ANTIBAKTERIJSKA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA KORE NARANČE (Citrus sinensis Osbeck cv. Washington navel) DOBIVENIH ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM

Batrnek, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:181:724651

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

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

Katarina Batrnek

Antibakterijska i antioksidativna aktivnost ekstrakata kore naranče (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel) dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom

Diplomski rad

Osijek, 2019.

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 KORE NARANČE (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel) DOBIVENIH ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM

Katarina Batrnek

Rad je izrađen: na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka

Mentor: doc. dr. sc. Valentina Pavić

Kratak sažetak: Kora naranče sadržava različite fitokemikalije kao što su triterpeni, glikozidi te flavonoidi od kojih su većina antioksidativnog djelovanja. U današnje vrijeme sve više dolazi do iskorištavanja tvari koje se nalaze u kori naranče te je potrebno odrediti optimalne uvjete za najveći prinos tijekom ekstrakcije. Cilj ovog istraživanja je utvrditi kako različiti uvjeti ultrazvučne ekstrakcije uzoraka kore naranče (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel) utječu na ukupnu antibakterijsku i antioksidativnu aktivnost određivanjem ukupne koncentracije fenolnih spojeva, ukupne antioksidacijske te antibakterijske aktivnosti na Gram - pozitivne i Gram - negativne humane patogene. U provedenom istraživanju određen je ukupan sadržaj fenolnih spojeva te ukupna antioksidacijska i antibakterijska aktivnost. Rezultati su pokazali da omjer otapalo-biljna tvar ima utjecaj na sadržaj fenolnih spojeva, a da uz navedeni omjer i temperatura ima utjecaj na ukupnu antioksidacijsku aktivnost. Na smanjenje antibakterijske aktivnosti utjecaj ima veća koncentracija etanola prilikom ultrazvučne ekstrakcije.

Broj stranica: 52

Broj slika: 12

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 116

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: kora naranče, antioksidacijska i antibakterijska aktivnost, ultrazvučna ekstrakcija

Datum obrane: 12. 07. 2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, doc., predsjednik
2. Dr. sc. Valentina Pavić, doc., mentor i član
3. Dr. sc. Rosemary Vuković, doc., član
4. Dr. sc. Mirna Velki, doc., zamjena člana

Rad je pohranjen u: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek MS thesis Department of Biology

Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF ORANGE PEEL (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel) EXTRACTS OBTAINED ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION

Katarina Batrnek

Thesis performed at: Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry

Supervisior: Valentina Pavić, PhD, Assistant Professor

Short abstract: Orange peel contains various phytochemicals such as triterpenes, glycosides and flavonoids most of which are antioxidant. Nowadays, more and more exploitation of the substances found in the orange peel is increasingly occurring, and it is necessary to determine optimal conditions for maximum yield during extraction. The aim of this study is to determine how different conditions of ultrasonic extraction of orange peel (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel) affect total antibacterial and antioxidative activity by determining the total concentration of phenolic compounds, total antioxidative and antibacterial activity on Gram - positive and Gram - negative human pathogens. The total amount of phenolic compounds and total antioxidant and antibacterial activity were determined in the study. The results showed that the ratio of solvent to plant material has an influence on the content of phenolic compounds, and that the above ratio and temperature have an effect on total antioxidant activity. Higher concentration of ethanol during ultrasonic extraction have reducing effect on antibacterial activity.

Number of pages: 52

Number of figures: 12

Number of tables: 4

Number of references: 116

Original in: Croatian

Keywords: orange peel, antioxidative and antibacterial effect, ultrasound-assisted extraction

Date of thesis defence: 12. 07. 2019.

Reviewers:

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

Thesis deposited in: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

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

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Naranča (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel) 1
1.1.1. Povijest vrste i geografska distribucija 1
1.1.2. Općenite karakteristike vrste 1
1.1.3. Kemijski sastav vrste 3
1.1.4. Framakologijski profil 3
1.1.5. Upotreba narančine kore 4
1.2. Ultrazvučna ekstrakcija 5
1.2.1. Upotreba ultrazvuka 7
1.2.2. Ultrazvučni uređaji 8
1.3. Antioksidacijska aktivnost 10
1.3.1. Oksidativni stres 10
1.3.2. Antioksidansi 12
1.3.3. Metode odrađivanja antioksidativne aktivnosti 14
1.4. Antibakterijska aktivnost 15
1.4.1. Opća svojstva bakterija 15
1.4.2. Metode određivanja antibakterijske aktivnosti 18
1.5. Cilj rada 20
2. MATERIJALI I METODE 21
2.1. Materijal 21
2.2. Metode 21
2.2.1. Ekstrakcija uzoraka 21
2.2.2. Određivanje koncentracije ukupnih fenola 22
2.2.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti 23
2.2.4. Određivanje antibakterijske aktivnosti 24
2.3. Statistička obrada podataka 26
3. REZULTATI 27
3.1. Utjecaj različitih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na koncentraciju fenolnih spojeva 27
3.2. Utjecaj različitih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na ukupnu antioksidacijsku aktivnost 29
3.3. Utjecaj različitih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na antibakterijsko djelovanje 31
4. RASPRAVA 37
5. ZAKLJUČCI 41
6. LITERATURA 42

1. UVOD

1.1. Naranča (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel)

Slatka naranča (sorta Washington navel) je zimzelena biljna vrsta iz roda agruma (*Citrus*), pripada porodici Rutaceae. Stablo se odlikuje visokom i gustom krošnjom s oštrim bodljama na granama.

1.1.1. Povijest vrste i geografska distribucija

Prvi puta naranča je kultivirana u južnoj Kini i sjeveroistočnoj Indiji. Perzijska naranča, rasla je kao divlja vrsta u južnoj Europi te dolazi u Italiju u 11. stoljeću .U početku se kao takva koristila u medicinske svrhe (Liu i sur., 2012). Talijanski trgovci raširili su ju na Mediteranskom području u razdoblju poslije 1450. godine. Cristofor Columbo je raširio sjeme citrusa na područje Haitia i Kariba tijekom njegovog drugog putovanja 1500. godine. Nakon što je naranča identificirana kao jestiva biljka, imućniji ljudi na tom području počeli su ju uzgajati. Tijekom 1500. godine, naranča je predstavljena u Južnoj Americi i Meksiku, a do 1646. godine bila je rasprostranjena širom Europe. U ranoj europskoj povijesti, pisci pišu o Perzijskom citrusu kao biljci divnog mirisa, repelentu protiv moljaca te lijeku protiv trovanja (Milind i Dev, 2012). Glavne regije svijeta u kojima je naranča zastupljena su SAD uz Brazil, Meksiko i Argentinu, Mediteranska regija koju predvode Španjolska, Italija, Egipat i Turska te južna i istočna Azija s vodećom Kinom, Japanom i Indijom (Mekbib i sur., 2006).

1.1.2. Općenite karakteristike vrste

Naranča je biljka koja je komercijalno raširena u tropskim, semitropskim i toplim regijama te je jedna od najrasprostranjenijih biljaka koja se sadi u svijetu (Ehler, 2011). Njeno drvo je zimzeleno, najčešće bodljikavih grana te raste od 7.5 m do najviše 15 m visine. Listovi su joj glatki, sjajni i kožasti, ovalnog do eliptičnog oblika, 6.5-15 cm dužine i 2.5-9.5 cm širine. Tamno zelene boje su te često imaju miris sličan plodovima. Raspoređeni su gusto i naizmjenično na granama drveta (Etebu i Nwauzoma, 2014). Krase ju bijeli dvospolni cvjetovi (Slika 1) promjera od 4 do 6 cm. Sastoje se od 5 petala koje sadrže uljne žlijezde i najčešće 20 žutih prašnika (Valiente i Albrigo, 2004). Nakon cvatnje dolazi do razvoja plodova (Slika 2), žutonarančastih okruglih boba širine od 6.5 do 9.5 cm. Nastali od sinkarpne plodnice gdje svaka kriška naranče predstavlja jedan plodni list cvijeta. Anatomski plod se dijeli na vanjski dio perikarp tj. koru i unutrašnji dio, pulpu. Kora sadrži aromatske uljne žlijezde koje daju naranči karakteristični miris. Također na površini se nalazi vosak koji štiti

naranču, a njegova količina ovisi o vrsti, klimatskim uvjetima i stupnju rasta (Goudeau i sur., 2008).



Slika 1. Cvijet naranče (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel)

(Web 1.)



Slika 2. Prikaz ploda naranče (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel)

(Web 2.)

1.1.3. Kemijski sastav vrste

Biljke proizvode kemikalije poznate kao sekundarni metaboliti koji nisu izravno uključeni u proces rasta, ali služe kao obrana protiv ineskata i mikrobioloških napada. Alkaloidi, flavonoidi, terpenoidi i fenoli pripadaju u tu kategoriju (Okwu, 2005). Fitokemikalije koje su prisutne u plodu su D-limonen (s udjelom od 90 %), citral, citronelal, sinesal, n-nonal, geranil acetat i linalil acetat, a plod naranče sadržava 1.5 % esencijalnih ulja. Lipofilni flavonoidi i furanokumarini su prisutni u prešanim uljima. Hesperidin, naringin i neohesperidin su najvažniji flavonoidi u citrusima. Hesperidin je najprisutniji u naranči te se sastoji od ramnoze i glukoze. Pronalazimo ga u obliku bijelih mrlja u membrani zamrznutih naranči i u smrznutom koncentriranom narančinom soku (Ladaniya, 2008). Karotenoidni pigmenti daju žuto, narančasto i crveno obojenje voću i povrću. Boja ovisi o dvostrukim vezama i različitim fukncionalnim skupinama koje se nalaze u molekuli karoteinoida. Najviše ih ima u kori u obliku lipoproteinskog kompleksa vezanog na lipide u kromoplastu. Po kemijskom sastavu pripadaju terpenima čija je osnovna jedinica izopren. Najpoznatiji karotenoidi su α, β, γ–karoten i likopen (Khoo i sur., 2011).

U kori naranče najzastupljeniji su triterpeni, glikozidi te flavonoidi. U listovima prevladavaju terpenoidi, a u cvjetovima triterpeni. Plod naranče bogat je vitaminima B1, B2, B3, B5, B6 i vitaminom C te mineralima kao što su cink, kalcij, željezo te magnezij (Okwu i Emernike, 2006).

1.1.4. Framakologijski profil

U ljudskoj prehrani od iznimne važnosti su mikronutrijenti kao što su vitamin C i E, karotenoidi te flavonoidi, a biljke su bitan izvor tih komponenti (Di Majo i sur., 2005). Fitokemikalije prisutne u jestivom voću i povrću pozitivno utječu na ljudski metabolizam i zdravlje te pomažu u prevenciji kroničnih i degenerativnih bolesti (Tripoli i sur., 2007). Smatra se da jedna naranča sadržava oko 170 fitonutrijenata i više od 60 flavonoida s antitumorskim, antiupalnim i antioksidativnim svojstvima te sva ta svojstva imaju važnu ulogu u poboljšanju zdravlja (Cha i sur., 2001).

Citrusni flavonoidi sadrže protuupalne komponente koje kontroliraju formiranje bioloških medijatora odgovornih za aktivaciju endotelnih stanica i specijaliziranih stanica uključenih u proces nastajanja upale. Mogu inhibirati kinaze i fosfodiesteraze koje su potrebne u procesu stanične signalizacije te također imaju utjecaj na imunološki odgovor

aktivacijom T i B limfocita (Manthey i sur., 2001). Osobito značajan flavonoid izoliran iz kore naranče je polimetoksi flavon koji je u dosadašnjim istraživanjima pokazao protuupalni učinak (Huang i Ho, 2010).

Limonen, jedna od glavnih tvari koja se nalazi u kori naranče, reducira rizik od pojave karcinoma pluća, dojke, debelog crijeva te kože (Tanaka i sur., 1997, Sun, 2007). Druga značajna komponenta naranče je hesperidin i njegov flavonoidni analog, diosmin koji su pokazali antikancerogenu aktivnost u različitim istraživanjima. Antikancerogena aktivnost tvari ovisi o antioksidativnim svojstvima molekula kao i o njenoj sposobnosti za modifikaciju aktivnosti jetrenih enzima. β-kriptoksantin, karotenoid koji daje narančastocrvenu boju prisutan je u velikoj količini u narančama te značajno smanjuje rizik od nastanka karcinoma pluća (Milind i Dev, 2012).

Naranča sadržava nizak broj kalorija, bogata je vlaknima i pektinom te je značajna u prehrani kod osoba koje se bore s pretilošću. Pektin smanjuje kolesterol u krvi na način da smanjuje njegovu reapsorpciju u debelom crijevu te izaziva osjećaj sitosti (Ivanović, 2015).

Prema istraživanjima WHO-a, citrusi su važni u sprječavanju razvoja kardiovaskularnih bolesti zbog toga što smanjuju razinu homocisteina (Silaste i sur., 2003). Također zbog visokog sadržaja vitamina C, karotenoida i flavonoida, važna su zaštita od kardiovaskularnih bolesti. Polimetoksi flavon koji je prisutan u kori naranče smanjuje razinu kolesterola s boljom efikasnošću od nekih lijekova i to bez nuspojava. Djeluje na način da smanjuje sintezu kolesterola i triglicerida unutar jetre (Kurowska i Manthey, 2004).

1.1.5. Upotreba narančine kore

Kora naranče važan je nusprodukt u industriji koja se bavi preradom citrusa, međutim većina takvih nusprodukata tretiraju se kao otpad. Kora naranče sastoji se od dva različito obojena dijela epikarp (flavedo) i mezokarp (albedo) te se obojenost kore mijenja ovisno o stupnju zrelosti ploda (Ferenčić i sur., 2016). Epikarp je obojeni, vanjski dio površine kore dok je mezokarp unutrašnji, meki bijeli sloj kore. Narančina kora sadržava velik broj fenolnih komponenti uključujući i nekoliko flavonoida. Dosadašnja istraživanja pokazala su da kora citrusa sadržava esencijalna ulja koja se koriste u antibakterijske i antioksidativne svrhe (Madhuri i sur., 2014).

U današnje vrijeme u poljoprivredi kora naranče koristi se kao sastojak za obogaćivanje životinjske hrane te kao organsko gnojivo kroz kompost. To se uspješno postiže modificiranjem citrusnog otpada tako da se prilagođava omjer C/N tla, pH vrijednost te koeficijent vlage (van Heerden i sur., 2002). Sadržavajući mnoge značajne komponente, kora naranče je iskoristiva u biorafineriji. Biorafinerija se definira kao ustrojstvo industrije koja iz biomase otpada kroz razne procese i opremu proizvodi gorivo, energiju i kemikalije. Prednost biorafinerije je velika iskoristivost biootpada u dobre svrhe. Kora naranče u epikarpu sadržava karotenoide i esencijalna ulja, od kojih je oko 90 % D-limonen, klasificiran kao ciklički terpen (Chafer i sur., 2001). On je bezbojna tekućina na sobnoj temperaturi s jakim mirisom na naranču te se koristi u industriji hrane i lijekova kao pojačivač okusa. Također se koristi u kemijskoj industriji pri proizvodnji kozmetike i proizvoda za čišćenje jer je njegova izolacija vrlo jednostavna i razvijena. Pektin je također važna komponenta koja se nalazi u kori naranče i to u mezokarpu (albedo) te se koristi u prehrambenoj industriji kao tvar za zgrušnjavanje te stabilizator u sokovima i mliječnim proizvodima. Uz pektin od kore naranče mogu se još iskoristiti pektinski enzimi koji nastaju prilikom kombinacije uzgoja kore i mikroorganizama te se isto tako koriste u prehrambenoj industriji najčešće pri proizvodnji sokova. Uz sve navedene upotrebe još se koristi kao tvar koja apsorbira nečistoće i teške metale u otpadnim vodama (Namasivayam i sur., 2003). Aktiviran ostatak citrusne kore (eng. *Activated citrus peel extract*) najčešće sadržava barem jednu od navedenih komponenti: oligosaharide, peptide, masne kiseline, trigliceride te glikozide. Koristi se kao dio dermatoloških tretmana te za očuvanje hrane, pića i kozmetike (Medvedev i Kat, 2004). Relativno visoka koncentracija celuloze i hemiceluloze te niska koncentracija lignina nameće koru naranče kao idealan materijal za proizvodnju papira. Proizvodnja papirne mase iz narančine kore pokazala se 45 % jeftinija, što je pokazalo smanjenje troškova proizvodnje od 0.9 do 4.5 % (Ververis i sur., 2007). Istraživanja su pokazala da kora naranče sadržava brojne važne i iskoristive tvari koje su danas vrlo lako primjenjive te ekonomski isplative (Siles Lopez i sur., 2010).

1.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Ekstrakcija predstavlja izdvajanje i koncentriranje određenih sastojaka iz biljnih i životinjskih tkiva pomoću odabranih otapala primjenom standardiziranih metoda (Savić, 2014). Ultrazvučna ekstrakcija je jedna od novijih metoda koje se upotrebljavaju u prehrambenoj industriji. Dokazano je da ultrazvučni valovi visokog intenziteta mogu dovesti do rupture stanica i denaturacije enzima, dok je za ultrazvuk niskog intenziteta utvrđeno da

može dovesti do promjene u metabolizmu stanica (Chemat i sur., 2010). Ultrazvučna ekstrakcija je jednostavna metoda koja je lako izvediva u laboratoriju u ultrazvučnoj kupelji. Sama metoda temelji se na tome da se usitnjeni uzorak pomiješa sa otapalom pogodnim za taj biljni materijal, te se sve zajedno stavlja u ultrazvučnu kupelj na kojoj se namješta temperatura i vrijeme ekstrakcije (Garcia-Salas i sur., 2010). Tehnologijom ultrazvučne ekstrakcije možemo povećati ekstrakciju polifenola, antocijana, aromatskih tvari, ulja te polisaharida. Mehanički učinci ultrazvuka osiguravaju veće prodiranje otapala u materijale koji se ekstrahiraju te time povećavaju transfer mase (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Kod ekstrakcije čvrstih tvari treba povećati površinu uzajamnog djelovanja između faza usitnjavanja i homogenizacije. U sredini ekstrakcije brzinu gibanja faza je potrebno povećati te se vrijeme ekstrakcije treba produljiti prilikom povećanja količine tvari (Eskilsson i Bjorklund, 2000).

Dugogodišnja istraživanja ultrazvučne ekstrakcije na komoraču, hmelju, nevenu i menti sa vodom i etanolom kao otapalima, pokazala su da je volumen povećan za 34 %, 18 %, 2 % i 3 % u vodi te za 34 %, 12 %, 3 % i 7 % u etanolu (Vinatour, 2001). Vilkhu je u svom istraživanju proučavao utjecaj ultrazvučne ekstrakcije i različitih otapala prilikom ekstrakcije karnoske kiseline iz ružmarina. Korištenjem konvencionalne ekstrakcije sa etanolom kao otapalom, prinos ekstrahirane tvari bio je manji nego estrakcijom sa etil-acetatom i butanonom. Međutim, ultrazvučnom ekstrakcijom sva 3 otapala pokazala su slične količine dobivene tvari. To nam pokazuje da ultrazvučna ekstrakcija smanjuje ovisnost o otapalu i omogućuje upotrebu alternativnih otapala što je bitno za ekonomske, okolišne i zdravstvene značajke (Vilkhu, 2008).

Ultrazvučna ekstrakcija prepoznata je kao odlična tehnika u industriji jestivih ulja zbog poboljšanja efikasnosti i smanjenja vremena ekstrakcije (Babaei i sur., 2006). U eksperimentu sa sojom i sjemenkama kima, kavitacija uzrokovana ultrazvučnom ekstrakcijom pokazala je povećanje propusnosti biljnog tkiva. Mikrofrakture i kidanje staničnih stijenki soje i kima pokazalo je veće otpuštanje sastojaka nego konvencionalne metode ekstrakcije i maceracije (Vikhu, 2008).

Antrakinoni izolirani iz korijena biljke *Morinda citrifolia* aktivne su komponente koje su pokazale nekoliko terapeutskih učinaka te su korišteni u antitumorskom liječenju. Nedavno je provedeno istraživanje ultrazvučne ekstrakcije kako bi se poboljšala učinkovitost otapala pri ekstrakciji antrakinona iz korijena *M.citrifolia*. Ekstracija provedena ultrazvukom u

etanol/voda sustavu smanjila je vrijeme ekstrakcije za 75 % i povećala sam prinos dobivene komponente (Hemwimol i sur., 2006).

1.2.1. Upotreba ultrazvuka

Ultrazvuk je dio zvučnog spektra visoke frekvencije (>20 kHz) koji je viši od gornje granice zvuka koji čovjek može detektirati. U većini slučajeva ultrazvučni valovi su longitudinalni valovi, a kroz određeni medij se mogu širiti kao longitudinalni ili transverzalni valovi (Režek Jambrak i sur., 2010). Longitudinalni valovi se šire kroz sva tri agregacijska stanja, a za širenje transverzalnih valova potrebno je čvrsto tijelo (Abu-Zidan i sur., 2011). Prema intenzitetu ultrazvuk dijelimo na one visokog i niskog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta je onaj koji ima intenzitet manji od 1 W/cm^2 i frekvenciju višu od 100 kHz. Koristi se za ispitivanje određenih sastojaka hrane te za ispitivanje kemijskog sastava, debljine, protoka ili prisustva stranih tijela u gotovim prehrambenim proizvodima. Strana tijela u hrani su komadići materijala koji su zaostali u hrani, a princip njihovog otkrivanja temelji se na različitoj zvučnoj impedanciji i brzini zvuka stranih tijela u odnosu na hranu tj. njihov različiti odziv tijekom prolaska ultrazvučnog vala (Brnčić i sur., 2009). Ultrazvuk visokog intenziteta je onaj koji ima frekvenciju od 20 do 100 kHz te snagu između od 10 do 1000 W/cm^2. Takav ultrazvuk dovodi do fizikalnih promjena materijala te do kemijskih promjena kod materijala gdje se primjenjuje. U današnje vrijeme najčešće se koristi za čišćenje, odzračivanje tekućina, homogenizaciju tekućina, sušenje, ekstrakciju, destilaciju i uklanjanje mikroorganizama (Herceg i sur., 2009). Ultrazvukom visokog intenziteta može se unaprijediti obrada hrane u smjeru poboljšavanja nutritivnih vrijednosti te se može uštedjeti energija i skratiti trajanje procesa proizvodnje (Brnčić i sur., 2009).

Upotreba ultrazvuka dovodi do poboljšanja ekstrakcija u usporedbi s konvencionalnim tehnikama zbog manje upotrebe otapala te kraćeg vremena tretmana. Ovakvim tipom ekstrakcije dolazi do boljeg kontakta otapala i čvrste tvari koja se ekstrahira. Prilikom upotrebe ultrazvuka dolazi do pojave mehaničkih učinaka kao što je kavitacija te turbulencija i strujanje tekućine. Ultrazvuk smanjuje čvrstinu stanične stijenke nakon čega dolazi do proširenja staničnih pora. Sav taj slijed događaja dovodi do pucanja stanične stijenke (Blekić i sur., 2011).

Tijekom upotrebe ultrazvuka dolazi do nastanka longitudinalnih valova kada se zvučni val susretne s tekućim medijem prilikom čega dolazi do stvaranja promjenjivog tlaka i širenja

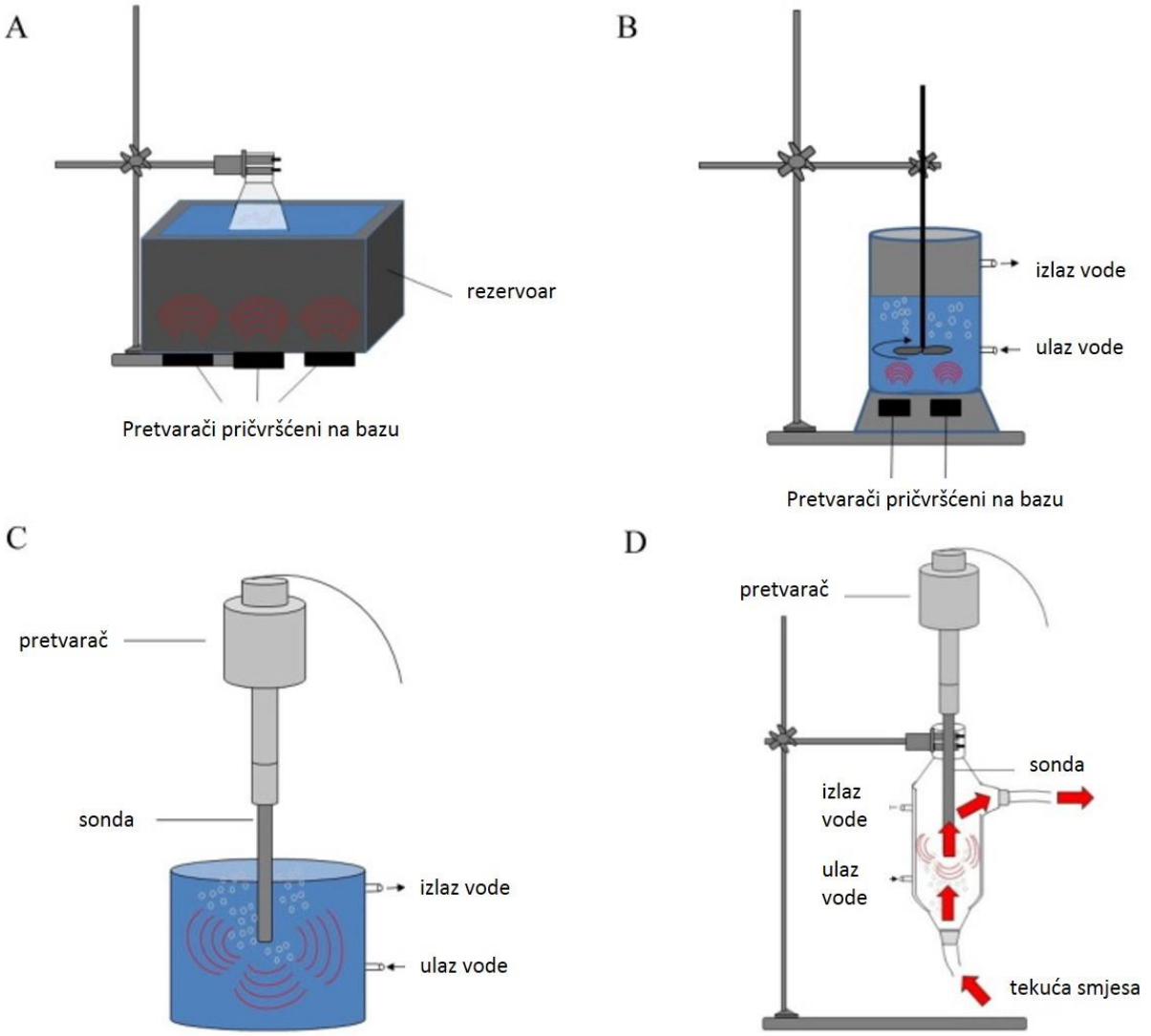
vrtloga (Haar i Coussios, 2006). Nakon toga nastaje velik broj mjehurića mikroskopske veličine što dovodi do pojave kavitacije. Dolazi do oscilacije mjehurića te nakon mnogobrojnih ciklusa kompresije i ekspanzije dolazi do implozije. Sudarajući se jedna s drugom, molekule oko mjehurića stvaraju područje s visokom temperaturom i tlakom (Wu i Nyborg, 2008). Povećanjem amplitude ultrazvučnih valova dolazi do povećanja broja stvorenih mjehurića jer više amplitude dovode do nastanka kavitacije. Kavitacijski mjehurići se ne mogu širiti u stanici zbog čega dolazi do povećanja tlaka i pucanja stanice i tkiva. Omjer maksimalne i početne veličine mjehurića utječe na intenzitet implozije (Herceg i sur., 2009). Pozitivne strane ekstrakcije ultrazvukom su te da se razaranjem biljnih stanica oslobađa njihov sadržaj zbog oštećenja stanične stijenke i membrane, a samim time se povećava kontaktna površina čvrsto-tekuće faze, odnosno materijala ekstrakcije i otapala (Ivanović, 2011).

1.2.2. Ultrazvučni uređaji

Korištenje ultrazvučne energije u današnje vrijeme je područje koje je u znatnom usponu. Ultrazvuk se na uzorcima može koristiti na više načina, pa i hibridnim tehnikama kombinacija ultrazvuka s konvencionalnim metodama.

Ultrazvučna kupka dio je gotovo svakog analitičkog laboratorija. Ona emitira zvučne valove visoke frekvencije i energije u posudi ispunjenoj tekućinom, najčešće vodom. Snaga zračenja joj je od 1 do 5 W/cm^2 te se ne svrstava u moćne alate kemijskih laboratorija. Kupke uglavnom emitiraju jednu frekvenciju, koja je najčešće 40 kHz, međutim postoje i one kod kojih se može namjestiti dualna frekvencija. Takvi uređaji su poboljšane verzije standardnih ultrazvučnih kupki te oni mogu koristi frekvenciju od 25 i 40 kHz u isto vrijeme (Santos i Capelo, 2007). Zbog različitih struktura ultrazvučnih kupki one omogućavaju veliki broj parametara koji se mogu proučavati. Same kupke uključuju termostatski kontrolirano grijanje i promjenjivu snagu, frekvencijsko prostiranje pomoću kojeg se dobiva ujednačenije polje kavitacije, pokretna sila koja nastaje uključivanjem ili isključivanjem omogućuje kratak signal isprekidane snage ili njezino pulsiranje, električni mjerači vremena omogućuju različito trajanje tretmana i perioda kada je isključen. Ultrazvučne kupke djeluju pri nižem intenzitetu zbog toga što se na taj način izbjegava oštećenje stijenki spremnika koje uzrokuje kavitacija. Zbog velikih volumena tekućine koja se tretira u spremniku, ultrazvučne kupelji rade pri manjim akustičnim snagama. (Brnčić i sur., 2009).

Za razliku od ultrazvučne kupke, ultrazvučna sonda je uronjena direktno u otopinu i ima snagu koja je 100 puta veća od snage kupke. Pokazala se kao moćan alat za ekstrakciju tvari iz čvrstih uzoraka pomoću otapala. Svaka ultrazvučna sonda je fokusirajuća, jer je oblikovana tako da je snop sonde u jednom dijelu sužen. Takav dio snopa naziva se fokus, a zvučni tlak u njemu je do dva puta veći nego na površini sonde (Krstelj, 2003). Ultrazvučne vibracije na vrhu sonde omogućuje kontrola amplitude zračenja koja se može postaviti na bilo koju razinu. U normalnim uvjetima nisu potrebne visoke amplitude da bi došlo do kavitacije u uzorku. Izbor korištenja uređaja ovisi o različitim faktorima. Za analizu većeg broja uzoraka primijenit ćemo ultrazvučnu kupku, a za ekstrakciju čvrsto-tekućeg uzorka bolji je izbor ultrazvučna sonda jer je smanjeno vrijeme ekstrakcije (Pico, 2013). Nedavno je proizvođač REUS (Contes, Francuska) razvio novi reaktor za kupku na 25 kHz, koji se uglavnom koristi za primjenu u ekstrakciji. Sastoji se od reaktora od nehrđajućeg čelika opremljenog dvostrukim slojem plašta s cirkulacijom vode kako bi se omogućila kontrola temperature sustavom hlađenja/grijanja. Ultrazvučne sonde velike snage se općenito češće koriste u ekstrakciji. Sustav sonde je snažniji zbog ultrazvučnog intenziteta isporučenog kroz manju površinu (samo vrh sonde), kada se uspoređuje s ultrazvučnom kupkom. Obično rade na oko 20 kHz i koriste pretvornik spojen na sondu koja je uronjena u reaktor što rezultira izravnom isporukom ultrazvuka u ekstrakcijski medij s minimalnim gubitkom energije ultrazvuka. Postoji nekoliko izvedbi sondi različitih duljina, promjera i geometrije vrha. Odabir sonde se vrši prema primjeni i na volumen uzorka koji se sonificira. Intenzitet ultrazvuka isporučenog pomoću sustava sondi u tekućem mediju inducira brzo povećanje temperature u reaktoru. Proizvođači ultrazvučne opreme velike snage usredotočili su se na razvoj uređaja koji uključuju specifične operativne značajke, kao što je kontinuirani protok. Oprema se u osnovi sastoji od reaktora od stakla ili nehrđajućeg čelika, kroz koji se tekućinska smjesa pumpa pod atmosferskim ili visokim tlakom. Kontinuirani reaktor može se ohladiti ili zagrijati pomoću dvostrukog plašta (Chemat i sur., 2017)



Slika 3. Najčešće korišteni ultrazvučni sustavi: A: Ultrazvučna kupka, B: Ultrazvučni reaktor uz miješanje, C: Ultrazvučna sonda, D: Kontinuirana sonifikacija ultrazvučnom sondom. (preuzeto i proilagođeno prema Chemat i sur., 2017)

1.3. Antioksidacijska aktivnost

1.3.1. Oksidativni stres

Povećanje stvaranja reaktivnih, slobodnih kisikovih radikala dovodi do oksidativnog stresa. Oksidativni stres se još definira kao poremećaj ravnoteže prooksidansa i antioksidansa kao što su vitamin C, E i antioksidacijski enzimi. Do pomaka ravnoteže prema

prooksidansima može doći ukoliko je smanjena antioksidativna zaštita organizma ili ako je stvaranje radikala pojačano (Birben i sur., 2012).

Reaktivne kisikove jedinke (eng. *Reactive Oxygen Species*-ROS) produkt su aerobnog metabolizma. Među njih ubrajamo superoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal (OH·) te molekulu vodikovog peroksida (H_2O_2). Slobodna reaktivna čestica je atom ili molekula koja sadrži nespareni elektron (pozitivan, negativan ili bez naboja). Reaktivne kisikove čestice glavni su krivci za oštećenje lipida, proteina i DNA (Schieber i Chandel, 2014). Međutim u posljednja dva desetljeća pokazale su se korisne kao signalne molekule za regulaciju bioloških i fizioloških procesa. Molekularni mehanizmi kao što su antioksidativna regulacija gena (tioredoksin, peroredoksin, Ref-1 i Nrf-2), regulacija mitohondrijskog oksidativnog stresa, homeostaza željeza kroz klaster proteina (IRE-IRP) te apoptoza i starenje, mjesta su gdje reaktivne kisikove jedinke pokazuju svoju važnost i korist (Ray i sur., 2012).

Oksidativni stres dovodi do nastanka kroničnih i neizlječivih bolesti. Osobe kod kojih organizam nije u mogućnosti vlastitim mehanizmom prilagodbe povećati stvaranje antioksidanata i održati ravnotežu, kao i kod osoba kod kojih je potreba za antioksidantima povećana dolazi do razvoja oksidativnog stresa. Starije osobe, osobe koje boluju od šećerne bolesti, reumatske bolesti, Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolest, srčanog i moždanog infarkta pripadaju u kritičnu skupinu koja ima veće šanse za stvaranje oksidativnog stresa. Alzheimerova i Parkinsonova bolest su jedne od poznatijih neurodegenerativnih bolesti kod kojih su istraživanja pokazala oštećenje neurona i neuralnu disfunkciju uzrokovanu oksidativnim stresom (Yan i sur., 2013).

Kod stanja povećane potrošnje kisika, kao što se javlja kod sportaša, također dolazi do oksidativnog stresa (Duračkova, 2010). Takav oksidativni stres dovodi do oštećenja mišića te smanjuje aktivnost antioksidativnih enzima (Vina i sur., 2006).

Regulacija oksidativnog stresa pokazala se od izuzetne važnosti kod prevencije razvoja tumora i antitumorske terapije. Visoke razine reaktivnih kisikovih jedinki dovode do proliferacije kancerogenih stanica zbog toga što je oksidacijsko stanje takvih stanica znatno drugačije nego kod normalnih stanica (Sosa i sur., 2013). Nastanak karcinoma događa se zbog toga što dolazi do napada ROS-a na molekulu DNA. Oštećenjem DNA dolazi do nepravilnog razvoja stanica koje se nekontrolirano dijele i dovode do nastanka stanica koje ne podliježu apoptozi. Antitumorske terapije usmjerene su ka razvoju lijekova koje će smanjivati razinu

reaktivnih kisikovih jedinki i na taj način spriječiti daljnji razvoj i širenje tumora (Gorrini i sur., 2013).

Istraživanja koja su provedena do sada na temu virusnih infekcija i oksidativnog stresa odnose se pretežno na infekcije herpes virusima (EBV), primarnim hepatotropnim virusima (virusima hepatitisa B i C) i HIV infekciju. Smanjenjem razine reaktivnih kisikovih jedinki prilikom navedenih infekcija može se iskoristiti kao jedan smjer kretanja prilikom razvoja terapija (Brkić i sur., 2010).

1.3.2. Antioksidansi

Brojno izlaganje različitim izvorima stresa vodi ka prilagodbi organizma i zaštiti od reaktivnih kisikovih jedinki i razvoju mehanizama antioksidativne obrane. Antioksidansi su spojevi koji mogu odložiti ili spriječiti oksidaciju supstrata te djeluju na način da sprječavaju nastanak ROS-a (smanjenjem lokalne koncentracije kisika, prekidanjem lanca stvaranja novih radikala, vezanjem metalnih iona), inaktiviraju reaktivne kisikove vrste (razlaganjem peroksida), smanjuju njihove efekte. Mogu također djelovati na način da omogućuju oporavak od oksidativnih oštećenja, uklanjanjem izmjenjenih molekula i popravljanjem oštećenja nastalih njihovim djelovanjem. Najzastupljeniji su u mitohondrijima jer se tamo stvara najviše slobodnih radikala, ali su pronađeni i u citosolu te drugim staničnim strukturama (Stevanović i sur., 2011).

Najpoznatija podjela antioksidanasa je na enzimske i neenzimske. Enzimski antioksidansi u ljudskom organizmu su superoksid dismutaza, katalaza te glutation peroksidaza. Navedeni antioksidansi djeluju na način da blokiraju iniciranje reakcije nastanka slobodnih radikala te onemogućavaju peroksidaciju lipida na način da svaki od enzimskih antioksidanasa veže jednog od pripadnika ROS-a. Neenzimski antioksidansi se dijele na endogene, odnosno metaboličke i egzogene. Endogeni neenzimski antioksidansi su oni koje organizam sam proizvodi te jedni od najznačajnijih su L-arginin, koenzim Q10, glutation. Vitamin C i E, karotenoidi, flavonoidi, omega-3-masne kiseline su najznačajniji egzogeni neenzimski antioksidansi koji se moraju unositi u tijelo (Gupta i sur., 2014).

Vitamin C ubrajamo u vitamine topljive u vodi te je jedan od najpoznatijih antioksidansa kojeg najviše pronalazimo u voću i povrću. Najveća koncentracija zastupljena je u voću kao što su jagode, naranča, limun i kivi. Dokazano je da najveća količina vitamina C

nakon prerade ostaje u soku naranče u usporedbi sa sokom jabuke (Gardner i sur., 2000). Čovjek ga mora unositi jer vitamin C sprječava oksidaciju drugih spojeva te je elektron donor za 8 enzima koji su uključeni u sintezu kolagena, karnitina i noradrenalina, amidaciju peptidnih hormona te u metabolizam tirozina. Također sudjeluje u obnavljanju tokoferoksilnog radikala vitamina E i na taj način omogućavaju vitaminu E da ponovno djeluje kao antioksidans u organizmu. Vitamin C nakuplja se u mozgu, jetri, slezeni, gušterači te u nadbubrežnoj žlijezdi gdje je najviše zastupljen (Domitrović, 2006).

Flavonoidi su skupina sekundarnih biljnih metabolita koji pripadaju polifenolnim spojevima te su dobri antioksidativni spojevi u uklanjanju peroksilnih i hidroksilnih radikala. Međutim ovisno o koncentraciji mogu se ponašati kao prooksidansi što može u nekim slučajevima biti i od koristi organizmu jer potiče organizam na stvaranje i aktivaciju drugih antioksidativnih puteva (Prochazkova i sur., 2011). Važni flavonoidi koji su pronađeni u naranči su hesperidin, naringin i neohesperidin. Istraživanja su pokazala antioksidativno, antikancerogeno, antialergijsko i protuupalno djelovanje hesperidina te se zbog toga on naziva i bioflavonoidom jer ima široki spektar djelovanja u stanicama. (Wilmsen i sur., 2005). Neohesperidin osim što jača imunitet, potiče bolji rad jetre te ubrzava razgradnju lipida kod steatoze jetre (Martinis i sur., 2008). Naringin je flavonoid koji ima antiproliferativna svojstva na staničnim linijama epitela raka dojke i aktivira tri enzima za popravak DNA kod raka prostate, ali za razliku od ostalih flavonoida ima najslabije djelovanje (Gao i sur., 2006).

Minerali kao što su magnezij, kalcij, bakar, kalij predstavljaju veliki značaj za ljudsko zdravlje. Njihova razina se u plodovima naranče povećava od lipnja prema studenom. Makronutrijenti su važni za pravilan rad krvožilnog sustava, za poboljšanje zdravlja zubi i kostiju (Paramasivam i sur., 2008).

Karotenoidi su moćni antioksidansi koji neutraliziraju slobodne radikale. Karotenoidi pronađeni u plodu naranče imaju antikancerogeni utjecaj te bolje djeluju kad ih se više kombinira prilikom terapije nego kada se konzumiraju samostalno (Nishino i sur., 2009).

Naranča je također bogata vitaminima iz B skupine: B1, B3, B6, folna kiselina (Okwu i Emernike, 2006). Ti su vitamini važni za održavanje normalne funkciju živčanog sustava (Moser, 2012). Uz sve navedene elemente, naranča je bogata i vlaknima koja imaju važnu ulogu u probavi hrane. Konzumacija hrane bogate vlaknima smanjuje rizik od pojave kardiovaskularnih bolesti, pretilosti, dijabetesa (Romero-Lopez, 2011).

1.3.3. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koriste se navedene metode: ABTS-metoda, DPPH-metoda te TEAC metoda od kojih su sve indirektne metode. Uz njih još postoje i direktne metode određivanja antioksidativne aktivnosti, a to su ORAC metoda te određivanje antioksidacijskog kapaciteta s β-karotenom (Woydilo i sur., 2007).

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

DPPH metoda je jednostavna i primjenjuje se od 1958. godine posebno kod ispitivanja antioksidativne aktivnosti voća i povrća te hrane (Shalaby i Shanab, 2013). To je spektrometrijska metoda koja se temelji na reakciji antioksidansa s organskim radikalom (Schlesier i sur., 2002).

Slobodni radikal DPPH$^{\cdot}$ sa nesparenim elektronom ima maksimalnu apsorpciju na 517 nm što označava ljubičasto obojenje otopine. Kada antioksidans reagira sa DPPH$^{\cdot}$, u prisustvu vodika kao elektron donora, dolazi do redukcije u DPPH (Slika 4) i što dovodi do apsorpcije na manjim valnim duljinama nego što je to kod DPPH. Zbog toga dolazi do obezbojenja otopine i nastaje žuta boja. Veća obezbojenost pokazuje veću redukcijsku sposobnost spoja (Patel i Patel, 2011).



Slika 4. Prelazak difenilpikrazila (slobodni radikal) u difenilpikrlihidrazin (Casanovas i sur., 2015)

Prilikom korištenja ove metode DPPH reagira sa cijelim spojem kojeg ispitujemo odnosno sa cijelim antioksidansom. Reakcija DPPH je spora što omogućuje ispitivanje i slabih antioksidanasa (Alam i sur., 2012). Sama reakcija se odvija pri sobnoj temperaturi i u tami da bi se izbjegla razgradnja antioksidanasa (Dawidowicz i sur., 2012).

1.4. Antibakterijska aktivnost

1.4.1. Opća svojstva bakterija

1.4.1.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis štapićasta je Gram-pozitivna aerobna bakterija. Mezofilna je vrsta rasprostranjena u tlu, vodama, žitaricama i povrću. Sadržava mnoge enzime koji omogućuju razgradnju supstrata te pružaju bakteriji mogućnost da preživi konstantne promjene koje se događaju u okolišu (Westers i sur., 2004). *B. subtilis* posjeduje spore koje mogu preživjeti različite ekstremne životne uvjete, pa recimo nađu li se u prašini, mogu se širiti vjetrom na velike udaljenosti (Kalenić i sur., 2013).

Korak po korak, otkrivanjem cijelog genoma bakterije *B. subtilis* dolazi do razvoja i napretka njenog korištenja u modernoj tehnologiji. Ona je od izuzetne važnosti jer omogućuje proizvodnju proteina uzimajući metabolite iz kulture medija u kojoj se uzgaja (Zhang i sur., 2017). Zbog svih tih karakteristika *B. subtilis* je bakterijska kultura kojoj cijena uzgoja nije visoka, ali pokazuje visoku produktivnost i lako manipuliranje (Terpe, 2006).

Tijekom nutritivnog stresa *B. subtilis* stvara endospore koje joj omogućuju preživljavanje ekstremnih uvjeta kao što su visoka temperatura, UV i gama-zračenje, isušivanje te otrovne kemikalije. α i β proteini imaju glavnu ulogu u preživljavanju nepovoljnih uvjeta. Oni štite molekulu DNA te se nalaze samo u endospori, a nema ih u vegetativnoj stanici. Provedeno je istraživanje s ciljem otkrivanja nastanka mutageneze u sporama nakon UV zračenja. Rezultati su pokazali da do mutageneze dolazi nakon što se spore *B. subtilis* tretiraju UV-A, UV-B ili UV-C zračenjem, ali mutacije se razlikuju ovisno o tipu UV zračenja (Cvjetan i sur., 2016).

Probiotici su dobroćudne bakterije koje poboljšavaju crijevnu mikrofloru i aktiviraju imunološki sustav. Zbog svoje sposobnosti preživljavanja niskog pH želuca i sposobnosti dolaska u crijevo, *B. subtilis* smatra se odličnim probiotikom. Također stimulira imunološki sustav tako što stvara velik broj protutijela. Posebno je važno stvaranje sekretornog oblika imunoglobulina A (sIgA) čime se pokreće imunološka reakcija u sluznici crijeva te se aktivira stečeni i urođeni imunološki sustav. Dolazi do aktivacije T i B limfocita prilikom čega se sprječava ulazak patogena i širenje infekcije (Hong i sur., 2008).

1.4.1.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli jedna je od najrasprostranjenijih koliformnih bakterija koje nastanjuju donji dio probavnog trakta sisavaca. Nastani se u probavnom sustavu već nekoliko dana nakon rođenja i ostaje u njemu kroz cijeli život. *E. coli* se može podijeliti u četiri kategorije (A, B1, B2 i D) ovisno o dijelu probavnog trakta kojeg nastanjuju (Cuevas-Ramos i sur., 2010). Pripada u Gram–negativne bakterije, a lako je prepoznatljiva po svom štapićastom obliku. Aerobna je i fakultativno anaerobna bakterija te se može lako uzgojiti u laboratorijskim uvjetima (Orth i sur., 2011). *E. coli* može preživjeti neko vrijeme u vodi, zemlji i na različitim predmetima u biološkom materijalu. U hrani se lako i brzo razmnožava. Osjetljiva je na uobičajene dezinficijense. Izvanbolnički izolati *E. coli* obično su osjetljivi na amoksicilin i druge semisintetičke peniciline, cefalosporine, karbapeneme i aminoglikozide. Posljednjih su godina opisani sojevi koji izlučuju karbapenemaze, tako da neki sojevi *E. coli* postaju rezistentni na većinu postojećih antibiotika (Kalenić i sur., 2013).

Većina sojeva *E. coli* ne uzrokuje bolesti, ali postoje serotipovi koji mogu dovesti do trovanja hranom i crijevnih infekcija (Usajewicz i Nalepa, 2006). Također neke podvrste mogu dovesti do razvoja bolesti s teškim simptomima, kao što je enterohemoragična *E. coli* (EHEC). Pojava hemolitičko-uremijskog sindroma (HUS) karakterizira zarazu ovom bakterijom (Nguyen i Sperandio, 2012).

80 do 90 % infekcija mokraćnog sustava uzrokuju upravo uropatogeni sojevi *E. coli*. Bakterija se veže za stanice mokraćnog sustava i dovodi do pojave infekcije koja može zahvatiti mokraćni mjehur i bubrege te kod određene skupine pacijenata može ostaviti trajne posljedice (Abduzaimović i sur., 2016).

Razvojem molekularne biologije i metoda istraživanja došlo je do saznanja da *E. coli* ima važnu ulogu u farmaceutskoj industriji, komercijalnom genetičkom inženjeringu te u istraživanju mikrobiološke evolucije, te je moguće reći da je *E. coli* u sadašnjosti najvažniji modelni organizam u biologiji (Blount, 2015).

1.4.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Prvi puta 1882. godine Gessard opisuje mikroorganizam odgovoran za stvaranje plavkastog gnoja u rani ozlijeđenih vojnika te ga naziva *Bacillus pyocyaneus.* 1900. godine Migula primjenjuje naziv *Pseudomonas* (grč. *pseudo*-lažan, lažno, *monas*-jedinka, jedinica), a epitet *aeruginosa* (lat. *aeruginosus*-pun bakrene hrđe tj. zelen) zamjenjuje *pyocyaneus* te nastaje današnji naziv *Pseudomonas aeruginosa*. Štapićasta je Gram-negativna bakterija te je

obligatni aerob i ne stvara spore. Najčešće živi u vlažnom okolišu, u zemlji i površinskim vodama (Kalenić i sur., 2013).

Jedna je od najčešćih bolničkih patogena koji uzrokuje infekcije povezane s visokom stopom smrtnosti. Razvijen metabolizam i oportunistički način života omogućava ovoj bakteriji preživljavanje u različitim uvjetima, a posjeduje i sposobnost stvaranja biofilmova. Kod hospitaliziranih pacijenata do kolonizacije najčešće dolazi u respiratornom i urinarnom traktu, a kod nekih pacijenata zabilježena je i kolonizacija gastrointestinalnog trakta. Kod osoba s normalnim imunološkim odgovorom ne postoji rizik od razvoja infekcija nastalih *P. aeruginosom* (Gužvinec i sur., 2012).

P. aeruginosa je izuzetno otporna bakterija prema tvarima koje dolaze izvana. Postoje različiti oblici rezistencije koje je razvila ova bakterija na antibiotike, najčešće na β-laktame kao što su penicilini, cefalosporini, karbapanemi i monobaktami. Kao Gram-negativna bakterija posjeduje vanjsku membranu koja joj omogućava smanjeno propuštanje antibiotika. Stvaranjem efluksa odnosno izbacivanjem tvari iz stanice je još jedan način obrane od napada antibioticima. Također mogu inaktivirati antibiotike bakterijskim enzimima, β-laktamazama. (Poole, 2011).

Osobe oboljele od cistične fibroze podložne su infekcijama uzrokovanim *P. aeruginosom*. Razvojem i napretkom te bolesti dolazi do stvaranja guste sluzi koja oblaže dišne puteve te tako stvara idealan okoliš za nastanjivanje *P. aeruginosa* koja tvori biofilmove. Nastala infekcija najveći je uzrok smrtnosti kod pacijenata oboljelih od cistične fibroze jer navedena bakterija stvara otpornost na antibiotike koji bi mogli pomoći u liječenju (Doring i sur., 2012).

1.4.1.4. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus bakterija je kuglastog oblika koja pripada aerobnim bakterijama te formira nakupine slične grozdovima, iako ih se može naći i pojedinačno, u paru i u kratkim lancima. Ima tipičnu stijenku Gram-pozivitnog mikroorganizma, nema flagele, nepokretna je i ne formira spore (Kalenić i sur., 2013). U normalnim uvjetima nastanjuje sluznicu nosa, gastrointestinalni trakt te površinu kože (Alagić i sur., 2015). Patogena je bakterija te izaziva razne infekcije u ljudskom tijelu zbog toga što kao izvor metabolita koristi hemoglobin (Pishchany i sur., 2010).

S. aureus proizvodi faktore virulencije koji joj omogućavaju lakše širenje i prodiranje kroz organizam. Površinski proteini omogućuju prihvaćanje za proteine domadara, karotenoidi i katalaza omogućavaju preživljavanje fagocitoze, dok toksini uništavaju membrane eukariota (Iwatsuki i sur., 2006). Proizvodi također grupu toksina TSST-1 i enterotoksine (SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEH, SEI) koji uzrokuju nastanak toksičnog šoka te stimuliraju proliferaciju T-limfocita (Dinges i sur., 2000).

Ova bakterija je jedna od najotpornijih patogena koji se može nastaniti u ljudskom organizmu. Otporna je na sve antibiotike koji su se do sada primjenjivali u njenom liječenju, lako modificira svoje gene odgovorne za nastanak virulencije te ima sposobnost usvajanja gena (Budimir i sur., 2007). MRSA (eng. *Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*) su sojevi bakterije *S. aureus* koji predstavljaju veliki problem u bolnicama, a u današnje vrijeme sve više i u izvanbolničkim sredinama. Tipični izvanbolnički izolati posjeduju gen za kodiranje bikomponentnog toksina Panton Valentin leukocidina (PVL), koji doprinosi razvoju težih infekcija u izvanbolničkom okruženju (Budimir i sur., 2012). Prvo dolazi do kolonizacijskog stanja gdje pacijent ima na svom tijelu MRSA, ali ne pokazuju se simptomi zaraze. Ulaskom bakterije u tijelo dolazi do umnožavanja i pojave simptoma bolesti. Simptomi bolesti su vrućica, kožne promjene te povećanje broja leukocita (Tong i sur., 2015). Razvoj i kolonizacija ove bakterije je vrlo laka, jer je prilagođena različitim ekološkim nišama, moguće ju je izolirati i u hrani te to predstavlja problem u budućnosti, no sve veći je trend prevencije širenja te bolesti zbog kontrole bolničkih infekcija i poboljšanja higijene (Budimir i sur., 2012).

1.4.2. Metode određivanja antibakterijske aktivnosti

Antibakterijsko djelovanje važna je komponenta koja se ispituje kod biljaka u novijim istraživanjima. Prirodni proizvodi, ekstrakti dobiveni iz biljaka u današnje vrijeme predstavljaju neograničen izvor za razvoj i proizvodnju pripravaka i lijekova različitih kemijskih sastava. Nekoliko metoda je trenutno dostupno i koristi se u određivanju antibakterijskih svojstava biljnih ekstrakata. Najčešće korištene metode su metoda minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), metoda razrjeđivanja agara (eng. *Agar dilution*) te disk difuzijska analiza (eng. *Disk diffusion*) (Klančnik i sur., 2010).

1.4.2.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije, MIC (eng. *Minimal Inhibitory Concentration*)

Razina antibakterijske aktivnosti koja inhibira rast bakterije određuje se *in vitro* testiranjem aktivnosti standardizirane koncentracije bakterija u serijskim razrjeđenjima. Najniža koncentracija ekstrakta koja inhibira rast bakterija naziva se minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Metoda minimalne inhibitorne koncentracije pripada dilucijskim metodama te se može izvoditi na tekućoj ili krutoj podlozi. Biljni ekstrakt se serijski razrijedi, umetne u bakteriološku podlogu gdje se zatim inokulira ispitivani soj bakterije. Inkubacija traje od 18 do 24 sata na 35-37 °C nakon čega se gleda zamućenje (bujona) ili porast kolonija na krutoj podlozi što označava prisutnost bakterija. MIC se izražava u mg/L ili μg/ml (Bedenić, 2009). Uz MIC još se pojavljuje termin minimalna baktericidna koncentracija (MBC) koja označava najnižu koncentraciju ekstrakta koji usmrćuje sve mikroorganizme na podlozi (Pramila i sur., 2011). Iako se MIC i MBC koriste kao popularne metode za otkrivanje antibakterijske aktivnosti i one imaju neke nedostatke kao nemogućnost otkrivanja postantibiotskog efekta za koji se kasnije koriste farmakokinetička i farmakodinamička modeliranja (Kiem i Schentag, 2006).

1.5. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi kako različiti uvjeti ultrazvučne ekstrakcije uzoraka kore naranče (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel) utječu na ukupnu antibakterijsku i antioksidativnu aktivnost određivanjem ukupne koncentracije fenolnih spojeva, ukupne antioksidacijske te antibakterijske aktivnosti na Gram - pozitivne i Gram - negativne humane patogene.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijal

Ovo istraživanje je provedeno na kori dobivenoj iz naranče *Citrus sinensis* Osbeck cv. Washington navel. Biljke su uzgajane pod istim klimatskim i kulturnim uvjetima u Opuzenu (južna Hrvatska). Plodovi su sakupljeni tijekom plodonosnog razdoblja u studenom 2014. i svježe obrađeni uklanjanjem kore koje su dalje samljevene i podvrgnute ekstrakciji.

2.2. Metode

2.2.1. Ekstrakcija uzoraka

Ekstrakcija uzoraka kore naranče napravljena je pri 3 različite temperature (30, 50 i 70 °C) s različitim trajanjem vremena ekstrakcije (15, 30 i 45 min), s različitim omjerima otapala i biljna tvari (10, 30 i 50 mL/g) te s različitim omjerom etanola i vode (60:40, 40:60, 20:80). Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupki Elma, ElmasonicP 70 H s frekvencijom od 37 kHZ pri snazi od 50 W. Nakon ultrazvučne ekstrakcije uzorci su filtrirani kroz filter papir i pohranjeni na + 4 °C do daljnjih analiza.

Tablica 1. Dizajn eksperimenta ultrazvučne ekstrakcije

UZORAK	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (min)	OTAPALO-ČVRSTA TVAR (ml/g)	ETANOL (%)
1	70	45	30	50
2	70	30	30	20
3	30	30	30	20
4	30	45	30	50
5	30	30	10	50
6	50	15	10	50
7	50	30	50	20
8	50	45	30	20
9	50	30	30	50
10	70	15	30	50
11	30	30	30	80

12	70	30	30	80
13	50	30	10	20
14	30	15	30	50
15	50	30	30	50
16	50	30	10	80
17	70	30	10	50
18	50	30	30	50
19	50	45	30	80
20	50	30	30	50
21	50	15	50	50
22	70	30	50	50
23	30	30	50	50
24	50	15	30	80
25	50	30	50	80
26	50	45	50	50
27	50	45	10	50
28	50	30	30	50
29	50	15	30	20

2.2.2. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

2.2.2.1. Folin-Ciocalteu metoda

Folin – Ciocalteu metoda je spektrofotometrijska metoda koja se koristi za određivanje ukupne koncentracije fenolnih spojeva. Metoda se temelji na reakciji Folin – Ciocalteu reagensa (smjesa fosofovolframove i fosfomolibdenske kiseline) s fenolnim spojem u blago alkalnim uvjetima pri čemu dolazi do nastanka plave boje.

Postupak:

U reakcijsku smjesu dodano je 0.5 ml vodom razrijeđenog ekstrakta kore naranče (1:4) i 2.5 ml destilirane vode nakon čega je dodano 0.5 ml Folin-Ciocalteu reagensa koji je prethodno razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:10. Pripremljena smjesa je vorteksirana te je nakon 3 minute dodano 2 ml zasićene otopine Na_2CO_3 te je dodana

destilirana voda do oznake 10 ml. Svi uzorci su dobro promiješani i ostavljeni su u tami 90 minuta pri sobnoj temperaturi nakon čega je mjerena apsorbancija pri 700 nm. Na isti način pripremljena je i slijepa proba, ali umjesto ekstrakta kore naranče stavlja se destilirana voda u reakcijsku smjesu. Svaki uzorak pripremljen je u tri ponavljanja, a rezultati su dobiveni prema kalibracijskoj krivulji galne kiseline i izraženi u miligramima ekvivalenata galne kiseline (GAE) po gramu kore naranče.

2.2.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

2.2.3.1. DPPH analiza

Ukupna antioksidacijska aktivnost ekstrakata narančine kore određena je prema modificiranoj DPPH metodi, prema Shih i sur., 2007.

Postupak:

750 μL razrijeđene otopine ekstrakata kore naranče (faktor razrijeđenja=10) pomiješano je s 750 μL otopine DPPH radikala (0.2 mM) te je konačna koncentracija DPPH radikala bila 0.1 mM. Smjesa je je vorteksirana te je inkubirana na sobnoj temperaturi u tami 30 minuta nakon čega je mjerena apsorbanca pri λ=517 nm. Kao kontrola korištena je 0.1 mM otopina DPPH radikala, a kao standard askorbinska kiselina. Sva mjerenja provedena su u tri replike te je sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\%\ \text{hvatanja DPPH radikala} = \frac{Ab + As - Am}{Ab} \times 100$$

gdje su:

Ab - apsorbancija 0.1 mM metanolne otopine DPPH radikala pri λ = 517 nm;

As – apsorbancija 0.1 mM metanolne otopine ekstrakta pri λ = 517 nm (slijepa proba ekstrakta);

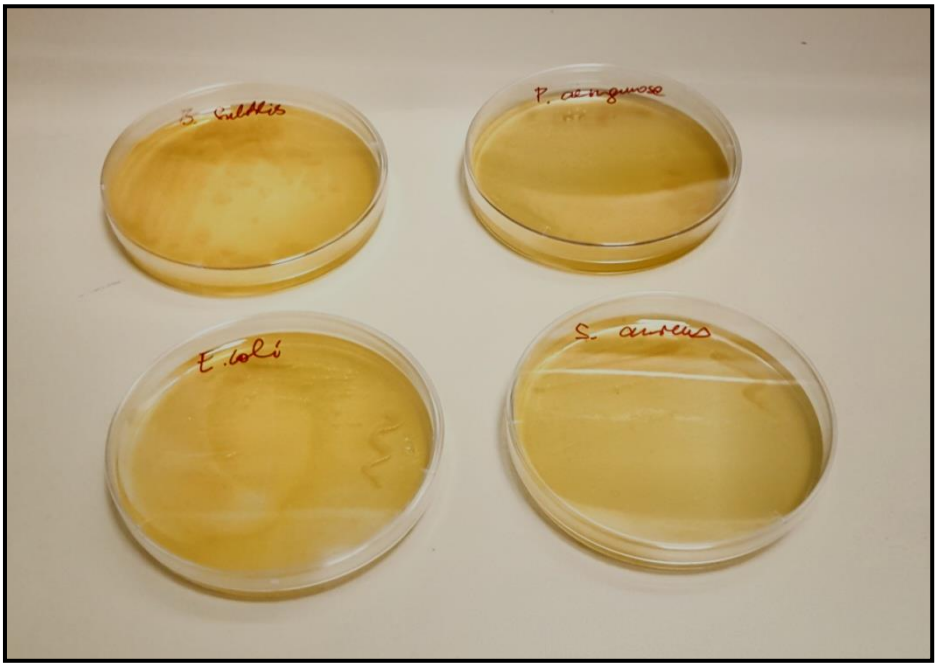
Am – apsorbancija 0.1 mM metanolne otopine smjese ekstrakata i DPPH radikala pri λ = 517 nm

2.2.4. Određivanje antibakterijske aktivnosti

2.2.4.1. Priprema hranjive podloge

U eksperimentu je korištena Müller Hinton čvrsta hranjiva podloga za nasađivanje bakterija. Za pripremu 100 ml čvrste hranjive podloge potrebno je izvagati 2.2 g Müller Hintona, 0.5 g ekstrakta kvasca i 1.5 g agara. Zatim je potrebno dodati 1 ml glicerola te do 100 ml 0.25M otopine PBS-a (fosfatni pufer, engl. *Phosphate buffer saline*) s podešenom pH vrijednosti na 7.4. Potrebno je sve promiješati te kuhati 10 minuta. Nakon kuhanja podloge je potrebno autoklavirati 15 minuta pri 121 °C. Nakon autoklaviranja podloge se malo ohlade te se izliju u Petrijeve posude. Dodatnim hlađenjem podloge se stvrdnjavaju te se na taj način omogućuje nasađivanje bakterijskih kultura. Podloge s nasađenim bakterijama inkubiraju se pri 37 °C tijekom noći (16 sati).

U mikrotitarskim pločicama korišten je tekući Müller Hinton bujon. Za pripremu 1 L Müller Hinton bujona potrebno je otopiti 22 g Müller Hintona u 1 L hladne destilirane vode zatim zagrijati smjesu do potpunog otapanja te autoklavirati na 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon obavljenog postupka smjesu je potrebno ohladiti, razdijeliti i pohraniti u hladnjaku.



Slika 4. Prikaz hranjivih podloga s bakterijskim sojevima nakon inkubacije

2.2.4.2. Odabir bakterijskih organizama 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. Vrste *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, kao česti ljudski patogeni odabrane su vrste *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* te također predstavljaju Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterije. Navedene bakterije su čuvanje u hladnjaku u dubokom agaru.

Gustoća bakterijskih suspenzija određena je prema McFarlandovom standardu čiji je princip uspoređivanje sa suspenzijom poznatog zamućenja, a koja se nalazi u ampuli jednakog promjera. Uporaba McFarland standarda neophodna je pri standardizaciji mikrobioloških metoda, a standardi su sukladni brojevima na McFarland skali. U ovom istraživanju korišten je Standard 0.5 kod kojeg koncentracija bakterija iznosi 150 x 10^6 /ml. Apsorbancija bakterijske suspenzije mjerena je u sterilnoj fiziološkoj otopini pri 600 nm.

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

Standard	**Koncentracija bakterija (1) x10^6/ml**	**Teoretska optička gustoća (2) pri 550 nm**	**Apsorbancija pri 600 nm**
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 pokazuju prosječnu vrijednost

(2) Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći bakterijske suspenzije

2.2.4.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Pripremljena su 50 %-tna razrjeđenja svih ekstrakata. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata izvedeno je na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. U svaku jažicu otpipetirano je 100 µl Müller Hinton bujona. U prvu jažicu u nizu dodano je 100 µl otapala, odnosno etanol kao negativna kontrola. U svaku sljedeću jažicu u nizu dodano je po 100 µl razrijeđenih ekstrakata. Nakon izrade serijskih razrjeđenja ispitivanih uzoraka, u svaku je jažicu dodano 20 µl bakterijske suspenzije. Odnosno, inokulirano je 300 x 10^3 bakterija (gustoća korištene bakterijske suspenzije je 0.5 na McFarland skali, što iznosi 150 x 10^6 bakterija/ml). Tako priređena pločica se inkubira na 37 °C tijekom 24 sata.

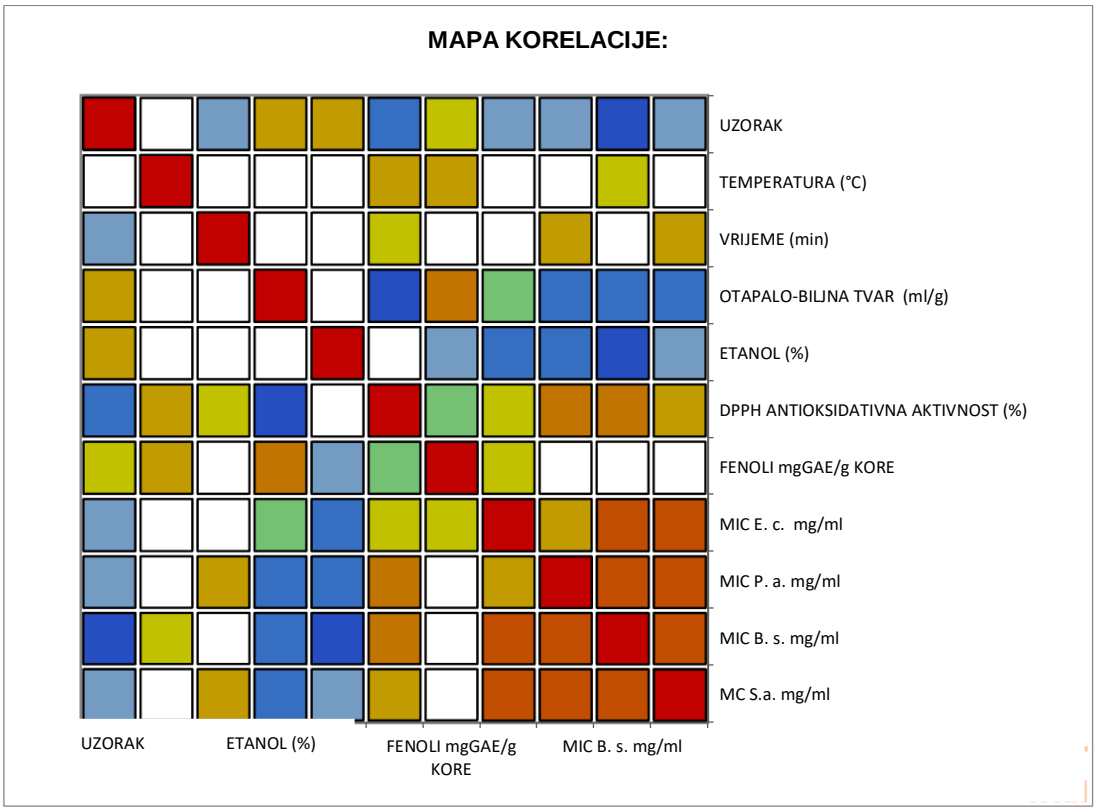
Promjene nastale rastom, odnosno inhibicijom rasta bakterija, očitavaju se golim okom. Naime, pojava zamućenja ili taloga na dnu mikrotitarske pločice znak su rasta bakterija. Pojava taloga dodatno se uspoređuje s kontrolnim jažicama. Najveće razrjeđenje ekstrakata pri kojem nije došlo do pojave zamućenja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

2.3. Statistička obrada podataka

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilk testom. Obzirom na to da podaci ne slijede normalnu raspodjelu, za usporedbu ekstrakata kore naranče 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 α=0.05.

3. REZULTATI

Analizom rezultata uspoređen je utjecaj različitih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola, ukupnu antioksidacijsku aktivnost te antibakterijsko djelovanje ekstrakata kore naranče.



Slika 5. Prikaz korelacijske mape uvjeta i parametara u provedenom istraživanju

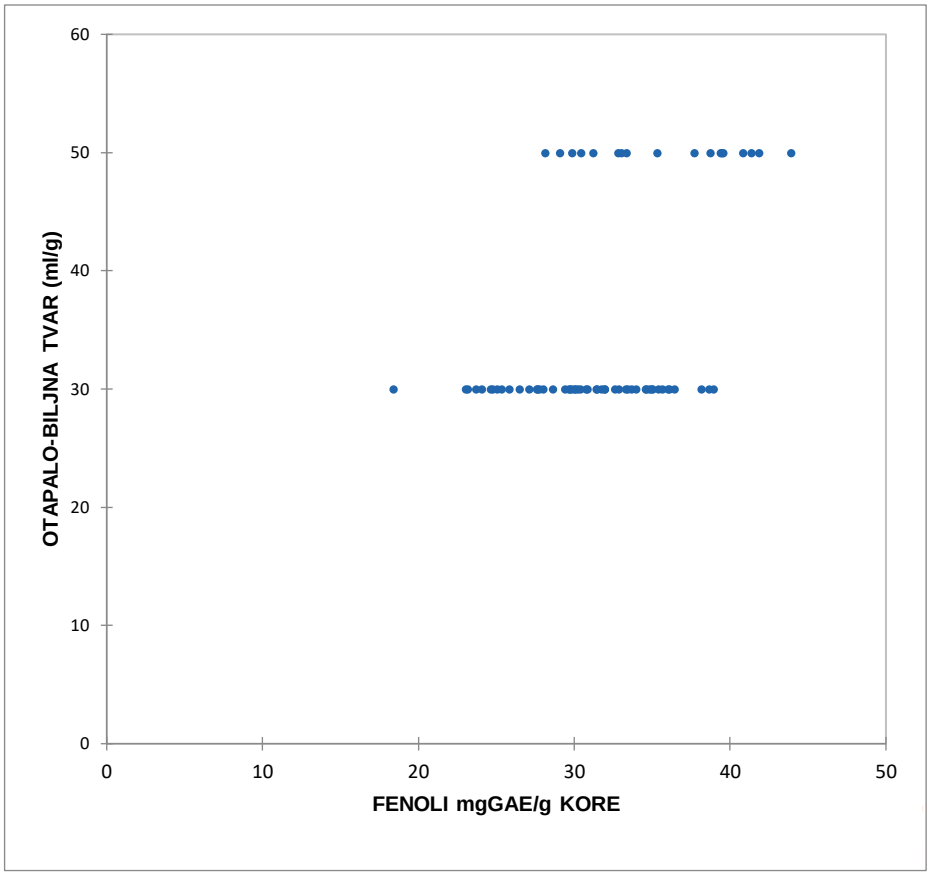
*korelacijska mapa koristi plavo-crvenu (hladno-toplo) skalu za prikaz korelacije; plava boja odgovara korelaciji blizu -1, crvena boja odgovara korelaciji blizu 1, a zelena korelaciji blizu 0.

3.1. Utjecaj različitih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na koncentraciju fenolnih spojeva

Pri ultrazvučnoj ekstrakciji najviša koncentracija ukupnih fenola iznosila je 41,37 mgGAE/g u uvjetima ekstrakcije pri 70°C tijekom 30 min s omjerom 50 ml otapala na 1 g biljne tvari te 50 %-tnim etanolom (Tablica 3, uzorak 22). Najniža koncentracija ukupnih fenola iznosila je 22,28 mgGAE/g u uvjetima ekstrakcije pri 50 °C tijekom 45 min s omjerom 30 ml otapala na 1 g biljne tvari te 20 %-tnim etanolom. Srednja vrijednost ukupne količine fenolnih spojeva u eksperimentu iznosi 31,946 mgGAE/g. Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije dobivene vrijednosti su slabo povezane s omjerom otapalo-biljna tvar (Slika 6, $r=0,409$; $p<0,05$).

Tablica 3. Koncentracija ukupnih fenola iukupna antioksidacijska aktivnost ekstrakata

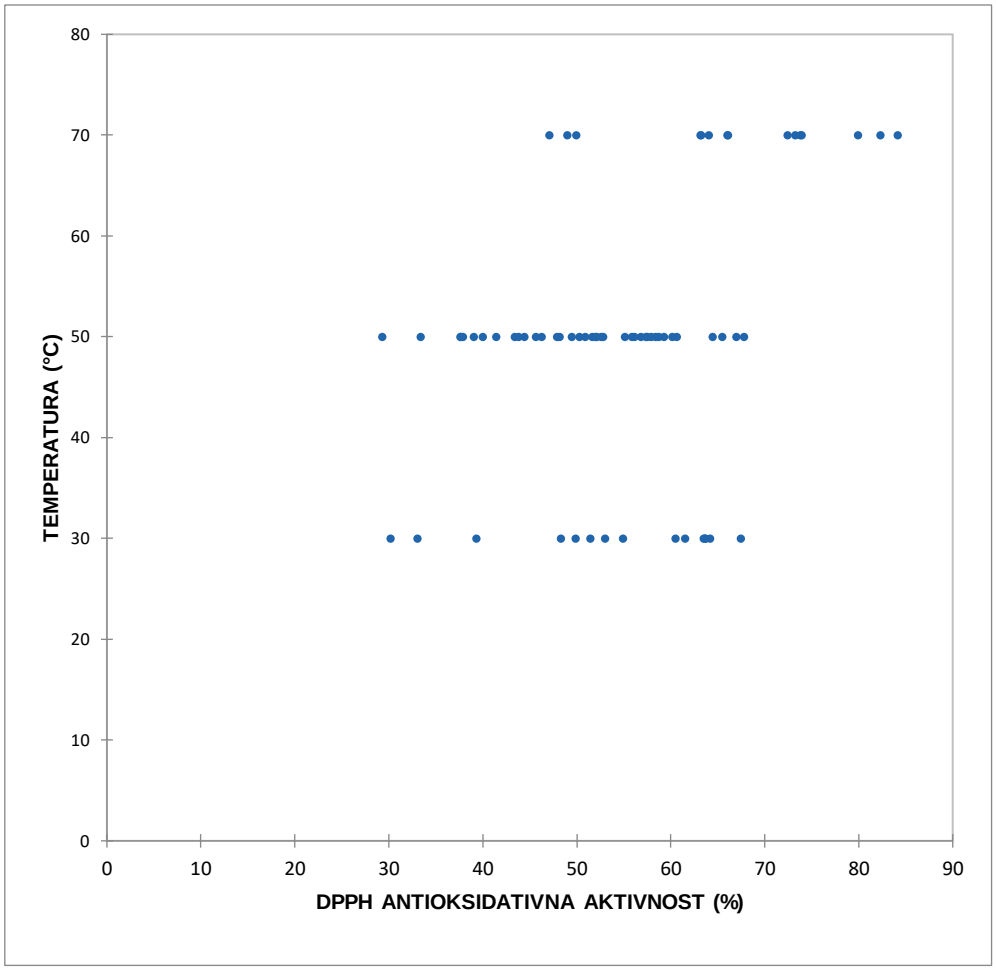
UZORAK	UKUPNI FENOLI(mg_{GAE} g^{-1})	DPPH (%)
1	33,65 + 2,34	82,07 ± 2,14
2	33,44 + 2,29	66,67 ± 6,13
3	32,83 + 3,13	60,82±5,19
4	34,58 + 2,34	62,56 ± 1,82
5	ND	ND
6	ND	ND
7	37,08 + 3,55	36,62 ±2,94
8	22,28 + 3,55	57,93 ± 1,00
9	32,80 + 2,02	57,93 ± 2,15
10	32,79 + 2,75	73,14 ± 0,76
11	25,22 + 2,31	51,39 ± 1,58
12	33,04 + 1,40	65,35 ± 1,15
13	ND	ND
14	29,33 + 0,69	59,04 ±9,78
15	31,15 + 1,86	56,03 ± 5,30
16	ND	ND
17	ND	ND
18	27,87 + 1,91	57,09 ± 13,61
19	24,50 + 1,14	54,81 ± 3,51
20	29,27 + 1,14	63,24 ± 7,08
21	30,02 + 1,08	38,80 ± 8,27
22	41,37 + 2,28	48,61 ± 1,46
23	37,45 + 4,01	34,13 ± 4,68
24	25,65 + 1,66	52,15 ± 6,83
25	30,42 + 2,34	38,48 ±1,29
26	38,83 + 3,29	47,39 ± 1,03
27	ND	ND
28	34,33 + 2,56	48,64 ± 3,90
29	38,55 + 0,38	52,44 ± 0,42



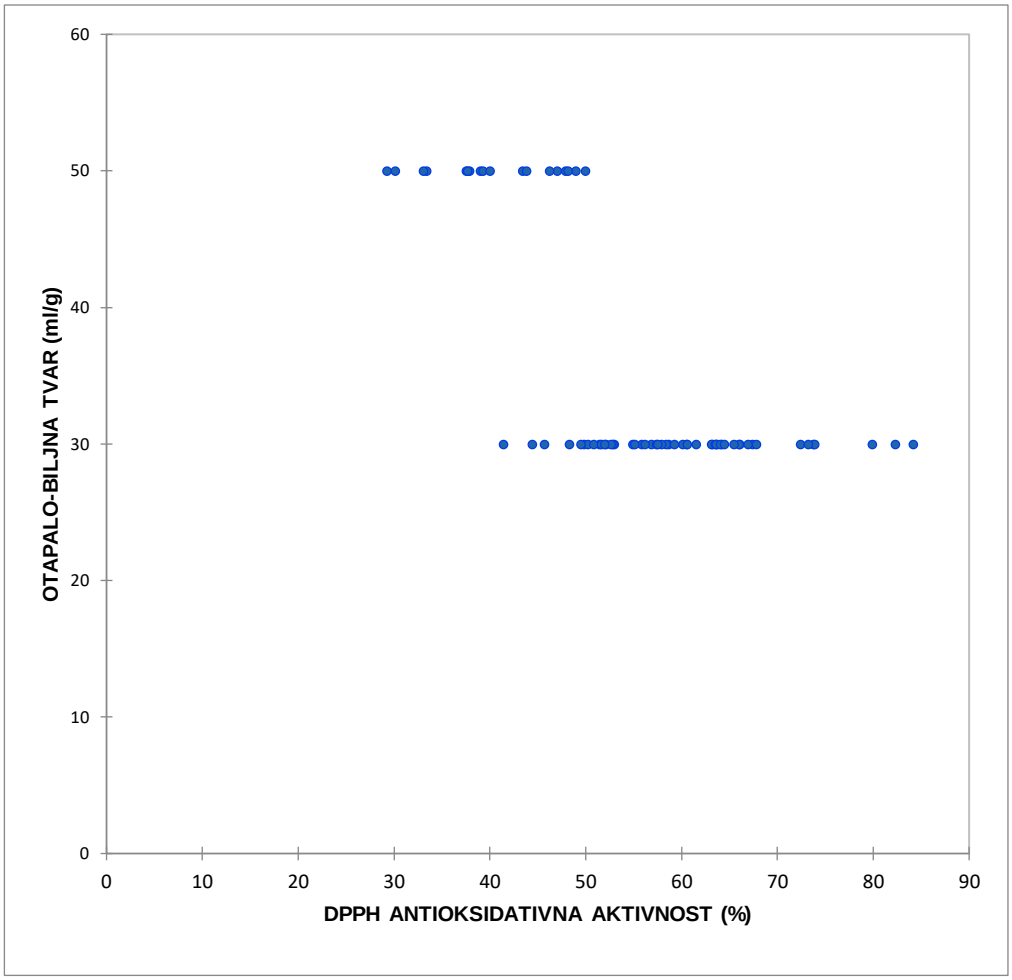
Slika 6. Prikaz povezanosti omjera otapala-čvrste tvari (ml/g) i koncentracije ukupnih fenola (mgGAE/g) (r=0,409; p<0,05)

3.2. Utjecaj različitih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na ukupnu antioksidacijsku aktivnost

Ukupna antioksidativna aktivnost određena je pomoću modificirane DPPH metode. Tijekom ispitivanja antioksidacijske aktivnosti najveći dobiveni iznos je 82,07 % pri uvjetima ekstrakcije 70 °C tijekom 45 minuta pri omjeru otapalo-biljna tvar 30 ml na 1 g biljne tvari i 50 %-tnim etanolom, a najmanja iznosi 34,13 % pri uvjetima ekstrakcije 30 °C tijekom 30 minuta pri omjeru otapalo-biljna tvar 50 ml na 1 g biljne tvari i 50 %-tnim etanolom (Tablica 3, uzorak 23). Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije postoji slaba povezanost između antioksidativne aktivnosti i temperature (Slika 7, r=0,30; p<0,05) te dobra negativna povezanost između omjera otapalo-biljna tvar i antioksidativne aktivnosti (Slika 8, r=-0,72; p<0,05).



Slika 7. Prikaz povezanosti temperature (°C) i antioksidative aktivnosti (%) ($r=0,30$; $p<0,05$)



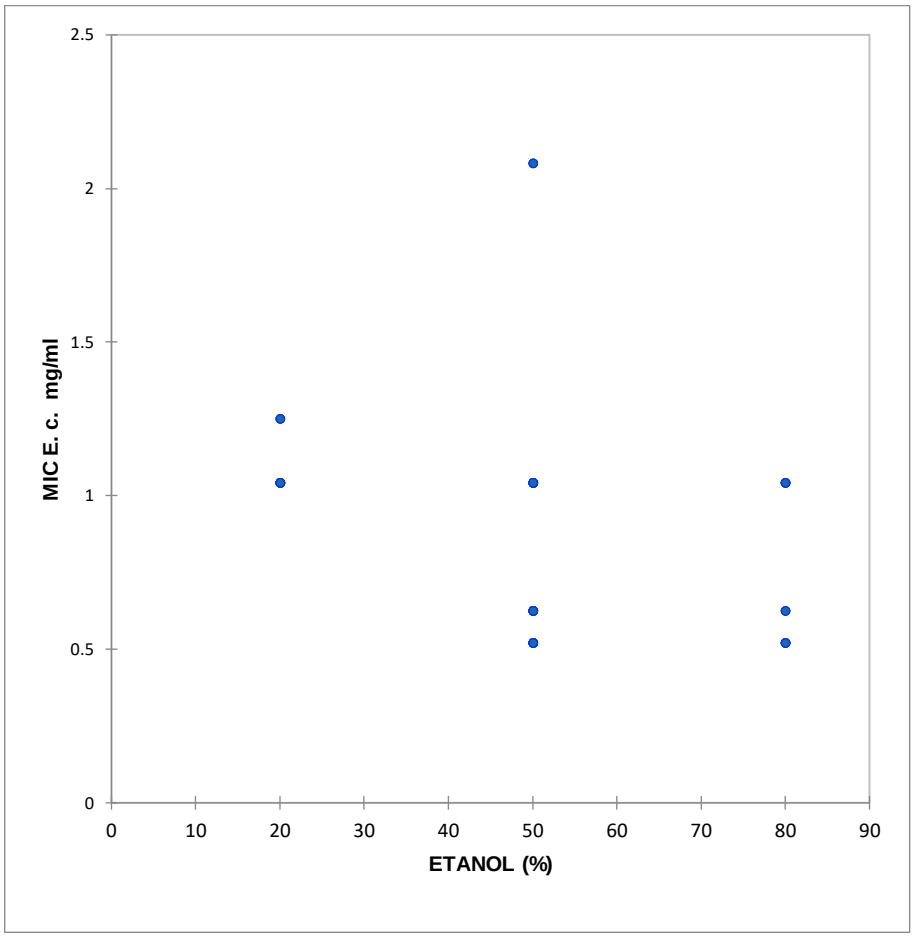
Slika 8. Prikaz povezanosti omjera otapalo-biljna tvar (ml/g) i antioksidativne aktivnosti (%) ($r=-0,72$; $p<0,05$)

3.3. Utjecaj različitih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na antibakterijsko djelovanje

Najbolja antibakterijska aktivnost utvrđena je kod uzorka ekstrahiranog pri 30 °C tijekom 30 min s omjerom 50 ml otapala na 1 g biljne tvari te 50%-tnim etanolom (Tablica 4, uzorak 23). Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije postoji slaba negativna povezanost između minimalne inhibitorne koncentracije i sadržaja etanola prilikom ultrazvučne ekstrakcije.

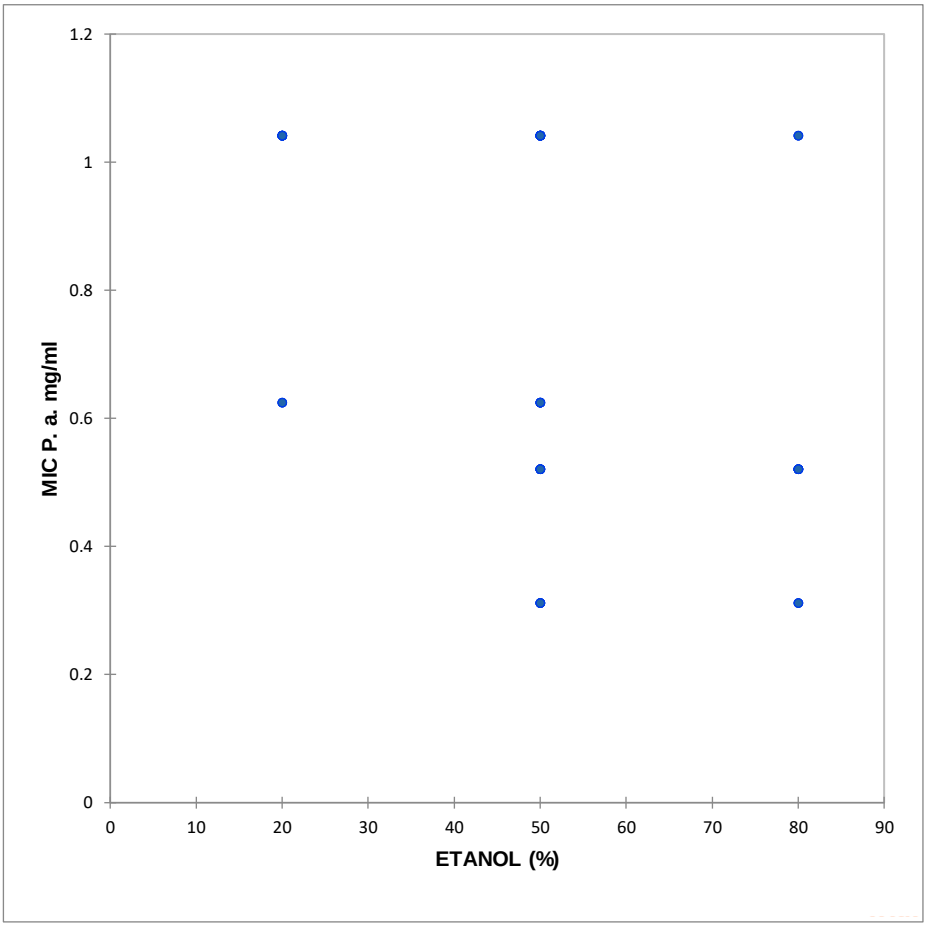
Tablica 4. Vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije MIC (mg mL^{-1})

UZORAK	**MIC (mg mL^{-1})**			
	E. coli	***P. aeruginosa***	***B. subtilis***	***S. aureus***
1	2,083333333	1,041666667	2,083333333	1,041666667
2	1,041666667	1,041666667	2,083333333	1,041666667
3	1,041666667	1,041666667	2,083333333	1,041666667
4	1,041666667	1,041666667	1,041666667	1,041666667
5	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND
7	1,25	0,625	1,25	0,625
8	1,041666667	1,041666667	2,083333333	1,041666667
9	1,041666667	1,041666667	1,041666667	2,083333333
10	1,041666667	0,520833333	1,041666667	1,041666667
11	1,041666667	0,520833333	0,520833333	1,041666667
12	0,520833333	0,520833333	0,520833333	0,520833333
13	ND	ND	ND	ND
14	0,520833333	0,520833333	0,520833333	0,520833333
15	0,520833333	0,520833333	0,520833333	0,520833333
16	ND	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND	ND
18	0,520833333	1,041666667	0,520833333	0,520833333
19	0,520833333	1,041666667	0,520833333	1,041666667
20	1,041666667	1,041666667	1,041666667	1,041666667
21	0,625	0,625	0,625	0,625
22	0,625	0,625	0,3125	0,625
23	0,625	0,3125	0,3125	0,3125
24	1,041666667	0,520833333	0,520833333	0,520833333
25	0,625	0,3125	0,3125	0,625
26	0,625	0,3125	0,3125	0,625
27	ND	ND	ND	ND
28	1,041666667	1,041666667	0,520833333	1,041666667
29	1,041666667	1,041666667	2,083333333	1,041666667
AMIKACIN	0,00016	0,0003	0,00002	0,000



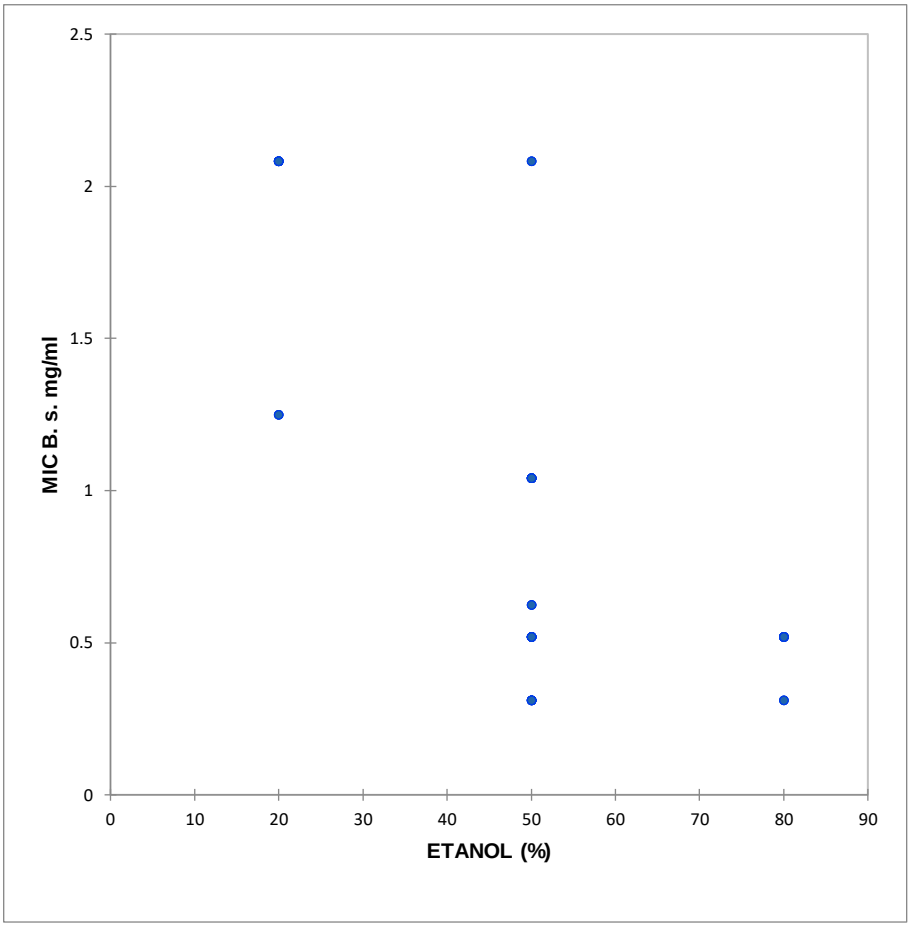
Slika 9. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije bakterije *E. coli* (mg/ml) i sadržaja etanola (%) ($r=-0,43$; $p<0,05$)

Minimalna inhibitorna koncentracija dobivena ispitivanjem bakterije *E. coli* iznosi 0,5208 mg/ml, dobivena kod 5 različitih uzoraka (Tablica 4, uzorci 12, 14, 15, 18, 19). Najveća koncentracija iznosi 2,0833 mg/ml, a dobivena je pri 70 °C tijekom 45 min min s omjerom 30 ml otapala na 1 g biljne tvari te 50%-tnim etanolom.



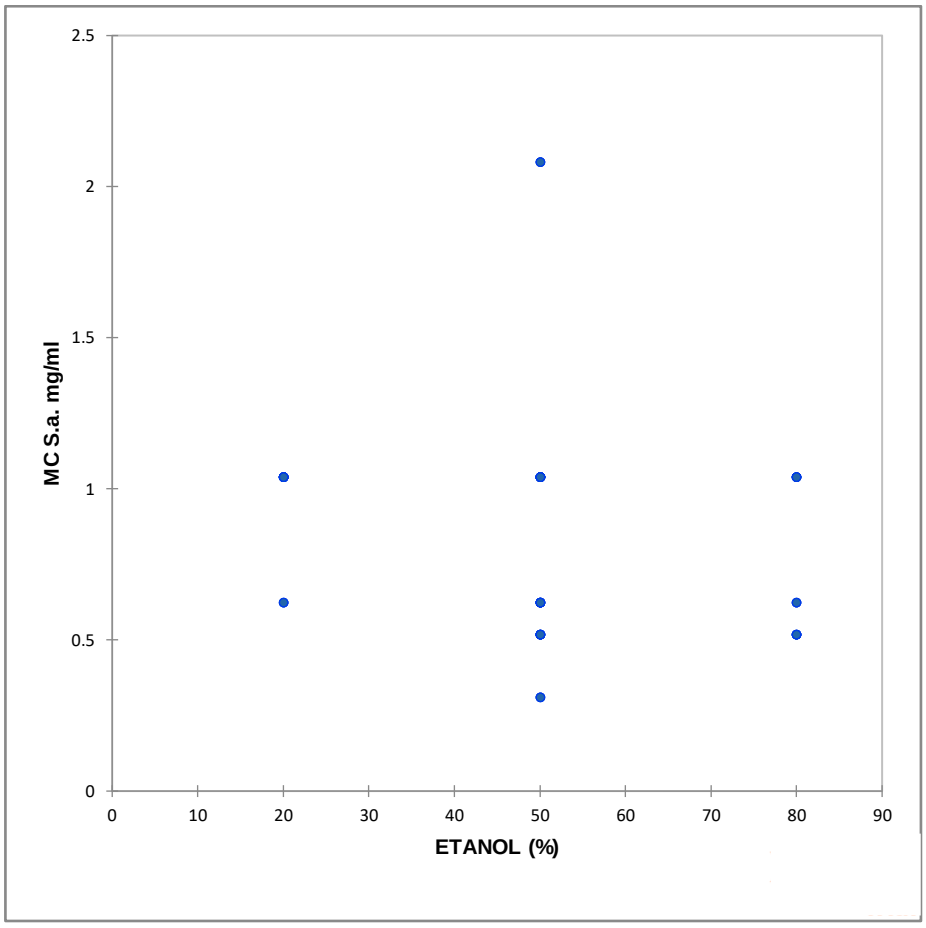
Slika 10. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije bakterije *P. aeruginosa* (mg/ml) i sadržaja etanola (%) (r=-0,464; p<0,05)

Minimalna inhibitorna koncentracija dobivena ispitivanjem bakterije *P. aeruginosa* iznosi 0,3125 mg/ml kod 3 različita uzorka. Najveća MIC iznosi 1,04166 mg/ml kod 11 različitih uzoraka (pod brojem 1, 2, 3, 4, 8, 9, 18, 19, 20, 28, 29). Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije postoji slaba negativna povezanost između minimalne inhibitorne koncentracije i sadržaja etanola prilikom ultrazvučne ekstrakcije (Slika 10, r=-0,464; p<0,05).



Slika 11. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije bakterije *B. subtilis* (mg/ml) i sadržaja etanola (%) (r=-0,67; p<0,05)

U slučaju bakterije *B. subtilis* minimalna inhibitorna koncentracija iznosi 0,312 mg/ml koja se pojavljuje kod 4 uzorka (Tablica 4, uzorci 22, 23, 25, 26). Najveća MIC je 2,0833 mg/ml kod 5 uzoraka (Tablica 4, uzorci 1, 2, 3, 8, 29). Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije postoji dobra negativna povezanost između minimalne inhibitorne koncentracije i sadržaja etanola prilikom ultrazvučne ekstrakcije (Slika 11, r=-0,67; p<0,05).



Slika 12. Prikaz povezanosti minimalne inhibitorne koncentracije bakterije *S. aureus* (mg/ml) i sadržaja etanola (%) (r=-0,28; p<0,05)

Najniža minimalna inhibitorna koncentracija dobivena ispitivanjem bakterije *S. aureus* bila je 0,3125 mg/ml kod uzorka koji je dobiven ekstrakcijom pri 30 °C tijekom 30 minuta u omjeru otapalo-biljna tvar koje je iznosilo 50 ml na 1 g biljnu tvari s 50 %-tnim etanolom. Najveća MIC bila je 2,0833 mg/ml dobivena je kod uzorka koji je ekstrahiran pri 50 °C tijekom 30 minuta u omjeru otapalo-biljna tvar koje je iznosilo 30 ml na 1 g biljnu tvari s 50 %-tnim etanolom (Tablica 4, uzorak 9). Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije postoji dobra negativna povezanost između minimalne inhibitorne koncentracije i sadržaja etanola prilikom ultrazvučne ekstrakcije (Slika 12, r=-0,28; p<0,05).

4. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu istraženo je kako različiti uvjeti ultrazvučne ekstrakcije uzoraka kore naranče utječu na ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva te na antioksidacijsku i antibakterijsku aktivnost.

Metodom Folin-Ciocalteu dobivena je ukupna koncentracija fenolnih spojeva kod uzoraka kore naranče. Najveća koncentracija fenola dobivena je tijekom 30 minuta pri temperaturi od 70 °C s omjerom otapalo-biljna tvar 50 ml na 1 g biljnog materijala te s 50 % etanolom, a najmanja tijekom 45 minuta pri temperaturi od 50 °C s omjerom otapalo-biljna tvar 30 ml na 1 g biljnog materijala s 20 %-tnim etanolom. Dosadašnja istraživanja pokazala su da ultrazvučna ekstrakcija smanjuje vrijeme trajanja ekstrakcije i povećava količinu ekstrahiranih fenolnih spojeva na način da dolazi do promjena staničnih struktura i razaranja biljnih stanica prilikom čega dolazi do lakšeg otapanja fenolnih spojeva u otapalu (Banožić i sur., 2019). Vrijeme ekstrakcije krucijalno je jer ono može rezultirati uštedom vremena i potrošenih sredstava tijekom provedbe eksperimenta. Produženo vrijeme ekstrakcije dovodi do smanjenja ukupne količine fenolnih komponenti jer dolazi do dužeg izlaganja faktorima kao što su svjetlost i kisik (Chan i sur., 2009). U radu Kamran Khan i sur. 2010, provedena je standardna ekstrakcija fenola iz narančine kore u istim uvjetima kao i ultrazvučna ekstrakcija, osim sonifikacije. Sadržaj fenola pri ultrazvučnoj ekstrakciji bio je veći u kraćem vremenskom razdoblju u odnosu na sadržaj fenola pri standardnoj ekstrakciji u dužem vremenskom trajanju. Uz odabir dužine trajanja ekstrakcije važno je odabrati i optimalan odnos količine otapala-čvrste tvari potrebne za ekstrakciju da bi se dobili što veći prinosi ekstrahiranih fenolnih spojeva (Wang i Weller, 2006). Spearmanovim testom korelacije pokazana je povezanost između omjera otapalo-biljna tvar i koncentracije fenolnih spojeva. Etanol kao polarni spoj pokazao se kao dobro otapalo tijekom ekstrakcije biljnog materijala. Prijašnja istraživanja pokazala su da otapala veće polarnosti pokazuju veću koncentraciju ekstrahiranih fenolnih spojeva od onih manje polarnosti (Roby i sur., 2019). Uz sve navedeno također su izrazito bitne fizikalne karakteristike otapala zbog utjecaja na kavitaciju tijekom ultrazvučne ekstrakcije. Otapala s niskom viskoznosti i manjom površinskom napetosti bolje utječu na samu ekstrakciju (Corbin i sur., 2015). Ultrazvučna ekstrakcija pokazala se učinkovitija u prinosu fenola u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije. Visoki tlak i

temperatura su važni čimbenici ekstrakcije te se trebaju pronaći optimalni uvjeti pri kojima će koncentracija fenolnih spojeva biti najveća (M'hiri i sur., 2015).

Antioksidacijsko djelovanje kore naranče mjereno je DPPH metodom. Najveća antioksidacijska aktivnost dobivena je prilikom ekstrakcije u trajanju od 45 minuta pri 70 °C s omjerom otapalo-biljna tvar 30 ml na 1 g biljnog materijala i 50 %-tnim etanolom, a najmanja prilikom ekstrakcije u trajanju od 30 minuta pri 30 °C s omjerom otapalo-biljna tvar 50 ml na 1 g biljnog materijala i 50 %-tnim etanolom. Povezanost između temperature i omjera otapalo-biljna tvar s ukupnom antioksidacijskom aktivnosti uzoraka potvrđena je Spearmanovim testom korelacije. U posljednje vrijeme velika važnost se pridaje iskorištavanju industrijskog otpada kao što je sirovi biljni materijal, u ovom slučaju kora naranče. Kora naranče se pokazala kao veliki izvor antioksidativnih komponenti te ovisno o uvjetima ekstrakcije dolazi do njenog maksimalnog iskorištavanja (Hegazy i Ibrahium, 2012). Ultrazvučna ekstrakcija u odnosu na druge tipove ekstrakcije donosi veći postotak ekstrahiranih tvari koje imaju antioksidativno djelovanje. Visoka temperatura tijekom ekstrakcije utječe na ukupno antioksidacijsko djelovanje uzoraka jer dovodi do boljeg raspadanja biljnog materijala i samim time većeg prodiranja otapala u uzorak i otapanja ekstrahirane komponente (Golmohamadi i sur., 2013). U ovom istraživanju je negativni predznak između povezanosti omjera otapalo-biljna tvar i antioksidacijske aktivnosti što pokazuje da veća količina otapala smanjuje antioksidacijsku aktivnost. Polarnost otapala važna je komponenta koja utječe na ekstrahirane spojeve iz uzoraka. Veća količina polarnog otapala može djelovati na spojeve tijekom ekstrakcije te na taj način smanjiti njihovu antioksidativnu aktivnost (Rababah i sur., 2010). U većini prijašnjih radova pronađena je povezanost između koncentracije ukupnih fenolnih spojeva i antioksidativne aktivnosti biljnog materijala (Rababah i sur., 2004). Međutim u ovom istraživanju možemo pretpostaviti da je vrsta fenolnih komponenti u uzorku važnija od ukupne koncentracije koja pridonosi antioksidativnoj aktivnosti.

Važna komponenta ekstrakcije je i odabir otapala. U istraživanju koje su proveli Albu i sur. (2004) ispitivana je razlika uspješnosti ekstrakcije u etanolu i vodenoj kupelji. Rezultati su pokazali da je ista količina dobivenih tvari ekstrahirana u etanolu u 15 minuta kao što je u 3 sata u vodenoj kupelji. Taj zaključak se može objasniti intenzifikacijom prijenosa mase pri ultrazvučnoj ekstrakciji, što dovodi do bolje reakcije otapala i biljnog materijala (Drmić i Jambrak, 2010),

Antibakterijsko djelovanje ekstrakata kore naranče ispitivano je metodom minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Jednako učinkovito djelovanje bilo je kod bakterija *P. aeruginosa, B. subtilis, S. aureus*, a najmanje učinkovito djelovanje bilo je kod bakterije *E. coli*. Spearmanov koeficijent korelacije pokazao je povezanost između postotka etanola i antibakterijskih svojstava kore naranče. Povećanjem sadržaja etanola dolazi do nižih vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije što znači jaču antibakterijsku aktivnost. No, pri manjim količinama etanola koji se koriste tijekom ekstrakcije dolazi do većeg oslobađanja bitnih antibakterijskih molekula. U dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da veće količine etanola kao otapala mogu dovesti do reakcija s aktivnim sastojcima iz biljnog ekstrakta te na taj način smanjiti antibakterijsko djelovanje uzorka (Rababah i sur., 2010). U istraživanjima koja su provedena do danas pokazano je da ekstrahirane komponente koje se smatraju antibakterijskim, djeluju različito na određene skupine bakterija jer je to u ovisnosti o mogućnosti penetracije spojeva kroz stijenke i membrane bakterija (Mehmood i sur., 2015).

Prijašnja istraživanja kore i sjemenki naranče kao otpadnog materijala ekstrahiranog u etanolu i vodi pokazala su vrlo dobro antibakterijsko djelovanje na bakterijske patogene (*E. coli* i *S. aureus*) te samim time napravili bazu za iskorištavanje otpada u dobre svrhe. Kora naranče pokazala se iskoristivijom nego sjemenke zbog svog većeg sadržaja vode koja omogućava veću zastupljenost antibakterijskih komponenti (Egbuonu i Osuji, 2016).

Uzorci kore naranče ultrazvučno ekstrahirani u različitim uvjetima pokazali su dobru antibakterijsku i antioksidacijsku aktivnost te ukupnu koncentraciju fenola. Narančina kora pruža bogatstvo različitih aktivnih tvari koje su značajne za ljudsko zdravlje te bi kao idući korak bilo poželjno izolirati molekule koje dovode do antibakterijske i antioksidativne aktivnosti. Uz sam sastav molekula značajno bi bilo detaljnije proučiti mehanizme kojima se odvijaju određene aktivnosti. Uz ultrazvučnu ekstrakciju još bi se mogla provesti ekstrakcija superkritičnim fluidima i mikrovalna ekstrakcija nakon čega bi se mogli usporediti rezultati i oderditi koja je povoljnija i učinkovitija za uzorke kore naranče. Primjenom otapala različite polarnosti moguće je istražiti koje otapalo pruža najveće prinose ukupnih fenolnih spojeva i najveću antioksidtivnu aktivnost. U iduća istraživanja antibakterijskog djelovanja poželjno je uključiti disk-difuzijsku metodu, FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodu po Benzieu i Strainu (1996) i ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) metodu po Arts i sur.

(2001) za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Koristeći više različitih metoda tijekom eksperimenta dobili bi se točniji i značajniji rezultati pomoću kojih bi se detaljnije i preciznije odredile pozitivne značajke kore naranče.

5. ZAKLJUČCI

Analizom utjecaja različitih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola, antioksidacijsku aktivnost te antibakterijsko djelovanje kore naranče, ovim su istraživanjem izvedeni sljedeći zaključci:

- Optimalni uvjeti za dobivanje najveće koncentracije ukupnih fenolnih spojeva tijekom ultrazvučne ekstrakcije su 70 °C tijekom 30 min s omjerom otapalo-biljna tvar 50 ml na 1 g biljnog materijala te 50 %-tnim etanolom
- Optimalni uvjeti za dobivanje najveće antioksidativne aktivnosti kore naranče tijekom ultrazvučne ekstrakcije su 70 °C tijekom 45 min pri omjeru otapalo-biljna tvar 30 ml na 1 g biljnog materijala te 50 %-tnim etanolom
- Veći omjer otapalo-biljna tvar donosi do većeg prinosa ukupnih fenolnih spojeva prilikom ultrazvučne ekstrakcije
- Pri višoj temperaturi ultrazvučne ekstrakcije dolazi do većeg postotka ukupne antioksidativne aktivnosti
- Veći omjer otapalo-biljna tvar dovodi do smanjenja antioksidativne aktivnosti uzoraka kore naranče
- Bolja je povezanost između antioksidativne aktivnosti i omjera otapalo-biljna tvar nego između parametara antioksidatvna aktivnost i temperatura
- Veća koncentracija etanola dovodi do smanjenja minimalne inhibitorne koncentracije
- Važno je odrediti optimalni odnos otapalo-biljna tvar, dužinu trajanja i temperaturu ultrazvučne ekstrakcije

6. LITERATURA

Abu-Zidan, F. M., Hefny, A. F., Corr, P. (2011) Clinical ultrasound physics. Journal of Emergencies, Trauma and Shock 4(4):501-503

Alagić, D., Smajlović, M., Članjak, E., Čaklovica, K. (2015) *Staphylococcus aureus* patogen prenosiv hranom. Veterinarski fakultet, Univerziteta u Sarajevu 180 pp.

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

Abduzaimović, A., Aljičević, M., Rebić, V., Mahmutović-Vranić, S., Abduzaimović, K., Šestić, S. (2016) Antibiotic Resistance in Urinary Isolates of *Escherichia coli*. Materia Sociomedica 28(6):416-419

Babaei, R., Jabbari, A., Yamini, Y. (2006) Solid-liquid etraction of fatty acids of some cariety of Iranian rice in closed vessel in the absence and presence of ultrasonic waves. Asian Journal of Chemistry 18, 57-64

Banožić, M., Banjari, I., Jakovljević, M., Šubarić, D., Tomas, S., Babić, J., Jokić, S. (2019) Optimization of ultrasound-assisted extraction of some bioactive compounds from tobacco waste. Molecules 24(8):1611

Bedenić, B. (2009) Antibakterijski lijekovi. Medicinska mikrobiologija 221-252.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. (2012) Oxidative Stress and

Antioxidant Defense. World Allergy Organ J 5:9–19

Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Croatian Journal of Food Science and Technology 3(1):32-47

Blount, Z. D. (2015) The natural history of model organisms: The unexhausted potential of *E. coli*. Elife 25;4

Brkič, S., Marić, D., Tomić, S., Dimitrijević, R. (2010) Virusne infekcije i oksidativni stres. Vojnosanitetski pregled 67(12):1015-1020

Brnčić, M., Markučič, D., Omelić, M., Tripalo, B., Ježek, D. (2009) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta pri otkrivanju stranih tijela u prehrambenim sustavima. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam 4(2):18-22

Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam 4(2):32-37

Budimir, A., Bošnjak, Z., Kalenić, S., Tambić, T., Tambić Andrašević, A. (2007) Otpornost izolata vrste *Staphylococcus aureus* na antibiotike u Hrvatskoj u godini 2004. Medicina 43:55-64

Budimir, A., Bošnjak, Z., Kalenić, S. (2012) Meticili-rezistentni *Staphylococcus aureus* u Hrvatskoj. Infektološki glasnik 32:2, 59-66

Casanovas, E. M., Fasciglione, G., Barassi, C. A. (2015) Azospirillum spp. and related PGPRs inocula use in intensive agriculture. U: Handbook for Azospirillum, Springer International Publishing Switzerland, str. 447-467.

Cha, J. Y., Cho, Y. S., Kim, I., Anno, T., Rahman, S. M., Yanagita, T. (2001) Effect of hesperetin, a citrus flavonoid on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. Plant Foods for Human Nutrition 56, 349-358

Chafer, M., Gonzalez-Martinez, C., Ortola, M. D., Chiralt, A., Fito, P. (2001) Kinetics of osmotic dehydration in orange and mandarin peels. Journal of Food Process Engineering 24:273-289

Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Wan Aida, W. M., Ho, C. W. (2009) Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. International Food Research Journal 16:203-219

Chemat, F., Huma, Z., Kamran Khan, M. (2010) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry 18:813-835

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry 34, 540–560.

Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguieres, A., Renouard, S., Blondeau, J. P., Ferroud, C., Doussot, J. (2015) Development and validation of an efficient

ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. Ultrasonics Sonochemistry 26,176-185

Cuevas-Ramos, G., Petit, C. R., Marcq, I., Boury, M., Oswals, E., Nougayrede, J. P. (2010) *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. PNAS 107(25):11537-11542

Cvjetan, S., Repar, J., Vlašić, I. (2016) Preživljavanje bakterija u ekstremnim uvjetima. Znanstveni susreti 3. vrste

Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., Olszowy, M. (2012) On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). Food chemistry 131:1037-1043

Di Majo, D., Giammanco, M., La Guardia, M., Tripoli, E., Giammanco, S., Finotti, E. (2005) Flavanones in Citrus fruit: Structure antioxidant activity relationships. Food Research International 38, 1161-1166

Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews 13(1):16-34

Domitrović, R. (2006) Vitamin C u prevenciji i liječenju bolesti. Pharmacognosy reviews 16:107-125

Doring, G., Flume, P., Heijerman, H., Elborn, J. S. (2012) Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: Curent and future strategies. Journal of Cystic Fibrosis 11(6):461-479

Drmić, H. I Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Croatian Journal of Food Science Technology 2 (2):22-33

Duračkova, Z. (2010) Some current insights into oxidative stress. Psyhiological Research 59(4):459-69

Egbuonu, A. C., Osuji, C. A. (2016) Proximate compositions and antibacterial activity of *Citrus sinensis* (Sweet orange) peel and seed extracts. European Journal of Medical Plants 12(3):1-7

Ehler, S. A. (2011) Citrus and its benefits. Journal of Botany 5:201-207

Eskilsson, C. S., Bjorklund, E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. Journal of chromatography A 902(1):227-50

Etebu, E. i Nwauzoma, A. B. (2014) A review on sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck): health, diseases and management. American Journal of Research Communication 2(2):33-70

Ferenčić, D., Gluhić, D., Dudaš, S. (2016) Hranjiva vrijednost mandarina (*Citrus reticulata* Blanco, *Citrus nobilis* Lour). Glasnik zaštite bilja 39(3):46-52

Gao, K., Henning, S. M. et al., (2006) The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. Journal of Nutritional Biochemistry 17:89-95

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2010) Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. Molecules 15(12):8813-26

Gardner, P. T., White, T .A .C., McPhail, D. B., Duthie , G. G. (2000) The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. Food Chemistry 68:471-474

Golomohamadi, A., Moller, G., Powers, J., Nindo, C. (2013) Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of raspberry puree. Ultrasonics Sonochemistry 20,1316-1323

Gorrini, C., Harris, I. S., Mak, T. W. (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. Nature Reviews Drug Discovery 12, 931-947

Goudeau, D., Uratsu, S. L., Inoue, K., Goes da Silva, F., Leslie, A., Cook, D., Reagan, R. L., Dandekar, A. M. (2008) Turning the orchestra: Selective gene regulation and orange fruit quality. Plant Science 174(3):310-320

Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Chaudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., Gupta, P. K., Pakuwal, U. (2014) Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. Asian Pacific journal of cancer prevention 15(11):4405-9

Gužvinec, M., Butić, I., Jelić, M., Lucić, S., Tambić-Andrašević, A. (2012) Rezistencija na antibiotike u bakterije Pseudomonas aeruginosa. Infektološki glasnik 32 (2), 71-80

Haar, G. T., Coussios, C. (2006) High intensity focused ultrasound:Physical principles and devices. International Journal of Hyperthermia 23(2):89-104

Hegazy, A. E., Ibrahium, M. I. (2012) Antioxidant activities of orange peel extracts. World Applied Sciences Journal 18(5):684-688

Hemwimol, S., Pavasant, P., Shotipruk, A. (2006) Ultrasonic-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. Ultrasonics Sonochemistry 13:543-548

Herceg, Z., Brnčić, M., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badnjak, M., Sokolić, I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. Mljekarstvo 59 (1):65-69

Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Krešić, G. (2009) Procesi konzerviranja hrane: Novi postupci, Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-67

Hong, H. A., Huang, J.-M., Khaneja, R., Hiep, L. V., Urdaci, M. C., Cutting, S. M. (2008) The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. Journal of Applied Microbiology 105 (2):510-520

Huang, Y. S., Ho, S. C. (2010) Polymetoxy flavones are responsible fot the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. Food Chemistry 119(3):868-873

Ivanković, J. (2011) Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom. Doktorska dizertacija

Ivanović, D. (2015) Pretilost-gojaznost. Srce i krvni sudovi 34(2):53-57

Iwatsuki K, Yamasaki O., Morizane S., Oono T., (2006) Staphylococcal cutaneous infections: Invasion, evasion and aggression. Journal of Dermatological Science 42, 203-214

Kalenić, S. i suradnici (2013) Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb 680 pp.

Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Smole Možina, S. (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of Microbiological Methods 81:121-126

Khoo, H. E., Nagendra Prasad, K., Kong, K. W., Jiang, Y., Ismail, A. (2011) Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. Molecules 16, 1710-1738

Kiem. S., Schentag, J. J. (2006) Realtionship of minimal inhibitory concentration and bactericidal for treatment of ventilator-associated pneumonia. Seminars in respiratory and critical care medicine 27(1):51-67

Krstelj, V. (2003) Ultrazvučna kontrola. Fakultet strojarstva i brodogradnje 329 pp.

Kurowska, E. M. I Manthey, J. A. (2004) Hypolipidemic effect and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(10):2879-2886

Ladaniya, M. S. (2008) Citrus fruit, biology, technology and evaluation. Principal Scientist (Horticulture) ICAR Research Complex for Goa Ela, Goa, India

Liu, Y., Heying, E., Tanumihardjo, S. A. (2012) History, global distribution and nutritional importance of citrus fruits. Comprehensive reviews in food science and food safety 11 (6):530-545

Madhuri, S., Ashwini, U. H., Srilakshmi, N. S., Prashith Kekuda, T. R. (2014) Antimicrobial activity of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* peel extracts. Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation 3 (4):366-368

Manthey, J. A., Guthrie, N., Grohmann, K. (2001) Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Current Medicinal Chemistry 8:135-153

Martinis, I., Pavić, E., Oreč, I., Kardum, D. (2008) Dijetoterapija bolesti jetre. Medicus 17(1):113-122

McFarland J. (1907) The nephelometer:an instrument for estimating the number of bacteria insuspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. JAMA. 49(14):1176–1178

Medvedev, A., Kat, E. (2004) Activated citrus peel extract. US Patent NO. 10553288

Mehmood, B., Dar, K. K., Ali, S., Awan, U. A., Nayyer, A. Q., Ghous, T., Andleeb, S. (2015) In vitro assessment of antioxidant, antibacterial and phytochemical analysis of peel of *Citrus sinensis*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Science 28(1):231-239

Mekbib, S. B., Regnier, T. J., Korsten, L. (2006) Citrus (*Citrus sinensis*) disease survey: knowledge, attitude and management practices in Ethiopia. Tropical research journal 4:1-9

M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., Ghoul, M. (2015) Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. Food and Bioproducts Processing 96,161-170

Milind, P. I Dev, C. (2012) Orange:range of benefits. International research journal of pharmacy 3 (7): 59-63

Moser, C. (2012) How diet and nutrition affect mental health. Focal point. Youth, Young Adults & Mental Health 26(1):15-17

Namasivayam, C., Yamuna, R. T., Jayanthi, J. (2003) Removal of methylene blue from wastewater by adsorption on cellulosic waste orange peel. Cellulose Chemistry and Technology 37:333-339

Nguyen, Y. i Sperandio, V. (2012) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2:90

Nishino, H., Murakoshi, M., Tokuda, H., Satomi, Y. (2009) Cancer prevention by carotenoids. Archives of Biochemistry and Biophysics 483(2):165-168

Okwu, D. E. (2005) Phytochemicals, vitamins and minerals contents of two Nigerian medical plants. International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences 1,375-381

Okwu, D. E. I Emernike, I. N. (2006) Evaluation of the phytonutrients and vitamins continent of citrus fruits. International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences 2 (1):1-6

Orth, J. D., Conrad, T. M., Na, J., Lerman, J. A., Nam, H., Feist, A. M., Palsson, B. (2011) A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism. Molecular Systems Biology 7, 535

Paramasivam, S., Alva, A. K., Hostler, K. H., Easterwood, G. W., Southwell, J. S. (2008) Fruit nutrient accumulation of four orange varieties during fruit development. Journal of Plant Nutrition 23(3):313-327

Patel, R.M., Patel N.J. (2011) In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research 1, 52-68.

Pico, Y. (2013) Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. Trends in Analytical Chemistry 43:84-99

Pishchany, G., McCoy, A. L., Torres, V. J., Krause, J. C., Crowe Jr., J. E., Fabry, M. E., Prochazkova, D., Boušova, I., Wilhelmova, N. (2010) Antioxidant and prooxidant properties offlavonoids. Fitoterapia 82:513-523

Poole, K. (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to max. Frontiers in Microbioogy 2:65

Ray, P. D., Huang, B. W., Tsuji, Y. (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cellular Signaling 24(5):981-990

Pramila, D. M., Xavier, R., Marimuthu, K., Kathiresan, S., Khoo, M. L., Senthilkumar, M., Sathya, K., Sreeramanan, S. (2011) Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (*Mentha piperita*: Lamiaceae). Journal of Medicinal Plants Research 6(2):331-335

Rababah, T. M., Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K., Yang, W. (2010) Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth and pomegranate. Journal of Food Science 75(7):626-632

Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S., Horax, R. (2004) Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola and ginkgo extracts, vitamin E and tert-butylhydroquinone. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:5183-6

Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badnjak, M., Werner, Z. (2010) Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. Kemija u industriji 59 (4):169-177

Roby, M.H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., Khalel, K. I. (2013) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage *(Salvia officinalis* L.) i majoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Industrial Crops and Products 43:827-831

Romero-Lopez, M. R., Osorio-Diaz, P., Bello-Perez, L. A., Tovar, J., Bernardino-Nicanor, A. (2011) Fiber concentrate from orange (*Citrus sinensis* L.) bagase:characterization and application as bakery product ingredient. International Journal of Molecular Science 12:2174-2186

Santos, H. M., Capelo, J. L. (2007) Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. Talanta 73(5):795-802

Savić, LJ. (2014) Metode ekstrakcije biljnih materijala:uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. Lekovite sirovine 34:93-103

Schieber, M., Chandel, N. S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. Current Biology 24(10):453-62

Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V., Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Free radical research 36(2):177-87

Shalaby E. A., Shanab S.M.M. (2013) Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 7(10), 529-538.

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

Silaste, M. L., Rantala, M., Alfhan, G., Aro, A. (2003) Plasma homocysteine concentration is decreased by dietary intervention. British Journal of Nutrition 89(3):295-301

Siles Lopez, J. A., Li, Q., Thompson, I. P. (2010) Biorafinery of waste orange peel. Critical reviews in biotechnology 30:1, 63-69

Skaar, E. P. (2010) Specificity fo Human Hemoglobin Enhances *Staphylococcus aureus* Infection. Cell Host & Microbe 8(6):544-550

Sosa, V., Moline, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., Leonart, M. E. (2012) Oxidative stress and cancer: An overview. Ageing Research Reviews 12(1):376-390

Stevanović, J., Borozan, S., Jović, S., Ignjatović, I. (2011) Antioxidative defense. Veterinarski glasnik 65(3-4):247-256

Sun, T. (2007) D-limonene:Safety and Clinical Applications. Alternative Medicine Review 12(3):259-264

Tanaka, Y., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Fukutani, K., Tanaka, T., Ogawa, H. (1997) Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. Carcinogenesis 18:957-965

Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologus protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied Microbiology and Biotechnology 72:211

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V. G. (2015) Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations and Management. Clinical Microbiology Reviews 28(3):603-661

Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., Giammanco, M. (2007) Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. Food Chemistry 104, 466-479

Usajewicz, I. i Nalepa, B. (2006).Survival of Escherichia coli O157:H7 in Milk Exposed to High Temperatures and High pressure. Food Technology and Biotechnology 44(1):33-39

Valiente, J. I. I Albrigo, L. G. (2004) Flower bud induction of sweet orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): Effect of low temperatures, crop load and bud age. Journal of American Society of Horticultural Science 129(2):158-164

Van Heerden, I., Cronje, C., Swart, S. H., Kotze, J. M., (2002) Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. Bioresource Technology 81:71-76

Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D. G., Santas, P., Santas, R., Corleti, V. (2007) Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. Bioresource Technology 98:296-301

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. Innovative Food Science and Emerging Technologies 9:161-169

Viña, J., Borras, C., Gomez-Cabrera, M.C., Orr, W. C. (2006) Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression. Role of reactive oxygen species and (phyto)oestrogens in the modulation of adaptive response to stress. Free Radical Research 40: 111-119

Vinatour, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry 8:303-313

Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology 17,300-312

Westers, L., Westers, H., Quax, W. J. (2004) *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotehnological approach to optimize the host organism. BBA-Molecular Cell Research 1-3:299-310

Wilmsen, P. K., Spada, D. S., Salvador, M. (2005) Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(12):4757-4761

Woydilo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry 105(3):940-949

Wu, J., Nyborg, W. L. (2008) Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. Advanced Drug Delivery Reviews 60(10):1103-1116

Yan, M. H., Wang, X., Zhu, X. (2013) Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinskon disease. Free Radical Biology and Medicine 62:90-101

Zhang, K., Su, L., Duan, X., Liu, L., Wu, J. (2017) High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system. Microbial cell factories 16:32

Web izvori slikovnih prikaza

Web 1. https://garden-tags-live.s3-accelerate.amazonaws.com/38083_tal2lifshitz_1521558233885_1080.jpeg

Web 2. https://www.oscartintori.it/wp-content/uploads/2017/05/50C-Citrus-sinensis-washington-navel-1.jpg