

# Ispitivanje optimalnog prinosa fenolnih spojeva iz roda *Veronica* primjenom različitih tehnika ekstrakcije i otapala

---

**Bačić, Katarina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:645054>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-23**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu  
Odjel za biologiju

Katarina Bačić

**Ispitivanje optimalnog prinosa fenolnih spojeva iz roda  
*Veronica* primjenom različitih tehnika ekstrakcije i otapala**

Diplomski rad

Split, 2024.

## Diplomski rad

**Studentica:**

Katarina Bačić

**Mentorica:**

prof. dr. sc. Valerija Dunkić



Split, lipanj 2024.

Ovaj rad je napisan u Splitu 2024. godine u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost: “Hrvatske vrste roda *Veronica*: fitotaksonomija i biološka aktivnost” (CROVeS-PhyBA), pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerije Dunkić i neposrednim vodstvom dr. sc. Ivane Vrca. Diplomski rad je predan na ocjenu Odjelu za biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu u svrhu postizanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije (mag. educ. biol. et chem.)

## IZJAVA

Izjavljujem da sam moralnom i materijalnom odgovornošću diplomski rad naslova: **ISPITIVANJE OPTIMALNOG PRINOSA FENOLNIH SPOJEVA IZ RODA *Veronica* PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE I OTAPALA** izradila samostalno pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerije Dunkić i neposrednim vodstvom dr. sc. Ivane Vrca. Diplomski rad sam napisala u obliku znanstveno-istraživačkog rada u duhu hrvatskoga jezika. Tuđe zaključke, teorije i spoznaje u ovome radu navela sam parafrazirajući. Literatura koju sam koristila navedena je na kraju diplomskoga rada.

Studentica

Katarina Bačić

## ZAHVALA

*Želim se zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Valeriji Dunkić, neposrednoj voditeljici dr. sc. Ivani Vrca i dr. sc. Mariji Nazlić. Hvala Vam na pomoći, pozitivnoj energiji i korisnim savjetima bez kojih izrada ovog diplomskog rada ne bi bila ostvarena.*

*Svim srcem se zahvaljujem svojim kolegicama Vani i Loriani koje su me poticale na uspjeh i onda kada nije bilo najlakše. Uvijek ću se rado prisjećati naših zajedničkih trenutaka na ovom putu obrazovanja.*

*Za kraj, hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su me vjerno pratili i podupirali kroz sve moje studentske dane.*

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za biologiju  
Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Hrvatska

Diplomski rad

### ISPITIVANJE OPTIMALNOG PRINOSA FENOLNIH SPOJEVA IZ RODA *Veronica* PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE I OTAPALA

Katarina Bačić

#### SAŽETAK

Vrste roda *Veronica*, podrijetlom iz Europe i jugoistočne Azije, već su se od davnina koristile u ljekovite svrhe. Pripadaju porodici Plantaginaceae, zvanj još i porodica trpučevki. Sekundarnim ili specijaliziranim metabolizmom biljaka nastaju raznovrsni kemijski spojevi u koje spadaju i fenolni spojevi. Prisutni su otopljeni u organelu biljne stanice, vakuoli. Prema brojnim istraživanjima, fenolni spojevi pokazali su pozitivni učinak na ljudsko zdravlje. Cilj ovog istraživanja je tehnikama ekstrakcije ispitati kojim se otapalom dobiva najveći prinos fenolnih spojeva iz usitnjenog biljnog materijala vrsta *Veronica anagallis-aquatica* L., *Veronica hederifolia* L., *Veronica persica* Poir. te *Veronica polita* Fr. Ekstrakcija iz biljnog materijala provedena je u destiliranoj vodi, 80%-tnom etanolu i čistom metanolu. Fenolni spojevi su izolirani primjenom ultrazvučne tehnike ekstrakcije pri temperaturama od 25 °C i 40 °C te ekstrakcijom postupkom maceracije.

**Ključne riječi:** *Veronica anagallis-aquatica* L., *Veronica hederifolia* L., *Veronica persica* Poir., *Veronica polita* Fr., prinos fenolnih spojeva, ultrazvučna ekstrakcija, maceracija, destilirana voda, 80%-tni etanol, metanol

**Rad sadrži:** 67 stranica, 25 slika, 4 tablice, 54 literaturna navoda

Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** prof. dr. sc. Valerija Dunkić

**Neposredni voditelj:** dr. sc. Ivana Vrca

**Ocjenjivači:**

prof. dr. sc. Valerija Dunkić

dr. sc. Ivana Vrca

dr. sc. Marija Nazlić

**Rad prihvaćen:** Lipanj, 2024.

## Basic documentation card

University of Split  
Faculty of science  
Biology department  
Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Croatia

Graduating thesis

### INVESTIGATION OF THE OPTIMAL YIELD OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM THE GENUS *Veronica* USING DIFFERENT EXTRACTION TECHNIQUES AND SOLVENTS

Katarina Bačić

#### ABSTRACT

Species of the genus *Veronica*, native to Europe and Southeast Asia, have been used for medicinal purposes since ancient times. They belong to the Plantaginaceae family, also called the plantain family. The secondary or specialized metabolism of plants produces a variety of chemical compounds, including phenolic compounds. They are present dissolved in the organelle of the plant cell, the vacuole. According to numerous studies, phenolic compounds have shown a positive effect on human health. The aim of this research is to use extraction techniques to examine which solvent produces the highest yield of phenolic compounds from crushed plant material of the species *Veronica anagallis-aquatica* L., *Veronica hederifolia* L., *Veronica persica* Poir. and *Veronica polita* Fr. Extraction from plant material was carried out in distilled water, 80% ethanol and pure methanol. Phenolic compounds were isolated using the ultrasonic extraction technique at temperatures of 25 °C and 40 °C and extraction by the maceration process.

**Key words:** *Veronica anagallis-aquatica* L., *Veronica hederifolia* L., *Veronica persica* Poir., *Veronica polita* Fr., yield of phenolic compounds, ultrasonic extraction, maceration, distilled water, 80% ethanol, methanol

**Thesis consist of:** 67 pages, 25 pictures, 4 tables, 54 references

Original language: Croatian

**Supervisor:** Prof. Valerija Dunkić, PhD

**Assistant Supervisor:** Ivana Vrca, PhD

#### Reviewers:

Valerija Dunkić, PhD. Full professor

Ivana Vrca, PhD. Senior assistant

Marija Nazlić, PhD. Senior assistant

**Thesis accepted:** June, 2024.



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	2
2.1. Porodica Plantaginaceae.....	2
2.1.1. Rod <i>Veronica</i> .....	3
2.1.1.1. <i>Veronica anagallis-aquatica</i> L. ....	4
2.1.1.2. <i>Veronica persica</i> Poir .....	5
2.1.1.3. <i>Veronica polita</i> Fr.....	6
2.1.1.4. <i>Veronica hederifolia</i> L.....	7
2.2. Specijalizirani biljni metaboliti .....	8
2.2.1. Hlapljivi spojevi u biljkama .....	9
2.2.2. Fenolni spojevi .....	9
2.2.2.1. Flavonoidi.....	11
2.2.2.2. Fenolne kiseline .....	12
2.2.2.2.1. Salicilna kiselina .....	13
2.2.2.3. Lignin .....	14
2.2.2.4. Tanin .....	14
2.3. Biološka aktivnost specijaliziranih biljnih metabolita .....	15
2.3.1. Citotoksično djelovanje specijaliziranih biljnih metabolita .....	15
2.3.2. Antibakterijsko djelovanje specijaliziranih biljnih metabolita .....	15
2.3.3. Antioksidativno djelovanje specijaliziranih biljnih metabolita .....	16
2.4. Pripreme biljnog materijala i tehnike izolacije fenolnih spojeva.....	16
2.4.1. Sušenje i čuvanje ljekovitog bilja .....	16
2.4.2. Ekstrakcija.....	17
2.4.2.1. Konvencionalne metode ekstrakcije.....	17
2.4.2.1.1. Destilacija vodenom parom.....	17
2.4.2.1.2. Vodena destilacija ili hidrodestilacija .....	17
2.4.2.1.3. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	18
2.4.2.1.4. Maceracija .....	18
2.4.2.2. Napredne tehnike ekstrakcije .....	19

2.4.2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	19
2.4.2.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima .....	19
2.4.2.2.3. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem .....	21
2.4.3. Filtracija .....	22
2.4.4. Centrifugiranje.....	23
2.4.5. Tehnike uparavanja.....	23
2.4.5.1. Uparavanje rotavaporom .....	23
2.4.5.2. Liofilizacija .....	24
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>26</b>
3.1. Priprema biljnog materijala.....	26
3.2. Maceracija .....	28
3.3. Ekstrakcija ultrazvukom.....	30
3.4. Uparavanje rotavaporom .....	31
3.5. Liofilizacija .....	31
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>33</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>38</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>40</b>
<b>7. METODIČKI DIO .....</b>	<b>41</b>
<b>8. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>60</b>
<b>9. POPIS SLIKA.....</b>	<b>65</b>
<b>10. POPIS TABLICA.....</b>	<b>67</b>

## 1. UVOD

Fitokemikalije su vrsta kemikalija proizvedena u biljkama. To su ujedno i bioaktivne komponente među koje ubrajamo i fenolne spojeve. Fenolni spojevi su raznovrsna skupina kemijskih spojeva čija se struktura temelji na hidroksilnoj skupini vezanoj na aromatski prsten. Nalaze se otopljeni u staničnoj organeli biljke, vakuoli. Dva glavna načina biosinteze fenolnih spojeva u biljkama su put šikiminske kiseline te put jabučne kiseline. U ovu grupu spojeva spadaju stilbeni, lignin, tanini, flavonoidi, fenolne kiseline te mnogi drugi. Produkti su sekundarnog biljnog metabolizma koji ima važnu ulogu u obrani biljke protiv biljojeda, patogena, UV oštećenja te drugim oblicima zaštite ključnih za preživljavanje biljnog organizma. Putem konzumiranja voća i povrća, čovjek u svoj organizam unosi određene fenolne spojeve. Dokazano je da veliki broj predstavnika iz fenolne grupe spojeva ima pozitivni učinak na ljudsko zdravlje što se očituje u izuzetno dobrom antimikrobnom, antikancerogenom te antioksidacijskom djelovanju. Kako bi se fenolni spojevi izolirali te primijenili dalje u ljekovite svrhe, potrebno ih je ekstrahirati iz biljnog materijala. Ekstrakcija je postupak odvajanja određenih tvari iz uzorka pomoću otapala u kojem su te iste tvari dobro topljive. Tehnike ekstrakcije dijelimo na klasične i napredne. U klasične spadaju: vodena destilacija, destilacija vodenom parom, ekstrakcija tekuće-tekuće, infuzija, dekokcija, maceracija i dr. Među naprednim tehnikama ekstrakcije ubrajaju se ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem.

Za ovo istraživanje u svrhu izrade diplomskog rada kao biljni materijal korištene su četiri vrste roda *Veronica* gdje je svaka vrsta usitnjena i otpljena u tri različita otapala: destilirana voda, 80%-tni etanol i čisti metanol. Provedene su dvije metode ekstrahiranja fenolnih spojeva iz biljnog materijala, a to su maceracija i ultrazvučna ekstrakcija pri dvjema temperaturama: 25 °C i 40 °C. Metanolni i etanolni uzorci upareni su pomoću rotavapor uređaja dok su vodeni ekstrakti upareni liofilizatorom. Nakon svake tehnike ekstrakcije izračunat je prinos fenolnih spojeva u uzorcima.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Porodica Plantaginaceae

Porodica Plantaginaceae zvana još i porodica trpučevki pripada redu Lamiales. Porodica se sastoji od 90 rodova i oko 1900 vrsta biljaka. Gotovo su kozmopolitski rasprostranjene, iako većina vrsta obitava u područjima umjerene klime. Pojedine vrste su izrazite gospodarske važnosti kao ukrasno bilje, korovi ili izvori lijekova (web 1).

Vrste iz porodice trpučevki najčešće su jednogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, a uključuju kopnene vrste te korijenaste vodene vrste. Većina biljaka je zigomorfna, ali neki rodovi su aktinomorfni (web 2).

Listovi su cjeloviti, ponekad rasperani, u prizemnim rozetama te nemaju palistiće. Cvjetovi su dvospolni te najčešće imaju četiri prašnika i nadraslu plodnicu građenu od jednog plodnog lista. Plod je tobolac (Domac, 2002).

Razna istraživanja su pokazala da vrste iz roda *Plantago* sadržavaju važne kemijske spojeve poput glikozida, iridoida, triterpena, fenilpropanoida, flavonoida i fenolnih kiselina. Rod *Plantago* je medicinski značajan i zbog polisaharida koji se mogu izolirati iz sjemenaka, a primjenu mogu imati i u uklanjanju toksina (Gonçalves i Romano 2016).

Neki značajniji rodovi porodice Plantaginaceae su: *Antirrhinum*, *Cymbalaria*, *Littorella*, *Plantago*, *Digitalis*, *Veronica* (web 2).



**Slika 1.** *Plantago lanceolata* L., značajni predstavnik porodice Plantaginaceae (izvor: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration\\_Plantago\\_major0\\_clean.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration_Plantago_major0_clean.jpg))

### 2.1.1. Rod *Veronica*

Podrijetlom iz Europe i istočne Azije, vrste iz roda *Veronica* ili čestoslavice su se u povijesti koristile kao izvor hrane ili u ljekovite svrhe. Rod *Veronica* obuhvaća više od 500 vrsta cvjetnih višegodišnjih i jednogodišnjih biljaka. Vrste ovog roda karakteriziraju cvjetovi raznih boja kao što su: plava, ljubičasta, ružičasta, lila i bijela. Stabljika *Veronice* prekrivena je cjevastim, malim cvjetovima koji su skupljeni u grozdove. Cvjetovi se otvaraju od podnožja prema gore te stvaraju grozd koji nalikuje na klas (web 3). Listovi su smješteni nasuprotno te pri dnu stabljike najčešće tvore rozetu. Plod je tobolac. Smatra se da je latinsko ime *Veronica* dano po svetišci Svetoj Veroniki (15.st.) ili da je izmijenjen način pisanja od *Betonica* koji prema Pliniju Starijem potječe od keltskog naroda Betonaca (web 4).

U Hrvatskoj raste oko tridesetak vrsta roda *Veronica* (čestoslavice), a kao najljekovitija smatra se *Veronica officinalis*, ljekovita čestoslavica ili puzava čestoslavica. Spominje se kao jedna od biljaka koja pomaže u liječenju kuge. Mladi listovi se mogu dodati salatama i varivima dok se cvjetovi koriste za aromatiziranje vina i likera. Nadzemni dio biljke u cvatu, ali bez drvenastih dijelova, koristi se u ljekovite svrhe. Sušenje prikupljenih dijelova mora biti na mjestu koje je zaklonjeno od direktnog sunčevog zračenja. Osušeni dijelovi, prethodno usitnjeni, pohranjuju se u papirnatim vrećama te čuvaju na tamnom i suhom mjestu. Od kemijski aktivnih tvari biljka je obogaćena eteričnim uljem, glikozidima, trjeslovinama, flavonoidima, vitaminima i mineralima. Čestoslavica se sama ili u kombinaciji s drugim biljkama koristi u sprječavanju visokog kolesterola, upale crijeva i želuca. plućnih bolesti, bolesti jetre i gušterače, upale bubrega i mokraćnog mjehura, depresije, reume, gihta, vrtoglavice, kožnih bolesti te kod zarastanja rana. Primjerice, vrste *Veronica officinallis* L., *V. beccabunga* L. i *V. spicata* su u tradicionalnoj medicini Balkana korištene za liječenje: slezene, bubrega, jetre, uboda zmije, ekcema. Navedene vrste korištene su još i kao ekspektorant za kašalj i ispiranje grla (Vrca i sur., 2023). Od osušene, usitnjene biljke mogu se načiniti razni ljekoviti pripravci kao što su: čajevi, kapi, kupke i sokovi. Upotrebljavaju se i druge čestoslavice (web 5).

#### 2.1.1.1. *Veronica anagallis-aquatica* L.

Vodena čestoslavica (*Veronica anagallis-aquatica* L.) je zeljasta trajna biljka razgranate šuplje stabljike visoke do 100 cm. Listovi su nasuprotni i fino nazubljeni. Dvospolni cvjetovi imaju 4 svijetloplave latice te dva prašnika. Cvjetovi nastaju u pazušcima gornjih listova te su gusto skupljeni u grozdaste cvatove. Vrijeme cvatnje je od svibnja do rujna. Raste na područjima Europe i Azije, ali je raširena i po drugim kontinentima. Obitava na vlažnim mjestima, a može se naći i u plitkim vodama, potocima i rijekama. Raste na umjereno kiselim tlima (web 6).



**Slika 2.** *V. anagallis-aquatica* L. (izvor: [https://species.wikimedia.org/wiki/Veronica\\_anagallis-aquatica](https://species.wikimedia.org/wiki/Veronica_anagallis-aquatica))

#### 2.1.1.2. *Veronica persica* Poir.

*Veronica persica* potječe iz Azije i dijelova Europe. Listovi su nasuprotni, jajoliki te se izmjenjuju na gornjem dijelu stabljike. Na krajevima razgranatih stabljika nalaze se izduženi grozdovi cvjetova. Cvjetovi su cjevasti, s 4 svijetloplave do plavoljubičaste latice, bijeli pri dnu te obrubljeni tamnim prugama. Cvijet se sastoji od 2 prašnika i plodnice građene od jednog plodnog lista (web 7). Prema istraživanjima, dokazano je antibakterijsko, skolicidno i antifugalno djelovanje ekstrakata *V. persica* koja se pokazala kao djelotvorna biljka protiv herpes simplex virusa (HSV). Frakcija ekstrakta u 80%-tnom metanolu ima potencijal protiv herpes simplex virusnih infekcija (Sharifi-Rad i sur., 2018).



**Slika 3.** *V. persica* Poir. (izvor: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/veronica-persica/>)

#### 2.1.1.3. *Veronica polita* Fr.

*Veronica polita* ili siva poljska vrtnica zeljasta je biljka čija je stabljika polegnuta ili se uzdiže. Listovi su jajoliki i nazubljeni. Cvjetovi su svijetloplave boje. Na biljci se nalaze pojedinačne aksilarne peteljke koje su kraće ili malo duže od listova. Euroazijskog je porijekla uključujući zapadnu Aziju, sjevernu Afriku, Britansko otočje i Sjevernu Ameriku, ali je diljem svijeta unesena u odgovarajuća staništa kao korov za uzgoj (web 8).





**Slika 4.** *V. polita* Fr. (izvor: <https://delawarewildflowers.org/plant.php?id=2295>)

#### 2.1.1.4. *Veronica hederifolia* L.

*Veronica hederifolia* L. ili bršljanasta čestoslavica je jednogodišnja biljka sa penjajućom stabljikom. Stabljike su okrugle s nasuprotnim listovima. Pojedinačni cvjetovi rastu u pazušcima listova. Cvijet se sastoji od 4-5 blijedoljubičastih latica s tamnijim žilama. Dva su prašnika. Porijeklom je iz Euroazije, sjeverne Afrike i zapadne Azije dok je na drugim lokalitetima prisutna kao unesena vrsta i korov (web 9).



**Slika 5.** *V. hederifolia* L. (izvor: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/veronica-hederifolia/>)

## 2.2. Specijalizirani biljni metaboliti

Ugljikohidrati, bjelančevine, masti i nukleinske kiseline ubrajaju se u neizostavne molekule metabolizma svih živih organizama našeg planeta. Ove molekule proizvod su primarnog metabolizma i zato se nazivaju primarni metaboliti. Bez obzira na velike razlike među organizmima, putevi sinteze ovih kemijskih spojeva kod svih organizama su gotovo jednaki. Bez produkata primarnog metabolizma život na Zemlji bio bi nezamisliv (web 10). Isto tako i kod biljaka, primarni metaboliti uključeni su u njihov rast, razvoj i razmnožavanje. Međutim, biljke proizvode i različite kemijske spojeve koji nisu direktno uključeni u primarni metabolizam, a nazivaju se specijalizirani metaboliti. Neke od glavnih uloga specijaliziranih metabolita u biljkama su obrana od predatora i patogena, mehanička potpora te privlačenje životinja koje oprašuju biljke, ali i onih koji rasprostranjaju sjemenke. Nadalje, smatra se da pokazuju i povećanu toleranciju na niske temperature, vodni stres i teške metale. Djeluju i fotoprotektivno, a pojedini spojevi štite biljke od UV zračenja (Burčul, 2012).

Sekundarni metabolizam u biljaka izuzetno je složen proces. Enzimi, uključeni u mehanizme, najčešće su pod utjecajem okolnih čimbenika. Regulacije ovih enzima vrlo su važne u područjima znanstvenih istraživanja zbog velike primjene produkata specijaliziranih metabolita u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. S obzirom na kemijsku podjelu, u specijalizirane biljne metabolite ubrajaju se: fenolni spojevi (fenolni glikozidi, lignani, tanini, fenolne kiseline, kumarini, ksantoni, kinoni), terpeni (monoterpeni, diterpeni, triterpeni, seskviterpeni, politerpeni, giberelini, karotenoidi), iridoidi, steroidni spojevi, alkaloidi, hlapiva ulja te mnogi drugi spojevi. Neki od ovih spojeva ističu se po antibiotskom djelovanju na mnoge vrste mikroorganizama što je potvrđeno znanstvenim ispitivanjima. Primjerice, karvakrol i timol, spojevi unutar fenolne grupe sekundarnih biljnih metabolita i sastojci eteričnih ulja aromatskih biljaka (origano, majčina dušica, timijan...) pokazuju antimikrobno djelovanje. Također i kvercetin, spoj iz grupe flavonoida kojim je bogat crveni luk, ima dobro antimikrobno djelovanje. Pozitivni utjecaj na zdravlje čovjeka i sposobnost uništavanja velikog broja mikroorganizama pokazuju i katehini, spojevi koji se nalaze u čajevima. Dakle, produkti sekundarnog biljnog metabolizma djelotvorni su protiv mnogobrojnih mikroorganizama kao i protiv velikog broja patogena iz hrane (*Clostridium*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Vibrio*). Navedeni spojevi samo su neki u mnoštvu spojeva nastalih sekundarnim biljnim metabolizmom čiji se broj svakodnevno povećava zahvaljujući raznolikim znanstvenim istraživanjima (web 10). Specijalizirani biljni metaboliti razvili su se kao posljedica

nasljednih mutacija, prirodne selekcije i evolucijskih promjena. Njihov sadržaj u pojedinim stanicama, tkivima i biljnim organima mijenja se tijekom razvitka, starenja ili godišnjih doba na što utječe raspoloživost hranjivih tvari i stresni uvjeti. Kod biljaka postoje i prilagodbe koje služe kao zaštita od njihovih vlastitih obrambenih tvari (Burčul, 2012).

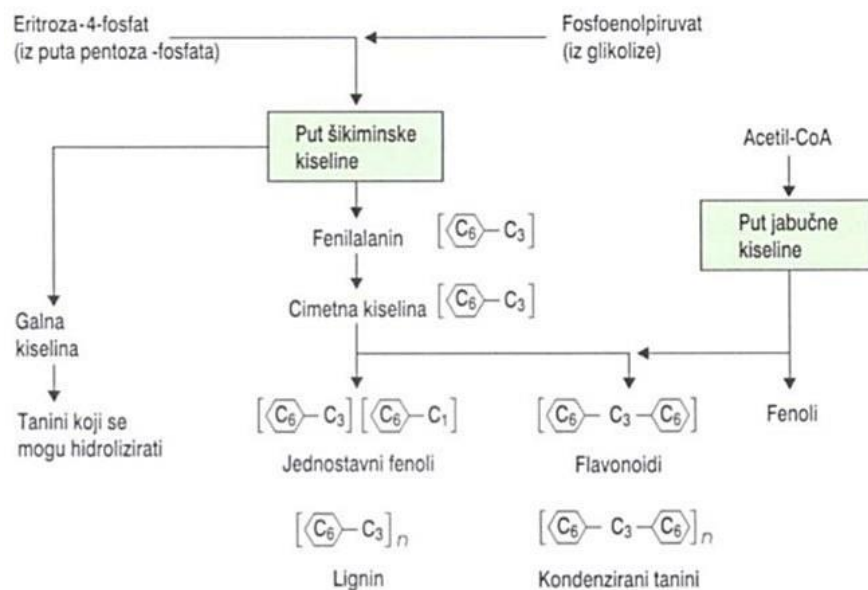
### 2.2.1. Hlapljivi spojevi u biljkama

Hlapljivi spojevi smatraju se zaslužnim za mirisna i aromatična svojstva biljaka. Eterična ulja dobivena iz listova ili cvjetova aromatičnog bilja procesom destilacije spadaju u hlapljive spojeve. Nadalje, postoje i pripravci koji se nazivaju konkretima, apsolutima i tinkturama koji predstavljaju smjesu hlapljivih spojeva. Dobivaju se postupkom ekstrakcije aromatičnih biljaka. Izolacija hlapljivih spojeva iz biljaka korisna je zbog široke primjene spomenutih pripravaka. Izolati se koriste u proizvodnji lijekova, kozmetike i parfema. Metode koje se najčešće koriste pri izolaciji hlapljivih spojeva ili njihovih smjesa su destilacija, ekstrakcija s organskim otapalima i prešanje. Kromatografske metode primjenjuju se za identifikaciju izoliranih spojeva. Eterična ulja su bistre, blago obojene tekućine. Slabo se otapaju u vodi, a dobro u organskim otapalima. Kemijski sastav eteričnih ulja i udio pojedinih sastojaka utječe na njihov miris. U eteričnim uljima prisutni su alifatski, ciklički, aciklički, zasićeni i nezasićeni ugljikovodici, ali i derivati ugljikovodika s kisikom među kojima se najviše ističu fenoli, alkoholi, ketoni, esteri i karboksilne kiseline. Neka eterična ulja sadržavaju i organske spojeve s dušikom ili sumporom. Većinom svi dijelovi biljaka, poput listova, cvjetova, plodova, podanaka i korijenja sadržavaju eterična ulja. Manja koncentracija eteričnog ulja prisutna je u drvenastim dijelovima biljaka, kori i stabljici. Eterična ulja štite biljku od mikroorganizama, životinja te nepovoljnih klimatoloških uvjeta. Također, pomažu i za vrijeme oplodnje jer mirisi eteričnih ulja privlače kukce koji te biljke oprašuju (Žilić, 2019).

### 2.2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi produkti su sekundarnog biljnog metabolizma. Za ovu skupinu spojeva značajna je fenolna odnosno hidroksilna skupina na aromatskom prstenu. Nalazimo ih u staničnom organelu biljke, vakuoli, otopljene u obliku glikozida ili estera šećera. U biljne fenole ubrajaju se mnogi kemijski spojevi od kojih su neki topljivi samo u organskim otapalima, neki u vodi, a neki su netopivi polimeri (Galić, 2020). Neki od značajnijih fenolnih spojeva u biljkama su lignin,

flavonoidi, karotenoidi, salicilna kiselina i tanin. Fenolni spojevi su prisutni u svim biljkama dok njihov sastav i količina ovisi o unutarnjim i vanjskim faktorima. Količina fenolnih spojeva ovisi o vanjskim uvjetima rasta s obzirom da sudjeluju u komunikaciji biljke s okolinom. Dokazano je da lokacija rasta biljke utječe na razinu fenolnih spojeva. Udio polifenolnih komponenata povećava se za vrijeme stresnih uvjeta u biljkama (Valentić, 2023). Fenolni spojevi povezani su s obrambenom ulogom u biljkama, međutim važni su i u drugim procesima poput ubrzavanja oprašivanja, bojenja za kamuflažu biljke te kao zaštita od herbivora (Derong i sur., 2016). Primjerice, u biljkama su otkriveni fenolni spojevi koji djeluju protiv gljivica. Pojedini metaboliti sintetiziraju se pri infekciji biljke (fitoaleksini) dok drugi djeluju kao infektivni inhibitori (fitoantocipini) (Valentić, 2023). Poznati su različiti načini nastajanja fenolnih spojeva u biljkama. Dva najvažnija su put šikiminske kiseline i put jabučne kiseline. Put šikiminske kiseline prisutan je u biosintezi većine biljnih fenola dok je put jabučne kiseline češći kod gljiva i bakterija. Putem šikiminske kiseline, aromatske aminokiseline nastaju iz ugljikohidratnih prekursora u ciklusu pentoza-fosfata i glikolize. Put šikiminske kiseline pojavljuje se u biljkama, bakterijama i gljivama, ali ne i kod životinja. Životinje nemaju put za sintezu aromatskih kiselina kao što su fenilalanin, triptofan i tirozin (Galić, 2020). Fenolni spojevi povezani su s pozitivnim učincima na ljudski organizam. Voće i povrće glavni su izvor ovih spojeva u prehrani čovjeka. Na temelju raznih izvješća, fenolni spojevi su pokazali svoju važnu ulogu u suzbijanju raznih ljudskih bolesti. Istraživanja su pokazala da fenolni spojevi djeluju u sredstvima protiv starenja, antioksidativnim, antiproliferativnim te protuupalnim sredstvima. Biljni polifenoli reguliraju metabolizam ugljikohidrata, ublažavaju hiperglikemiju, poboljšavaju metabolizam masnog tkiva, ublažavaju oksidativni stres i upalne procese. Nadalje, mnoga istraživanja su pokazala da ekstrakti bogati polifenolima povoljno utječu na hipertenziju s ciljem normalizacije krvnog tlaka (Derong i sur., 2016).

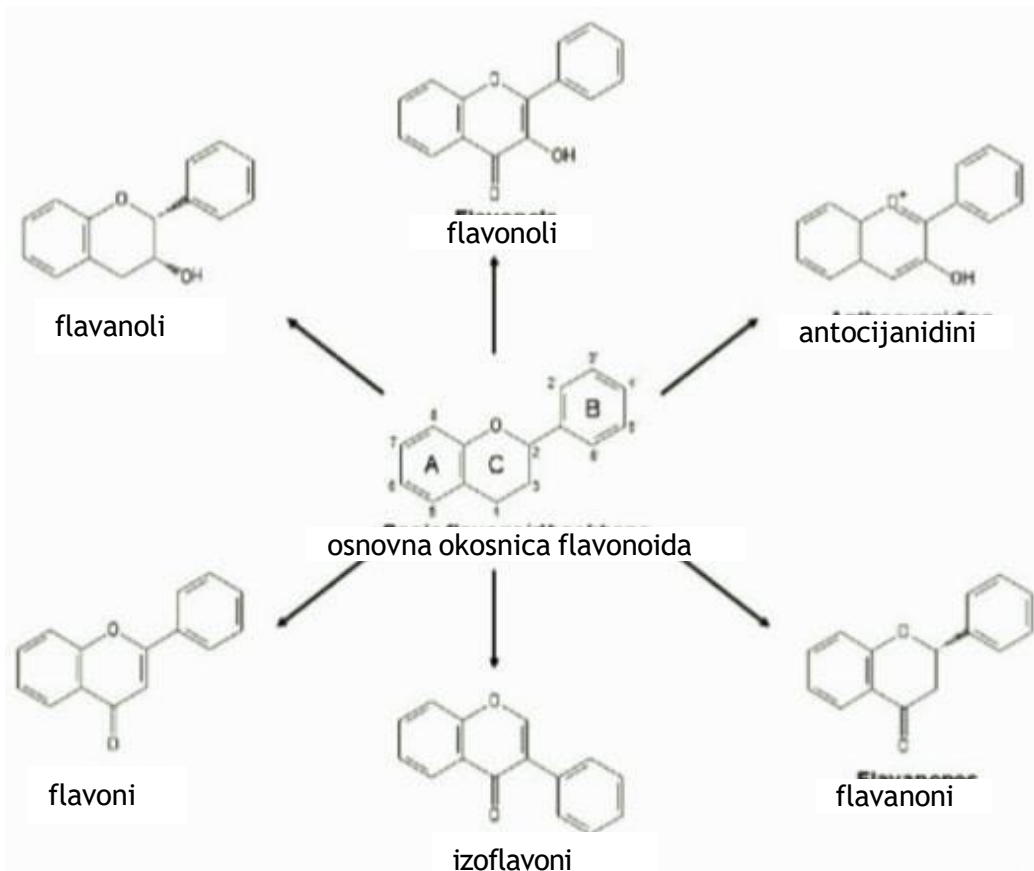


**Slika 6.** Put jabučne i šikiminske kiseline (izvor: Galić, 2020, Pevalek-Kozlina, 2003).

### 2.2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najveća skupina među fenolnim spojevima. Poznato je oko 10 000 flavonoida. Njihova građa se sastoji od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u 2 aromatska prstena povezana piranskim prstenom. U prirodi postoje u slobodnoj formi ili formi glikozida. Flavonoidi se dijele na: flavanole, flavonole, flavone, izoflavone, antocijanidine i flavanone. Na polarnost određenog spoja utječu supstituenti vezani na prsten stoga se mogu podijeliti na hidrofilne i lipofilne. Flavanoni, flavonoli, izoflavoni i flavoni metilirani su aglikoni te pokazuju manju polarnost, a ekstrahiraju se otopinom benzena, kloroforma, diklormetana, etil acetata ili dietil etera. Nešto polarnije vrste poput flavonoid glikozida i nekih aglikona uglavnom se izoliraju iz biljaka ekstrakcijom s alkoholima, acetonom, vodom (Renko, 2020). U biljkama se pojavljuju kao signalne molekule, imaju ulogu obrane od mikroorganizama i patogenih gljivica, potiču klijanje spora i sjemenki, štite od UV zračenja. Također, služe kao prilagodba na visoke i niske temperature, sušu i promjenu saliniteta. S obzirom da žive boje biljaka privlače oprašivače, flavonoidi time pomažu i u procesu reprodukcije (Valentić, 2023). Flavonoidi pokazuju pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka posebno u smanjenju upalnih procesa u organizmu (web 11). Skupina flavonola također pokazuje citoprotektivni učinak što znači da štite stanice, a isto tako i neurone. Studije pokazuju da je konzumiranjem flavonola, točnije voća, povrća ili čajeva koji ih sadrže, moguće

usporiti brzinu gubitka pamćenja. Također, pokazuju antioksidativna svojstva pridonoseći tako boljem funkcioniranju kardiovaskularnog sustava pri čemu je smanjena mogućnost moždanog udara (web 12).

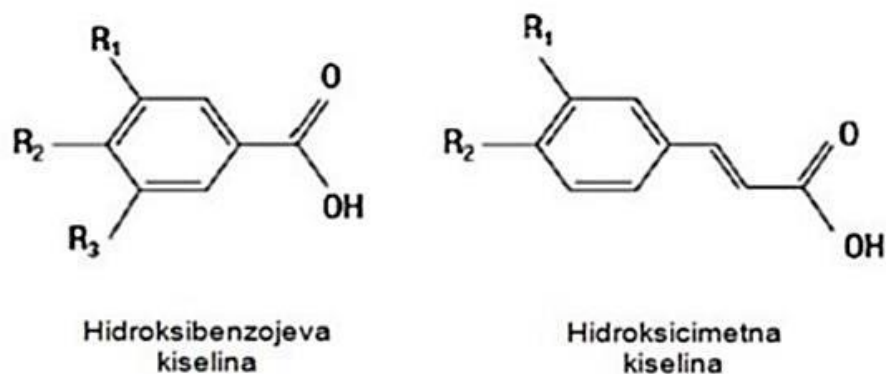


**Slika 7.** Flavonoidi (izvor: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/12/1263>)

#### 2.2.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline ubrajaju se u raznoliku skupinu fitokemikalija-fenola. Glavna struktura fenolnih kiselina je benzenski prsten povezan s karboksilnom skupinom po čemu se razlikuju dvije skupine fenolnih kiselina: hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina. Broj atoma ugljika u hidroksibenzojevoj kiselini je 7, dok hidroksicimetna kiselina sadrži 9 atoma ugljika. Fenolne kiseline razlikuju se po položaju i broju supstituenata, metoksilnih i hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu. U hidroksibenzojeve kiseline spadaju: salicilna kiselina, galna kiselina,

protokatehnična kiselina, elagična kiselina i vanilinska kiselina. Hidroksicimetne kiseline uključuju: kavenu kiselinu, feruličnu kiselinu, *p*-kumarinsku kiselinu, kininsku kiselinu i dr. U biljkama hidroksibenzojeve kiseline konjugiraju se sa organskim kiselinama ili šećerima. Biljke sintetiziraju manju koncentraciju hidroksibenzojevih kiselina. Izuzeci su crveno voće, crna rotkva i luk gdje su koncentracije kiselina nešto veće. U prirodi su zastupljenije hidroksicimetne kiseline, a javljaju se u obliku estera. Fenolne kiseline sintetiziraju se fenilpropanoidnim putem i putem šikiminske kiseline. Većina fenola u bakterijama, gljivicama i biljkama proizvodi se putem šikiminske kiseline pretvaranjem jednostavnih molekula ugljikohidrata u fenilalanin i triptofan (Bumba, 2021).



**Slika 8.** Kemijska struktura hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (izvor: Lisica, 2016)

#### 2.2.2.2.1. Salicilna kiselina

Salicilna kiselina ili *o*-hidroksibenzojeva kiselina ubraja se u skupinu fenolnih spojeva koji se sintetiziraju u biljkama. Derivat je cimetne kiseline, a nastaje putem šikiminske kiseline (Jakovac, 2017). Istraživanje termogeneze (zagrijavanje biljnih organa) dokazalo je da salicilna kiselina ima hormonsko djelovanje kod biljaka. Prilikom cvatnje u nekih biljnih vrsta dolazi do zagrijavanja. Temperatura cvatova naraste i za 10 °C zbog čega isparavaju tvari koje privlače kukce oprašivače. Za vrijeme tog procesa, koncentracija salicilne kiseline poveća se do 100 puta. Toplinska energija se oslobađa radi cijanid-rezistentnog disanja u mitohondriju kojeg izaziva salicilna kiselina. Nadalje, salicilna kiselina sudjeluje i u prijenosu signala pri kontaktu s patogenim organizmima. Njezina uloga je da regulira otpornost na biotrofne organizme. Sintetizira se u kloroplastima, a potom prelazi u citoplazmu gdje izaziva imunosnu reakciju. Salicilna kiselina povećava otpornost

i na abiotske stresne uvjete: smrzavanje, suša, UV radijacija, osmotski stres, izloženost teškim metalima. U nekim uvjetima salicilna kiselina ima utjecaj i na razvojne biljne procese kao što je klijanje sjemena, vegetativni rast, cvatnja, senescencija, disanje, fotosinteza, glikoliza. Ovakvi procesi mogu biti potaknuti ili inhibirani što ovisi o koncentraciji salicilne kiseline. Niske koncentracije salicilne kiseline potiču nakupljanje niskih koncentracija reaktivnih oblika kisika koji u tom slučaju djeluju kao signalne molekule i sudjeluju u raznim biokemijskim procesima. Visoke koncentracije salicilne kiseline utječu na nakupljanje visokih koncentracija ROS-a što za posljedicu ima oksidativni stres i smrt biljne stanice (Lazarević i Poljak, 2019).

#### 2.2.2.3. Lignin

Lignin je jedan od glavnih sastavnica stanične stijenke u biljaka. Fenolni je polimer složene strukture te velike molekularne mase. Proizvodi se u biljnim stanicama metaboličkim putem fenilalanin/tirozin. Lignin je drugi najzastupljeniji biopolimer jer sačinjava 30% organskog ugljika u biosferi. Ima važnu ulogu u rastu i razvoju biljaka. Poboljšava transport minerala u biljci, povećava krutost stanične stijenke i hidrofobna svojstva. Lignin također štiti biljni organizam od patogena. Koristi se kao energent ili za razvoj materijala, primjerice karbonskih vlakana zbog fenolnih hidroksilnih skupina i alifatskih hidroksilnih skupina u njegovoj strukturi. Lignin se dijeli u tri kategorije s obzirom na različite biljne vrste: lignin tvrdog drveta, lignin mekog drveta i lignin trava. Primjerice, laneni i kukuruzni lignin sadrže visoku koncentraciju alifatskih OH skupina to jest nemetoksilatnih fenolnih skupina koje služe u proizvodnji fenolnih smola u cilju proizvodnje poliuretana. Smatra se da lignin ima i antitumorsku aktivnost (Liu i sur., 2018).

#### 2.2.2.4. Tanin

Tanini u biljkama spadaju u skupinu polifenolnih spojeva. Nalaze se uglavnom u vakuolama ili u površinskom vosku na biljkama gdje ne ometaju biljni metabolizam. Tek nakon smrti biljne stanice mogu utjecati na metaboličke puteve. Nastaju putem šikiminske kiseline koji je poznat još kao i fenilpropanoidni put. Sadrži ih voće (grožđe, borovnica), povrće, čokolada, čajevi. Za oporan okus koji osjećamo kada pijemo vino ili jedemo voće koje nije potpuno zrelo, odgovorni su upravo tanini. Također su zaslužni za boju cvijeća i jesenskog lišća. Tanini vežu i talože proteine, a mogu stvarati komplekse i s celulozom, škrobom i mineralima. Kod biljaka, tanini se nalaze u različitim biljnim tkivima primjerice u pupovima, listovima, korijenju, sjemenkama i stabljikama. Neke od



uloga tanina u biljkama su: zaštita od smrzavanja, zaštita od grabežljivaca i patogena, inhibicija mikrobne aktivnosti. Tanini utječu na nutritivnu vrijednost raznih namirnica u ljudskoj prehrani, ali i na stočnu hranu za životinje. Dokazano je da tanini imaju većinom negativni učinak na probavljivost hrane kod životinja (web 13).

### **2.3. Biološka aktivnost specijaliziranih biljnih metabolita**

Biološki aktivne tvari iz prirode mogu imati pozitivan učinak na zdravlje. Specijalizirani metaboliti biljaka, poput polifenola, glukozinolata, karotenoida i alkaloida upotrebljavaju se kao lijekovi i arome. Polifenoli su istraživani zbog njihovih antioksidacijskih učinaka i mogućnosti sprječavanja kroničnih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i raka. Djeluju antiinflamatorno, antikancerogeno, antioksidacijski i neuroprotektivno. Iako su se dugo koristili u medicini, njihovi mehanizmi djelovanja nisu potpuno razjašnjeni (Miletić, 2022).

#### 2.3.1. Citotoksično djelovanje specijaliziranih biljnih metabolita

Citotoksičnost je sposobnost određenih kemikalija ili posredničkih stanica da unište druge žive stanice (Čelik, 2018). Djelovanje antikancerogenih biljnih derivata inducira apoptotsku staničnu smrt koja je ovisna o kaspazi ili p53 putu. Istraživanja pokazuju da polifenolni spojevi inhibiraju ključne signalne puteve koji pomažu u proliferaciji stanica karcinoma. Za metnolne i vodene ekstrakte vrsta *Veronica persica* i *Veronica polita* dokazana je citotoksična aktivnost na stanice mišjeg melanoma (Vrca i sur., 2023). Nazlić i sur. (2021) su u istraživanju potvrdili citotoksični učinak hidrolata vrsta *Veronica saturejoide* subsp. *saturejoides* i *Veronica officinalis*. Dokazali su kako hidrolati ovih dviju vrsta inhibiraju rast pojedinih staničnih linija karcinoma. Najveći uspjeh inhibicije dokazan je na stanicama raka debelog crijeva.

#### 2.3.2. Antibakterijsko djelovanje specijaliziranih biljnih metabolita

Polifenolni spojevi imaju mnogobrojne pozitivne učinke među kojima se ubraja i njihovo antibakterijsko djelovanje. Svojom funkcijom inhibiraju enzime i ionske kanale te tako sprječavaju nastanak i širenje bolesti uzrokovane bakterijskim toksinima. Naime, bakterijama nedostaje cAMP fosfodiesteraza i lipoksigenaza odnosno eukariotski enzimi za koje se smatra da su mjesta vrlo značajna kod djelovanja flavonoida (Valentić, 2023). Antimikrobni učinak protiv Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija pokazuje spoj oleuropein. Onemogućava rast i razvoj *Escherichiae*

*coli*, *Klebsiellae pneumoniae*, *Bacilli cerei*, *Salmonellae enteritidis*. Dokazano je inhibicijsko djelovanje na enterotoksin B kojeg sintetizira *Staphylococcus aureus* (Šuman, 2017).

### 2.3.3. Antioksidativno djelovanje specijaliziranih biljnih metabolita

Oksidacijski stres neuravnoteženo je stanje gdje prekomjerne koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), reaktivnih dušikovih vrsta (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), ali i vodikovog peroksida, hidroksilnih radikala, superoksidnih radikala, singletnog kisika, peroksilnog radikala, peroksinitrita i dušičnog oksida premašuju antioksidacijski kapacitet što za posljedicu ima oksidaciju različitih makromolekula poput proteina, DNA, lipida i enzima. Oksidacijski stres također može dovesti do procesa poput upalne reakcije, proliferacije stanica te apoptoze. U humanim stanicama, antioksidacijski učinak mogu imati i razni bioaktivni spojevi poput fenolnih fitokemikalija (flavonoidi, glikozidi, alkaloidi). Najveće oksidacijsko djelovanje pokazuju polifenolni spojevi. U organizmu, ovi spojevi djeluju kroz nekoliko mehanizama: uništavanje slobodnih radikala, zaštita ostalih antioksidansa (npr. vitamina E) te vezanje na oksidirajuće metalne ione inhibirajući time njihovu apsorpciju (Miletić, 2022).

## 2.4. Pripreme biljnog materijala i tehnike izolacije fenolnih spojeva

### 2.4.1. Sušenje i čuvanje ljekovitog bilja

U biljci ljekovite tvari nisu svugdje jednako raspoređene. Vanjski faktori okoliša i razvojni stadij biljke utječu na koncentraciju njenih djelatnih tvari. Prije sušenja biljke nadzemni dijelovi (cvjetovi, listovi, stabljika) se ne peru. Nakon branja biljke se istresu na čiste papire. Danas veliki sakupljači bilja sušenje obavljaju pri standardiziranim uvjetima (temperatura, vlaga). Isto tako, kod domaćinstava je važno da se sušenje odvija na prozračnom, sjenovitom i toplom mjestu kako bi se vlaga što prije isušila. Veće količine biljnog materijala pohranjuju se u višeslojnim papirnatim vrećama ili papirnatim kutijama na zračnom i suhom mjestu. Vreće i kutije moraju biti zatvorene. Vlaga je glavni uzrok oštećenja biljnog materijala jer većina biljaka ima sposobnost navlačenja vlage iz zraka što potiče razvoj plijesni (web 14).

## 2.4.2. Ekstrakcija

Prvi postupak kod izlolanja biološki aktivnih tvari iz biljaka je ekstrakcija. Prije ekstrakcije potrebna je obrada biljnog materijala i priprava uzorka (npr. usitnjavanje osušene biljke, filtracija). Svrha ekstrakcije je koncentriranje biološki aktivnih tvari odnosno odvajanje tih tvari od drugih, manje važnih tvari za ljekovito djelovanje. Ekstrakcija je proces prijenosa odgovarajuće tvari iz tekuće ili krute faze u drugu fazu u kojoj je ta tvar topljivija nego u početnoj fazi. Tvar koja se želi izdvojiti mora biti topljivija u drugoj fazi (otapalu) nego u početnom uzorku iz kojeg se ekstrahira. Različita topljivost tvari u pojedinim fazama omogućava odvajanje tvari. Pri ekstrakciji tekuće-tekuće tvar se raspodjeljuje između dvije tekuće faze (otapala) koje se ne miješaju. Ekstrakcija čvrsto-tekuće za posljedicu ima prelazak tvari iz čvrste faze u tekuću fazu ili obrnuto. Efikasnost ekstrakcije većinom ovisi o polarnosti otapala ili smjese otapala. Organski spojevi se puno bolje otapaju u organskim otapalima nego u vodi tako da se takvi spojevi uspješno ekstrahiraju iz vodenih otopina u organsku fazu. Koja će se ekstrakcijska tehnika primijeniti uvelike ovisi o polarnosti, topljivosti i strukturi tvari koja se želi odvojiti. Napredne tehnike ekstrakcije doprinose ubrzanju postupka, povećanju produktivnosti postupka te smanjenju cijene (Priščan, 2021).

### 2.4.2.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

#### 2.4.2.1.1. Destilacija vodenom parom

Destilacija vodenom parom koristi se za destilaciju biljnog materijala obogaćenog eteričnim uljem koje ima termostabilne spojeve. Termostabilne komponente se ne miješaju s vodom. Postupak se temelji na propuštanju vodene pare kroz biljni materijal nakon čega se eterično ulje zajedno sa parom kondenzira, prikuplja te dekantira (Poljanec, 2017).

#### 2.4.2.1.2. Vodena destilacija ili hidrodestilacija

Smatra se najčešćom i najstarijom metodom za izolaciju hlapljivih spojeva u laboratoriju. Za provođenje ove tehnike potreban je atmosferski tlak i temperature od 100°C. Usitnjeni biljni materijal uranja se u vodu koja se direktno zagrijava do točke vrelišta ili se zagrijava spiralna cijev. Voda isparava zajedno s biljnim komponentama, potom se kondenzira u hladilu te nakon toga sakuplja u središnjem dijelu aparature (Baranović, 2022).

#### 2.4.2.1.3. Ekstrakcija tekuće-tekuće

U ovom postupku ekstrakcije postoje dvije tekuće faze, a to je otopina koja sadrži tvar koju se treba izolirati te otapalo u tekućem stanju. Da bi se željena tvar izdvojila iz otopine, jedna faza se mora raspršiti u drugoj. Ovaj način ekstrakcije najčešće se koristi kod termolabilnih sastojaka ili azeotropnih smjesa kada je korištenje postupka destilacije nemoguće (Butorac, 2018).

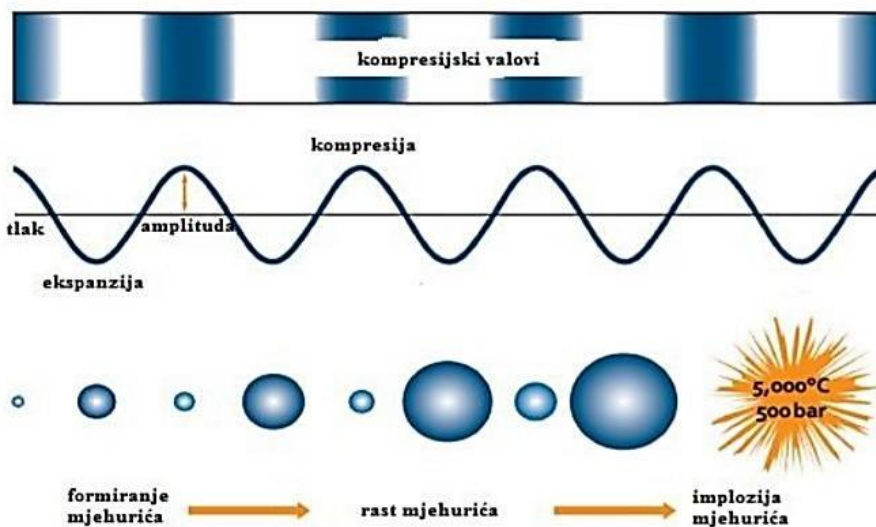
#### 2.4.2.1.4. Maceracija

Proces maceracije metoda je dobivanja ekstrakata tehnikom ekstrakcije čvrsto-tekuće. Usitnjeni biljni materijal stavi se u začepljeni spremnik s otapalom. Zatim se smjesa ostavi na sobnoj temperaturi uz često miješanje, najčešće sedam dana. Nakon toga se otopina profiltrira, a talog preša. Tekućina istisnuta iz taloga se pomiješa s dobivenim filtratom te se ponovo profiltrira. Za vrijeme postupka maceracije otapalo sporo difundira kroz staničnu stijenkku gdje otapa tvari u stanici pa je zato potrebno povremeno miješanje ili blago zagrijavanje. Također, miješanje doprinosi ubrzanju difuzije otapala koje mora dospjeti na površinu biljke. Kako bi se spriječilo isparavanje otapala i hlapljivih produkata iz biljnog materijala, potrebno je koristiti zatvoreni spremnik. Najpoznatiji macerati su dobiveni od nevena, kantariona, smilja, lavande. Maceracija hladnom vodom preko noći koristila se za pripremu čajeva i to od lista breze, koprive, maline, preslice i slično. Ljekovito bilje se potopi u vodu i ostavi stajati od 30 minuta do dva sata. Međutim, aktivne tvari nekih biljaka se ne mogu ekstrahirati u vodi, a to su primjerice list ginka i plod sikavice. Maceracija biljnog materijala može se provoditi i na povišenoj temperaturi koja pospješuje topljivost stvari u otapalu, a primjer za to bi bila priprava infuzija (čajeva). Ljekovito bilje se prelije vrućom vodom i ostavi stajati 5-15 minuta nakon čega se smjesa profiltrira. Za infuziju se upotrebljavaju listovi (breza, kadulja...), cvjetovi (kamilica) te plodovi (bijeli i crveni glog, šipak). Također, postoji i druga vrsta maceracije, a to je dekokcija. Provodi se pri ekstrakciji termički stabilnih aktivnih spojeva koji su topljivi u vodi. Većinom su to tvari iz tvrdih dijelova biljke kao što su kora i korijen. Biljka se kuha u kipućej vodi (obično 5-15 minuta), a potom se hladi, cijedi ili filtrira. Maceracija se može provesti i više puta da bi se povećala koncentracija željenih aktivnih tvari (Priščan, 2021).

## 2.4.2.2. Napredne tehnike ekstrakcije

### 2.4.2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvučna ekstrakcija ili UAE (Ultrasound-assisted extraction) koristi ultrazvučne valove od 20 kHz do 2000 kHz. Navedena metoda ekstrakcije se temelji na mehaničkom efektu akustične kavitacije ultrazvučnog vala pri čemu se dodirna površina između uzorka i otapala povećava, a stanična stijenka postaje permeabilnija (Poljanec, 2017). Prilikom utjecaja ultrazvuka kavitacije potiču bubrenje stanica i probijanje staničnih stijenki što za posljedicu ima veliku brzinu difuzije kroz staničnu stijenku te lakše ispiranje komponenti stanice. Osim temperature, otapala i tlaka, za proces ultrazvučne ekstrakcije nužno je ispravno namjestiti faktore poput vremena tretiranja, frekvencije, snage ultrazvuka te distribucije zvučnih valova. Kako bi se postigla maksimalna koncentracija željenog bioaktivnog spoja, treba se optimizirati temperatura, snaga ultrazvuka te izbor otapala (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

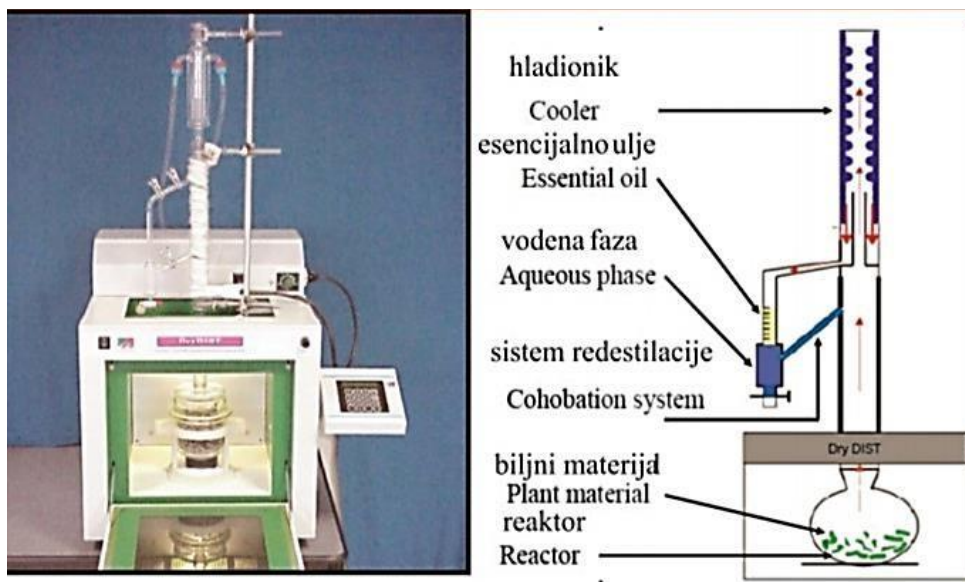


**Slika 9.** Princip ultrazvučne ekstrakcije (UAE) (izvor: Šimić, 2015)

### 2.4.2.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalno zagrijavanje hrane ima mnoge pozitivne strane poput bržeg grijanja, smanjenja vremena zagrijavanja, boljeg energetskog učinka itd. U posljednje vrijeme mikrovalno zagrijavanje ima veliku važnost u područjima analitičke i organske kemije. Osim što je jako učinkovita, ovo je metoda koja i ne onečišćuje okoliš. U novije vrijeme mikrovalna ekstrakcija

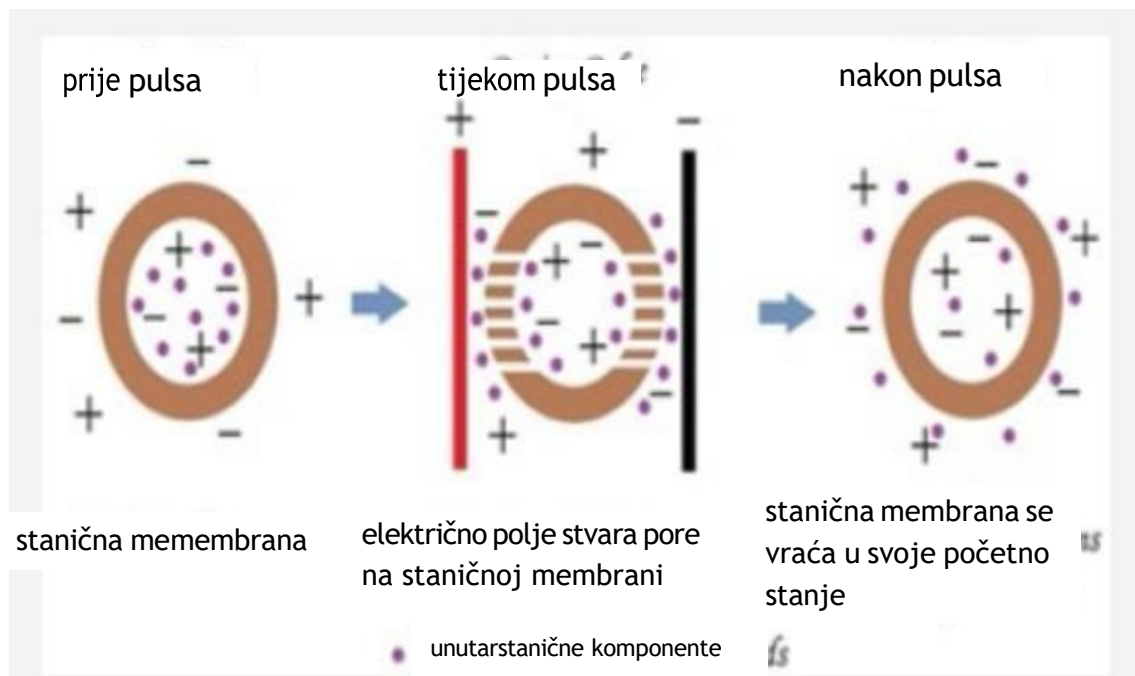
smatra se alternativnom metodom prema standardnim metodama za ekstrakciju. Mikrovalovi spadaju u dio elektromagnetskog zračenja čija frekvencija iznosi oko 2450 MHz. Značajna je primjena radiovalova u mobitelima, satelitskoj televiziji te u radarskoj tehnici. Korištenje mikrovalova pri dielektričnom zagrijavanju, započelo je u laboratorijima kasnih 70-ih godina. Da bi dielektrično zagrijavanje bilo moguće, materijal mora apsorbirati mikrovalnu energiju i pretvoriti je u toplinu. Zagrijavanjem cijelog volumena uzorka mikrovalovima oštećuju se vodikove veze inicirajući rotaciju dipola. Tako kretanje iona u otopini omogućava penetraciju otapala u matriks te se tako ostvaruje otapanje. U komercijalno dostupnim sustavima razlikuju se dvije vrste ekstrakcija, a to je ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku te ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperature. Jedan od važnih faktora u procesu mikrovalne ekstrakcije je izbor otapala. Odabrano otapalo mora dobro upijati energiju mikrovalova te imati visoku dielektričnu konstantu. Otapala kao što su voda, metanol i etanol mogu se zagrijati mikrovalnom energijom zbog svoje polarnosti. Nadalje, što je temperatura viša to je ekstrakcijski učinak bolji. Kod ekstrakcije termo-labilnih spojeva, povišene temperature mogu razgraditi ekstrakte. Snaga mikrovalova tijekom procesa ekstrakcije mora biti ispravno određena kako bi se izbjegla razgradnja termoosjetljivih supstanci koju uzrokuje prekoračenje temperature. Mikrovalna ekstrakcija značajna je u ekstrakciji fenola, pesticida, metala, jestivih ulja, masti itd. Takva ekstrakcija može potrajati i do samo nekoliko minuta pri čemu se mogu upotrijebiti manji volumeni otapala. Mogu se primijeniti i polarna i nepolarna otapala. U metodama ekstrakcije moguće je kombinirati ultrazvuk i mikrovalove zajedno radi smanjenja količine reagensa, smanjenja onečišćenja, smanjenja potrebnog vremena za razgradnju itd. (Blekić i sur., 2011).



**Slika 10.** Mikrovalna ekstrakcija (izvor: Blekić i sur., 2011)

#### 2.4.2.2.3. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem

Uporaba pulsirajućeg električnog polja provodi se tako što uzorak prolazi između dvije elektrode gdje se stvaraju pulsevi visokih napona (Gotal, 2020). Da bi se ekstrakcija uspješno provela, potrebno je namjestiti određene parametre kao što su napon, puls i vrijeme tretmana (Kalčić, 2022). Ova metoda zasniva se na punjenju kondenzatora izvorom istosmjerne struje nakon čega se kondenzatori prazne pri čemu nastaju pulsevi. Tehniku je moguće provoditi na razne načine, primjerice eksponencijalno padajućim valovima ili bipolarnim pulsevima. Pulsevi djeluju na staničnu stijenku i staničnu membranu. Pomoću pulseva visokog napona moguće je destabilizirati lipidno-proteinski sloj stanične stijenke što za posljedicu ima bubrenje i pucanje stanične stijenke. Propuštanjem kemijskih spojeva koje inače ne prolaze kroz lipidno-proteinski sloj, stanična stijenka puca, a proces se zove elektroporacija (Gotal, 2020). Istraživanja su pokazala da je mjesto djelovanja električnog polja zapravo lipidni dio stanične membrane. Pri povećanju temperature i povećane fluidnosti membrane fosfolipidni dvosloj membrane stanice prelazi iz gelaste strukture u tekuće stanje te se tako olakšava elektroporacija (Kalčić, 2022).

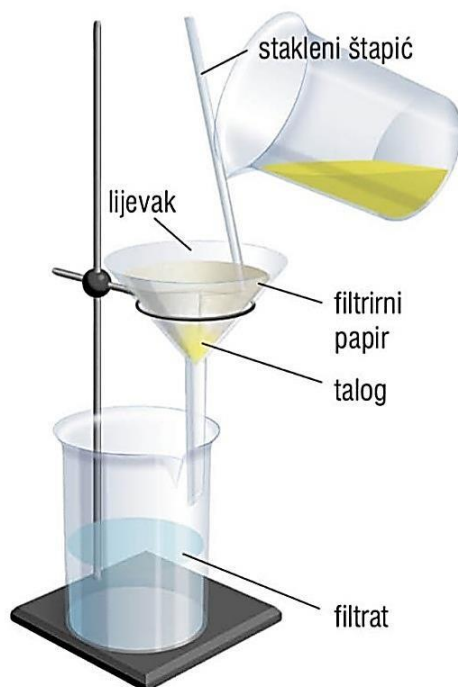


**Slika 11.** Proces ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem (izvor: <https://juniperpublishers.com/napdd/images/NAPDD.MS.ID.555657.G001.png>)

### 2.4.3. Filtracija

Filtriranje je tehnika koja se koristi kako bi se čvrste tvari odvojile od tekućina ili plinova pomoću filtarskog medija koji je propusan za tekućinu, ali ne i za krutinu. Filtrat je tekućina koja prolazi kroz filtar. Filtracija, osim u laboratoriju, prisutna je i u svakodnevnom životu. Primjerice kuhanje kave bazira se na propuštanju tople vode kroz mljevenu kavu i filter. Nadalje, bubrezi su “biološki filter” jer filtriraju krv uz pomoć glomerula, a važne molekule se reapsorbiraju natrag u krv. Postoji više vrsta filtracija. Opća filtracija je osnovni oblik filtracije gdje je sila teže značajna za filtriranje smjese. Smjesa se odozgo izlijeva na filtarski medij (najčešće je to filter papir), a gravitacija tekućinu vuče prema dolje. Čvrsta tvar se skuplja te ostaje na filteru. Neke druge vrste filtracije su: hladna filtracija, vakuumska filtracija, vruća filtracija (web 15).





**Slika 12.** Filtracija (izvor: <https://edutorij-admin-api.carnet.hr/storage/extracted/4874fe79-8302-4ea2-b516-4657ea249026/kemija-7/m01/kazalo-multimedije/index.html>)

#### 2.4.4. Centrifugiranje

Kod postupka centrifugiranja čestice ili molekule koje se nalaze u otopini rotiraju se u uređaju zvanom centrifuga. To rezultira odvajanjem tvari od okolnog medija zbog taloženja različitim brzinama. Proces se bazira na sedimentaciji čestica. Čestice veće gustoće će se istaložiti dok ostale tvari medija ostaju suspendirane. Theodor Svedberg dobio je Nobelovu nagradu 1926. za utvrđivanje da čestice različitih veličina imaju drugačije koeficijente sedimentacije. Čestice imaju specifične brzine taloženja. Različite čestice se ne ponašaju jednako pod djelovanjem centrifugalne sile koja može biti izražena u okretajima po minuti (rpm) ili kao funkcija polumjera rotora (relativna centrifugalna sila, g.) (web 16).

#### 2.4.5. Tehnike uparavanja

##### 2.4.5.1. Uparavanje rotavaporom

Rotacijski isparivači (rotavapori) uređaji su koji se upotrebljavaju za uspješno uklanjanje otapala iz otopine putem procesa isparavanja. Rotavapori koriste za kristalizaciju, sušenje, odvajanje i obnavljanje otapala uz kontinuiranu destilaciju hlapljivih otapala. Uređaj je najčešće korišten u

kemijskoj, farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji. Rad rotacijskih isparivača temelji se na smanjivanju točke vrelišta otapala primjenjivanjem sniženog tlaka. Odgovarajućom brzinom, tikvica za isparavanje se rotira gdje na unutarnjoj stijenci tikvice otapala tvore veliko područje tankog filma. Tikvica se zagrijava ravnomjerno pri čemu otapala s nižim vrelištem isparavaju. U prihvatnoj tikvici, nakon hlađenja pomoću kondenzatora, otapalo se reciklira. Hlađenje kondenzatora se provodi pomoću vode iz slavine ili suhog leda. Prednost korištenja rotavapora je da korisnici mogu ukloniti otapalo učinkovitije i brže od isparavanja pod atmosferskim tlakom (web 17).

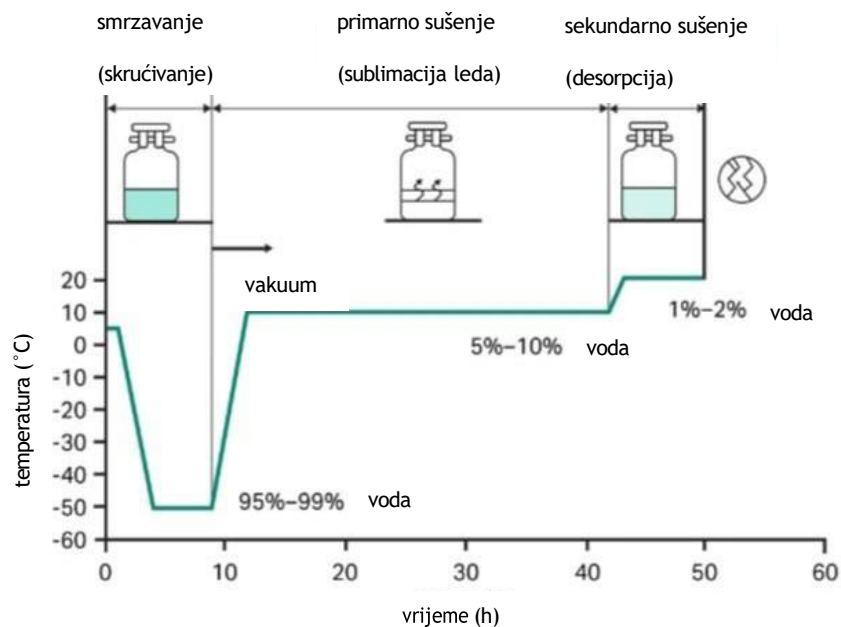


**Slika 13.** Rotacijski isparivač (izvor: <https://www.asynt.com/blog/what-is-a-rotary-evaporator/>)

#### 2.4.5.2. Liofilizacija

Sušenje smrzavanjem ili liofilizacija proces je uklanjanja vode iz određenog uzorka. Često se primjenjuje u prehrambenoj industriji za produljenje roka trajanja hrane te očuvanje pokvarljivih

materijala. Proces liofilizacije bazira se na smrzavanju materijala, smanjenjem tlaka i dovođenjem topline kako bi zamrznuta voda u uzorku sublimirala. Postoje tri faze liofilizacije, a najkritičnija je prva faza, faza zamrzavanja. Hlađenje uzorka provodi se ispod njegove trojne točke kako bi došlo do sublimacije, a ne taljenja. Tako se zadržava fizički oblik određene tvari. Druga faza odnosno faza primarnog sušenja (sublimacije) provodi se snižavanjem tlaka i dodavanjem topline uzorku kako bi voda mogla ispariti. Sublimaciju ubrzava vakuum. U drugoj fazi uklanja se oko 95 % vode iz uzorka. Završna faza procesa je sekundarno sušenje ili adsorpcija. Tijekom ove faze uklanjaju se ionski vezne molekule vode. Temperatura se podiže više nego u primarnoj fazi sušenja pri čemu se kidaju veze između molekula vode i materijala (web 18).



**Slika 14.** Proces liofilizacije (izvor:

[https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/genomics/knowledge-center/advantages-of-lyophilization\)](https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/genomics/knowledge-center/advantages-of-lyophilization)

### 3. MATERIJALI I METODE

Za vrijeme provedbe praktičnog rada u laboratoriju korišteni su sljedeći biljni materijali, kemikalije te uređaji:

Biljni materijal:

Četiri vrste roda *Veronica*:

- *Veronica anagalis-aquatica* L. (lokalitet i vrijeme branja: Podevčevo 2021.)
- *Veronica hederifolia* L. (lokalitet i vrijeme branja: Botanički vrt, 2021.)
- *Veronica persica* Poir. (lokalitet i vrijeme branja: Čaporice, 2021.)
- *Veronica polita* Fr. (lokalitet i vrijeme branja: Kaštel žegarski, 2021.)

Kemikalije:

- destilirana voda
- metanol 99,8+ % (BDH PROLABO, Ru-Ve d.o.o., Sv. Nedjelja, Hrvatska)
- 80 % etanol razrijeđen od 96 % etanola (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- ultra čista voda (MiliQ water)
- tekući dušik (Fox life, Omiš, Hrvatska)

Uređaji:

- mlinac za kavu (Kaufland Stiftung & Co. KG, Njemačka)
- tehnička vaga (Mettler toledo, Columbus, Ohio, SAD)
- ultrazvučna kupelj (Bandelin sonorex, Meckenheim, Njemačka)
- centrifuga (Hettich, universal 32 R, Kirchlangen, Njemačka)
- liofilizator (Christ, Alpha 1-4 LSC plus, Osterode am Harz, Njemačka)
- rotavapor (Buchi rotavapor R-200, Flawil, Švicarska)

#### 3.1. Priprema biljnog materijala

Prije početka praktičnog rada biljni materijal je pohranjen u kartonskim vrećicama pri sobnoj temperaturi, zaklonjen od sunca. Tako se skladišteni biljni materijal adekvatno osušio. Na početku

praktičnog rada je na tehničkoj vagi odvagano 20 grama svake od 4 prethodno osušene vrste biljke roda *Veronica*: *V. anagallis-aquatica*, *V. hederifolia*, *V. persica*, *V. polita*. Osušeni biljni materijal usitnjava se mlincem za kavu 2-3 minute te je svaka podvrsta zasebno pohranjena na sobnoj temperaturi u 4 prethodno označene Falcon epruvete. Biljni materijal je spreman za primjenu u istraživanju.



**Slika 15.** Usitnjeni biljni materijal 4 vrste roda *Veronica*: *V. hederifolia*, *V. anagallis-aquatica*, *V. persica*, *V. polita* (foto: Katarina Bačić)

### 3.2. Maceracija

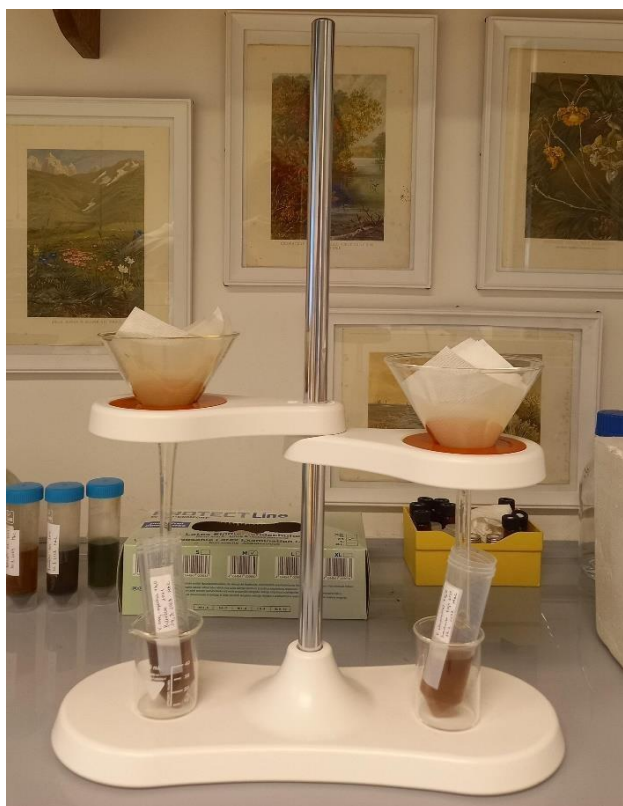
Za tehniku ekstrakcije maceracijom treba otopiti biljni materijal odbrane 4 vrste u 80 %-tnom etanolu, destiliranoj vodi i metanolu. Odvaž se 0,5 grama *V. anagallis-aquatica*, *V. hederifolia*, *V. polita* i *V. persica*. Zatim se u svaku Falcon epruvetu doda 25 mL destilirane vode. Isti postupak se ponovi za otapalo 80%-tnog etanola te otapalo metanola. Falcon epruvete su se začepljene pohranile u kutiji gdje su stajale 3 dana pri sobnoj temperaturi. Sadržaj u epruvetama je bilo potrebno povremeno promiješati staklenim štapićem kako bi se maceracija ispravno odvila. Poslije 3 dana sve Falcon epruvete centrifugiraju se 5 minuta na 4000 rpm-a. Centrifugiranje se provodi kako bi se biljni materijal istaložio na dno Falcon epruveta. Ovim postupkom omogućeno je efikasnije filtriranje uzoraka. Filtracija je process odvajanja čvrste tvari (taloga) od otopine pomoću lijevka, filter papira te stalka za lijevke. Filtrati se pohranjuju u novim, čistim Falcon epruvetama te se zatvaraju čepom preko kojeg se stavlja parafilm. Parafilm je koristan zbog zaštite uzoraka od moguće kontaminacije. Uzorci se spremaju u hladnjak za daljnje istraživanje.



**Slika 16.** Maceracija (foto: Katarina Bačić)



**Slika 17.** Centrifuga (foto: Katarina Bačić)



**Slika 18.** Filtracija (foto: Katarina Bačić)

### 3.3. Ekstrakcija ultrazvukom

Za ekstrakciju ultrazvukom odvaže se 0,5 grama biljnog materijala svake od 4 vrste te se prebaci u čistu Falcon epruvetu. U sve 4 Falcon epruvete dodaje se 25 mL destilirane vode. Cijeli se postupak ponovi isto za otapalo 80% etanola i otapalo metanola. Epruvete se začepe te preko čepa zaštite parafilmom. Kada su uzorci spremni za ultrazvučnu ekstrakciju, urone se u ultrazvučnu kupelj na 60 minuta pri temperaturi od 25° C. Nakon 60 minuta Falcon epruvete se izvade iz ultrazvučne kupelji te postavljaju na centrifugiranje. Centrifugiranje traje 5 minuta na 4000 rpm-a. Potom se uzorci filtriraju isto kao i kod postupka maceracije. Profiltrirani uzorci se stavljaju u nove Falcon epruvete te zatvaraju čepom. Čepovi se oblažu parafilmom kako ne bi došlo do kontaminacije uzorka. Uzorci se pohranjuju u hladnjaku za daljnje istraživanje. Isti postupak se ponavlja i za ultrazvučnu ekstrakciju na 60 minuta i 40° C. Nakon ekstrakcije, uzorci se centrifugiraju te potom filtriraju. Pohranjuju se u novim Falcon epruvetama te stavljaju u hladnjak za idući korak istraživanja.



**Slika 19.** Ultrazvučna ekstrakcija (UAE) (foto: Katarina Bačić)



### 3.4. Uparavanje rotavaporom

Za izolaciju fenolnih spojeva iz uzoraka treba ukloniti otapalo iz otopine pomoću rotavapora. Prije uparavanja rotavaporom, uzorci se iz Falcon epruveta prebacuju u tikvice s okruglim dnom koje su prethodno izvagane prazne na tehničkoj vagi. Pri procesu uparavanja uzoraka vodena kupelj rotavapora je zagrijana na otprilike 40 °C, a tlak postavljen na oko 130 mbara. Uparavanje metanolnih uzorka odvija se oko 5 minuta, a uparavanje etanolnih uzoraka i do 10 minuta zbog nešto veće točke vrelišta etanola. Nakon što otapala ispare, na stijenkama tikvice zaostaje suhi talog u kojem su koncentrirani fenolni spojevi. Zatim se tikvica sa suhim talogom važe te se njena masa zapisuje. Razlika u masi tikvice sa suhim talogom i prazne tikvice je zapravo masa taloga u kojem se nalaze fenolni spojevi.



**Slika 20.** Rotavapor (foto: Katarina Bačić)

### 3.5. Liofilizacija

Proces liofilizacije prolaze uzorci koji su otopljeni u vodi. Isto kao i kod procesa uparavanja pomoću rotavapora, uzorci se iz Falcon epruveta prebacuju u tikvice s okruglim dnom. Prije ovog koraka, važe se masa prazne tikvice na tehničkoj vagi. Prilikom procesa liofilizacije korišten je

tekući dušik u koji se uranjaju tikvice sa sadržajem koji treba upariti. Tikvice se vrte određenom brzinom te se otapalo zamrzava. Nakon faze zamrzavanja, slijedi faza isušivanja pri kojoj se tikvica prinosi na liofilizator na temperaturi od  $-55^{\circ}\text{C}$  i tlaku od 1000 mbara. Kada su otapala uparena, proces liofilizacije je gotov, a na stijenkama tikvice ostaje suhi talog biljnog materijala sa fenolnim spojevima. Razlika mase tikvice sa suhim talogom i prazne tikvice daje masu suhog taloga u kojem se nalaze fenolni spojevi.



**Slika 21.** Liofilizacija (foto: Katarina Bačić)

## 4. REZULTATI

Svrha istraživanja je dokazivanje u kojem otapalu i pri kojoj tehnici ekstrakcije biljni materijal daje veći prinos fenolnih spojeva iz vrsta *Veronica anagallis-aquatica*, *Veronica hederifolia*, *Veronica persica*, *Veronica polita*. Za otapalo je korištena destilirana voda, 80%-tni etanol i metanol. Provedene tehnike ekstrakcije su maceracija, ultrazvučna ekstrakcija (UAE) pri 25° C te ultrazvučna ekstrakcija (UAE) pri 40° C. Rotavapor uparava etanolne i metanolne uzorke jer ova otapala imaju niža vrelišta od same vode koju je lakše upariti liofilizatorom. Kako bi se izračunala masa suhog taloga koji je ostao na stijenkama tikvice nakon uparavanja, potrebno je oduzeti masu tikvice sa suhim talogom i masu prazne tikvice. Zatim se postotak iskorištenja fenolnih spojeva računa po formuli:  $\eta = m (\text{suhog biljnog materijala}) / m (\text{ukupna}) \times 100\%$

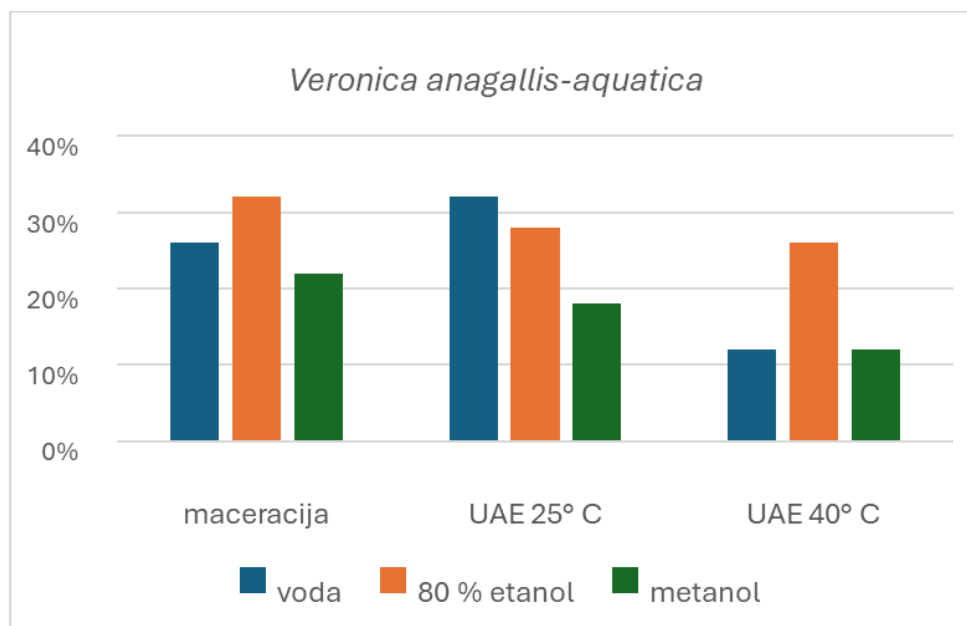
gdje je *m* (*suhog biljnog materijala*) masa suhog taloga koji je ostao na stijenkama tikvice, a *m* (*ukupna*) masa od 0.5 grama biljnog materijala koja je odvagana prije dodavanja otapala.

Postoci iskorištenja fenolnih spojeva dobiveni su za svaku od 4 vrste (*V. anagallis-aquatica*, *V. hederifolia*, *V. persica*, *V. polita*).

Tablica 1 i slika 22 pokazuju da je kod tehnike maceracije najbolji rezultat postignut s 80%-tnim etanolom kao otapalom (32%). Metodom UAE pri 25° C najveći prinos fenolnih spojeva dobiva se s destiliranom vodom kao otapalom (32%). Metoda UAE pri 40° C pokazala je najveći prinos fenolnih spojeva s 80%-tnim etanolom (26%). Od korištenih otapala, metanol je kod vrste *V. anagallis-aquatica* u obje ekstrakcije dao najmanji prinos fenolnih spojeva.

**Tablica 1.** Rezultati iskorištenja fenolnih spojeva *V. anagallis-aquatica*

<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.	H <sub>2</sub> O	EtOH	MetOH
<b>Maceracija</b>	26%	32%	22%
<b>UAE 25 °C</b>	32%	28%	18%
<b>UAE 40 °C</b>	12%	26%	12%

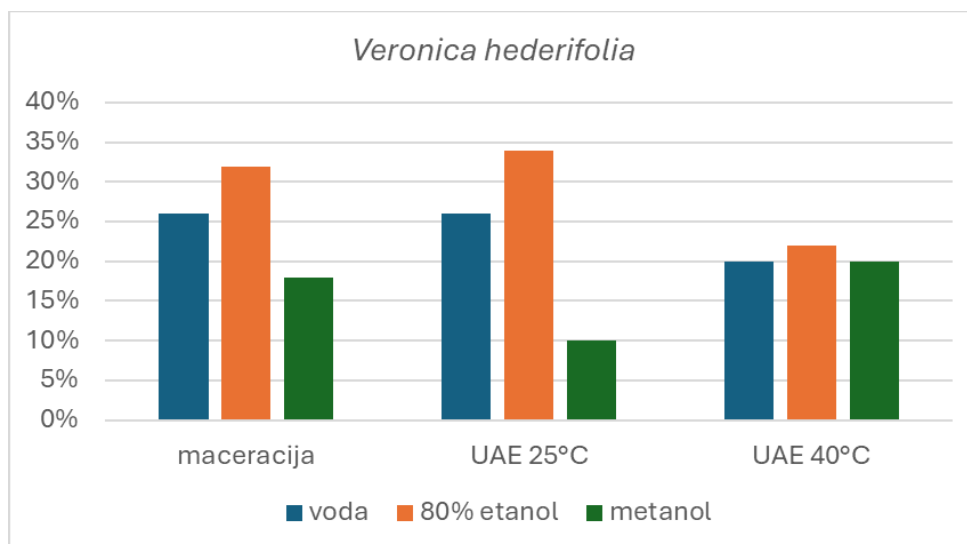


**Slika 22.** Rezultati prinosa fenolnih spojeva *V. anagallis-aquatica*

Iz tablice 2 i slike 23 za *V. hederifolia* vidljivo je da obje tehnike ekstrakcije (maceracija, UAE pri 25° C i 40° C) daju najveći prinos fenolnih spojeva u slučaju kad je 80%-tni etanol otapalo.

**Tablica 1.** Rezultati iskorištenja fenolnih spojeva *V. hederifolia*

<i>Veronica hederifolia</i> L.	H <sub>2</sub> O	EtOH	MetOH
<b>Maceracija</b>	26 %	32%	18%
<b>UAE 25 °C</b>	26%	34%	10%
<b>UAE 40 °C</b>	20%	22%	20%

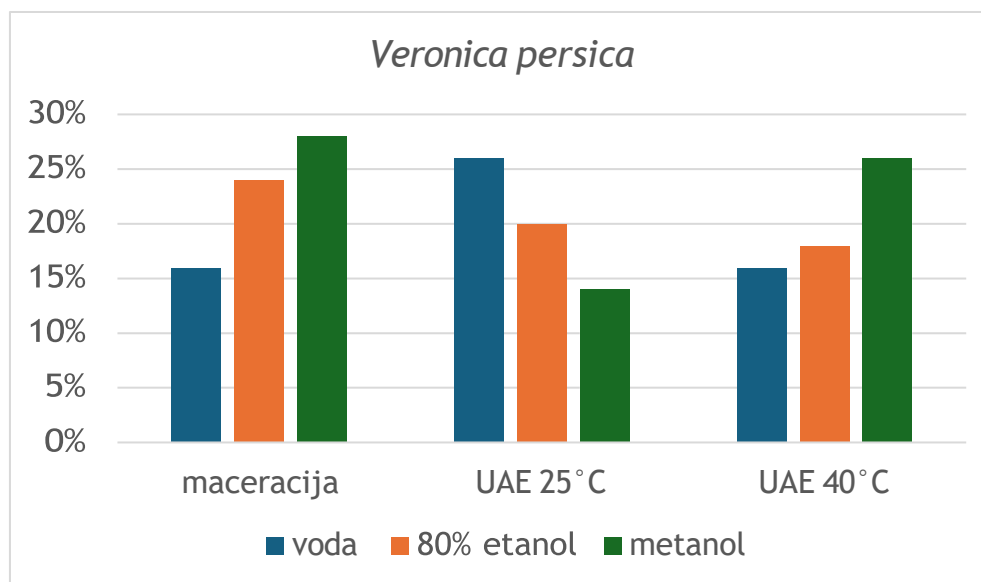


**Slika 23.** Rezultati prinosa fenolnih spojeva *V. hederifolia*

Tablica 3 i slika 24 pokazuje da kod *V. persica* postupkom maceracije najbolji prinos fenolnih spojeva daje otapalo metanola (28%). Metodom UAE pri 25° C destilirana voda pokazuje najveći prinos fenolnih spojeva (26%) dok se kod metode UAE pri 40° C metanol pokazao kao otapalo s najvećim iskorištenjem fenolnih spojeva (26%).

**Tablica 2.** Rezultati iskorištenja fenolnih spojeva *V. persica*

<i>Veronica persica</i> L.	H <sub>2</sub> O	EtOH	MetOH
<b>Maceracija</b>	16%	24%	28%
<b>UAE 25 °C</b>	26%	20%	14%
<b>UAE 40 °C</b>	16 %	18%	26%

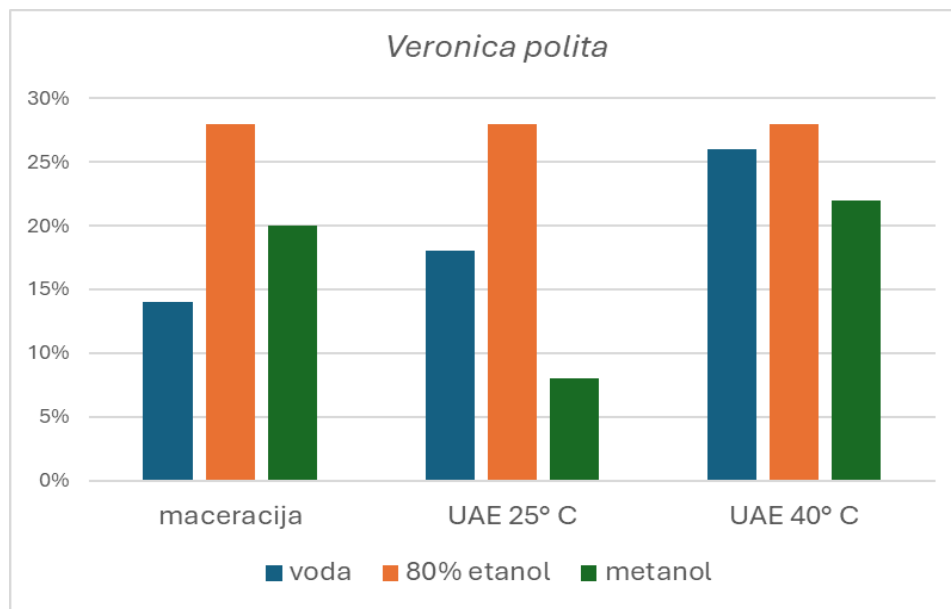


**Slika 24.** Rezultati prinosa fenolnih spojeva *V. persica*

Iz tablice 4 i slike 25 se može iščitati da se maceracija pokazala najuspješnijom s etanolom kao otapalom jer u tom slučaju daje najveći prinos fenolnih spojeva (28%). Metoda UAE pri 25°C daje najveći prinos fenolnih spojeva s etanolom kao otapalom (28%). Nadalje, metoda UAE pri 40°C je najefikasnija u prinosu fenolnih spojeva s etanolom kao otapalom (28%).

**Tablica 3.** Rezultati iskorištenja fenolnih spojeva *V. polita*

<i>Veronica polita</i> L.	H <sub>2</sub> O	EtOH	MetOH
<b>Maceracija</b>	14%	28%	20%
<b>UAE 25 °C</b>	18%	28%	8%
<b>UAE 40 °C</b>	26%	28%	22%



**Slika 25.** Rezultati prinosa fenolnih spojeva *V. polita*

## 5. RASPRAVA

Za postizanje optimalnog prinosa ekstrakcije fenolnih spojeva iz vrsta roda *Veronica*, ključnu ulogu ima otapalo u kojem će se bioaktivne komponente biljnog materijala ekstrahirati pomoću odgovarajuće tehnike ekstrakcije. Prema zelenoj kemiji jako je važno pronaći adekvatnu zamjenu za štetna organska otapala. Optimalno otapalo treba biti nezapaljivo, kemijski i fizički stabilno, male hlapljivosti, pogodno za recikliranje te ekološki prihvatljivo. Voda se smatra najboljom opcijom zbog nezapaljivosti, netoksičnosti i niske cijene. Slaba topljivost brojnih organskih spojeva u vodi te potrošnja veće energije prilikom uklanjanja vode na kraju procesa predstavljaju ograničenje njenog korištenja kao otapala (Radojčić Redovniković, 2020).

Za ovo istraživanje korištena su tri otapala (voda, 80%-tni etanol i metanol), a kao klasična metoda ekstrakcije, primijenjena je maceracija. Na dvjema različitim temperaturama (25 °C i 40 °C) provedena je ultrazvučna ekstrakcija (UAE) koja spada u napredne tehnike ekstrakcije.

Prema dobivenim rezultatima, za vrstu *V. anagallis-aquatica*, najveći prinos ekstrakcije fenolnih spojeva pri ultrazvučnoj ekstrakciji i metodi maceracije dobiven je u slučaju 80%-tnog etanola kao otapala. Za istu vrstu biljke slične rezultate potvrđuje Sušić (2023) čiji su prinosi najveći s 80 %-tnim etanolom kao otapalom kod tehnike UAE pri 40 °C i maceracije. Također, Fadić (2016) potvrđuje da je kod izolacije bioaktivnih komponenti iz cvijeta i lista trnine 70%-tni etanol izolirao ukupno više bioaktivnih spojeva.

*V. hederifolia* najveće iskorištenje prinosa ekstrakcije fenolnih spojeva daje u otapalu 80%-tnog etanola pri tehnikama UAE pri 25 °C i maceracije. Slične rezultate s 80%-tnim etanolom također dobiva Sušić (2023) kod već spomenute vrste *V. anagallis-aquatica*. Botić (2020) u svome radu dokazuje da su ekstrakti 50%-tnog etanola sadržavali veći udio fenola od drugih korištenih otapala u ekstrakciji fenolnih spojeva borovice.

Vrsta *V. persica* najveći prinos ekstrakcije fenolnih spojeva s destiliranom vodom ima postupkom UAE pri 25° C. Glasnović (2018) dokazuje da ekstrakcijom fenolnih spojeva iz listova majčine dušice u većem broju eksperimenata voda daje najveći prinos koncentracije fenolnih spojeva. Nešto veće prinose ekstrakcije fenolnih spojeva tehnikama UAE pri 40° C i maceracije pokazuju otapala 80%-tnog etanola i metanola. Ovo je u skladu s Vrca i sur. (2024) gdje je kod vrsta *V. anagallis-aquatica* i *Veronica persica* najveći prinos ekstrakcije fenolnih spojeva bio sa otapalima



80%-tnog etanola ( $32.00 \pm 1.41\%$  i  $18.00 \pm 0.00\%$ ) i čistog metanola ( $26.00 \pm 2.83\%$  i  $18.25 \pm 3.18\%$ ). Nadalje, Šimac (2018) dokazuje kako je čisti metanol najefikasnije otapalo za ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina, flavonoidnih spojeva i flavonola iz lista lovora.

Usporedbom svih korištenih tehnika ekstrakcije kod vrste *V. polita* najefikasnije otapalo je 80%-tni etanol (28% za sve tehnike ekstrakcije). Rajković (2018) dokazuje da je najveći maseni udio ukupnih fenola iz kore mandarine dobiven uporabom 50%-tnog etanola.

Uzimajući u obzir sve prethodno navedeno, u ovom ispitivanju 80%-tni etanol se pokazao kao najbolji odabir otapala jer daje najveće iskorištenje prinosa ekstrakcije fenolnih spojeva u vrstama biljaka roda *Veronica*.

Maceracija i UAE pri 25 °C su se pokazale uspješnijim tehnikama za sva tri otapala kod vrsta *V. anagallis-aquatica* i *V. hederifolia* (Tablice 1 i 2), izuzev metanolni ekstrakt *V. hederifolia*. Generalno, kod vrsta *V. persica* i *V. polita* sve su se tehnike ekstrakcije pokazale podjednako uspješnima u 80%-tnom etanolu. Nadalje, Sušić (2023) dokazuje da su se kod izolacije prinosa fenolnih spojeva iz vrste *V. anagallis-aquatica* najuspješnijim tehnikama ekstrakcije pokazale UAE pri 40 °C i maceracija, dok vrsta *V. persica* najveće iskorištenje prinosa fenolnih spojeva pokazuje metodom UAE pri 40 °C. Za vrstu *V. polita*, Lauc (2023) ističe da se najveći prinos fenolnih spojeva se dobiva metodama UAE pri 25 °C i maceracije. Međutim, kao razlog relativnih odstupanja rezultata usporedbom navedenih istraživanja, treba napomenuti ograničenost ponavljanja izvođenja mjerenja.

Prednost korištene UAE metode je brži proces izoliranja fenolnih spojeva (60 min) za razliku od maceracije koja se odvijala 3 dana. Đuran (2017) u ekstrakciji fenolnih spojeva iz komine masline ističe kako koncentracija fenolnih spojeva u otapalu za vrijeme UAE pokazuje stalni prirast što je posljedica povišenja temperature zbog ultrazvučnih valova.

## 6. ZAKLJUČAK

Fenolni spojevi kao specijalizirani biljni metaboliti odlikuju se mnogim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. Dosadašnjim brojnim znanstvenim istraživanjima dokazano je njihovo snažno antimikrobno, antikancerogeno te antioksidacijsko djelovanje. Cilj istraživanja bio je odrediti koje otapalo u provođenju dvije metoda ekstrakcije daje što veći prinos fenolnih spojeva iz pojedinih vrsta biljaka roda *Veronica*: *V. anagallis-aquatica* L., *V. hederifolia* L., *V. persica* Poir., *V. polita* Fr. Suhi biljni materijal svake vrste otopljen je u tri različita otapala: destilirana voda, 80%-tni etanol i čisti metanol. Dvije metode ekstrahiranja fenolnih spojeva biljnog materijala provedene su ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama 25 °C i 40 °C te tehnikom maceracije. U svim provedenim ekstrakcijama, 80%-tni etanol se pokazao kao generalno optimalno otapalo za ekstrahiranje fenolnih spojeva iz navedenih vrsta roda *Veronica*. Kod vrste *V. persica* primijećena su mala odstupanja od ovog zaključka jer podjednako dobre rezultate u provedenim tehnikama ekstrakcije daje i otapalo metanola. Zbog toksičnosti metanola, 80%-tni etanol i destilirana voda su bolja opcija zbog njihove ekološke prihvatljivosti. Svakako, treba naglasiti da su rezultati ovog istraživanja preliminarni zbog ograničenog ponavljanja izvođenja mjerenja. Da bi se potvrdili zaključci na dobivene rezultate, potrebno je procese ekstrahiranja biljnog materijala u otapalima višestruko izvesti.

## 7. METODIČKI DIO

<b>Ime i prezime učitelja</b>	<b>Predmet</b>	<b>Razred</b>
Katarina Bačić	Biologija	3.
<b>Nastavna tema</b> <i>Odrediti na osnovu godišnjeg izvedbenog kurikuluma (GIK).</i>		<b>Datum</b>
Fotosinteza		29.12.2023.

<b>Cilj nastavne teme</b> <i>Odrediti u skladu s ciljem poučavanja dijela nastavne teme.</i>	
usvajanje znanja o procesu fotosinteze	
<b>Ključni pojmovi</b> <i>Pojmovi koje učenik treba usvojiti uz poučavanje.</i>	<b>Temeljni koncepti</b> <i>Ideje koje učenici trebaju usvojiti na razini razumijevanja i/ ili primjene (uz pomoć konceptualnog okvira poučavanja biologije).</i>
fotosinteza, kloroplast, fotosintetski pigmenti, primarne reakcije, Calvinov ciklus, fotoliza vode, fosforilacija, primarni (asimilacijski škrob), kemosinteza, fotorespiracija, C3 biljke, C4 biljke, CAM biljke	<p>Fotosinteza je Suncem inducirani metabolički proces u kojem od ugljikova(IV) oksida i vode nastaju ugljikohidrati uz oslobađanje kisika.</p> <p>Proces fotosinteze odvija se u svim stanicama koje imaju organel kloroplast, primjerice: zeleni dijelovi biljke, alge, cijanobakterije te pojedini protoktisti (euglena).</p> <p>Fotosintetski pigmenti u kloroplastima imaju važnu ulogu u fotosintezi i to posebno klorofil <i>a</i> koji direktno sudjeluje u pretvorbi Sunčeve energije u kemijsku energiju. Osim klorofila <i>a</i> i <i>b</i>, u tilakoidnim membranama nalaze se još i pigmenti poput karotenoida i ksantofila. Fotosinteza je složen proces koji se može podijeliti u dvije skupine reakcija: primarne (svjetlosne reakcije) i sekundarne reakcije (Calvinov ciklus). Za primarne reakcije koje se odvijaju u tilakoidima kloroplasta nužna je svjetlost koja služi za stvaranje NADPH-a i ATP-a. Ova dva spoja služe kao izvor energije u Calvinovu ciklusu pomoću kojih se ugljikov(IV) oksid ugrađuje u organske spojeve. Fotoliza vode je proces cijepanja molekule vode pri čemu u primarnim reakcijama nastaju elektroni, vodikovi ioni i molekula kisika. Nadalje, za primarne reakcije značajni su procesi fosforilacije gdje nastaje ATP. Sekundarne reakcije (Calvinov ciklus) odvijaju se u stromi kloroplasta te obuhvaćaju reakcije u kojima uz pomoć NADPH-a i ATP-a dolazi do redukcije ugljikova(IV) oksida i sintetiziranja ugljikohidrata. Primarni (asimilacijski) škrob je polimerna molekula koja nastaje od viška</p>

glukoze koja se nakuplja u stromi kloroplasta. Kemosinteza je proces podmirivanja energije u kojoj organske tvari nastaju oksidacijom iz anorganskih tvari (npr. H<sub>2</sub>S) bez korištenja svjetlosne energije. Prilikom fotorespiracije ne nastaju molekule ATP-a ni šećeri, već se troši ATP i otpušta CO<sub>2</sub>. Osim C<sub>3</sub> biljaka za koje je značajno da se reakcije tame odvijaju po Calvinovu ciklusu (prva stabilna molekula ima 3 atoma ugljika), postoje i C<sub>4</sub> biljke koje se koriste dodatnim metaboličkim putem u kojem prva nastala stabilna molekula ima 4 atoma ugljika. Biljke sa dnevnim kiselinskim ritmom ili CAM biljke noću zatvaraju svoje puči te CO<sub>2</sub> ugrađuju u organske kiseline. Tijekom dana puči su zatvorene te započinje Calvinov ciklus gdje biljke koriste CO<sub>2</sub> koji nastaje razgradnjom spomenutih organskih kiselina.

**Kontekst poučavanja koncepta** *Sadržajni okvir učenja (na kojim će se primjerima učiti).*

Na temelju preparata prereza lista graha učenici uočavaju biljne organele kloroplaste pomoću mikroskopa. Metodom razgovora, nastavnica objašnjava važnost kloroplasta i pigmenta klorofila u procesu fotosinteze.

Uz shematske prikaze fotosintetskog procesa, učenici usvajaju temeljne mehanizme primarnih (svjetlosnih reakcija) te reakcija Calvinovog ciklusa. Grafičkim prikazima nastavnica tumači kako čimbenici okoline utječu na intezitet fotosinteze. Metodom razgovora nastavnica pojašnjava kako C<sub>4</sub> biljke i CAM biljke imaju posebne načine za nakupljanje ugljikovog (IV) oksida što im omogućava obavljanje fotosinteze u slučaju kada su puči zatvorene.

**Odgojno-obrazovni ishodi** *Odabрати i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.*

<b>BIO SŠ B.3.1.</b>	Analizira regulacijske mehanizme održavanja homeostaze na razini stanice i organizma.
<b>BIO SŠ C.3.1.</b>	Analizira procese kruženja tvari, vezanja i pretvorbi energije na razini stanice povezujući ih s funkcioniranjem organizma.
<b>BIO SŠ C.3.2.</b>	Analizira principe iskorištavanja energije na razini stanice.
<b>BIO SŠ D.3.1.</b>	Primjenjuje osnovna načela i metodologiju znanstvenoga istraživanja kritički prosuđujući rezultate i opisuje posljedice razvoja znanstvene misli tijekom povijesti.

**Primjeri:**

OŠ PRJ A.5.1. Učenik objašnjava temeljnu građu prirode

BIO OŠ B.8.4. Povezuje različite načine razmnožavanja organizama s nasljeđivanjem roditeljskih osobina i evolucijom.

BIO SŠ C.3.2. Analizira principe iskorištavanja energije na razini stanice.

**Očekivanja međupredmetnih tema** *Odabrati i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.*

osr A.5.3. Razvija svoje potencijale.

osr B.5.2. Suradnički uči i radi u timu.

Br. Ishoda u razradi(RI/IA)	<b>Razrada ishoda</b> <i>Koristiti prema Kurikulumu.</i> <b>Ishodi aktivnosti</b> <i>Prema potrebi dodati i specifično razraditi ishod iz razrade ishoda.</i>	<b>Zadatak/ primjer pitanja za provjeru</b> <i>Pitanja trebaju polaziti od razine propisane Kurikulumom (minimum), ali treba planirati i pitanja više razine usvojenosti.</i>	KR	PU
<b>B.3.1.</b>	-Analizira uloge staničnih dijelova u održavanju homeostaze uočavajući sinergiju staničnih dijelova. -Povezuje homeostazu stanice s homeostazom organizma. -Objašnjava utjecaje abiotičkih i biotičkih čimbenika na homeostazu stanice i organizma opisujući njihov odgovor.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kako molekule ATP i NADPH stvorene primarnim reakcijama fotosinteze doprinose stvaranju ugljikohidrata u Calvinovom ciklusu?</li> <li>- Zašto je stvaranje ugljikohidrata u stromi kloroplasta važno za fotosintetske organizme?</li> <li>- Objasni kako intezitet svjetlosti, temperatura te koncentracija CO<sub>2</sub> mogu utjecati na intezitet fotosinteze.</li> </ul>	R2  R2  R3	+/-  +  +/-
<b>C.3.1.</b>	-Analizira osnovne metaboličke procese na razini stanice.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Koji su produkti procesa fotosinteze?</li> <li>- Zašto se klorofil <i>a</i> smatra pigmentom vrlo značajnim za proces fotosinteze?</li> </ul>	R1  R2	+  +/-
<b>C.3.2.</b>	-Povezuje iskorištavanje energije s okolišnim uvjetima i brojem staničnih tvorba u različitim stanicama.	- Objasni kako štapićaste i mezofilne stanice lista doprinose učinkovitoj fotosintezi kod C4 biljaka?	R2	+/-

<b>D.3.1.</b>	<p>-Prikuplja podatke uz donošenje zaključaka tijekom učenja i poučavanja.</p> <p>-Obrađuje podatke uz odgovarajuću kvalitativnu i kvantitativnu analizu.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Na koji način proces fotosinteze doprinosi kruženju ugljika u prirodi?</li>   <li>- Kako fotosinteza doprinosi održavanju učinka staklenika?</li> </ul>	<p>R3</p> <p>R3</p>	<p>+/-</p> <p>+/-</p>
<p><b>Kognitivna razina (KR):</b> I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema  <b>Procjena uspješnosti učenja (PU):</b> - odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika  <b>Br. ishoda u razradi (RI):</b> dodati prema odgovarajućem broju iz dokumenta Kurikuluma Prirode i Biologije - numerirana razrada ishoda (npr. OŠ PRI A.5.1.2 Uočava na temelju praktičnih radova da su tvari građene od sitnih čestica; BIO OŠ B.8.4.9. Povezuje mitozu s razmnožavanjem jednostaničnih te s rastom i obnavljanjem višestaničnih organizama; BIO SŠ Č.3.2.2. Analizira prijenos tvari kroz membranu/membranom s aspekta korištenja energije)  <b>(IA):</b> broj ishoda aktivnosti generirati prema nadređenom broju (RI) ishoda u razradi (npr. OŠ PRI A.5.1.2.1. Zaključuje na temelju praktičnog rada da je u morskoj vodi otopljena sol.)</p>				

## Tijek

Artikulacija (pregledni nacrt nastavnog sata) - Kratki tablični pregled strukture nastavnog sata s iskazanim dominantnim aktivnostima i sociološkim oblicima rada te predviđenim trajanjem za svaki strukturni element sata (po potrebi dodati retke tablice). Uz svaku aktivnost obavezno navesti oznaku ishoda u razradi (prema Kurikulumu Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda) koji se njome ostvaruje.

Tip sata	Obrada novog nastavnog sadržaja		Trajanje	Jedan sat			
BR. NASTAVNOG SATA/	STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA	DOMINANTNA AKTIVNOST	BR. ISHODA I MPT OČEKIVANJA	KORISTITI	METODA	OBLIK RADA	TRAJANJE (min)
U	Početni dio	<p>Na početku nastavnog sata pozdravljam učenike i predstavljam se. Zatim formiram 4 grupe učenika. Dvije grupe učenika dobivaju slikovne prikaze živih bića kopnenog svijeta od kojih moraju složiti hranidbeni lanac (od proizvođača do krajnjeg potrošača) dok druge dvije grupe na isti način slažu slikovne prikaze hranidbenog lanca vodenog svijeta. Nakon određenog zadatka, pitanjima provjeravam učenike njihovo razumijevanje principa hranidbenog lanca. Na prvom slajdu im pokazujem točan poredak organizama u hranidbenom lancu kojeg su trebali sastaviti. Koja je osnovna razlika između organizama na samom dnu hranidbenog lanca od onih poviše njih? (organizmi na dnu hranidbenog lanca su autotrofi odnosno proizvode sami sebi hranu dok su ostali organizmi potrošači te hrane ili heterotrofi, R2). Učenicima pojašnjavam kako organizmi s dna hranidbenog lanca poput biljaka, algi, cijanobakterija i nekih protoktista proizvode hranu procesom fotosinteze te im govorim da je to tema ovog nastavnog sata. Na ploču zapisujem naslov nastavne teme: Fotosinteza.</p>	D.3.1.	PP  P	R  F  F	G	5 min

Središnji dio	<p>Na drugom slajdu tumačim slikovni prikaz procesa fotosinteze. Koji su reaktanti, a koji produkti fotosinteze? (fotosinteza je metabolički proces u kojem uz pomoć Sunčeve energije od anorganskih spojeva ugljikovog (IV) oksida i vode nastaju ugljikohidrati i kisik, R1). Učenicima dijelim radne listove i već pripremljene mikroskopske preparate na kojima se nalazi presjek lista graha. Učenici u grupama promatraju preparat na mikroskopu. Postavljam im pitanje što uočavaju na mikroskopskoj slici. Na preparatu pod mikroskopom se primjećuju zeleni okrugli organeli u biljnim stanicama. Koji su to organeli? (kloroplasti, R1). Učenici u radnom listu crtaju prikazane organele na mikroskopskom preparatu. Pojašnjavam da se proces fotosinteze odvija u kloroplastima. Na četvrtom slajdu prikazana je slika strukture kloroplasta i njegovih dijelova. Imaju li samo biljke kloroplaste? (kloroplaste, osim zelenih dijelova biljaka, imaju alge, cijanobakterije te neki protoktisti, R2). Na petom slajdu prikazana je struktura molekule klorofila i njegov apsorpcijski spektar. Zašto je klorofil ključan u procesu fotosinteze? (od svih pigmenata u biljnim stanicama samo klorofil <i>a</i> ima sposobnost pretvorbe Sunčeve energije u kemijsku energiju, R2). Koji dio Sunčevog spektra apsorbira klorofil? (klorofil <i>a</i> dobro apsorbira plavi i crveni dio vidljivog spektra elektromagnetskog zračenja, a slabo apsorbira zeleni dio spektra, R2). Na šestom slajdu prikazan je proces fotosinteze koji se dijeli u dvije skupine. Jednom dijelu razreda zadajem da iz teksta u udžbeniku pročita o primarnim reakcijama fotosinteze, a drugom dijelu razreda zadajem da pročita o sekundarnim reakcijama fotosinteze. Zatim prozivam učenika ili učenicu da opišu što su zapamtili iz teksta te im pomažem u objašnjavanju i pojašnjavam eventualne nejasnoće. (Za vrijeme primarnih reakcija fotosinteze, molekula klorofila iskorištava Sunčevu energiju stvaranje ATP-a i NADPH-a. U sekundarnim reakcijama odnosno Calvinovom ciklusu svjetlost nije potrebna pa se pomoću nastalih molekula ATP-a i NADPH-a reducira ugljikov(IV) oksid i stvaraju ugljikohidrati, R2). Koji je najzastupljeniji protein u biosferi? (enzim RUBISCO, u Calvinovu ciklusu katalizira vezanje ugljikova(IV) oksida na molekulu ribuloza</p>	C.3.1.	PP	R	C
			RL		I
			PM	PR	
			M		
				C	F
		C.3.1.	PP		
				R	30 min
			UDŽ		
				T	I
					F
		B.3.1.		R	



	<p>difosfata iz koje će nakraju redukcijom ugljika nastati molekula glukoze, R1). Kako nastaje primarni (asimilacijski) škrob? (Ugljikohidrati nastali u Calvinovu ciklusu služe za sintezu saharoze i škroba. Saharoza je prijenosni oblik šećera. Prilikom nakupljanja viška produkata fotosinteze (šećera) u stromi kloroplasta nastaje polimerna molekula škroba, R2). Zašto se fotosinteza smatra osnovnim biološkim procesom? (Procesom fotosinteze nastaje kisik nužan za život većine organizama. Također, smanjuje se koncentracija ugljikova(IV) oksida te tako uravnotežuje temperaturu na Zemlji. Fotosinteza omogućava kruženje ugljika u prirodi kroz hranidbeni lanac, R3). Postoje li organizmi koji sebi stvaraju hranu bez utjecaja Sunčeve energije? (Da, taj proces naziva se kemosinteza te je provode samo pojedini prokarioti i to oksidacijom anorganskih tvari, R1). Na sedmom slajdu nalaze se grafički prikazi utjecaja čimbenika okoline na intezitet fotosinteze. Prozivam učenika ili učenicu da iz grafa iščitaju kako intezitet svjetlosti, koncentracija CO<sub>2</sub> i temperatura mogu utjecati na na intezitet fotosinteze. Može li enzim RUBISCO vezati kisik? (Za vrijeme suhih i toplih dana, biljke zatvaraju svoje puči kako bi spriječile gubitak vode iz listova. Tada enzim RUBISCO veže kisik, a nastali glikolat iz Calvinova ciklusa prolazi metabolički put zvan fotorespiracija, R2). Nastaju li ugljikohidrati za vrijeme fotorespiracije? (Fotorespiracijom ne nastaju šećeri, ali se troše molekule ATP što uzrokuje energetski gubitak za biljku, R2). Učenicima pojašnjavam kako kod većine biljaka prva stabilna molekula koja nastaje ima 3 ugljikova atoma (C3 biljke). Na osmom slajdu prikazane su biljke koje se koriste specifičnim metaboličkim putevima kako bi provodile fotosintezu i sa zatvorenim pučima. Koje biljke razvijaju specifične metaboličke putove u procesu fotosinteze? Kako su se biljke prilagodile na te uvjete? (Biljke koje žive u uvjetima visokih temperatura i razdoblja suše razvile su posebne prilagodbe na fotosintetske procese. To su C4 biljke čije je ime nastalo zbog 4 atoma ugljika u molekuli koja nastaje u Calvinovu ciklusu. U takvim biljnim stanicama odvija se proces fotosinteze, a ne fotorespiracije, R2). Je li učinkovitost fotosinteze veća u C3 ili u C4 biljkama? (Fotosinteza je manje učinkovita kod C3 biljaka</p>	D.3.1.		R	
		B.3.1.	PP	I	F
		C.3.2.	PP	R	F

	<p>jer one nemaju specifične metaboličke putove koji bi spriječili fotorespiraciju, R2). Učenicima govorim kako osim C4 biljaka postoje i CAM biljke. CAM biljke noću otvaraju puči te CO<sub>2</sub> ugrađuju u organske kiseline. Calvinov ciklus odvija se po danu kada su puči zatvorene, a CO<sub>2</sub> se dobiva razlaganjem organskih kiselina prethodo pohranjenih u vakuolama. Koja je osnovna razlika između C4 i CAM biljaka? (Kod CAM biljaka došlo je do vremenskog odvajanja primarnih i sekundarnih reakcija fotosinteze, R2).</p>			R		
Završni dio	<p>Na kraju sata učenici individualno rješavaju zadatke za ponavljanje u radnom listu. Provjeravam točnost riješenosti zadataka tako što prozivam učenike da pročitaju odgovore. Pojašnjavam eventualne nejasnoće.</p>	D.3.1.	RL	T R	I F	10 min
<p><b>Nositelji aktivnosti:</b> N - nastavnik, U - učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)  <b>Koristiti u izvedbi:</b> RL - radni listić za učenike, UDŽ - udžbenik, RB - radna bilježnica, P - ploča, PM - prirodni materijal, E - pokus/eksperiment, MD - model, AP - aplikacija, PP - projekcija prezentacije, VL - video lekcija, APP - digitalni alat, P/SU - platforma/sustav učenja na daljinu, V - video zapis, A - animacija, I - igra, IU - igranje uloga, RS - računalna simulacija, M - mikroskop, L - lupa, F - fleks kamera, T - tablet, MO - mobitel, OP - organizator pažnje, AL - anketni listić TM - tekstualni materijali (dodati prema potrebi)  <b>Metode:</b> PR - praktični radovi, D - demonstracija, C - crtanje, I - usmeno izlaganje, R - razgovor, T - rad na tekstu i pisanje  <b>Oblici rada:</b> I - individualno, P - rad u paru, G - grupni rad, F - frontalno</p>						

**Materijalna priprema** *Popis nastavnog materijala, izvora znanja, sredstva i pomagala, odnosno svega što je potrebno pripremiti za uspješno odvijanje nastave prema postavljenom cilju i zamišljenom planu. Treba biti uključena izvorna stvarnost kad god je to moguće, kao i nastavna sredstva te nastavna pomagala koja će se koristiti tijekom poučavanja i učenja.*

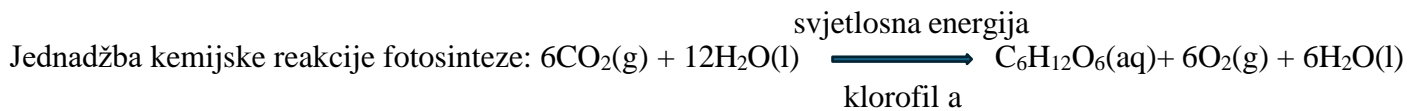
Izvorna stvarnost: mikroskopski preparat prereza lista graha

Nastavna sredstva: živa riječ nastavnika, PP prezentacija, radni list

Nastavna pomagala: LCD projektor, računalo, pokazivač, kreda, ploča

**Plan učeničkog zapisa** *Može biti plan ploče ili zapis koji nastaje na temelju drugih poticaja.*

### FOTOSINTEZA



- fotosinteza se dijeli na dvije skupine reakcija:
  1. primarne reakcije u kojima se Sunčeva energija pretvara u kemijsku energiju
  2. sekundarne reakcije (Calvinov ciklus) u kojima se redukcijom ugljikova(IV) oksida sintetiziraju ugljikohidrati

**Vrednovanje** *Različiti pristupi vrednovanju.*

Vrednovanje za učenje	Vrednovanje kao učenje	Vrednovanje naučenog
Postavljajući pitanja tijekom sata provjeravam jesu li učenici razumjeli sadržaj nastavne teme te objašnjavam moguća pogrešna poimanja.	Na kraju nastavnog sata pitam učenike jesu li razumjeli gradivo nastavne teme te pojašnjavam eventualne nejasnoće.	Na početku sata učenicima dijelim radne listove. Za vrijeme obrade nastavne teme, učenici ispunjavaju zadatke koji su vezani uz vježbu <i>Mikroskopiranje kloroplasta</i> , a na pri kraju nastavnog sata učenici u svrhu ponavljanja rješavaju određene zadatke u radnom listu. Zatim, učenike prozivam te provjeravam uspješnost usvojenosti gradiva.

**Prilagodba za učenike s teškoćama u učenju** *Naveći način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

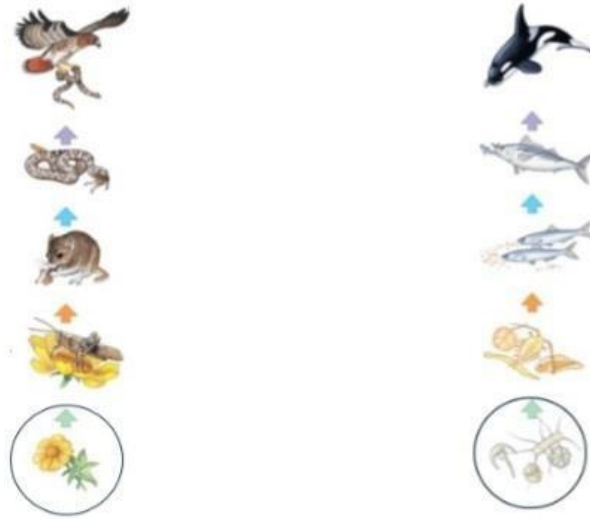
Nema učenika s poteškoćama u učenju.

**Prilagodba za darovite učenike** *Naveći način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

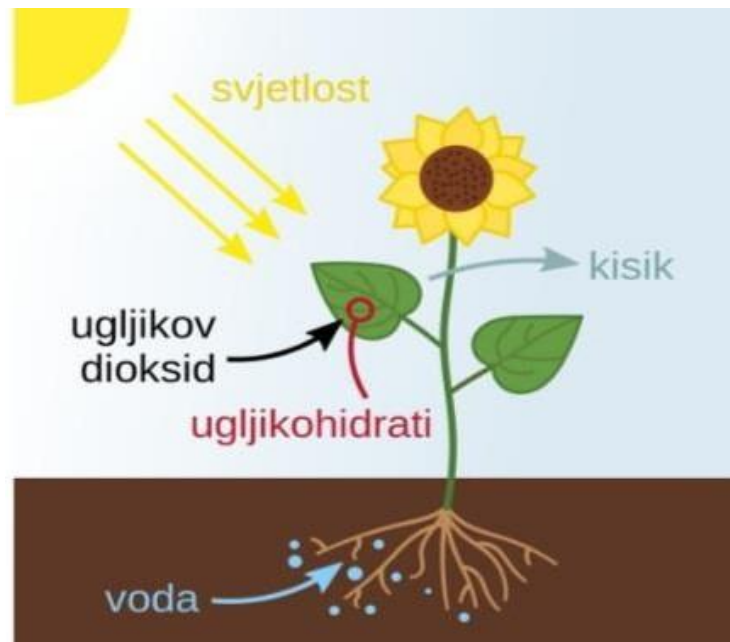
Nema darovitih učenika.

**Prilozi** Popis materijala koji će se koristiti u nastavi (radni listovi, ispis PP prezentacije i ostali materijal).

Prva kliznica



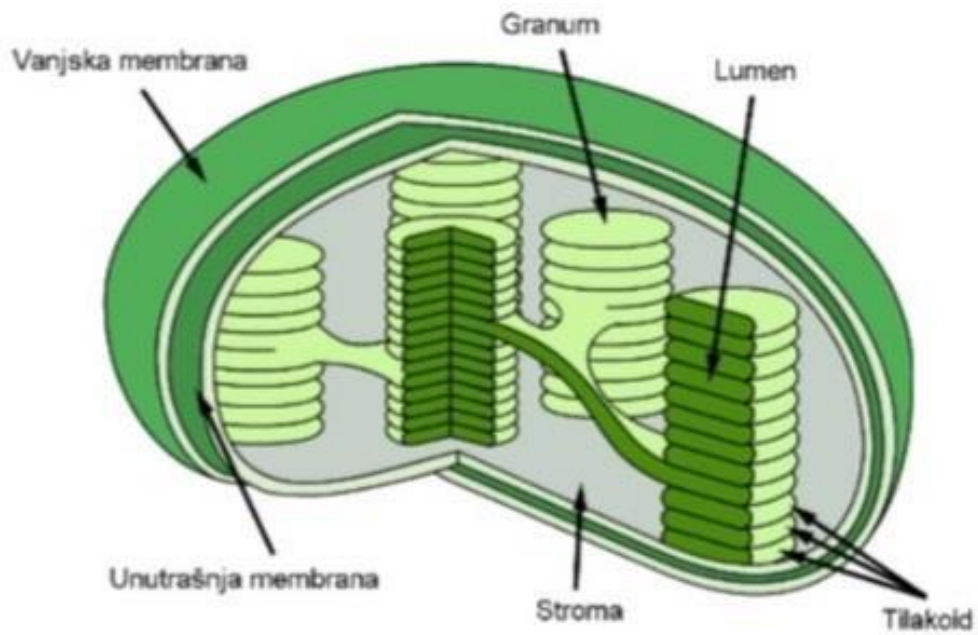
Druga kliznica



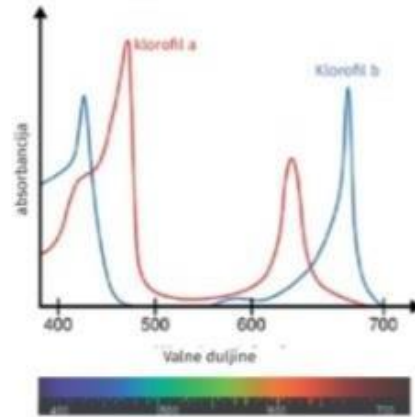
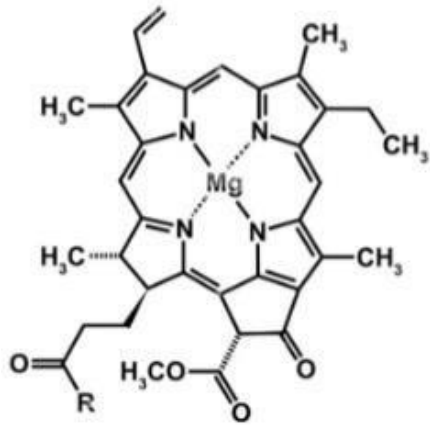
Treća kliznica



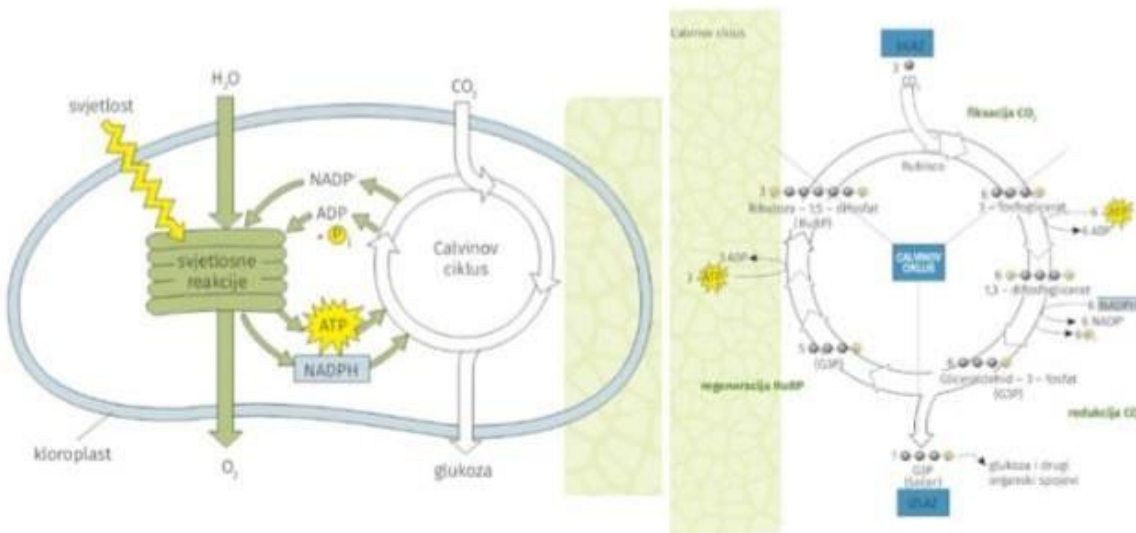
Četvrta kliznica



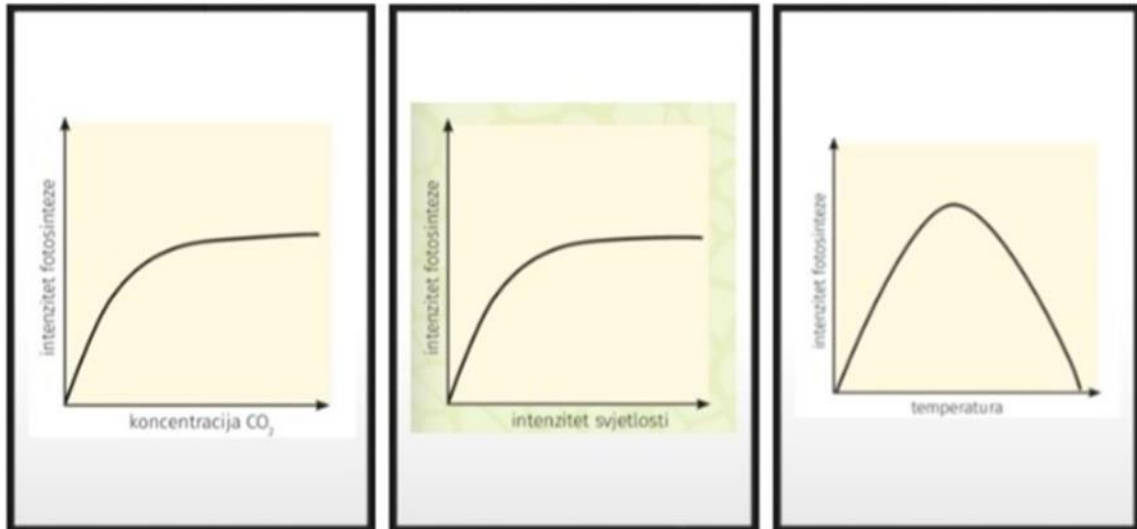
Peta kliznica



Šesta kliznica



## Sedma kliznica



### utjecaji čimbenika okoline na intenzitet fotosinteze

## Osma kliznica

### C4 biljke

- u uvjetima zatvorenih puči se odvija fotosinteza, a ne fotorespiracija
- odvajanje svjetlosnih reakcija koje se događaju u mezofilnim stanicama lista od reakcija Calvinova ciklusa koji se odvija u štapičastim stanicama
- primjeri: kukuruz, šećerna trska, razne tropske biljke



### CAM biljke

- noću otvaraju puči te ugrađuju CO<sub>2</sub> u organske kiseline
- danju zatvaraju puči te se odvija Calvinov ciklus
- primjer: sukulentne biljke





Deveta kliznica

**PONAVLJANJE**



Radni list

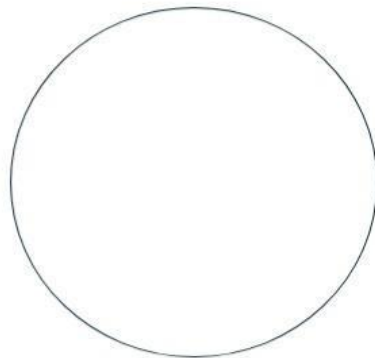
Ime i prezime:	
Datum:	



RADNI LIST  
FOTOSINTEZA

**Vježba: Mikroskopiranje kloroplasta (preparat: prerez lista biljke graha)**

Nacrtaj dio preparata koji vidiš pod mikroskopom:



1. Koji su organeli biljne stanice lista graha na mikroskopskom prikazu? Koju funkciju imaju u biljci?

---

---

---

2. Zaokruži.

Klorofil *a* slabo apsorbira zeleni dio spektra Sunčeve svjetlosti, a dobro apsorbira plavi i crveni dio spektra.      TOČNO      NETOČNO

3. Zaokruži.

Biljke imaju klorofil samo u listovima.      TOČNO      NETOČNO

## PONAVLJANJE

1. Navedi skupine organizama koje mogu obavljati fotosintezu.

\_\_\_\_\_

2. Koje su dvije skupine reakcija u procesu fotosinteze? U kojoj od ove dvije skupine nastaje glukoza?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3. Štapičaste stanice u kojima se odvija Calvinov ciklus značajne su za:

- a) C3 biljke
- b) C4 biljke
- c) CAM biljke

4. Objasni razliku između kemosinteze i fotosinteze.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Literatura** *Izvori za učenike i izvori koje je učitelj koristio za pripremu poučavanja.*

Čačev T., Horvat B., Ivandić A., Korač Šubaša A., Marceljak Ilić M., 2020., Biologija 3, udžbenik iz Biologije za 3. razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb.

**Refleksija nakon poučavanja** *Zabilješke nakon izvedbe nastavnog sata o uspješnosti sa sugestijama za poboljšanje.*

Smatram da je učenicima nastavna tema jako zanimljiva i korisna kako bi razumjeli metaboličke procese te povezali fotosintezu s procesima kruženja ugljika u prirodi.

## 8. POPIS LITERATURE

1. Baranović, L. (2022), Razlika u kemijskom profilu hidrodestilata alge *Halopteris scoparia* s obzirom na lokaciju rasta, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet.
2. Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 3 (1), str. 32-47.
3. Botić, V. (2020), Utjecaj različitih metoda i parametara ekstrakcije na fenolni profil i antioksidacijsku aktivnost borovice (*Juniperus communis L.*), Split: Kemijsko-tehnološki fakultet.
4. Bumba, V. (2021), Antioksidacijski potencijal odabranih fenolnih kiselina-teoretski pristup, Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Odjel za kemiju.
5. Burčul, B. (2012), Najotrovnije biljke i njihovi sekundarni metabolit, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.
6. Butorac, V. (2018), Utjecaj primijenjene metode ekstrakcije na izolaciju bioaktivnih komponenti iz lavande, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet.
7. Čačev T., Horvat B., Ivandić A., Korač Šubaša A., Marceljak Ilić M., 2020., *Biologija 3*, udžbenik iz Biologije za 3. razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb.
8. Çelik, T.A. (2018), Cytotoxicity, IntechOpen.
9. Derong, L., Mengshi, X., Jingjing, Z., Zhuohao, L., Baoshan, X., Xindan, L., Maozhu K., Liangyu, L., Qing, Z., Yaowen, L., Hong, C., Wen, Q., Hejun, W., Saiyan, C. (2016), An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes, *National library of medicine*, str. 19.
10. Domac, R. (2002), *Flora Hrvatske*, Zagreb: Školska knjiga.
11. Drmić, H., Režek Jambrak, A., (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 2 (2), str. 22-33.
12. Đuran, L. (2017), Ekstrakcija fenolnih spojeva iz komine masline, Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.
13. Fadić, K. (2016), Izolacija bioaktivnih komponenti iz cvijeta i lista trnine, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
14. Galić, L. (2020), Fenolni spojevi u biljkama, Osijek: Fakultet agrobiotehničkih znanosti
15. Glasnović, M. (2018), Zelena otapala u ekstrakcijama bioaktivnih komponenti i eteričnih ulja, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

16. Gonçalves, S., Romano, A., (2016) The medicinal potential of plants from the Genus *Plantago* (Plantaginaceae), *Industrial Crops and Products*, 83, 213-226.
17. Gotal, AM. (2020), Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada primjenom pulsirajućeg električnog polja, Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet.
18. Jakovac, E. (2017), Salicilna kiselina: biosinteza, metabolizam i fiziološka uloga, Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Odjel za biologiju.
19. Kalčić, P. (2022), Utjecaj pulsirajućeg električnog polja na inaktivaciju mikroorganizama, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
20. Lauc, M. (2023), Određivanje najučinkovitije metode ekstrakcije te otapala za izolaciju fenolnih spojeva iz vrsta *Veronica polita* Fr. i *Veronica chamaedrys* L., Split: Prirodoslovno-matematički fakultet.
21. Lazarević, B., Poljak, M. (2019), Fiziologija bilja, Zagreb: Agronomski fakultet, Zavod za ishranu bilja.
22. Liu, Q., Luo, L., Zheng, L. (2018) Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants, *National Library of Medicine*, str. 16.
23. Miletić, M. (2022), Selekcija biološki aktivnih tvari sa zaštitnim učincima na citotoksičnost induciranu polikloriranim bifenilima, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
24. Nazlić M., Fredotović Ž., Vuko E., Fabijanić L., Kremer D., Stabentheiner E., Ruščić M., Dunkić V. (2021). Wild species *Veronica officinalis* L. and *Veronica saturejoides* Vis. ssp. *satirejoides*-Biological potential of free volatiles, *Horticulturae* 7(9): 295.
25. Poljanec, K. (2017), Proizvodnja biljnih ekstrakata, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
26. Prišćan D. (2021), Primjena ekstrakcijskih tehnika u izolaciji medicinski aktivnih tvari iz biljaka, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.
27. Radojčić Redovniković, I. (2020), Zelena otapala, *Osvježimo znanje*, str. 670-671.
28. Rajković, A. (2018), Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija polifenola iz kore mandarine, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
29. Renko, I. (2020), Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz timijana (*Thymus vulgaris*), kadulje (*Salvia officinalis*) i lovora (*Laurus nobilis*) primjenom ultrazvuka, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

30. Sharifi-Rad, J., Roointan, A., Setzer, W.N., Sharifi-Rad, M., Iriti, M., Salehi, B. (2018) Susceptibility of *Leishmania major* to *Veronica persica* Poir. extracts - *In vitro* and *in vivo* assays, *Cellular and Molecular Biology*, str. 44-49.
31. Sušić, K. (2023), Ispitivanje različitih tehnika ekstrakcije i otapala u svrhu dobivanja većeg prinosa ekstrakata s fenolnim spojevima iz vrsta *V. persica* Poir. i *Veronica anagallis-aquatica* L., Split: Prirodoslovno-matematički fakultet.
32. Šimac, A. (2018), Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva u ekstraktima lista lovora (*Laurus nobilis* L.), Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
33. Šuman, F. (2017), Citotoksično djelovanje oleuropeina iz ekstrakta lista divlje masline na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet.
34. Valentić, D. (2023), Uloga fenolnih spojeva u obrani biljke od patogena, Zagreb: Agronomski fakultet.
35. Vrca, I., Orhanović, S., Pezelj, I., Sušić, K., Dunkić, V., Kremer, D., Nazlić, M. (2024) Identification of phenolic compounds present in three Speed-well (*Veronica* L.) species and their antioxidant potential, *Multidisciplinary digital publishing institute*, str. 16.
36. Žilić, Lj. (2019), Hlapljivi spojevi smilja, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet



Web stranice:

Web 1: <https://www.britannica.com/plant/Plantaginaceae> pristupljeno: 3.3.2024

Web 2: <https://gobotany.nativeplanttrust.org/family/plantaginaceae/> pristupljeno: 3.3.2024.

Web 3: <https://www.flower.style/flowers-we-love/veronica> pristupljeno: 15.5. 2024.

Web 4: <https://www.plantea.com.hr/cestoslavica/> pristupljeno: 4.3.2024.

Web 5: <https://gospodarski.hr/casopis/izdanja-2016/cestoslavica-za-poboljsanje-zdravlja-i-bolje-pamcenje/> pristupljeno: 6.3.2024

Web 6: <https://www.plantea.com.hr/vodena-cestoslavica/> pristupljeno: 4.3.2024.

Web 7: <https://www.minnesotawildflowers.info/flower/birds-eye-speedwell#:~:text=Flowers%20are%20tubular%2C%20about%201,stadens%20and%20a%20single%20style> pristupljeno: 3.3.2024.

Web 8: [https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica\\_polita](https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica_polita) pristupljeno: 6.3.2024.

Web 9: [https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica\\_hederifolia](https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica_hederifolia) pristupljeno: 6.3.2024.

Web 10: <https://www.vasezdravlje.com/hrana-i-zdravlje/sekundarni-biljni-metaboliti-kao-alternativa-antibioticima> pristupljeno: 6.3.2024.

Web 11: <https://vitamini.hr/znanost-industrija/znanost/prehrana-bogata-flavonoidima-povezana-s-manjim-rizikom-od-alzheimerove-bolesti-14392/> pristupljeno: 15.5.2024.

Web 12: <https://www.plivazdravlje.hr/vijesti/clanak/36845/Flavonoidi-potpomazu-kognitivne-sposobnosti.html> pristupljeno: 8.3.2024.

Web 13: <https://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/tannin.html> pristupljeno: 13.3.2024.

Web 14: [https://www.eu-krka-knin.hr/files/Prirucnik\\_ljekovito\\_bilje.pdf](https://www.eu-krka-knin.hr/files/Prirucnik_ljekovito_bilje.pdf) pristupljeno: 15.5.2024.

Web 15: <https://www.thoughtco.com/filtration-definition-4144961> pristupljeno: 24.4.2024.

Web 16: <https://hr.thpanorama.com/articles/qumica/centrifugacin-en-qu-consiste-tipos-importancia-ejemplos.html> pristupljeno: 28.4.2024.

Web 17: [https://www.asynt.com/blog/what-is-a-rotary-evaporator/#:~:text=Rotary%20evaporators%20\(rotovaps\)%20are%20devices,optimal%20extraction%20and%20distillation%20performance](https://www.asynt.com/blog/what-is-a-rotary-evaporator/#:~:text=Rotary%20evaporators%20(rotovaps)%20are%20devices,optimal%20extraction%20and%20distillation%20performance) pristupljeno: 12.4.2024.

Web 18: <https://www.millrocktech.com/lyosight/lyobrary/what-is-lyophilization/> pristupljeno: 13.4.2024.

## 9. POPIS SLIKA

**Slika 1.** *Plantago lanceolata* L., značajni predstavnik porodice Plantaginaceae (izvor:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration\\_Plantago\\_major0\\_clean.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration_Plantago_major0_clean.jpg))

**Slika 2.** *V. anagallis-aquatica* L. (izvor: [https://species.wikimedia.org/wiki/Veronica\\_anagallis-aquatica](https://species.wikimedia.org/wiki/Veronica_anagallis-aquatica))

**Slika 3.** *V. persica* Poir. (izvor: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/veronica-persica/>)

**Slika 4.** *V. polita* Fr. (izvor: <https://delawarewildflowers.org/plant.php?id=2295>)

**Slika 5.** *V. hederifolia* L. (izvor: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/veronica-hederifolia/>)

**Slika 6.** Put jabučne i šikiminske kiseline (izvor: Galić, L. (2020), Fenolni spojevi u biljkama, Osijek: Fakultet agrobiotehničkih znanosti) (izvor: Pevalsek-Kozlina, B. (2003), Fiziologija bilja)

**Slika 7.** Flavonoidi (izvor: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/12/1263>)

**Slika 8.** Kemijska struktura hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (izvor: Lisica, P. (2016), Utjecaj uvjeta ekstrakcije na izolaciju fenolnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet)

**Slika 9.** Princip ultrazvučne ekstrakcije (UAE) (izvor: Šimić, I. (2015), Ultrazvučna ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja, Zagreb: Fakultet kemijskog inženjstva i tehnologije)

**Slika 10.** Mikrovalna ekstrakcija (izvor: Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, Croat. J. Food Sci. Technol., 3 (1), str. 32-47.)

**Slika 11.** Proces ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem (izvor: <https://juniperpublishers.com/napdd/images/NAPDD.MS.ID.555657.G001.png>)

**Slika 12.** Filtracija (izvor: <https://edutorij-admin-api.carnet.hr/storage/extracted/4874fe79-8302-4ea2-b516-4657ea249026/kemija-7/m01/kazalo-multimedije/index.html>)

**Slika 13.** Rotacijski isparivač (izvor: <https://www.asynt.com/blog/what-is-a-rotary-evaporator/>)

**Slika 14.** Proces liofilizacije (izvor: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/genomics/knowledge-center/advantages-of-lyophilization>)

**Slika 15.** Usitnjeni biljni materijal 4 vrste roda *Veronica*: *V. hederifolia*, *V. anagallis-aquatica*, *V. persica*, *V. polita* (foto: Katarina Bačić)

**Slika 16.** Maceracija (foto: Katarina Bačić)

**Slika 17.** Centrifuga (foto: Katarina Bačić)

**Slika 18.** Filtracija (foto: Katarina Bačić)

**Slika 19.** Ultrazvučna ekstrakcija (UAE) (foto: Katarina Bačić)

**Slika 20.** Rotavapor (foto: Katarina Bačić)

**Slika 21.** Liofilizacija (foto: Katarina Bačić)

**Slika 22.** Rezultati prinosa fenolnih spojeva *V. anagallis-aquatica*

**Slika 23.** Rezultati prinosa fenolnih spojeva *V. hederifolia*

**Slika 24.** Rezultati prinosa fenolnih spojeva *V. persica*

**Slika 25.** Rezultati prinosa fenolnih spojeva *V. polita*

## **10. POPIS TABLICA**

**Tablica 1.** Rezultati iskorištenja fenolnih spojeva *V. anagallis-aquatica*

**Tablica 2.** Rezultati iskorištenja fenolnih spojeva *V. hederifolia*

**Tablica 3.** Rezultati iskorištenja fenolnih spojeva *V. persica*

**Tablica 4.** Rezultati iskorištenja fenolnih spojeva *V. polita*