ANTIBAKTERIJSKA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA RUTVICE (Ruta graveolens L.) DOBIVENIH OPTIMIRANOM EKSTRAKCIJOM U EUTEKTIČKOM OTAPALU KOLIN-KLORID/LIMUNSKA KISELINA

Flačer, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:598784

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Dora Flačer

ANTIBAKTERIJSKA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA RUTVICE (*Ruta graveolens* L.) DOBIVENIH OPTIMIRANOM EKSTRAKCIJOM U EUTEKTIČKOM OTAPALU KOLIN – KLORID/LIMUNSKA KISELINA

Diplomski rad

OSIJEK, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju

Diplomski rad

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti Znanstveno polje: Biologija

ANTIBAKTERIJSKA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA RUTVICE (*Ruta graveolens* L.) DOBIVENIH OPTIMIRANOM EKSTRAKCIJOM U EUTEKTIČKOM OTAPALU KOLIN – KLORID/LIMUNSKA KISELINA

Dora Flačer

Rad je izrađen na: Odjelu za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Mentor: dr.sc. Valentina Pavić**, doc.**

Kratak sažetak diplomskog rada

Rutvica *R. graveolens* je opsežno proučavana biljna vrsta zbog bogatog sadržaja fitokemikalija poput furanokumarina te flavonoida od kojih je najznačajniji rutin koji se smatra vrlo jakim antioksidansom. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako različiti uvjeti ekstrakcije listova rutvice u eutektičkim otapalima utječu na ukupni sadržaj rutina, fenolnih spojeva, antioksidacijsku i antibakterijsku aktivnost na Gram pozitivne i Gram negativne humane patogene te na taj način pronaći optimalne uvjete ekstrakcije. U provedenom istraživanju određeni su optimalni uvjeti za ekstrakciju rutina, ukupan sadržaj fenola, te ukupna antioksidacijska i antibakterijska aktivnost. Pokazalo se da postoje dobra antioksidacijska i antibakterijska aktivnost, a također su u korelaciji s ukupnim sadržajem fenola.

Broj stranica: 58
Broj slika: 21
Broj tablica: 3
Broj literaturnih navoda: 100
Broj priloga: -
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: rutvica, antioksidacijska i antibakterijska aktivnost, rutin, fenoli, eutektičko otapalo
Datum obrane: 21.12.2017.
Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr.sc. Irena Labak, doc., predsjednik
2. dr.sc. Valentina Pavić, doc., mentor i član
3. dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, doc., član
4. dr.sc. Mirna Velki, doc., zamjena člana

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek MS thesis Department of Biology

Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF RUTA EXTRACTS (*Ruta graveolens* L.) WITHIN OPTIMIZED EXTRACTION IN EUTECTIC SOLVENT CHOLINE-CHLORIDE/CITRIC ACID

Dora Flačer

Thesis performed at: Department of Biology, J. J. Strossmayer, University of Osijek,Croatia

Supervisor: PhD Valentina Pavić, Assistant Professor

Short abstract

Ruta *R. graveolens* has been extensively studied plant species due to its rich phytochemicals content such as furanocoumarins and flavonoids, the most notably is the rutin which is considered a very strong antioxidant. The aim of this study was to determine how different conditions of eutectic solvent extraction of leaflets affect the total content of rutin, phenolic compounds, total antioxidative and antibacterial activity on Gramm positive and Gramm negative human pathogens and thus find optimal conditions for extraction. Optimum conditions for rutin extraction, total phenol content and total antioxidative and antibacterial activity were determined in the study. Good antioxidative and antibacterial activity has been shown and are also correlated with the total phenol content.

Number of pages: 58
Number of figures: 21
Number of tables: 3
Number of references: 100
Original in: Croatian
Key words: ruta, antioxidative and antibacterial effect, rutin, phenols
Date of the thesis defence: 21.12.2017.
Reviewers:

1. Irena Labak, PhD, Assistant Professor, president
2. Valentina Pavić, PhD, Assistant Professor, supervisor and reviewer
3. Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, Assistant Professor, reviewer
4. Mirna Velki, PhD, Assistant Professor, substitute reviewer

Thesis deposited in

Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Departmetnt of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Valentini Pavić na strpljenju, podršci i vođenju kroz istraživanje te na savjetima tijekom pisanja ovog diplomskog rada.
Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na bezgraničnoj podršci tijekom studija te prijateljima i kolegama koji su bili uz mene od samog početka studija.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1

1.1. Rutvica (*Ruta graveolens* L.) ... 1

1.1.1. Etimologija i povijest vrste ... 1

1.1.2. Karakteristike vrste i stanište ... 1

1.1.3. Kemizam vrste ... 2

1.1.3.1. Rutin ... 2

1.1.3.2. Furanokumarini ... 3

1.1.3.3. Fenoli ... 4

1.1.4. Upotreba i farmakologija ... 5

1.1.4.1. Kardiovaskularni i antioksidativni efekti ... 5

1.1.4.2. Istraživanja na životinjama ... 5

1.1.4.3. Klinički podaci ... 6

1.1.4.4. Antibakterijska/Antifungalna funkcija ... 6

1.1.5. Toksikologija ... 6

1.2. Eutektičko otapalo ... 7

1.2.1. Prirodna eutektička otapala ... 8

1.2.2. Primjena eutektičkih otapala ... 9

1.3. Antioksidacijska aktivnost ... 10

1.3.1. Oksidativni stres ... 10

1.3.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti ... 11

1.3.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda ... 11

1.3.2.2. Željezo-kelirajuća aktivnost ... 13

1.4. Antibakterijska aktivnost ... 14

1.4.1. Bakterije ... 14

1.4.1.1. Escherichia coli ... 14

1.4.1.2. Pseudomonas aeruginosa ... 14

1.4.1.3. Bacillus subtilis ... 16

1.4.1.4. Staphylococcus aureus ... 17

1.4.2. Metode određivanja antibakterijske aktivnosti ... 18

1.4.2.1. Metoda razrijeđivanja agara (engl. *Agar dilution*) ... 18

1.4.2.2. Metoda minimalne inhibitorne koncentracije, MIC (engl. *Minimal Inhibitory Concentration*) ... 18

1.5. Cilj rada **20**
2. MATERIJALI I METODE 21
2.1. Materijal **22**
2.2. Priprava eutektičkog otapala **22**
2.3. Ekstrakcija uzoraka **22**
2.4. Određivanje rutina u ekstraktima putem HPLC-a **23**
2.5. Metode **24**
2.5.1. Određivanje koncentracije ukupnih fenola 24
2.5.1.1. Folin-Ciocalteu test 24
2.5.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti 25
2.5.2.1. DPPH analiza 25
2.5.3. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti 25
2.5.3.1. Odabir bakterija i određivanje gustoće bakterijske suspenzije 25
2.5.3.2. Hranjiva podloga 26
2.5.3.3. Priprema bakterijskih kultura 27
2.5.3.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije 27
2.6. Dizajn eksperimenta **28**
2.7. Statistička obrada podataka **29**
3. REZULTATI 30
3.1. Utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije na sadržaj rutina **31**
3.2. Utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola **33**
3.3. Antioksidacijska aktivnost (DPPH analiza) **34**
3.4. Antibakterijska aktivnost (MIC) **34**
4. RASPRAVA 39
5. ZAKLJUČCI 44
6. LITERATURA 46

1. UVOD

UVOD

1.1. Rutvica (*Ruta graveolens* L.)

Rutvica (smrdljiva rutvica, ruta, ruda, ruta vonjava) je zimzeleni polugrm s raspodijeljenim sivo-zelenim listovima i zelenkasto-žutim cvjetovima (ljeti) iz porodice Rutaceae.

1.1.1. Etimologija i povijest vrste

Latinsko ime roda *Ruta* potječe od grčke riječi *ryesthai* (spašavati) zbog ljekovitih svojstava biljke. Ime vrste *graveolens* označava jak miris (Grlić, 1990). Na stranim jezicima nalazimo je pod nazivom rutvica (engl. common rue, Herb of Grace, njem. Weinraute, fr. rue des jardins, rue fetide, tal. ruta comune, špa. ruda, port. arruda, slo. vinska rutica).

Lišće, ekstrakti i ostali dijelovi rutvice korišteni su stotinama godina kao insekticidi. U narodnoj medicini, rutvica se koristila kao antispazmatik, sedativ te kao stimulans za početak menstrualnog ciklusa. U nekim kulturama, ekstrakti rutvice korišteni su i kao abortivna sredstva (Conway i Slocumb, 1979).

U mediteranskoj tradicionalnoj medicini, rutvica je korištena za liječenje različitih plućnih stanja kao što je tuberkuloza, za smanjenje oteklina slezene te za liječenje rana na koži (Pollio i sur., 2008). U Novom Meksiku korištena je kao čaj za liječenje ukočenosti u vratu, vrtoglavice, glavobolje, grčeva u trbuhu i problema s unutarnjim uhom. Eterično ulje jakog, gorkog okusa korišteno je i za liječenje trakavica (Paley, 2009).

1.1.2. Karakteristike vrste i stanište

Stabljika je u donjem dijelu razgranata i može narasti do 70 cm visine. Korijen je žućkastosmeđe boje, u unutrašnjosti bijel, aromatičan kao i listovi. Listovi su naizmjenični, neparno perasto jednostruko ili dvostruko razdijeljeni na zaobljene plavkastozelene listiće. Cvjetovi su dvospolni, skupljenu u gronjaste cvatove dvostrukog ocvijeća. Čašku čine četiri zelena lapa, a vjenčić je građen od četiri žute latice (Slika 1). Cvate od lipnja do kolovoza, a plod je tobolac koji sadrži smeđe sjemenke. Cijela biljka izrazito je aromatičnog mirisa. Rasprostranjena je u jugoistočnom dijelu Europe, a može se pronaći na suhim, kamenitim i siromašnim tlima (Gligić, 1953).

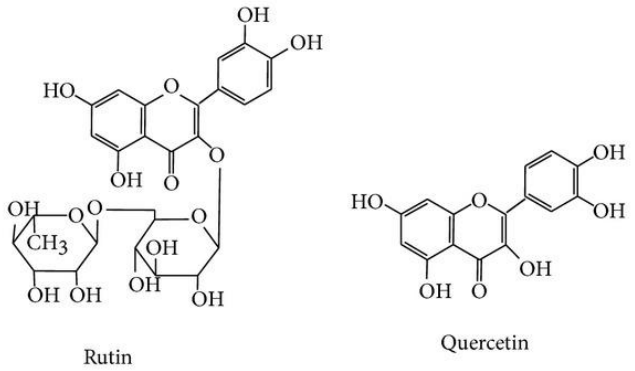
Slika 1. Fotografija cvijeta rutvice (*R. graveolens*) (Web 1)

1.1.3. Kemizam vrste

Rutvica je opsežno proučavana biljna vrsta. Sadrži mješavinu furokvinolinskih alkaloida u koncentracijama od 1.5 % od kojih su najznačajniji arborin, arborinin i gamma-fagarin (Wolters i Eilert, 1981). Akridonski alkaloidi (rutakridonski epoksid, hidroksirutakridonski epoksid) nalaze se u najvećoj koncentraciji u korijenu (Verzár–Petri i sur., 1976). Ostali alkaloidi uključuju graveolin, graveolinin, kokusaginin, rutakridon i skimijanin. Flavonoid rutin također je prisutan u biljci i smatra se da podupire i jača krvne žile, što smanjuje krvni tlak. Biljka i njeno eterično ulje bogati su derivatima kumarina koji pridonose njezinoj farmakološkoj aktivnosti. Ti derivati uključuju furokumarine kao što su bergapten, psoralen, ksantoksantin, ksantotoksin, izopimpinelin i rutamarin, te alkaloide kinolinskog tipa (Haesen i sur., 1971).

1.1.3.1. Rutin

Rutin, također poznat kao rutozid, kvercetin-3-*O*-rutinozid i soforin, je glikozid koji se sastoji od flavonol kvercetina i disaharidne rutinoze (α-L-ramnopiranozil-(1→6)-β-D-glukopiranoza). To je flavonoid citrusa koji se nalazi u širokom rasponu biljaka, uključujući agrume, a najčešće ga nalazimo u vrstama roda *Ruta* po kojem je dobio ime. Rutin, poput kvercetina, je glikozid flavonoidnih kvercetina. Kao takve, kemijske strukture oba spoja su vrlo slične, s razlikom u hidroksilnoj funkcionalnoj skupini (Slika 2). I kvercetin i rutin se koriste u mnogim zemljama kao lijekovi za zaštitu krvnih žila i sastojci su brojnih multivitaminskih preparata i biljnih lijekova (Krewson i Naghski, 1952).



Slika 2. Prikaz i usporedba strukture rutina i kvercetina (Web 2)

Rutin se kao ligand može vezati s kationima opskrbljujući biljne stanice hranjivim tvarima iz tla. Kod čovjeka se veže na željezni ion Fe^{2+}, sprječavajući njegovo vezanje na vodikov peroksid koji bi inače stvorio visoko reaktivni slobodni radikal koji može oštetiti stanice. Nadalje, pokazalo se da *in vitro* inhibira vaskularni endotelni faktor rasta u subtoksičnim koncentracijama, pa djeluje i kao inhibitor angiogeneze. Ovo otkriće može imati potencijalnu važnost za kontrolu nekih vrsta raka (Luo i sur., 2008).

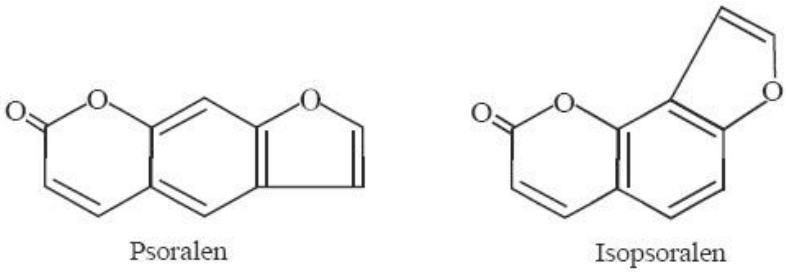
Kod miševa, štakora (Shenbagam i Nalini, 2011), hrčaka i kunića (Juźwiak i sur., 2005), kao i u *in vitro* istraživanjima (Shen i sur., 2002) pokazani su određeni učinci rutina, no još nisu provedena istraživanja koja bi dokazala značajne i pozitivne učinke rutina kao dodatka prehrani kod čovjeka.

Rutin inhibira agregaciju trombocita (Navarro-Núñez i sur., 2008) i smanjuje kapilarnu propusnost, što razrjeđuje krv i poboljšava cirkulaciju, te bi se mogao koristiti za liječenje bolesnika s rizikom od srčanog i moždanog udara. Pokazuje protuupalnu aktivnost kod nekih životinjskih i *in vitro* modela (Guardia i sur., 2001). Inhibira aktivnost aldoza reduktaze, enzima normalno prisutnog u oku i ostalim dijelovima tijela, a pomaže i u pretvaranju glukoze u šećerni alkohol sorbitol (Akileshwari i sur., 2012).

Rutin je također antioksidans za koji je utvrđeno da je najjači u usporedbi s kvercetinom, akacetinom, morinom, hispidulinom, hesperidinom i naringinom (Eickhorst i sur., 2007).

1.1.3.2. Furanokumarini

Psoralen i njegovi derivati (linearni furanokumarini) se koriste u dermatologiji, a također su vrlo obećavajući u liječenju bolesti. Ti sekundarni metaboliti se prirodno pojavljuju u biljkama (Slika 3).



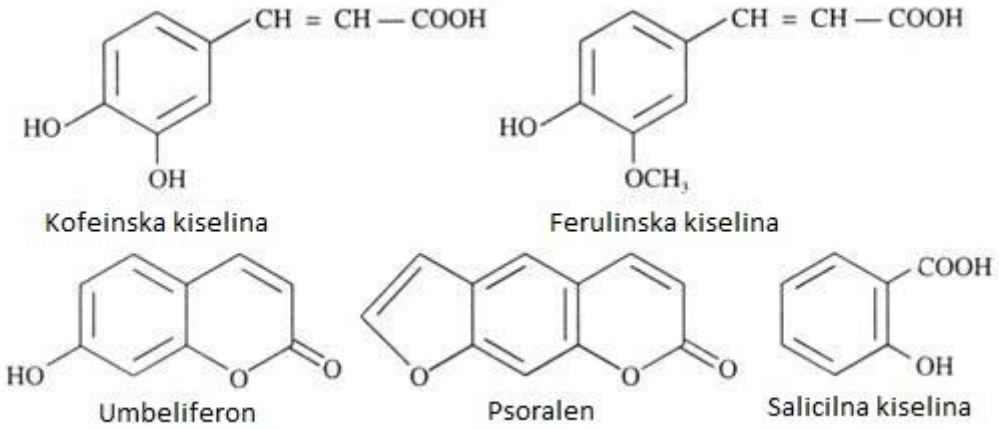
Slika 3. Psoralen i jedan od njegovih derivata (Web 3)

U jednom istraživanju proučavane su vrste *Ruta chalepensis*, *R. angustifolia*, *R. graveolens* i *R. montana* kako bi procijenili njihov potencijal za proizvodnju furanokumarina (psoralen, ksantotoksin, bergapten, izopimpinelin). Vrste roda *Ruta* sadrže 4 do 17 mg g^{-1} suhe tvari furanokumarina. Te su koncentracije bile veće od onih koje se nalaze u drugim porodicama za koje je poznato da proizvode iste spojeve (Moraceae, Apiacae i Fabaceae). Od četiri ispitivane vrste, *R. graveolens* pokazala je visoke koncentracije furanokumarina i najbolju biomasu. Šesnaest različitih *R. graveolens* uzgojeno je kako bi se pronašao najbolji kandidat za proizvodnju furanokumarina. Biljke su sadržavale prosječnu koncentraciju od 10 mg g^{-1} suhe tvari furanokumarina, u rasponu od 2,8 do 17,5 mg g^{-1} suhe tvari, ali nije postojala statistički značajna razlika s obzirom na podrijetlo. Raspored furanokumarina je proučavan u različitim dijelovima biljke. U plodovima je pronađena pet do deset puta veća koncentracija furanokumarina od korijena, stabljike i lišća. Izopimpinelin je bio visoko koncentriran u korijenju, gdje je dosegao 25% ukupnih furanokumarina. Potencijalni prinos furanokumarina je rezultat biomase i proizvodnje sekundarnih metabolita. Na te parametre utjecao je fenološki stadij biljaka, s najvećom proizvodnjom u plodovima, koji su imali najveće koncentracije, biomasu i stoga prinos furanokumarina. *R. graveolens* koje se uzgajaju na polju mogu proizvesti 12 kg furanokumarina po hektaru, uglavnom u plodovima i lišću (Milesi i sur., 2001).

1.1.3.3. Fenoli

U jednom od proučavanih istraživanja promatrane su divlje i kultivirane rutvice, a rezultati ukazuju da su divlji i kultivirani organi imali sličan sadržaj polifenola, flavonoida i tanina. Štoviše, organi su bili bogati vanilinskom kiselinom i kumarinom s najvišim razinama u kultiviranim listovima i cvjetovima. Dvanaest fenolnih spojeva utvrđeno je u različitim dijelovima biljaka i uključivalo je 12 fenolnih kiselina s tri hidroksicimetne kiseline (kofeinska, trans-hidroksicimetna i ferulinska kiselina) i devet hidroksibenzojevih kiselina (3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina, galna kiselina, klorogenska kiselina, sirilska kiselina, karnozna kiselina, salicilna kiselina i vanilinska kiselina)

(Ouerghemmi i sur., 2017). Fenolne kiseline i kumarin predstavljaju glavne skupine fenola u lišću i cvijeću, dok su flavonoidi slabo zastupljeni s postotcima koji nisu prelazili 10% ukupnih fenola. Stabljike i listovi kultivirane rutvice pokazuju značajno više razine fenolnih kiselina nego divlja rutvica. Uočene su i više razine kumarina, dok je u stabljikama prevladavala vanilinska kiselina. Postoje i još neke varijacije u prisutnosti fenolnih spojeva između različitih organa, pa je tako ferulinska kiselina otkrivena u stabljikama i lišću, ali je odsutna u cvjetovima; salicilna kiselina je otkrivena u stabljikama i cvijeću, a odsutna u lišću. Varijacije mogu biti povezane s morfološkom diferencijacijom koja se javlja tijekom fenološkog ciklusa (Ouerghemmi i sur., 2017). Slika 4 prikazuje strukture nekih od fenolnih spojeva sadržanih u rutvici.



Slika 4. Strukture nekih fenolnih spojeva u rutvici (Web 4)

1.1.4. Upotreba i farmakologija

1.1.4.1. Kardiovaskularni i antioksidativni efekti

Ekstrakt rutvice proučavan je kao potencijalni blokator kalijevih kanala u intaktnim mijeliniziranim živčanim stanicama. Uz kapsaicin, za ekstrakt rutvice se potvrdilo da nije selektivan samo za kalijeve kanale, već može blokirati i kanale protoka natrija, iako u manjoj mjeri (Bethge i sur., 1991).

1.1.4.2. Istraživanja na životinjama

U izoliranim srcima štakora tretiranim ekstraktom *R. graveolens*, povećanjem koncentracije povećan je i učinak, što je zabilježeno u vremenu atrioventrikularnog provođenja, dužini Wenckebach ciklusa te efektivnim i funkcionalnim refrakternim razdobljima (Khori i sur.,

2008). U drugom istraživanju, štakorima je dan metanolni ekstrakt *R. graveolens* od 20 mg/kg/dan tijekom 90 dana, a rezultati pokazuju niže razine kolesterola, lipoproteina male gustoće i aterogene indekse. Povećane su razine lipoproteina visoke gustoće, dok su oksidativni stres i upale također smanjene (Ratheesh i sur., 2011).

1.1.4.3. Klinički podaci

U istraživanju 56 bolesnika s karcinomom debelog crijeva (34 s ranim stadijem i 22 s naprednim stadijem), otkriveno je da ekstrakt *R. chalepensis* štiti eritrocite od oksidativnog stresa izazvanog radikalima. Specifično, ovaj učinak je zabilježen kod pacijenata s ranim stadijem kolorektalnog karcinoma i nije opažen kod naprednih stadija (Acquaviva i sur., 2011).

1.1.4.4. Antibakterijska/Antifungalna funkcija

Kod više od 15 spojeva pronađenih u rutvici otkrivena je *in vitro* antibakterijska i antifungalna aktivnost (Wolters i Eilert, 1981). Među njima, akridonski alkaloidi su najmoćniji antimikrobni spojevi dok kumarini inhibiraju rast bakterija i gljivica samo pri visokim koncentracijama. Testirano eterično ulje rutvice i flavonoidi nisu pokazali takvu aktivnost. Jedno od istraživanja upućuje na to da su ekstrakti *R. graveolens* pokazali inhibitorno djelovanje protiv gram pozitivnih bakterija kao što su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* i *Bacillus subtilis* (Ivanova i sur., 2005). Ostala istraživanja otkrila su da brojne komponente rutvice izravno ometaju replikaciju DNA, čime se sprječava i razmnožavanje nekih virusa (Novák i sur., 1967).

1.1.5. Toksikologija

U nekim istraživanjima otkriveno je da su ekstrakti rutvice mutageni, ali klinička važnost tih nalaza nije utvrđena (Paulini i sur., 1987).

Toksičnost sušenog lišća najvjerojatnije je manja nego kod svježeg lišća zbog gubitka hlapljivog ulja (Heskel i sur., 1983). Tinktura *R. graveolens* pokazala je fotomutagenost različitog stupnja na temelju različitih koncentracija alkaloida prisutnih u spoju (Schimmer i Kühne, 1990).

Velike doze (više od 100 ml ulja ili približno 120 g listova u jednoj dozi) mogu uzrokovati bol u želucu, povraćanje i sistemske komplikacije, uključujući smrt. Jedna oralna doza od 400 mg/kg, dana zamorcima, bila je smrtonosna zbog krvarenja nadbubrežne žlijezde, jetre i bubrega. Međutim, dnevna oralna doza od 30 mg dana ljudima u trajanju od 3 mjeseca nije

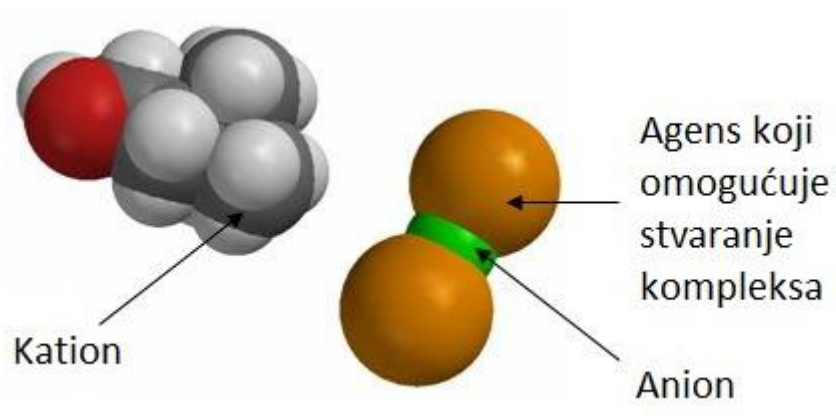
rezultirala abnormalnom funkcijom jetre. U jednom od izvješća o slučajevima toksičnosti spominje se multiorganska toksičnost kod 78-godišnje žene koja je ekstrakt *R. graveolens* koristila za kardiovaskularnu zaštitu. Nakon 3 dana korištenja, pacijentica je došla na hitnu službu s bradikardijom, akutnim zatajenjem bubrega s hiperkalijemijom koja zahtijeva hemodijalizu i koagulopatiju (Seak i Lin, 2007). Također psoraleni iz rutvice, u kontaktu s kožom i izloženi UV A zračenju, odgovorni su za nastanak fotodermatitisa (Eickhorst i sur., 2007).

1.2. Eutektičko otapalo

Eutektička otapala ili DES (engl. *Deep Eutectic Solvent*) su sustavi formirani iz eutektičke smjese Lewisovih ili Brønstedovih kiselina i baza koje mogu sadržavati različite anionske i/ili kationske vrste (Smith i sur., 2014). Klasificirana su kao tip ionskih otapala s posebnim svojstvima. Sadrže jedan ili više spojeva u obliku smjese, čime se dobiva eutektik s talištem mnogo nižim od bilo koje od pojedinačnih komponenata. Jedan od najznačajnijih eutektičkih fenomena zabilježen je za smjesu kolin klorida i uree u omjeru 1:2 mol. Rezultirajuća smjesa ima točku taljenja od 12°C (daleko manju od tališta kolin klorida, 302 °C i uree, 133 °C), što ju čini tekućom pri sobnoj temperaturi (Abbott i sur., 2003).

Eutektička otapala prve generacije temelje se na smjesama kvaternih amonijevih soli s donorima vodikovih veza kao što su amini i karboksilne kiseline. Postoje četiri vrste eutektičkih otapala (Abbott i sur., 2007):

1. Kvaternarna amonijeva sol + metalni klorid
2. Kvaternarna amonijeva sol + metalni klorid hidrat
3. Kvaternarna amonijeva sol tipa III + donor vodikove veze
4. Metal klorid hidrat + donor vodikove veze



Slika 5. Eutektička otapala obuhvaćaju glomazne (engl. *bulky*) katione i manje anione koji su vezani za donor vodikove veze (slika preuzeta i modificirana prema (Abbott i sur., 2001).

Dok većina ionskih tekućina i DES-a uključuju kvaternarni amonijev ion kao kationsku komponentu, nedavno je utvrđeno da se eutektik također može formirati između metalne soli (hidrata) i jednostavnog amida ili alkohola, kako bi se oblikovala metalna otopina sastavljena od kationa i aniona putem procesa disproporcioniranja, npr.

$$2AlCl_3 + CH_4N_2O \leftrightarrow [AlCl_2 \cdot CH_4N_2O]^+ + [AlCl_4]^-$$

Metalna sol Urea Urea

Ovi takozvani eutektici tipa 4 korisni su jer proizvode kationske metalne komplekse, osiguravajući da dvostruki sloj blizu površine elektroda ima visoku koncentraciju metalnih iona (Abbott i sur., 2007).

1.2.1. Prirodna eutektička otapala

Prirodna eutektička otapala, NADES (engl. *NAtural Deep Eutectic Solvent*) su bio-bazirane ionske tekućine i eutektička otapala koja se sastoje od dva ili više spojeva koji su općenito primarni metaboliti na bazi biljaka, tj. organske kiseline, šećeri, alkoholi, amini i aminokiseline (Dai i sur., 2013). Ionske tekućine su soli, tekućine pri sobnoj temperaturi, koje karakteriziraju ionske veze koje imaju barem jedan veliki organski ion i kation s malim stupnjem simetrije. Anioni i kationi u tekućini drže se daleko, tako da smanjuju privlačne sile između njih i ometaju kristalizaciju, spuštajući točku tališta i rezultirajući potpuno ionskom tekućinom na sobnoj

temperaturi. Istraživanje koje su 2011. godine proveli Choi i sur., pokazalo je da voda može biti prisutna kao dio otapala, čvrsto je zadržana u tekućini i ne može ispariti.

1.2.2. Primjena eutektičkih otapala

U usporedbi s modernim ionskim tekućinama zasnovanim na anionima kao što je bistriflimid, koji dijele mnoge karakteristike, ali su ionski spojevi, a ne ionske smjese, DES su jeftinija za izradu, manje toksična i ponekad biorazgradiva te se mogu koristiti kao sigurna, učinkovita, jednostavna i jeftina otapala. Do danas su proučavane brojne primjene DES-a. Promjenom komponenata DES-a i njihovih molarnih omjera mogu se proizvesti nova eutektička otapala zbog čega se svake godine u literaturi pojavljuju mnoge nove primjene. Neke od najranijih primjena DES-a bile su elektrofiniranje metala pomoću DES-a kao elektrolita (Abbott i sur., 2007). Organski spojevi kao što je benzojeva kiselina (topljivost 0.82 mol/L) imaju veliku topljivost u DES-u, a to uključuje i celulozu. Iz tog se razloga DES primjenjuju kao otapala za ekstrakciju takvog materijala iz njegovih složenih matrica. Istraživana je i njihova primjenjivost u proizvodnji i pročišćavanju biodizela (Huang i sur., 2012).

Zahvaljujući njihovom jedinstvenom sastavu, DES daju obećavajuća rješenja koja utječu na strukturu i samoorganiziranje otapala. Nedavno je proučeno samoorganiziranje natrij dodecil-sulfata (SDS – engl. *Sodium dodecil sulphate*) u DES-u, što je pokazalo da DES može stvoriti mikroemulzije različite od onih u vodi (Pal i sur., 2014). U drugom slučaju, otapanje polimera polivinilpirolidon (PVP) u DES-u razlikuje se od onog u vodi, pri čemu se čini da je DES bolje otapalo za polimere nego voda (Sapir i sur., 2016). DES su također proučavani i za svoju potencijalnu uporabu kao ekološki održiva otapala za ekstrakciju zlata i drugih plemenitih metala iz rude (Jenkin i sur., 2016).

1.3. Antioksidacijska aktivnost

1.3.1. Oksidativni stres

Živi organizmi proizvode reaktivne kisikove jedinke (engl. ROS – *Reactive Oxygen Species*) kao rezultat normalnog staničnog metabolizma i okolišnih čimbenika (zagađivači zraka, dim cigarete). ROS su visoko reaktivne molekule i mogu oštetiti stanične strukture kao što su nukleinske kiseline, lipidi i proteini te mijenjati njihove funkcije. Pomak ravnoteže između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa naziva se "oksidativni stres". Regulacija redukcijskog i oksidirajućeg (redoks) stanja je kritična za održivost stanica, aktivaciju, proliferaciju i funkciju organa. Aerobni organizmi imaju integrirane antioksidacijske sustave koji uključuju enzimatske i neenzimatske antioksidanse koji su obično učinkoviti u blokiranju štetnih učinaka ROS-a. Međutim, u patološkim uvjetima, antioksidacijski sustavi mogu biti preplavljeni. (Birben i sur., 2012).

Kemijski se oksidativni stres povezuje s povećanom proizvodnjom oksidativnih jedinki ili značajnim smanjenjem djelotvornosti antioksidacijske zaštite, kao što je glutation (Schafer i Buettner, 2001). Učinci oksidativnog stresa ovise o veličini tih promjena, a stanica je sposobna nadvladati male perturbacije i vratiti se u prvobitno stanje. Međutim, značajniji oksidativni stres može uzrokovati smrt stanica, pa čak i umjerena oksidacija može izazvati apoptozu, dok intenzivniji stres može uzrokovati nekrozu (Lennon i sur., 1991).

Proizvodnja reaktivnih kisikovih jedinki je posebno destruktivan aspekt oksidativnog stresa. Takve jedinke uključuju slobodne radikale i perokside. Neki od manje reaktivnih jedinki (kao što je superoksid, $\bullet O_2^-$) mogu se prevesti oksidacijskim reakcijama s prijelaznim metalima ili drugim redoks-cikličkim spojevima (uključujući kinone) u agresivnije radikale koji mogu prouzročiti značajno oštećenje stanica. Većina tih jedinki proizvodi se na niskoj razini aerobnim metabolizmom i stanični obrambeni mehanizmi ih mogu uništiti u cijelosti, a tako se i svako oštećenje stanica neprestano popravlja. Međutim, u stanjima neprestanog oksidativnog stresa koji uzrokuje nekrozu, oštećenja uzrokuju gubitak ATP-a i inhibiciju kontrolirane apoptotičke smrti uzrokujući raspad stanice (Lee i Shacter, 1999). Većina dugoročnih učinaka uzrokovana je oštećenjem DNA (Evans i Cooke, 2004).

Oksidativni stres je ključan faktor u neurodegenerativnim bolestima, uključujući Lou Gehrigovu bolest (MND ili ALS), Parkinsonovu bolest, Alzheimerovu bolest, Huntingtonovu bolest, depresiju i multiplu sklerozu (Patel i Chu, 2011). Praćenjem biomarkera kao što su reaktivne kisikove i dušikove jedinke, dokazi antioksidacijske obrane ukazuju na to da

oksidativno oštećenje može biti uključeno u patogenezu ovih bolesti (Nunomura i sur., 2006), dok je kumulativni oksidacijski stres s oštećenjem mitohondrija i staničnog disanja vezan uz Alzheimerovu te Parkinsonovu bolest i druge neurodegenerativne bolesti (Ramalingam i Kim, 2012).

Smatra se da je oksidacijski stres povezan i s određenim kardiovaskularnim bolestima, jer je oksidacija LDL-a u vaskularnom endotelu preteča stvaranja plaka. Oksidacijski stres također igra ulogu u ishemijskoj kaskadi kod reperfuzijskih ozljeda srca nakon čega dolazi do hipoksije. Ova kaskada uključuje moždane i srčane udare. Oksidativni stres je uključen u sindrom kroničnog umora (Nijs i sur., 2006), a doprinosi i oštećenju tkiva nakon zračenja i hiperoksije te nastanku dijabetesa.

Pretpostavlja se da je oksidacijski stres uključen u razvoj karcinoma povezanog sa starenjem. Reaktivne jedinke proizvedene tijekom oksidativnog stresa mogu uzrokovati izravno oštećenje DNA što ih čini mutagenima, a također mogu inhibirati apoptozu i promicati proliferaciju, invazivnost i metastazu (Halliwell, 2007). Važna je i infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* koja potpomaže proizvodnju reaktivnih jedinki kisika i dušika u ljudskom želudcu, a posljedica je razvoj raka želuca (Handa i sur., 2011).

1.3.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti

Analitičke metode procjene jačine antioksidansa se mogu podijeliti u kategorije na spektrometrijske (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, fluorometrija), elektrokemijske (ciklička voltametrija, amperometrija i biamperometrija) i kromatografske tehnike (GC, HPLC) (Prior i sur., 2005).

1.3.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda

Spektrometrijske tehnike se oslanjaju na reakciju radikalnog kationa ili kompleksa s antioksidacijskom molekulom koja može donirati atom vodika (Brand-Williams i sur., 1995).

DPPH metoda je jednostavna i pogodna za određivanje antioksidacijske aktivnosti čistih spojeva, sokova voća i povrća ili ekstrakata (Almeida i sur., 2011), kao i za određivanje antioksidacijske aktivnosti u namirnicama i biljnim proizvodima. Osim toga, upotrebljava se i za određivanje stupnja lipidne peroksidacije, a moguća je primjena za čvrste i tekuće uzorke zbog čega ima široku primjenu.

DPPH metoda je vrlo brza i točna metoda (Prakash i sur., 2001). Temelji se na redukciji stabilnog, tamnoljubičastog dušikovog radikala DPPH• koji zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra, dok je maksimum apsorpcije na 517 nm. Sparivanjem elektronskog para stabilnog radikala DPPH• u prisutnosti elektron donora (antioksidans koji hvata slobodne radikale), ljubičasta se boja mijenja u žutu. Nastali spoj ima smanjeni intenzitet apsorpcije u vidljivom dijelu spektra, a rezultirajuće obezbojenje u stehiometrijskom je odnosu s brojem sparenih elektrona. Prema tome, sposobnost hvatanja slobodnih radikala određuje se mjerenjem pada apsorbancije pri 515-528 nm (Molnar, 2011; Duane, 2010).

Molekula 2,2-difenil-pikrilhidrazila je stabilni radikal zbog delokalizacije slobodnog elektrona kroz molekulu, stoga molekule ne dimeriziraju kao što je to slučaj kod većine slobodnih radikala.

Slika 6. Difenilpikrazil (slobodni radikal) i difenilpikrilhidrazin

Delokalizacija elektrona kroz molekulu daje tamnoljubičastu boju koja se gubi dodatkom antioksidansa, kada iz slobodnog radikala, difenilpikrilhidrazila, nastaje reducirani, svijetložuti difenilpikrilhidrazin, gdje je ZH reducirani oblik, a $A^{\bullet}$ je slobodni radikal nastao u prvom koraku (Molyneux, 2003; Gacche i sur., 2006).

$$Z^{\bullet} + AH = ZH + A^{\bullet}$$

Prvi put ovu su metodu objavili Brand-Williams i suradnici (1995), a rezultati se mogu izraziti na nekoliko načina. DPPH metoda je ovisna o otapalu i pH vrijednosti, a jedan od parametara koji određuju reakciju je i sterička dostupnost. Male molekule, koje imaju bolji pristup radikalskom mjestu, pokazuju relativno visoku antioksidacijsku aktivnost (de Magalhães, 2007). S obzirom na to, reakcijski mehanizam između antioksidansa i DPPH• ovisi i o strukturi samog antioksidansa (Bondet i sur., 1997). DPPH može reagirati s fenolnim

spojevima putem prijenosa vodikovog atoma ili elektrona. U nepolarnim otapalima preferira oduzimanje vodika, dok u polarnim otapalima, kao što su etanol i metanol, prijenos elektrona je važniji korak u hvatanju DPPH radikala (Yeo i sur., 2010).

1.3.2.2. Željezo-kelirajuća aktivnost

Željezo-kelirajuća aktivnost je proces keliranja metalnih iona odgovornih za nastajanje slobodnih radikala. Dolazi do nastanka kompleksa između ferozina i Fe^{2+} koji je crvene boje. U prisutnosti kelirajućih agenasa, remeti se nastajanje kompleksa te se smanjuje obojenost. Apsorbancija kompleksa nastalog između Fe^{2+} i ferozina mjeri se pri 562 nm, a učinkovitost keliranja metalnih iona uspoređena je sa keliranjem EDTA-dinatrijeve soli (Zhao i sur., 2006).

$$\text{Kelirajuća aktivnost} = \left(\frac{A0 - A1}{A0}\right) \times 100$$

A0 - apsorbancija kontrole

A1 - apsorbancija u prisutnosti otopine ispitivanog ekstrakta

1.4. Antibakterijska aktivnost

1.4.1. Bakterije

1.4.1.1. Escherichia coli

E. coli je gram-negativna, fakultativno anaerobna, koliformna bakterija štapićastog oblika, koja se obično nalazi u donjem dijelu crijevu toplokrvnih organizama (Tenaillon i sur., 2010). Većina *E. coli* sojeva je bezopasna, ali neki od serotipa mogu dovesti do ozbiljnih trovanja hranom i povremeno su odgovorni za povlačenje proizvoda zbog kontaminacije hrane (Vogt i Dippold, 2005). Bezopasni sojevi dio su normalne flore crijeva i korisno djeluju proizvodnjom vitamina K2 (Bentley i Meganathan, 1982) i sprječavanjem kolonizacije crijeva patogenim bakterijama formirajući simbiozu s njima (Hudault i sur., 2001). U okoliš dolazi putem fekalne materije. Bakterija masivno raste u svježoj fekalnoj tvari u aerobnim uvjetima tijekom 3 dana, no broj joj se nakon toga polako smanjuje (Russell i Jarvis, 2001).

E. coli i drugi fakultativni anaerobi čine oko 0,1% crijevne flore (Eckburg i sur., 2005), a fekalno-oralni prijenos glavni je put kojim patogeni sojevi bakterije uzrokuju bolesti. Stanice su sposobne preživjeti izvan tijela ograničeni dio vremena, što ih čini potencijalnim indikatorskim organizmima za testiranje uzoraka okoliša za fekalne kontaminacije (Dufour, 1977). Sve veći broj istraživanja u novije doba proučava ekološki postojanu *E. coli* koja može dugo živjeti čak i izvan domadara (Ishii i Sadowsky, 2008).

Bakterija se može uzgajati lako i jeftino u laboratorijskoj sredini i intenzivno se istražuje više od 60 godina. *E. coli* je kemoheterotrof čiji kemijski određeni medij mora sadržavati izvor ugljika i hranjivih tvari. Najrašireniji je prokariotski model organizma i važna vrsta u području biotehnologije i mikrobiologije, gdje je služila kao organizam domaćin za rad s rekombinantnom DNA.

1.4.1.2. Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa je gram-negativna, štapićasta, asporogena i monoflagelatna bakterija s velikom nutritivnom svestranošću. Obligatni je aerob te aerobno disanje koristi za svoj optimalni metabolizam iako može disati i anaerobno uz nitrate ili druge alternativne akceptore elektrona. *P. aeruginosa* može katabolizirati širok raspon organskih molekula, uključujući organske spojeve kao što je benzoat. Ovo ga čini sveprisutnim mikroorganizmom jer ga nalazimo u sredinama i organizmima kao što su tlo, voda, ljudi, životinje, biljke, kanalizacija i bolnice (Lederberg, 2000). U svim oligotrofnim vodenim ekosustavima, koji sadrže sadržaj visoke

koncentracije kisika, a niske koncentracije hranjivih tvari, *P. aerouginosa* je dominantan stanovnik što ga čini najzastupljenijim organizmom na zemlji (Costerton i sur., 1994)

Oportunistički je ljudski patogen zato što rijetko napada zdrave pojedince. Najčešće kolonizira imunokompromitirane pacijente, poput onih s cističnom fibrozom, rakom ili AIDS-om (Botzenhart i Döring, 1993). Prvo napada dvije trećine kritično bolesnih hospitaliziranih pacijenata, a to obično pridonosi porastu invazivnih bolesti. Također je vodeći gram-negativni oportunistički patogen u većini bolničkih centara, koji nosi stopu smrtnosti od 40-60 %. Može zakomplicirati 90 % slučajeva cistične fibroze i naveden je kao jedan od tri najčešća gram-negativna patogena povezana s najgorim vizualnim bolestima (Fick i Gabow, 1994). Nadalje, *P.aeruginosa* je vrlo važna bakterija tla koja je sposobna razgraditi policikličke aromatske ugljikovodike i pomoći pri stvaranju ramnolipida, kinolona, vodikovog cijanida, fenazina i lektina (Roy i sur., 2010). Također pokazuje intrinzičnu otpornost na mnogo različitih vrsta kemoterapijskih sredstava i antibiotika, što ga čini vrlo teškim za liječenje (Lederberg, 2000).

P. aeruginosa nije izuzetno virulentan u usporedbi s drugim većim patogenim bakterijskim vrstama kao što su *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes*, iako je sposoban za opsežnu kolonizaciju i može se agregirati u trajne biofilmove (biofilmovi na plućima kod cistične fibroze). Kronične infekcije pluća uzrokovane *P. aeruginosom* u bolesnika s cističnom fibrozom (CF) uzrokovane su stvaranjem biofilmova mukoidnih (sluzavih) alginata. Biofilm je strukturirani konzorcij bakterija, ugrađen u samostalno proizvedenu polimernu matricu koja se sastoji od polisaharida, proteina i DNA. U inficiranim plućima polisaharidni alginat je glavni dio matrice biofilma *P. aeruginosa*. Bakterijski biofilmovi uzrokuju kronične infekcije jer pokazuju povećanu toleranciju na antibiotike i odupiru se fagocitozi, kao i drugim komponentama urođenog i stečenog imunološkog sustava. Kao posljedica toga, javlja se izraženi odgovor antitijela, što dovodi do kronične upale posredovane imunološkim kompleksom, u kojem dominiraju polimorfonuklearni leukociti. Kronična upala je glavni uzrok oštećenja pluća u cističnoj fibrozi. Rast biofilma u takvim plućima povezan je s povećanom učestalošću mutacija, sporim rastom i prilagodbom bakterija na stanje u plućima, te antibiotičkom terapijom. Mala bakterijska metabolička aktivnost i povećanje replikacije bakterijskih stanica u inficiranim plućima odgovorni su za toleranciju na antibiotike. Biofilmovi se mogu spriječiti ranijom agresivnom antibiotičkom terapijom, a mogu se liječiti i kroničnom supresijskom terapijom (Høiby i sur., 2010).

1.4.1.3. Bacillus subtilis

Izvorno nazvan *Vibrio subtilis* 1835. godine, 1872. godine preimenovan je u *Bacillus subtilis*. Drugi sinonimi za ovu bakteriju su *Bacillus uniflagellatus*, *Bacillus globigii* i *Bacillus natto*. *B. subtilis* bakterije su bile jedne od prvih proučavanih bakterija s obzirom da su dobar model za stanični razvoj i diferencijaciju (Belda i sur., 2013).

To su štapićaste gram-pozitivne bakterije koje se prirodno nalaze u tlu i vegetaciji te rastu u mezofilnom temperaturnom području. Optimalna temperatura je 25-35 °C. Stres i nedostatak hranjivih tvari česti su u ovakvom okruženju zbog čega je *B. subtilis* razvio niz strategija koje dopuštaju opstanak u otežanim uvjetima. Jedna od strategija je stvaranje endospora otpornih na stresne uvjete u okolišu. Druga strategija je korištenje vanjske DNA koja bakterijama omogućuje prilagodbu rekombinacijom. Međutim, ove prilagodbe zahtjevaju puno vremena. *B. subtilis* također može brže osposobiti zaštitu nego druge bakterije, od mnogih stresnih situacija kao što su kiseli, alkalni, osmotski ili oksidativni uvjeti te toplina ili etanol. Toplina, kiselina ili etanol i nedostatak glukoze ili fosfata su podražaji koji aktiviraju sigma faktor B, globalni regulator stresnog odgovora (Bandow i sur., 2002).

Ova se vrsta obično nalazi u gornjim slojevima tla, ali postoje dokazi da postoji i u normalnoj crijevnoj flori kod ljudi. Istraživanje iz 2009. godine bavilo se usporedbom gustoće spora pronađenih u tlu (oko 106 spora/g) u odnosu na ljudski izmet (oko 104 spore/g). Broj spora pronađenih u ljudskom crijevu bio je previsok da bi se mogao pripisati isključivo konzumaciji putem kontaminirane hrane (Hong i sur., 2009).

Postoje brojna istraživanja koja se trenutno provode na ovoj bakteriji. Nedavno istraživanje usmjereno je na otpor spora *B. subtilis* na toplinu, zračenje i razne kemikalije. Poznato je da spore mogu preživjeti stotinama, čak milijunima godina u stanju mirovanja. Proučeni su važni čimbenici koji doprinose otpornosti spora. Utvrđeno je da su ovojnice bakterija glavni čimbenik jer stvaraju barijeru organizma protiv toksičnih tvari, ultraljubičastog zračenja i litičkih enzima. Također je utvrđeno da je i unutarnja membrana važna zbog svoje male propusnosti toksina. Popravak DNA od ključne je važnosti jer može kontrolirati oštećenje DNA uzrokovano zračenjem, toplinom i toksinima. Spore bakterije su također otporne na vlagu, prvenstveno zbog niskih koncentracija vode u jezgri. Što je niži sadržaj vode u jezgri, to je spora otpornija na vlagu. Važnost ovog istraživanja je u tome kako se spore *B. subtilis* u hrani i medicinskim proizvodima mogu učinkovito uništiti. Istraživanje otpornosti spora daje nam bolji uvid u korisnost određenih metoda u uništavanju spora (Setlow, 2006).

1.4.1.4. Staphylococcus aureus

S. aureus je gram-pozitivna bakterija kuglastog oblika, a često je nalazimo na sluznici nosa, u respiratornom traktu te na koži. Često djeluje na redukciju katalaze i nitrata, fakultativni je anaerob koji može rasti bez prisustva kisika (Masalha i sur., 2001). Iako *S. aureus* nije uvijek patogen, čest je uzrok infekcija kože (uključujući apscese) i respiratornih infekcija kao što je sinusitis te trovanja hranom. Patogeni sojevi često potiču infekcije proizvodnjom virulentnih čimbenika kao što su moćni proteinski toksini i ekspresijom proteina na površini stanice koja veže i inaktivira protutijela. Pojava sojeva otpornih na antibiotike kao što je *S. aureus* otporan na meticilin (MRSA) je globalni problem u kliničkoj medicini. Unatoč brojnim istraživanjima i tehnologiji, još uvijek ne postoji odgovarajući lijek.

Procjenjuje se da 20-30% ljudske populacije čine dugoročni nositelji *S. aureus* (Tong i sur., 2015) gdje se bakterija može naći kao dio normalne kožne flore, u nosnicama (Cole i sur., 2001) te kao uobičajeni stanovnik nižeg reproduktivnog trakta žena (Senok i sur., 2009). Može uzrokovati niz bolesti, od manjih infekcija kože, kao što su prištići, impetigo, čirevi, celulitis, folikulitis i apscesi, do bolesti koje ugrožavaju život kao što su upala pluća, meningitis, osteomijelitis, endokarditis, sindrom toksičnog šoka, bakteremija i sepsa. To je i dalje jedan od pet najčešćih uzroka bolničkih infekcija i često je uzrok infekcije rana nakon operacije. Svake godine oko 500.000 bolesnika u bolnicama Sjedinjenih Američkih Država dobije stafilokoknu infekciju, uglavnom *S. aureus* (Web 2).

Većina sadašnjih istraživanja ove bakterije uključuje proteomiku *S. aureus* i MRSA. Njegova otpornost na antibiotike postala je sve veći problem za današnje društvo i potrebno je više istraživanja kako bi se pronašao odgovarajući lijek. Jedno od istraživanja usmjereno je na stres i proteine gladovanja kako bi se moglo predvidjeti fiziološko stanje populacije (Kuroda i sur., 2001). Druga istraživanja koja se temelje na proteomici objektivno grade indeks ekspresije proteina za različite sojeve *S. aureus* i provode komparativnu analizu sojeva pod različitim uvjetima rasta (Skaar i sur., 2004). Metode korištene u ovom istraživanju daju velike nade za razvoj novih tehnika.

1.4.2. Metode određivanja antibakterijske aktivnosti

Najčešće *in vitro* analize korištene za biljne ekstrakte su za procjenu antibakterijskog djelovanja, pri čemu se u većini istraživanja koriste analize kao što su disk difuzijska analiza (engl. *Disk diffusion*), razrijeđivanje agara (engl. *Agar dilution*) i razrijeđivanje/mikrorazrijeđivanje bujona (engl. *Microdilution*). Metode za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata se temelje na onima opisanim za standardizirano ispitivanje antibiotika; međutim nekoliko čimbenika može utjecati na prikladnost ovih metoda za upotrebu s biljnim ekstraktima. Ti čimbenici uključuju vrstu organizma koji se testira, koncentraciju inokuluma, tip medija (npr. IsoSensitest naspram hranjivog agara) i svojstva ekstrakta koji se ispituje (pH, topljivost). Metode se mogu koristiti da bi se jednostavno utvrdilo postoji li i može li se antibakterijska aktivnost koristiti za izračunavanje minimalne inhibicijske koncentracije, MIC (engl. *Minimal Inhibitory Concentration*) (Wilkinson, 2006).

1.4.2.1. Metoda razrijeđivanja agara (engl. *Agar dilution*)

Metoda razrjeđivanja agara je još jedna relativno brza metoda koja ne uključuje korištenje sofisticirane opreme. Svaki laboratorij s opremom za osnovne mikrobiološke procese može koristiti ovu metodu. U ovoj metodi ispitivana tvar se na dodaje na agar s poznatim koncentracijama, nakon čega se na tako postavljen agar nasađuju bakterije koje se žele ispitati. Na takvim pločicama s replikama može se napraviti raspon koncentracija ispitivane tvari te se bakterije nanose u jažice s različitim koncentracijama. Na taj način može se ispitati veliki broj bakterija unutar pojedinačnog testa. Pločice se inkubira 24 h ili više i rast bakterija u smjesi ekstrakta/agara se označava kao prisutan/odsutan. Kritika ove metode je da je teško osigurati objektivnost i stoga usporediti jedan skup rezultata s drugim. Postoji i nekoliko drugih ograničenja ove metode uključujući korištenje većih volumena ispitivane tvari nego u drugim metodama, zbunjujuća antibakterijska djelovanja od hlapljivih tvari, teškoća postizanja stabilne emulzije eteričnih ulja u agaru, itd.

1.4.2.2. Metoda minimalne inhibitorne koncentracije, MIC (engl. *Minimal Inhibitory Concentration*)

U mikrobiologiji, minimalna inhibitorna koncentracija je najniža koncentracija tvari koja sprječava vidljiv rast bakterija. Razlika u odnosu na minimalnu baktericidnu koncentraciju, MBC (engl. *Minimal Bactericidic Concentration*) je u tome što se MBC odnosi na koncentraciju koja rezultira smrću mikroorganizama, što je definirano nesposobnošću stvaranja nove kulture bakterija. Što je MIC bliži MBC-u, to je spoj baktericidniji (Tripathi, 2013). MIC neke tvari određuje se pripremanjem otopina iste tvari *in vitro* u rastućim koncentracijama,

inkubiranjem otopina s odvojenim serijama kultiviranih bakterija i mjerenjem rezultata korištenjem metode razrjeđivanja agara ili bujona. Rezultati su ocjenjuju kao osjetljivi, intermedijarni ili otporni na određeni antibiotik. Točke odstupanja su dogovorene vrijednosti, objavljene u smjernicama referentnog tijela kao što su CLSI (engl. *US Clinical and Laboratory Standards Institute),* BSAC (engl. *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*) ili EUCAST (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (Andrews, 2001). MIC ovisi o mikroorganizmu, zaraženom čovjeku (samo u slučaju *in vivo*) i antibiotiku (McKinnon i Davis, 2004). U medicini je uzgoj organizma inficiranjem pacijenta uz dostupne antibiotike i određivanje MIC-ova važno za pronalazak ispravnog lijeka za primjenu na pacijenta. Kao takvi, MIC-ovi su obično polazna točka za veće pretkliničke procjene novih antimikrobnih sredstava (O'Neill i Chopra, 2004).

1.5. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi kako različiti uvjeti ekstrakcije uzoraka rutvice (*Ruta graveolens* L.) utječu na ukupnu antioksidacijsku te antibakterijsku aktivnost određivanjem ukupne koncentracije fenolnih spojeva, ukupne antioksidacijske te antibakterijske aktivnosti na Gram pozitivne i Gram negativne humane patogene.

2. MATERIJALI I METODE

MATERIJALI I METODE

2.1. Materijal

Osušeni listovi rutvice *R. graveolens L*. nabavljeni su iz biljne ljekarne Vextra d.o.o. (Mostar, Bosna i Hercegovina) u proljeće 2016. Prije ekstrakcije, biljni materijal je usitnjen pomoću laboratorijskog mlina. Kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu ovog rada nabavljene su od komercijalnih dobavljača. Sva laboratorijska mjerenja napravljena su u Biokemijskom laboratoriju Odjela za biologiju u Osijeku.

2.2. Priprava eutektičkog otapala

Sva eutektička otapala su pripremljena kao što je opisano u prethodnoj literaturi (Zhao i sur., 2015). Ukratko, kolin klorid i limunska kiselina su miješani u omjeru 1:1 kao što je prikazano u Tablici 1. Smjesa se zagrijava uz stalno miješanje sve dok se ne formira bistra tekućina. Nakon toga otapalo je razrijeđeno vodom, ohlađeno do sobne temperature i kao takvo korišteno za daljnje optimiranje ekstrakcije.

2.3. Ekstrakcija uzoraka

Priprema ekstrakata rutvice optimirana je pri različitim temperaturama reakcije, vremenima i sadržajem vode vidljivo u Tablici 1. Materijal u prahu (50 mg) pomiješan je s 1 mL odabranog otapala uz miješanje na određenoj temperaturi točno određeno vrijeme. Nakon ekstrakcije, smjesa je centrifugirana na 6000 okretaja/min tijekom 15 minuta i zatim dekantirana. Supernatant je ponovno centrifugiran kroz 15 minuta i dekantiran. Nakon toga supernatant je razrijeđen, filtriran kroz PTFE filter od 0.45 um i podvrgnut HPLC i daljnjim analizama.

Tablica 1. Optimiranje uvjeta priprave ekstrakata (omjer limunske kiseline i kolin-klorida – 1:1)

Uzorak	Sadržaj vode (%)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	rutin (g/100 g biljke)
1	10	30	50	**0,55**
2	10	90	50	**0,67**
3	20	30	30	**0,74**
4	20	90	30	**0,75**
5	30	60	30	**0,92**
6	10	60	30	**0,93**
7	20	60	50	**1,01**
8	30	30	50	**1,14**
9	20	60	50	**1,22**
10	20	90	70	**1,73**
11	20	30	70	**1,75**
12	30	60	70	**1,81**
13	27	52	70	**1,88**

2.4. Određivanje rutina u ekstraktima putem HPLC-a

Određivanje rutina provedeno je pomoću RP-HPLC metode s UV detekcijom. Analiza je izvedena u skladu s prethodno opisanim postupkom (Jokić i sur., 2016), uz eluiranje gradijentom destiliranom vodom kao fazom A i metanolom kao fazom B. Analize su provedene na sobnoj temperaturi uz brzinu protoka od 1,0 mL/min, volumen injekcije od 20 µL i UV detekcijske valne duljine 330 nm. Stock otopine standarda rutina pripremljene su u otapalu i kalibrirane u osam koncentracija (koncentracijski raspon 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0; 75,0; 100,0 i 250,0 mg/L). Linearnost rutinskih kalibracijskih krivulja potvrđena je s R^2 = 0,999 s ograničenjem detekcije, LOD (engl. *Limit Of Detection*) 0,053 mg / L, granicom kvantifikacije, LOQ (engl. *Limit of Quantification*) 0,175 mg / L i retencijskim vremenom rutina od 22,9 minuta.

2.5. Metode

2.5.1. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

2.5.1.1. Folin-Ciocalteu test

Koncentracija fenolnih spojeva iz dobivenih ekstrakata rutvice određena je spektrofotometrijski, metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965). Ova metoda se bazira na reakciji Folin-Ciocalteu (FC) reagensa (kompleks fosfomolibdenske-fosfovolframske kiseline) s reducirajućim reagensom (fenolni spoj) pri čemu dolazi do nastanka plave boje.

Postupak:

U reakcijsku smjesu dodano je 125 µl ekstrakta rutvice (ekstrakt je razrijeđen 2 puta) i 375 µl destilirane H_2O, nakon čega je dodano 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog s destiliranom H_2O u omjeru 1:10) i još 2,5 ml destilirane H_2O. Smjesa je vorteksirana i ostavljena da stoji 3 min. Zatim je dodano 2 ml zasićene otopine Na_2CO_3 i 4,5 ml destilirane H_2O i dobro promiješano. Uzorci su nakon toga ostavljeni u tami tijekom 90 minuta pri sobnoj temperaturi. Svaki uzorak pripremljen je u tri ponavljanja, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost dobivenih rezultata. Na isti je način pripremljena i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta rutvice uzima destilirana voda. Apsorbancija tako priređenih uzoraka se određuje pri 700 nm. Ukupni fenolni spojevi su izračunati su pomoću sljedeće formule, kao mg katehina/L ispitivanog ekstrakta, a onda preračunati i izraženi kao mg katehina/g suhe tvari:

$$katehin\ \left(\frac{mg}{L}\right) = 186{,}5\ x\ E_{700}\ x\ d$$

gdje su:

186,5 – molarni ekstincijski koeficijent katehina

E700 – apsorbanca pri 700 nm

d – razrjeđenje ispitivanog ekstrakta

2.5.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

2.5.2.1. DPPH analiza

Mjerenje ukupne antioksidacijske aktivnosti ekstrakata pokožice grožđa izvedeno je prema modificiranoj DPPH metodi, prema Shih i sur., 2007.

Postupak:

750 µL razrijeđene otopine ekstrakta (faktor razrijeđenja = 1875) pomiješano je sa 750 µL otopine DPPH radikala (0,2 mM), tako da je konačna koncentracija DPPH radikala bila 0,1 mM. Smjesa je dobro promiješana i inkubirana na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbancija pri λ = 517 nm. Kao kontrola korištena je 0,1 mM otopina DPPH radikala, a kao standard askorbinska kiselina. Sva mjerenja su provedena u tri ponavljanja. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\%\ hvatanja\ DPPH\ radikala = \left(\frac{Ab+As-Am}{\mathrm{Ab}}\right) \mathrm{x}\ 100$$

gdje su:

Ab – apsorbancija 0,1 mM otopine DPPH radikala pri λ = 517 nm

As – apsorbancija 0,1 mM otopine ekstrakta pri λ = 517 nm (slijepa proba spoja)

Am – apsorbancija 0,1 mM otopine smjese testiranih ekstrakata i DPPH radikala pri 517 nm

2.5.3. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti

2.5.3.1. Odabir bakterija i određivanje gustoće bakterijske suspenzije

Četiri korištene bakterije izolirane su iz različitih kliničkih uzoraka dobivenih s Mikrobiološkog odjela Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Osijeku. *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* odabrane su kao dva najčešće korištena modelna organizma u istraživanjima koja predstavljaju Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterije. S druge strane, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* odabrane su kao ljudski patogeni te također predstavljaju Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterije. Navedene bakterije su čuvane u hladnjaku, u dubokom agaru.

Gustoću bakterijskih suspenzija odredili smo prema McFarlandovom standardu čiji je princip uspoređivanje sa suspenzijom poznatog zamućenja, a koja se nalazi u ampuli jednakog

promjera. Uporaba McFarland standarda je neophodna pri standardizaciji mikrobioloških metoda, a standardi su sukladni brojevima na McFarland skali. U ovom istraživanju smo koristili Standard 0,5 kod kojeg koncentracija bakterija iznosi 150 × 10^6/mL. Apsorbanciju bakterijske suspenzije smo mjerili u sterilnoj fiziološkoj otopini pri 600 nm. Gustoća bakterijske suspenzije, kao i antioksidacijska aktivnost ekstrakata mjerene su na prijenosnom spektrofotometru (HACH DR/2010 Spectrophotometer).

Tablica 2. Vrijednost standarda na McFarland skali (McFarland, 1907)

Standard	**Koncentracija bakterija** [(1)] **x10⁶ /ml**	**Teoretska optička gustoća**[2] **na 550 nm**	**Apsorbancija pri 600nm**
0,5	150	0,125	0,063
1	300	0,25	0,123
2	600	0,50	0,242
3	900	0,75	0,431
4	1200	1,00	0,653
5	1500	1,25	0,867

[1] Koncentracija bakterija ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost.

[2]Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći bakterijske suspenzije.

2.5.3.2. Hranjiva podloga

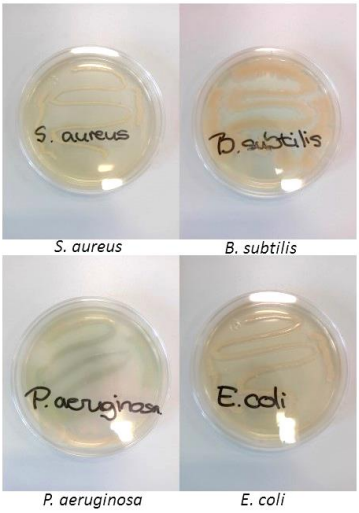
Bakterije su nasađivane na čvrstu hranjivu podlogu Müller Hinton, Merck, Njemačka, koji je neselektivna podloga na kojoj rastu brojni mikroorganizmi. Podloga sadrži relativno visoku koncentraciju škroba koji djelomično apsorbira bakterijske toksine te oni ne interferiraju s određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije ispitivane tvari.

Sastav podloge (u jednoj litri):

- goveđi ekstrakt - 2,0 g
- kiseli hidrolizat kazeina - 17,5 g
- škrob - 1,5 g
- agar - 17,0 g

2.5.3.3. Priprema bakterijskih kultura

Za pripremu 100 mL hranjive podloge potrebno je izvagati 2,2 g Müller Hintona, 0,5 g ekstrakta kvasca i 1,5 g agara. Nakon toga dodaje se 1 mL glicerola te do 100 mL 0,25M otopine PBS-a (fosfatni pufer, engl. *Phosphate buffer saline*) i podešene pH vrijednosti na 7,4. Potrebno je sve promiješati te kuhati 10 minuta. Podloge tada autoklavirati na 121 °C tijekom 15 min. Nakon autoklaviranja, podloge ohladiti i izliti u petrijevke. Dodatnim hlađenjem podloga se stvrdnjava te se tada nasađuju bakterijske kulture. Nasađena su 4 soja bakterija za ispitivanje te ostavljena na inkubaciji tijekom noći (16h) pri temperaturi od 37 °C.



Slika 7. Prikaz bakterijskih kultura istraživanih sojeva nakon inkubacije

2.5.3.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Za pripremu 1L Müller Hinton bujona potrebno je izvagati 22g Müller Hintona i dodati 1L destilirane vode, zagrijati do potpunog otapanja te autoklavirati pri 121 °C tijekom 15 minuta. Pripremljeni bujon se nakon sterilizacije i hlađenja pohranjuje u hladnjak.

Postupak:

Pokus se izvodi na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. U svaku jažicu se otpipetira 100 µL Muller Hinton bujona (MH bujon). U prvu jažicu u nizu je dodano 100 µL antibiotika amikacina, koji je korišten kao pozitivna kontrola. Korišteni antibiotik je razrijeđen u omjeru 1:500. U drugu jažicu dodano je 100 µL otapala kao negativna kontrola. U svaku sljedeću jažicu u nizu dodano je po 100 µL razrijeđenih ekstrakata, redom od 1. do 13. Sve je rađeno u duplikatu, tako da je na svakoj pločici nakon šeste jažice ponovljen postupak. Multikanalnom pipetom je promiješano sve dodano u prve jažice u nizu te je nakon miješanja preneseno po 100 µL u sljedeće, u svrhu dobivanja serijskih razrijeđenja. Nakon razrjeđenja ispitivanog uzorka,

u svaku se jažicu dodaje 20 µL bakterijske suspenzije. Odnosno, u svaku je jažicu inokulirano 300 × 10^3 bakterija (gustoća korištene bakterijske suspenzije je 0,5 na McFarland skali, što iznosi 150 × 10^6 bakterija/mL). Tako priređena pločica se inkubira na 37 °C tijekom 24h.

Promjene nastale rastom, odnosno inhibicijom rasta bakterija, očitavaju se golim okom. Naime, pojava zamućenja ili taloga na dnu mikrotitarske pločice znak su rasta bakterija. Pojave taloga dodatno se uspoređuju s kontrolnim jažicama. Najveće razrjeđenje uzorka pri kojem nije došlo do pojave zamućenja predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju pojedinog uzorka.

Slika 8. Prikaz mikrotitarskih pločica pripremljenih za inkubaciju

2.6. Dizajn eksperimenta

Box-Behnkenov dizajn (BBD), detaljno objašnjen u istraživanju Başa i Boyacıa (2007), korišten je za određivanje optimalnih procesnih parametara za ekstrakciju lišća rutvice pomoću eutektičkog otapala. Sadržaj vode (X_1), vrijeme (X_2) i temperatura (X_3) bili su nezavisne varijable koje su proučavane kako bi se optimizirao postupak ekstrakcije u smislu dobivanja većeg sadržaja rutina u ekstraktima. Ispitivani čimbenici i ispitane razine prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Razine nezavisnih varijabli za dizajnirani eksperiment

Nezavisna varijabla	Simbol	Razina		
		Niska (-1)	Srednja (0)	Visoka(+1)
Sadržaj vode % (v/v)	X_1	10	20	30
Vrijeme (min)	X_2	40	50	60
Temperatura (°C)	X_3	1	2	3

Analiza je izvedena pomoću komercijalnog softvera Design-Expert® (ver 9, Stat-Ease Inc., USA). Analiza varijance (ANOVA) također je korištena za procjenu kvalitete opremljenog modela. Test statističke razlike temelji se na ukupnim kriterijima pogreške s razinom pouzdanosti od 95,0 %.

2.7. Statistička obrada podataka

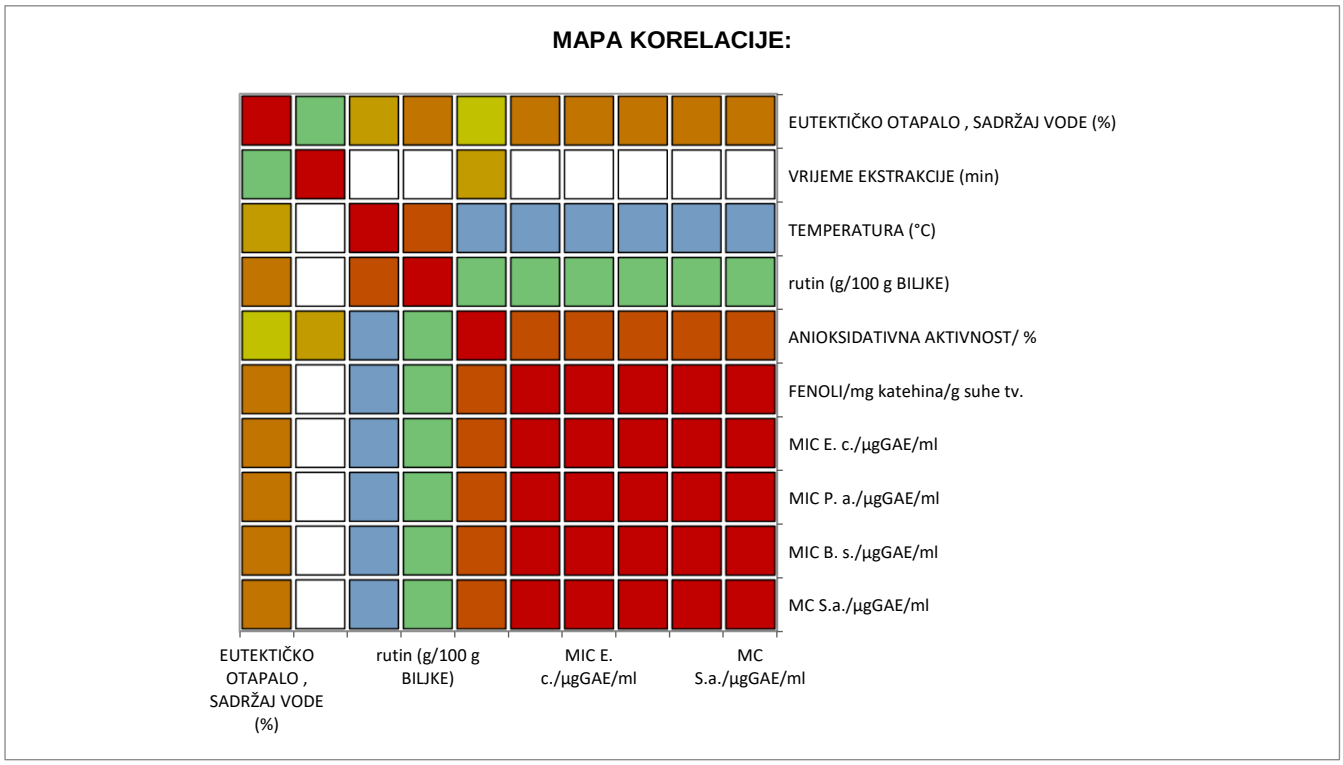
Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilk testom. Obzirom na to da podaci ne slijede normalnu raspodjelu, za usporedbu ekstrakata rutvice prema koncentraciji ukupnih fenola, antioksidacijskoj i antibakterijskoj aktivnosti korišten je neparametrijski Spearmanov koeficijent korelacije. Za prikaz rezultata korišten je dijagram raspršenja (engl. *Scatter diagram*) na kojemu se nezavisna varijabla nalazi na osi *x*, a zavisna na osi *y*. Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkom programu programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA), a korelacijske mape izrađene su pomoću programa XLSTAT-Base. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od $\alpha=0.05$.

3. REZULTATI

Rezultati

Analizom rezultata uspoređen je utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije na sadržaj rutina (Slike 10. i 11.), koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva (Slika 12.), ukupnu antioksidacijsku aktivnost (Slika 13.) i antibakterijsko djelovanje (Slike 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20. i 21.) ekstrakata rutvice.

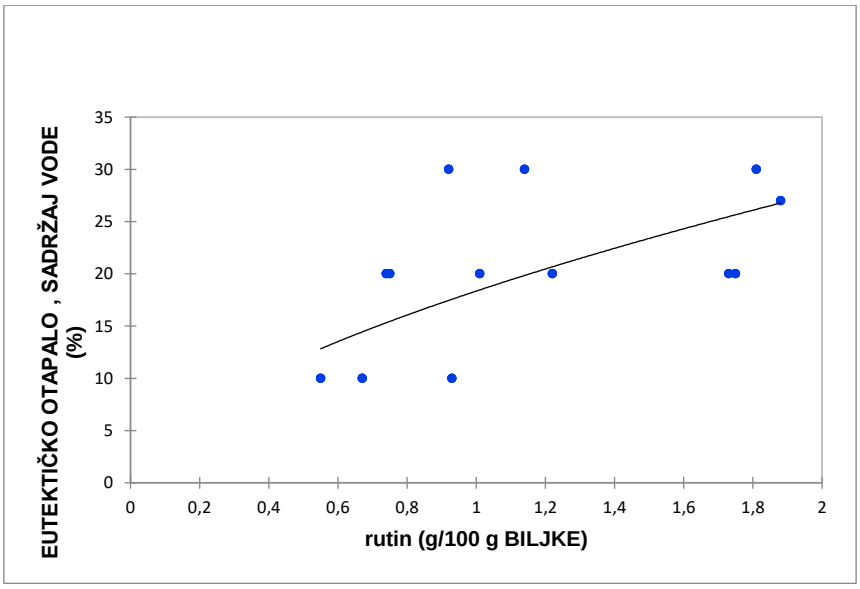
Slika 9. Prikaz korelacijske mape uvjeta i parametara u provedenom istraživanju



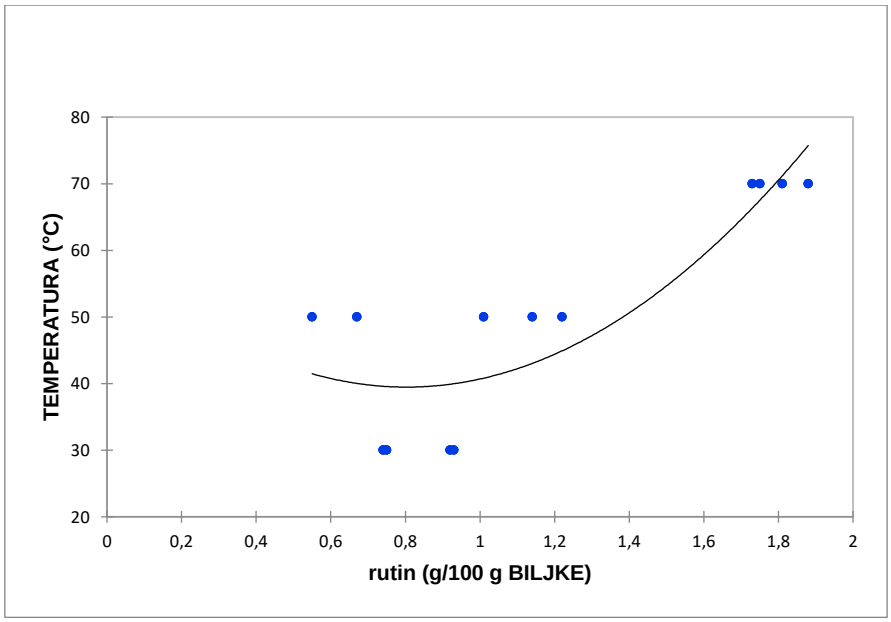
* korelacijska mapa koristi plavo-crvenu (hladno-toplo) skalu za prikaz korelacije; plava boja odgovara korelaciji blizu -1, crvena boja odgovara korelaciji blizu 1, a zelena korelacija je blizu 0.

3.1. Utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije na sadržaj rutina

U ispitivanju količine sadržaja rutina, najveća dobivena vrijednost iznosi 1,88 g rutina/100 g biljke pri temperaturi od 70 °C i sadržaju vode od 27 % tijekom 52 minute. Najmanja vrijednost iznosi 0,55 g rutina/100 g biljke, a dobivena je pri 50 °C, 10 % vode i 30 minuta. Srednja vrijednost u provedenoj ekstrakciji iznosi 1,162 g rutina/100 g biljke. Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije, među uzorcima postoji dobra povezanost ($p<0.05$).



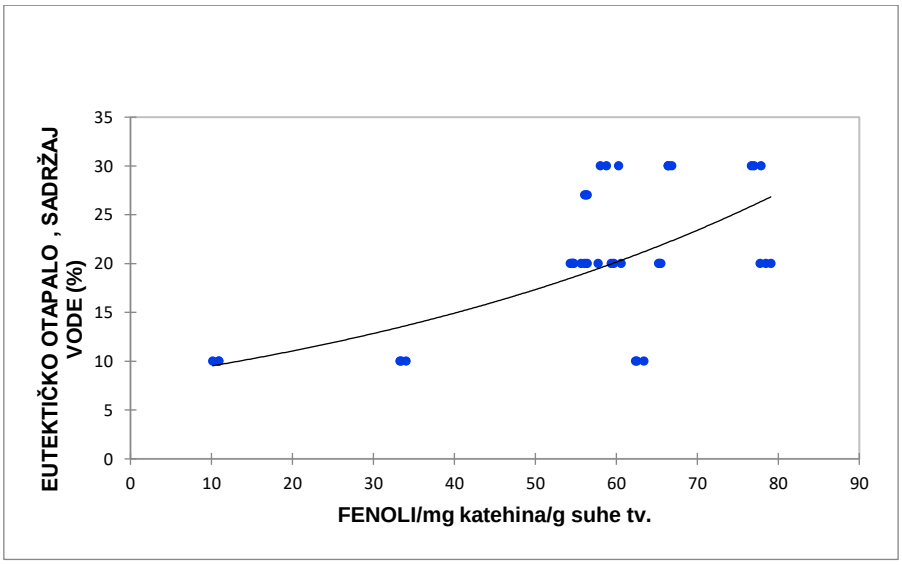
Slika 10. Prikaz povezanosti sadržaja vode (%) u eutektičkom otapalu i količine rutina (g u 100 g biljke) (r=0,56; p<0,05)



Slika 11. Prikaz povezanosti temperature (°C) ekstrakcije i količine rutina (g u 100 g biljke) (r=0,73; p<0,05)

3.2. Utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola

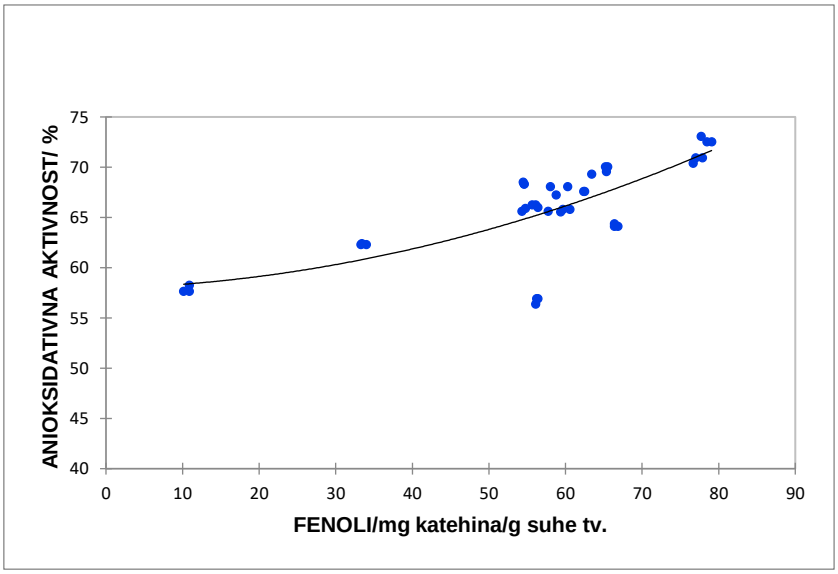
Najveća dobivena vrijednost koncentracije ukupnih fenola iznosi 79,076 mg katehina/g suhe tvari pri uvjetima ekstrakcije 30 °C, 20 % vode i tijekom 90 minuta. Najmanja dobivena vrijednost iznosi 10,146 mg katehina/g suhe tvari i dobivena je pri 30 °C, 10 % vode i tijekom 60 minuta. Srednja vrijednost u provedenoj analizi iznosi 56,604 mg katehina/g suhe tvari. Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije postoji dobra povezanost među uzorcima ($p<0,05$).



Slika 12. Prikaz povezanosti sadržaja vode (%) u eutektičkom otapalu i koncentracije ukupnih fenola (mg katehina/g suhe tvari) ($r=0,50$; $p<0,05$)

3.3. Antioksidacijska aktivnost (DPPH analiza)

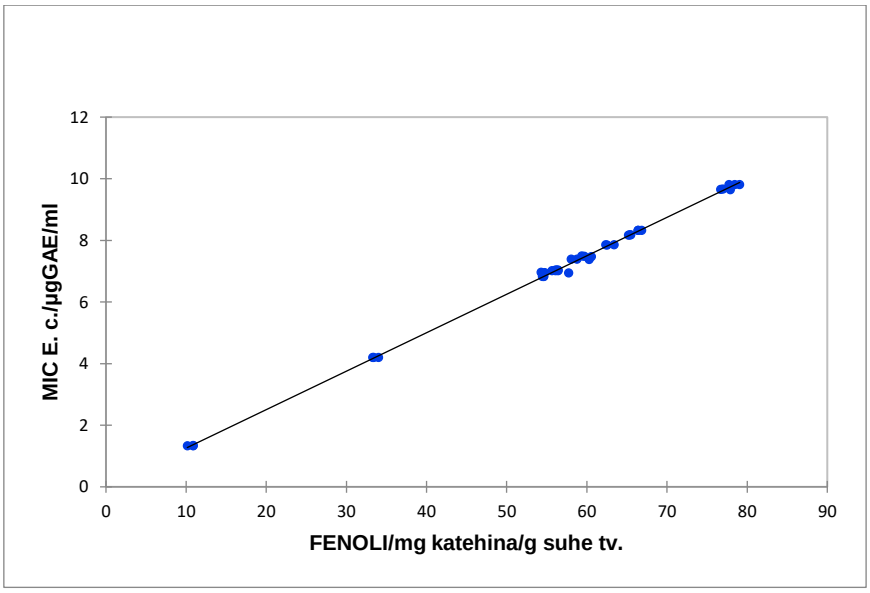
Antiradikalne aktivnosti izražene su kao postotak smanjenja početne DPPH apsorpcije s različito dobivenim ekstraktima rutvice. Korišteni uzorci su nakon razrjeđenja bili finalne koncentracije c_f = 0,026 mg suhe tv./ml. U ispitivanju antioksidacijske aktivnosti najveća dobivena vrijednost iznosi 73,07 % pri uvjetima ekstrakcije 30 °C, 20 % vode i tijekom 90 minuta, dok najmanja iznosi 56,37 % i dobivena je pri 70 °C, 27 % vode i tijekom 52 minute. Srednja vrijednost dobivenih rezultata DPPH analize iznosi 65,86 %. Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije dobivene vrijednosti su dobro povezane s ukupnim sadržajem fenola.



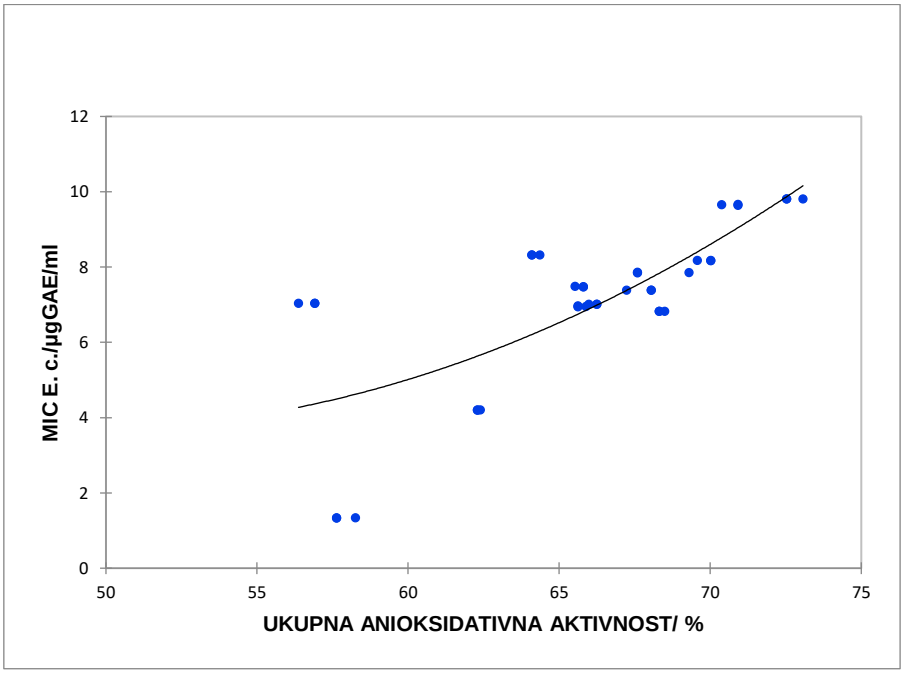
Slika 13. Prikaz povezanosti antioksidacijske aktivnosti (%) i ukupnog sadržaja fenola (mg katehina/g suhe tvari) ($r=0,64$; $p<0,05$)

3.4. Antibakterijska aktivnost (MIC)

Korišteni uzorci su nakon razrjeđenja bili finalne koncentracije c_f = 1 mg/ml. Spearmanovim koeficijentom korelacije utvrđeno je da između uzoraka svih bakterija i antioksidacijske aktivnosti postoji dobra povezanost, dok je povezanost s koncentracijom ukupnih fenola izvrsna.

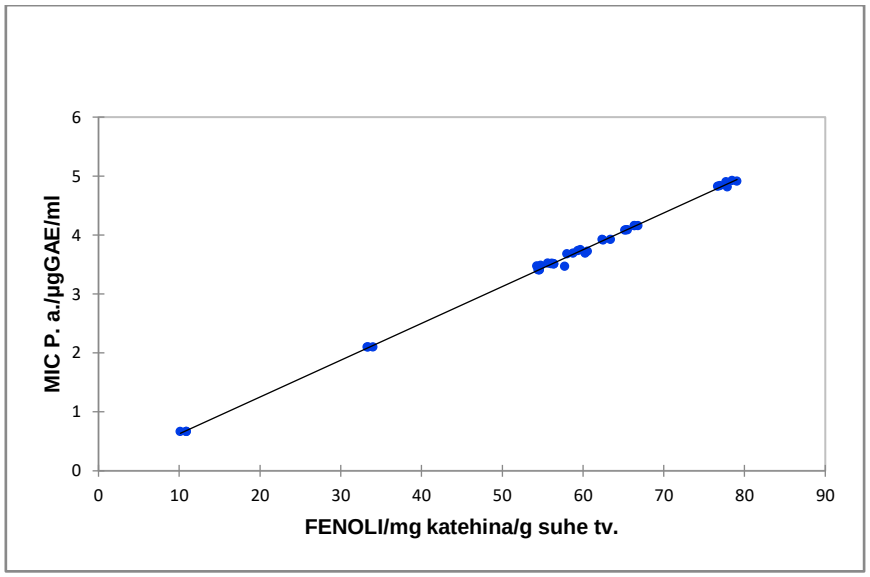


Slika 14. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije bakterije *E. coli* (µgGAE/ml) i koncentracije ukupnih fenola (mg katehina/g suhe tvari) (r = 0,98; p<0,05)

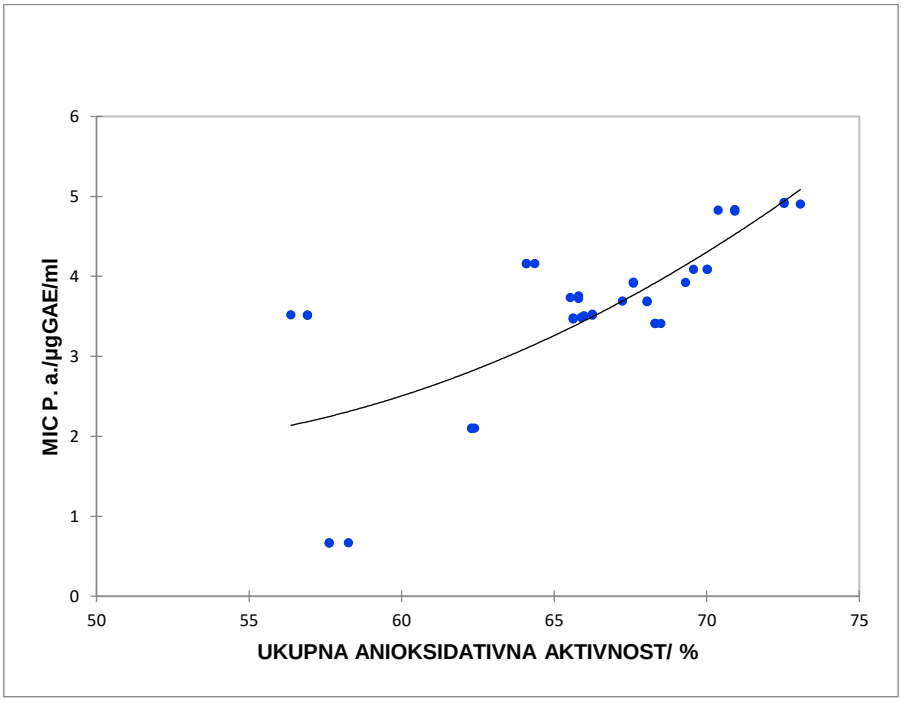


Slika 15. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije bakterije *E. coli* (µgGAE/ml) i ukupne antioksidacijske aktivnosti (%) (r=0,61; p<0,05)

Minimalna inhibitorna koncentracija dobivena ispitivanjem bakterije *E. coli* iznosi 1,328 µgGAE/ml, dobivena kod uzorka koji je ekstrahiran pri 30 °C, 10 % vode i tijekom 60 minuta. Najveća koncentracija iznosi 9,806 µgGAE/ml, a dobivena je kod uzorka koji je ekstrahiran pri 30 °C, 20 % vode i tijekom 90 minuta. Srednja vrijednosti dobivenih rezultata iznosi 7,075 µgGAE/ml.

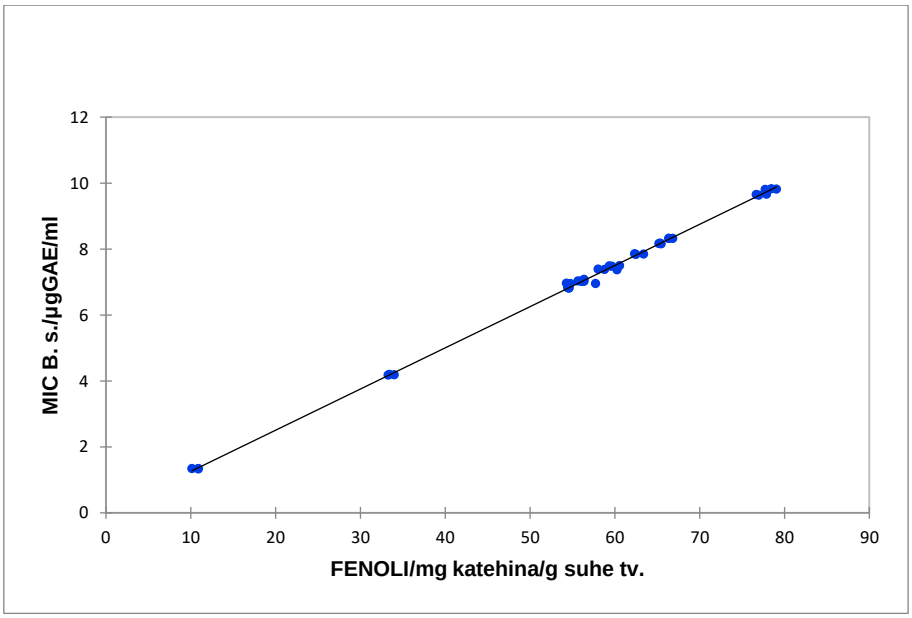


Slika 16. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije kod bakterije *P. aeruginosa* (µgGAE/ml) i koncentracije ukupnih fenola (mg katehina/g suhe tvari) (r=0,97; p<0,05)

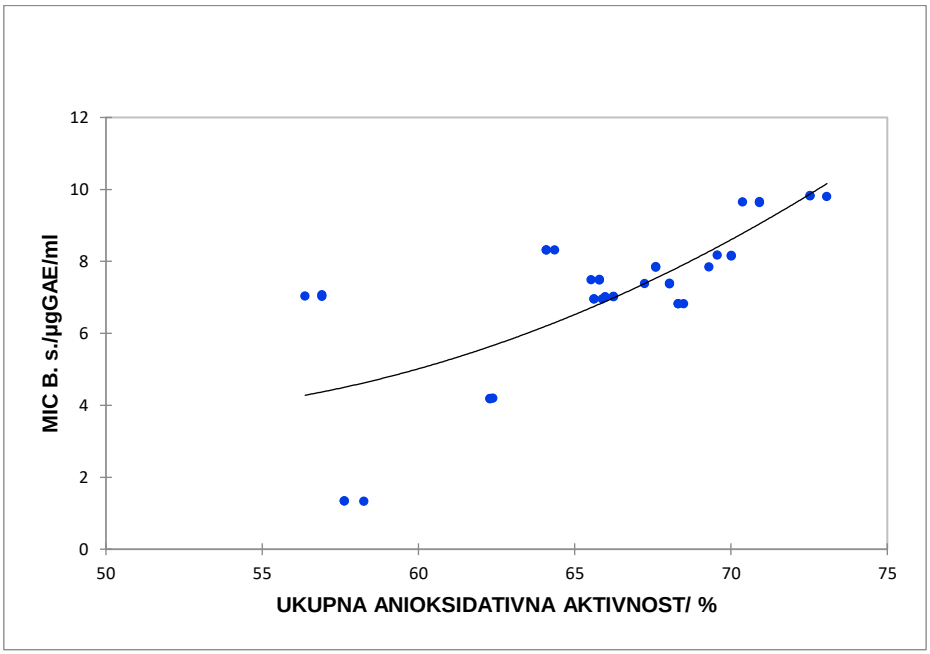


Slika 17. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije kod bakterije *P. aeruginosa* (µgGAE/ml) i ukupne antioksidacijske aktivnosti (%) (r=0,62; p<0,05)

Minimalna inhibitorna koncentracija dobivena ispitivanjem bakterije *P. aeruginosa* iznosi 0,664 µgGAE/ml i dobivena je kod uzorka koji je ekstrahiran pri 30 °C, 10 % vode i tijekom 60 minuta. dok najveća iznosi 4,922 µgGAE/ml i dobivena je kod uzorka koji je ekstrahiran pri 30 °C, 20 % vode i tijekom 90 minuta. Srednja vrijednosti dobivenih rezultata iznosi 3,538 µgGAE/ml.

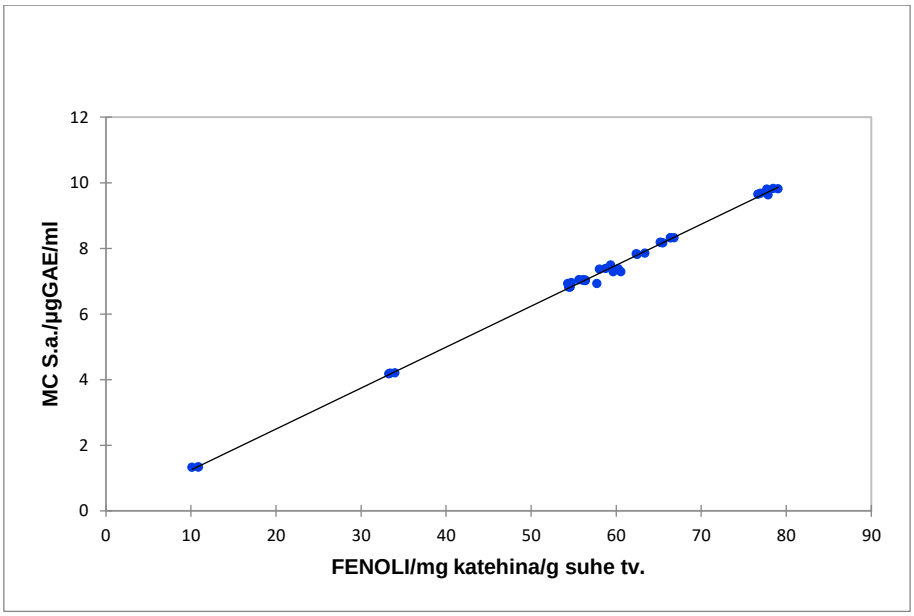


Slika 18. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije kod bakterije *B. subtilis* (µgGAE/ml) i koncentracije ukupnih fenola (mg katehina/g suhe tvari) (r=0,98; p<0,05)

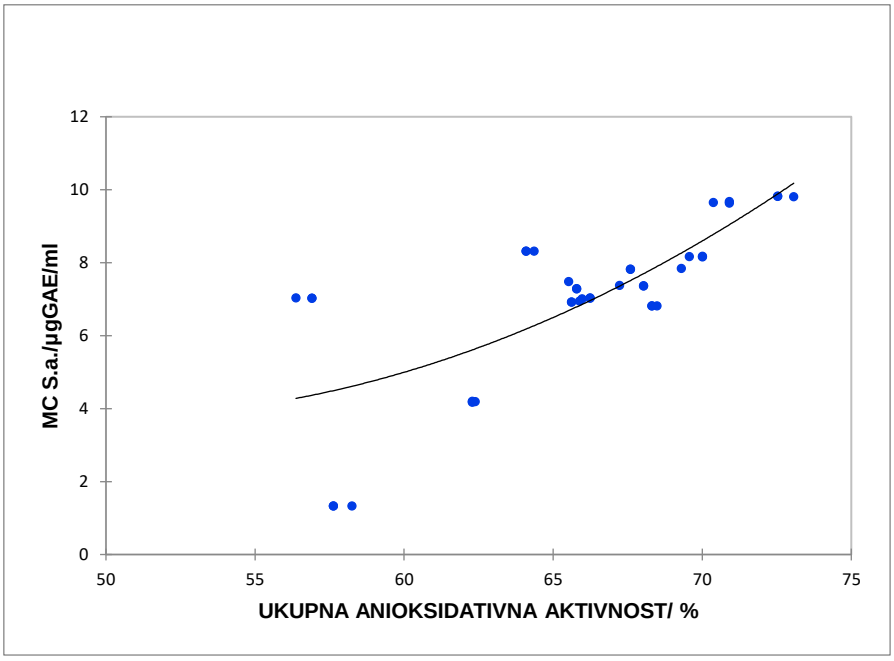


Slika 19. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije kod bakterije *B. subtilis* (µgGAE/ml) i ukupne antioksidacijske aktivnosti (%) (r=0,62; p<0,05)

Minimalna inhibitorna koncentracija dobivena ispitivanjem bakterije *B.subtilis* iznosi 1,330 µgGAE/ml i dobivena je kod uzorka koji je ekstrahiran pri 30 °C, 10 % vode i tijekom 60 minuta dok najveća iznosi 9,825 µgGAE/ml i dobivena je kod uzorka koji je ekstrahiran pri 30 °C, 20 % vode i tijekom 90 minuta. Srednja vrijednost dobivenih rezultata iznosi 7,076 µgGAE/ml.



Slika 20. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije kod bakterije *S. aureus* (µgGAE/ml) i koncentracije ukupnih fenola (mg katehina/g suhe tvari) (r=0,97; p<0,05)



Slika 21. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije kod bakterije *S. aureus* (µgGAE/ml) i antioksidacijske aktivnosti (%) (r=0,63; p<0,05)

Minimalna inhibitorna koncentracija dobivena ispitivanjem bakterije *S. aureus* iznosi 1,327 µgGAE/ml i dobivena je kod uzorka koji je ekstrahiran pri 30 °C, 10 % vode i tijekom 60 minuta. Najveća iznosi 9,824 µgGAE/ml i dobivena je kod uzorka koji je ekstrahiran pri 30 °C, 20 % vode i tijekom 90 minuta. Srednja vrijednosti dobivenih rezultata iznosi 7,063 µgGAE/ml.

4. RASPRAVA

Rasprava

U ovom diplomskom radu utvrđeno je kako različiti uvjeti ekstrakcije listova rutvice u eutektičkim otapalima utječu na ukupni sadržaj rutina, fenolnih spojeva, ukupnu antioksidacijsku i antibakterijsku aktivnost na Gram pozitivne i Gram negativne humane patogene te su na taj način pronađeni optimalni uvjeti ekstrakcije.

Glavni nedostatak povezan s rutinom je njegova ograničena bioraspoloživost, uglavnom zbog niske topljivosti u vodi, slabe stabilnosti i ograničene propusnosti membrane. Zbog takvih uvjeta bilo je potrebno napraviti optimiranu ekstrakciju pri čemu se različitim vremenima reakcije, temperaturama i sadržajem vode optimiralo uvjete za ekstrakciju najveće količine rutina. Tijekom 52 minute pri temperaturi od 70 °C i 27 % vode, dobiveno je 1,88 g rutina/100g biljke što je ujedno i najveća količina dobivenog rutina među uzorcima, dok je najmanja količina 0,55 g rutina/100 g biljke dobivena tijekom 30 minuta pri 50 °C i 10 % vode. Spearmanov koeficijent korelacije potvrdio je dobru povezanost između sadržaja rutina i temperature te sadržaja vode iz čega je moguće zaključiti da će se pri većoj temperaturi i sadržaju vode ekstrahirati i veće koncentracije rutina. Zbog navedenih nedostataka rutina ekstrakcija se radila u eutektičkom otapalu što je relativna novost u ovom području. Tek se u nekoliko dosadašnjih istraživanja eutektička otapala koriste za ekstrakciju rutina. Huang i sur. (2017) ekstrahirali su rutin iz heljde, s 95 %-tnom efikasnošću ekstrakcije, kombinirajući ultrazvuk i eutektička otapala, dok se u drugom istraživanju rutin ekstrahirao iz japanske sofore (*Sophora japonica* L.) upotrebom 20 različitih eutektičkih otapala baziranih na kolin-kloridu (Zhao i sur., 2015).

Sadržaj ukupnih fenola rutvice dobiven je Folin-Ciocalteu metodom, te je utvrđeno da uvjeti koji su optimalni za dobivanje najveće količine rutina, nisu optimalni i za ekstrakciju ukupnih fenola. Najveći sadržaj ukupnih fenola dobiven je tijekom 90 minuta pri 30 °C i 20 % vode, dok je najmanji pri istoj temperaturi, ali tijekom 60 minuta i s 10 % vode. Nekoliko parametara može utjecati na prinos fenola, uključujući vrijeme ekstrakcije, temperaturu, omjer otapala i uzorka, vrstu otapala i polarnost, te broj ponovljenih ekstrakcija uzoraka. Te se razlike mogu pripisati različitim svojstvima fenola (Fan i sur., 2015). S obzirom na sposobnost formiranja vodikovih veza s vodom što utječe na topljivost fenola, moguće je zaključiti da će se pri većem sadržaju vode otopiti i veće koncentracije fenola. To je pokazano i Spearmanovim testom korelacije gdje je postojala dobra povezanost između uzoraka u pogledu količine vode u eutektičkom otapalu i količine dobivenih fenola. U svome radu Durling i sur. (2007) primijetili

su da se sadržaj fenola povećao u kratkom vremenu ekstrakcije. Povećanim vremenom ekstrakcije potencijalno se povećava i gubitak otapala isparavanjem zbog čega predlažu da vrijeme ekstrakcije ne bude duže od 3h. U jednom od istraživanja, znanstvenici su kvantitativno i kvalitativno ispitivali fitokemikalije u rutvici uključujući i GC-MS (engl. *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*) profiliranje metanolnih ekstrakata stabljike, korijena i lišća. Među čak 160 različitih komponenti koje su pronašli, uvelike su zastupljeni i flavonoidi, jedna od skupina fenola (Benazir, 2011). Flavonoidi su poznati kao jaki antioksidansi s obzirom da je utvrđeno kako mogu zaštititi tkivo od slobodnih radikala kisika i oksidacije. Imaju ulogu i u prevenciji ateroskleroze, raka, kroničnih upala, mogu inhibirati starenje, a posjeduju i antiparazitsko djelovanje (Sharma, 2006). U brojnim istraživanjima, za fenole je pokazano da imaju brojne pozitivne učinke, među kojima su i oni antibakterijski (Mocan i sur., 2014).

Antioksidacijsko djelovanje ekstrakata rutvice ispitano je DPPH analizom, a pokazalo se da ekstrakti s najvećom količinom fenola imaju i najveći postotak ukupne antioksidacijske aktivnosti pri čemu je korelacija potvrđena Spearmanovim koeficijentom, a uvjeti su jednaki. Najmanja antioksidacijska aktivnost je dobivena pri 70 °C, 27 % vode i tijekom 52 minute. Također, kod dva ekstrakta u uvjetima s 10 % sadržaja vode u eutektičkom otapalu dobivene su vrlo male količine fenola pri čemu je moguće zaključiti da je to premala količina vode da bi se fenoli uspjeli ekstrahirati, ali su se očito ekstrahirale određene komponente koje imaju povoljan utjecaj na antibakterijsku aktivnost, koja se pokazala najboljom u tim uzorcima. Mnogobrojna dosadašnja istraživanja također su potvrdila da neke biljke, među njima i rutvica, svoju antioksidacijsku djelatnost mogu zahvaliti upravo fenolima (Pandey i sur., 2011). U istraživanju koje su proveli Pandey i sur. (2011) pokazalo se da ekstrakt lišća rutvice pokazuje snažnu antioksidacijsku aktivnost inhibirajući hidroksilni radikal te dušikove i željezove okside. Slično istraživanje također je pokazalo da antioksidacijska aktivnost rutvice osim inhibicije DPPH radikala, može sudjelovati i u inhibiciji lipidne peroksidacije (Mohammadi-Motamed i sur., 2014).

Antibakterijsko djelovanje ekstrakata rutvice ispitivano je metodom minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Pokazalo se da su optimalni uvjeti za učinkovito antibakterijsko djelovanje pri nižim temperaturima, s malim postotkom sadržaja vode i tijekom dužeg perioda vremena. Najučinkovitije djelovanje uočeno je kod bakterije *P. aeruginosa*, a najmanje učinkovito kod bakterije *B. subtilis*. Najniža minimalna inhibitorna koncentracija dobivena je pri 10 % vode, 30 °C i tijekom 60 minuta, dok je najveća dobivena pri 20 % vode, 30 °C i tijekom 90 minuta. Dva ekstrakta dobivena pri 10% sadržaja vode, za koje se pokazalo da imaju

najmanje količine fenola, u ovom slučaju imaju najniže minimalne inhibitorne koncentracije. Spearmanov koeficijent korelacije pokazao je da među sadržajem fenola i antibakterijskom aktivnošću postoji dobra povezanost, no ne na povećanje te aktivnosti. U jednom od istraživanja također su se ispitivala antibakterijska svojstva rutvice analizom fitokemikalija, a kao antibakterijski agensi izdvojene su alifatske kiseline, različiti alkaloidi te terpeni (Benazir, 2011). U sličnom istraživanju alkaloidi su također izdvojeni kao česte komponente ekstrakata rutvice, s najvećim koncentracijama u lišću (Tang i sur., 2002). Mikroskopske analize fluorescencije rutvice provedene u jednom istraživanju, pokazale su značajne razlike u lokalizaciji akridonskih alkaloida u različitim organima. Čini se da su korijeni, i mladi i stari, najbogatiji akridonima. Intenzivna akumulacija zabilježena je i u parenhimskim stanicama zaštitnih tkiva (kaliptra, rizodermis i hipodermis) mladih korijena i ksiloma starih. Akridoni su granulirani i pričvršćeni na staničnu stijenku ili se više-manje homogeno distribuiraju u plazmi (Verzár–Petri i sur., 1976). U istraživanju koje su proveli Ouerghemmi i sur. (2017), ispitivano je postoje li razlike u antioksidacijskoj i antibakterijskoj aktivnosti kod divljih i uzgojenih vrsta *R. chalepensis*. Antibakterijska aktivnost je ispitivana na bakterijama *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*, a najbolje djelovanje je, kao i u ovome istraživanju, uočeno kod *P. aeruginosa*. Sama antibakterijska aktivnost bila je ovisna o organima i porijeklu biljke, a najveća je dobivena u uzorcima stabljike. Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije, između uzoraka bakterija i antioksidacijske aktivnosti postoji dobra povezanost. U sličnom istraživanju, znanstvenici su analizirali biološke aktivnosti metanolnih ekstrakata vrste *R. chalepensis*. Kemijski sastav esencijalnog ulja odredili su putem GC/MS (engl. *Gas chromatography/Mass spectrometry*), antioksidacijsku aktivnost putem DPPH radikala, a antibakterijsku aktivnost su putem MIC i disk-difuzijske metode na bakterijama *E. coli*, S. aureus, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas hydrophila* i *Listeria monocytogenes*. Metanolni ekstrakti su pokazali značajnu antibakterijsku aktivnost, najveću kod *E. coli* i *P. aeruginosa*, te umjerenu kod ostalih sojeva. Ono što je zanimljivo je da su Gram-pozitivne bakterije osjetljivije na esencijalna ulja i ekstrakte od Gram-negativnih bakterija zbog hidrofobnih lipopolisaharida koji se nalaze u njihovoj vanjskoj membrani, a ona im osigurava zaštitu od različitih agenasa (Karaman i sur., 2003; Sahin i sur., 2003). U skladu s time, u našem istraživanju, Gram-pozitivne *E. coli* i *P. aeruginosa* su bile osjetljivije na korištene ekstrakte od Gram-negativnih *B. subtilis* i *S. aureus*.

Ekstrakti rutvice u ovom su istraživanju u različito postavljenim uvjetima pokazali dobru antioksidacijsku i antibakterijsku aktivnost koje su uvjetovane različitim i brojnim komponentama same biljke. S obzirom na to, u budućim istraživanjima bi se trebalo osvrnuti i

na njih te detaljnije proučiti njihova svojstva, pa čak i mehanizme kojima se odvijaju navedene aktivnosti. Poželjno je napraviti RP-HPLC (engl. *Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography*) analize sekundarnih metabolita kao što su akridonski alkaloidi, alifatske kiseline, furanokumarini, tanini i terpeni. Uz to, poželjno bi bilo i usporediti različite vrste ekstrakcija kao što je ekstrakcija superkritičnim fluidima, mikrovalna i ultrazvučna ekstrakcija. Također bi u daljnja istraživanja bilo poželjno uključiti i raznovrsnije metode. U slučaju antibakterijskog djelovanja uključiti i disk-difuzijsku metodu, dok kod antioksidacijskog djelovanja FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodu po Benzieu i Strainu (1996) i ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) metodu po Artsu i sur. (2001). Tako dobiveni rezultati bili bi statistički točniji i značajniji, a preciznije bi se moglo odrediti i više komponenata ekstrahiranih ovim načinom ekstrakcije te detaljnije odrediti njihovu specifičnu ulogu.

5. ZAKLJUČCI

ZAKLJUČCI

Usporedbom utjecaja različitih uvjeta ekstrakcije na sadržaj rutina, koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva, ukupnu antioksidacijsku aktivnost i antibakterijsko djelovanje ekstrakata rutvice u ovome istraživanju, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Optimalni uvjeti ekstrakcije za dobivanje najveće koncentracije rutina su 70 °C, 27 % sadržaja vode i period od 52 minute.
- Pri višoj temperaturi i većem sadržaju vode ekstrahirat će se i veće količine rutina.
- Uvjeti koji su optimalni za dobivanje najveće količine rutina, nisu optimalni i za ekstrakciju fenola, te učinkovito djelovanje ostalih praćenih parametara.
- Pri većem sadržaju vode ekstrahirat će se i veće koncentracije fenola.
- Ekstrakti s najvećom količinom fenola imaju i najveći postotak ukupne antioksidacijske aktivnosti u jednakim uvjetima.
- Optimalni uvjeti za učinkovito antibakterijsko djelovanje su pri nižim temperaturama, s malim postotkom sadržaja vode i tijekom dužeg perioda vremena ekstrakcije.
- Veći sadržaj fenola uzrokovao je smanjenje antibakterijske aktivnosti.
- Gram-pozitivne *E. coli* i *P. aeruginosa* su osjetljivije na djelovanje ekstrakata od Gram-negativnih *B. subtilis* i *S. aureus*.

6. LITERATURA

LITERATURA

Abbott AP, Capper G, Davies DL, Munro HL, Rasheed RK, Tambyrajah V. 2001. Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chem Commun Camb Engl*:2010–2011.

Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. 2003. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem Commun* 0:70–71.

Abbott AP, Barron JC, Ryder KS, Wilson D. 2007. Eutectic-based ionic liquids with metal-containing anions and cations. *Chem Weinh Bergstr Ger* 13:6495–6501.

Acquaviva R, Iauk L, Sorrenti V, Lanteri R, Santangelo R, Licata A, Licata F, Vanella A, Malaguarnera M, Ragusa S, et al. 2011. Oxidative profile in patients with colon cancer: effects of *Ruta chalepensis* L. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15:181–191.

Akileshwari C, Muthenna P, Nastasijević B, Joksić G, Petrash JM, Reddy GB. 2012. Inhibition of Aldose Reductase by *Gentiana lutea* Extracts. *Exp Diabetes Res* 2012.

Almeida MMB, de Sousa PHM, Arriaga ÂMC, do Prado GM, Magalhães CE de C, Maia GA, de Lemos TLG. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res Int* 44:2155–2159.

Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1:5–16.

Arts MJTJ, Haenen GRMM, Voss HP, Bast A. 2001. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food Chem. Toxicol.* 39:787–791.

Bandow JE, Brötz H, Hecker M. 2002. Bacillus subtilis Tolerance of Moderate Concentrations of Rifampin Involves the ϛB-Dependent General and Multiple Stress Response. *J Bacteriol* 184:459–467.

Baş D, Boyacı İH. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng* 78:836–845.

Belda E, Sekowska A, Le Fèvre F, Morgat A, Mornico D, Ouzounis C, Vallenet D, Médigue C, Danchin A. 2013. An updated metabolic view of the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Microbiol Read Engl* 159:757–770.

Benazir JF. 2011. Phytochemical profiling, antimicrobial and cytotoxicity studies of methanolic extracts from *Ruta graveolens*. *Intell Transp Syst J* 44:1407–1409.

Bentley R, Meganathan R. 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev* 46:241–280.

Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „Antioxidant Power“: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239:70-76.

Bethge EW, Bohuslavizki KH, Hänsel W, Kneip A, Koppenhöfer E. 1991. Effects of some potassium channel blockers on the ionic currents in myelinated nerve. *Gen Physiol Biophys* 10:225–244.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ* J 5:9–19.

Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. 1997. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Sci Technol* 30:609–615.

Botzenhart K, Döring G. 1993. Ecology and Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *In Pseudomonas aeruginosa* as an Opportunistic Pathogen. M Campa, M Bendinelli, and H Friedman (eds.), pp. 1–18. *Springer US*

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 28:25–30.

Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE, Witkamp G-J, Verpoorte R. 2011. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?[W]. *Plant Physiol* 156:1701–1705.

Cole AM, Tahk S, Oren A, Yoshioka D, Kim Y-H, Park A, Ganz T. 2001. Determinants of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1064–1069.

Conway GA, Slocumb JC. 1979. Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. *J Ethnopharmacol* 1:241–261.

Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. 1994. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176:2137–2142.

Dai Y, van Spronsen J, Witkamp G-J, Verpoorte R, Choi YH. 2013. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* 766:61–68.

Dufour AP. 1977. *Escherichia coli:* The Fecal Coliform. *J Bacteriol* 154:2237–2142.

Durling NE, Catchpole OJ, Grey JB, Webby RF, Mitchell KA, Foo LY, Perry NB. 2007. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chem* 101:1417–1424.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. 2005. *Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. Science* 308:1635–1638.

Eickhorst K, DeLeo V, Csaposs J. 2007. Rue the herb: *Ruta graveolens*--associated phytophototoxicity. *Dermat Contact Atopic Occup Drug* 18:52–55.

Evans MD, Cooke MS. 2004. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 26:533–542.

Fan R, Yuan F, Wang N, Gao Y, Huang Y. 2015. Extraction and analysis of antioxidant compounds from the residues of *Asparagus officinalis* L. *J Food Sci Technol* 52:2690–2700.

Fick GM, Gabow PA. 1994. Hereditary and acquired cystic disease of the kidney. *Kidney Int* 46:951–964.

Gacche RN, Gond DS, Dhole NA, Dawane BS. 2006. Coumarin Schiff-bases: as antioxidant and possibly anti-inflammatory agents. *J Enzyme Inhib Med Chem* 21:157–161.

Gligić V, Etimološki botanički rečnik, Sarajevo: Veselin Masleša, 1954.

Grlić Lj, Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, Zagreb: August Cesarec, 1990.

Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farm Soc Chim Ital* 1989 56:683–687.

Haesen JP, Vörde Sive Vörding JG, Kho KF. 1971. Isolation and identification of xanthotoxin from the underground parts of *Ruta graveolens*. *Planta Med* 19:285–289.

Halliwell B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35:1147–1150.

Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. 2011. Redox biology and gastric carcinogenesis: the role of *Helicobacter pylori*. *Redox Rep Commun Free Radic Res* 16:1–7.

Heskel NS, Amon RB, Storrs FJ, White CR. 1983. Phytophotodermatitis due to *Ruta graveolens*. *Contact Dermatitis* 9:278–280.

Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 5:1663–1674.

Hong HA, Khaneja R, Tam NMK, Cazzato A, Tan S, Urdaci M, Brisson A, Gasbarrini A, Barnes I, Cutting SM. 2009. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Res Microbiol* 160:134–143.

Huang D, Zhou H, Lin L. 2012. Biodiesel: an Alternative to Conventional Fuel. *Energy Procedia* 16:1874–1885.

Huang Y, Feng F, Jiang J, Qiao Y, Wu T, Voglmeir J, Chen Z-G. 2017. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chem* 221:1400–1405.

Hudault S, Guignot J, Servin A. 2001. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* 49:47–55.

Ishii S, Sadowsky MJ. 2008. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes Environ* 23:101–108.

Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I. 2005. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia* 76:344–347.

Jenkin GRT, Al-Bassam AZM, Harris RC, Abbott AP, Smith DJ, Holwell DA, Chapman RJ, Stanley CJ. 2016. The application of deep eutectic solvent ionic liquids for environmentally-friendly dissolution and recovery of precious metals. *Miner Eng* 87:18–24.

Jokić S, Rajić M, Bilić B, Molnar M. 2016. Supercritical Extraction of Scopoletin from *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Flowers. *Phytochem Anal PCA* 27:290–295.

Juźwiak S, Wójcicki J, Mokrzycki K, Marchlewicz M, Białecka M, Wenda-Rózewicka L, Gawrońska-Szklarz B, Droździk M. 2005. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol Rep PR* 57:604–609.

Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ogütçü H, Sengül M, Adigüzel A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 85:231–235.

Khori V, Nayebpour M, Semnani S, Golalipour MJ, Marjani A. 2008. Prolongation of AV nodal refractoriness by *Ruta graveolens* in isolated rat hearts. Potential role as an anti-arrhythmic agent. *Saudi Med* J 29:357–363.

Krewson CF, Naghski J. 1952. Some Physical Properties of Rutin. *J Am Pharm Assoc Sci Ed* 41:582–587.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, et al. 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Lond Engl* 357:1225–1240.

Lederberg J. 2000. The dawning of molecular genetics. *Trends Microbiol* 8:194–195.

Lee YJ, Shacter E. 1999. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem* 274:19792–19798.

Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. 1991. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 24:203–214.

Luo H, Jiang B-H, King SM, Chen YC. 2008. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutr Cancer* 60:800–809.

Masalha M, Borovok I, Schreiber R, Aharonowitz Y, Cohen G. 2001. Analysis of Transcription of the Staphylococcus aureus Aerobic Class Ib and Anaerobic Class III Ribonucleotide Reductase Genes in Response to Oxygen. *J Bacteriol* 183:7260–7272.

McKinnon PS, Davis SL. 2004. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 23:271–288.

Milesi S, Massot B, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A. 2001. *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Sci* 161:189–199.

Mocan A, Vlase L, Vodnar DC, Bischin C, Hanganu D, Gheldiu A-M, Oprean R, Silaghi-Dumitrescu R, Crișan G. 2014. Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. leaves. *Mol Basel Switz* 19:10056–10073.

Mohammadi- Motamed S, Shahidi-Motlagh S, Bagherzadeh H, Azad Forouz S, Tafazoli H. 2014. Evaluation of antioxidant activity of *Ruta graveolens* L. extract on inhibition of lipid peroxidation and DPPH radicals and the effects of some external factors on plant extract's potency. *Res J Pharmacogn* 1:45–50.

Molyneux P. 2003. The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. 26.

Navarro-Núñez L, Lozano ML, Palomo M, Martínez C, Vicente V, Castillo J, Benavente-García O, Diaz-Ricart M, Escolar G, Rivera J. 2008. Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway. *J Agric Food Chem* 56:2970–2976.

Nijs J, Meeus M, De Meirleir K. 2006. Chronic musculoskeletal pain in chronic fatigue syndrome: recent developments and therapeutic implications. *Man Ther* 11:187–191.

Novák I, Buzás G, Minker E, Koltai M, Szendrei K. 1967. Isolation of some effective substance from the herb of *Ruta graveolens* L. *Acta Pharm Hung* 37:130–141.

Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. 2006. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:631–641.

O'Neill AJ, Chopra I. 2004. Preclinical evaluation of novel antibacterial agents by microbiological and molecular techniques. *Expert Opin Investig Drugs* 13:1045–1063.

Ouerghemmi I, Bettaieb Rebey I, Rahali FZ, Bourgou S, Pistelli L, Ksouri R, Marzouk B, Saidani Tounsi M. 2017. Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. *J Food Drug Anal* 25:350–359.

Pal M, Rai R, Yadav A, Khanna R, Baker GA, Pandey S. 2014. Self-aggregation of sodium dodecyl sulfate within (choline chloride + urea) deep eutectic solvent. *Langmuir ACS J Surf Colloids* 30:13191–13198.

Paley, Yossi. 2009. All natural migraine remedy. Patent WO2009147467, predan: 6.6.2008, objavljen: 10.12.2009.

Pandey P, Mehta A, Hajra S, John J, Mehta P, 2011, Antioxidant property, total Phenolic content and inhibition of a-amylase activity of Ruta graveolens L. leaves extract. *Journal of Pharmacological Research* 4, 1735-1737.

Patel VP, Chu CT. 2011. Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration. *Int J Clin Exp Pathol* 4:215–229.

Paulini H, Eilert U, Schimmer O. 1987. Mutagenic compounds in an extract from rutae herba (*Ruta graveolens* L.). I. Mutagenicity is partially caused by furoquinoline alkaloids. *Mutagenesis* 2:271–273.

Pollio A, De Natale A, Appetiti E, Aliotta G, Touwaide A. 2008. Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta spp.* (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *J Ethnopharmacol* 116:469–482.

Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290–4302.

Ramalingam M, Kim S-J. 2012. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996 119:891–910.

Ratheesh M, Shyni GL, Sindhu G, Helen A. 2011. Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats. *Exp Toxicol Pathol Off J Ges Toxikol Pathol* 63:285–290.

Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, Ren Q, Dodson R, Harkins D, Shay R, Watkins K i sur. 2010. Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS ONE 5.*

Russell JB, Jarvis GN. 2001. Practical mechanisms for interrupting the oral-fecal lifecycle of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:265–272.

Sahin F, Karaman I, Güllüce M, Oğütçü H, Sengül M, Adigüzel A, Oztürk S, Kotan R. 2003. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *J Ethnopharmacol* 87:61–65.

Sapir L, Stanley CB, Harries D. 2016. Properties of Polyvinylpyrrolidone in a Deep Eutectic Solvent. *J Phys Chem* A 120:3253–3259.

Schafer FQ, Buettner GR. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30:1191–1212.

Schimmer O, Kühne I. 1990. Mutagenic compounds in an extract from Rutae Herba (*Ruta graveolens* L.). II. UV-A mediated mutagenicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by furoquinoline alkaloids and furocoumarins present in a commercial tincture from Rutae Herba. *Mutat Res* 243:57–62.

Seak C-J, Lin C-C. 2007. *Ruta Graveolens* intoxication. *Clin Toxicol Phila Pa* 45:173–175.

Senok AC, Verstraelen H, Temmerman M, Botta GA. 2009. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database Syst Rev*:CD006289.

Setlow P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* 101:514–525.

Sharma DK. 2006. Bioprospecting for drug research and functional foods for the prevention of diseases—Role of flavonoids in drug development. *JSIR* Vol6505 May 2006.

Shenbagam M, Nalini N. 2011. Dose response effect of rutin a dietary antioxidant on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance - a histopathologic study. *Fundam Clin Pharmacol* 25:493–502.

Shih M-H, Su Y-S, Wu C-L. 2007. Synthesis of aromatic substituted hydrazinothiazole derivates to clarify structural characterization and antioxidant activity between 3-arylsydnonyl and aryl substituted hydrazino-thiazoles. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55:1126-1135.

Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–158.

Skaar EP, Humayun M, Bae T, DeBord KL, Schneewind O. 2004. Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* 305:1626–1628.

Smith EL, Abbott AP, Ryder KS. 2014. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chem Rev* 114:11060–11082.

Tang Y-Q, Yeaman MR, Selsted ME. 2002. Antimicrobial Peptides from Human Platelets. *Infect Immun* 70:6524–6533.

Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8:207–217.

Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. 2015. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* 28:603–661.

Tripathi KD. 2013. Essentials of Medical Pharmacology. *JP Medical Ltd*. 21:363–375

Verzár–Petri G, Csedö K, Möllmann H, Szendrei K, Reisch J. 1976. Fluoreszenzmikroskopische untersuchungen über die lokalisierung von acridon-alkaloiden in geweben von *Ruta graveolens*. *Planta Med*. 33:164–170

Vogt RL, Dippold L. 2005. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002. *Public Health Rep* 120:174–178.

Wilkinson JM. 2006. Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts. In Modern Phytomedicine. I Ahmad, F Aqil, and M Owais (eds.), pp. 157–171. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*;

Wolters B, Eilert U. 1981. Antimicrobial Substances in Callus Cultures of *Ruta graveolens**. *Planta Med* 43:166–174.

Yeo JD, Jeong MK, Park CU, Lee J. 2010. Comparing antioxidant effectiveness of natural and synthetic free radical scavengers in thermally-oxidized lard using DPPH method. *J Food Sci* 75:C258-262.

Zhao B-Y, Xu P, Yang F-X, Wu H, Zong M-H, Lou W-Y. 2015. Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain Chem Eng* 3:15.

Web izvori:

Web 1: http://www.plantea.com.hr/ruta/ (10.8.2017.)

Web 2: https://www.researchgate.net/figure/266028474_fig1_Chemical-structures-of-rutin-RU-and-quercetin-QU (10.8.2017.)

Web 3: http://www.epharmacognosy.com/2012/04/psoralen-synonyms-lata-kasturi-bengali.html (12.8.2017.)

Web 4: http://www.biologydiscussion.com/plants/secondary-metabolites/simple-plant-phenolics-lignin-flavonoids-and-tannins/23704 (13.8.2017.)