana DNA molekula (Slika 23.b). Rezultati obiju metoda upućuju i na prisutnost komponente čija je maksimalna valna duljina apsorbancije oko 320 nm. Međutim, količina te komponente je niska u uzorku vrste *T. arduini*. Ista komponenta se nalazi u puno višoj koncentraciji u uzorku vrste *M. croatica*, a posebice u vrste *M. petraea* (Slika 23.b). Nadalje, kod obje spomenute vrste UV spektar pokazuje prisutnost komponenata s maksimumom apsorbancije kod 260 nm što bi odgovaralo DNA molekuli. Međutim CD spektar istog uzorka nam pokazuje da je kod vrste *M. croatica* prisutna veoma niska količina DNA, dok je kod vrste *M. petraea* DNA u koncentracijama ispod granice detekcije instrumenta. Radi se očito o spoju čiji je maksimum apsorbancije pri 260 nm i prekriva spektar DNA. Zbog navedenih činjenica bilo je veoma teško odrediti točnu koncentraciju DNA u navedena dva uzorka jer su se spektrofotometrijskim određivanjem dobili pogrešni rezultati zbog preklapanja apsorbancija pri valnoj duljini od 260 nm. Prisutnost DNA je dokazana gel elektroforezom (Slika 19), no njezina je koncentracija vjerojatno puno niža od izmjerene. Nadalje, zbog nemogućnosti provođenja PCR reakcije pretpostavili smo da je došlo do vezivanja neke komponente (sekundarnog metabolita) na DNA. U tu svrhu proveden je eksperiment "mekšanja" molekule DNA. Rezultati promjena apsorbancije u ovisnosti o temperaturi za DNA vrsta *T. arduini* (pozitivna kontrola) i *M. croatica* prikazani su na Slici 24.

I ovom metodom je kod vrste *M. petraea* utvrđeno da u uzorku dominira neki drugi, za sada neidentificirani spoj.



Slika 24. Promjena apsorbancije u ovisnosti o temperaturi za izoliranu DNA vrsta a) *T. arduini* i b) *M. petraea*.

Kod vrste *T. arduini* koja je poslužila kao pozitivna kontrola temperatura "mekšanja" DNA bila je oko 57 °C što odgovara temperaturi mekšanja dvolančane DNA koja je bogata dvostrukim A-T vezama koje pucaju kod nižih temperatura. Iz rezultata je vidljiva dvofazna denuracijska krivulja što upućuje i na prisutnost neke destabilizacijske komponente, ali u niskim koncentracijama. Kod vrste *M. croatica* situacija je drugačija, temperatura mekšanja je bila 46 °C što svakako upućuje na prisutnost destabilizacijske komponente te njena prisutnost očito uzrokuje probleme kod provođenja PCR reakcije.

3.2. POLIFENOLNE GRUPE SPOJEVA ODREĐENE SPEKTROFOTOMETRIJSKIM METODAMA

U biljnim vrstama od interesa određen je udio ukupnih fenola, flavonoidi, flavanola, hidroksicimetnih kiselina te proantocijanidina (Tablice 10-13.) u različitim dijelovima biljaka sa različitih lokaliteta.

3.2.1. *Teucrium arduini*

Tablica 10. Količina ukupnih fenola (TP; mg GAE/g sm), ukupnih flavonoida (TF; mg CE/g sm), ukupnih hidroksicimetnih kiselina (THA; mg CAE/g sm) ukupnih flavanola (TFL; mg QE/g sm) te proantocijanidina (TPAN; mg CE/g sm) u listu (L), cvatu (C) i stabljici (S) vrste *T. arduini* sa šest različitih lokaliteta.

		Sniježnica	Sveti Jure	Vošac	Šušanj	Učka	Vaganac
TP	L	37,27±1,54 ^d	47,08±1,19 ^{bc}	40,94±2,66 ^{cd}	45,58±3,10 ^{bc}	59,15±2,59 ^a	48,97±3,28 ^b
	C	26,39±1,31 ^e	23,72±1,20 ^{efg}	24,19±2,21 ^{efg}	9,01±0,99 ^h	18,63±0,83 ^g	10,66±0,24 ^h
	S	20,12±2,17 ^{fg}	18,37±1,20 ^g	20,02±0,79 ^{fg}	25,29±0,58 ^{ef}	25,16±2,23 ^{ef}	24,86±3,55 ^{ef}
TF	L	34,24±1,46 ^e	47,48±5,05 ^d	48,58±2,71 ^d	58,58±4,09 ^c	81,86±4,01 ^a	67,09±5,35 ^b
	C	24,70±0,59 ^{fg}	26,63±0,42 ^{efg}	20,77±1,54 ^g	9,03±1,39 ^h	19,64±0,95 ^g	7,02±0,33 ^h
	S	21,20±0,21 ^g	21,79±1,19 ^g	22,64±2,69 ^g	33,54±2,45 ^e	34,00±1,56 ^e	32,19±4,31 ^{ef}
THA	L	67,75±5,20 ^d	82,09±5,71 ^c	82,84±2,03 ^c	87,84±5,31 ^{bc}	119,66±3,44 ^a	92,98±4,07 ^b
	C	34,33±1,64 ^{efg}	37,08±1,63 ^e	31,00±1,56 ^{efg}	11,79±1,80 ^h	26,02±1,33 ^g	13,53±2,39 ^h
	S	26,36±0,49 ^g	26,99±1,79 ^{fg}	25,53±3,44 ^g	36,07±1,74 ^{ef}	36,95±1,58 ^e	33,28±3,97 ^{efg}
TFL	L	38,79±1,95 ^d	51,01±2,82 ^{bc}	47,16±1,61 ^c	51,89±3,46 ^{bc}	75,71±2,57 ^a	54,23±1,32 ^b
	C	20,96±1,51 ^e	18,17±3,41 ^{ef}	19,26±2,03 ^e	8,37±1,29 ^h	15,51±1,37 ^{efg}	10,99±2,40 ^{gh}
	S	12,43±0,63 ^{fgh}	11,44±1,64 ^{gh}	10,77±3,12 ^{gh}	16,09±1,28 ^{efg}	16,41±1,17 ^{efg}	15,22±1,35 ^{efg}
TPAN	L	2,51±0,11 ^f	3,38±0,27 ^f	2,54±0,09 ^f	3,17±0,18 ^f	6,22±0,45 ^d	2,80±0,11 ^f
	C	0,91±0,06 ^g	3,06±0,23 ^f	1,25±0,30 ^g	1,20±0,26 ^g	2,59±0,12 ^f	0,78±0,27 ^g
	S	11,26±1,02 ^{ab}	12,14±0,36 ^a	10,16±0,40 ^b	6,15±0,39 ^d	8,92±0,43 ^c	4,99±0,43 ^e

Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-h.

Značajno veći udio ispitivanih fenolnih grupa spojeva određen je u listovima vrste *T. arduini* u usporedbi sa cvatovima i stabljikama s istih lokaliteta. Jedino je količina ukupnih proantocijanidina značajno viša u stabljikama u odnosu na cvat i list.

Udio ukupnih polifenola, s obzirom na lokalitete, kretao se u listovima od $37,27 \pm 1,54$ (Sniježnica) do $59,15 \pm 2,59$ (Učka) mg GAE/g sm. Najveća varijacija u količini ukupnih fenola primijećena je u cvatovima s različitih lokaliteta i kretala se od $9,01 \pm 0,99$ mg GAE/g sm za lokalitet Šušanj do skoro 3 puta veće vrijednosti u uzorcima s lokaliteta Sniježnica ($26,39 \pm 1,31$ mg GAE/g sm). U stabljikama s lokaliteta Šušanj ($25,29 \pm 0,58$ mg GAE/g sm), Učka ($25,16 \pm 2,23$ mg GAE/g sm) i Vaganac ($24,86 \pm 3,55$ mg GAE/g sm) određen je gotovo jednak udio ukupnih fenola dok je u stabljikama s lokaliteta Sniježnica ($20,12 \pm 2,17$ mg GAE/g sm), Sveti Jure ($18,37 \pm 1,20$ mg GAE/g sm) i Vošac ($20,02 \pm 0,79$ mg GAE/g sm) udio bio nešto niži.

Sličan trend zabilježen je i kod ukupnih flavonoida (TF) gdje list s lokaliteta Učka također pokazuje najvišu razinu TF ($81,86 \pm 4,01$ mg CE/g sm) koja je gotovo 2,4 puta viša od količine ukupnih flavonoida izmjerenih u listu s lokaliteta Sniježnica ($34,24 \pm 1,46$ mg CE/g sm). Najniža vrijednost za listove usporediva je s najvišom vrijednosti ukupnih flavonoida izmjerenih u stabljikama ($34,00 \pm 1,56$ mg CE/g sm, lokalitet Učka). Slično kao i kod ukupnih fenola najnižu vrijednost u cvatovima pokazuju uzorci vrste *T. arduini* s lokaliteta Šušanj ($9,03 \pm 1,39$ mg CE/g sm) i Vaganac ($7,02 \pm 0,33$ mg CE/g sm).

Ukupne hidroksicimetne kiseline izražene su u miligramima kava kiseline po gramu suhe mase biljnog materijala (mg CAE/g sm) i najviša vrijednost izmjerena je u listovima s lokaliteta Učka ($119,66 \pm 3,44$ mg CAE/g sm), a najniža u cvatovima s lokaliteta Šušanj ($11,79 \pm 1,80$ mg CAE/g sm). Lokalitet Sveti Jure i Vošac ne pokazuju značajne razlike u udjelu hidroksicimetnih kiselina ni u jednom ispitivanom biljnom organu, dok ostali lokaliteti pokazuju značajan utjecaj na razinu hidroksicimetnih kiselina. Kod svih lokaliteta u listovima se nalazi značajno viši udio THA nego u cvatovima i stabljikama. Kod lokaliteta Sniježnica, Sveti Jure i Vošac razina THA viša je u cvatovima (redom: $34,33 \pm 1,64$, $37,08 \pm 1,63$, $31,00 \pm 1,56$ mg CAE/g sm), u usporedbi sa stabljikom (redom: $26,36 \pm 0,49$, $26,99 \pm 1,79$, $25,53 \pm 3,44$ mg CAE/g sm), dok je kod lokaliteta Šušanj, Učka i Vaganac u stabljikama (redom: $36,07 \pm 1,74$, $36,95 \pm 1,58$, $33,28 \pm 3,97$ mg CAE/g sm) njihova razina značajno viša nego u cvatovima (redom: $11,79 \pm 1,80$, $11,79 \pm 1,80$, $13,53 \pm 2,39$ mg CAE/g sm).

Razina flavonola u uzorcima vrste *T. arduini* sa svih lokaliteta je viša dva do tri puta u listovima u odnosu na cvat i stabljiku. U listovima s lokaliteta Sveti Jure ($51,01 \pm 2,82$ mg QE/g sm), Vošac ($47,16 \pm 1,61$ mg QE/g sm), Šušanj ($51,89 \pm 3,46$ mg QE/g sm) i Vaganac ($54,23 \pm 1,32$

mg QE/g sm) ne postoji značajna razlika u udjelu flavonola, dok je u listovima lokaliteta Učka ($75,71 \pm 2,57$ mg QE/g sm) razina najviša, a na lokalitetu Sniježnica ($38,79 \pm 1,95$ mg QE/g sm) najniža. U cvatovima s lokaliteta Sniježnica ($20,96 \pm 1,51$ mg QE/g sm), Sveti Jure ($18,17 \pm 3,41$ mg QE/g sm), Vošac ($19,26 \pm 2,03$ mg QE/g sm) i Učka ($15,51 \pm 1,37$ mg QE/g sm) razina flavonola je približno jednaka dok je ona s lokaliteta Šušanj ($8,37 \pm 1,29$ mg QE/g sm) i Vaganac ($10,99 \pm 2,40$ mg QE/g sm) nešto niža. U stabljikama različitih lokaliteta nema značajne razlike u udjelu ukupnih flavonola.

Kao što je već spomenuto, jedino je udio proantocijanidina značajno viši u stabljici u odnosu na cvatove i listove. Samo razina proantocijanidina u listovima vrste *T. arduini* s lokaliteta Učka ($6,22 \pm 0,45$ mg CE/g sm) pokazuje nešto višu vrijednost u odnosu na listove s drugih lokaliteta kod kojih se vrijednost kreće između $2,51 \pm 0,11$ mg CE/g sm (Sniježnica) i $3,38 \pm 0,27$ mg CE/g sm (Sveti Jure). Kod cvatova je nešto drugačiji utjecaj lokaliteta pa tako cvat vrste *T. arduini* s lokaliteta Vaganac ($0,78 \pm 0,27$ mg CE/g sm) pokazuje najnižu vrijednost, a cvat s lokaliteta Sveti Jure ($3,06 \pm 0,23$ mg CE/g sm) najvišu. U stabljikama izmjerena razina proantocijanidina kreće se od $4,99 \pm 0,43$ mg CE/g sm (Vaganac) pa do čak $12,14 \pm 0,36$ mg CE/g sm (Sveti Jure).

3.2.2. *Moltkia petraea*

Razina ukupnih polifenola u listovima i cvatovima vrste *M. petraea* s lokaliteta Orebić (list: $23,88 \pm 0,76$ mg GAE/g sm; cvat: $25,59 \pm 0,86$ mg GAE/g sm) i Dinara (list: $20,26 \pm 1,34$ mg GAE/g sm; cvat: $21,38 \pm 1,78$ mg GAE/g sm) ne pokazuje značajne razlike. U stabljikama s oba lokaliteta razina ukupnih polifenola (Orebić: $17,87 \pm 0,55$ mg GAE/g sm; Dinara: $9,79 \pm 0,57$ mg GAE/g sm) značajno je niža u usporedbi sa cvatovima i listovima.

Razina flavonoida u vrsti *M. petraea* s lokaliteta Orebić ne pokazuje značajne razlike s obzirom na dio biljke (list: $25,66 \pm 1,72$ mg CE/g sm, cvat: $25,40 \pm 3,08$ mg CE/g sm, stabljika: $20,84 \pm 2,31$ mg CE/g sm), dok je u uzorcima s lokaliteta Dinara udio flavonoida značajno niži u stabljici ($8,66 \pm 0,50$ mg CE/g sm) u odnosu na list ($20,11 \pm 1,63$ mg CE/g sm) i cvat ($20,44 \pm 1,18$ mg CE/g sm). Jednako kao i kod ukupnih polifenola, razina flavonoida nešto je viša u uzorcima s lokaliteta Orebić nego u onih s lokaliteta Dinara.

Tablica 11. Količina ukupnih fenola (TP; mg GAE/g sm), ukupnih flavonoida (TF; mg CE/g sm), ukupnih hidroksicimetnih kiselina (THA; mg CAE/g sm) ukupnih flavonola (TFL; mg QE/g sm) te proantocijanidina (TPAN; mg CE/g sm) u listu (L), cvatu (C) i stabljici (S) vrste *M. petraea* s dva različita lokaliteta.

		Orebić	Dinara
TP	L	23,88±0,76 ^{ab}	20,26±1,34 ^{cd}
	C	25,59±0,86 ^a	21,38±1,78 ^{bc}
	S	17,87±0,55 ^d	9,79±0,57 ^e
TF	L	25,66±1,72 ^a	20,11±1,63 ^b
	C	25,40±3,08 ^a	20,44±1,18 ^{ab}
	S	20,84±2,31 ^{ab}	8,66±0,50 ^c
THA	L	21,20±0,73 ^a	17,13±0,76 ^a
	C	20,08±0,94 ^a	16,12±0,59 ^a
	S	14,86±1,09 ^c	6,37±0,74 ^d
TFL	L	12,82±0,58 ^a	9,77±0,19 ^b
	C	10,01±1,10 ^b	8,00±0,31 ^c
	S	9,77±0,19 ^c	6,82±0,56 ^d
TPAN	L	1,09±0,09 ^{bc}	0,90±0,04 ^{cd}
	C	1,88±0,23 ^a	1,26±0,14 ^b
	S	0,67±0,06 ^{de}	0,41±0,05 ^e

Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-h.

Razina hidroksicimetnih kiselina ne pokazuje značajne razlike u listovima i cvatovima s lokaliteta Orebić (list: 21,20±0,73 mg CAE/g sm; cvat: 20,08±0,94 mg CAE/g sm) i Dinara (list: 17,13±0,76 mg CAE/g sm ; cvat: 16,12±0,59 mg CAE/g sm). Hidroksicimetne kiseline u stabljikama značajno su niže u odnosu na list i cvat (Orebić: 14,86±1,09 mg CAE/g sm; Dinara: 6,37±0,74 mg CAE/g sm).

Listovi oba lokaliteta pokazuju značajno viši udio flavonola (Orebić: 12,82±0,58 mg QE/g sm; Dinara: 9,77±0,19 mg QE/g sm) u usporedbi sa cvatovima (Orebić: 10,01±1,10 mg QE/g sm; Dinara: 8,00±0,31 mg QE/g sm) i stabljikama (Orebić: 9,77±0,19 mg QE/g sm; Dinara: 9,77±0,19 mg QE/g sm). Izmjerene vrijednosti u uzorcima s lokaliteta Dinara značajno su niže u usporedbi s istim biljnim organima lokaliteta Orebić.

Razina proantocijanidina bila je najviša u cvatovima s oba lokaliteta (Orebić: $1,88 \pm 0,23$ mg CE/g sm; Dinara: $1,26 \pm 0,14$ mg CE/g sm) u odnosu na listove (Orebić: $1,09 \pm 0,09$ mg CE/g sm; Dinara: $0,90 \pm 0,04$ mg CE/g sm) i stabljike (Orebić: $0,67 \pm 0,06$ mg CE/g sm; Dinara: $0,41 \pm 0,05$ mg CE/g sm). Jednako kao i kod ostalih izmjerenih skupina polifenola uzorci lokaliteta Orebić pokazuju značajno više vrijednosti.

3.2.3. *Micromeria croatica*

Tablica 12. Količina ukupnih fenola (TP; mg GAE/g sm), ukupnih flavonoida (TF; mg CE/g sm), ukupnih hidroksicimetnih kiselina (THA; mg CAE/g sm) ukupnih flavonola (TFL; mg QE/g sm) te proantocijanidina (TPAN; mg CE/g sm) u listu (L), cvatu (C) i stabljici (S) vrste *M. croatica* s tri različita lokaliteta.

		Stupačinovo	Bojinac	Bačić kuk
TP	L	$23,37 \pm 0,39^c$	$26,31 \pm 1,47^b$	$29,74 \pm 1,05^a$
	C	$26,18 \pm 0,75^b$	$23,07 \pm 0,97^c$	$24,14 \pm 1,44^{bc}$
	S	$18,07 \pm 0,73^d$	$12,81 \pm 0,75^e$	$15,01 \pm 0,29^e$
TF	L	$26,70 \pm 0,50^{ab}$	$27,98 \pm 3,83^a$	$29,57 \pm 0,04^a$
	C	$27,65 \pm 0,66^a$	$21,09 \pm 2,72^{bc}$	$31,24 \pm 2,54^a$
	S	$18,26 \pm 0,61^{cd}$	$11,05 \pm 0,31^e$	$12,91 \pm 1,86^{de}$
THA	L	$15,95 \pm 0,74^{cde}$	$17,95 \pm 0,08^{bcd}$	$19,26 \pm 0,16^{abc}$
	C	$19,64 \pm 2,70^{ab}$	$14,82 \pm 1,26^{def}$	$22,44 \pm 1,83^a$
	S	$11,44 \pm 0,92^{fg}$	$10,00 \pm 0,45^g$	$12,75 \pm 0,62^{efg}$
TFL	L	$5,49 \pm 0,43^{bcd}$	$6,41 \pm 0,33^{bc}$	$6,03 \pm 0,10^{bc}$
	C	$9,31 \pm 1,22^a$	$6,46 \pm 0,58^b$	$9,71 \pm 1,16^a$
	S	$4,52 \pm 0,61^{cd}$	$4,05 \pm 0,16^d$	$5,50 \pm 0,33^{bcd}$
TPAN	L	$1,06 \pm 0,05^b$	$1,01 \pm 0,12^b$	$0,90 \pm 0,12^{bc}$
	C	$1,74 \pm 0,10^a$	$1,27 \pm 0,07^b$	$1,77 \pm 0,07^a$
	S	$0,56 \pm 0,08^{cd}$	$0,49 \pm 0,06^d$	$0,45 \pm 0,03^d$

Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-h

Nakupljanje ukupnih polifenola u vrsti *M. croatica* također je različito s obzirom na biljni organ i značajno ovisi o lokalitetu. U uzorcima s lokaliteta Bojinac i Bačić Kuk izmjerena je najviša razina ukupnih polifenola u listovima (Bojinac: $26,31 \pm 1,47$ mg GAE/g sm; Bačić kuk: $29,74 \pm 1,05$ mg GAE/g sm), dok je kod lokaliteta Stupačinovo najviša vrijednost izmjerena u

cvatu ($26,18 \pm 0,75$ mg GAE/g sm). U stabljikama je izmjeren značajno niži udio ukupnih polifenola na sva tri lokaliteta (Stupačinovo: $18,07 \pm 0,73$ mg GAE/g sm; Bojinac: $12,81 \pm 0,75$ mg GAE/g sm; Bačić kuk: $15,01 \pm 0,29$ mg GAE/g sm).

Ukupni flavonoidi pokazali su gotovo istu vrijednost u listu i cvatu s lokaliteta Stupačinovo (list: $26,70 \pm 0,50$ mg CE/g sm; cvat: $27,65 \pm 0,66$ mg CE/g sm) i Bačić kuk (list: $29,57 \pm 0,04$ mg CE/g sm ; cvat: $31,24 \pm 2,54$ mg CE/g sm), dok je kod lokaliteta Bojinac u cvatu ($21,09 \pm 2,72$ mg CE/g sm) izmjerena značajno niža razina flavonoida nego u listu ($27,98 \pm 3,83$ mg CE/g sm). U stabljikama, razina flavonoida dvostruko je niža nego u listovima i cvatovima i iznosila je $18,26 \pm 0,61$ mg CE/g sm za lokalitet Stupačinovo, $11,05 \pm 0,31$ mg CE/g sm za lokalitet Bojinac te $12,91 \pm 1,86$ mg CE/g sm za lokalitet Bačić kuk.

Kod vrste *M. croatica* hidroksicimetne kiseline pokazivale su najvišu vrijednost u cvatovima biljaka s lokaliteta Stupačinovo ($19,64 \pm 2,70$ mg CAE/g sm) i Bačić kuk ($22,44 \pm 1,83$ mg CAE/g sm) te u listu s lokaliteta Bojinac ($17,95 \pm 0,08$ mg CAE/g sm). Lokalitet nije značajno utjecao na razinu hidroksicimetnih kiselina u stabljikama te je ona iznosila $11,44 \pm 0,92$ mg CAE/g sm u biljkama s lokaliteta Stupačinovo, $10,00 \pm 0,45$ mg CAE/g sm s lokaliteta Bojinac te $12,75 \pm 0,62$ mg CAE/g sm u stabljikama biljaka s lokaliteta Bačić kuk.

Flavonoli su pokazali značajno više vrijednosti u cvatovima (Stupačinovo: $9,31 \pm 1,22$ mg QE/g sm; Bačić Kuk: $9,71 \pm 1,16$ mg QE/g sm) u usporedbi s listovima (Stupačinovo: $5,49 \pm 0,43$ mg QE/g sm; Bačić kuk: $6,03 \pm 0,10$ mg QE/g sm) i stabljikama (Stupačinovo: $4,52 \pm 0,61$ mg QE/g sm; Bačić kuk: $5,50 \pm 0,33$ mg QE/g sm) za lokalitete Stupačinovo i Bačić kuk. Kod lokaliteta Bojinac primijećena je gotovo jednaka razina flavonola u listu ($6,41 \pm 0,33$ mg QE/g sm) i cvatu ($6,46 \pm 0,58$ mg QE/g sm). Kod lokaliteta Stupačinovo i Bačić kuk razina flavonola u listu i stabljici (Stupačinovo: $4,52 \pm 0,61$ mg QE/g sm; Bačić kuk: $5,50 \pm 0,33$ mg QE/g sm) nije se značajno razlikovala, dok je kod lokaliteta Bojinac stabljika ($4,05 \pm 0,16$ mg QE/g sm) pokazala značajno nižu vrijednost u usporedbi sa ostalim dijelovima biljke. Lokalitet nije značajno utjecao na razinu flavonola, osim kod cvatova.

Jednako kao i kod flavonola, lokalitet je značajno utjecao samo na razinu proantocijanidina u cvatovima biljaka s lokaliteta Bojinac ($1,27 \pm 0,07$ mg CE/g sm) koji su nakupili nižu količinu u usporedbi sa cvatovima biljaka s lokaliteta Stupačinovo ($1,74 \pm 0,10$ mg CE/g sm) i Bačić kuk ($1,77 \pm 0,07$ mg CE/g sm). U listovima (Stupačinovo: $1,06 \pm 0,05$ mg

CE/g sm; Bojinac: 1,01±0,12 mg CE/g sm; Bačić kuk: 0,90±0,12 mg CE/g sm) je izmjerena nešto niža vrijednost proantocijanidina nego u cvatu dok je kod stabljika (Stupačinovo: 0,56±0,08 mg CE/g sm; Bojinac: 0,49±0,06 mg CE/g sm; Bačić kuk: 0,45±0,03 mg CE/g sm) ona bila najniža.

3.2.4. *Rhamnus intermedia*

Tablica 13. Količina ukupnih fenola (TP; mg GAE/g sm), ukupnih flavonoida (TF; mg CE/g sm), ukupnih hidroksicimetnih kiselina (THA; mg CAE/g sm), ukupnih flavonola (TFL; mg QE/g sm) te proantocijanidina (TPAN; mg CE/g sm) u listu (L) i kori (K) vrste *R. intermedia* s dva različita lokaliteta

		Dundović podi	Bojinac
TP	L	33,62±6,78 ^b	46,40±4,12 ^a
	K	26,11±1,93 ^{bc}	19,31±1,60 ^c
TF	L	12,01±0,98 ^a	8,28±0,50 ^b
	K	8,96±1,32 ^b	3,58±0,10 ^c
THA	L	34,03±2,46 ^a	25,78±0,59 ^b
	K	16,28±1,45 ^c	12,53±1,65 ^c
TFL	L	34,79±1,65 ^a	26,94±0,49 ^b
	K	19,35±1,90 ^c	14,20±2,03 ^d
TPAN	L	19,51±0,97 ^a	16,20±0,27 ^b
	K	8,03±0,42 ^c	1,38±0,20 ^d

Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-h

Kod vrste *R. intermedia* razina različitih skupina polifenola određivana je u listu i kori biljaka s lokaliteta Dundović podi na Sjevernom, te Bojinac na južnom Velebitu. Udio ukupnih polifenola bio je značajno viši u listu u usporedbi s korom u uzorcima s lokaliteta Bojinac (list: 46,40±4,12 mg GAE/ g sm; kora: 19,31±1,60 mg GAE/ g sm), dok se razina TP u listu i kori nije značajno razlikovala u uzorcima s lokaliteta Dundović podi (list: 33,62±6,78 mg GAE/ g sm; kora: 26,11±1,93 mg GAE/ g sm). S obzirom na lokalitet, list lokaliteta Bojinac te kora lokaliteta Dundović podi pokazale su značajno više vrijednosti u usporedbi s istim dijelom biljke s drugog lokaliteta.

Drugačija je situacija za ukupne flavonoide gdje su uzorci sa lokaliteta Dundović podi pokazali značajno više vrijednosti i u listu ($12,01 \pm 0,98$ mg CE/g sm) i u kori ($8,96 \pm 1,32$ mg CE/g sm). U kori biljaka s lokaliteta Dundović podi izmjerena je gotovo jednaka vrijednost TP kao i u listu lokaliteta Bojinac ($8,28 \pm 0,50$ mg CE/g sm), dok je u kori lokaliteta Bojinac razina flavonoida značajno niža i iznosi $3,58 \pm 0,10$ mg CE/g sm.

Ukupne hidroksicimetne kiseline također su izmjerene u višim vrijednostima u listu (Dundović podi: $34,03 \pm 2,46$ mg CAE/g sm; Bojinac: $25,78 \pm 0,59$ mg CAE/g sm) u usporedbi s korom (Dundović podi: $16,28 \pm 1,45$ mg CAE/g sm; Bojinac: $25,78 \pm 0,59$ mg CAE/g sm). S obzirom na lokalitet u listu je značajno veća razina THA u uzorcima s lokaliteta Dundović podi dok u kori sa različitih lokaliteta razina nije značajno različita.

Malo drugačiji trend je kod flavonola gdje i list i kora s lokaliteta Dundović podi pokazuju više vrijednosti (list: $34,79 \pm 1,65$ mg QE/g sm; kora: $19,35 \pm 1,90$ mg QE/g sm) u usporedbi s lokalitetom Bojinac (list: $26,94 \pm 0,49$ mg QE/g sm; kora: $14,20 \pm 2,03$ mg QE/g sm). Također je i razina TFL značajno je viša u listovima biljaka s oba lokaliteta.

Proantocijanidini pokazuju više vrijednosti u listovima i to 2,4 puta višu vrijednost za lokalitet Dundović podi (list: $19,51 \pm 0,97$ mg CE/g sm; kora: $8,03 \pm 0,42$ mg CE/g sm) te 11,7 puta višu vrijednost za lokalitet Bojinac (list: $16,20 \pm 0,27$ mg CE/g sm; kora: $1,38 \pm 0,20$ mg CE/g sm). I ovdje uzorci lokaliteta Dundović podi pokazuju značajno više vrijednosti u usporedbi s lokalitetom Bojinac.

3.3. PROFIL FENOLNIH KISELINA ODREĐEN UPLC-MS/MS METODOM

Sastav i koncentracije pojedinih fenolnih kiselina određeni su tekućinskom kromatografijom vrlo visoke učinkovitosti uz korištenje masenog spektrometra (UPLC-MS/MS). Ova je metoda izuzetno osjetljiva i precizna u detekciji malih organskih molekula. Rezultati za ispitivane vrste prikazani su u Tablicama 14-18.

3.3.1. *Teucrium arduini*

Tablica 14. Sastav i koncentracija fenolnih kiselina ($\mu\text{g/mL}$) određen UPLC-MS/MS metodom u listu (L), cvatu (C) i stabljici (S) vrste *T. arduini* sa šest različitih lokaliteta.

Fenolne kiseline		Sniježnica	Sveti Jure	Vošac	Šušanj	Učka	Vaganac
galna	L	0,13 \pm 0,01	0,18 \pm 0,10	0,21 \pm 0,03	nd	nd	0,37 \pm 0,19
	C	0,16 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	1,14 \pm 0,01	0,86 \pm 0,22	3,24 \pm 0,06	0,36 \pm 0,03
	S	0,13 \pm 0,07	nd	nd	nd	nd	0,13 \pm 0,03
protokatehinska	L	2,06 \pm 0,02	3,69 \pm 0,01	5,09 \pm 0,08	10,09 \pm 0,06	12,95 \pm 0,04	11,34 \pm 1,11
	C	3,21 \pm 0,28	3,05 \pm 0,2	18,01 \pm 0,69	19,07 \pm 0,45	20,13 \pm 0,19	11,67 \pm 0,22
	S	1,93 \pm 0,09	5,85 \pm 0,12	4,39 \pm 0,85	8,05 \pm 0,62	24,02 \pm 0,89	5,60 \pm 0,32
klorogenska	L	6,3 \pm 0,16	6,79 \pm 0,05	6,92 \pm 0,10	6,32 \pm 0,01	7,79 \pm 0,19	6,45 \pm 0,12
	C	6,29 \pm 0,01	6,43 \pm 0,03	6,80 \pm 0,09	6,12 \pm 0,01	6,56 \pm 0,03	nd
	S	6,20 \pm 0,01	6,36 \pm 0,04	6,29 \pm 0,05	6,29 \pm 0,01	6,54 \pm 0,03	6,26 \pm 0,03
gentistična	L	3,46 \pm 0,15	4,62 \pm 0,17	7,74 \pm 0,08	5,35 \pm 0,46	3,62 \pm 0,12	7,57 \pm 0,29
	C	3,15 \pm 0,03	3,53 \pm 0,01	31,49 \pm 1,29	6,48 \pm 0,65	7,37 \pm 0,19	8,31 \pm 0,60
	S	3,52 \pm 0,04	3,64 \pm 0,02	3,66 \pm 0,17	8,41 \pm 0,42	4,50 \pm 0,15	9,60 \pm 0,01
4-hidroksibenzojeva	L	2,41 \pm 0,09	6,55 \pm 0,33	5,78 \pm 0,08	3,39 \pm 0,09	3,62 \pm 0,02	4,87 \pm 0,08
	C	6,30 \pm 0,15	5,48 \pm 0,41	31,96 \pm 0,39	16,18 \pm 0,92	10,97 \pm 0,01	15,27 \pm 0,86
	S	2,13 \pm 0,19	3,18 \pm 0,01	2,76 \pm 0,58	4,10 \pm 0,30	2,89 \pm 0,09	4,54 \pm 0,24
kava	L	6,53 \pm 0,05	6,46 \pm 0,13	12,63 \pm 0,65	11,33 \pm 0,33	25,37 \pm 0,90	9,62 \pm 1,30
	C	7,56 \pm 0,24	6,10 \pm 0,30	13,59 \pm 0,54	3,66 \pm 0,07	20,59 \pm 0,49	3,64 \pm 0,19
	S	2,56 \pm 0,02	2,84 \pm 0,05	2,77 \pm 0,12	4,34 \pm 0,12	9,53 \pm 0,24	3,83 \pm 0,08
vanilinska	L	1,41 \pm 0,02	3,24 \pm 0,11	2,20 \pm 0,13	2,36 \pm 0,12	3,25 \pm 0,18	2,37 \pm 0,03
	C	2,82 \pm 0,09	3,34 \pm 0,02	5,37 \pm 0,01	5,30 \pm 0,05	5,32 \pm 0,01	5,34 \pm 0,57
	S	2,05 \pm 0,02	2,55 \pm 0,16	2,99 \pm 0,64	3,94 \pm 0,09	4,04 \pm 0,35	3,70 \pm 0,07

siringična	L	3,20±0,11	6,34±0,38	5,09±0,23	4,84±0,35	5,12±0,37	4,18±0,26
	C	4,86±0,11	7,05±0,16	8,64±0,49	5,25±0,14	6,29±0,19	5,47±0,23
	S	3,92±0,13	7,71±0,03	5,35±0,17	6,10±0,22	6,47±0,05	5,59±0,35
3-hidroksibenzojeva	L	nd	nd	0,05±0,01	0,07±0,01	nd	0,08±0,01
	C	0,04±0,01	0,08±0,01	0,05±0,02	0,17±0,03	0,16±0,01	0,17±0,01
	S	0,07±0,02	0,07±0,01	nd	0,18±0,01	0,07±0,01	0,20±0,01
4-kumarinska	L	3,94±0,13	3,48±0,06	2,78±0,09	3,35±0,11	6,08±0,01	4,74±0,14
	C	3,84±0,06	6,99±0,30	18,98±0,60	9,82±0,56	17,22±0,07	12,29±0,80
	S	1,61±0,19	1,24±0,02	0,49±0,19	1,68±0,06	3,90±0,05	2,38±0,06
sinapinska	L	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	C	5,52±0,06	5,80±0,03	6,14±0,10	5,37±0,02	5,67±0,04	nd
	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ferulinska	L	5,18±0,05	8,54±0,18	9,67±0,20	7,83±0,22	13,10±1,08	4,55±0,23
	C	7,71±0,55	11,71±0,56	9,81±0,04	2,82±0,09	14,64±0,31	5,06±0,44
	S	4,72±0,64	6,84±0,12	6,19±1,00	5,88±0,08	22,78±1,59	3,40±0,04
3-kumarinska	L	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-kumarinska	L	nd	nd	0,04±0,01	nd	nd	nd
	C	nd	nd	0,18±0,01	nd	nd	nd
	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
salicilna	L	7,02±0,21	17,79±0,72	11,15±0,13	14,78±0,54	5,04±0,27	21,14±0,37
	C	16,25±1,64	22,45±1,64	35,37±0,50	22,56±1,72	21,74±0,14	31,29±1,38
	S	17,84±0,50	18,47±0,20	9,75±0,95	19,30±1,34	13,09±0,85	24,17±0,55
<i>trans</i> -cimetna	L	2,19±0,05	2,48±0,03	2,22±0,01	1,92±0,08	1,99±0,07	1,93±0,01
	C	2,04±0,03	2,55±0,04	2,04±0,05	nd	1,71±0,01	1,64±0,02
	S	1,89±0,04	1,73±0,01	1,57±0,04	nd	1,78±0,02	1,58±0,01

nd- nije detektirano

U vrsti *T. arduini* sa šest različitih lokaliteta, metodom UPLC-MS/MS, izmjerena je koncentracija 15 slobodnih fenolnih kiselina: galne, protokatehinske, klorogenske, gentistične, 4-hidroksibenzojeve, kava kiseline, vanilinske, siringične, 3-hidroksibenzojeve, 4-kumarinske, sinapinske, ferulinske, 3-kumarinske, 2-kumarinske, salicilne te *trans*-cimetne kiseline. Niti u jednom ispitivanom uzorku vrste *T. arduini* nije detektirana 3-kumarinska

kiselina, dok je sinapinska detektirana samo u cvatovima (osim u biljaka s lokaliteta Vaganac) u koncentraciji od $5,37 \pm 0,02 \mu\text{g/g sm}$ (Šušanj) do $6,14 \pm 0,10 \mu\text{g/g sm}$ (Vošac). 2-kumarinska kiselina detektirana je samo u listu ($0,04 \pm 0,01 \mu\text{g/g sm}$) i cvatu ($0,18 \pm 0,01 \mu\text{g/g sm}$) biljaka s lokaliteta Vošac.

Neke od identificiranih fenolnih kiselina su tkivno specifične, odnosno nalaze se u povećanoj koncentraciji u jednom dijelu biljke u odnosu na ostale, no njihov omjer uvelike ovisi o lokalitetu. Jedna od takvih je galna kiselina čija je koncentracija najviša u cvatovima s lokaliteta Učka ($3,24 \pm 0,06 \mu\text{g/g sm}$), dok je u listu prisutna u nižim koncentracijama. U stabljici s lokaliteta Sveti Jure, Vošac, Šušanj i Učka te u listovima s lokaliteta Šušanj i Učka galna kiselina nije detektirana.

Protokatehinsku kiselinu smo izmjerili u povećanoj koncentraciji u cvatu biljaka s lokaliteta Vošac i Šušanj (Vošac: $18,01 \pm 0,69 \mu\text{g/g sm}$; Šušanj: $19,07 \pm 0,45 \mu\text{g/g sm}$) u odnosu na koncentraciju u listu (Vošac: $5,09 \pm 0,08 \mu\text{g/g sm}$; Šušanj: $10,09 \pm 0,06 \mu\text{g/g sm}$) i stabljici (Vošac: $4,39 \pm 0,85 \mu\text{g/g sm}$; Šušanj: $8,05 \pm 0,62 \mu\text{g/g sm}$). Kod ostalih je lokaliteta omjer nešto drugačiji pa je tako kod lokaliteta Sveti Jure izmjerena najviša koncentracija protokatehinske kiseline u stabljici ($5,85 \pm 0,12 \mu\text{g/g sm}$) u usporedbi s listom ($3,69 \pm 0,01 \mu\text{g/g sm}$) i cvatom ($3,05 \pm 0,2 \mu\text{g/g sm}$) s istog lokaliteta.

Klorogenska kiselina je detektirana u svim uzorcima osim u cvatu biljaka s lokaliteta Vaganac i pokazala je malu razliku u odnosu na različite lokalitete i dijelove biljke. Njena je koncentracija u uzorcima u rasponu od $6,20 \pm 0,01 \mu\text{g/g sm}$ (stabljika Sniježnica) do $7,79 \pm 0,19 \mu\text{g/g sm}$ (list Učka).

Slično kao i klorogenska, gentistična kiselina pokazuje malu razliku u odnosu na različite dijelove biljke s lokaliteta Sniježnica, Sveti Jure i Vaganac. Kod lokaliteta Vošac njena koncentracija u cvatu ($31,49 \pm 1,29 \mu\text{g/g sm}$) je četiri puta viša u odnosu na list ($7,74 \pm 0,08 \mu\text{g/g sm}$) te čak 8,5 puta viša u odnosu na stabljiku ($3,66 \pm 0,17 \mu\text{g/g sm}$).

4-hidroksibenzojeva kiselina pokazuje značajno više razine u cvatovima u odnosu na ostale dijelove biljke na svim lokalitetima osim na lokalitetu Sveti Jure (list: $6,55 \pm 0,33 \mu\text{g/g sm}$; cvat: $5,48 \pm 0,41 \mu\text{g/g sm}$; stabljika: $3,18 \pm 0,01 \mu\text{g/g sm}$), no njezina koncentracija uvelike ovisi o lokalitetu. Najviša je koncentracija izmjerena u cvatu s lokaliteta Vošac ($31,96 \pm 0,39$

$\mu\text{g/g sm}$) dok je njena koncentracija u cvatovima s lokaliteta Sveti Jure čak 5,8 puta niža ($5,48\pm 0,41 \mu\text{g/g sm}$). U listovima i stabljikama koncentracija 4-hidroksibenzojeve kiseline kretala se između $2,13\pm 0,19 \mu\text{g/g sm}$ (stabljika Sniježnica) i $6,55\pm 0,33 \mu\text{g/g sm}$ (list Sveti Jure).

Koncentracija kava kiseline značajno je viša u listu ($25,37\pm 0,90 \mu\text{g/g sm}$) i cvatu ($20,59\pm 0,49 \mu\text{g/g sm}$) vrste *T. arduini* s lokaliteta Učka u usporedbi sa ostalim lokalitetima. Vanilinska kiselina pokazuje oko dva puta više vrijednosti u cvatovima u odnosu na listove i stabljike na svim lokalitetima, a uzorak cvata s lokaliteta Vošac pokazuje najvišu vrijednost od $5,37\pm 0,01 \mu\text{g/g sm}$. Isti uzorak pokazuje i najvišu vrijednost siringične kiseline ($8,64\pm 0,49 \mu\text{g/g sm}$). Značajno niže vrijednosti slobodne 3-hidroksibenzojeve kiseline, izmjerene su u stabljici, a kretale su se najviše do $0,20\pm 0,01 \mu\text{g/g sm}$ (Vaganac). Ista kiselina nije detektirana u listovima biljaka s tri lokaliteta (Sniježnica, Sveti jure, Učka) te stabljike s jednog lokaliteta (Vošac). Kumarinska kiselina detektirana je u značajno višim koncentracijama kod cvata s lokaliteta Vošac ($18,98\pm 0,60 \mu\text{g/g sm}$) i Učka ($17,22\pm 0,07 \mu\text{g/g sm}$). Osim navedena dva lokaliteta, značajno viša vrijednost kumarinske kisleine u cvatu u usporedbi s ostalim dijelovima detektirana je i u biljaka s lokaliteta Sveti Jure, Šušanj i Vaganac.

Slobodna sinapinska kiselina detektirana je samo u cvatovima (osim kod lokaliteta Vaganac) u koncentracijama od $5,37\text{-}6,14 \mu\text{g/g sm}$. Najviše koncentracije ferulinske kiseline u slobodnoj formi u izmjerene su u biljkama s lokaliteta Učka i to u koncentracijama od $13,10\pm 1,08 \mu\text{g/g sm}$ u listu, $14,64\pm 0,31 \mu\text{g/g sm}$ u cvatu, te $22,78\pm 1,59 \mu\text{g/g sm}$ u stabljici. Na ostalim lokalitetima ferulinska kiselina detektirana je u značajno nižim koncentracijama. Salicilna kiselina također značajno ovisi o lokalitetu te je njena najviša koncentracija u slobodnoj formi izmjerena u cvatu s lokaliteta Vošac ($35,37\pm 0,50 \mu\text{g/g sm}$). *Trans*-cimetna kiselina zastupljena je u značajno nižim koncentracijama koje se kreću oko $1,5\text{-}2 \mu\text{g/g sm}$, a istu nije bilo moguće detektirati u cvatu i stabljici s lokaliteta Šušanj.

Kako bismo odredili utjecaj lokaliteta i dijela biljke na nakupljanje ukupnih fenolnih kiselina, sve fenolne kiseline u pojedinom analiziranom uzorku su zbrojene i vrijednosti su prikazane u Tablici 15.

Biljke uzorkovane na lokalitetu Učka pokazuju najviše koncentracije ukupnih fenolnih kiselina, dok je kod biljaka s lokaliteta Sniježnica nađena najniža razina (dva puta niža). U

biljkama sa svih lokaliteta u cvatovima je detektirana viša koncentracija fenolnih kiselina nego u listovima i stabljikama.

Tablica 15. Ukupna koncentracija izmjerenih slobodnih fenolnih kiselina u pojedinim dijelovima biljke *T. arduini*.

Lokalitet	List	Cvat	Stabljika	Ukupno
Sniježnica	43,83	69,75	48,57	162,15
Sveti Jure	70,16	84,69	60,48	215,33
Vošac	71,57	189,39	46,21	307,17
Šušanj	71,63	103,66	68,27	243,56
Učka	87,93	141,61	99,61	329,15
Vaganac	79,21	100,51	70,98	250,7

3.3.2. *Moltkia petraea*

U listu, cvatu i stabljici vrste *M. petraea* također su određene slobodne fenolne kiseline UPLC-MS/MS metodom.

Tablica 16. Sastav i koncentracija fenolnih kiselina ($\mu\text{g/g}$ sm) određeni UPLC-MS/MS metodom u listu, cvatu i stabljici vrste *M. petraea* sa dva različita lokaliteta

fenolne kiseline	Orebić			Dinara		
	list	cvat	stabljika	list	cvat	stabljika
galna	0,32±0,02	19,85±1,20	4,90±0,24	0,26±0,03	10,27±0,83	0,72±0,25
protokatehinska	42,82±0,20	50,29±0,34	56,75±0,05	35,12±0,94	41,91±0,17	38,09±0,23
klorogenska	nd	nd	nd	nd	6,35±0,05	6,15±0,01
gentistična	7,56±0,89	6,72±0,51	7,87±0,23	4,89±0,14	5,84±0,20	5,39±0,08
4-hidroksibenzojeva	8,271±2,99	61,31±0,82	71,93±0,03	47,89±0,09	71,30±0,51	28,27±0,02
kava	79,02±1,28	158,92±7,35	136,07±0,18	47,08±2,37	94,78±0,04	77,26±0,40
vanilinska	21,81±0,19	14,83±0,07	41,47±0,03	13,39±0,82	12,02±0,03	15,87±0,21
siringična	5,88±0,07	4,47±0,02	5,14±0,04	5,04±0,13	5,21±0,15	5,92±0,24
3-hidroksibenzojeva	0,31±0,01	0,41±0,01	0,35±0,01	0,16±0,05	0,29±0,01	0,15±0,01
4-kumarinska	23,24±0,66	43,49±2,81	12,86±0,12	15,12±1,35	39,65±0,01	6,75±0,07
sinapinska	5,62±0,18	7,01±0,89	5,57±0,02	6,07±0,39	5,76±0,01	5,74±0,01
ferulinska	11,14±0,75	25,32±2,76	22,62±0,45	12,71±0,62	14,66±0,09	51,81±1,04
3-kumarinska	nd	nd	0,13±0,02	nd	nd	0,10±0,00
2-kumarinska	nd	nd	nd	nd	nd	nd
salicilna	11,70±0,06	10,43±0,26	14,24±0,52	7,53±0,53	11,30±0,33	5,56±0,02
trans-cimetna	2,40±0,13	2,31±0,08	1,86±0,01	2,38±0,08	2,73±0,04	1,81±0,09
Ukupno:	220,09	405,36	381,76	197,64	322,07	249,59
		1007,21			769,30	

I kod vrste *M. petraea* koncentracija slobodnih fenolnih kiselina uvelike ovisi o lokalitetu, ali i o analiziranom dijelu biljke. Količina galne kiseline značajno je viša u cvatu (Orebić: 19,85±1,20 $\mu\text{g/g}$ sm, Dinara: 10,27±0,83 $\mu\text{g/g}$ sm) u usporedbi s listom i stabljikom s oba lokaliteta. Protokatehinska kiselina je u biljkama lokaliteta Orebić pokazivala najvišu vrijednost u stabljici (56,75±0,05 $\mu\text{g/g}$ sm), a u biljkama lokaliteta Dinara u cvatu (41.91±0.17 $\mu\text{g/g}$ sm). Klorogenska kiselina određena je samo u cvatu i stabljici s lokaliteta Dinara u koncentracijama 6,35±0,05 $\mu\text{g/g}$ sm i 6,15±0,01 $\mu\text{g/g}$ sm. U sličnim koncentracijama

identificirana je i gentistična kiselina čija se koncentracija nije značajno razlikovala ovisno o lokalitetu i dijelu biljke te se kretala u vrijednostima između $4,89 \pm 0,14 \mu\text{g/g sm}$ (list Dinara) i $7,87 \pm 0,23 \mu\text{g/g sm}$ (stabljika Orebić). Manje značajan utjecaj lokaliteta i dijela biljke na koncentraciju fenolnih kiselina primijećen je i za siringičnu, 3-hidroksibenzojevu, sinapinsku, te *trans*-cimetnu kiselinu. 4-hidroksibenzojeva kiselina izmjerena je u vrijednostima od $28,27 \pm 0,02 \mu\text{g/g sm}$ (stabljika Dinara) do $82,71 \pm 2,99 \mu\text{g/g sm}$ (list Orebić).

Od izmjerenih fenolnih kiselina u slobodnom obliku u najvišoj koncentraciji zastupljena je kava kiselina i to posebno u listovima (Orebić: $158,92 \pm 7,35 \mu\text{g/g sm}$; Dinara $94,78 \pm 0,04 \mu\text{g/g sm}$), no primijećen je značajan utjecaj lokaliteta na akumulaciju te fenolne kiseline. Biljke s lokaliteta Orebić pokazuju i dva puta više vrijednosti. Sličan trend zabilježen je i kod vanilinske kiseline čije su vrijednosti više za lokalitet Orebić, a to je posebno izraženo kod stabljike (Orebić: $41,47 \pm 0,03 \mu\text{g/g sm}$, Dinara: $15,87 \pm 0,21 \mu\text{g/g sm}$). 4-kumarinska kiselina detektirana je u značajno višim koncentracijama u cvatu (Orebić: $43,49 \pm 2,81 \mu\text{g/g sm}$; Dinara: $39,65 \pm 0,01 \mu\text{g/g sm}$) i njezina koncentracija nije značajno pod utjecajem lokaliteta rasta. Kod ferulinske kiseline najviša je vrijednost izmjerena u stabljici s lokaliteta Dinara ($51,81 \pm 1,04 \mu\text{g/g sm}$) pri čemu je i koncentracija dva puta viša nego kod stabljike s lokaliteta Orebić ($22,62 \pm 0,45 \mu\text{g/g sm}$). 3-kumarinska kiselina detektirana je samo u stabljikama dok 2-kumarinska kiselina nije detektirana ni u jednom uzorku vrste *M. petraea*. Vrijednost salicilne kiseline s lokaliteta Orebić najviša je u stabljici ($14,24 \pm 0,52 \mu\text{g/g sm}$), a u uzorcima s lokaliteta Dinara u cvatu ($11,30 \pm 0,33 \mu\text{g/g sm}$).

U uzorcima s lokaliteta Orebić identificirana je viša koncentracija ukupnih fenolnih kiselina ($1007,21 \mu\text{g/g sm}$). Na oba lokaliteta je najviša koncentracija ukupnih fenolnih kiselina bila u cvatu, zatim u stabljici, a najniža u listovima vrste *M. petraea*.

3.3.3. *Micromeria croatica*

Tablica 17. Sastav i količina fenolnih kiselina ($\mu\text{g/g}$ sm) određeni UPLC-MS/MS metodom u u listu (L), cvatu (C) i stabljici (S) vrste *M. croatica* s tri različita lokaliteta.

fenolne kiseline		Šušanj	Bojinac	Bačić kuk
galna	L	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd
	S	nd	nd	nd
protokatehinska	L	5,39±0,12	4,79±0,73	4,88±0,12
	C	10,69±0,60	8,98±0,36	5,65±0,24
	S	8,38±0,48	7,36±0,73	8,21±0,00
klorogenska	L	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd
	S	nd	nd	nd
4-hidroksibenzojeva	L	10,12±0,87	10,20±0,11	9,66±0,22
	C	14,26±1,08	13,03±0,22	12,27±0,87
	S	10,20±0,11	15,87±0,76	10,12±0,43
kava	L	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd
	S	18,60±3,11	nd	nd
vanilinska	L	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd
	S	nd	nd	nd
siringična	L	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd
	S	16,61±0,78	13,20±1,24	15,95±1,40
3-hidroksibenzojeva	L	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd
	S	nd	nd	nd
4-kumarinska	L	3,92±0,13	2,19±0,26	3,46±0,26
	C	6,92±0,26	5,83±0,26	5,56±0,64
	S	6,56±1,03	14,21±0,52	6,65±0,90
sinapinska	L	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd
	S	16,61±0,78	13,20±1,24	15,95±1,40
ferulinska	L	nd	nd	nd
	C	nd	nd	nd
	S	5,07±0,76	4,53±0,61	nd
salicilna	L	9,43±1,19	8,13±0,43	7,59±0,54
	C	14,49±0,54	11,65±1,30	9,66±0,22
	S	21,54±2,94	28,82±0,65	18,55±1,08
Ukupno	L	28,86	25,31	25,59
	C	46,36	39,49	33,14
	S	103,57	97,19	75,43
		178,79	161,99	134,16

nd- nije detektirano

Kao što je prikazano u Tablici 17 kod vrste *M. croatica* samo su protokatehinska, 4-hidroksibenzojeva, 3-hidroksibenzojeva i salicilna kiselina detektirane u svim dijelovima biljke i na svim lokalitetima. Protokatehinska kiselina je na lokalitetu Šušanj i Bojinac prisutna u najvišoj koncentraciji u cvatovima (Sušanj: $10,69 \pm 0,60$ $\mu\text{g/g sm}$; Bojinac: $8,98 \pm 0,36$ $\mu\text{g/g sm}$), a na lokalitetu Bačić kuk u stabljici ($8,21 \pm 0,00$ $\mu\text{g/g sm}$). 4-hidroksibenzojeva kiselina detektirana je u rasponu koncentracija od $9,66 \pm 0,22$ $\mu\text{g/g sm}$ (Bačić kuk, list) do $15,87 \pm 0,76$ $\mu\text{g/g sm}$ (Bojinac, stabljika). Kava kiselina je prisutna samo u stabljici s lokaliteta Šušanj i to u koncentraciji od $18,60 \pm 3,11$ $\mu\text{g/g sm}$. Također, samo u stabljikama su detektirane i siringična, sinapinska i ferulinska kiselina. Na koncentraciju siringične i sinapinske kiseline u stabljikama nije značajno utjecao lokalitet te su one određene u približno jednakim koncentracijama (srednja vrijednost i za siringičnu i za sinapinsku kiselinu iznosila je $15,25$ $\mu\text{g/g sm}$) na sva tri lokaliteta. Ferulinska kiselina je detektirana u stabljici lokaliteta Sušanj ($5,07 \pm 0,76$ $\mu\text{g/g sm}$) i Bojinac ($4,53 \pm 0,61$ $\mu\text{g/g sm}$), ali ne i na lokalitetu Bačić kuk. U slobodnom obliku 4-kumarinska kiselina u najvišoj koncentraciji je izmjerena u stabljici s lokaliteta Bojinac ($14,21 \pm 0,52$ $\mu\text{g/g sm}$) dok je kod ostalih uzoraka ista kiselina bila u dva i više puta nižim koncentracijama. Također, stabljika s lokaliteta Bojinac pokazala je i najvišu koncentraciju salicilne kiseline i to $28,82 \pm 0,65$ $\mu\text{g/g sm}$. Općenito, u stabljikama vrste *M. croatica* je detektirana značajno viša koncentracija salicilne kiseline u odnosu na cvat i list.

3.3.4. *Rhamnus intermedia*

Kod vrste *R. intermedia*, sastav i koncentracije fenolnih kiselina također značajno ovise o dijelu biljke i o lokalitetu. Najviša koncentracija slobodnih fenolnih kiselina u izmjerena je za vanilinsku kiselinu u listu lokaliteta Bojinac i iznosi $276,61 \pm 13,33$ $\mu\text{g/g sm}$. U kori s istog lokaliteta vanilinska kiselina nije detektirana. Koncentracija vanilinske kiseline u listu s lokaliteta Bojinac više je 20 puta nego u listu s lokaliteta Dundović podi ($13,23 \pm 0,17$ $\mu\text{g/g sm}$). Slična je situacija i s klorogenskom kiselinom čija je koncentracija u listu s lokaliteta Bojinac ($124,28 \pm 6,67$ $\mu\text{g/g sm}$) 17,3 puta viša nego u listu s lokaliteta Dundović podi ($7,18 \pm 0,06$ $\mu\text{g/g sm}$). S druge pak strane izmjerene vrijednosti galne, protokatehinske, ferulinske te salicilne kiseline u listovima s oba lokaliteta pokazuju približno jednake koncentracijame. U kori u usporedbi s listom, određena je niža koncentracija fenolnih kiselina, osim salicilne kiseline koja je u kori (Dundović podi: $17,97 \pm 0,04$ $\mu\text{g/g sm}$; Bojinac: $15,33 \pm 1,95$ $\mu\text{g/g sm}$) izmjerena u većim koncentracijama u usporedbi s listovima (Dundović

podi: $7,01 \pm 0,42 \mu\text{g/g sm}$; Bojinac: $8,36 \pm 0,33 \mu\text{g/g sm}$). Koncentracija salicilne kiseline značajno ne ovisi o lokalitetu.

Tablica 18. Sastav i koncentracija fenolnih kiselina ($\mu\text{g/g sm}$) određeni UPLC-MS/MS metodom u listu (L) i kori (K) vrste *R. intermedia* s dva različita lokaliteta.

fenolne kiseline	Dundović podi		Bojinac	
	list	kora	list	kora
galna	$47,43 \pm 1,09$	$63,72 \pm 1,11$	$44,48 \pm 2,80$	$8,50 \pm 0,00$
protokatehinska	$152,44 \pm 1,60$	$95,82 \pm 0,24$	$161,51 \pm 8,23$	$7,78 \pm 0,36$
klorogenska	$7,18 \pm 0,06$	$6,39 \pm 0,03$	$124,28 \pm 6,67$	nd
4-hidroksibenzojeva	$36,35 \pm 0,48$	$10,82 \pm 0,34$	$22,23 \pm 0,43$	$11,58 \pm 0,11$
kava	$16,15 \pm 0,42$	$4,67 \pm 0,04$	$25,50 \pm 1,27$	nd
vanilinska	$13,23 \pm 0,17$	$19,32 \pm 0,05$	$276,61 \pm 13,33$	nd
siringična	$8,40 \pm 0,38$	$34,02 \pm 0,08$	$22,22 \pm 1,24$	nd
3-hidroksibenzojeva	$0,43 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$	nd	nd
4-kumarinska	$26,14 \pm 0,22$	$5,94 \pm 0,26$	$11,39 \pm 0,90$	$1,37 \pm 0,39$
sinapinska	$6,95 \pm 0,14$	$7,82 \pm 0,28$	nd	nd
ferulinska	$15,64 \pm 0,04$	$12,82 \pm 0,04$	$18,54 \pm 0,30$	$10,88 \pm 0,76$
salicilna	$7,01 \pm 0,42$	$17,97 \pm 0,04$	$8,36 \pm 0,33$	$15,33 \pm 1,95$
Ukupno:	337,35	279,45	715,12	55,44
	616,8		770,56	

nd- nije detektirano

3.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidacijske aktivnosti ekstrakata istraživanih vrsta izmjerene su korištenjem četiri metode te su određeni antioksidacijski indeksi za svaku pojedinu biljku

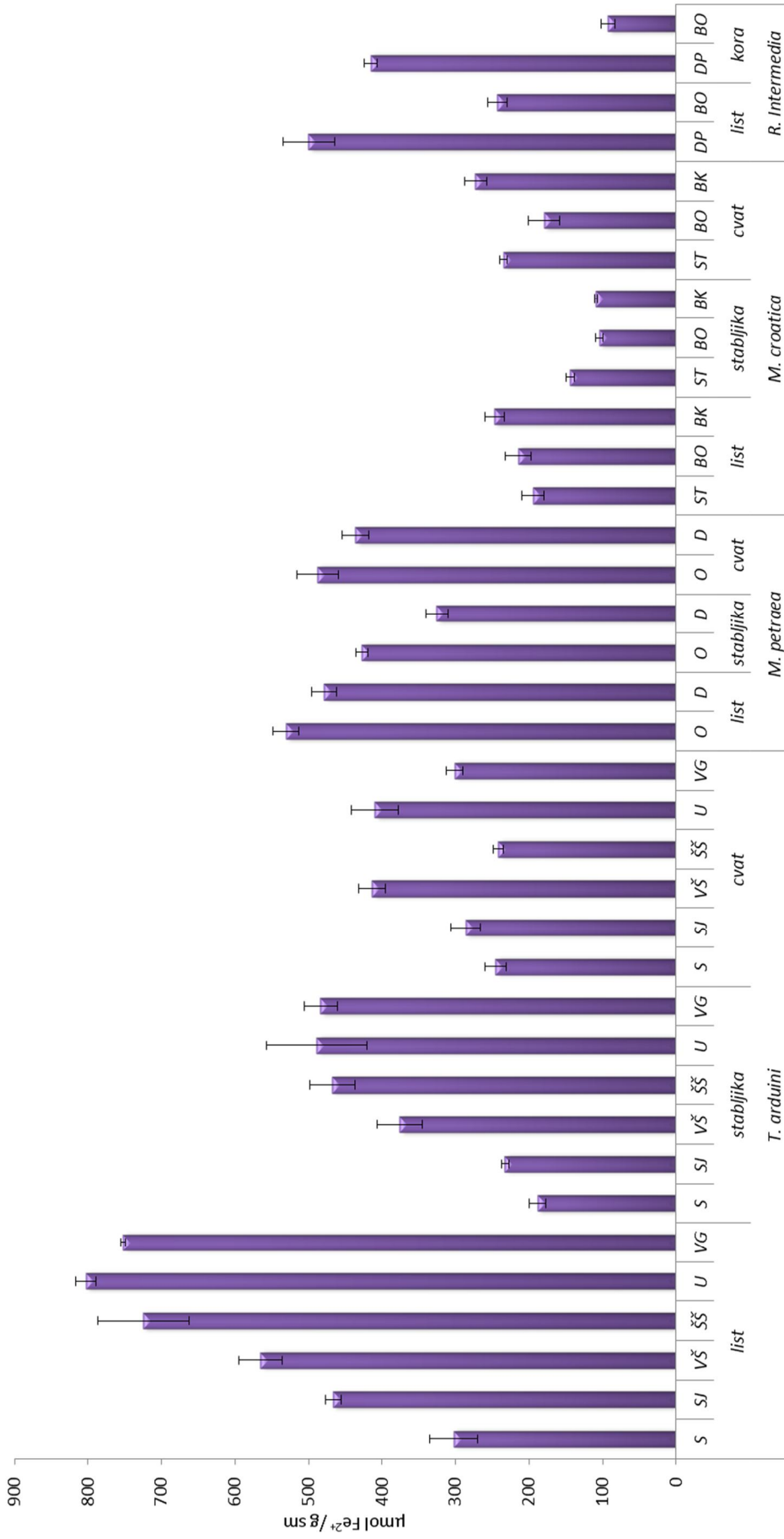
3.4.1. FRAP metoda

Kao što je vidljivo iz Slike 25 kod vrste *T. arduini* najvišu antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom pokazuje uzorak lista s lokaliteta Učka ($802,77 \pm 13,57 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g sm}$), a slijede ga listovi s lokaliteta Vaganac ($752,02 \pm 3,38 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g sm}$) i Šušanj ($725,19 \pm 62,05 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g sm}$). Antioksidacijska aktivnost izmjerena u listovima s lokaliteta Sveti Jure ($466,42 \pm 10,57 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$) i Vošac ($565,28 \pm 29,86 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$) nešto je niža te je usporediva s vrijednostima izmjerenim u stabljikama s lokaliteta Šušanj ($467,76 \pm 30,60 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$), Učka ($488,80 \pm 67,85 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$) i Vaganac ($483,48 \pm 22,86 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$) te cvatovima s lokaliteta Vošac ($413,64 \pm 17,74 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$) i Učka ($409,84 \pm 32,36 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$). Lokalitet Sniježnica pokazao je najniže vrijednosti izmjerene u vrsti *T. arduini* među listovima ($302,53 \pm 33,09 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$) i stabljikama ($188,43 \pm 11,09 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$).

Kod vrste *M. petraea* lokalitet je značajno utjecao na antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom te je ona bila viša u uzorcima s lokaliteta Orebić (list: $530,54 \pm 17,61 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$; cvat: $487,94 \pm 27,96 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$ stabljika: $427,40 \pm 7,66 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$) u usporedbi s lokalitetom Dinara (list: $478,78 \pm 17,40 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$; cvat: $436,08 \pm 18,47 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$; stabljika: $325,66 \pm 15,09 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$). Antioksidativna aktivnost u stabljikama bila je nešto niža, dok su cvatovi i listovi pokazali gotovo jednaku antioksidacijsku aktivnost.

Slična je situacija i kod vrste *M. croatica* gdje cvatovi i listovi pokazuju slične vrijednosti, dok je kod stabljika antioksidacijska aktivnost niža. Lokalitet Bačić kuk pokazuje najvišu aktivnost u listovima ($247,34 \pm 13,09 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$) i cvatovima ($272,75 \pm 15,18 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$), dok za stabljike najvišu aktivnost pokazuje lokalitet Stupačinovo ($144,37 \pm 5,47 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$).

Biljna vrsta *R. intermedia* pokazuje značajno više vrijednosti u listovima (Dundović podi: $499,7 \pm 35,48 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$; Bojinac: $242,98 \pm 12,74 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$) u usporedbi s korom (Dundović podi: $415,05 \pm 8,70 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$; Bojinac: $92,24 \pm 9,12 \text{ Fe}^{2+}/\text{g sm}$). Lokalitet Dundović podi pokazuje više vrijednosti u oba ispitivana biljna organa.



Slika 25. Antioksidacijska aktivnost ispitivanih biljnih vrsta mjerena FRAP metodom.

3.4.2. DPPH metoda

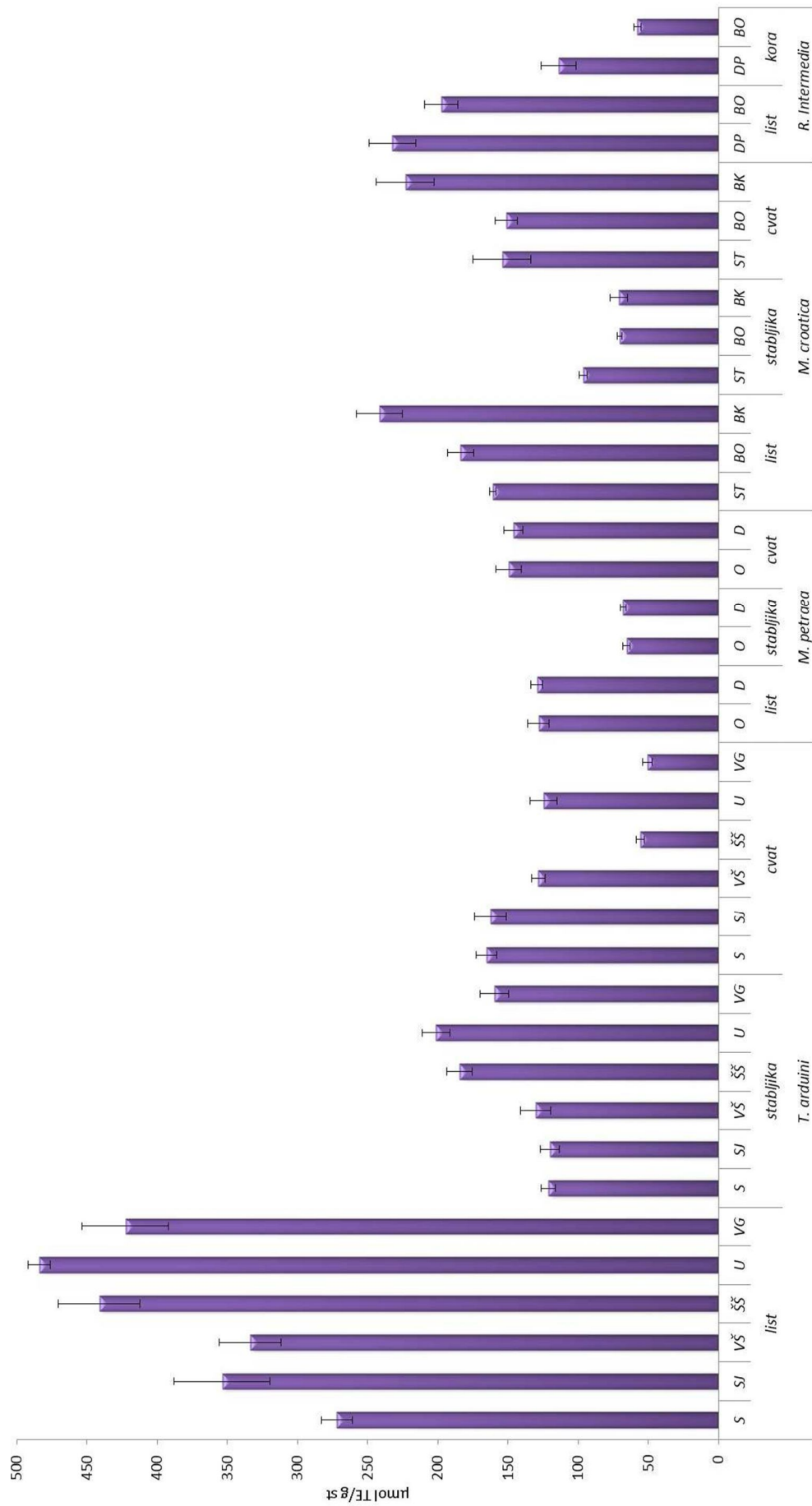
Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom koja određuje sposobnost gašenja slobodnih DPPH[•] radikala prikazani su na Slici 26.

Slično kao i kod FRAP metode najvišu je antioksidacijsku aktivnost kod vrste *T. arduini* pokazao list lokaliteta Učka ($483,92 \pm 7,70 \mu\text{mol TE/g sm}$). Vrijednosti izmjerene u listovima (srednja vrijednost za listove $384,54 \pm 78,74 \mu\text{mol TE/g sm}$) bile su oko 2 puta više od vrijednosti izmjerenih u stabljikama (srednja vrijednost za stabljike $152,82 \pm 34,54 \mu\text{mol TE/g sm}$) te gotovo 3 puta više od vrijednosti u cvatovima (srednja vrijednost za cvatove $114,59 \pm 50,43 \mu\text{mol TE/g sm}$). Najniže vrijednosti izmjerene su u cvatovima lokaliteta Šušanj ($55,70 \pm 2,61 \mu\text{mol TE/g sm}$) i Vaganac ($50,75 \pm 3,40 \mu\text{mol TE/g sm}$).

Slične vrijednosti kao u cvatovima i stabljikama vrste *T. arduini* pokazuju listovi (Orebić: $128,12 \pm 7,60 \mu\text{mol TE/g sm}$; Dinara: $129,37 \pm 4,21 \mu\text{mol TE/g sm}$) i cvatovi (Orebić: $149,25 \pm 9,04 \mu\text{mol TE/g sm}$; Dinara: $146,04 \pm 6,93 \mu\text{mol TE/g sm}$) vrste *M. petraea*. Stabljike pokazuju značajno niže vrijednosti (Orebić: $65,52 \pm 2,36 \mu\text{mol TE/g sm}$; Dinara: $67,80 \pm 2,06 \mu\text{mol TE/g sm}$) i kod ove biljke nije primijećen značajan utjecaj lokaliteta na antioksidacijsku aktivnost mjerenu DPPH metodom.

Kod vrste *M. croatica* listovi i cvatovi (srednja vrijednost za list $195,36 \pm 41,63 \mu\text{mol TE/g sm}$ za cvat $176,05 \pm 40,69 \mu\text{mol TE/g sm}$) pokazuju značajno više vrijednosti od stabljike (srednja vrijednost: $79,30 \pm 14,87 \mu\text{mol TE/g sm}$). Lokalitet Bačić kuk pokazao je najvišu vrijednost u listovima ($241,58 \pm 16,62 \mu\text{mol TE/g sm}$) i cvatovima ($223,01 \pm 20,64 \mu\text{mol TE/g sm}$).

Listovi vrste *R. intermedia* (Dundović podi: $232,41 \pm 16,60 \mu\text{mol TE/g sm}$; Bojinac: $197,42 \pm 11,68 \mu\text{mol TE/g sm}$) pokazuju jaču antioksidacijsku aktivnost mjerenu DPPH metodom u usporedbi sa korom (Dundović podi: $114,02 \pm 12,43 \mu\text{mol TE/g sm}$; Bojinac: $57,67 \pm 2,65 \mu\text{mol TE/g sm}$). Lokalitet Dundović podi u listovima pokazuje 1,2 puta, a u kori dva puta višu vrijednost u usporedbi s lokalitetom Bojinac.



Slika 26. Antioksidacijska aktivnost ispitivanih biljnih vrsta mjerena DPPH metodom

3.4.3. ABTS metoda

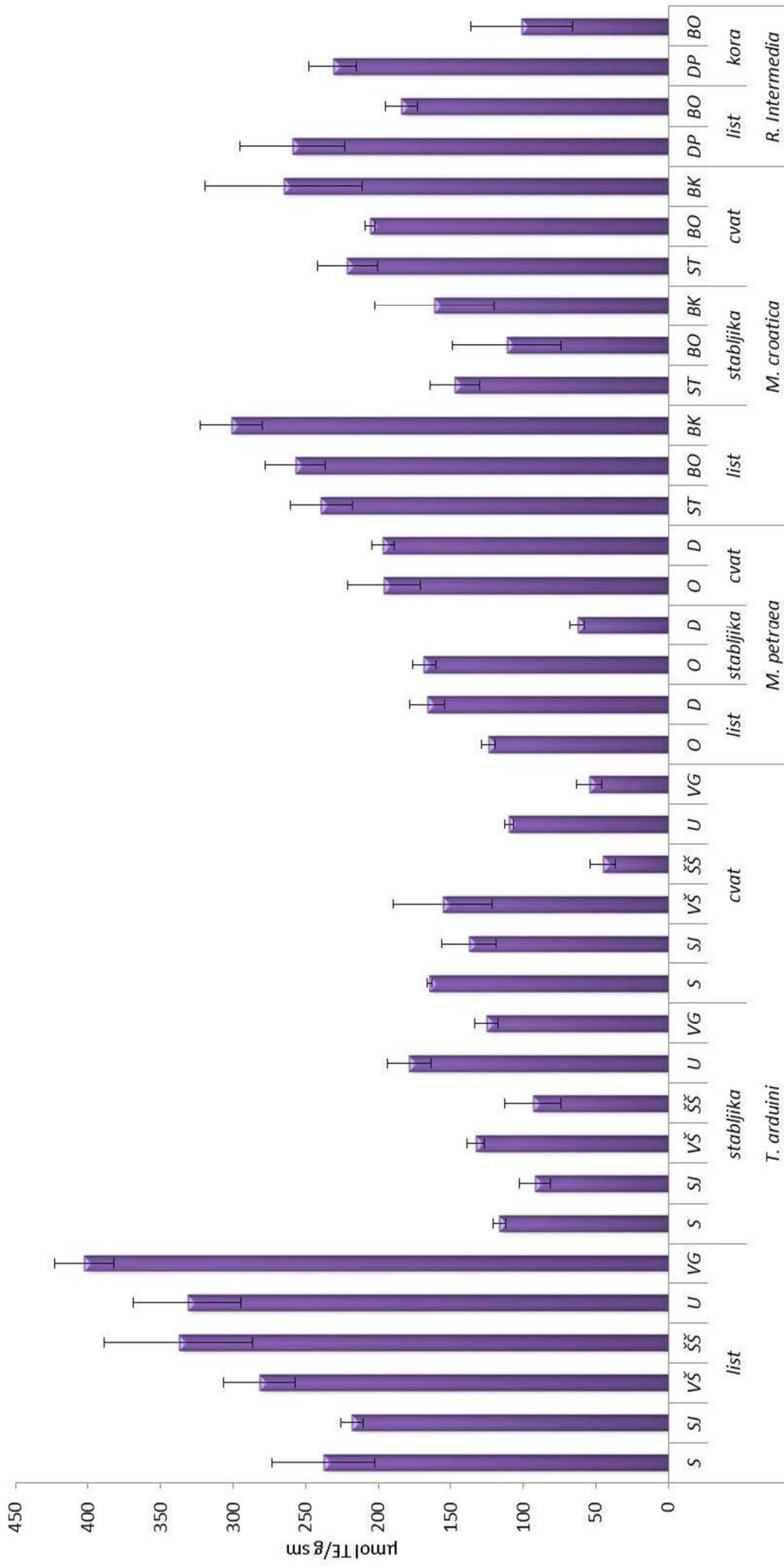
ABTS metoda, jednako kao i DPPH metoda bazira se na gašenju slobodnih radikala, rezultati za četiri istražene biljke nalaze se na Slici 27.

Kod vrste *T. arduini*, jednako kao i kod FRAP i DPPH metode, listovi (srednja vrijednost: $301,70 \pm 69,03 \mu\text{mol TE/g sm}$) pokazuju više vrijednosti u odnosu na cvatove (srednja vrijednost: $111,27 \pm 51,19 \mu\text{mol TE/g sm}$) i stabljike (srednja vrijednost: $123,26 \pm 31,81 \mu\text{mol TE/g sm}$). Najvišu antioksidacijsku aktivnost mjerenu ABTS metodom u vrsti *T. arduini* pokazuje list lokaliteta Vaganac ($402,78 \pm 20,41 \mu\text{mol TE/g sm}$), a najnižu cvat lokaliteta Šušanj ($45,19 \pm 8,66 \mu\text{mol TE/g sm}$) i Vaganac ($54,65 \pm 8,51 \mu\text{mol TE/g sm}$).

Biljna vrsta *M. petraea* pokazuje najvišu antioksidacijsku aktivnost mjerenu ABTS metodom u cvatovima (Orebić: $196,03 \pm 25,21 \mu\text{mol TE/g sm}$; Dinara: $196,62 \pm 7,69 \mu\text{mol TE/g sm}$) te ona ne ovisi značajno o lokalitetu. Kod stabljike i listova situacija je malo drugačija, odnosno vrijednosti značajno ovise o lokalitetu. Kod listova, više vrijednosti pokazuju biljke lokaliteta Dinara ($166,39 \pm 11,91 \mu\text{mol TE/g sm}$), a kod stabljika, biljke lokaliteta Orebić ($168,60 \pm 8,06 \mu\text{mol TE/g sm}$).

Kod vrste *M. croatica* vrijednosti u listovima i cvatovima su slične, a najviša vrijednosti izmjerena je u listu ($301,39 \pm 21,37 \mu\text{mol TE/g sm}$) te cvatu ($265,33 \pm 54,33 \mu\text{mol TE/g sm}$) lokaliteta Bačić kuk. Kod stabljika, vrijednosti se nisu značajno razlikovale te su iznosile $147,22 \pm 17,17 \mu\text{mol TE/g sm}$ za lokalitet Stupačinovo, $111,53 \pm 37,33 \mu\text{mol TE/g sm}$ za Bojinac te $161,40 \pm 40,92 \mu\text{mol TE/g sm}$ za Bačić kuk.

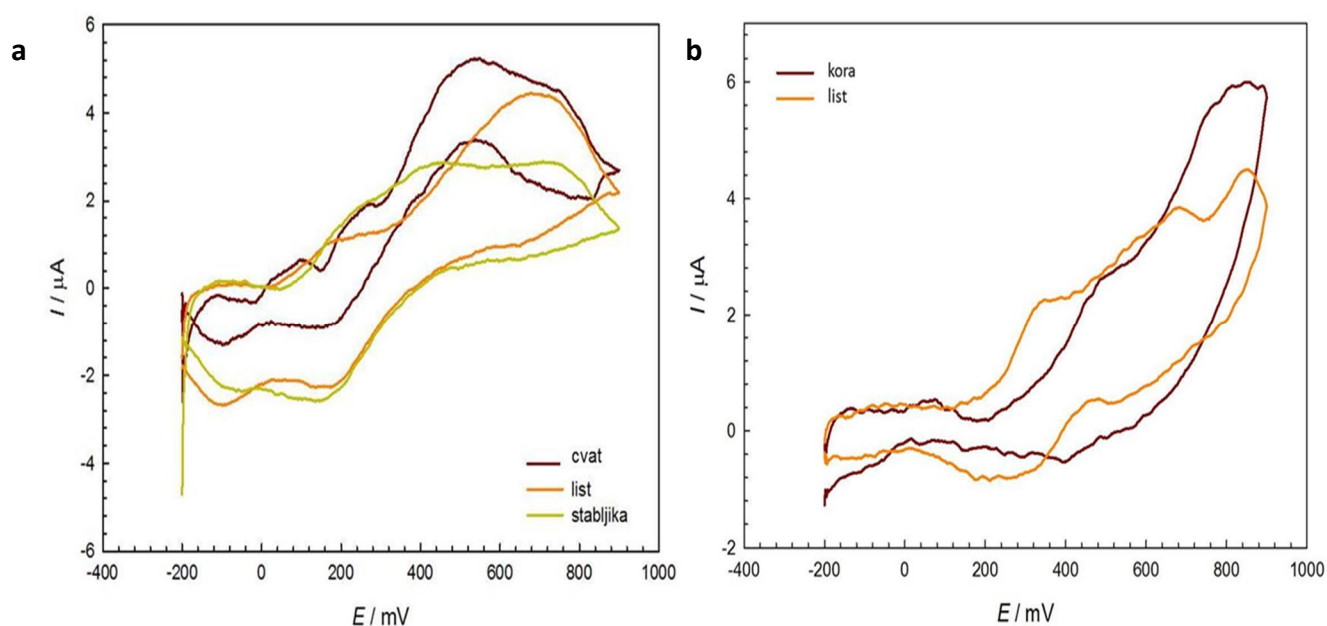
Kod vrste *R. intermedia* lokaliteta Dundović podi vrijednosti i za koru ($231,21 \pm 16,36 \mu\text{mol TE/g sm}$) i za list ($259,25 \pm 36,29 \mu\text{mol TE/g sm}$) više su nego kod biljaka lokaliteta Bojinac (kora: $101,13 \pm 35,1 \mu\text{mol TE/g sm}$; list: $184,07 \pm 11,14 \mu\text{mol TE/g sm}$).



Slika 27. Antioksidacijska aktivnost ispitivanih biljnih vrsta mjerena ABTS metodom

3.4.4. Ciklička voltametrija

Ciklički voltamogrami različitog razrjeđenja ekstrakata istraženih biljaka snimljeni su u širokom području potencijala od -200 do 900 mV. Primjer cikličkog voltamograma za biljnu vrstu *M. croatica* lokalitet Bojinac, te biljnu vrstu *R. intermedia* lokalitet Bojinac prikazani su na Slici 28.



Slika 28. Primjer cikličkog voltamograma za vrste a) *M. croatica* i b) *R. intermedia* s lokaliteta Bojinac

Elektrokemijski parametri za analizirane ekstrakte prikazani su u Tablici 19. Uzorci su razrijeđeni u 80% metanolu od 10 do 50 puta. Iz očitanih elektrokemijskih parametara vidi se da svi uzorci ne pokazuju jednak broj anodnih strujnih valova zbog različitog sastava te vrlo niske koncentracije spojeva koji se oksidiraju na navedenim potencijalima. Analizom voltamograma mogu se dobiti podaci o sastavu te količini pojedinih antioksidansa u ispitivanom uzorku. Prisutnost i broj katodnih strujnih vrhova daje informaciju o reverzibilnosti reakcije. Kod reverzibilnih je reakcija anodni strujni vrh popraćen katodnim strujnim vrhom, dok se kod ireverzibilnih reakcija ne javlja katodni strujni vrh.

Kod vrste *T. arduini* izgled cikličkih voltamograma uvelike je ovisio o tipu uzorka. Listovi s lokaliteta Sniježnica, Sveti Jure i Vošac pokazuju dva anodna i dva katodna (osim Sniježnice) strujna vrha dok su kod biljaka s lokaliteta Šušanj, Učka i Vaganac rezultirali s tri

anodna i tri katodna strujna vrha. Svim uzorcima lista vrste *T. arduini* svojstven je anodni val na oko 500 mV te 750 mV, dok uzorci s onih lokaliteta koji pokazuju tri strujna vrha imaju dodatan strujni vrh na oko 600 mV. Kod cvatova iste biljke na uzorcima sa svih lokaliteta primijećena su dva anodna i dva ili tri (ovisno o uzorku) katodna pstrujna vrha. Prvi anodni strujni vrh primijećen je na oko 500 mV, a drugi na oko 740 mV. Jednako kao i kod listova, uzorci stabljike vrste *T. arduini* lokaliteta Snježnica, Sveti Jure i Vošac pokazuju dva anodna strujna vrha (na oko 500 i 740 mV), dok oni s lokaliteta Šušanj, Učka i Vaganac pokazuju tri anodna strujna vrha (na oko 500, 640 te 750 mV).

Kod vrste *M. petraea* sva su mjerenja rađena na razrjeđenjima od 25 puta te izgled cikličkih voltamograma i očitani parametri uvelike ovise o ispitivanom dijelu biljke ali i o lokalitetu. Kod listova s oba lokaliteta primijećena su tri anodna i tri katodna strujna vrha no njihov potencijal ovisi o lokalitetu tako da se u listovima s lokaliteta Orebić anodni strujni vrhovi nalaze na oko 500, 690 i 750 mV, dok se oni na uzorcima lokaliteta Dinara nalaze na oko 520, 580 i 750 nm. Kod cvatova s lokaliteta Orebić identificirana su tri anodna (oko 530, 690 i 730 mV) i tri katodna strujna vrha, dok su kod lokaliteta Dinara detektirana dva anodna (oko 350 i 750 mV) i dva katodna strujna vrha. Obrnuta je situacija kod stabljika, koje u uzorku s lokaliteta Orebić pokazuju dva anodna (na oko 510, 640 mV) i dva katodna strujna vrha, dok u uzorku s lokaliteta Dinara primjećujemo tri anodna (na oko 310, 600 i 810 mV) i dva katodna strujna vrha.

Za biljnu vrstu *M. croatica* kod listova s lokaliteta Stupačinovo primijećen je jedan anodni (680 mV) te dva katodna vala, za listove lokaliteta Bojinac dva anodna (oko 240 i 680 mV) i dva katodna, a za listove Bačić kuk tri anodna (190, 490 i 690 mV) i dva katodna strujna vrha. Kod cvata s lokaliteta Bojinac izmjerena su tri anodna (oko 270, 530, 710 mV) te dva katodna strujna vrha, a u ekstraktima biljaka s lokaliteta Stupačinovo i Bačić kuk dva anodna (Stupačinovo oko 510 i 680 mV; Bačić kuk oko 540 i 700 mV) te dva katodna strujna vrha. Kod stabljike lokaliteta Stupačinovo prisutna su dva anodna (na oko 390 700 mV) i jedan katodni strujni vrh, a kod lokaliteta Bojinac i Bačić kuk tri anodna (Bojinac na oko 260, 440 i 720 mV; Bačić kuk oko 290; 520 i 700 mV) i dva katodna strujna vrha.

Kod vrste *R. intermedia* s lokaliteta Dundović podi u listu su identificirana dva (oko 490 i 770 mV), a u kori jedan (oko 650 mV) anodni te po jedan katodni strujni vrh. Kod

lokaliteta Bojinac izmjerena su tri anodna strujna vrha u listu (oko 340, 680 i 850 mV) i dva u kori (oko 510 i 850 mV), te jedan katodni strujni vrh za list, a nijedan za koru što upućuje na ireverzibilnost procesa.

Tablica 19. Elektrokemijski parametri za ispitivane biljke.

Biljka	dio	lokalitet	df	Ep,a (mV)			Ip,a (µA)			Ep,k (mV)			Ip,k (µA)			Q900
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Ta	list	S	50x	510	-	758	8,77	-	9,67	366	-	-	3,32	-	-	46,63±1,24
		SJ		486	-	758	4,67	-	4,25	354	46	-	6,04	3,55	-	23,46±1,58
		VŠ		504	-	752	4,28	-	4,63	302	20	-	2,08	2,41	-	24,22±0,64
		ŠŠ		508	626	758	5,10	3,56	4,55	320	158	12	3,37	3,92	4,59	22,97±0,83
		U		500	602	754	5,74	4,48	5,06	324	112	8	2,29	2,59	2,71	27,98±1,49
		VG		502	604	754	5,79	3,99	4,78	340	140	-2	3,48	3,58	3,63	23,98±2,21
	cvat	S	25x	502	-	742	3,99	-	4,42	264	90	-14	2,99	3,78	3,60	18,71±3,63
		SJ		484	-	734	3,95	-	3,58	284	140	-12	3,84	4,16	4,34	17,90±2,01
		VŠ		480	-	744	3,91	-	4,85	370	164	-	0,53	-0,36	-	23,83±3,00
		ŠŠ		468	-	722	2,59	-	1,69	364	160	-	2,16	2,61	-	7,19±1,23
		U		504	-	742	3,75	-	1,51	268	76	-74	3,35	3,88	4,27	12,01±3,14
		VG		494	-	730	3,56	-	1,97	270	28	-	1,98	1,90	-	9,78±1,27
	stabljika	S	25x	504	-	750	3,79	-	1,07	314	136	-34	3,14	3,46	3,74	13,34±1,65
		SJ		470	-	748	2,33	-	1,32	296	94	-	2,68	3,05	-	11,22±0,00
		VŠ		503	-	738	5,05	-	3,92	196	65	-50	3,03	3,67	4,05	22,70±1,89
		ŠŠ		504	646	748	4,84	3,96	3,11	366	258	-80	2,78	3,45	4,27	19,93±2,11
		U		475	645	744	4,94	3,59	4,17	342	124	-	0,91	1,98	-	12,01±3,13
		VG		520	636	729	5,08	4,73	3,87	264	76	-74	3,36	3,89	4,27	19,56±1,07
Mp	list	O	25x	504	696	756	5,24	5,70	5,88	416	182	-78	1,28	3,84	4,76	30,54±1,21
		D		521	584	752	4,95	4,64	4,59	328	182	-25	3,16	5,28	5,12	23,79±1,81
	cvat	O	25x	526	687	730	5,17	5,31	4,97	398	162	-82	1,26	3,53	4,29	26,27±4,78
		D		352	-	748	1,19	-	5,15	-	140	-92	3,61	-	3,24	22,69±1,96
	stabljika	O	25x	508	643	-	4,76	4,00	-	406	-	-68	0,57	-	3,73	25,10±4,05
		D		314	598	808	1,85	3,73	5,22	-	118	-80	-	3,85	3,55	25,55±0,79
Mc	list	ST	50x	-	-	678	-	-	3,66	-	124	-91	-	1,87	1,91	18,48±0,60
		BO		242	-	684	0,78	-	3,91	166	-102	-	2,76	3,17	-	16,47±0,27
		BK		192	492	694	1,57	4,33	4,62	-	146	-88	-	3,15	2,80	26,38±1,09
	cvat	ST	50x	-	508	680	-	3,21	3,17	-	142	-66	-	1,46	2,13	19,98±1,65
		BO		268	528	714	1,90	5,21	4,61	-	148	-94	-	0,90	1,28	26,05±0,75
		BK		-	536	698	-	4,38	4,16	-	174	-94	-	1,34	3,10	23,29±1,21
	stabljika	ST	50x	-	390	702	-	1,82	2,41	-	180	-	-	1,74	-	13,15±0,29
		BO		262	444	720	1,94	2,84	5,85	-	136	-66	2,58	2,34	-	17,71±0,51
		BK		292	522	700	1,15	1,97	2,39	-	124	-80	1,33	1,03	-	11,34±1,47
Ri	list	DP	50x	490	771	-	1,70	2,16	-	185	-	-	2,98	-	13,73±4,04	
		BO		340	676	846	2,25	3,83	4,47	240	-	-	0,78	-	20,56±0,49	
	kora	DP	10x	654	-	-	3,97	-	-	152	-	-	2,34	-	23,64±0,00	
		BO		-	506	846	-	2,69	5,98	-	-	-	-	-	21,07±1,18	

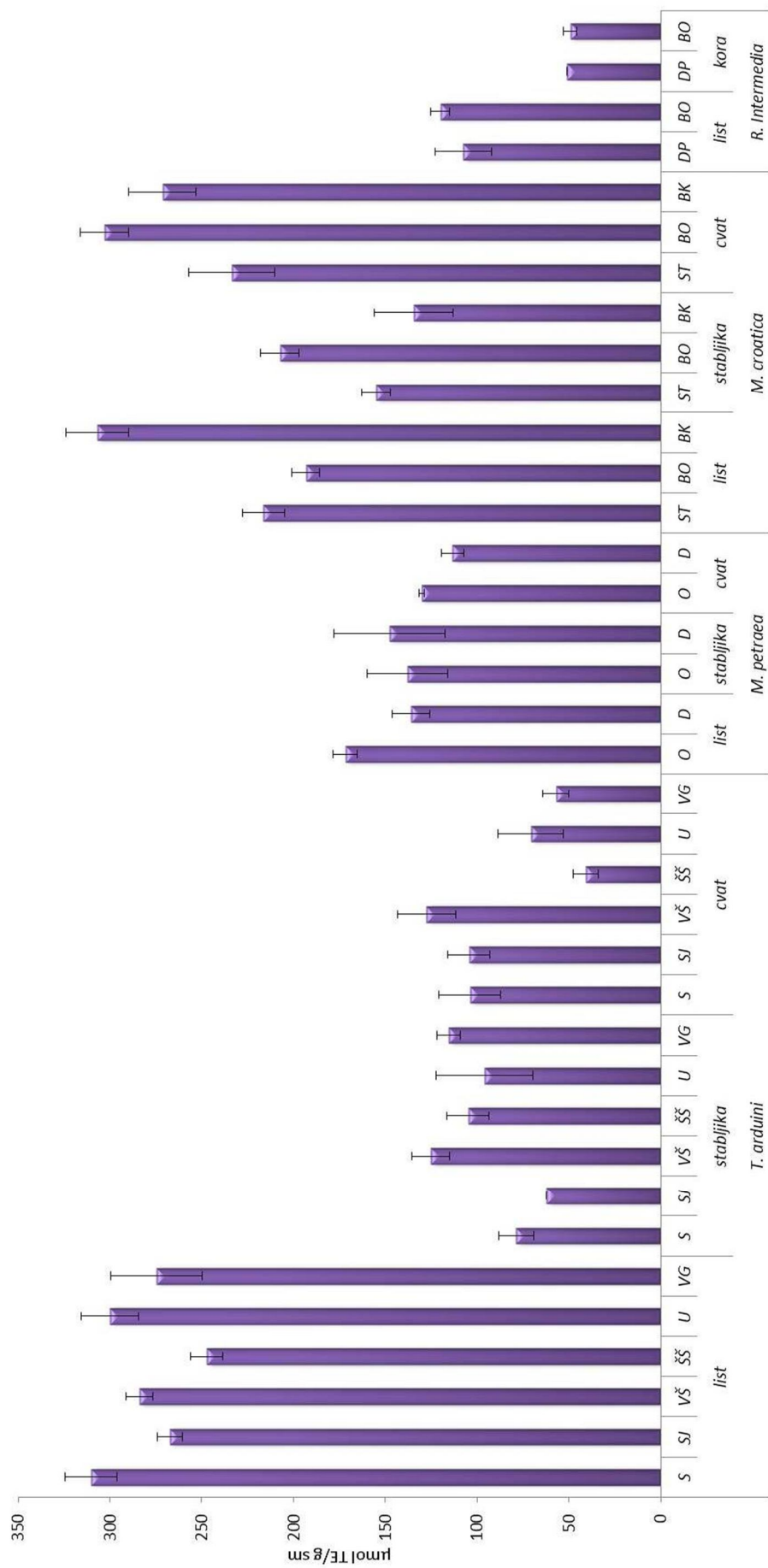
Iz navedenih elektrokemijskih parametara prema baždarnom pravcu za Trolox preračunati su ekvivalentni Trolox-a prema kojima je izražena antioksidacijska aktivnost biljnih ekstrakata mjerena cikličkom voltametrijom (Slika 29).

Antioksidacijska aktivnost mjerena cikličkom voltametrijom u listovima vrste *T. arduini* kreće se od $247,17 \pm 8,80$ $\mu\text{mol TE/g sm}$ (lokalitet Šušanj) do $310,20 \pm 14,26$ $\mu\text{mol TE/g sm}$ (lokalitet Sniježnica). Kod stabljike i cvatova iste biljke izmjerene vrijednosti su niže i kreću se od $62,1 \pm 0,00$ $\mu\text{mol TE/g sm}$ (Sveti Jure) do $125,06 \pm 10,22$ $\mu\text{mol TE/g sm}$ (Vošac) za stabljiku te od $40,73 \pm 6,65$ $\mu\text{mol TE/g sm}$ (Šušanj) do $127,55 \pm 15,81$ $\mu\text{mol TE/g sm}$ (Vošac) za cvatove.

Kod vrste *M. petraea* između različitih dijelova biljaka i lokaliteta nisu primijećene velike razlike u izmjerenoj antioksidacijskoj aktivnosti cikličkom voltametrijom. Lokalitet Orebić pokazuje malo više vrijednosti u listu ($171,83 \pm 6,74$ $\mu\text{mol TE/g sm}$), i cvatu ($130,25 \pm 1,39$ $\mu\text{mol TE/g sm}$) u usporedbi s lokalitetom Dinara (list: $136,09 \pm 10,19$ $\mu\text{mol TE/g sm}$; cvat: $113,38 \pm 6,09$ $\mu\text{mol TE/g sm}$). Kod stabljike vrijednosti su gotovo jednake (Orebić: $137,82 \pm 21,89$ $\mu\text{mol TE/g sm}$; Dinara: $147,70 \pm 30,2$ $\mu\text{mol TE/g sm}$).

Kod vrste *M. croatica* značajno više vrijednosti izmjerene su u listu lokaliteta Bačić kuk ($306,85 \pm 16,85$ $\mu\text{mol TE/g sm}$) te cvatu s lokaliteta Bojinac ($207,47 \pm 10,32$ $\mu\text{mol TE/g sm}$) i Bačić kuk ($271,43 \pm 18,34$ $\mu\text{mol TE/g sm}$). Ostale vrijednosti su niže, a najniža izmjerena vrijednost za vrstu *M. croatica* nađena je u stabljici s lokaliteta Bačić kuk te iznosi $134,46 \pm 21,32$ $\mu\text{mol TE/g sm}$.

Biljna vrsta *R. intermedia* pokazuje značajno više vrijednosti u listu (Dundović podi: $107,52 \pm 15,53$ $\mu\text{mol TE/g sm}$; Bojinac: $120,07 \pm 5,04$ $\mu\text{mol TE/g sm}$) u usporedbi s korom (Dundović podi: $51,09 \pm 0,00$ $\mu\text{mol TE/g sm}$; Dinara: $49,20 \pm 3,58$ $\mu\text{mol TE/g sm}$) i te vrijednosti nisu značajno različite u odnosu na lokalitet.



Slika 29. Antioksidacijska aktivnost ispitivanih biljnih vrsta mjerena metodom cikličke voltametrije

3.4.5. Antioksidacijski indeks

Tablica 20. Antioksidacijski indeks (ACI) za ispitivane uzorke

		FRAP	DPPH	ABTS	CV	ACI	
Ta	L	S	38	56	59	100	63
		SJ	58	73	54	86	68
		VŠ	70	69	70	92	75
		ŠŠ	90	91	84	80	86
		U	100	100	82	97	95
		VG	94	87	100	89	92
	S	S	23	25	29	25	26
		SJ	29	25	23	20	24
		VŠ	47	27	33	40	37
		ŠŠ	58	38	23	34	38
		U	61	42	44	31	44
		VG	60	33	31	37	40
	C	S	31	34	41	33	35
		SJ	36	34	34	34	34
		VŠ	52	27	39	41	39
		ŠŠ	30	12	11	13	16
		U	51	26	27	23	32
		VG	38	10	14	18	20
Mp	L	O	66	26	31	55	45
		D	60	27	41	44	43
	S	O	53	14	42	44	38
		D	41	14	16	48	29
	C	O	61	31	49	42	46
		D	54	30	49	37	42
Mc	L	ST	24	33	59	70	47
		BO	27	38	64	62	48
		BK	31	50	75	99	64
	S	ST	18	20	37	50	31
		BO	13	15	28	67	31
		BK	14	15	40	43	28
	C	ST	29	32	55	75	48
		BO	22	31	51	98	51
		BK	34	46	66	88	58
Ra	L	DP	62	48	64	35	52
		BO	30	41	46	39	39
	K	DP	52	24	57	16	37
		BO	11	12	25	16	16

Antioksidacijski indeks (ACI) izračunat je na osnovu mjerenja antioksidacijskih aktivnosti biljnih ekstrakata pomoću četiri gore navedene metode. Rezultati su prikazani u Tablici 20.

Od svih ispitivanih uzoraka u okviru ovog rada najjaču antioksidacijsku aktivnost pokazuju listovi vrste *T. arduini* lokaliteta s Učka (ACI: 95) i Vaganac (ACI: 95). Također, listovi vrste *T. arduini* sa svih lokaliteta pokazuju ACI viši od 50. ACI indeks viši od 50 pokazuje i list vrste *M. croatica* s lokaliteta Bačić kuk (ACI: 64), cvatovi vrste *M. croatica* s lokaliteta Bojinac (ACI: 51) i Bačić kuk (ACI: 58) te list vrste *R. intermedia* s lokaliteta Dundović podi (ACI: 52). Antioksidacijski indeks niži ili jednak vrijednosti 20 pokazuju cvatov vrste *T. arduini* s lokaliteta Šušanj (ACI: 16) i Vaganac (ACI: 20), te kora vrste *R. intermedia* s lokaliteta Bojinac. Većina ispitivanih uzoraka ima ACI indeks između 20 i 40, a zanimljivo je da kod vrste *M. petraea* svi ispitivani uzorci upadaju u tu skupinu te ona ne pokazuje značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti ovisno o biljnom tkivu ili lokalitetu.

3.5. KEMOMETRIJSKE ANALIZE

3.5.1. Korelacije

U svrhu određivanja korelacija između antioksidacijske aktivnosti mjerene različitim metodama te koncentracije polifenolnih metabolita izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije, pripadajuće p vrijednosti, te koeficijent determinacije (R^2).

Tablica 21. Matriks a) Pearsonovog koeficijenta za antioksidacijske metode te izmjerene polifenolne komponente u biljnim vrstama od interesa. Podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti $p \leq 0,05$; b) Koeficijenta determinacije za ispitivane podatke (Tablica 21 a i b).

(a)

	DPPH	ABTS	FRAP	CV	TP	TF	TFL	THA	TPRA	UFK
DPPH	1									
ABTS	0,824	1								
FRAP	0,705	0,503	1							
CV	0,674	0,726	0,239	1						
TP	0,929	0,785	0,635	0,584	1					
TF	0,918	0,719	0,734	0,648	0,799	1				
TFL	0,892	0,624	0,721	0,439	0,897	0,799	1			
THA	0,928	0,640	0,730	0,534	0,870	0,909	0,963	1		
TPRA	0,159	0,041	0,149	-0,284	0,293	-0,031	0,253	0,137	1	
UFK	-0,153	-0,076	0,136	-0,304	0,083	-0,311	-0,044	-0,201	0,419	1

(b)

	DPPH	ABTS	FRAP	CV	TP	TF	TFL	THA	TPRA	UFK
DPPH	1									
ABTS	0,679	1								
FRAP	0,497	0,253	1							
CV	0,454	0,527	0,057	1						
TP	0,862	0,617	0,404	0,341	1					
TF	0,843	0,517	0,538	0,420	0,639	1				
TFL	0,795	0,390	0,519	0,193	0,805	0,639	1			
THA	0,862	0,410	0,533	0,285	0,757	0,826	0,927	1		
TPRA	0,025	0,002	0,022	0,081	0,086	0,001	0,064	0,019	1	
UFK	0,023	0,006	0,019	0,093	0,007	0,097	0,002	0,040	0,176	1

Pearsonov koeficijent korelacije za sve ispitane uzorke prikazan je u Tablici 21a. Prema razini značajnosti većina metoda pokazuje značajnu korelaciju između vrijednosti antioksidacijskih aktivnosti i polifenolnih skupina prisutnih u biljnim ekstraktima, osim ukupnih proantocijanidina i ukupnih fenolnih kiselina. Također, nije značajan koeficijent korelacije između FRAP metode te cikličke voltometrije. Najviši Pearsonov koeficijent izračunat je za ukupne hidroksicimetne kiseline i ukupne flavonole (0,963), no također vrijednosti iznad 0,900 pokazuju i ukupni polifenoli i DPPH test (0,929), ukupni flavonoidi i DPPH test (0,918), ukupne hidroksicimetne kiseline i DPPH test (0,928), te ukupni flavanoidi i ukupne hidroksicimetne kiseline (0,909).

Nadalje, izračunat je i koeficijent determinacije (jačina povezanosti) koji se izračunava kvadriranjem koeficijenta korelacije R te se označava s R^2 (Udovičić i sur., 2007). I ovdje je naj snažnija povezanost izračunata za ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonole (0,927) te nam govori da između te dvije varijable postoji 92,7% zajedničkih vrijednosti. S obzirom na antioksidacijske metode najveća razina povezanosti pronađena je između ABTS i DPPH metode (0,679), a najmanja između cikličke voltometrije i FRAP metode (0,057). Ukupni polifenoli, flavonoidi, flavanoli te hidroksicimetne kiseline pokazuju značajne povezanosti s antioksidacijskim aktivnostima mjerenim spektrofotometrijskim metodama (R^2 od 0,390 do 0,869) dok su povezanosti s cikličkom voltametrijom niže (R^2 od 0,081 do 0,538).

Kako bismo dobili rezultate za svaku pojedinu biljnu vrstu izračunat je Pearsonov koeficijent za 10 varijabli za svaku pojedinu biljnu vrstu te su rezultati prikazani u Tablicama 22 a-c.

Tablica 22. Matriks Pearsonov-a koeficijent uzračunati za 10 ispitivanih varijabli za biljke (a) *T. arduini*; (b) *M. petraea*; (c) *M. croatica*; (d) *R. intermedia*. Vrijednosti koje pokazuju značajnu korelaciju označene su podebljanim slovima.

a)

	DPPH	ABTS	FRAP	CV	TP	TF	TFL	THA	TPRA	UFK
DPPH	1									
ABTS	0,630	1								
FRAP	0,696	0,549	1							
CV	-0,286	-0,659	0,224	1						
TP	0,825	0,751	0,925	-0,079	1					
TF	0,657	0,711	0,942	0,044	0,966	1				
TFL	0,718	0,508	0,996	0,250	0,914	0,921	1			
THA	0,739	0,662	0,982	0,090	0,976	0,983	0,972	1		
TPRA	0,847	0,709	0,636	-0,321	0,861	0,740	0,622	0,741	1	
UFK	0,006	0,551	-0,043	-0,514	0,254	0,284	-0,103	0,128	0,474	1

b)

	DPPH	ABTS	FRAP	CV	TP	TF	TFL	THA	TPRA	UFK
DPPH	1									
ABTS	0,946	1								
FRAP	0,854	0,819	1							
CV	0,903	0,886	0,683	1						
TP	0,981	0,926	0,808	0,927	1					
TF	0,974	0,914	0,892	0,838	0,963	1				
TFL	0,966	0,906	0,800	0,921	0,973	0,935	1			
THA	0,986	0,929	0,817	0,934	0,988	0,963	0,990	1		
TPRA	-0,099	-0,154	-0,120	-0,213	-0,109	0,001	-0,211	-0,128	1	
UFK	-0,221	-0,208	0,022	-0,268	-0,275	-0,185	-0,239	-0,249	0,137	1

c)

	DPPH	ABTS	FRAP	CV	TP	TF	TFL	THA	TPRA	UFK
DPPH	1									
ABTS	0,963	1								
FRAP	0,945	0,906	1							
CV	0,739	0,619	0,662	1						
TP	0,915	0,937	0,905	0,648	1					
TF	0,935	0,932	0,975	0,575	0,933	1				
TFL	0,592	0,570	0,790	0,438	0,577	0,700	1			
THA	0,891	0,889	0,967	0,576	0,842	0,929	0,871	1		
TPRA	0,647	0,597	0,826	0,594	0,653	0,765	0,934	0,840	1	
UFK	-0,860	-0,926	-0,807	-0,631	-0,867	-0,849	-0,564	-0,820	-0,645	1

d)

	DPPH	ABTS	FRAP	CV	TP	TF	TFL	THA	TPRA	UFK
DPPH	1									
ABTS	0,738	1								
FRAP	0,666	0,986	1							
CV	0,912	0,413	0,306	1						
TP	0,797	0,382	0,236	0,919	1					
TF	0,864	0,973	0,951	0,586	0,496	1				
TFL	0,982	0,756	0,714	0,851	0,674	0,887	1			
THA	0,977	0,704	0,661	0,870	0,677	0,849	0,997	1		
TPRA	0,999	0,758	0,684	0,904	0,804	0,876	0,977	0,968	1	
UFK	0,706	0,357	0,200	0,833	0,984	0,436	0,561	0,556	0,720	1

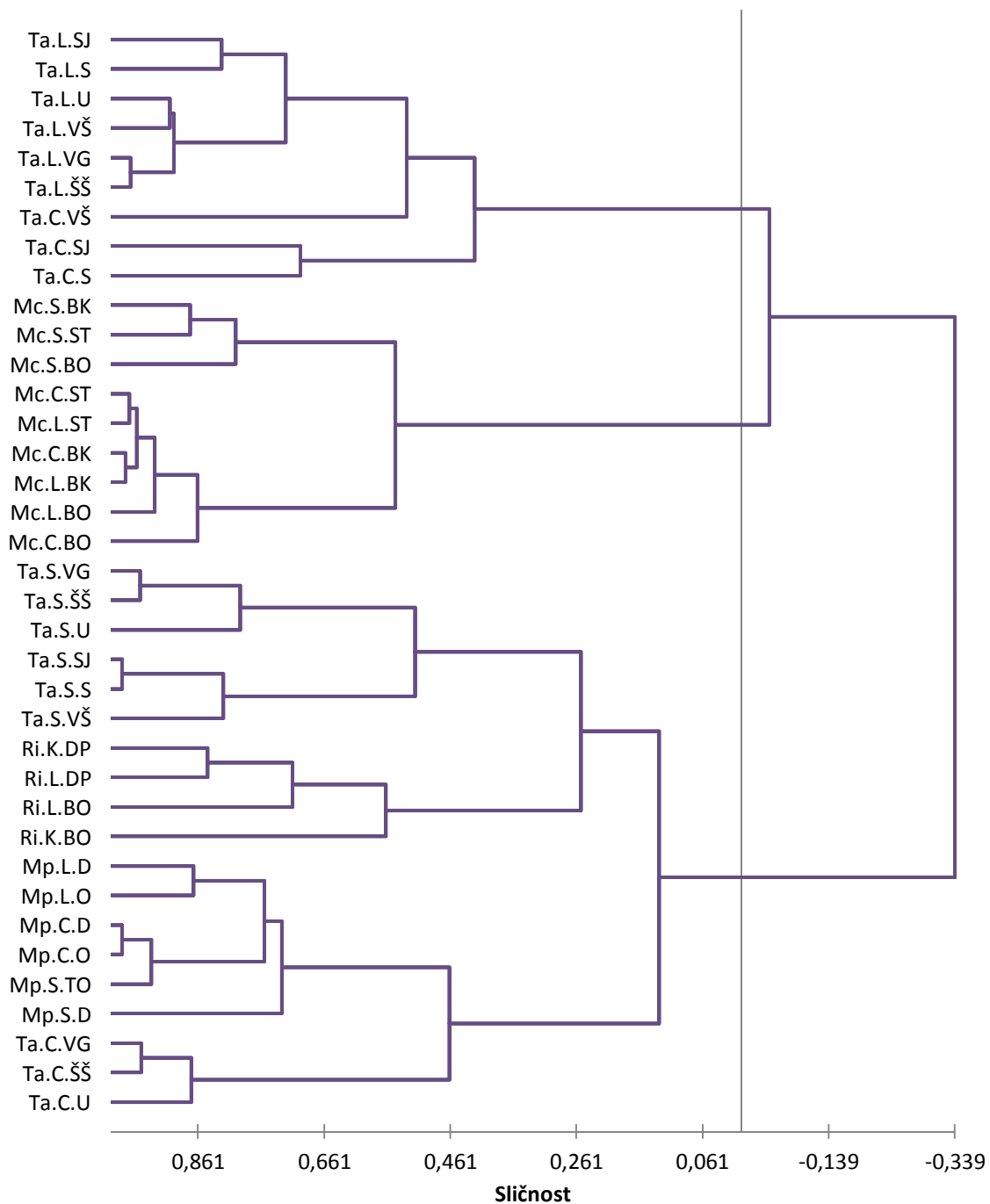
Za vrstu *T. arduini* značajne korelacije prema Pearsonov-om koeficijentu pokazuju DPPH metoda sa vrijednostima izmjerenim za ukupne fenole (0,825) i proantocijanidine (0,847), FRAP metoda sa ukupnim fenolima (0,905), flavonoidima (0,942), flavanolima (0,996) i hidrosicimetnim kiselinama (0,982) dok ABTS metoda i metoda cikličke voltometrije ne pokazuju značajne korelacije sa izmjerenim polifenolnim grupama. Kod vrste *M. petraea* situacija je drugačija te imamo značajne korelacije između svih ispitivanih varijabli osim ukupnih proantocijanidina i ukupnih fenolnih kiselina sa spektrofotometrijski mjerenim metabolitima i antioksidacijskim aktivnostima. Za biljnu vrstu *M. petraea* sve spektrofotometrijske metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti pokazale su značajne međusobne korelacije te korelacije sa ukupnim fenolima, flavonoidima i hidrosicimetnim kiselinama dok ciklička voltometrija pokazuje značajnu korelaciju samo s DPPH metodom. Također spektrofotometrijske metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti pokazuju negativne korelacije sa ukupnim fenolnim kiselinama. Kod vrste *R. intermedia* s obzirom za metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti značajnu korelaciju pokazuju samo FRAP i DPPH metoda (0,986). DPPH metoda pokazuje značajnu korelaciju s ukupnim flavanolima (0,982), hidrosicimetnim kiselinama (0,977) te proantocijanidinima (0,999) dok ABTS i FRAP metoda značajno koreliraju samo sa ukupnim flavonoidima.

3.5.2. Hijerarhijska klaster analiza

Rezultati fitokemijskih analiza i određivanja antioksidacijske aktivnosti podvrgnuti su multivarijantnoj analizi uz pomoć UPMG klastera a rezultati su prikazani na Slikama 30-32.

Dendrogram dobiven klaster analizom prikazan je na Slici 30. Uspoređeno je 10 varijabli (ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, ukupni flavonoli, ukupne hidroksicimetne kiseline, proantocijanidini, ukupne fenolne kiseline te antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH, FRAP, ABTS i metodom cikličke voltometrije) u 37 analiziranih uzoraka. Uzorci su se podijelili u tri grupe i nekoliko podgrupa. U prvoj grupi nalaze se listovi vrste *T. arduini* sa svih lokaliteta te cvatovi s lokaliteta Vošac, Sveti Jure i Sniježnica. Listovi su jasno odijeljeni u posebnu podgrupu od cvatova. Druga grupa obuhvaća uzorke vrste *M. croatica*. Također, u zasebnu podgrupu jasno su se odijelile stabljike, dok su listovi i cvatovi u drugoj podgrupi.

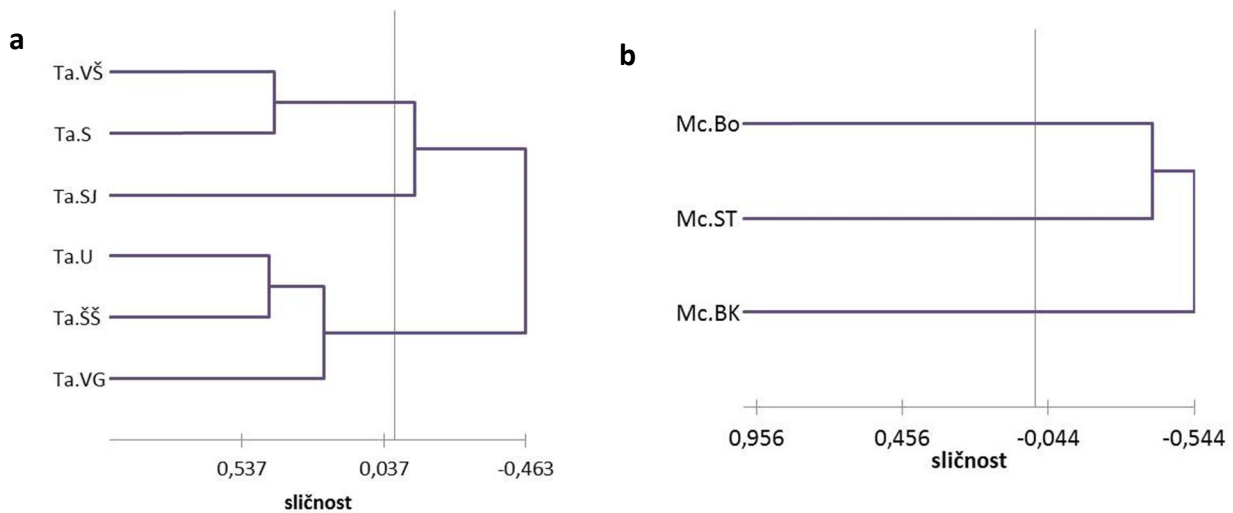
Treća grupa je također podijeljena u jasne podgrupe. U jednoj se nalaze stabljike vrste *T. arduini* sa svih šest lokaliteta, u drugoj su analizirani uzorci vrste *R. intermedia*, dok se treća sastoji od dvije grane. U jednoj su svi analizirani uzorci vrste *M. petraea*, a u drugoj cvatovi vrste *T. arduini* s lokaliteta Vaganac, Šušanj i Učka.



Slika 30. Dendrogram dobiven klaster analizom podataka za sastav metabolita i antioksidacijske aktivnosti ispitivanih biljnih ekstrakata s obzirom na biljni organ i lokalitet rasta biljke.

Kako bi se odredio utjecaj lokaliteta, za svaki je lokalitet izračunata ukupna vrijednost za cvat, list i stabljiku te su podaci obrađeni klaster analizom (slika 31 a i b). Kako za vrste *M. petraea* i *R. intermedia* imamo samo dva lokaliteta nisu obrađivani na ovaj način.

Za biljnu vrstu *T. arduini*, s obzirom na Pearsonov koeficijent uzorci su podijeljeni u trigrupe. U jednoj su južni lokaliteti Vošac i Sniježnica dok je Sveti Jure izdvojen. Za biljnu vrstu *M. croatica* lokaliteti Bojinac i Stupačinovo jasno su se odijelili od lokaliteta Bačić kuk.

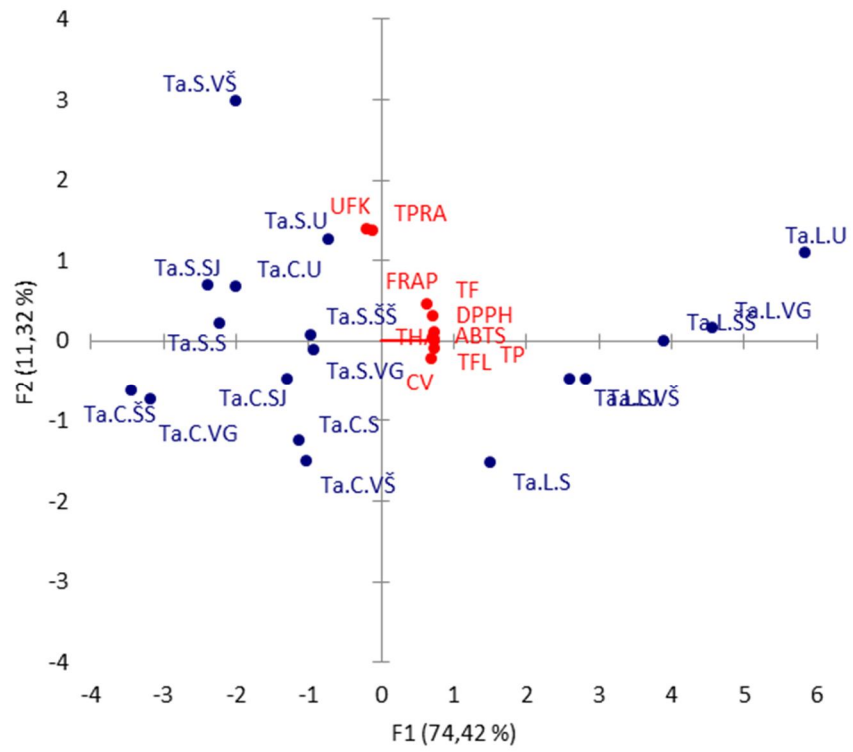


Slika 31. Dendrogram dobiven klaster analizom 10 ispitivanih varijabli na različitim lokalitetima za vrste a) *T. arduini* i b) *M. croatica*.

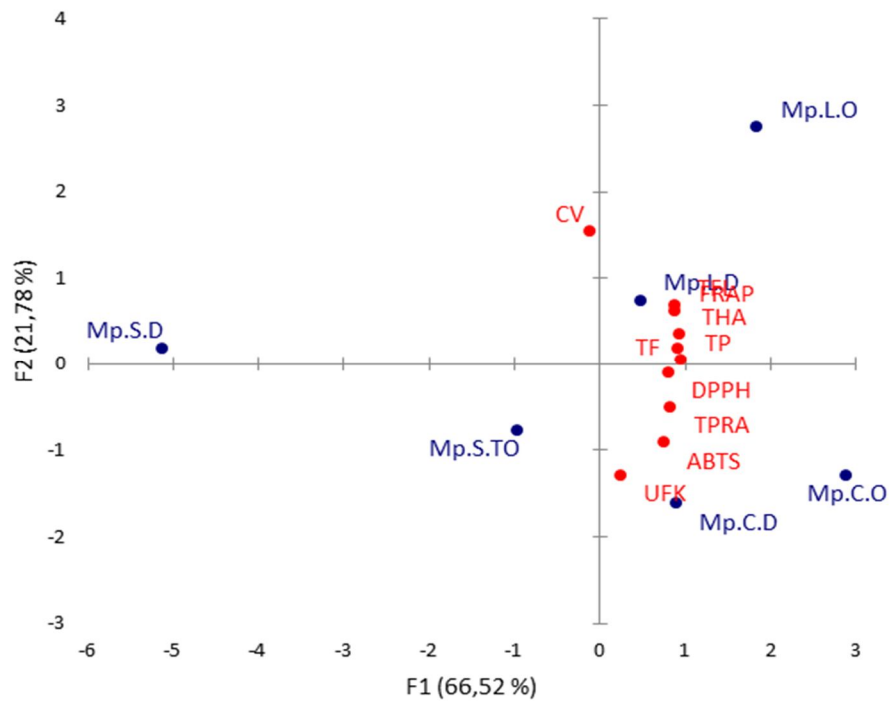
3.5.3. Analiza glavnih komponenti

Podaci su analizirani i analizom glavnih komponenti, PCA (engl. *principal component analysis*) analizom, te su rezultati prikazani na Slici 32. a-d. Za svaku istraženu biljnu vrstu izračunati je Pearsonov koeficijent (Tablice 22 a-d) za 10 varijabli (ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, ukupni flavonoli, ukupne hidroksicimetne kiseline, proantocijanidini, ukupne fenolne kiseline te antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH, FRAP, ABTS i metodom cikličke voltometrije) te nacrtani orijentacijski dijagrami.

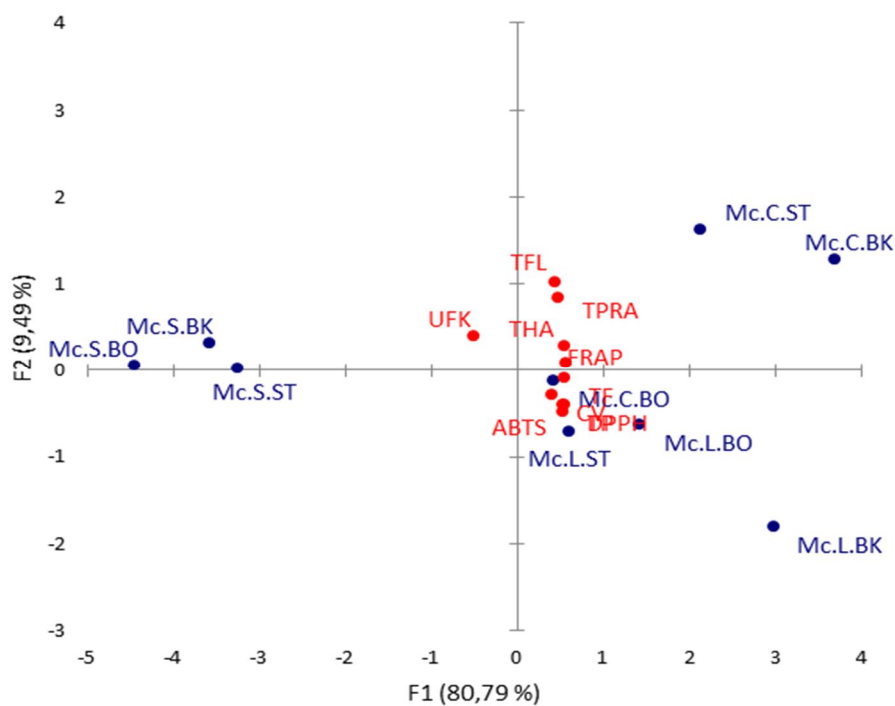
a)



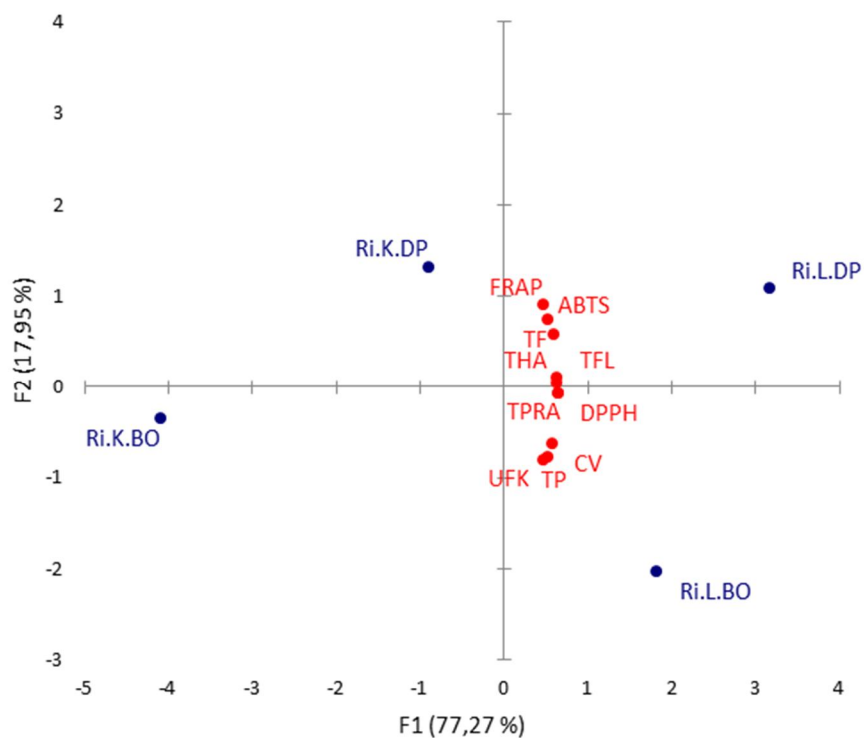
b)



c)



d)



Slika 32. Orijentacijski dijagrami (prikazan u obliku *biplota*) analize glavnih komponenti (PCA) vrsta a) *T. arduini*; b) *M. petraea*; c) *M. croatica*; d) *R. intermedia* s obzirom na biljni organ i lokalitete te međusoban odnos varijabli.

PCA analiza za biljnu vrstu *T. arduini* (Slika 32a) uzima u obzir 85,74% varijabilnosti podataka te pokazuje jasno odvajanje uzoraka na temelju različitih biljnih organa. Uzorci listova sa svih lokaliteta smješteni su u desnom dijelu slike zbog visokog sadržaja ukupnih fenola, flavonoida, flavonola, hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijske aktivnosti. Stabljike su smještene u gornjem lijevom dijelu slike zbog povećanog sadržaja ukupnih proantocijanidina (TPRA) te fenolnih kiselina (UFK). Cvatovi su grupirani u donjem lijevom dijelu slike. Također, jasno je vidljivo da su listovi sa sjevernijih lokaliteta Učka Vaganac i Šušanj smješteni bliže jedan drugome nego oni sa južnijih lokaliteta Vošac, Sniježnica i Sveti Jure među kojima su Vošac i Sveti Jure najbliže.

Za vrstu *M. petraea* PCA analiza uzima u obzir 88,30% varijabilnosti podataka te također pokazuje jasno grupiranje uzoraka s obzirom na biljni organ. Listovi i cvatovi koji pokazuju više vrijednosti mjerenih varijabli smješteni su u desnom dijelu slike. U desnom gornjem kvadratu nalaze se uzorci lista s oba lokaliteta kod kojih su izmjerene nešto više vrijednosti ukupnih fenola flavonoida, flavanola, hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom i metodom cikličke voltametrije. Kod cvatova su izmjerene nešto više vrijednosti ukupnih fenolnih kiselina, proantocijanidina i antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS i DPPH metodom. Na lijevoj su strani slike uzorci stabljike kod kojih imamo niže vrijednosti mjerenih varijabli.

Kod vrste *M. croatica* PCA analizom je opisano 90,28% varijabilnosti podataka te pokazuje jasno odvajanje uzoraka stabljika na lijevoj strani slike zbog viših vrijednosti ukupnih fenolnih kiselina (UKF) u odnosu na cvatove i listove. Na desnoj strani slike smješteni su uzorci listova i cvatova koji nisu jasno odvojeni jer nema velikih razlika u izmjerenim varijablama između ta dva biljna organa.

Za vrstu *R. intermedia* PCA analiza obuhvaća 95,22% varijabilnosti podataka te prikazuje uzorke listova sa desne, te kore sa lijeve strane slike. Listovi se nalaze na desnoj strani zbog viših izmjerenih vrijednosti ispitivanih varijabli. Također ovdje možemo primijetiti da su se i listovi i kora lokaliteta Dundović podi smjestili na gornjoj strani slike, dok se uzorci sa lokaliteta Bojinac nalaze na donjoj strani slike.

3.6. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA NA RAZINI MAKROMOLEKULA

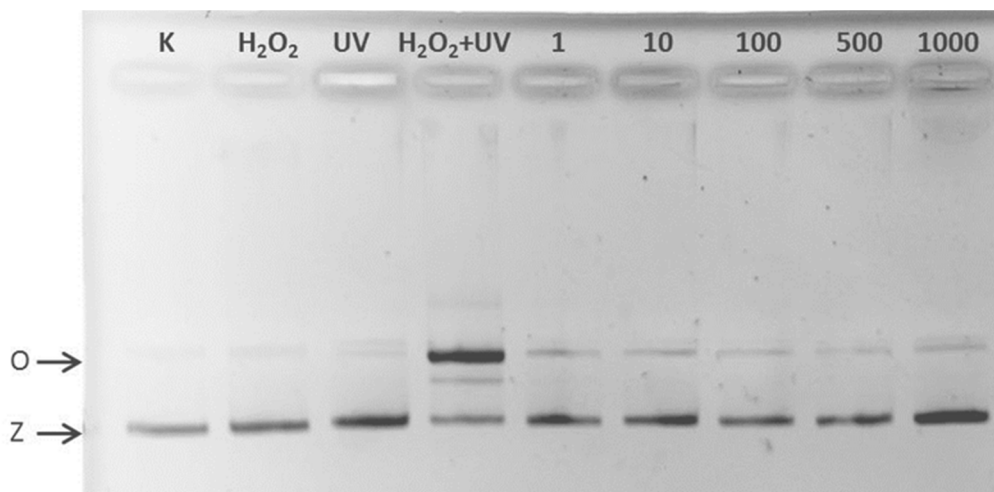
Ekstrakti koji su pokazali najvišu antioksidacijsku aktivnost korišteni su za određivanje zaštitne uloge od oksidacijskih oštećenja na razini makromolekula te za stanične testove. Ekstrakti su upareni do suhog te otopljeni u metanolu na koncentraciju 10mg/mL. Tako pripremljeni ekstrakti (engl. *crude extract*) korišteni su za navedene testove. Iskorištenje ekstrakcije prikazano je u Tablici 23.

Tablica 23. Iskorištenje ekstrakcije za listove vrsta *T. arduini* s lokaliteta Učka, *M.croatica* s lokaliteta Bačić kuk, *M.petraea* s lokaliteta Orebić te *R. intermedius* lokaliteta Dundović podi

Uzorak	Iskorištenje ekstrakcije (%)
Ta.U	39,51±5,42
Mc.BK	12,79±2,27
Mp.O	11,71±0,36
Ri.DP.	19,50±0,84

3.6.1. Zaštita DNA

Zaštitna uloga ekstrakta od oštećenja DNA ispitana je na modelu višestruko zavijene plazmidne DNA, ϕ X174 RF1 koja u nativnoj formi na gelu daje jedan signal označen na Slici 33. slovom Z. Kod izlaganja DNA ultraljubičastom zračenju, uz prisutnost vodikova peroksida dolazi do otvaranja strukture plazmida te ona prelazi u otvorenu formu, označenu na slici sa slovom O. DNA uz dodatak vodikova peroksida te uz ili bez prisutnosti ispitivanih ekstrakata je bila izložena UV zračenju kako bi se na gelu mogla pratiti zaštitna uloga ekstrakata.



Slika 33. Zaštitna uloga različitih koncentracija ekstrakta vrste *M. petraea* (1, 10, 100, 500 i 1000 µg/mL) na višestruko zavijenu DNA

Tablica 24. Djelovanje različitih koncentracija ekstrakata na zaštitnu DNA. Pojavnost signala za otvorenu formu indicira da je u tom uzorku došlo do oštećenja DNA: označeno simbolom – (nema zaštite). Ukoliko je DNA ostala u nativnoj višestrukozavijenoj formi to je naznačeno sa simbolom +.

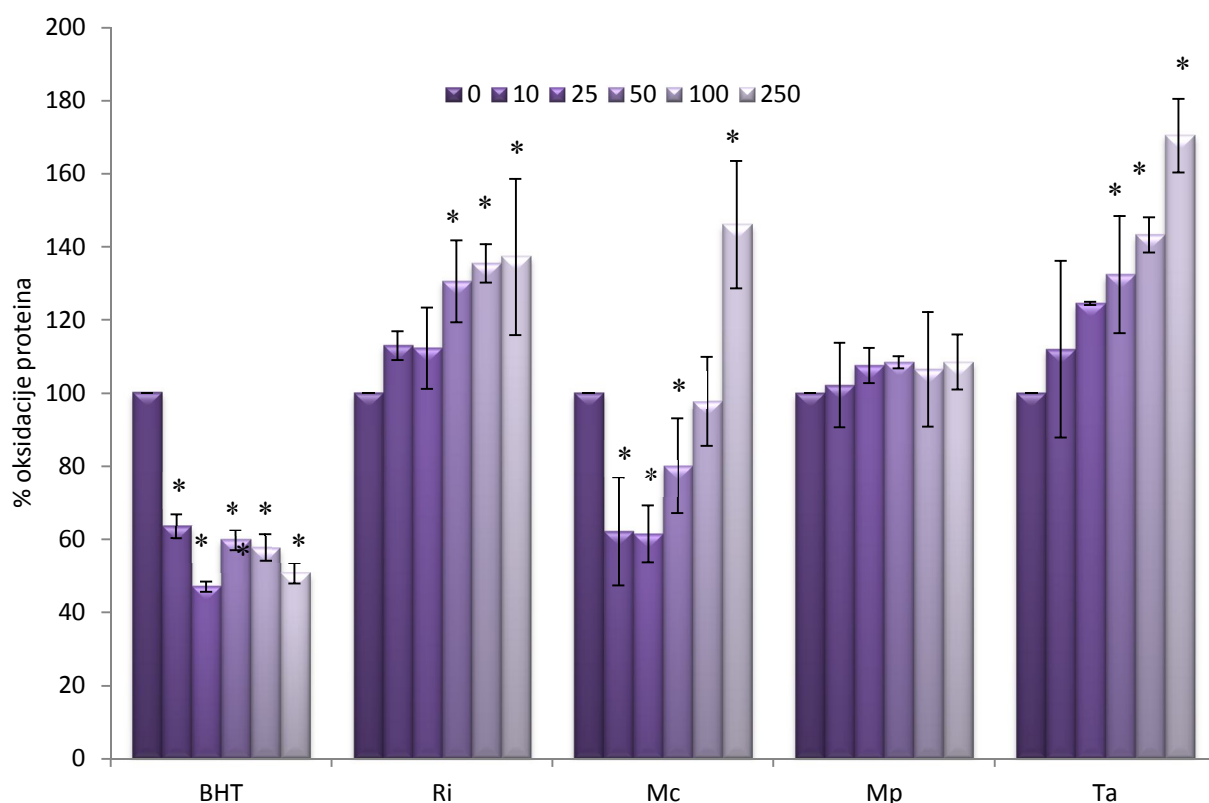
	UV+	1	10	100	500	1000
	H ₂ O ₂	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Ta	-	+	+	+	+	+
Mp	-	+	+	+	+	+
Mc	-	+	+	+	+	+
Ri	-	+	+	+	+	+

Kao što se jasno vidi iz prikazane Tablice 24., ekstrakti izolirani iz sve četiri biljke pokazale su zaštitnu ulogu na razini DNA u ispitivanim koncentracijama od 1, 10, 100, 500 i 1000 µg/mL.

3.6.2. Zaštita od oksidacije proteina

3.6.2.1. Metoda mjerenja stupnja karbonilacije proteina

Stupanj karbonilacije proteina goveđeg albumina (BSA) nakon inkubacije na 37°C uz potaknutu oksidaciju metalima, bez i uz prisutnost ekstrakta različitih koncentracija, prikazani su na Slici 34.



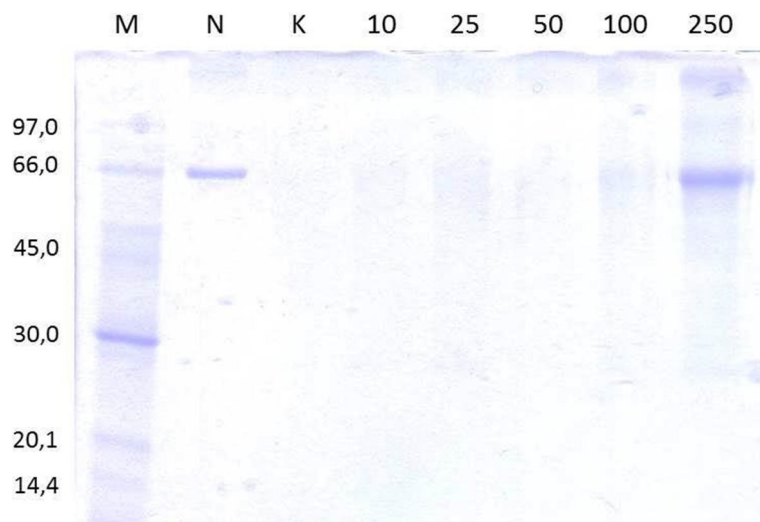
Slika 34. Postotak oksidacije proteina goveđeg albumina (BSA) nakon inkubacije s ekstraktima uz izazivanje oksidacije. Zvezdicama su označene vrijednosti koje su značajno različite od slijepe probe. Kao pozitivna kontrola korišten je komercijalni antioksidans BHT.

Kao pozitivna kontrola korišten je komercijalni antioksidans BHT koji je kao što je bilo očekivano pokazao zaštitu od oksidacije proteina višu od 40% kod svih ispitanih koncentracija. Biljna vrsta *M. petraea* nije pokazala nikakav značajan utjecaj na zaštitu od oksidacije proteina kod ispitanih koncentracija. Vrste *T. arduini* i *R. intermedia* pokazale su čak prooksidativno djelovanje, tj. dodatno izazivanje oksidacije proteina kod koncentracija viših od 25 µg/mL. Jedino je ekstrakt vrste *M. croatica* pokazao zaštitno djelovanje od

oštećenja i to kod koncentracija nižih ili jednakih 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kod koncentracije od 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bilo je prisutno 80% oksidiranog proteina u odnosu na kontrolu, kod koncentracije 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 61%, a kod koncentracije 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 60%. Kod viših koncentracija ekstrakt vrste *M. croatica* također pokazuje prooksidativno djelovanje.

3.6.2.2. Provjera zaštitne uloge biljnih ekstrakata na oštećenje proteina elektroforezom u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)

Moguća zaštitna uloga biljnih ekstrakata različitih koncentracija od oštećenja proteina praćena je i elektroforezom u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE). Oksidacija proteina izazvana je grijanjem reakcijske smjese koja je sadržavala protein u prisutnosti iona bakra te vodikova peroksida. Rezultati su prikazani na Slici 35. Proteinska vrpca albumina goveđeg seruma (BSA) u poliakrilamidnom gelu pokazuje signal na 66,0 kD. Uslijed oksidacije na gelu nije moguće detektirati tu proteinsku vrpcu. Ukoliko biljni ekstrakt ima zaštitno djelovanje, protein BSA moguće je detektirati na gelu bez obzira na provedenu oksidaciju. (Slika 35).



Slika 35. Proteinska slika albumina goveđeg seruma (BSA) u poliakrilamidnom gelu (N) nakon oksidacije bez (K) i uz prisutnost različitih koncentracija ekstrakata (10, 25, 50, 100 i 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) vrste *T. arduini*. Oznakom N označen je neoksidirani protein goveđeg seruma.

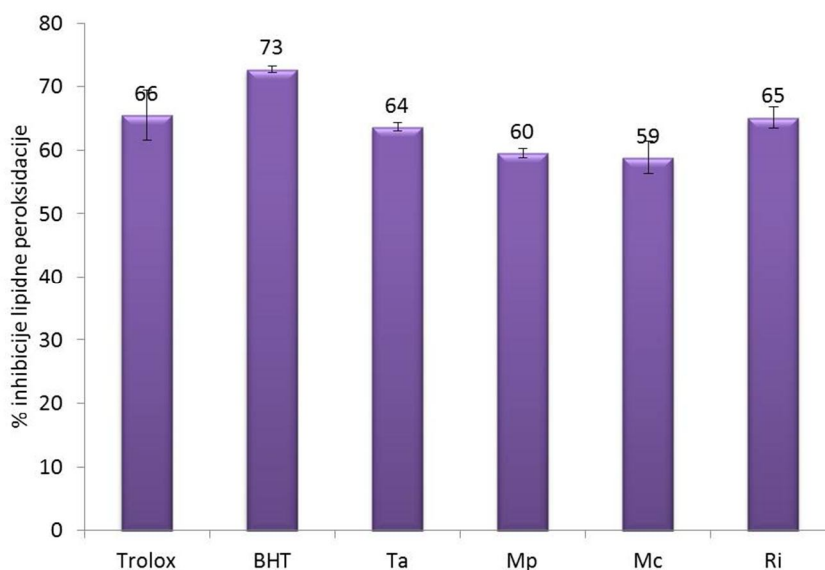
Tablica 25. Rezultati za ispitivane vrste. Prisutnost (+), odnosno odsutnost (-) signala na 66 kD.

	nativni	K	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL
Ta	+	-	-	-	-	-	+
Mp	+	-	-	-	-	-	-
Mc	+	-	-	-	-	-	-
Ri	+	-	-	-	-	-	-

Među ispitivanim uzorcima jedino je ekstrakt biljke *T. arduini* u koncentraciji od 250 µg/mL pokazao zaštitno djelovanje od oksidacije proteina.

3.6.3. Zaštita od oksidacije lipida

Zaštitna uloga ekstrakata od peroksidacije lipida mjerena je na modelu linolne kiseline. Rezultati su prikazani na Slici 36.



Slika 36. Postotak (%) inhibicije lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu nakon inkubiranja sa biljnim ekstraktima. Kao pozitivne kontrole korišteni su komercijalni antioksidansi Trolox i BHT.

Nakon 24h inkubacije na 37°C u odnosu na slijepu probu najviši postotak inhibicije lipidne peroksidacije pokazao je komercijalni antioksidans BHT koji je korišten kao

pozitivna kontrola. Svi biljni ekstrakti pokazali su zaštitu ulogu od lipidne peroksidacije: *T. arduini* (64%) i *R. intermedia* (65%) pokazali su nešto jači učinak u odnosu na *M. croatica* (60%) i *M. petraea* (59%).

3.7. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata vrsta *T. arduini*, *M. petraea*, *M. croatica* i *R. intermedia* ispitana je na bakterijskim stanicama *S. aureus* 3048, *E. coli* 3014, *S. Typhimurium* FP1, te *B. subtilis* ATCC 6633. Kao pozitivna kontrola korišten je antibiotik streptomycin a kao negativna metanol.

Metodom difuzije s rupicama u agaru biljni ekstrakti u koncentracijama 7,8, 15,62, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 nisu pokazali nikakvu antimikrobnu aktivnost. Također metanol kao pozitivna kontrola nije pokazao nikakvu aktivnost dok je streptomycin pokazivao promjer od 18 mm.

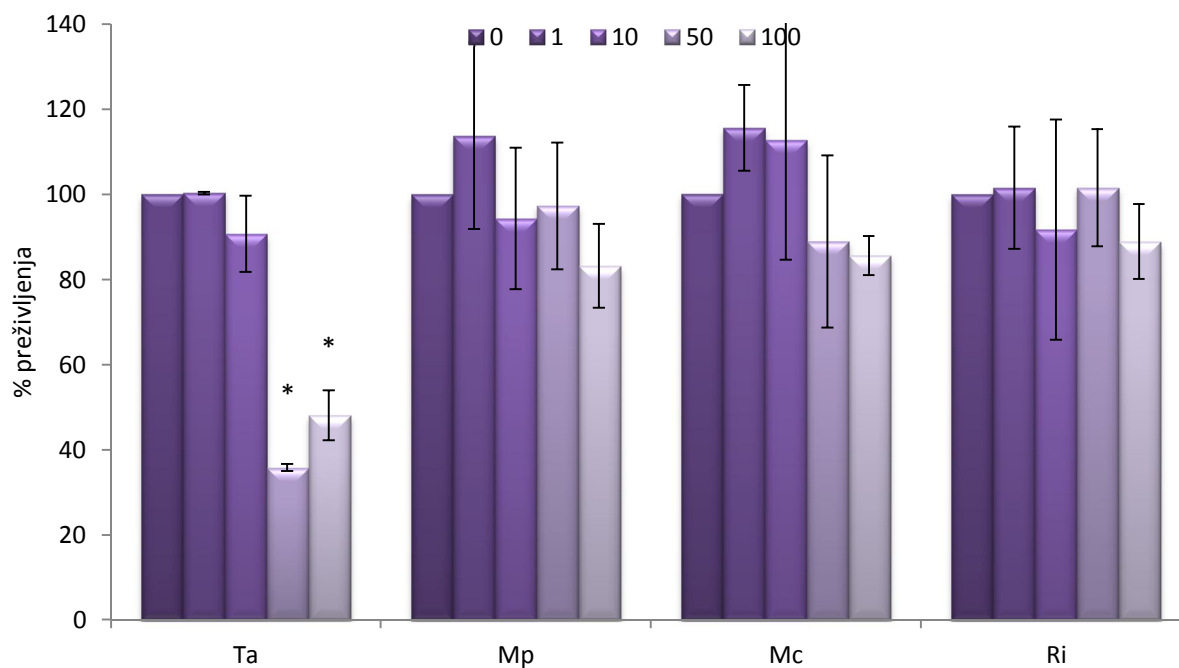
Turbidimetrijskom metodom nije primijećena nikakva inhibicija rasta bakterijskih stanica kod ispitivanih uzoraka, ali ni kod metanola kao negativne kontrole.

Također antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata u koncentraciji od 10 µg/mL ispitana je i metodom difuzije s filter diskovima te također ni jedan od ispitivanih biljnih ekstrakata nije pokazao antimikrobnu aktivnost.

3.8. STANIČNI TESTOVI

3.8.1. Test citotoksičnosti

Citotoksičnost, prooksidativna/antioksidativna aktivnost ispitivana je na HEP2 stanicama karcinoma grkljana (Slika 37).

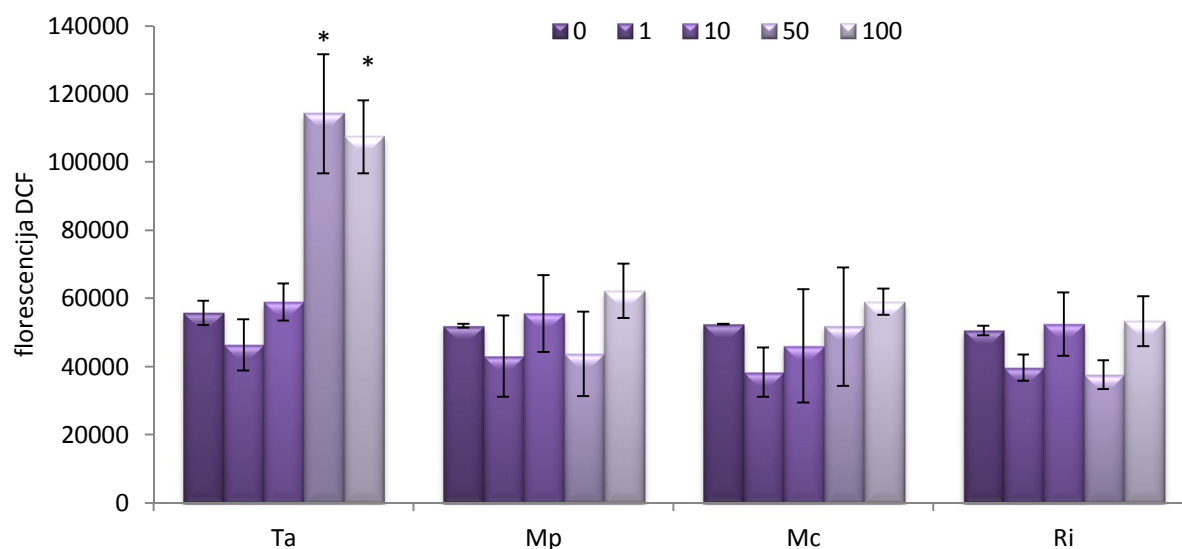


Slika 37. Preživljene stanice (%) karcinoma grkljana (HEP2) nakon tretmana s različitim koncentracijama ispitivanih ekstrakata ($\mu\text{g}/\text{mL}$) i tretmana od 24h. Zvezdicom su označene vrijednosti statistički značajno različite od kontrole.

Značajan utjecaj na preživljene stanice karcinoma grkljana nakon 24 sata tretmana pokazao je jedino ekstrakt vrste *T. arduini* u koncentracijama od 50 i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Odnosno, prisutnost tog ekstrakta uzrokovalo je smanjenje preživjelih tumorskih stanica 65%, tj. 50% u odnosu na kontrolu. Ekstrakti ostalih triju biljaka nisu imali značajan utjecaj na preživljenje tumorskih stanica.

3.8.2. Prooksidativno/antioksidativno djelovanje

Također, mjerena je količina reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u stanicama nakon tretmana od 24h sa ispitivanim ekstraktima bez i uz prethodno tretiranje stanica sa vodikovim peroksidom. Rezultati za tretman bez vodikova peroksida prikazani su na Slici 38, a uz prethodni tretman s vodikovim peroksidom na Slici 39.

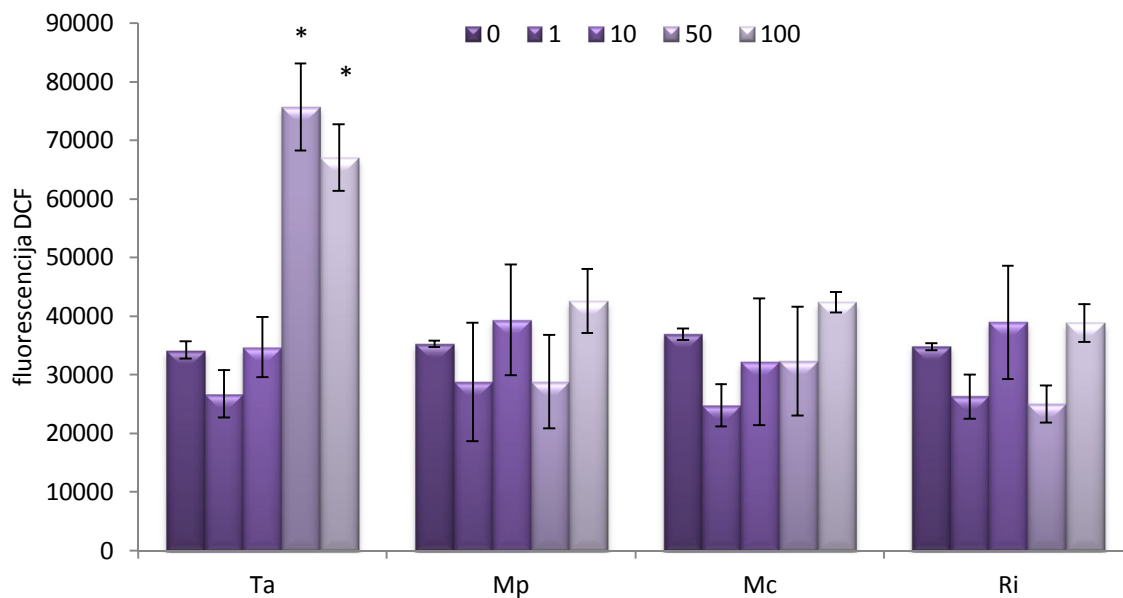


Slika 38. Izmjerene vrijednosti reaktivnih kisikovih skupina u HEP2 stanicama nakon 24h inkubacije s ekstraktima ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ispitivanih vrsta biljaka (prooksidativno djelovanje).

Zvezdicom su označene vrijednosti statistički značajno različite od kontrole.

Nakon inkubacije stanica HEP2 tijekom 24 sata u prisutnosti biljnih ekstrakata došlo je do povećanja količine reaktivnih kisikovih spojeva. Do značajnog porasta ovih spojeva došlo je u stanicama tretiranim s ekstraktima vrste *T. arduini* u koncentracijama 50 i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Slika 38).

Nadalje i kod mjerenja antioksidacijske aktivnosti, odnosno sposobnosti ekstrakta da smanji broj reaktivnih kisikovih jedinki nakon tretmana s H_2O_2 do značajnog porasta je došlo jedino kod ekstrakata vrste *T. arduini* u koncentracijama od 50 i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Jedino je ekstrakt biljne *T. arduini* pri 50 i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pokazivao prooksidativno djelovanje što je u skladu s rezultatima dobivenim u testu zaštite proteina mjerenjem količine nastalih karbonila (Slika 39).



Slika 39. Izmjerene vrijednosti reaktivnih kisikovih skupina u HEp2 stanicama nakon 24h inkubacije s ekstraktima ispitivanih vrsta biljaka ($\mu\text{g/mL}$) uz dodatak H_2O_2 (antioksidativno djelovanje). Zvezdicom su označene vrijednosti statistički značajno različite od kontrole.

4. RASPRAVA

4.1. GENETSKA ISTRAŽIVANJA

Metabolička i filogenetska karakterizacija endemičnih i medicinski zanimljivih biljaka provedena je za mali broj vrsta u svijetu pa tako i u Hrvatskoj. Prema podacima od prije 10 godina u 94% biljnih vrsta na Zemlji još uvijek nije karakterizirano s obzirom na sastav fitokemikalija (Verpoorte, 2000). Zbog široko rasprostranjene uporabe biljaka u zdravstvene i kozmetičke svrhe, a s druge strane zbog malo znanstvenih dokaza o njihovom djelovanju mnoga svjetska udruženja kao što je Svjetska zdravstvena organizacija (WHO- engl. *World Health Organisation*) uvrstile su istraživanja na ljekovitim biljaka kao prioritetna (WHO, 2005 i 2007). Stoga postoji potreba za intenzivnijim razvojem takvih istraživanja s različitih aspekata: metabolomike, genetike, bioraznolikosti itd.

U ovom radu istražene su fitokemijske i genetske razlike u endemičnim i medicinski zanimljivim biljnim vrstama ilirsko-balkanskog područja: *T. arduini*, *M. petraea*, *M. croatica* i *R. Intermedia*. Nadalje, ispitan je antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata testovima *in vitro*, te su provjereni potencijalni zaštitni učinci ovih ekstrakata na oksidaciju i oštećenja makromolekula. U konačnici ispitan je i njihov potencijalni antimikrobni učinak te djelovanje biljnih ekstrakata na jednu tumorsku staničnu liniju.

4.1.1. Izolacija i pročišćavanje DNA iz uzoraka bogatih sekundarnim metabolitima

Iako je izolacija DNA danas postala jedan od osnovnih koraka u istraživanjima u molekularnoj biologiji, mnogi autori se slažu da je taj postupak još uvijek veliki izazov, posebno u biljaka bogatih sekundarnim metabolitima. Prisutnost različitih sekundarnih metabolita, od kojih velika većina još nije okarakterizirana, može utjecati na kvalitetu i kvantitetu izoliranih nukleinskih kiselina (Asif i sur., 2000). U ovom radu, DNA je izolirana iz osušenih uzoraka listova. Iako je za vrste *M. croatica* i *M. petraea* DNA uspješno izolirana u zadovoljavajućoj količini i kvaliteti što je pokazano standardnim metodama provjere, spektrofotometrijskom i elektroforetskom analizom na gelu agaroze, PCR reakcija nije rezultirala produktima tj. DNA odsječcima. Problemi s izolacijom DNA i provođenjem PCR reakcije za vrste bogate sekundarnim metabolitima poznati su u literaturi. Polifenolne komponente prisutne u biljci (posebice tanini) mogu se lako oksidirati te formirati kinone koji

ireverzibilno povezuju proteine i nukleinske kiseline u komplekse visoke molekulske mase (Salzman i sur., 1999; landolino i sur., 2004), dok polisaharidi mogu koprecipitirati s nukleinskim kiselinama (Carra i sur., 2007). Nastali kompleksi mogu interferirati s DNA polimerazom, reverznom transkriptazom te DNA restrikcijskim endonuleazama i tako onemogućiti uporabu tehnika molekularne biologije (landolino i sur., 2004). Kako je ovo prvo istraživanje provedeno na navedenim biljnim vrstama, te ne postoje radovi o sastavu sekundarnih metabolita po kojima bih mogla zaključiti koja skupina stvara produkte koji ometaju provođenje PCR reakcije, bila sam prisiljena isprobati različite tehnike za izolaciju i pročišćavanje DNA.

Metoda izolacije uz uporabu detergenta CTAB (Doyle i Doyle, 1987) kojom je izolirana DNA zadovoljavajuće kvalitete iz vrsta *T. arduini* i *R. intermedia*, nije imala pozitivan ishod za vrste *M. croatica* i *M. petraea*. Izolirana je DNA loše kvalitete te se tijekom precipitacije stvarao viskozni talog slabo topljiv u TE puferu. Takav talog može nastati kod koprecipitacije polisaharida s DNA tijekom taloženja uz dodatak alkohola (Sudheer Pamidimarri i sur., 2009). Niska vrijednost omjera apsorbancije $OD_{260/280}$ (između 1,3 i 1,65) upućivala je na kontaminaciju proteinima, dok je DNA prilikom elektroforeze neujednačeno migrirala te zaostala u jažicama gela. U literaturi se navedene pojave povezuju s prisutnosti proteina i polisaharida u uzorcima DNA (Sharma i sur., 2002; Sudheer Pamidimarri i sur., 2009) koji mogu s DNA stvarati komplekse. Stoga sam primjenila metode izolacije i pročišćavanja DNA koje su u literaturi opisane specifično za uklanjanje proteina i polisaharida. Proteini su uklonjeni ispiranjem s kloroformom/izoamilnim alkoholom dok su polisaharidi uklonjeni uz pomoć visoke koncentracije soli u ekstrakcijskom puferu te precipitacijom s Na-acetatom. Također, primijenjeno je i ispiranje fenolom. Takvim postupkom ekstrakcije dobivena je DNA koja je na gelu davala oštru, jasnu vrpču, no PCR reakcija nije dala nikakve produkte. Nadalje, DNA je izolirana korištenjem komercijalnog kompleta za izolaciju DNeasy Plant Mini kiti (Qiagen). Dobivena je mala količina DNA koja također nakon PCR reakcije nije davala produkte. Prokušana je i izolacija kao kombinacija navedenog kiti i pročišćavanja s izoamilnim alkoholom/kloroformom kao što je rađeno u radu Bezić i sur. (2009) za vrste *Satureja* s područja Hrvatske, no ni navedeni postupci nisu dali DNA koja bi u reakciji PCR rezultirala produktima. Također, PCR reakcije su provođene u širokom rasponu koncentracija

DNA (1-1000 ng), mijenjanjem količine polimeraze te uz dodavanje DMSO. Nažalost, nikakve modifikacije u pročišćavanju DNA i sastavu lančane reakcije polimeraze nisu dale rezultate.

Kako kod vrsta *M. croatica* i *M. petraea* i nakon izvedenih mnogih modifikacija izolacije i pročišćavanja nismo dobili produkte PCR reakcije, snimljeni su UV i CD spektri izolata DNA te je provedeno "mekšanje" DNA sa svrhom ispitivanja njene kvalitete i čistoće. Navedene metode najčešće se koriste za ispitivanje nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s DNA i RNA molekulama (Piantanida, 2003). U ovom smo ih radu koristili kako bismo ispitali moguću prisutnost nekog destabilizirajućeg spoja koji utječe na provođenje PCR reakcije. Kao usporedba korištena je DNA iz vrste *T. arduini* kod koje se nisu javljali problemi u izvođenju PCR reakcija. UV i CD spektri izolata DNA za tu biljnu vrstu potvrdili su prisutnost DNA zadovoljavajuće kvalitete ali i male količine spoja sa maksimumom apsorbancije pri valnoj duljini 320 nm. Nasuprot tome, izolat DNA iz vrste *M. croatica* sadržavao je malu količinu DNA i znatno veće količine nepoznatog spoja. Temperatura mekšanja te DNA bila je pomaknuta na 46°C, dok je uobičajena temperatura mekšanja DNA u TE puferu između 50-60 °C, kao što je bilo izmjereno za biljnu vrstu *T. arduini*. Pomak temperature mekšanja DNA prema nižim vrijednostima može biti uzrokovan vezivanjem spoja u utore DNA čime se destabilizira dvostruka uzvojnica (Piantanida, 2003). Kod vrste *M. petraea*, iako je prisutnost DNA potvrđena na agaroznom gelu, koncentracija DNA bila je ispod limita detekcije instrumenta korištenog za mjerenja UV i CD spektara. Obje su metode potvrdile prisutnost visoke količine spoja s maksimumom apsorbancije na 273 nm i na 316 nm. Ta dva spoja vjerojatno ometaju dobivanje čiste DNA koja bi mogla biti upotrijebljena za PCR reakcije. Kako sa sigurnošću ne znamo o kojim se spojevima radi, a sve dostupne metode pročišćavanja nisu dale dovoljno kvalitetnu DNA za provođenje PCR reakcije, na navedene dvije biljke nisu provedene RAPD analize. Postoji mogućnost da je i do vezanja nepoznate, destabilizirajuće, komponente na molekulu DNA došlo prilikom sušenja biljnog tkiva. Da bi se provjerila navedena tvrdnja bilo bi potrebno prikupiti nove uzorke za analizu što nije moguće u vremenskim okvirima ovog doktorskog rada. Kako se radi o endemičnim biljnim vrstama njihova je eksploatacija ograničena, a i financijska situacija u ovom trenutku to ne dozvoljava.

4.1.2. RAPD analize

Danas se u istraživanjima genetske varijabilnosti koriste različite metode kao što su polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka- RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), PCR-RFLP, nasumično umnažanje polimorfne DNA- RAPD (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*) te mikrosatelitski biljezi -SSR (engl. *Simple Sequence Repeats*). RAPD je relativno jednostavna i jeftina metoda koja zahtjeva malu količinu DNA što je važno kod istraživanja endemičnih i rijetkih biljnih vrsta kod kojih nisu dostupne veće količine biljnog materijala. Stoga je ta metoda odabrana za određivanje genetske varijabilnosti endemičnih biljnih vrsta u ovom radu. Do sada, RAPD metoda uspješno je korištena za analizu genetske varijabilnosti rijetkih endemičnih biljnih vrsta (Artyukova i sur., 2005), te ljekovitih i aromatičnih biljaka (Padmalatha i Prasad, 2006; Khan i sur., 2007; Ikbali i sur., 2010; Al-Rawashdeh, 2011; Chattopadhyay i sur., 2012). Također, u literaturi se navodi visoki stupanj korelacije između RAPD metoda i zahtjevnije i sofisticiranije SSR metode (Leal i sur., 2010).

Prema UPMGA dendrogramu za biljnu vrstu *T. arduini* kreiranom na bazi Dice-ova koeficijenta uzorci s različitih lokaliteta grupirani su u tri skupine: Učka i Sveti Jure u jednu skupinu, zatim Vošac u posebnu skupinu, te u treću skupinu Sniježnica, Vaganac i Šušanj. Lokalitet Sveti Jure i Vošac te Šušanj i Vaganac geografski su blizu jedan drugoga. Uzorci ubrani na tim lokalitetima pokazuju visok stupanj korelacije prema Dice-ovom koeficijentu, od 0,688, odnosno 0,720. Najmanji koeficijent, 0,556, izračunat je između lokaliteta Učka i Šušanj, no ta vrijednost još uvijek pokazuje veoma veliku genetičku sličnost. Ti rezultati su u skladu s činjenicom da endemične vrste, koje rastu na uskim geografskim područjima, imaju niski stupanj varijacije u usporedbi s biljkama koje rastu na puno širim područjima (Artyukova, 2005). RAPD markeri također su korišteni u određivanju genetske varijabilnosti osam populacija *Teucrium polium* s područja Tunisa (Boulila i sur., 2010). Autori navode 87% polimorfni vrpci dobivenih korištenjem osam početnica, što je slično rezultatima u ovom radu gdje je dobiveno 80% polimorfni vrpci uz korištenje devet početnica. Prema rezultatima RAPD analiza, u navedenom radu, populacije vrste *T. polinum* grupirane su zajedno u odnosu na klimatska područja te plodnost genetskog materijala (haploidnost/diploidnost).

Za biljnu vrstu *R. intermedia* ispitana su samo dva lokaliteta (Bojinac i Dundović podi). Dice-ov koeficijent genetičke sličnosti iznosio je 0,647 što upućuje na visoki stupanj sličnosti. Do sada u literaturi nije ispitivana genetska varijabilnost vrste *R. intermedia*. Iako postoji veliki broj *Rhamnus* vrsta do sada je genetska varijabilnost bila istražena u vrstama *Rhamnus alaternus* L. i *R. ludovici-salvatoris* (Ferriol i sur., 2009), *Rhamnus glaucophylla* Sommier. (Bedini i sur., 2011) te *Rhamnus persicifolia* Moris (Bacchetta i sur., 2011).

4.2. POLIFENOLI: SASTAV I ZASTUPLJENOST S OBZIROM NA BILJNU VRSTU, BILJNI ORGAN I LOKALITET RASTA

Zbog povećanog interesa za istraživanjem polifenolnih komponenti u biljkama porastao je i broj metoda koje se koriste za njihovu identifikaciju i kvantifikaciju. Iako spektrofotometrijske metode daju informacije o kvalitativnom sastavu pojedinih polifenolnih grupa u uzorku od interesa, zbog jednostavnosti i relativno niskih troškova, ove metode nalaze primjenu u biljnoj biologiji u istraživanjima vezanim uz biljnu fiziologiju (Salopek-Sondi i sur., 2013), a posebice u istraživanjima vezanim uz određivanje razine polifenolnih komponenti u hrani i ljekovitim biljkama kao izvorima komponenata s antioksidacijskim potencijalom (Piljac-Žegarac i sur., 2010; Zovko-Kočić i sur., 2010; Kremer i sur., 2011). Za dobivanje detaljnih informacija o sastavu polifenola poželjno je i potrebno kombinirati spektrofotometrijske metode s metodama tekućinske kromatografije povezane s masenim detektorima (LC-MS) koje omogućuju kvalitativno određivanje pojedinih fenolnih spojeva.

U ovom radu određene su fenolne kiseline UPLC-MS/MS metodom. Fenolne kiseline su mnogobrojna skupina fenolnih spojeva koje su derivati benzojeve i cimetine kiseline. U biljkama se nalaze u slobodnom obliku ili u obliku konjugata te igraju važnu ulogu u rastu i razvoju, zaštiti biljaka od nametnika, u obrani od oksidativnog stresa i sl. (Gruz i sur., 2008). Nadalje, dokazano je da fenolne kiseline imaju pozitivne učinke na zdravlje ljudi zbog svoje antioksidativne, antiproliferativne, antimutagene i antimikrobne aktivnosti (Robbins, 2003). Njihova razina i oblik u kojem su prisutne u biljkama ovisi o raznim genetskim i vanjskim čimbenicima. U biljnim vrstama fenolne kiseline u slobodnoj su formi prisutne u širokom rasponu koncentracija od 10 do 2200 µg/g svježeg tkiva (Manach i sur., 2004).

4.2.1. *Teucrium arduini*

U uzorcima vrste *T. arduini* spektrofotometrijski je određen sastav ukupnih fenola, flavonoida, ukupnih hidrokscimetnih kiselina, flavonola i proantocijanidina u listu, stabljici i cvatu (Tablica 10). Ukupni fenoli u vrsti *T. arduini* prethodno su, većinom, bili istraživani spektrofotometrijskim metodama (Kremer i sur., 2011a; Stanković i sur., 2011; Jurišić-Grubešić i sur., 2012; Stanković i sur., 2012) ili kombinacijom spektrofotometrijskih i kromatografskih metoda (Šamec i sur., 2010; Kremer i sur., 2013). U našem prethodnom radu (Šamec i sur., 2010) odredili smo ukupne fenole te fenolne kiseline u cvatovima i listovima vodenih ekstrakata vrste *T. arduini* sa šest istih lokaliteta koji su bili objekt istraživanja i u ovom radu. U vodenim infuzijama vrijednosti ukupnih fenola kretale su se od 6,24-30,49 mg GAE/g suhe mase za cvatove i 6,90-23,39 mg GAE/g suhe mase za listove. Te su vrijednosti značajno niže od vrijednosti izmjerenih u metanolnim ekstraktima (80% metanol) koji su analizirani u ovom radu (list: 37,27-58,15 mg GAE/g dw; cvat: 9,01-26,39 mg GAE/g dw). Rezultati analiza polifenola u skladu su s literaturnim podacima za druge biljne vrste (Cai i sur., 2004; Falleh i sur., 2008) koji potvrđuju da je metanol u kombinaciji s određenim postotkom vode pogodnije otapalo za ekstrakciju ukupnih fenola od čiste vode. Također, naša dosadašnja istraživanja (Šamec i sur., 2010) pokazala su da infuzije cvatova (srednja vrijednost 15,59 mg GAE/g sm) imaju više vrijednosti ukupnih polifenola te većine pojedinačnih fenolnih kiselina od listova (srednja vrijednost 11,73 mg GAE/g sm), dok su u ovom radu značajno više vrijednosti ukupnih fenola izmjerene u listovima. Sličan trend uočili su i drugi autori, npr. kod vrste *Cynara cardunculus* L., gdje je u listovima izmjeren gotovo dvostruko viši udio ukupnih fenola i flavonoida nego u cvatovima (Falleh i sur., 2008). Za tu biljnu vrstu razina ukupnih polifenola bila je 14,79 mg GAE/g sm za listove te 6,96 mg GAE/g sm za cvatove, dok je razina flavonoida za listove bila 9,08 mg CE/g sm, a za cvatove 5,58 mg CE/g sm. Izmjerene vrijednosti značajno su niže u odnosu na iste izmjerene u vrsti *T. arduini* koja je bila jedan od objekata istraživanja u ovom radu. Iako je, s obzirom na podatke dobivene u ovom radu, biljna vrsta *T. arduini* pokazala visok udio polifenolnih komponenata, u prethodna dva rada (Jurišić-Grubešić i sur. 2012; Stanković i sur. 2012) je vrsta *T. arduini*, u usporedbi s ostalim vrstama roda *Teucrium* pokazala niži sadržaj polifenolnih komponenata. Ove razlike mogu se obrazložiti kako genetskim razlikama, tako i stanišnim razlikama između populacija.

Kod pojedinačnih fenolnih kiselina analiziranih u ovom radu situacija je nešto drugačija, s obzirom na spektrofotometrijski dobivene podatke, te je u cvatovima sa svih lokaliteta detektirano ukupno više slobodnih fenolnih kiselina nego u listovima i stabljikama. Najvišu razinu ukupnih fenolnih kiselina nakupljale su biljke lokaliteta Učka kod kojih su galna, gentistična, 4-hidroksibenzojeva, vanilinska, 3-hidroksibenzojeva, 4-kumarinska, sinapinska i salicilna kiselina nađene u značajno višim udjelima u cvatovima. Trend nakupljanja slobodnih fenolnih kiselina u cvatovima u usporedbi s ostalim dijelovima biljaka primijećen je i za vrste *Asclepias syriaca* L. (Sikorska i sur., 2000). Na osnovu naših rezultata pokazano je da vrsta *T. arduini* sadrži niže koncentracije slobodnih fenolnih kiselina u usporedbi s drugim biljkama iz porodice *Lamiacea* (Zgorcka i Glovniak, 2001) u kojima su se koncentracije slobodne protokatehinske, 4-hidroksibenzojeve, gentistične, klorogenske, siringične, kava, vanilinske, p-kumarinske, ferulinske i ružmarinske kiseline za većinu biljaka kretali između 50-100 µg/g suhe mase. U našem radu samo su gentistična, 4-hidroksibenzojeva i salicilna kiselina u cvatovima s lokaliteta Vošac detektirane u koncentracijama iznad 30 µg/g suhe mase. Također, u radu autora Kremer-a i sur. (2013) u vrsti *T. arduini* s Biokova određena je niska razina ferulinske kiseline u listovima i cvatovima te ružmarinske u listovima, dok sinapinska, kava te kumarinska kiselina nisu detektirane. Iako je spektrofotometrijski određena viša razina hidroksicimetnih kiselina u listovima, od hidroksicimetnih kiselina u slobodnoj formi značajno više vrijednosti u listovima pokazale su jedino klorogenska kiselina u listovima biljaka na lokalitetu Učka, ferulinska kiselina u biljkama na lokalitetu Šušanj te kava i *trans*-cimetna kiselina u biljkama na lokalitetu Šušanj, Učka i Vaganac.

Analize biljaka s različitih lokaliteta pokazale su da lokalitet rasta značajno utječe na količinu i sastav polifenola. Tako listovi i stabljike s najsjevernijeg lokaliteta, Učka, pokazuju najviše vrijednosti, dok one s najjužnijeg lokaliteta, Sniježnica, pokazuju najniže vrijednosti polifenolnih komponenti. Da geografska širina i klimatski uvjeti utječu na razinu polifenolnih komponentata poznato je u literaturi za vrste *Crithmum maritimum* L. i *Inula candida* (L.) Cass (Maleš i sur., 2003; Maleš i sur., 2010b) s područja Hrvatske. Biljke s lokaliteta Šušanj i Vaganac, iako pokazuju visoki udio polifenolnih komponentata u listu i stabljici istovremeno sadrže značajno niže vrijednosti u cvatovima. Cvatovi su biljni reproduktivni organi i često sadrže značajne količine polifenolnih komponentata koje sudjeluju u privlačenju oprašivača

(Luximon-Ramma i sur., 2002). Razina polifenolnih komponenti u cvatu mijenja se ovisno o vremenu proteklom od početka cvatnje: na početku cvatnje je najviša i s vremenom se snižuje kako cvat stari (Maleš i sur., 2003; Schmitzer i sur., 2010; Joshi i sur., 2011). Biljke korištene u ovom radu ubrane su u periodu cvatnje u isto vrijeme (razlika nekoliko dana) na šest lokaliteta. Niža razina izmjerenih polifenolnih komponenti na lokalitetima Šušanj i Vaganac može se obrazložiti time što su cvatovi s ta dva lokaliteta bila u uznapređovaloj fazi cvatnje (stariji cvatovi). Naime, navedena se dva lokaliteta nalaze na nižim nadmorskim visinama (Šušanj 600 m; Vaganac 700 m) te je cvatnja na tim lokalitetima počela nekoliko tjedana ranije u odnosu na ostale lokalitete koji su smješteni iznad 1200 m n.v. (Učka 1200m, Vošac 1300 m, Sveti Jure 1550m, Sniježnica 1300 m).

4.2.2. *Moltkia petraea*

Fitokemijski sastav i biološka aktivnost vrste *M. petraea* su vrlo malo istraženi. Dostupan je samo rad autora Zovko-Končić i sur. (2010) koji se bavi određivanjem antioksidativnih komponenti u vodenim ekstraktima cvata i lista te usporedbom biljaka iste vrste s lokaliteta Sveti Jure i Sniježnica.

Prema rezultatima dobivenim u ovom radu, udio ukupnih fenola, flavonoida te hidrokisicimernih kiselina ne razlikuje se značajno u listovima i cvatovima, dok je u stabljikama nešto niži. Ti su rezultati u skladu s objavljenim radom Zovko-Končić i sur. (2010) koji su također odredili sličnu razinu ukupnih fenola u vodenim ekstraktima cvatova i listova ove vrste s lokaliteta Sveti Jure. Razina proantocijanidina bila je značajno viša u cvatovima. Proantocijanidini, poznati još i pod nazivom kondenzirani tanini, sintetiziraju se u biljkama kao oligomeri ili polimeri flavan-3-ola u biosintetskom putu flavonoida (He i sur., 2008). Njihova uloga u biljkama najčešće je uključena u obranu od predatora, te u restrikciju rasta ostalih biljaka u okolini (He i sur., 2008). U literaturi je zabilježeno nakupljanje ovih spojeva u povišenoj koncentraciji u cvatovima u odnosu na ostale biljne organe (Luximon-Ramma i sur., 2002)

U radu Zovko-Končić i sur. (2010) opisana je preraspodjela fenolnih kiselina s obzirom na biljno tkivo u biljkama koje su rasle na lokalitetima Sniježnica i Sveti Jure. Za lokalitet Sniježnica u najvišoj koncentraciji izmjerene su fenolne kiseline u stabljici, a za lokalitet Sveti Jure u listu. U ovom radu na oba je lokaliteta značajno viši udio slobodnih fenolnih kiselina

izmjerena u cvatovima koji sadrže značajno više galne i kava kiseline u odnosu na listove i stabljike. Posebno je izmjerena visoka koncentracija kava kiseline u cvatu s lokaliteta Orebić ($158,92 \pm 7,35 \mu\text{g/g}$) te je ta vrijednost slična kao u vodenim infuzima vrste *M. petraea* (Zovko-Končić i sur., 2010) gdje su koncentracije kava kiseline iznosile $192,2 \pm 27,0 \mu\text{g/g}$ za lokalitet Sveti Jure, te $110,8 \pm 14,3$ za lokalitet Sniježnica. Za lokalitet Dinara u ovom radu izmjerena je nešto niža koncentracija kava kiseline u cvatovima ($94,78 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$). Ta je vrijednost usporediva s koncentracijom kava kiseline ($92,0 \mu\text{g/g}$) u nadzemnom dijelu plavog maka (*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.) (Kosina i sur., 2010) koji se u tradicionalnoj kineskoj medicini koristi za ublažavanje bolova i povišene tjelesne temperature. Kava kiselina pokazuje antioksidacijsku aktivnost u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Olthofi sur., 2001) te antiproliferacijsku aktivnost prema stanicama karcinoma (Prasad i sur., 2011). Unatrag nekoliko godina povećan je interes za kava kiselinu i ekstrakte bogate kava kiselinom zbog njihove sposobnosti inhibicije produkcije aflatoksina u *Aspergillus flavus* (Campbell i Kim, 2006).

U ovom radu je za južniji lokalitet Orebić izmjerena viša razina ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i ukupnih fenolnih kiselina, te su one u cvatu i listu pokazivale 15-25% više vrijednosti u odnosu na lokalitet Dinara. Hidroksicimetne kiseline u listovima i cvatovima nisu bile podložne utjecaju lokaliteta. Količina fenolnih kiselina izmjerenih UPLC-MS/MS metodom u biljkama s lokaliteta Orebić ($1007,21 \mu\text{g/g sm}$) bila je oko 23% viša nego u biljkama s lokaliteta Dinara ($770,34 \mu\text{g/g sm}$). Zovko-Končić i sur. (2010) u uzorcima s lokaliteta Sveti Jure na Biokovu izmjerili su 23% više fenolnih kiselina nego u uzorcima s lokaliteta Sniježnica i nad Konavla.

4.2.3. *Micromeria croatica*

Biljna vrsta *M. croatica*, kao i veliki broj biljaka koje rastu u mediteranskim i submediteranskim područjima poznate su po nakupljanju značajnih količina sekundarnih metabolita. Do sada su istraživanja sekundarnih metabolita te vrste najčešće bila usmjerena na sastav eteričnih ulja (Kremer i sur., 2012; Vuko, 2012). Ostale grupe sekundarnih metabolita do danas su u ovoj vrsti malo istražene. U radu Vladimir-Knežević i sur. (2011) uspoređen je udio ukupnih fenola, flavonoida i fenolnih kiselina mjerenih spektrofotometrijski u nadzemnom dijelu tri vrste roda *Micromeria* sa samo jednog

lokaliteta: *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia*. U tom radu, vrsta *M. croatica* je pokazala najviši udio ukupnih fenola i fenolnih kiselina. Naši rezultati pokazuju da razina fenolnih komponenti u vrsti *M. croatica* ovisi o lokalitetu te da je omjer izmjerenih polifenolnih grupa različit s obzirom na različite lokalitete. Kao i u vrsta *T. arduini* i *M. petraea*, kod vrste *M. croatica* razina polifenolnih komponenata značajno je niža u stabljikama u usporedbi sa cvatovima i listovima. Taj trend zabilježen je i za druge mediteranske biljne vrste (Maleš i sur., 2003; Maleš i sur., 2010b). Uzrok tomu je vjerojatno činjenica da polifenolne komponente sudjeluju u interakciji biljke s okolinom pa je njihovo nakupljanje u organima poput cvatova i listova puno vjerojatnije nego u stabljici. Cvatovi i listovi zbog svoje fiziološke uloge više reagiraju na promjenu vanjskih čimbenika te je kod njih izraženija varijacija u sastavu fenolnih spojeva uzrokovana okolišnim čimbenicima.

U listovima je jedino udio ukupnih fenola bio značajno viši na lokalitetu Bačić kuk, dok su ostali lokaliteti pokazivali slične vrijednosti polifenolnih grupa. Sastav eteričnih ulja vrste *M. croatica* s navedenih lokaliteta bile su i predmet istraživanja u doktorskoj disertaciji Vuko (2012) gdje je pokazano da je lokalitet rasta biljaka imao utjecaja na sastav eteričnih ulja. Najviša količina fenolnih kiselina određena je UPLC-MS/MS metodom kod lokaliteta Bojinac, dok su biljke s lokaliteta Bačić kuk sadržavale najnižu razinu fenolnih kiselina. Općenito, koncentracija svih određenih slobodnih fenolnih kiselina bila je ispod 30 µg/g sm te u usporedbi s ostalim biljkama istraženim u ovom radu, ali i prema literaturnim podacima za druge biljke iz porodice *Laminacea* (Zgorka i Glowniak, 2001; Ziakova i Brandšteterová, 2003; Kivilompolo i Hyotylainen, 2007) vrstu *M. croatica* se možemo smatrati vrstom s niskim udjelom fenolnih kiselina u slobodnoj formi. Najviša je koncentracija izmjerena za salicilnu kiselinu (28,82 µg/g) u stabljici biljaka s lokaliteta Bojinac.

4.2.4. *Rhamnus intermedia*

Biljke iz porodice *Rhamnus* koriste se u tradicionalnoj medicini jer je njihova kora bogata sekundarnim metabolitima antrakinonima koji su najčešće bili predmet istraživanja i kod vrste *R. intermedia* (Genovese i sur., 2012; Locatelli i sur., 2012; Kosalec i sur., 2013). U našem je radu spektrofotometrijski određen sastav polifenolnih komponenti u listu i kori vrste *R. intermedia* s dva lokaliteta: Dundović podi i Bojinac. Viša vrijednost ukupnih fenola izmjerena je u listu s lokaliteta Bojinac dok su najviše vrijednosti za ukupne flavonoide,

hidroksicimetne kiseline, flavanole te proantocijanidine izmjerene u listovima s lokaliteta Dundović podi. Na oba lokaliteta značajno je viši udio polifenolnih grupa izmjeren u listu u usporedbi s korom. Do sada su polifenolne komponente bile određivane samo u kori vrste *R. intermedia* u radu Kosalec i sur. (2013) gdje je uspoređena koncentracija ukupnih fenola i flavonoida u kori vrste *R. intermedia* s uzocima kore još triju vrsta roda *Rhamnus*: *R. alaternus* L., *R. fallax* Boiss i *R. pumila* Turra. Kora vrste *R. intermedia* pokazala je najniži udio ispitivanih polifenolnih grupa u tom radu. Često se vrsta *R. alaternus* ističe kao predstavnik roda *Rhamnus* s visokim sadržajem polifenolnih spojeva koji pridonose antimikrobnoj i citotoksičnoj aktivnosti njezinih ekstrakata (Ammar i sur., 2007; Ammar i sur., 2009; Bhour i sur., 2011). U radu Boussahel i sur. (2013), u listu vrste *R. alaternus*, koncentracija ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima iznosila je $33,65 \pm 2,50$ mg GAE/g ekstrakta, što s obzirom na iskorištenje ekstrakcije iznosi 232,38 mg GAE/g suhe mase i ta je vrijednost oko pet puta viša od izmjerene koncentracije ukupnih fenola u listovima vrste *R. intermedia* s lokaliteta Bojinac u ovom radu.

U biljkama vrste *R. intermedia* analiziranim na oba lokaliteta izmjeren je značajno viši udio slobodne protokatehinske, 4-hidroksibenzojeve, kava, 4-kumarinske i ferulinske kiseline u listu, dok je udio slobodne salicilne kiseline viši u kori. Sličan trend zabilježen je i kod perzijske vrbe (*Salix aegyptiaca* L.) gdje je u kori pronađeno 4,4 puta više salicilne kiseline u odnosu na listove (Enayat i Banerjee, 2009). Upravo je salicilna kiselina iz kore vrba (*Salix* spp.) jedan od najranije poznatih biljnih spojeva koji se koristio u terapijske svrhe. Kora vrbe korištena je za ublažavanje bolova i snižavanje tjelesne temperature još od 5 st. prije Krista, a 1820 g. salicilna kiselina je izolirana iz kore vrbe kao predominantna aktivna komponenta (Delaney, 2004). Danas se zna da je salicilna kiselina jedan od biljnih hormona koji ima važnu ulogu u klijanju sjemenki, zatvaranju puči, transportu iona, provodnosti membrana, regulaciji rasta i fotosinteze i posebno u obrani biljke od stresnih okolišnih uvjeta (El-Tayeb, 2005).

Kod vrste *R. intermedia* na nakupljanje slobodnih fenolnih kiselina značajno je utjecao lokalitet, posebice na sadržaj galne i protokatehinske kiseline u kori gdje su u uzorcima s lokaliteta Dundović podi izmjerene 7,3 odnosno 12,3 puta više vrijednosti u odnosu na lokalitet Bojinac. U listovima s lokaliteta Bojinac izmjerene su 17,3 puta više vrijednosti klorogenske te čak 20,9 puta više vrijednosti vanilinske kiseline. Navedene činjenice

pokazuju da razina spomenutih fenolnih kiselina značajno ovisi o okolišnim čimbenicima, zbog njihove uloge u odgovoru biljaka na vanjske utjecaje (Anttonen i Karjalainen, 2005).

4.2.5. Međusobna usporedba ispitanih biljnih vrsta s obzirom na sastav polifenolnih spojeva

Među ispitanim uzorcima najviši udio ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola izmjeren je u listovima vrste *T. arduini* s lokaliteta Učka. Razina ukupnih fenola izmjerenih u tom uzorku usporediva je s razinom ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima zelenog čaja, a koja iznosi između 50 i 60 mg GAE/g sm (Druzynska i sur., 2007; Turkmen i sur., 2007). U listu vrste *T. arduini* s Učke izmjerena je posebno visoka vrijednost flavonoida koja je bila gotovo 23 puta viša od vrijednosti izmjerene u kori vrste *R. intermedia* s lokaliteta Bojinac. U svim našim uzorcima zabilježena je značajna razina polifenolnih komponenti s obzirom na literaturne podatke objavljene za 45 kineskih biljnih vrsta korištenih u tradicionalnoj medicini (Li i sur., 2008). U navedenom radu autori su radili ekstrakciju u 80% metanolu (slično kao što je rađeno u ovom radu), te su rezultati izraženi po suhoj masi što nam omogućuje neposrednu usporedbu. U kineskim biljnim vrstama ukupni fenoli kretali su se u rasponu od 1,15 do 52,35 mg GAE/g am. List vrste *T. arduini* s lokaliteta Učka analiziran u ovom radu sadrži viši udio ukupnih fenola od svih biljaka obuhvaćenim kineskim istraživanjem. Li i sur. (2008) definiraju biljke s koncentracijom ukupnih fenola višom od 28 mg GAE/g sm biljkama s visokim udjelom polifenola. Prema toj definiciji, sve četiri vrste analizirane u ovom radu pripadaju biljkama s visokim udjelom polifenola pri čemu se ističu listovi vrsta *T. arduini* i *R. intermedia* te list vrste *M. croatica* s lokaliteta Bačić Kuk. U drugom pak radu, također na kineskim biljkama koje se koriste u tradicionalnoj medicini za liječenje kardiovaskularnih bolesti, udio ukupnih fenola određen je u 112 biljaka (Cai i sur., 2004) ekstrahiranih u 80% metanolu. U većini tih biljaka (70,5 %), izmjerena koncentracija ukupnih fenola kretala se u rasponu od 5,10-50,0 mg GAE/g sm. Pritom 19 kineskih vrsta pokazuje sadržaj polifenola viši od 50 mg GAE/g sm. Prema sadržaju polifenolnih spojeva ovdje ispitane endemične vrste usporedive su s tim kineskim medicinski interesantnim biljnim vrstama. Čak i cvatovi vrste *T. arduini* s lokaliteta Šušanj i Vaganac koji imaju najniže vrijednosti ukupnih fenola među ovdje ispitivanim biljnim vrstama imaju više vrijednosti od 22, odnosno 49% vrsta koje navode u radu Li. i sur. (2008), te od 36 odnosno 32% biljnih vrsta istraženih u radu Cai i sur. (2004).

Zanimljivo je da je vrsta *R. intermedia*, u usporedbi s ostalim biljkama ispitanim u ovom radu, vrlo bogata proantocijanidinima čija je vrijednost i u listu i u kori visoka, a posebno kod uzoraka lista s lokaliteta Dundović podi. U tom je uzorku izmjerena i vrlo visoka koncentracija protokatehinske kiseline. Biljke *R. intermedia* s oba lokaliteta sadržavale su protokatehinsku kiselinu u koncentracijama višim od 150 µg/g sm. Protokatehinska kiselina je također jedna od važnijih bioaktivnih komponenata u poznatim ljekovitim biljkama kao što su sljez (Tseng i sur., 1998), ginko (Ali i sur., 2005) i gospina trava (Jurgenliemk i Nahrstedt, 2002). Uz protokatehinsku, još je samo kava kiselina u vrsti *M. petraea* određena u koncentraciji višoj od 100 µg/g sm. U toj je biljci i određena najviša ukupna koncentracija fenolnih kiselina i to gotovo 7,5 puta viša nego u vrsti *M. croatica* koja se među ovdje ispitanim biljnim vrstama pokazala kao najlošiji izvor fenolnih kiselina.

4.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Kao jedno od najznačajnijih bioloških djelovanja polifenola ističe se njihova antioksidacijska aktivnost s kojom se povezuje i pozitivno djelovanje polifenola na zdravlje (Noorhajati i sur., 2012). Iako su mnogobrojna istraživanja u području antioksidansa i njihovog djelovanja *in vitro* razvijene su i mnoge metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti, a u istraživanjima se obično koristi paralelno tri ili više metoda (Frankel i Finley, 2008). U našem radu antioksidacijska aktivnost ispitivana je korištenjem tri spektrofotometrijske metode (FRAP, DPPH, ABTS) te elektrokemijskom metodom cikličke voltametrije.

4.3.1. FRAP metoda

FRAP metoda jedna je od najčešće korištenih metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata (Katalinic i sur., 2006; Surveswaran i sur., 2007; Wojdyło i sur., 2007; Li i sur., 2008). Rezultati antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom mogu se izraziti po ekvivalentima Trolox-a ili po mikromolima Fe^{2+} , te se dobivene vrijednosti često u literaturi nazivaju i redukcijskim kapacitetom/potencijalom. Kod većine se autora izražavaju po mikromolima Fe^{2+} te smo takav način izražavanja koristili i u ovom radu što nam omogućuje lakšu usporedbu dobivenih rezultata s podacima drugih autora.

U našem radu najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti pokazuju uzorci lista vrste *T. arduini* s lokaliteta Šušanj, Učka i Vaganac kod kojih su vrijednosti iznad $700 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g sm}$. Vrijednosti izmjerene u tim uzorcima značajno su više od vrijednosti izmjerenih u vodenim infuzima lista vrste *T. arduini* s navedena tri lokaliteta u prethodnoj studiji (Šamec i sur., 2010). U radu Li i sur. (2008) antioksidacijska aktivnost izmjerena je FRAP metodom u metanolnim ekstraktima 45 različitih biljaka te se kretala od $1,23$ do $453,53 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g sm}$, a najvišu vrijednost bila je u vrste *Sargentodoxa cuneata* Rehd. Et Wils. Usporedivu vrijednost antioksidacijske aktivnosti mjerenu FRAP metodom dobili su i Wong i sur. (2006a) kod vrste *Rhodiola sacra* Fu ($480 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g sm}$). Osim navedena tri uzorka s aktivnošću većom od $700 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g sm}$, više vrijednosti od $450 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g sm}$ u našem su radu pokazali i uzorci stabljike vrste *T. arduini* s lokaliteta Šušanj, Učka i Vaganac, list vrste *M. petraea* s lokaliteta Orebić i Dinara, cvat s lokaliteta Orebić, te list vrste *R. intermedia* s

lokaliteta Dundović podi. Za sve navedene uzorke možemo smatrati da imaju izrazito visoku antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s kineskim biljnim vrstama (Wong i sur., 2006a; Li i sur., 2008).

Vrsta *M. croatica* pokazala je najnižu antioksidacijsku aktivnost mjerenju FRAP metodom (vrijednosti niže od 300 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g sm}$) što je u skladu sa znatno nižim koncentracijama polifenolnih spojeva izmjerenih u ovoj vrsti. Kod ostalih biljaka aktivnost značajno ovisi o lokalitetu, što je također posljedica različitog nakupljanja sekundarnih metabolita u biljkama s različitih lokaliteta.

4.3.2. DPPH metoda

DPPH metoda također je veoma često korištena metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti, prvenstveno zbog jednostavnosti izvođenja i visokog stupnja reproducibilnosti. Antioksidacijska aktivnost u našem radu izražena je po mikromolima (μmol) Trolox ekvivalenta po gramu suhe mase te se kretala u rasponu od 50,75 $\mu\text{mol TE/g sm}$ (cvat vrste *T. arduini* s lokaliteta Vaganac) do 483,92 $\mu\text{mol TE/g sm}$ (list vrste *T. arduini* s lokaliteta Učka). Izrazito su visoke vrijednosti, u usporedbi s ostalim uzorcima, izmjerene u listovima vrste *T. arduini* i u svih su listova svih bile iznad 250 $\mu\text{mol TE/g sm}$. Većina izmjerenih uzoraka imala je antioksidacijsku aktivnost mjerenu DPPH metodom ispod 200 $\mu\text{mol TE/g sm}$, osim lista i cvata vrste *M. croatica* s lokaliteta Bačić kuk i lista vrste *R. intermedia* s lokaliteta Dundović podi čije su vrijednosti bile od 200 do 250 $\mu\text{mol TE/g sm}$. U radu Surveswaran i sur. (2007) antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom u 137 indijskih ljekovitih biljaka kretala se od 0,00 do 679,69 $\text{mmol Trolox ekvivalenta po } 100\text{ g suhe mase}$. Srednja vrijednost svih ispitanih indijskih biljaka bila je 28,05 $\text{mmol TE}/100\text{g sm}$ što odgovara 280,5 $\mu\text{mol TE/g sm}$ te je ta vrijednost nešto viša od srednje vrijednosti za sve ispitivane uzorke u ovom radu (177,06 $\mu\text{mol TE/g}$).

U mjerenjima FRAP metodom, listovi i cvatovi vrste *M. petraea* pokazivali su značajno više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti od listova i cvatova vrste *M. croatica*, dok je rezultat mjerenja DPPH metodom bio drugačiji te su listovi vrste *M. croatica* pokazali više vrijednosti dok su vrijednosti za cvatove bile približno jednake. Različiti trend u rezultatima antioksidacijske aktivnosti mjerenima FRAP i DPPH metodama također je zabilježen u radu Surveswaran i sur. (2007). DPPH metodom mjeri se gubitak obojenja na 515 nm te neki

spojevi kao što su karotenoidi i antocijani koji imaju sličan spektar mogu interferirati u dobivanju točnih podataka (Prior. i sur., 2005). Za razliku od DPPH metode, FRAP metoda mjeri intenzitet nastalog obojenja te je teško odrediti točan kraj reakcije, jer različiti uzorci mogu sadržavati razne komponente koje mogu narušiti kinetiku reakcije (Ou i sur., 2002; Prior i sur, 2005).

4.3.3. ABTS metoda

ABTS metoda, jednako kao i FRAP i DPPH metode, mjeri promjenu boje te je prema nekim autorima (Arnao, 2000; Cai i sur., 2004; Lee i sur., 2003; Shan i sur., 2005) najpogodnija metoda za spektrofotometrijsko mjerenje antioksidacijske aktivnosti zbog brzine izvođenja, mogućnosti obrade velikog broja uzoraka u kratkom vremenu, visokog stupnja reproducibilnosti te manjeg broja komponenata koje interferiraju tijekom mjerenja (Surveswaran i sur., 2007). Kod ABTS metode rezultati su najčešće izraženi u ekvivalentima Troloxa, skraćeno, kao TEAC (engl. *Total Equivalent Antioxidant Capacity*) vrijednost te se metoda često naziva i TEAC metoda. TEAC vrijednost podrazumijeva izražavanje rezultata u mmol Troloxa /100 g. U našem su radu podaci izraženi u $\mu\text{mol TE/g sm}$ zbog lakše usporedbe s DPPH metodom i metodom cikličke voltametrije.

Najviša antioksidacijska aktivnost ABTS metodom izmjerena je u ekstraktu listova vrste *T. arduini* s lokaliteta Vošac, Šušanj, Učka i Vaganac što je u skladu s rezultatima dobivenim FRAP i DPPH metodama. Zanimljivo je da su prema ovoj metodi i listovi vrste *M. croatica* (posebno lokalitet Bačić kuk) pokazivali veoma visoke vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Navedena četiri uzorka pokazuju više vrijednosti od 45 ispitanih kineskih biljaka koje navode u radu Li i sur. (2008) gdje su se vrijednosti antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom u 80% metanolu kretale u rasponu od 0,97 do 265,43 mmol Trolox/g. U našim se uzorcima antioksidacijska aktivnost kretala između 45,19 i 402,78 $\mu\text{molTE/g sm}$. Literaturni podaci određivanja antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom u metanolnim ekstraktima (80 %) pokazuju različite trendove. U radu Surveswaran i sur. (2007) određena je antioksidacijska aktivnost ABTS metodom u 137 indijskih biljaka te se raspon kretao od 0,61 do 500,70 mmol TE/100 g sm. 50% biljaka ispitanih u navedenom radu ima vrijednosti antioksidacijske aktivnosti između 50,1 i 1000 $\mu\text{molTE/g}$ te većina naših uzoraka (osim cvatova vrste *T. arduini* s lokaliteta Šušanj) upadaju u istu skupinu vrijednosti.

4.3.4. Ciklička voltametrija

Kod cikličke voltametrije mjerenje se najčešće obavlja u acetatnom puferu različitih pH vrijednosti (Yakovleva i sur., 2007; Piljac-Žegarac i sur., 2009; Piljac-Žegarac i sur., 2010), no mjerenja se mogu provoditi i u metanolu (Cosio i sur., 2006; Barros i sur., 2011) uz dodatak perklorata za povećanje vodljivosti, kao što je bio slučaj u ovom radu.

Rezultati mjerenja u ovom radu upućuju da izgled cikličkog voltamograma i antioksidacijska aktivnost biljnih ekstrakata značajno ovise o analiziranoj biljnoj vrsti i biljnom organu. Svi ispitivani uzorci ne pokazuju jednak broj strujnih vrhova što proizlazi iz različitog sastava antioksidativnih komponenata. Kod naših su uzoraka primijećena do tri anodna strujna vrha u rasponu od 192 do 845 mV, slično kao i za čiste polifenolne komponente ispitivane u radu Yakovleva i sur. (2007) gdje su svi ispitivani polifenoli pokazivali oksidacijski strujni vrh između 235-843 mV kod fiziološkog pH. U navedenom su radu polifenolne komponente s obzirom na brzinu oksidacije i potencijal anodnih strujnih vrhova podijeljene u tri grupe:

- flavonoidi i fenolne kiseline s dvije hidroksi grupe na orto poziciji jedna nasuprot druge imaju anodni strujni vrh na potencijalima ispod 400 mV,
- polifenoli s metoksi grupama pokazuju anodni strujni vrh na potencijalima između 400-600 mV
- jednostavni fenoli ili monohidroksifenolne kiseline koje oksidiraju sporije pokazuju anodne strujne vrhove na potencijalima iznad 600 mV.

Kada uspoređujemo vlastite rezultate s literaturnim podacima valja naglastiti da povećanje pH vrijednosti za jednu jedinicu pomiče strujni vrh oksidacije oko 35 mV u negativnom smjeru, odnosno smanjenje pH za jednu jedinicu pomiče strujni vrh oksidacije za oko 35 mV u pozitivnom smjeru (Piljac-Žegarac i sur., 2010). U našem radu svi uzorci pokazuju strujne vrhove na potencijalima između 400 i 800 mV. Za sve uzorke vrsta *T. arduini* i *M. petraea* primijećeni su strujni vrhovi na oko 500 i 750 mV. Iznad 800 mV strujni vrhovi su primijećeni u uzorcima lista i kore vrste *R. intermedia* s lokaliteta Bojinac što može, s obzirom na literaturne podatke, upućivati na prisutnost hidroksibenzojevih kiselina koje imaju visoki potencijal oksidacije (Yakovleva i sur., 2007; Simić i sur., 2007). Ova se pretpostavka slaže s rezultatima određivanja slobodnih fenolnih kiselina UPLC-MS/MS metodom kojom je u biljnoj vrsti *R. intermedia* određena visoka koncentracija hidroksibenzojevih kiselina kao što

su protokatehinska, 4-hidroksibenzojeva, vanilinska te siringična kiselina. Nadalje, strujni vrh na višim potencijalima može upućivati na prisutnost salicilne kiseline koja također oksidira pri višim potencijalima (Simić i sur., 2007). List i stabljika s lokaliteta Bačić kuk te svi biljni organi vrste *M. croatica* s lokaliteta Bojinac, cvat i stabljika vrste *M. petraea* s lokaliteta Dinara te list vrste *R. intermedia* s lokaliteta Bojinac pokazuju prvi strujni vrh na potencijalima nižim od 400 mV što ukazuje na prisutnost spojeva s niskim formalnim potencijalom. Anodni strujni vrh na tim potencijalima bez pripadajućeg katodnog pika primijećen je i u biljci *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. u 80% metanolu i povezan je s visokim udjelom flavonoida, tokoferola i vitamina C u toj biljci (Barros i sur., 2011). U radu Zhang i sur. (2011) istraživanja na čistim flavonoidima pokazuju da flavonoidi imaju dva ili tri karakteristična anodna strujna vala koji ovise o broju hidroksilnih grupa koje se oksidiraju. Flavanoli su u istom radu pokazali niže anodne potencijale prvog strujnog vrha od ostalih flavonoida te su svi ispitani flavonoidi pokazali prvi anodni strujni vrh na potencijalima ispod 600 mV. Svi naši uzorci pokazuju strujni vrh na potencijalima ispod 600 mV što ukazuje na prisutnost flavonoida. Ovakav oblik voltamograma je u skladu i sa spektrofotometrijskim mjerenjima gdje je biljna vrsta *R. intermedia* pokazala visoki sadržaj flavonoida, posebice flavonola. Ovisno o sastavu analiziranih ekstrakata reakcije na elektrodi mogu biti ireverzibilne (Barros i sur., 2011), što je slučaj i kod nekih uzoraka ispitanih u ovom radu. Na reverzibilnost/ireverzibilnost reakcije može utjecati i otapalo u kojem je mjerenje obavljeno pa su tako Roy i sur. (2011) u vodenim ekstraktima kore indijske biljke *Dalbergia sissoo* Roxb. primijetili reverzibilnu reakciju, dok je u metanolnim ekstraktima reakcija bila ireverzibilna.

Antioksidacijska aktivnost se cikličkom voltametrijom određuje na način da se integrira površina ispod anodnog strujnog vrha u krivulji I vs. E te uspoređuje s površinom za odabrani standard. U ovom radu je upotrijebljen Trolox kao standard te su rezultati izraženi u ekvivalentima Trolox-a po gramu suhe mase. Mjerenjem antioksidacijske aktivnosti ovom metodom listovi vrste *T. arduini* pokazali su visoke vrijednosti, no visoka antioksidacijska aktivnost u usporedbi s drugim uzorcima određena je i u listu i cvatu vrste *M. croatica* s lokaliteta Bačić kuk te cvatu s lokaliteta Bojinac. Navedeni uzorci vrste *M. croatica* pokazuju strujne vrhove na nižim potencijalima što je u skladu s očekivanjima da će uzorci koji sadrže komponente s nižim oksidacijskim potencijalom imati višu antioksidacijsku aktivnost (Barros i sur., 2011).

4.3.5. Antioksidacijski indeks

Antioksidacijski indeks (AOI) uzima u obzir rezultate mjerenja antioksidacijske aktivnosti za sve četiri metode te nam na taj način omogućuje lakšu usporedbu dobivenih podataka. U izračunu antioksidacijskog indeksa, rezultati svih metoda imaju jednaku težinu. Prema literaturnim podacima ovaj je parametar do sada korišten za usporedbu antioksidacijske aktivnosti mjerene različitim metodama u napicima, čajevima i sl. (Seeram i sur., 2008; Piljac-Žegarac i sur., 2010; Šamec i sur., 2010).

Među ispitanim uzorcima u ovom radu najviši je antioksidacijski indeks pokazao list vrste *T. arduini* s lokaliteta Učka (95) koji je imao najvišu aktivnost mjerenu FRAP i DPPH metodom, a slijedi ga list vrste *T. arduini* s lokaliteta Vaganac (antioksidacijski indeks 92) koji je pokazao najvišu aktivnost mjerenu ABTS metodom. Ovi su rezultati u skladu s našom prethodnom studijom (Šamec i sur., 2010) na vodenim ekstraktima vrste *T. arduini* gdje je uzorak lista s lokaliteta Učka pokazao najviši antioksidacijski indeks. Među uzorcima vrste *M. petrae* najviši je AOI pokazao list s lokaliteta Orebić (45) iako je i list lokaliteta Dinara imao veoma sličnu vrijednost (43). Kod vrste *M. croatica* najviši AOI ima list s lokaliteta Bačić kuk (64), a kod vrste *R. intermedia* list s lokaliteta Dundović podi (52).

Antioksidacijski indeks nam omogućuje i međusobno uspoređivanje biljaka istraženih u ovom radu bez posebnog naglaska na jednu metodu. Najjaču antioksidacijsku aktivnost pokazuju uzorci lista vrste *T. arduini* koji svi pokazuju AOI viši od 60. Od ostalih uzoraka jedino još list vrste *M. croatica* s lokaliteta Bačić kuk ima AOI viši od 60. Tri uzorka koja pokazuju najniži AOI su cvatovi vrste *T. arduini* s lokaliteta Šušanj i Vaganac te kora vrste *R. intermedia* s lokaliteta Bojinac. Ostali uzorci pokazuju umjerenu antioksidacijsku aktivnost s vrijednostima AOI u rasponu od 20 do 60.

4.4. KEMOMETRIJSKE ANALIZE

4.4.1. Korelacije

Korelacija je statistički postupak za izračunavanje povezanosti dviju varijabli. Vrijednost korelacije brojčano se iskazuje koeficijentom korelacije, najčešće Pearsonovim ili Spearmanovim, dok se značajnost koeficijenta iskazuje vrijednošću P. Koeficijent korelacije pokazuje u kojoj su mjeri promjene vrijednosti jedne varijable povezane s promjenama vrijednosti druge varijable. Predznak koeficijenta korelacije (+ ili –) govori nam o smjeru povezanosti (Udovičić i sur., 2007). Često autori u radovima govore samo o korelaciji i koeficijentu, te je teško razlučiti o kojem se koeficijentu radi.

Kako bi se odredio odnos (korelacija) između pojedinih rezultirajućih varijabli u ovom radu, izračunati je Pearsonov koeficijent, značajnost koeficijenta te koeficijent determinacije (jačina povezanosti). Većina uzoraka pokazala je značajnu korelaciju s Pearsonovim koeficijentom višim od 0,503. Ukupni proantocijanidini i fenolne kiseline ne pokazuju značajnu korelaciju s antioksidativnim metodama ni sa spektrofotometrijski određenim metabolitima što upućuje na činjenicu da ovi spojevi manje utječu na sveukupnu antioksidacijsku aktivnost uzoraka. Spektrofotometrijski određeni ukupni fenoli, flavonoidi, flavanoli te hidroksicimetne kiseline pokazuju najvišu korelaciju s antioksidacijskim vrijednostima određenim DPPH metodom dok je korelacija s rezultatima FRAP i ABTS metoda niža. Iako DPPH i ABTS metode imaju sličan mehanizam djelovanja (gašenje slobodnih radikala) one pokazuju različiti trend. Tako na primjer kod vrste *T. arduini* imamo više apsolutne vrijednosti u Trolox ekvivalentima izmjerene DPPH metodom dok ostale tri biljke pokazuju više vrijednosti izmjerene ABTS metodom. Svaka od polifenolnih komponenata ima drugačiju kinetiku reakcije te je ponekad veoma teško odrediti krajnju točku reakcije kolorimetrijskih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti (Ozgen i sur., 2006). Kada se radi o biljnim ekstraktima nekada bi trebalo reakciju produžiti i na nekoliko sati no kako ne znamo točan sastav naših ekstrakata veoma je teško predvidjeti kinetiku reakcije. Također, moguća je interferencija nekih komponenata prisutnih u ekstraktu zbog čega se dobiveni rezultati mogu razlikovati. Naši rezultati još jednom potvrđuju već ustanovljenu činjenicu (Awika i sur., 2003; Ozgen i sur., 2006; Thaipong i sur.,

2006) da je za točno određivanje antioksidacijske aktivnosti nekog biljnog ekstrakta potrebno primijeniti najmanje dvije metode paralelno.

Rezultati u ovom radu pokazuju niže korelacije između sadržaja polifenola određenih spektrofotometrijskom metodom i antioksidacijske aktivnosti određene ABTS i FRAP metodama što je suprotno od rezultata Ozgen i sur., (2006), Thaipong i sur. (2006) te Piljac-Žegarac i sur. (2010) koji su utvrdili veoma visoke korelacije između istih metoda. U radu Piljac-Žegarac i sur. (2009) korelacija između rezultata DPPH metode i cikličke voltometrije iznosi 0,62 što odgovara našoj vrijednosti za Pearsonov koeficijent izračunat za DPPH i cikličku voltometriju. Također, u našem radu ciklička voltometrija ne pokazuje značajnu korelaciju s FRAP metodom dok je ona sa DPPH i ABTS metodom nešto viša. Kod mjerenja antioksidacijske aktivnosti cikličkom voltametrijom za integriranje površine ispod krivulje mogu se koristiti različiti potencijali kao konačna točka. U radu Zhang i sur. (2011) ispitana je korelacija između antioksidacijske aktivnosti cikličkom voltametrijom i one dobivene mjerenjem ukupnih fenola FRAP, DPPH i ABTS metodama u ovisnosti o potencijalu koji se koristi za izračunavanje površine ispod krivulje Q. Kada je za izračunavanje antioksidacijske aktivnosti korištena površina ispod voltamograma do potencijala 500 mV (Q_{500}) za sve je metode korelacija rasla s porastom potencijala. Kada su korišteni potencijali iznad 500 mV korelacija je počela padati za DPPH i FRAP metodu dok je za ABTS metodu ostala ista. Ti su rezultati u skladu s podacima dobivenim u ovom radu gdje je za izračunavanje antioksidacijske aktivnosti cikličkom voltametrijom korištena vrijednost Q_{900} (potencijal od 900 mV) te dobivena viša korelacija između CV i ABTS metode nego između CV i DPPH i FRAP metode. Prema tim podacima ukupna antioksidacijska aktivnost ukoliko se mjeri ovdje spomenutim metodama nije uvjetovana brojem hidroksilnih grupa u nekom spoju već njihovim položajem unutar molekule te su najčešće odraz redukcijskog potencijala samo grupe s najnižim potencijalom (Zhang i sur. 2011).

Kada gledamo korelacije s obzirom na svaku biljku posebno situacija je nešto drugačija te ovisi o biljnoj vrsti. Kod vrste *T. arduini* četiri metode korištene za mjerenje antioksidacijske aktivnosti nisu pokazivale međusobno značajne korelacije, a jedino je FRAP metoda pokazala značajne korelacije sa spektrofotometrijski mjerenim sekundarnim metabolitima (osim proantocijanidina). Također, kod vrste *R. intermedia* nisu nađene značajne korelacije između antioksidacijskih metoda osim između DPPH i FRAP metode.

Navedeni rezultati svakako još jednom potvrđuju da je za mjerenje antioksidacijske aktivnosti potrebno koristiti više metoda paralelno kako bi se dobili točniji i potpuniji rezultati jer često njihovi rezultati imaju drugačiji trend, a to je vidljivo iz nedostatka značajne korelacije između rezultata dobivenih različitim metodama.

4.4.2. Hijerarhijska klaster analiza

Više varijabli koje su međusobno povezane možemo istovremeno analizirati multivarijantnim ili multidimenzionalnim analitičkim postupcima. U fitokemijskim se istraživanjima često koriste ovakve analize kako bi se kvalificirali uzorci ali i odredio odnos varijabli npr. antioksidacijskih aktivnosti ispitivanih biljnih ekstrakata (Wong i sur., 2006b; Hossain i sur., 2011; Patras i sur., 2011). Također, koriste se i u istraživanju različitih fizioloških procesa u biljkama (Souza i sur., 2003; Ramel i sur., 2009; Salopek-Sondi i sur., 2013) te u kemotaksonomiji (Kremer i sur., 2011).

Dendrogram dobiven klaster analizom prikazan je na Slici 30. Vrste *M. croatica*, *R. intermedia* te *M. petraea* grupirane su u zajedničke podgrupe što ukazuje da je sastav njihovih fitokemikalija karakterističan za pojedinu vrstu te da se razlikuje u ovisnosti o pojedinom dijelu biljke. Jedino se svi analizirani uzorci vrste *T. arduini* nisu grupirali zajedno. Zajedno su grupirani svi listovi i cvatovi s lokaliteta Vošac, Sveti Jure i Sušanj u gornjem dijelu slike. Sve stabljike su u sredini slike grupirane zajedno, dok su cvatovi s lokaliteta Vaganac, Šušanj i Učka pri dnu slike zbog niskog udjela polifenolnih spojeva te niske antioksidacijske aktivnosti. Prema ovdje predstavljenim rezultatima istraživani sadržaj polifenolnih spojeva te njihova antioksidacijska aktivnost mogu poslužiti u kemotaksonomske svrhe, odnosno svrstavanje pojedinih biljnih vrsta u grupe s obzirom na sastav polifenolnih komponenata. Razina polifenola karakteristična je za pojedinu vrstu.

Kako bismo odredili relaciju između genetske sličnosti dobivene RAPD analizama i sličnosti dobivene analizom sekundarnih metabolita, za svaki je lokalitet izračunata ukupna količina sekundarnih metabolita u cijeloj biljci (zbroj pojedinih dijelova). Prema genetskoj sličnosti i Diceo-vom koeficijentu generiraju se dvije glavne grupe: u prvoj su biljke s lokaliteta Učka, Sveti Jure i Vošac s izdvojenim Vošcem, a u drugoj su Sniježnica, Vaganac i Šušanj (Slika 21). Kod dendrograma izrađenog na temelju podataka za polifenolne metabolite i antioksidacijsku aktivnost u jednoj su grupi Vošac, Sniježnica i Sveti Jure gdje je

Sveti Jure izdvojen, a u drugoj Učka, Sušanj i Vaganac (Slika 31). Na temelju analiza sekundarnih metabolita uzorci su grupirani na temelju geografske širine rasta što upućuje na činjenicu da na sintezu polifenolnih komponenata značajnije utječe lokalitet rasta, odnosno vanjski faktori nego genetski faktori. U prijašnjim radovima koji obuhvaćaju genetske studije drugih vrsta iz roda *Teucrium* i sintezu eteričnih ulja utvrđeno je da njihova razina i sastav eteričnih ulja više ovisi o genetskim faktorima nego o okolišnim čimbenicima (Djabou i sur., 2011; Djabou i sur., 2012a; Djabou i sur., 2012b).

4.4.3. Analiza glavnih komponenata (PCA analiza)

PCA (engl. *Principal component analysis*) je multivarijantna statistička metoda koja omogućuje vizualizaciju korelacije između analiziranih podataka, u ovom slučaju različitih dijelova vrsta *T. arduini*, *M. petraea*, *M. croatica* i *R. intermedia* s različitih lokaliteta i spektrofotometrijski određenih grupa polifenola (ukupni fenoli, flavonoidi, proantocijanidini, ukupne hidroksicimetne kiseline te ukupni flavanoli), fenolnih kiselina određenih UPLC-MS/MS metodom (ukupne kao zbroj svih identificiranih) te antioksidacijskih aktivnosti određenih uz pomoć četiri metode (DPPH, ABTS, FRAP i cikličkom voltametrijom). Izračunat je Pearsonov koeficijent koji je prikazan u Tablicama 22 a-d te su na osnovu njega prikazane slike 32 a-d za svaku pojedinu ispitivanu biljnu vrstu.

Ovisno o korelaciji između ispitivanih varijabli one su smještene bliže ili udaljenije unutar orijentacijskog dijagrama. S obzirom na njih razmješteni su i ispitivani uzorci. Pa tako na Slici 32a za biljnu vrstu *T. arduini* imamo sve uzorke listova na desnoj strani zbog visokih vrijednosti polifenolnih grupa i antioksidacijske aktivnosti. Također, primijećeno je da su analizirani uzorci listova s lokaliteta Učka, Vaganac i Sušanj smješteni bliže nego uzorci listova s lokaliteta Vošac, Sveti Jure i Sniježnica što odgovara već prije spomenutom trendu da sjeverniji lokaliteti pokazuju više vrijednosti polifenola i antioksidacijsku aktivnost. Kod vrsta *M. croatica* i *M. petraea* imamo jasno odijeljene uzorke stabljika na lijevoj strani dok su cvatovi i listovi na desnoj strani. Kod vrste *R. intermedia* sliku možemo analizirati s obzirom na dio biljke gdje na desnoj strani imamo listove, a na lijevoj kore. Također, ovdje se uzorci s lokaliteta Dundović podi nalaze u gornjem dijelu slike, dok su oni s lokaliteta Bojinac u daljnjem dijelu.

4.5. DJELOVANJE EKSTRAKATA NA RAZINI MAKROMOLEKULA

Antioksidacijske aktivnosti polifenolnih spojeva određene *in vitro* testovima (poput DPPH, FRAP, ABTS ili ORAC) mogu upućivati, iako nisu garancija, na njihovo pozitivno djelovanje na razini makromolekula ili stanica. Stoga je slijedeći korak u ispitivanjima djelovanja biljnih ekstrakata ili izoliranih spojeva istraživanje na razini makromolekula (DNA, proteina i lipida).

4.5.1. Zaštitna uloga ekstrakata na molekulu DNA

Do oksidacije DNA molekula može doći uslijed djelovanja reaktivnih kisikovih spojeva ili uslijed djelovanja ksenobiotika. Stanice posjeduju efikasne mehanizme popravka DNA, no oštećenja nastala oksidacijom ostaju tijekom replikacije te u konačnici mogu izazvati mutacije (Choi i sur., 2002). Jedan od često korištenih biotestova u literaturi je uporaba plazmida ϕ X174 RF1 DNA (Keum i sur., 2000). Test se zasniva na činjenici da je plazmid nakon elektroforetske analize u agaroznom gelu vidljiv u dvije forme: brže migrirajuća vrpca odgovara višestrukozavijenoj formi ukoliko nije došlo do oštećenja, dok sporije migrirajuća vrpca odgovara otvorenoj formi plazmida koja se javlja kao posljedica oštećenja. Uz sinergističko djelovanje H_2O_2 i UV zračenja dolazi do oštećenja DNA i do otvaranja plazmida što se na gelu agaroze detektira kao sporije migrirajuća otvorena forma plazmida. U prisutnosti svih naših ekstrakata u koncentracijama 1-1000 μ g/mL, DNA zadržava nativnu formu zbog sposobnosti ekstrakata da zaštite molekulu DNA od oštećenja. Zaštitno djelovanje ekstrakta od oštećenja izazvanog djelovanjem ultraljubičastog zračenja povezuje se s prisutstvom polifenolnih komponenata, posebice flavonoida koji i u biljci imaju poznatu ulogu u zaštiti od ultraljubičastog zračenja (Jaganath i Crozier, 2010). Ovo su prvi rezultati vezani uz ispitivanje sposobnosti ekstrakata vrsta *T. arduini*, *M. petraea*, *M. croatica* i *R. intermedia* da štite molekulu DNA od oštećenja. U literaturi tom je metodom pokazana zaštitna uloga ekstrakata različitih ljekovitih biljaka od oksidacije DNA (Keum i sur., 2000; Choi i sur., 2002; Kumar i sur., 2011).

4.5.2. Zaštitna uloga biljnih ekstrakata od oksidacije proteina

Bočni proteinski lanci, posebice oni koji sadrže triptofan, histidin i cistein posebno su osjetljivi na fragmentaciju izazvanu djelovanjem slobodnih radikala koja može izazvati inaktivaciju enzima i receptora što rezultira neprovratnim oštećenjem stanice (Stadtman, 2001; Levine i Stadtman, 2001). Prisutnost karbonilnih grupa predstavlja prvi stupanj u oksidaciji proteina te se metoda mjerenja nastalih karbonila često koristi za ispitivanje oštećenja proteina izazvanih oksidacijom. Različite redoks reakcije izazivaju nastajanje karbonilnih grupa, a broj karbonilnih grupa značajno povećava oksidacija izazvana metalima kao što su Fe^{2+} i Cu^{2+} (Mayo i sur., 2003).

Zaštitno djelovanje od oksidacije proteina mjereno je na dva načina, spektrofotometrijskim mjerenjem količine nastalih karbonila te elektroforezom u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE). Za spektrofotometrijsko mjerenje oksidacija je izazvana grijanjem proteina BSA uz prisutnost Fe^{3+} , askorbinske kiseline te vodikova peroksida. U svim je uzorcima došlo do oksidacije proteina što je vidljivo iz porasta apsorbancije za slijepu probu u odnosu na kontrolu. Značajnu zaštitnu ulogu od oksidacije pokazao je standard BHT no ta zaštita nije bila ovisna o koncentraciji. BHT inhibira oksidaciju u odnosu na kontrolu za oko 40 % što je u skladu s rezultatima autora Emen i sur. (2009). Ekstrakt vrste *M. petraea* nije pokazao nikakav efekt na oksidaciju proteina, dok je ekstrakt vrste *M. croatica* pri koncentracijama 10 i 25 $\mu\text{g/mL}$ imao antioksidativno djelovanje usporedivo s djelovanjem BHT-a, a kod koncentracija viših od 50 $\mu\text{g/mL}$ prooksidativno djelovanje. Također, kod vrsta *T. arduini* i *R. intermedia* pokazano je značajno prooksidativno djelovanje koje se linearno povećavalo s koncentracijom. Ta su dva ekstrakta pokazala i najvišu antioksidacijsku aktivnost te se naši rezultati slažu s rezultatima Dorman i Hiltunen (2011) koji su također objavili da biljni ekstrakti koji imaju jaku antioksidacijsku aktivnost u *in vitro* testovima i zaštitnu ulogu npr. od lipidne peroksidacije, pokazuju prooksidativno djelovanje na proteine. U spomenutom su istraživanju prooksidativno djelovanje pokazale galna kiselina i piknogenol od čistih komponenata te ekstrakti borovice (*Juniperus communis* L.), bosiljka (*Ocimum basilicum* L.), kima (*Carum carvi* L.) i lovora (*Laurus nobilis* L.). Činjenica da neki polifenoli, iako štite lipide od oksidacije mogu imati prooksidativno djelovanje na proteine već je poznata u literaturi (Laughton i sur., 1989; Aruoma et al., 1990; Aruoma i sur., 1992).

Također, zaštitna uloga od oksidacije proteina nastala djelovanjem iona Cu^{2+} praćena je i metodom SDS-PAGE. Nakon 30 min došlo je do oštećenja što je bilo vidljivo kao nedostatak proteinske vrpce od 66kDa koja je prisutna u kontrolnom uzorku. Zaštitnu ulogu imao je ekstrakt vrste *T. arduini* kod najviše koncentracije. Istu metodu koristili su Mayo i sur. (2003) za ispitivanje zaštitne uloge različitih komercijalno dostupnih antioksidansa. Askorbinska kiselina i Trolox pokazali su zaštitnu ulogu kod viših koncentracija, dok je GSH pokazivao zaštitnu ulogu samo kod koncentracija nižih od 0,1 mM. Ispitano je i djelovanje polifenola resveratrola koji također nije pokazivao zaštitnu ulogu.

4.5.3. Zaštitna uloga biljnih ekstrakata od lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija igra važnu ulogu u izazivanju oksidativnog stresa, a nusprodukti lipidne peroksidacije mogu ometati normalne biokemijske procese (Box i Maccubbin, 1997). Stupanj lipidne peroksidacije može se reducirati u prisutnosti antioksidansa. U ovom radu ispitana je potencijalna inhibicija lipidne peroksidacije u prisutstvo ekstrakata vrsta *T. arduini*, *M. petraea*, *R. intermedia* i *M. croatica* te dvaju standarda BHT i Trolox-a kao pozitivne kontrole. Komercijalni antioksidans BHT je pokazao nešto viši postotak inhibicije (73%) od Troloxa (66%). Ekstrakti sve četiri biljne vrste su pokazali značajnu inhibiciju lipidne peroksidacije. Nešto viši postotak inhibicije su pokazale vrste *T. arduini* i *R. intermedia*. Iako je ovo prvo istraživanje na ove dvije vrste ekstrakti ostalih vrsta rodova *Teucrium* (Kadifkova Panovska i sur., 2005; Hasani i sur., 2007) i *Rhamnus* (Ammar i sur., 2009; Moreira i sur., 2013) u literaturi su već poznati kao ekstrakti sa sposobnošću inhibicije lipidne peroksidacije. Za biljnu vrstu *M. croatica* inhibicija lipidne peroksidacije iznosi 59% što je jednako vrijednosti izmjerenoj za ekstrakt vrste *Micromeria fruticosa* ssp *serpyllifolia* (Gulluce i sur., 2004). Nadalje, ekstrakti biljaka ispitani u ovom radu pokazali su inhibiciju lipidne peroksidacije usporedivu s onom detektiranom kod pakistanske ljekovite biljke *Artemisia incisa* Pamp. (Rehman i sur., 2011) te metanolnog ekstrakta sjemenki grožđa (Jayaprakasha i sur., 2001).

4.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

U ovom radu po prvi je puta ispitano potencijalno antimikrobno djelovanje metanolnih ekstrakta vrsta *T. arduini*, *M. petraea*, *M. croatica* i *R. intermedia*. U prethodnim su studijama vodeni infuzi vrste *T. arduini* s lokaliteta Učka pokazali antimikrobnu aktivnost prema *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* (Šamec i sur., 2010), dok vodeni infuzi vrste *M. petraea*, nije pokazala antimikrobno djelovanje (Zovko-Končić i sur., 2010) što je u skladu s našim rezultatima na metanolnim ekstraktima te vrste.

Prema literaturnim podacima eterična ulja vrsta iz roda *Micromeria* imaju antimikrobnu aktivnost (Marinković i sur., 2003). Gulluce i sur. (2004) ispitali su antimikrobnu aktivnost eteričnih ulja i metanolnih ekstrakata vrste *Micromeria fruticosa* s područja Turske. Pokazali su da eterična ulja pokazuju antimikrobnu aktivnost dok metanolni ekstrakti ne. Ti su rezultati u skladu s našim rezultatima gdje također metanolni ekstrakt vrste *M. croatica* ne pokazuju antimikrobno djelovanje. Razlog što u metanolnim ekstraktima nije pronađena antimikrobna aktivnost, a u eteričnim uljima jest vjerojatno leži u činjenici da su kod te vrste za antimikrobnu aktivnost odgovorni lipofilni sekundarni metaboliti koji su prisutni u eteričnim uljima, ali ne i u metanolnom ekstraktu.

4.7. STANIČNI TESTOVI

Djelovanje ekstrakata vrsta *T. arduini*, *M. petraea*, *R. intermedia* i *M. croatica* ispitano je na razini stanica tj. na staničnoj liniji karcinoma grkljana HEP2. Značajan utjecaj na preživljavanje stanica nakon 24h tretmana imali su ekstrakti vrste *T. arduini* koncentracije 50 i 100 µg/mL dok ekstrakti ostalih biljnih vrsta nisu pokazivali djelovanje. Citotoksični efekt metanolnog ekstrakata vrste *T. arduini* prethodno je dokazana prema stanicama karcinoma crijeva HCT-116 (Stanković i sur., 2011).

Ovdje ispitivani uzorci pokazali su relativno visoku antioksidacijsku aktivnost u *in vitro* testovima. Antioksidacijska aktivnost nekog spoja najčešće se povezuje s njegovom sposobnošću da neutralizira slobodne radikale, posebno da reducira nastajanje slobodnih kisikovih spojeva (ROS). Stoga je mjerena količina ROS-eva u stanicama nakon 24h tretmana s različitim koncentracijama ispitivanih ekstrakata. Ekstrakti vrsta *M. petraea*, *M. croatica* i *R. intermedia* nisu pokazivale nikakav značajan utjecaj na količinu ROS-eva, dok je ekstrakt vrste *T. arduini* pri koncentracijama 50 i 100 µg/mL uzrokovao povećanje količine ROS-eva u tretiranim stanicama u odnosu na kontrolu. Navedeni biljni ekstrakt pokazao je najviši udio polifenolnih komponenata, a polifenoli u vodenom mediju mogu antioksidirati tvoreći visokoreaktivne OH[•] radikale te tako mogu djelovati kao supstrat za peroksidaze ili druge metaloenzime stvarajući različite prooksidante (Sergedienne i sur., 1999). Rezultati mjerenja ROS-eva u prisutnosti ekstrakta vrste *T. arduini* u skladu su s rezultatima karbonilacije proteina uz isti ekstrakt koji je pokazao prooksidativno djelovanje u koncentracijama višima od 25 µg/mL. Nadalje, stanice su prije dodavanja ekstrakta tretirane vodikovim peroksidom. Nakon 24h došlo je do povišenja količine ROS-eva kod ekstrakata vrste *T. arduini* pri koncentracijama 50 i 100 µg/mL. Također, zapažen je trend da je u stanicama tretiranim višom koncentracijom (100 µg/mL), s obzirom na broj živih stanica, izmjerena manja količina ROS-eva nego kod niže koncentracije. Sličan trend poznat je kod ekstrakata lista maline (*Rubus idaeus* L.) gdje je pokazano da više koncentracije induciraju nastajanje ROS-eva (Durgo i sur., 2011). Prema autorima Sergedienne i sur. (1999) citotoksično djelovanje biljnog ekstrakta *T. arduini* vjerojatno je povezano s prooksidativnim djelovanjem polifenola.

5. ZAKLJUČCI

- Endemične vrste *Teucrium arduini*, *Moltingia petraea*, *Micromeria croatica* i *Rhamnus intermedia* po prvi puta su detaljno okarakterizirane s obzirom na sastav fitokemikalija u različitim biljnim organima i s obzirom na različite lokalitete rasta.
- Sastav i količina polifenolnih spojeva značajno se razlikovala u svim istraženim vrstama s obzirom na različite biljne organe. Za vrste *T. arduini* i *R. intermedia* izmjerena je značajno viša koncentracija ukupnih fenola, flavonoida, flavanola te hidroksicimetnih kiselina u listovima s obzirom na ostale biljne organe. Kod vrsta *M. petraea* i *M. croatica* razlike u cvatu i listu nisu bile toliko izražene.
- Najviše koncentracije ukupnih fenola, flavonoida, flavanola te hidroksicimetnih kiselina izmjerene su listu vrste *T. arduini* s lokaliteta Učka.
- Ukupno najviše pojedinačnih fenolnih kiselina izmjereno je u biljnoj vrsti *M. petraea* u čijim je cvatovima izmjerena visoka koncentracije kava kiseline (lokalitet Orebić: $158,92 \pm 7,35$ $\mu\text{g/g sm}$; Dinara: $94,78 \pm 0,04$ $\mu\text{g/g sm}$).
- Listovi vrste *R. intermedia* s oba lokaliteta sadrže visoke (>150 $\mu\text{g/g sm}$) koncentracije protokatehinske kiseline, dok oni sa lokaliteta Bojinac sadrže i visoke koncentracije vanilinske ($276,61 \pm 13,33$ $\mu\text{g/g sm}$) i klorogenske ($124,28 \pm 6,67$ $\mu\text{g/g sm}$) kiseline.
- Dokazana je pozitivna korelacija između sadržaja polifenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti.
- Hijerarhijska klaster analiza pokazuje grupiranje uzoraka s obzirom na vrstu i biljni organ što upućuje na zaključak da je razina polifenolnih komponenata vrsno i tkivno specifična.
- Analiza glavnih komponenata (PCA) za svaku biljnu vrstu pokazuje značajne razlike u rezultirajućim varijablama s obzirom na biljni organ i lokalitet.
- Nije pronađena korelacija između sastava fitokemikalija i genetske varijabilnosti za vrstu *T. arduini*. Nakupljanje polifenolnih grupa više ovisi o geografskoj širini te nadmorskoj visini lokaliteta rasta biljaka. Primjećen je trend da biljke sa sjevernijih lokaliteta nakupljaju više koncentracije polifenolnih spojeva.

- Najviši antioksidacijski indeks (ACI) za vrstu *T. arduini* pokazuje ekstrakt lista biljaka s lokaliteta Učka, za vrstu *M. croatica* ekstrakt lista biljaka s lokaliteta Bačić kuk, za vrstu *M. petraea* ekstrakt lista s lokaliteta Orebić te za vrstu *R. intermedia* list s lokaliteta Dundović podi. Navedeni ekstrakti uključeni su u daljnje testove ispitivanja zaštitne uloge na razini makromolekula te stanične testove.
- Svi istraženi ekstrakti pokazali su zaštitnu ulogu na razini DNA molekule te sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije.
- Ekstrakt vrste *M. croatica* pokazao je zaštitnu ulogu od oštećenja goveđeg albumina kod nižih koncentracija, dok je kod viših koncentracija imao prooksidativno djelovanje. Ekstrakti vrsta *R. intermedia* i *T. arduini* pokazuju prooksidativno djelovanje kod koncentracija viših od 25 µg/mL, dok ekstrakt vrste *M. petraea* nije imao učinka pri oksidaciji proteina.
- Testirani ekstrakti nisu pokazali antimikrobno djelovanje.
- Ekstrakt vrste *T. arduini* kod koncentracija od 50 i 100 µg/mL pokazuje citotoksičnu aktivnost na stanice karcinoma grkljana HEP2. Isti ekstrakti pokazuju i prooksidativno djelovanje.
- Među ispitanim biljnim vrstama ističe se *T. arduini* kao vrsta s najboljim biološkim učinkom i visokim sadržajem polifenolnih komponenata koji značajno doprinose antioksidacijskoj aktivnosti.

6. REFERENCE

Alam, N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman. (2012). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **21**, 143–152.

Ali, B.H., Al Wabel, N., Blunden, G. (2005). Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytotherapy Research*, **19**, 369-375.

Al-Juddy, N.J., Jaladet, M.S. (2008). Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis. *Journal of Al-Nahrain University*, **11**, 86- 89.

Al-Rawashdeh, I.M. (2011). Genetic variability in a medicinal plant *Artemisia judaica* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *International Journal of Agricultural and Biology*, **13**, 279–282.

Ammar, R.B., Bhourri, W., Sghaier, M.B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte, A.-M., Chekir-Ghedira, L., Dijoux-Franca, M.-G., Ghedira, K. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*) : A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, **116**, 258-264.

Ammar, R.B., Kilani, S., Bouhlel, I., Skandrani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Bhourri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K. (2007). Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (*Rhamnaceae*). *Annals of Microbiology*, **57**, 453-460.

Angeles, J.G., Laurena, A.C., Tecson-Mendoza, M.E. (2005). Extraction of genomic DNA from the lipid-, polysaccharide-, and polyphenol-rich coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, **23**, 297a–297i.

Anttonena, M.J., Karjalainen, R.O. (2005). Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 759–769.

Aquaro, G., Peruzzi, L., Cesca, G. (2007). Chromosome numbers of 20 flowering plants from ex-Yugoslav countries. *Bocconeae*, **21**, 303-312.

AOAC International (2012) Official methods of analysis of AOAC International, 19th Edition, UR. Latimer, G., AOAC International.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, **12**, 1496-1547.

Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, **11**, 419–421.

Artyukova, E.V., Kholina, A.B., Kozyrenko, M.M., Zhuravlev, Y.N. (2005). Analysis of genetic variation in rare endemic species *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (*Fabaceae*) using RAPD markers. *Russian Journal of Genetics*, **40**, 710–716.

Aruoma, O. I., Evans, P. J., Kaur, H., Sutcliffe, L., Halliwell, B. (1990). Evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of Trolox C, vitamin E and probucol. *Free Radical Research Communications*, **10**, 143–157.

Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. (1992). Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid. *Xenobiotics*, **22**, 257–268.

Asif, M. H., Dhawan, P., Nath, P. (2000). A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, **18**, 109–115.

Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 6657-6662.

Babich, H., Rosenberg, D.W., Borenfreund, E. (1991). In vitro cytotoxicity studies with the fish hepatoma cell line, PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 327-336.

Bacchetta, G., Fenu, G., Mattana, E., Zecca, G., Grassi, F., Casazza, G., Minuto, L. (2011). Genetic variability of the narrow endemic *Rhamnus persicifolia* Moris (*Rhamnaceae*) and its implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, **39**, 477–484.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**, 191–203.

Balen, B., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P., Krsnik-Rasol, M. (2011). Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Hrvatska Sveučilišna Naklada, Zagreb.

Barros, L., Cabrita, L., Boas, M.V., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2011). Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chemistry*, **127**, 1600–1608.

Bedini, G., Carta, A., Zecca, G., Grassi, F., Casazza, G., Minuto, L. (2011). Genetic structure of *Rhamnus glaucophylla* Sommier endemic to Tuscany. *Plant Systematic and Evolution*, **294**, 273–280.

Bednarek, P., Osbourn, A. (2009). Plant-Microbe Interactions: Chemical Diversity in Plant Defense. *Science*, **324**, 746–748.

Benzie, I.F.F., 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 and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, **299**, 15–27

Bezić, N., Šamanić, I., Dunkić, V., Besendorfer, V., Puizina, J. (2009). Essential oil composition and internal transcribed spacer (ITS) sequence variability of four south Croatian *Satureja* species (*Lamiaceae*). *Molecules*, **14**, 925–938.

Bhourri, W., Ben Sghaier, M., Kilani, S., Bouhlel, I., Dijoux-Franca, M-G., Ghedira, K., Ghedira, L.C. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O-b-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-b-isorhamninoside. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 1167–1173.

Bors, W., Michel, C., Saran, M. (1984). Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin: A rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, **796**, 312-319.

Borse, T., Joshi, P., Chaphalkar, S. (2011). Biochemical role of ascorbic acid during the extraction of nucleic acids in polyphenol rich medicinal plant tissues. *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, **2**, 1-7.

Boudet, A.-M. (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds, *Phytochemistry*, **68**, 2722–2735.

Boulila, A., Bejaoui, A., Messaoud, C., Boussaid, M. (2010). Genetic diversity and population structure of *Teucrium polium* (*Lamiaceae*) in Tunisia. *Biochemical Genetics*, **48**, 57–70.

Boussahel, S., Dahamna, S., Ruberto G., Siracusa, L., Harzallah, D. (2013). Phytochemical study and antioxidant activities of leaves extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Pharmacognosy Communications*, **3**, 46-53.

Box, H.C., Maccubbin, A.E. (1997). Lipid peroxidation and DNA damage. *Nutrition*, **13**, 920–921

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*, **28**, 25–30.

Briskin, D.P. (2000). Medicinal plants and phytomedicines- linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, **124**, 507-514.

Burda, S., Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2774-2779.

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, **74**, 2157–2184.

Cakić, N.D. (2012). Alkaloids, phenylpropanoids, steroids and terpenoids from selected Apiaceae species, doktorska disertacija, Sveučilište u Nišu, Republika Srbska.

Campbell, B.C., Kim, J.H. (2006). Nuts' new aflatoxin fighter: Caffeic acid? *Agricultural Research Magazine*, **54**, 10.

Carra, A., Gambino, G., Schubert, A. (2007). A cetyltrimethylammonium bromide based method to extract low-molecularweight RNA from polysaccharide-rich plant tissues. *Analytical Biochemistry*, **360**, 318–320.

Chattopadhyay, P., Banerjee, N., Chaudhary, B. (2012). Genetic characterization of selected medicinal *Dendrobium* (*Orchidaceae*) species using molecular markers. *Research Journal of Biology*, **2**, 117-125.

Chevion, S., Berry, E.M., Kitrossky, N., Kohen, R. (1997). Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. *Free Radical Biology & Medicine*, **22**, 411 – 421.

Chong, J., Poutaraud, A., Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, **177**, 143–155.

Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Sang H. Park, S.H., Kim, S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, **163**, 1161-1168.

Cosio, M.S., Buratti, S., Mannino, S., Benedetti, S. (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the *Labiatae* family. *Food Chemistry*, **97**, 725–731.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites- Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing Ltd., Oxford-Velika Britanija.

Šilić, Č. (2005) Atlas of dendroflora (trees and shrub) of Bosnia and Herzegovina. Franjevačka kuća Masna Luka, Matica hrvatska Čitluk, Čitluk, 2005.

Dai, J., Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, **15**, 7313-7352.

Damiani, I., Morreel, K., Danoun, S., Goeminne, G., Yahiaoui, N., Marque, C., Kopka, J., Messens, E., Goffner, D., Boerjan, W., Boudet, A.-M., Rochange, S. (2005). Metabolite profiling reveals a role for atypical cinnamyl alcohol dehydrogenase CAD1 in the synthesis of coniferyl alcohol in tobacco xylem. *Plant Molecular Biology*, **59**, 753–769.

Delaney, T. P. (2004). Salicylic Acid u *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* ED. Davies, P.J., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 635-653.

Deng, S.L., Chen, W.-F., Zhou, B., Lang, Y., Liu, Z.-L. (2005). Protective effects of curcumin and its analogues against free radical-induced oxidative haemolysis of human red blood cells. *Food Chemistry*, **98**, 112-119.

Dewick, P.M. (2002). *Medicinal Natural Products*, 2nd Ed., John Wiley and Sons, Ltd.

Djabou, N., Allali, H., Battesti , M.-J., Tabti, B., Costa J., Muselli, A., Varesi, L. (2012b). Chemical and genetic differentiation of two Mediterranean subspecies of *Teucrium scorodonia* L. *Phytochemistry*, **74**, 123–132.

Djabou, N., Battesti , M.-J., Allali, H., Desjobert, J.-M., Varesi, L., Costa , J., Muselli, A. (2011) Chemical and genetic differentiation of Corsican subspecies of *Teucrium flavum* L. *Phytochemistry*, **72**, 1390–1399.

Djabou, N., Muselli, A., Allali, H., El Amine Dib, M., Tabti, B., Varesi, L., Costa , J. (2012a) Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L., *Phytochemistry*, **83**, 51-62.

Dorman, H.J. D, Hiltunen, R. (2011). Antioxidant and pro-oxidant in vitro evaluation of water-soluble food-related botanical extracts. *Food Chemistry*, **129**, 1612–1618.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11-15.

Druzynska, B., Stepniewska, A., Wołosiak, R. (2007). The influence of time and tipe of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **6**, 27-36.

Durgo, K., Belščak-Cvitanović, A., Stančić, A., Franekić, J., Komes, D. (2011). The bioactive potential of red raspberrry (*Rubus idaeus* L.) leaves in exhibiting cytotoxic and cytoprotective activity on human laryngeal carcinoma and colon adenocarcinoma. *Journal of Medicinal Food*, **1x**, 1-11.

El-Tayeb, M.A. (2005). Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, **45**, 215–224.

Emen, S., Çeken, B., Kızıl, G., Kızıl, M. (2009). DNA damage protecting activity and in vitro antioxidant potential of the methanol extract of *Cyclotrichium niveum*. *Pharmaceutical Biology*, **47**, 219–229.

Enayat, S., Banerjee, S. (2009). Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. *Food Chemistry*, **116**, 23–28.

Engelmeier, D., Hadacek, F. (2006). Antifungal natural products: assays and applications. In: Rai, et al., (eds) Naturally occurring bioactive compounds, Elsevier Sci. Ltd. pp. 423-467.

F. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2009). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, **161**, 839–851.

Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, **109**, 69-72.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, **331**, 372–379.

Ferriol, M., Llorens, L., Gil, L., Boira, H., (2009). Influence of phenological barriers and habitat differentiation on the population genetic structure of the balearic endemic *Rhamnus ludovici-salvatoris* Chodat and *R. alaternus* L. *Plant Systematic and Evolution*, **277**, 105–116

Fraga, C.G., Celep, G.S., Galleano, M. (2010). Biochemical actions of plant phenolics compounds: thermodynamic and kinetic aspects in plant phenolics and human health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. Eds. Fraga, C.G., Wiley, 2010 pp.

Franke, R., Humphreys, J-M., Hemm, M-R., Denault, J-W., Ruegger, MO., Cusumano, J-C., Chapple, C. (2002). The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, **30**, 33–45.

Frankel, E.N., Finley, J.W. (2008). How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **56**, 4901–4908.

Fuss, E. (2003). Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochemistry Reviews*, **2**, 307–320.

Genovese, S., Epifano, F., Curini, M., Kremer, D., Carlucci, G., Locatelli, M. (2012). Screening for oxyprenylated anthraquinones in Mediterranean *Rhamnus* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **43**, 125–127.

Georgiou, O., Dimitrellos, G., Georgiadis, T. (2000). *Moltkia petraea* (Boraginaceae) in Greece. *Phyton*, **40**, 57-69.

Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. (2011). Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 1128-1133.

Grass, S., Zidorn, C., Blattner, F.R., Stuppner, H. (2006). Comparative molecular and phytochemical investigation of *Leontodon autumnalis* (Asteraceae, Lactuceae) populations from Central Europe. *Phytochemistry*, **67**, 122–131.

Gruz, J., Novák, O., Strnad, M. (2008) Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, **111**, 789-794.

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils

and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, **103**, 1449-1456.

Hasani, P., Yasa, N., Vosough-Ghanbari, S., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Abdollahi, M. (2007). *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta Pharmaceutica*, **57**, 123-129.

Haslem, E. (2007). Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, **68**, 2713–2721.

He, F., Pan, Q.-H., Shi, Y., Duan, C.-Q. (2008). Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Molecules*, **13**, 2674-2703.

Hossain, M.B., Patras, A., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B., Bruntonc, N.P. (2011). Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on *in vitro* antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. *Journal of Functional Foods*, **3**, 179-189.

Howard, L. R., John R Clark, J.R., Brownmiller, C. (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**, 1238–1247.

Hu, W.J., Kawaoka, A., Tsai, C.J., Lung, J., Osakbe, K., Ebinuma, H., Chiang, V.L. (1998). Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 5407–5412.

Iandolino, A. B., Goes Da Silva, F., Lim, H., Choi, H., Williams, L. E., Cook, D. R. (2004). High-quality RNA, cDNA and derived EST libraries from grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, **22**, 269–278.

Ikbal, Boora, K.S., Dhillon, R.S. (2010). Evaluation of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. using RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*, **9**, 50-57.

Jaganath, I.B., Crozier, A. (2010). Dietary flavonoids and phenolic compounds, IN: Plant phenolics and Humanhealth: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. Eds. Fraga, C.G., Wiley, 2010 ppk—xy.

Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, **73**, 285-290.

Japelaghi, R.H., Haddad, R., Garoosi, G.-A. (2011). Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular Biotechnology*, **49**, 129–137.

Jones, H.D. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry*, **23**, 1349-1355.

Joshi, R., Poonam, Gulati, A. (2011). Biochemical attributes of tea flowers (*Camellia sinensis*) at different developmental stages in the Kangra region of India. *Scientia Horticulturae*, **130**, 266–274.

Jurgenliemk ,G., Nahrstedt, A. (2002). Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Medica*, **68**, 88-91.

Jurić, S., Hazler-Pilepić, K., Tomašić, A., Lepeduš, H., Jeličić, B., Puthiyaveetil, S., Bionda, T., Vojta, L., Allen, J. F., Schleiff, E., Fulgosi, H. (2009). Tethering of ferredoxin : NADP+ oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. *Plant Journal* , **60**, 783-794.

Jurišić Grubešić, R., Kremer, D., Vladimir-Knežević, S., Vuković Rodríguez, J. (2012). Analysis of polyphenols, phytosterols, and bitter principles in *Teucrium* L. species. *Central European Journal of Biology*, **7**, 542-550.

Jurišić-Grubešić, R., Vladimir-Knežević, S., Kremer, D., Kalodžera, Z., Vuković, J. (2007). Trichome micromorphology in *Teucrium* (*Lamiaceae*) species growing in Croatia. *Biologia Bratislava*, **62**, 148—156.

Kadifkova Panovska, T., Kulevanova, S., Stefova, M. (2005). *In vitro* antioxidant activity of some *Teucrium* species (*Lamiaceae*). *Acta Pharmaceutica*, **55**, 207-214.

Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, A. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, **2**, 41–60.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, **94**, 550–557.

Keum, Y.-S., Park, K.-K., Lee, J.-M., Chun, K.-S., Park, J.H., Lee, S.K., Kwon, H., Surh, Y.-J. (2000). Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Letters*, **150**, 41-48.

Khan, S., Qureshi, M.I., Kamaluddin, I., Alam, T., Abdin, M.Z. (2007). Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. *African Journal of Biotechnology*, **6**(3), 175-178.

Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P., Kumar, S. (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter*, **17**, 1–7.

Kivilompolo, M., Hyotylainen, T. (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of *Lamiaceae* herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, **1145**, 155–164.

Kliebenstein, D.J., Osbourn, A. (2012). Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **15**, 415–423.

Kocha, T., Yamaguchi, M., Ohtaki, H., Fukuda, T., Aoyagi, T. (1997). Hydrogen peroxide mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1337**, 319–326.

Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randić, M., Zovko Končić, M. (2013). Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark

extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food Chemistry*, **136**, 335–341.

Kosina, P., Gregorova, J., Gruz, J., Vacek, J., Kolar, M., Vogel e, M., Roos, W., Naumann, K., Simanek, V., Ulrichova, J. (2010). Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb. *Fitoterapia*, **81**, 1006–1012.

Kostadinova, E., Alipieva, K., Stefova, M., Stafilov, T., Antonova, D., Evstatieva, Lj., Matevski, V., Kulevanova, S., Stefkov, G., Bankova, V. (2007). Chemical composition of the essential oils from three *Micromeria* species growing in Macedonia and Bulgaria. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **26**, 3-7.

Kremer, D., Stabentheiner, E., Jurišić Grubešić, R., Oberländer, A., Vladimir-knežević, S., Kosalec, I., Ballian, D. (2011a). A morphological and chemotaxonomic study of *Teucrium arduini* L. in Croatia, and Bosnia and Herzegovina. *Plant Biosystems*, **146**, 1-11.

Kremer, D., Randić, M., Kosalec, I., Brkljačić, A., Lukač, G., Krušić, I., Ballian, D., Bogunić, F., Karlović, K. (2011b). New localities of the subendemic species *Berberis croatica*, *Teucrium arduini* and *Micromeria croatica* in the Dinaric Alps. *Acta Botanica Croatica*, **70**, 289–300.

Kremer, D., Stabentheiner, E., Dunkić, V., Dragojević Müller, I., Vujić, L., Kosalec, I., Ballian, D., Bogunić, F., Bezić, N. (2012). Micromorphological and chemotaxonomical traits of *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. *Chemistry & biodiversity*, **9**, 755-768.

Kremer, D., Košir, I. J., Kosalec, I., Zovko Končić, M., Potočnik, T., Čerenak, A., Bezić, N., Srećec, S., Dunkić, V. (2013). Investigation of chemical compounds, antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (*Lamiaceae*). *Current Drug Targets*, **14**, 1006-1014.

Kumar, M., Chandel, M., Kumar, S., Kaur, S. (2011) Protective effects of *Koelreuteria paniculata* Laxm. on oxidative stress and hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Phytopharmacology*, **1**(5), 177-189.

Laemmli, U.K, (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-185.

Lakušić, B., Lakušić, D., Slavkovska, V., Stevanović, V., Stevanović, B. (2007). Morpho-anatomical differentiation of the Balkan endemic species *Teucrium arduini* L. (*Lamiaceae*). *Archives of Biological Science*, **59**, 369–381.

Lakušić, B., Stevanović, B., Jančić, R., Lakušić, D. (2010). Habitat-related adaptations in morphology and anatomy of *Teucrium* (*Lamiaceae*) species from the Balkan peninsula (Serbia and Montenegro). *Flora*, **205**, 633–646.

Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J., Houlst, J. R. S. (1989). Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology*, **38**, 2859–2865.

Leal, A.A., Mangolin, C.A., do Amaral, A.T. Jr, Gonçalves, L.S., Scapim, C.A., Mott, A.S., Eloi, I.B., Cordovés, V., da Silva, M.F. (2010). Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. *Genetics and Molecular Research*, **9**(1), 9-18.

Leboš, A., Habjanič, K., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Šušković, J. (2008). The use of *Lactobacillus plantarum* L4 for the production of probiotic drink with cabbage juice. *Proceedings of the 4th Central European Congress on Food*, Cavtat, Croatia.

Lee, C., Lee, P., Kuo, Y. (2001). The chemical constituents from the aril of *Cassia Fistula* L. *Journal of Chinese Chemical Society*, **48**, 1053-1058.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, Y. C. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7292–7295.

Levine, R. L., Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, **36**, 1495–1502.

Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F. (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT*, **41**, 385-390.

Li, J.-H., Nesumi, A., Shimizu, K., Sakata, Y., Liang, M.-Z., He, Q.-Y., Zhou, H.-J., Hashimoto, F. (2010). Chemosystematics of tea trees based on tea leaf polyphenols as phenetic markers, *Phytochemistry*, **71**, 1342–1349.

Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Zovko Končić, M., Kosalec, I., Kremer, D. (2011). Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial properties of bark extracts of *Rhamnus catharticus* and *R. orbiculatus*. *Natural Product Communications*, **6**, 1275-1280.

Locatelli, M., Genovese, S., Carlucci, G., Kremer, D., Randić, M., Epifano, F. (2012). Development and application of high-performance liquid chromatography for the study of two new oxyprenylated anthraquinones produced by *Rhamnus* species. *Journal of Chromatography A*, **1225**, 113– 120.

Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H.M., Ross, C.F., Joseph R. Powers, J.R., Tang, J., Rasco, B.A. (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy, *Food Chemistry*, **129**, 637–644.

Lule, S.U., Xia, W. (2005). Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Reviews International*, **21**, 367–388.

Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A., Aruoma, O.I. (2002). Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5042–5047.

Mahesh, V., Million-Rousseau, R., Ullmann, P., Chabrillange, N., Bustamante, J., Mondolot, L., Morant, M., Noiro, M., Hamon, S., De Kochko, A., Werck-Reichhart, D., Campa, C. (2007). Functional characterization of two p-coumaroyl 3O-hydroxylase genes that are involved in chlorogenic acid biosynthesis in coffee trees. *Plant Molecular Biology*, **64**, 145–159.

Maleš, Ž., Hazler Pilepić, K., Petrović, L., Bagarić, I. (2010). Quantitative analysis of phenolic compounds of *Inula candida* (L.) Cass. *Periodicum Biologorum*, **112**, 307-310.

- Maleš, Ž., Kremer, D., Gašpar Randić, Z., Randić, M., Hazler Pilepić, K., Bojić, M. (2010). Quantitative analysis of glucofrangulins and phenolic compounds in Croatian *Rhamnus* and *Frangula* species. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, **5**, 108-113.
- Maleš, Ž., Žuntar, I., Nigović, B., Plazibat, M., Bilušić Vundać, V. (2003). Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire – *Crithmum maritimum* L. *Acta Pharmaceutica*, **53**, 139–144.
- Maltas, E., Vural, H.C., Yildiz, S. (2011). Extraction of genomic DNA from polysaccharide- and phenolics-rich *Ginkgo biloba*. *Journal of Medicinal Plant Research*, **5**, 332-339.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 727–47.
- Marinković, B., Marin, P.D., Soković, M., Duletić-Lausević, S., Vukojević, J. (2003). Antifungal effect of the essential oil of two *Micromeria* (*Lamiaceae*) species. *Bocconeia*, **16**, 1113-1116.
- Mayo, J.C., Tan, D.X., Sainz, R.M., Natarajan, M., Lopez-Burillo, S., Reiter, R.J. (2003). Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1620**, 139– 150.
- Moyo, M., Amoo, S.O., Bairu, M.W., Finnie, J.F., Van Staden, J. (2008). Optimising DNA isolation for medicinal plants. *South African Journal of Botany*, **74**, 771–775.
- Morant, M., Schoch, G.A., Ullmann, P., Ertunc, T., Little, D., Olsen, C.E., Petersen, M., Negrel, J., Werck-Roichhart, D. (2007). Catalytic activity, duplication and evolution of the CYP98 cytochrome P450 family in wheat. *Plant Molecular Biology*, **63**, 1–19.
- Moreira, T.F., Soares de Oliveira, D.M., Arruda, M.F.C., Hirota, B.C.K., Lordello, A.L.L., Campelo, P.M.S., Miguel, M.D., Miguel, O.G. (2013). Lipid peroxidation inhibition by ethanolic extract and fractions from *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. (*Rhamnaceae*). *International Journal of Phytomedicine*, **5**, in press.

Nair, R.B., Xia, Q., Kartha, C.J., Kurylo, E., Hirji, R.N., Datla, R., Selvaraj, G. (2002). Arabidopsis CYP98A3 mediating aromatic 3- hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. *Plant Physiology*, **130**, 210–220.

Nei, M., Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, **76**, 5269–5273.

Nikolić T, Fertalj K, Helman T, Mornar V, Kalpić (2001). CROFlora, a database application to handle the Croatian vascular flora. *Acta Botanica Croatica*, **60**, 31-48.

Nikolić T, Rešetnik, I. (2007). Plant uses in Croatia. *Phytologia Balcanica*, **13**, 229–238.

Noorhajati, H., Tanjung, M., Aminah, N.S., Suwandi, J.S. A. (2012). Antioxidant activities of extracts of trengguli stem bark (*Cassia fistula* L.). *International Journal of Basic & Applied Sciences*, **12**, 85-89.

Olthof, M.R., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*, **131**, 66-71.

Ou, B. X., Huang, D. J., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3122–3128.

Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio, A.Z., Scheerens, J.C., Miller, R. (2006). Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**, 1151-1157.

Padmalatha K, Prasad M.N.V. (2006). Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African Journal of Biotechnology*, **5**, 230-234.

Patras, A., Brunton, N.P., Downey, G., Rawson, A., Warriner, K., Gernigon, G. (2011). Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify fruits and vegetables commonly consumed in Ireland based on in vitro antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**, 250–256.

Patzak, J., Nesvadba, V., Henychova, A., Krofta, K. (2010). Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses. *Biochemical Systematics and Ecology*, **38**, 136–145.

Piantanida, I. (2003). Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s DNA i RNA. Detaljniji osvrt na ispitivanje interkalativnog načina vezanja. *Kemija u industriji*, **52**(11), 545-552.

Piljac, J., Martinez, S., Stipčević, T., Petrović, Ž., Metikoš-Huković, M. (2004). Cyclic voltammetry investigation of the phenolic content of Croatian wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **55**, 417–422.

Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Stipčević, T., Martinez, S. (2010). Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chemistry*, **121**, 820–825.

Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Martinez, S., Belščak, A. (2009). Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chemistry*, **113**, 394–400.

Piljac-Žegarac, J., Šamec, D. (2010). Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. *Food research international*, **44**, 345-350.

Prasad, N.R., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., Reddy, B.V. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **349**, 11-19.

Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4290–4302.

Prior, R.L., Hoang, H.A., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 3273–3279.

Prokudina, E.A., Havlíček, L., Al-Maharik, N., Lapčík, O., Strnad, M., Gruz, J. (2012). Rapid UPLC–ESI–MS/MS method for the analysis of isoflavonoids and other phenylpropanoids. *Journal of Food Composition and Analysis*, **26**, 36–42.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysgu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **50**, 586 – 621.

Radović, J., Čivić, K., Topić, R., Posavec Vukelić, V. (2009). Biološka raznolikost Hrvatske (drugo izdanje), Državni zavod za zaštitu prirode, Ministarstvo kulture Republike Hrvatske-Zagreb, Hrvatska.

Ramel, F., Sulmon, C., Gouesbet, G., Couee, I. (2009) Natural variation reveals relationships between pre-stress carbohydrate nutritional status and subsequent responses to xenobiotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, **104**, 1323–1337.

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 and Medicine*, **26**, 1231–1237.

Reddy, M.S.S., Chen, F., Shadle, G., Jackson, L., Aljoe, H., Dixon, R.A., (2005). Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L). *Proceedings of National Academy of Science of USA*, **102**, 16573–16578.

Redžić, S.S. (2007). The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina. *Collegium Antropologicum*, **31**, 869–890.

Rehman, A.U., Gulzar, S., Abbas, M.A., Shahzadi, T., Riaz, T., Siddiqui, S.Z., Ajaib, M. (2011). *In vitro* assessment of the protection from oxidative stress by various fractions of *Artemisia incisa* Pamp. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **76**, 1379–1386.

- Ribera, A.E., Zuñiga, G. (2012). Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungi control: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **12**, 893-911.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure– antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, **20**, 933–956.
- Robbins, R.J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 2866-2887.
- Roy, N., Laskar, R.A., Sk, I., Kumari, D., Ghosh, T., Begum, N.A. (2011). A detailed study on the antioxidant activity of the stem bark of *Dalbergia sissoo* Roxb., an Indian medicinal plant. *Food Chemistry*, **126**, 1115–1121.
- Ruegger, M., Chapple, C., (2001). Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism. *Genetics*, **159**, 1741–1749.
- Salopek-Sondi, B., Šamec, D., Mihaljević, S., Smolko, A., Pavlović, I., Janković, I., Ludwig-Müller, J. (2013). Influence of stress hormones on the auxin homeostasis in *Brassica rapa* seedlings. *Plant cell reports*, **32**, 1031-1042.
- Salzman, R. A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (1999). An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter*, **17**, 11–17.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, **81**, 215–217.
- Schmitzer, V., Veberič, R., Oster, G., Stampar, F. (2010). Color and phenolic content changes during flower development in groundcover rose. *Journal of American Societies of Horticultural Sciences*, **135**, 195–202.
- Schoch, G., Goepfer, T.S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D. (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3O-hydroxylase of phenolic esters, a missing

link in the phenylpropanoid pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 36566–36574.

Seeram, N.P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S.M., Feng, L., Dreher, M., Heber, D. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1415–1422.

Sergediene, E., Jonsson, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Rietjens, I.M.C.M., Caenas, N. (1999). Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Letters*, **462**, 392–396.

Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 7749–7759.

Sharma, A.D., Gill, P.K., Sihgh, P. (2002). DNA isolation from dry and fresh samples of polysaharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reports*, **20**, 415a-f.

Sikorska, M., Matlawska, I., Glowniak, K., Zgorka, G. (2000). Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in *Asclepias Syriaca* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug research*, **57**, 69-72.

Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., Todorović, M. (2007). Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, **12**, 2327-2340.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144–158.

Slavkovska, V., Couladis, M., Bojovic, S., Tzakou, O., Pavlovic, M., Lakusic, B., Jancic, R. (2005). Essential oil and its systematic significance in species of *Micromeria Benth* from Serbia & Montenegro. *Plant Systematic and Evolution*, **255**, 1–15.

Smelcerovic, A., Verma, V., Spiteller, M., Ahmad, S.M., Puri, S.C., Qazi, G.N. (2006). Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia. *Phytochemistry*, **67**, 171–177.

Souza, J., Santos, R.H.A., Ferreira, M.M.C., Molfetta, F.A., Camargo, A.J., Honorio, K.M., Ferreira da Silva, A.B. (2003). A quantum chemical and statistical study of flavonoid compounds (flavones) with anti-HIV activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **38**, 929-938.

Stadtman, E. R. (2001). Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **928**, 22–38.

Stalikas, C.D. (2010). Phenolic acids and flavonoids: Occurrence and analytical methods. R.M. Uppu et al. (ed.), *U Free Radicals and Antioxidant Protocols, Methods in Molecular Biology* 610, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC, pp. 65-90.

Stankovic, M.S., Curcic, M.G., Zizic, J.B., Topuzovic, M.D., Solujic, S.R., Markovic, S.D. (2011). *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 4190-4205.

Stanković, M.S., Stefanović, O., Čomić, Lj., Topuzović, M., Radojević, I., Solujić, S. (2012). Antimicrobial activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of *Teucrium* species. *Central European Journal of Biology*, **7**, 664-671.

Stevenson, D.E., Hurst, R.D. (2007). Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**, 2900 – 2916.

Sudheer Pamidimarri, D.V.N., Meenakshi, Sarkar, R., Boricha, G., Reddy, M.P. (2009). A simplified method for extraction of high quality genomic DNA from *Jatropha curcas* for genetic diversity and molecular marker studies. *Indian Journal of Biotechnology*, **8**, 187-192.

Sun, B., da-Silva, J.M.R., Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46**, 4267-4274.

Surveswaran, S., Cai, Y.-Z., Corke, H., Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, **102**, 938–953.

Šamec, D., Gruz, J., Strnad, M., Kremer, D., Kosalec, I., Jurišić Grubešić, R., Karlović, K., Lucić, A., Piljac-Žegarac, J. (2010) Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (*Lamiaceae*) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L. antioxidant capacity). *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 113–119.

Šamec, D., Piljac-Žegarac, J., Bogović, M., Habjanič, K., Grúz, J. (2011). Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae*, **128**, 78-83.

Šamec, D., Piljac Žegarac, J. (2011). Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures – comparison with blackberries, white and red grapes. *Scientia Horticulturae*, **131**, 15-21.

Šilić, Č. (1990). Endemic plants. Svjetlost, Sarajevo. p. 103

Šušković, J., Krobot, M., Mehak, M., Matošić, S. (1993). Antimikrobna aktivnost *Lactobacillus acidophilus*. *Mljekarstvo*, **43**, 95-106.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 669–675.

Thomas-Barberan, F.A., Espin, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 853-876.

Trinajstić, I., (1974). *Moltkea petraea* (Tratt.) Gris. in flora of Mljet island. *Glasnik Republičkog Zavoda Zaštite Prirode – Prirodnjačkog Muzeja Titograd*, **7**, 49–57.

Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, **2**, 1231-1246.

Tseng, T.H., Hsu, J.D., Lo, M.H., Chu, C.Y., Chou, F.P., Huang, C.L., Wang, C.J. (1998). Inhibitory effect of hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Letters*, **126**, 199-207.

Turkmen, N., Velioglu, Y.S., Sari, F., Polat, G. (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, **12**, 484-496.

Udovičić, M., Baždarić, K., Bilić-Zulle, L., Petrovečki, M. (2007). Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? *Biochemia Medica*, **17**, 10-5.

Verpoorte, R. (2000). Pharmacognosy in the new millenium: leadfinding and biotechnology. *Journal of pharmacy and pharmacology*, **52**, 253–262.

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Bival Štefan, M., Alegro, A., Kószegi, T., Petrik, J. (2011). Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected micromeria species from Croatia. *Molecules*, **16**, 1454-1470.

Vuko, E. (2012). Kemijski sastav i protuvirusno djelovanje eteričnog ulja i glavnih sastojaka ulja endemične vrste *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. Doktorska disertacija obranjena 27. lipnja 2012, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Vural, H.C. (2009). Genomic DNA isolation from aromatic and medicinal plants growing in Turkey. *Scientific Research and Essay*, **4**, 59-64.

Wayner, D.D.M.; Burton, G.W.; Ingold, K.U.; Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The Important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters*, **187**, 33-37.

Wielgorskaya, T. (1995). Dictionary of generic names of seed plants. Columbia University Press, New York.

Wojdyło, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, **105**, 940–949.

Wong, C.-C., Li, H.-B., Cheng, K.-W., Chen, F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, **97**, 705–711.

Wong, S.P., Leong, L.P., Koh, J.H.W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, **99**, 775–783.

World Health Organisation. (2005). National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines. WHO Press, Geneva, Switzerland.

World Health Organisation.(2007). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. WHO Press, Geneva, Switzerland.

Yakovleva, K.E., Kurzeev, S.A., Stepanova, E.V.,Fedorova, T.V., Kuznetsov, B.A., Koroleva, O.V. (2007). Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **43**, 661–668.

Yang, H.W., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, H.S., Choi, K.W. and Oh, K.S. (1998). Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction*, **13**, 998-1002.

Yen, G.-C., Hsieh, C.-L. (1998). Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in Vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3952-3957.

Yu, K., Little, D., Plumb, R., Smith, B. (2006). High-throughput quantification for a drug mixture in rat plasma– a comparison of Ultra Performance™ liquid chromatography/tandem mass spectrometry with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **20**, 544–552.

Zgorcka, G., Głowniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **26**, 79–87.

Zhang, D., Chu, L., Liu, Y., Wang, A., Ji, B., Wu, W.,Zhou,F., Wei, Y., Cheng, Q., Cai, S., Xie,L., Jia, G. (2011). Analysis of the antioxidant capacities of flavonoids under different spectrophotometric assays using cyclic voltammetry and density functional theory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 10277–10285.

Zhao, X.Y., Sun, H.D., Hou, A.J., Zhao, Q.S., Wei, T.T., Xin, W.J. (2005). Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, **1725**, 103–110.

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

Ziaková, A., Brandšteterová, E. (2003). Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some *Lamiaceae* family plants. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **26**, 443-453.

Zovko Končić, M., Kremer, D., Gruz, J., Strnad, M., Biševac, G., Kosalec, I., Šamec, D., Piljac-Žegarac, J., Karlović, K. (2010). Antioxidant and antimicrobial properties of *Moltingia petraea* (Tratt.) Griseb. flower, leaf and stem infusions. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 1537–1542.

7. SAŽETAK

Sekundarni biljni metaboliti, poznati i pod nazivom biljne bioaktivne molekule ili fitokemikalije imaju važne uloge u molekularnoj regulaciji razvitka i prilagodbe biljaka na okolišne čimbenike. Zbog svoje specifične kemijske strukture pokazuju i pozitivna djelovanja na zdravlje ljudi među kojima je najvažnije njihovo antioksidacijsko djelovanje. Najveća skupina sekundarnih biljnih metabolita sa dokazanim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje su polifenolne komponente.

Prema podacima Državnog zavoda za zaštitu prirode na području Hrvatske ima oko 523 endemične vrste, od kojih se neke koriste u tradicionalnoj medicini. U veći tih biljaka slabo je istražen sastav fitokemikalija i biološka aktivnost. U ovom radu polifenolne komponente određene su spektrofotometrijskim metodama te UPLC-MS/MS metodom u četiri endemične vrste *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae), *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb., *Micromeria croatica* (Pers.) Schott i *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst. Posebno je istraženo nakupljanje polifenolnih komponentata s obzirom na različite biljne organe i različite lokalitete rasta. Kako bi se utvrdila ovisnost nakupljanja polifenolnih komponentata o genetskim i okolišnim faktorima uspješno je analizirana genetska varijabilnost RAPD markerima u biljnim vrstama *T. arduini* i *R. intermedia* dok je kod vrsta *M. croatica* i *M. petraea* bilo nemoguće izvesti uspješne analize zbog potencijalnog vezanja nepoznatih komponenti na DNA molekulu. Antioksidacijska aktivnost u svim uzorcima ispitana je uz pomoć tri spektrofotometrijske metode (DPPH, ABTS, FRAP) te metodom cikličke voltometrije. Kako bi se odredio odnos između ispitivanih varijabli korištena je multivarijantna statistička analiza (PCA i HCA). U svrhu određivanja uzorka s najjačim antioksidacijskim djelovanjem izračunati su i antioksidacijski indeksi za svaku vrstu koji objedinjuje rezultate dobivene uz pomoć sve četiri metode. Detaljno su diskutirani navedeni parametri i njihovi međusobni odnosi.

Najviši antioksidacijski indeks među ispitivanim uzorcima pokazao je uzorak lista vrste *T. arduini* s lokaliteta Učka, a u navedenoj je biljnoj vrsti primjećeno značajno više nakupljanje polifenolnih komponentata u listu u odnosu na cvat i stabljiku. Kod te vrste nema pozitivne korelacije između nakupljanja sekundarnih metabolita i genetske varijabilnosti već nakupljanje značajnije ovisi o geografskoj širini i nadmorskoj visini lokaliteta rasta. Sjeverniji lokaliteti pokazali su više razine polifenolnih spojeva. Kod vrsta *M. croatica* i *M. petraea* list i

cvat nakupljaju približno jednake količine polifenola. Među ispitivanim biljnim vrstama *M. petraea* sadrži najviše fenolnih kiselina u slobodnoj formi, dok ih je u vrsti *M. croatica* najmanje. U listovima vrste *R. intermedia* izmjerene su visoke koncentracije vanilinske i klorogenske kiseline dok je *M. petraea* bogata kava kiselinom. Uzorak koji je pokazao najviši antioksidacijski indeks za svaku ispitivanu biljnu vrstu testiran je na razini makromolekula, odnosno testirano je potencijalno zaštitno djelovanje biljnih ekstrakata u izazvanoj oksidaciji molekula DNA, lipida i proteina. Svi testirani uzorci pokazali su zaštitno djelovanje na razini DNA te sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije. Ekstrakt vrste *M. petraea* nije pokazao djelovanje na razini proteina dok vrsta *M. croatica* kod niskih koncentracija sprječava oksidaciju, a kod viših ima prooksidativno djelovanje na proteine. Ekstrakti vrsta *R. intermedia* i *T. arduini* kod viših koncentracija pokazuju prooksidativno djelovanje na razini proteina. Ekstrakt vrste *T. arduini* također pokazuje citotoksičnu aktivnost prema stanicama karcinoma grkljana Hep2 što je povezano s njegovim prooksidativnim djelovanjem. Ni jedan ispitivani metanolni ekstrakt nije pokazao antimikrobno djelovanje.

8. SUMMARY

Plant secondary metabolites, also known as bioactive metabolites or phytochemicals, play an important role in molecular regulation of development and in adaptation of plants to unfavorable environmental conditions. One of the most abundant groups of secondary metabolites are polyphenols. These compounds have proven health benefits, mostly connected with their ability to act as antioxidants.

According to the Croatian State Institute for Nature Protection, Croatia harbors 523 endemic and subendemic plant species. Although scientific evidence of their biological activity and phytochemical composition is limited, some of these species are extensively used in traditional medicine. This study represents the first systematic analysis of phytochemicals, biological properties and genetic variability of four endemic species: *Teucrium arduini* L. (*Lamiaceae*), *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb., *Micromeria croatica* (Pers.) Schott and *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst. All analyses were done with respect to their growing regions in Croatia. Phytochemical analysis was performed using spectrophotometric techniques and the UPLC-MS/MS system. Genetic variability was determined using RAPD markers. Cyclic voltammetry and three spectrophotometric methods (DPPH, FRAP, ABTS) were utilized to assess the antioxidant activity of plant extracts. Multivariable statistical analyses (PCA, HCA) were used for determination of correlations among samples and variables. Those extracts with high antioxidant composite indices (ACI) were subjected to testing of protective effects on DNA, lipids and proteins. In addition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant/prooxidant activities were evaluated in human laryngeal carcinoma (HEp2) cell lines .

The highest antioxidant capacity and polyphenolic content were identified in leaf extracts of *T. arduini* grown on Mt. Učka. In this plant species, the leaves accumulated significantly more polyphenol compounds than the flowers, while in *M. croatica* and *M. petraea* the leaves and flowers exhibited equal levels of polyphenolic compounds. The variation in polyphenolic compounds of *T. arduini* from different locations depended more on environmental factors than genetic makeup showing that the plants grown in northern regions accumulated more polyphenolic compounds. Among all four analyzed plant species, *M. petraea* showed the highest content of phenolic acids measured by UPLC-MS/MS. Especially high levels of caffeic acid, as well as high vanilic and chlorogenic acid contents, were measured in *R. intermedia*. Extracts which exhibited high antioxidant composite indices

was tested for their protective effects against DNA, lipid and protein damage. All tested extracts showed protective effects against DNA and lipid damage. *M. petraea* had no effect on protein damage while *M. croatica* showed protective effects at low concentrations and pro-oxidant effects at higher concentrations. *T. arduini* and *R. intermedia* exhibited pro-oxidant effects on proteins at higher concentrations.

Only the *T. arduini* extract applied at the highest concentration showed cytotoxic and pro-oxidant effects in human laryngeal carcinoma (HEp2) cell lines. Analyzed extracts did not show any antimicrobial activity.

9. ŽIVOTOPIS

Dunja Šamec rođena je 15. listopada 1984. godine u Varaždinu. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja u Prvoj gimnaziji u Varaždinu, 2003. godine upisuje Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu. Tijekom studiranja bila je višestruko nagrađivana za postignute uspjehe te je dobitnica Rektorove nagrade, Dekanove nagrade, Državne stipendije A kategorije, Stipendije Biothničke zaklade i sl. Izradila je dva diplomatska rada te 2008. godine paralelno diplomirala na dva smjera- prehrambeno inženjerstvo i nutricionizam.

Od 2009. godine radi kao znanstvena novakinja u Laboratoriju za kemijsku biologiju, Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu na projektu "Molekularna regulacija biljnog razvitka" čija je voditeljica dr. sc. Branka Salopek Sondi. Samostalno je vodila tri projekta za doktorante, dva financirana od Hrvatske nacionalne zaklade za znanost i jedan od Unity Through Knowledge Fund-a. U sklopu tih projekata boravila je tri mjeseca na Palacky University u Olomoucu u Republici Češkoj te šest mjeseci na Washington State University u Pullman-u u SAD-u. Kao znanstvena novakinja sudjelovala je na tri međunarodna i dva domaća znanstvena projekta te tri komercijalna projekta suradnje znanosti i privrede. U sklopu hrvatsko-njemačke bilateralne suradnje boravila je ukupno tri mjeseca, u nekoliko navrata, na Institute of Botany, Technical University Dresden u Njemačkoj. Za sudjelovanja na međunarodnim znanstvenim skupovima osvojila je stipendije međunarodnih organizacija IUPAC, FESPB, FEBS te Fondation pour l'Université de Lyon. Aktivna je u popularizaciji znanosti te je sudjelovala kao voditelj punkta te predavač na Otvorenim danima IRB-a 2013. Uključila se i u realizaciji manifestacije Noć istraživača 2013. te je održala nekoliko predavanja za popularizaciju znanosti. Članica je Hrvatskog društva za biljnu biologiju te Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

Do sada je objavila 1 poglavlje u međunarodnoj knjizi, 11 CC radova (6 kao prvi autor), 1 rad u knjizi sažetaka sa skupa te preko 20-ak sažetaka u zbornicima skupova. Njezini su radovi citirani 75 (SCOPUS), odnosno 53 (WoS) puta. *h-indeks* iznosi 4 (SCOPUS) odnosno 3 (WoS).

Popis publikacija:

Poglavlja u knjigama:

1. Piljac-Žegarac, J., **Šamec, D.**, Piljac A., Herbal Teas: A Focus on Antioxidant Properties. *Tea in Health and Disease Prevention* / Preedy, Victor (ur.). London : Academic Press, 2013. str. 129-140.

Radovi u međunarodnim časopisima indeksirani u CC-u:

1. **Šamec, D.**, Piljac Žegarac, J. (2014). Fluctuations in the levels of antioxidant compounds and antioxidant capacity of ten small fruits during one year of frozen storage. *International Journal of Food Properties*, prihvaćen za objavljivanje.
2. **Šamec, D.**, Bogović, M., Vincek, D., Martinčić, J., Salopek-Sondi, B. (2013). Assessing the authenticity of the white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) cv. 'Varaždinski' by molecular and phytochemical markers, *Food Research International*, doi: 10.1016/j.foodres.2013.07.015.
3. Salopek-Sondi, B., **Šamec, D.**, Mihaljević, S., Smolko, A., Pavlović, I., Janković, I., Ludwig-Müller, J. (2013). Influence of stress hormones on auxin homeostasis in *Brassica rapa* seedlings. *Plant Cell Reports*, **32**, 1031-1042 (Special issue *Plant Hormone Signaling*).
4. Piljac Žegarac, J., Piljac, A., Basha, S., Pinter, M., **Šamec, D.**, Petravić Tominac, V. (2012). Degradation kinetics of total phenols, anthocyanins and antiradical activity of blackcurrant nectars stored at room and refrigerator temperatures. *Italian Journal of Food Sciences.*, **14**, 345-351.
5. **Šamec, D.**, Kremer, D., Grúz, J., Jurišić Grubešić, R., Piljac-Žegarac, J. (2012). *Rhamnus intermedia* Steud. et Hochst. – a new source of bioactive phytochemicals. *Croatica Chemica Acta.*, **85**, 125-129.
6. **Šamec, D.**, Piljac-Žegarac, J. (2011). Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures – comparison with blackberries, white and red grapes. *Scientia Horticulturae*, **131**, 15-21.

7. Piljac Žegarac, J., Šamec, D., Piljac, A., Mešić, A., Tkalčec, Z. (2011). Antioxidant properties of methanol and water extracts of three wild mushroom species: *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quél., *Sarcoscypha austriaca* (Sacc.) Boud, and *Strobilurus esculentus* (Wulfen). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **13**, 257-264.
8. Šamec, D., Piljac Žegarac, J., Bogović, M., Habjanič, K., Grúz, J. (2011). Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* Lour.) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae*, **128**, 78-83.
9. Piljac Žegarac, J., Šamec, D. (2010). Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. *Food Research International*, **44**, 345-350.
10. Zovko Končić, M., Kremer, D., Gruz, J., Strnad, M., Biševac, G., Kosalec, I., Šamec, D., Piljac Žegarac, J., Karlović, K. (2010). Antioxidant and antimicrobial properties of *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. flower, leaf and stem infusions. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 1537-1542.
11. Šamec, D., Gruz, J., Strnad, M., Kremer, D., Kosalec, I., Jurišić Grubešić, R., Karlović, K., Lučić, A., Piljac Žegarac, J. (2010). Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae) flower and leaf infusions. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 113-119.

Radovi u zbornicima skupova:

1. Piljac Žegarac, J., Martinez, S., Valek, L., Stipčević, T., Belščak, A., Šamec, D. (2008). Total phenol content and antioxidant capacity of Croatian food products. *Znanost i nove tehnologije u razvoju gospodarstva*, str. 39-51.

Sažeci u CC časopisima:

1. Šamec, D., Kremer, D., Gruz, J., Piljac-Žegarac, J., Salopek-Sondi, B. (2013). Effect of endemic plants extracts on biological macromolecules. *FEBS Journal*, 208 (Suppl. 1), 509. (Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013)

Sažeci u zbornicima skupova:

1. Meriño-Gergichevich, C., Ondrasek, G., Zovko, M., **Šamec, D.**, Alberdi, M., Reyes-Díaz, M. (2013). Changes in antioxidant capacity of highbush blueberry exposed to phytotoxic aluminum, *International Conference on the Biogeochemistry of trace Elements (ICOBTE)- Book of Abstracts*, Athens-SAD.
2. Nižić, I., **Šamec, D.**, Lepeduš, H., Ludwig-Müller, J., Salopek-Sondi, B. (2012). Effect of salt stress on *Brassica rapa* L. seedlings, *Zbornik sažetaka 11. Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem*, 178-179, Šibenik-Hrvatska.
3. **Šamec, D.**, Salopek-Sondim B., Salopekn I., Cuthbertson, D., Lange, B.M., Piljac-Žegarac, J. (2012). The effect of grafting on metabolite profile and antioxidant activity of black chokeberries (*Aronia melanocarpa* L., var. Viking), *Abstracts-Plant Biology Congress Freiburg*, 278, Freiburg-Njemačka.
4. **Šamec, D.**, Smolko, A., Ludwig-Müller, J., Salopek-Sondi, B. (2012). Identification and quantification of plant hormones auxins in *Brassica rapa* seedlings using GC-MS. *13th International Chromatography School- Book of Abstracts*, 47, Zagreb-Croatia
5. Nižić, I., **Šamec, D.**, Salopek Sondi, B. (2012). Effects of salt stress on Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) seedlings measured by spectrophotometric methods. *IX. Meeting of Young Chemical Engineers- Book of Abstracts*, 153, Zagreb-Hrvatska.
6. Sabolić, I., **Šamec, D.**, Valek Žulj, L., Kremer, D., Piljac-Žegarac, J., Martinez, S. (2012) Electrochemical investigation of antioxidant potency of medicinal plants" *IX. Meeting of Young Chemical Engineers- Book of Abstracts*, 167, Zagreb-Hrvatska.
7. **Šamec, D.**, Piljac-Žegarac, J. (2011). Fluctuations in antioxidant capacity and polyphenolic content of small fruits in storage at -20°C for one year. *Euroanalysis 2011 "Challenges in Modern Analytical Chemistry"- Abstracts*, 58, Beograd-Srbija.
8. **Šamec, D.**, Kremer, D., Piljac, A., Valek Žulj, L., Martinez, S., Piljac Žegarac, J. (2011). Antioxidant capacity of medicinal plants: a comparative study using five in vitro antioxidant assays", *YISAC 2011- 18th Young Investigators Seminar on Analytical Chemistry- Book of Abstracts*, 75, Novi Sad-Srbija.
9. **Šamec, D.**, Kremer, D., Gruz, J., Piljac Žegarac, J. (2011). Free phenolic acids in *Micromeria Croatica* (Pers.) Schott measured by UPLC-MS/MS" *12th International School of Ion Chromatography- Book of Abstracts*, 34, Zagreb-Hrvatska.

10. Šamec, D., Martinez, S., Piljac, A., Gruz, J., Piljac-Žegarac, J. (2010). Comparative antioxidant capacity of Jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*) water and methanol extracts measured by various tests. *Book of abstracts/5th Slovenian Symposium on Plant Biology with International Participation*, 90, Ljubljana-Slovenija.
11. Janković, I., Šamec, D., Brcko, A., Salopek-Sondi, B. (2010). Influence of stress-hormone treatments (ABA, SA, JA) on the *Brassica rapa* seedlings. *Book of abstracts/5th Slovenian Symposium on Plant Biology with International Participation*, 60, Ljubljana-Slovenija.
12. Šamec, D., Gruz, J., Piljac-Žegarac, J. (2010) UPLC-MS/MS determination of free phenolic acids in small fruit. *10th International Symposium and Summer School on Bioanalysis- Book of Abstract*, 100, Zagreb-Hrvatska.
13. Zovko Končić, M., Kremer, D., Gruz, J., Strnad, M., Biševac, G., Kosalec, I., Šamec, D., Piljac-Žegarac, J., Karlović, K. (2010) Antioxidant and antimicrobial properties of *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. *4. hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem : Knjiga sažetaka = Book of Abstracts*, 165, Opatija-Hrvatska.
14. Šamec, D., Piljac-Žegarac, J., Bogović, M. (2010). Utjecaj tradicionalnog načina kiseljenja na antioksidacijski kapacitet hrvatskih kultivara bijelog kupusa. *Zbornik sažetaka/Prvi studentski kongres Prehrana i klinička dijetoterapija*, 34-35, Rijeka-Hrvatska.
15. Šamec, D., Salopek, I., Salopek-Sondi, B., Piljac Žegarac, J. (2010). Grafting black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L., var. *Viking*) onto European rowan (*Sorbus aucuparia* L.) yields fruit with superior phytochemical content and bioactivity. *1st International Symposium of Biotech Students- Book of Abstracts*, 31-32, Zagreb-Hrvatska.
16. Šamec, D., Kremerm D., Piljac-Žegarac, J. (2009). Antioxidant properties of *Teucrium arduini* L. flower and leaf infusions, *EMBO Young Scientists Forum- Book of Abstracts*, 47, Zagreb-Hrvatska.
17. Šamec, D., Piljac-Žegarac, J. (2009). Antioxidant capacity evolution during maturation of cabbage varieties (*Brassica oleracea* and *Brassica rapa*). *Book of Abstracts - YISAC 2009, Young Investigators Seminar on Analytical Chemistry*, 55-56, Graz-Austrija.

18. **Šamec, D.**, Piljac-Žegarac, J. (2008) The influence of extraction solvent on the antioxidant activity of wild and cultivated Croatian mushrooms. *Book of abstracts - 15th Young Investigators' Seminar on Analytical Chemistry*, 55-58, Ljubljana-Slovenija.
19. **Šamec, D.** (2008) The influence of extraction solvent on the antioxidant activity of wild and cultivated mushrooms. *Bilten XII. međunarodne Tehnologijade*, 26-27, Rovinj-Hrvatska.
20. **Šamec, D.** (2007). Changes in phenolic profile and antioxidant activity during the production of concentrate cherry juice, *Bilten XI. međunarodne Tehnologijade*, Rovinj-Hrvatska.