

Primjena elektrokemijskog DNA biosenzora za određivanje antioksidacijskog učinka polifenola iz čaja kadulje

Budić, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:398240>

Rights / Prava: [Attribution-ShareAlike 4.0 International / Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U
OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

LEA BUDIĆ

**PRIMJENA ELEKTROKEMIJSKOG DNA BIOSENZORA ZA
ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA
POLIFENOLA IZ ČAJA KADULJE**

DIPLOMSKI RAD

OSIJEK, RUJAN 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za primijenjenu kemiju, biokemiju i instrumentalne metode
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Inženjerska kemija

Tema rada je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 27. svibnja 2022.

Mentor: doc. dr. sc. *Ivana Tomac*

PRIMJENA ELEKTROKEMIJSKOG DNA BIOSENZORA ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA POLIFENOLA IZ ČAJA KADULJE

Lea Budić, 0113140712

Sažetak: Elektrokemijske metode određivanja antioksidacijskog učinka, a posebno primjena elektrokemijskog DNA biosenzora, poprima veliki značaj. Nanošenjem DNA molekule na površinu radne elektrode i djelovanjem otopine za stvaranje slobodnih radikala na DNA biosenzor djelomično se oštetiti nanosena molekula DNA pri čemu nastaje oksidirajući produkt. Polifenoli reagiraju s novonastalim oksidirajućim produktom regenerirajući određeni postotak oštećene DNA molekule, što predstavlja njihov antioksidacijski učinak, a prati se voltametrijskim tehnikama. Deoksiribonukleinska kiselina (DNA), osnovna je komponenta DNA biosenzora. Kadulja (lat. *Salvia officinalis* L.) je biljka iz porodice *Lamiaceae* (usnače) i predstavlja izvor fenolnih kiselina i flavonoida. Zadatak ovog rada je bio ispitati mogućnost primjene elektrokemijskog DNA biosenzora za određivanje antioksidacijskog učinka polifenola iz čaja kadulje. Dobiveni rezultati pokazali su da najveći postotak preživjele DNA nakon inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala pokazuje otopina kafeinske kiseline, zatim slijede otopina ferulične kiseline i (+)-katehin te čaj od kadulje. Također, uspješno je primijenjena pravokutnovalna voltametrijia s otopinom Troloxa kao standard te su određeni ukupni polifenoli u uzorku čaja od kadulje.

Glavne riječi: čaj od kadulje, polifenoli, elektrokemijski DNA biosenzor, ciklička voltametrijia

Rad sadrži: 38 stranica
21 slika
5 tablica
0 priloga
40 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | | |
|----|--|---------------|
| 1. | doc. dr. sc. <i>Valentina Bušić</i> | predsjednik |
| 2. | doc. dr. sc. <i>Ivana Tomac</i> | član-mentor |
| 3. | prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i> | član |
| 4. | prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 30. rujna 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Applied Chemistry, Biochemistry and Instrumental Methods
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Engineering Chemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 8 held on May 27, 2022.

Mentor: *Ivana Tomac*, PhD, assistant prof.

Application of Electrochemical DNA Biosensor for Determining the Antioxidative Effect of Sage Tea Polyphenols *Lea Budić, 0113140712*

Summary: Electrochemical methods of determining the antioxidant effect, and especially the application of the electrochemical DNA biosensor, are gaining great importance. By applying a DNA molecule to the surface of the working electrode and the solution for the formation of free radicals on the DNA biosensor, the applied DNA molecule is partially damaged, and an oxidizing product is formed. Polyphenols react with the newly formed oxidizing product, regenerating a certain percentage of the damaged DNA molecule, which represents their antioxidant effect, and are monitored by voltammetric techniques. Deoxyribonucleic acid (DNA) is the basic component of DNA biosensors. Sage (lat. *Salvia officinalis* L.) is a plant from the *Lamiaceae* family and is a source of phenolic acids and flavonoids. The task of this work was to examine the possibility of using an electrochemical DNA biosensor to determine the antioxidant effect of polyphenols from sage tea. The obtained results showed that the highest percentage of surviving DNA after incubation in the solution for the generation of free radicals is shown by the caffeic acid solution, followed by the ferulic acid solution and (+)-catechin and sage tea. Also, square-wave voltammetry with Trolox solution as a standard was successfully applied and total polyphenols in the sage tea sample were determined.

Key words: sage tea, polyphenols, electrochemical DNA biosensor, cyclic voltammetry

Thesis contains: 38 pages
21 figures
5 tables
0 supplements
40 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Valentina Bušić</i> , PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. <i>Ivana Tomac</i> , PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, prof. | member |
| 4. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof. | stand-in |

Defense date: September 30, 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Hvala mentorici doc.dr.sc. Ivani Tomac na iznimno velikoj pomoći, vremenu, trudu, raspoloživosti i stručnim savjetima koji su doprinijeli nastanku ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem cijeloj svojoj obitelji, a posebno mojim roditeljima i sestri koji su uvijek bili uz mene, jer bez njihove podrške sve bi bilo puno teže.

Posebnu želim zahvaliti pokojnom dedi Leu koji je najviše od svih vjerovao u mene.

Hvala Vam,

Lea

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. KADULJA	4
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI U KADULJI.....	5
2.3. METODE ODREĐIVANJA POLIFENOLA.....	8
2.3.1. Elektrokemijske tehnike.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. ZADATAK	14
3.2. MATERIJALI I METODE	14
3.2.1. Određivanje antioksidacijskog učinka primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora	14
3.2.2. Pravokutnovalna voltametrijka kao metoda praćenja antioksidacijske aktivnosti u uzorku čaja od kadulje	17
3.2.3. Spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola u uzorku čaja od kadulje	17
4. REZULTATI	19
4.1. Određivanje antioksidacijskog učinka primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora	20
4.2. Pravokutnovalna voltametrijka kao metoda praćenja antioksidacijske aktivnosti u uzorku čaja od kadulje	25
4.3. Spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola u uzorku čaja od kadulje	26
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČAK.....	33
7. LITERATURA	35

Ovaj diplomski rad izrađen je sklopu istraživanja Županijskog projekta iz 2022. godine pod nazivom "Ispitivanje važnih bioaktivnih tvari iz poljoprivrednih proizvoda s gospodarstava Osječko-baranjske županije".

1. UVOD

Kadulja (*Salvia officinalis* L.) je višegodišnji polugrm mediteranskog podrijetla, visine 30-70 cm. Ima drvenastu stabljiku, listovi su uski i eliptični, srebrno-zelene boje, a cvjetovi plavo-ljubičaste boje. Biljke roda *Salvia* L. međusobno se razlikuju po izgledu i svojstvima. Uz najpoznatiju ljekovitu kadulju (*Salvia officinalis* L.), razlikuju se stepska kadulja (*Salvia nemorosa* L.), livadna kadulja (*Salvia pratensis* L.) i pršljenasta kadulja (*Salvia verticillata* L.).

Čaj od kadulje je jedan od najčešće korištenih oblika proizvoda od kadulje, a predstavlja vodenu otopinu osušenih listova kadulje. Prema sastavu kadulja predstavlja bogat izvor biološki aktivnih sastojaka kao što su polifenolni spojevi, koji mogu imati brojne pozitivne učinke na ljudski organizam (Walch i sur., 2011).

Do danas, u kadulji je pronađeno preko 160 vrsta polifenolnih spojeva, među kojima su najzastupljenije hidrokisicimne kiseline, među kojima se po sadržaju izdvaja kafeinska i ružmarinska kiselina (Lu i Foo, 2002; Kamatou i sur., 2010).

Zbog svog karakterističnog sastava, biljka kadulja koristi se u prehrambenoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji te se razlikuju proizvodi od kadulje kao što su eterično ulje, tinkture i čaj.

Različite instrumentalne metode primjenjuju se za identifikaciju i kvantifikaciju polifenolnih spojeva u realnim uzorcima. Kromatografske, spektrofotometrijske uz elektrokemijske metode su najzastupljenije za karakterizaciju polifenolnih spojeva kadulje. Od elektrokemijskih tehnika izdvajaju se voltametrijske tehnike među kojima ciklička i pravokutnovalna voltometrija su najzastupljenije zbog svoje osjetljivosti, selektivnosti i brzine analize.

Danas se u području elektrokemijske analize sve više koriste i elektrokemijski biosenzori odnosno elektrokemijski DNA biosenzor koji je našao primjenu u analizi antioksidacijskog učinka pojedinog ili pojedinih polifenolnih spojeva u realnim uzorcima kao usporedna tehnika standardnim spektrofotometrijskim tehnikama.

Stoga je zadatak ovog diplomskog rada ispitati mogućnost primjene elektrokemijskog DNA biosenzora za određivanje antioksidacijskog učinka polifenola iz čaja kadulje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KADULJA

Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.) je višegodišnja, zimzelena polugrmovita biljka iz porodice *Lamiaceae* ili usnače, reda *Lamiales* koja se uzgaja kao začinska, ljekovita i ukrasna biljka (**Tablica 1**). Aromatsku biljku prvi put je opisao Carl Linné 1753. godine. Kadulja je izvorno mediteranska biljka, raste na kamenjaru, vapnenastom tlu, a njezino stanište u Republici Hrvatskoj najviše je zastupljeno u Primorju, Dalmaciji i Dalmatinskom zaleđu.



Slika 1 Prikaz a) cvijeta i b) lista kadulje *Salvia officinalis* L. (Nikolić, 2015).

Kadulja je višegodišnji polugrm koji naraste do visine od 30 do 70 cm. Ima drvenastu stabljiku iz koje izbijaju grančice s listovima i cvjetovima (**Slika 1**). Listovi su srebrno zeleni i s obje strane prekriveni dlačicama. Cvjetovi kadulje su ljubičasto –plave boje, izduženo-ovalnog oblika, ugodnog mirisa koji privlači pčele te je iz tog razloga kadulja važna medonosna biljka (Trinajstić, 1992).

Biljka Kadulja je poznata od davnina, a u antičko doba koristila se kao lijek za brojne bolesti, (lat. *salvare* - spasiti, liječiti: *officinalis* – ljekovitost). Primjena kadulje je raznolika, najčešće se upotrebljava eterično ulje koje posjeduje ljekovita i začinska svojstva, te se osim u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji upotrebljava i u prehrambenoj industriji. Također, čaj od kadulje se koristi kao oblog za rane, te za ispiranje usta i grla kao dezinfekcija (Willfort, 2002).

Tablica 1 Taksonomija kadulje (Dubravec i Dubravec, 2001.)

CARSTVO	<i>Plantae</i>
KOLJENO	<i>Magnoliopsida</i>
RAZRED	<i>Magnoliopsida</i>

RED	<i>Lamiales</i>
PORODICA	<i>Lamiaceae</i>
ROD	<i>Salvia</i>
VRSTA	<i>Salvia officinalis</i>

2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI U KADULJI

Polifenolni spojevi su široko prisutni u hrani (voću, povrću, žitaricama, prerađevinama, napitcima). Neki od poznatih predstavnika polifenolnih spojeva su resveratrol u crnom vinu, (–)-epigalokatehin galat u zelenom čaju, klorogenske kiseline u kavi, antocijanini u obojenom voću, procijanidini u sjemenkama grožđa i slično. Budući da su polifenolni spojevi uglavnom strukturne komponente staničnih stijenki, neki od njih imaju zaštitnu ulogu od patogena, bolesti, daju pigment cvjetovima, plodovima kori i sjemenki biljke. Dobrobiti polifenolnih spojeva iz hrane privlače veliku pozornost znanstvenika jer su dostupni u svakodnevnoj prehrani ljudi. Do danas je objavljeno mnoštvo znanstvenih radova povezanih s mogućom ulogom polifenolnih spojeva u ljudskom organizmu, a većinom su povezani za moguću antioksidacijsku, neuroprotektivnu i protuupalnu ulogu, zatim ulogu poticanja apoptoze tumorskih stanica i slično (Cory i sur., 2018).

Tijekom rasta biljke, sekundarni metabolizam biljke proizvodi veliku i raznoliku vrstu polifenolnih spojeva koje ju štite od oksidacijskog stresa iz okoliša, odnosno od ultraljubičastog (UV) zračenja i isušivanja. Stoga, polifenolni spojevi predstavljaju sekundarne biljne metabolite te se ubrajaju u biološki aktivne tvari.

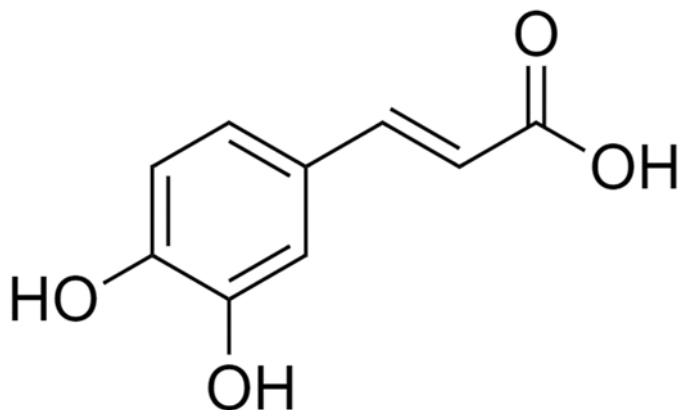
Svi polifenoli spojevi imaju zajedničko obilježje odnosno aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Hidroksibenzojeva kiselina, hidroksicimetna kiselina, flavonoidi, stilbeni i lignani predstavljaju glavnu klasifikaciju polifenolnih spojeva. Nadalje, flavonoidi se dalje mogu dijeliti na flavanole, flavone, izoflavone, antocijanidine i flavanole (Berend i Grabarić, 2008; Hardman, 2014).

Budući da su polifenolni spojevi svakodnevno prisutni u prehrani ljudi, njihova identifikacija i kvantifikacija predstavlja veliki interes znanstvenika te su razvijene pojedine tehnike u tu svrhu. Najčešće primjenjivana tehnika je kromatografija odnosno tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) u kombinaciji s različitim detektorima, ali i u kombinaciji s ostalim tehnikama od kojih se ističe tandemski spektrometrija mase tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koja uvelike povećava učinkovitost identifikacije polifenolnih spojeva iz hrane.

Nadalje, zastupljene su spektrofotometrijske metode i danas sve više se primjenjuju i elektrokemijske tehnike (Walch i sur., 2011; Saikrithika i Kumar, 2020; Khiya i sur., 2021).

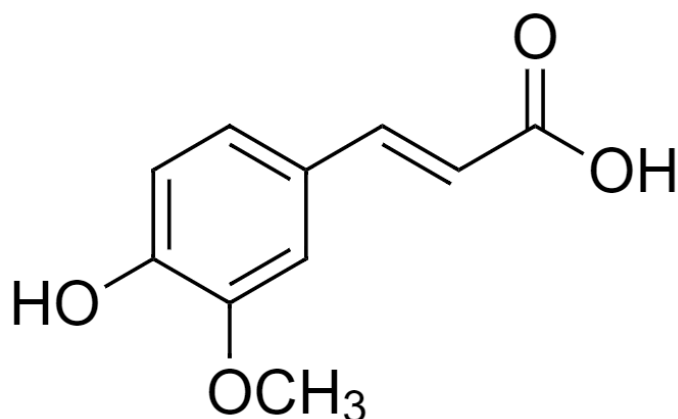
Prema svom kemijskom sastavu biljka kadulja predstavlja bogat izvor polifenolnih spojeva. Udio polifenolnih spojeva razlikuje se ovisno o dijelu godine u kojem se provodi berba (Generalić, 2012). Tako u svibnju, prosječan udio polifenola u kadulji iznosi 41 %, dok u ostalom dijelu godine iznosi 22-23 % (Generalić i sur., 2011). Najveći sadržaj polifenolnih spojeva nalazi se u sušenoj kadulji gdje srednja vrijednost iznosi 2919,7 mg/100g, dok je u svježoj kadulji taj udio znatno manji i iznosi 185 mg/100g, a najmanje su zastupljeni u vodenoj otopini čaja od kadulje, gdje ih ima samo 43,2 mg/100g. Udio polifenola u svježoj i sušenoj kadulji najviše se razlikuje u omjerima kafeinske i ružmarinske kiseline. Svježa kadulja sadrži 7,42 mg/100g kafeinske kiseline i 117,80 mg/100g ružmarinske kiseline, dok sušena kadulja sadrži 26,40 mg/100g kafeinske kiseline i 610,25 mg/100g ružmarinske kiseline (Lu i Foo, 2002).

Do danas je u kadulji identificirano oko 160 polifenolnih spojeva, od kojih su neki karakteristični samo nju. Najzastupljeniji polifenolni spojevi u kadulji su iz skupine hidroksicimetnih kiselina, kafeinska kiselina (**Slika 2**) i njezini izomeri kao što je ružmarinska kiselina (**Slika 4**), zatim ferulična kiselina (**Slika 3**).

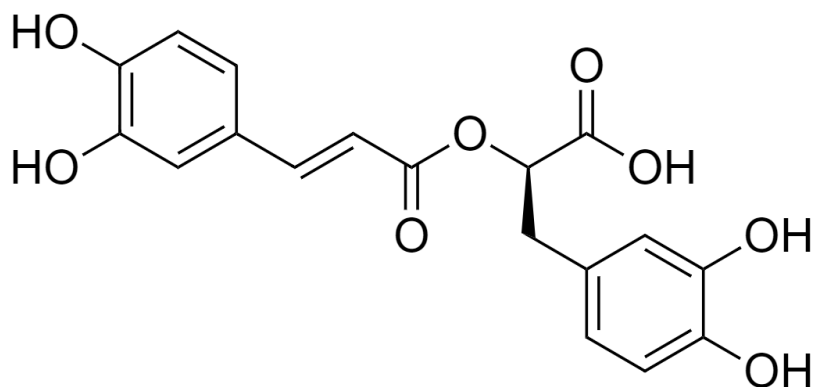


Slika 2 Kafeinska kiselina (Robards i sur., 1999).

Ferulična kiselina (**Slika 5**) se, zajedno s kafeinskom kiselinom, ubraja u skupinu polifenolnih spojeva, hidroksicimetne kiseline. Izolirana je iz bilje komorača, porodice *Apiaceae*, rod *Ferula*, te je po tome dobila i ime. Upotrebljava se u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Najčešće se ferulična kiselina u farmaceutskoj industriji koristi u pripravcima krema za sunčanje i u formulacijama protiv starenja kože jer prema provedenim istraživanjima moguće da utječe na odgađanje procesa starenja kože (Zdunska i sur., 2018).



Slika 3 Ferulična kiselina (Bival Štefan,2015)



Slika 4 Ružmarinska kiselina (WEB 1)

Nadalje, polifenolni spojevi iz skupine flavonoida točnije flavoni, flavonoli i njihovi glikozidi se prema sadržaju ističu u kadulji. Karakteristični flavoni za kadulju su 6-hidroksilirani flavoni (apigenin i luteolin glikozidi).

Polifenolni spojevi u kadulji smatraju se bioaktivnim spojevima i nositeljima mogućeg antioksidativnog učinka. Njihov antioksidativni učinak povezan je s koncentracijom polifenolnih spojeva u samoj biljci. Stoga, polifenolni spojevi iz biljke kadulje predstavljaju antioksidanse. Antioksidansi su molekule koje neutraliziraju slobodne radikale, nestabilne molekule koje mogu oštetiti stanicu bilo biljnu ili ljudsku, a neprestano se stvaraju. Antioksidansi pomažu u usporavanju ili inhibiraju na primjer oksidaciju lipida i kada se dodaju u hranu imaju mogućnost da minimiziraju užeglost, uspore stvaranje toksičnih oksidacijskih proizvoda te na taj način pomažu održavati kvalitetu i produžiti rok trajanja proizvoda. Nadalje, njihova uloga kao prirodnih antioksidansa omogućuje tijelu boriti se protiv velikog broja bolesti (kardiovaskularnih, upalnih, neurodegenerativnih) (Khiya i sur., 2021).

2.3. METODE ODREĐIVANJA POLIFENOLA

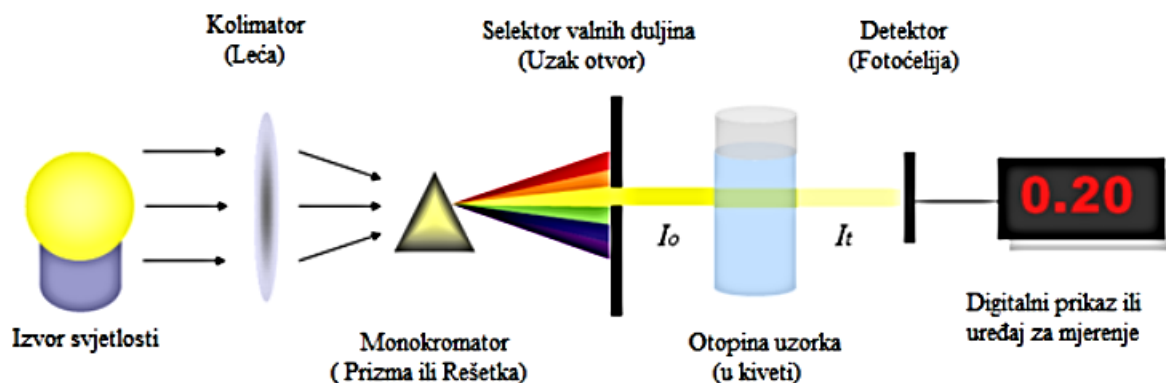
Do danas su razvijene mnoge metode karakterizacije (identifikacije i kvantifikacije) polifenolnih spojeva. Najzastupljenije su kromatografija, spektroskopija i danas sve više popularne elektrokemijske tehnike. Od kromatografskih tehnika najzastupljenija je kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) koja koristi različite detektore ili u kombinaciji s ostalim tehnikama kao što je spektrometrija masa. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti predstavlja tehniku koja se koristi za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju pojedine komponente u smjesi. Smjesa se odvaja pomoću osnovnog principa kromatografije na stupcu, a zatim se identificira i kvantificira spektroskopijom. Računalo analizira podatke i prikazuje izlaz na zaslonu. Detaljnije, HPLC radi prema osnovnom principu tankoslojne kromatografije ili kromatografije na stupcu. Sastoji se od stacionarne i mobilne faze (tekuće ili plinovite). Mobilna faza teče kroz stacionarnu fazu i sa sobom nosi komponente smjese. Različite komponente putuju različitim brzinama ovisno o njihovoj topljivosti u određenom otapalu. Dijelovi uređaja su rezervoar za mobilne faze, kolona, detektor, pumpa i kompjutor s odgovarajućom programskom podrškom (Jakobek Barron, 2017)).

Spektrofotometrija je najčešće korištena spektroskopska metoda koja se temelji na interakciji materije i svjetla, odnosno elektromagnetskog zračenja. Elektromagnetsko zračenje je dvojne prirode, ima svojstva i čestice i vala. Čestica se naziva fotonom i ima količinu energije koja se naziva kvant energije. Raspon energije fotona i odgovarajućih valnih duljina naziva se elektromagnetski spektar.

UV-VIS spektrofotometrija je jeftina, brza, jednostavna i lako dostupna metoda. Ova metoda prati promjenu apsorbancije u području valnih duljina od 200 do 800 nm i daje informacije o strukturi ispitanog analita (Taletović i sur., 2014).

Spektrofotometar je instrument kojim se mjeri količina svjetlosti koju uzorak apsorbira. Sastoji se od izvora zračenja, selektora valnih duljina (filteri, monokromatori), držača uzorka, detektora, sustava za obradu i prikaza podataka (**Slika 5**).

Princip rada spektrofotometra se temelji na Lambert–Beerovom zakonu koji opisuje pojavu apsorpcije svjetlosnog zračenja u otopini. Ovom metodom, može se odrediti koncentracija neke otopine prema intenzitetu boje te otopine, odnosno prema tom zakonu koncentracija otopine direktno je proporcionalna apsorbanciji (Šeruga, 1988).

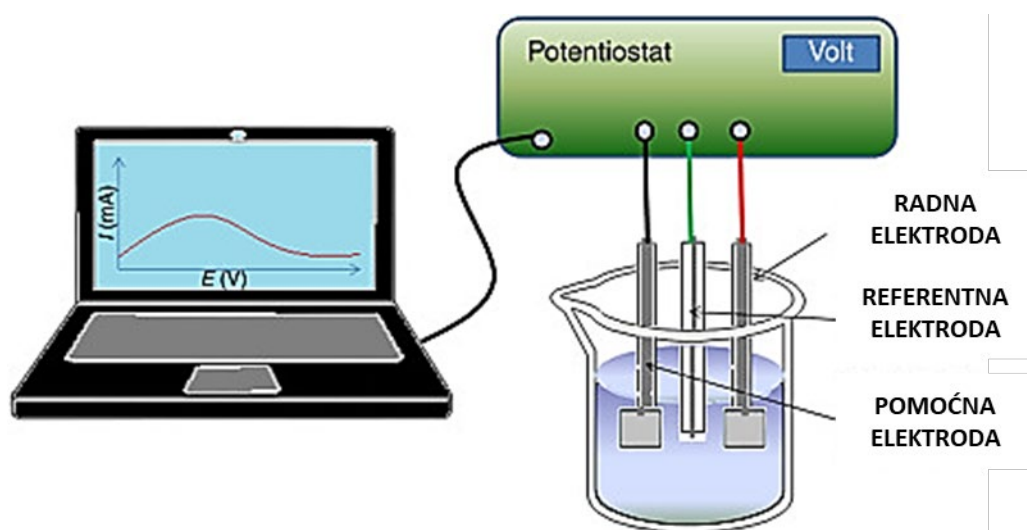


Slika 5 Spektrofotometar (WEB 2)

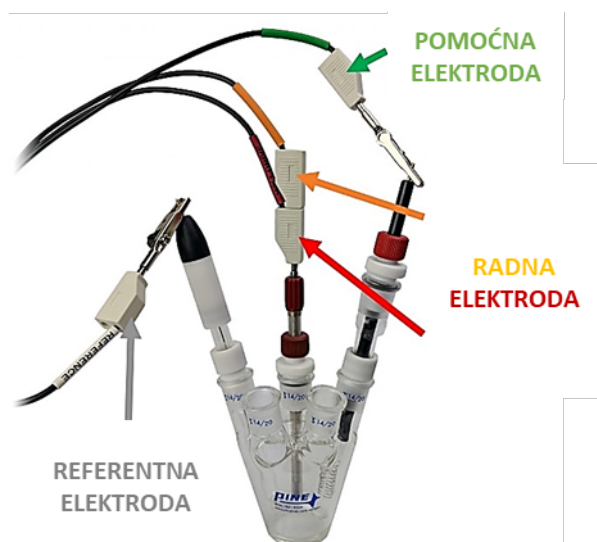
2.3.1. Elektrokemijske tehnike

Elektrokemijske tehnike se ubrajaju u instrumentalne tehnike koje zbog svoje osjetljivosti, točnosti, preciznosti, brzine i selektivnosti su sve zastupljenije u analizi realnih uzoraka. Najzastupljenija elektrokemijska tehnika u analizi realnih uzoraka je voltometrija. Voltometrija predstavlja skupinu elektrokemijskih metoda koje se temelje na mjerenju odnosa struje i potencijala kod elektrokemijskog procesa koji se odvija na površini radne elektrode. Mjerenja se odvijaju u elektrokemijskoj ćeliji, u kojoj se signal pobude izaziva između referentne i radne elektrode, a mjeri se struja koja teče između radne elektrode i pomoćne elektrode. Signal pobude je električni napon, a signal odziva je struja ćelije, a mjeri se kao funkcija narinutog napona (Piljac, 2010). Najčešće se koriste voltometrijske metode (ciklička, diferencijalna pulsna, pravokutnovalna), potenciometrijske i amperometrijske metode (Kilmartin, 2001.). Ono što je zajedničko kod svih voltometrijskih metoda je primjena potencijala (E) na elektrodu te praćenje nastale jakosti struje (I) u elektrokemijskoj ćeliji.

Elektrokemijska ćelija predstavlja troelektrodni sustav što znači da se sastoji od radne, referentne i pomoćne elektrode koje su uronjene u elektrolit (**Slika 7**). Na površini radne elektrode se odvija elektrokemijska reakcija, te joj se potencijal mijenja s vremenom. Referentna elektroda se koristi kao standard za mjerenje potencijala radne elektrode, a to je najčešće srebro/ srebrov klorid (Ag/AgCl), dok pomoćna elektroda omogućuje protok električne struje kroz ćeliju, a to je najčešće platinska žica koja zatvara strujni krug s radnom elektrodom u elektrokemijskoj ćeliji. Grafički prikaz provedenog ciklusa elektrokemijskog mjerenja naziva se voltamogram koji predstavlja ovisnost struje (I) i potencijala (E). Danas u analizi realnih uzoraka najzastupljenije su ciklička, diferencijalno pulsna i pravokutnovalna voltometrija te *stripping* tehnike. Potenciostat je elektrokemijski uređaj za provođenje elektrokemijskih tehnika te je kompjutorski kontroliran (**Slika 6**).



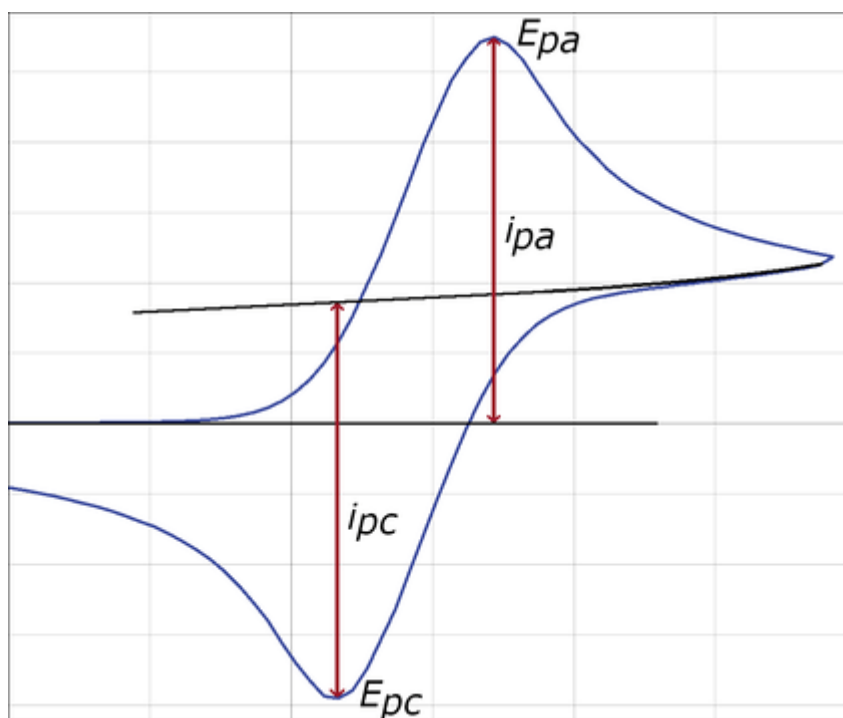
Slika 6 Prikaz kompjutorski kontroliranog potenciostata i elektrokemijske ćelije (WEB 3)



Slika 7 Voltametrijska ćelija (Web 3)

Ciklička voltometrija se ubraja u elektrokemijske tehnike, voltometriju. Najčešće se primjenjuje kao tehnika prvog izbor, a s ciljem karakterizacije elektrokemijske redoks reakcije na površini radne elektrode. Signal pobude je vremenski linearno promjenjivi potencijal radne elektrode, a signal odziva je struja. Potencijal radne elektrode mijenja se linearno konstantnom brzinom (u voltima po sekundi, V/s), te se mjeri protok struje u odnosu na proteklo vrijeme, odnosno potencijal radne elektrode linearno se prati od početne vrijednosti do krajnje vrijednosti i natrag, bilježeći odgovarajući intenzitet struje. Kada se dostigne zadana vrijednost, faza radne elektrode postaje obrnuta i pritom se mjeri struja koja protječe kroz članak. Ova se inverzija može dogoditi više puta tijekom jednog eksperimenta. Promjena potencijala se mijenja u

određenoj točki potencijala, odakle i naziv ciklička voltometrija. Grafički prikaz odziva naziva se ciklički voltamogram (**Slika 8**). Ciklički voltamogram prikazuje ovisnost struje o potencijalu radne elektrode te daje informaciju o potencijalu katodnog i anodnog strujnog pika, ($E_{p,a}$ i $E_{p,k}$), visine struje katodnog i anodnog pika, ($I_{p,a}$ i $I_{p,k}$), te o razlici potencijala strujnih pikova (ΔE_p). Referentna elektroda za vrijeme mjerenja ima konstantan potencijal i pomoću nje se kontrolira potencijal radne elektrode. Pomoćna elektroda omogućava tok struje od izvora kroz otopinu doradne elektrode čiji se potencijal mijenja linearno s vremenom.



Slika 8 Ciklički voltamogram (Web 4)

Pravokutnovalna voltometrija temelji se na brzim promjenama potencijala što omogućava frekvencija od 1 do 100 ciklusa u sekundi te se na taj način skraćuje vrijeme snimanja na nekoliko sekundi. Brzina snimanja je najveća prednost ove metode. Struja se mjeri na stacionarnoj radnoj elektrodi dok je potencijal između radne i referentne elektrode linearan s vremenom. Grafički prikaz sastoji se od velikog broja uzastopnih simetričnih pravokutnika koji predstavljaju signal pobude koji je stepeničasto rastući odnosno padajući. Signal pobude dobiva se kad se niz pravokutnovalnih pulseva doda na stepeničasti signal potencijala (Wang, 2000). Za vrijeme svakog ciklusa, struja se mjeri dva puta, na početku polaznog pulsa i na kraju pulsa suprotnog smjera (Piljac, 2010).

Danas u elektrokemijskim mjerenjima sve veću pažnju dobiva elektrokemijski biosenzor. Biosenzor predstavlja uređaj koji povezuje selektivni biološki element i pretvornik u jednu cjelinu. Uloga biosenzora je pretvoriti biokemijsku reakciju u električni analogni signal koji se može obrađivati. Biosenzor čine pretvornik i bioreceptor. Bioreceptor je imobilizirani osjetljivi

dio biosenzora koji služi za prepoznavanje analita, a pretvornik služi za pretvaranje biokemijskog signala nastalog kao interakcija analita s bioreceptorom u elektronički signal.

Elektrokemijski biosenzori proizvode odzivni signal na temelju interakcije biološkog elementa i ciljanog analita, pri čemu je odzivni signal napon, struja ili vodljivost. Biološki element se imobilizira na površinu radne elektrode.

Znanstvenici danas koriste jednokratne ugljikove elektrode (**Slika 9**) od kojih kreiraju biosenzor koji se priprema nanošenjem tankog sloja biološkog materijala (DNA) na površinu radne elektrode na koju može prethodno biti nanesen sloj nanočestica (ugljkovih, zlatnih).



Slika 9 Komercijalna "Screen Printed" ugljikova elektroda (Web 6)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

- ispitati mogućnost primjene elektrokemijskog DNA biosenzora za određivanje antioksidacijskog učinka polifenola iz čaja kadulje,
- odrediti sadržaj ukupnih polifenola primjenom spektrofotometrijske tehnike i
- primijeniti pravokutnovalnu voltametriju za određivanje antioksidacijskog učinka polifenolnih spojeva iz čaja kadulje.

3.2. MATERIJALI I METODE

Čaj od kadulje, proizvođača OPG Šperanda, kupljen je preko platforme na daljinu Solidarne eko grupe Osijek te je pripremljen za analizu prema uputi navedenoj na deklaraciji. Dvije žličice čaja se preliju s 200 mL kipuće vode i kuha 3 min, poklopi i odstoji 5 min. Čaj od kadulje je pripremljen s destiliranom vodom prema navedenom postupku te je filtriran preko filter papira i čuvan na tamnom. Prije svake analize se pripremao svježi uzorak čaja.

3.2.1. Određivanje antioksidacijskog učinka primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora

Elektrokemijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti kafeinske i ferulične kiseline, (+)-katehina i uzorka čaja od kadulje provedena je korištenjem elektrokemijskog DNA biosenzora primjenom cikličke voltametrije (CV) kao elektrokemijske tehnike kojom su praćene promjene elektrokemijskih parametara redoks sustava $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ u 0,1 mol L⁻¹ PBS pH 7,0 prije i tijekom inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala. Praćeno je oštećenje sloja DNA molekula na površini radne elektrode nastalo djelovanjem OH[•] radikala, kao i antioksidacijski utjecaj polifenolnih spojeva odnosno čaja od kadulje na stupanj oštećenja DNA molekula.

Za pripremu DNA biosenzora pripremljena je otopina dvolančane DNA (dsDNA) koncentracije 1 mg/mL u 0,1 mol L⁻¹ fosfatnom puferu (PBS) pH 7,0. Otopina 0,1 mol L⁻¹ PBS pH 7,0 pripremljena je od fosfatnih soli u Mili-Q vodi. Kao redoks sustav koristio se $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, $c=1 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹, pripremljen od $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ i $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ u 0,1 mol L⁻¹ PBS pH 7,0. Za (stvaranje slobodnih hidroksil radikala (OH[•])) pripremila se smjesa otopine vodikovog peroksida (H_2O_2), $c=2,5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ i otopine CuSO_4 , $c=5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ u PBS pH 7,0. Hidroksil radikali (OH[•]) stvoreni reakcijom između H_2O_2 i Cu^{2+} iona koristili su se za stvaranje oštećenja strukture DNA na površini radne elektrode.

Za elektrokemijska mjerenja antioksidacijske aktivnosti otopina polifenolnih spojeva i čaja od

kadulje korištena je komercijalna jednokratka ugljikova elektroda na koju je nanesen sloj karboksiliranih jednostjenčanih ugljikovih nanočestica (Metrohm DropSens, Španjolska). Elektroda predstavlja tro-elektrodni sustav (radna elektroda SWCNT-COOH/ugljik, pomoćna elektroda sloj ugljika i referenta elektroda i električni kontakt za sve tri elektrode sloj srebra) (**Slika 10**).

Ciklička voltametrija korištena je kao metoda praćenja elektrokemijskih promjena u redoks sustavu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ tijekom oštećenja i regeneracije sloja DNA na površini radne elektrode. Mjerenja su provedena na instrumentu potenciostatu/galvanostatu $\mu\text{Autolab}$ uz korištenje programske podrške GPES verzija 4.9.005 (Eco Chemie BV, Nizozemska). Mjerenja su provedena u stacionarnoj elektrokemijskoj ćeliji volumena 25 mL.

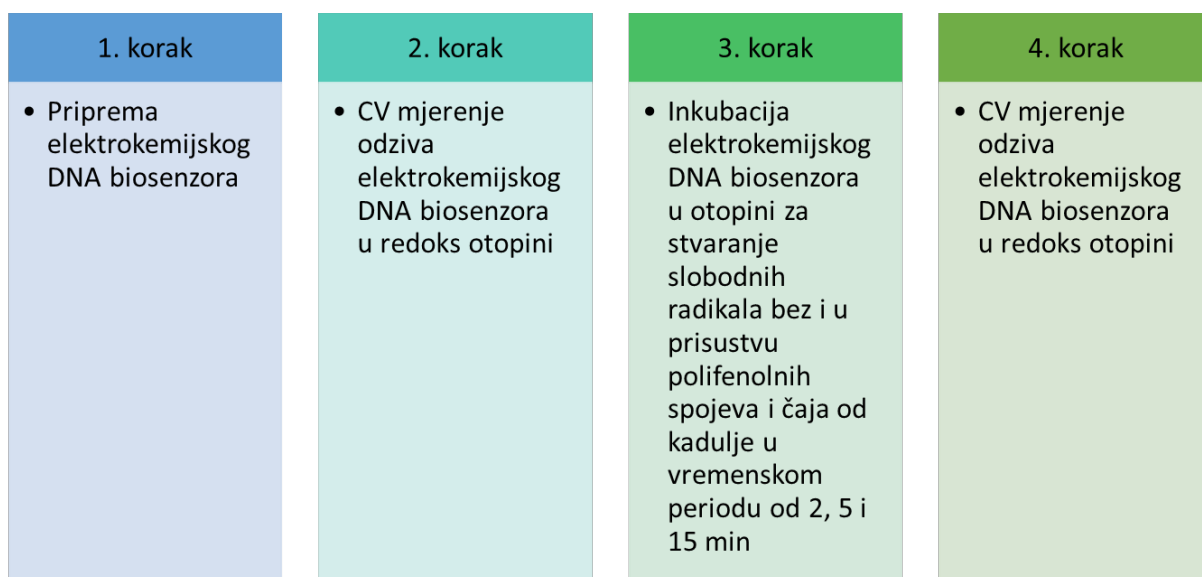
Eksperimentalni uvjeti cikličke voltametrije prikazani su u **Tablici 2**.

Tablica 2 Eksperimentalni uvjeti CV

Uvjeti	DNA/SWCNT	DNA/SWCNT/Fe/polifenolni spojevi iz čaja od kadulje
Početni potencijal	0V	-0,5 V
Konačni potencijal	1,4 V	0,7 V
Korak potencijala	0,005 V	0,005 V
Brzina polarizacije	0,1 V s ⁻¹	0,05 V s ⁻¹

Na elektrodu nanoseno je 50 μL otopine dsDNA koncentracije 1 mg mL⁻¹ i ostavljeno 1h na sobnoj temperaturi. Prije mjerenja standarda i čaja od kadulje provedena je ciklička voltametrija prema eksperimentalnim uvjetima prikazanim u **Tablici 2**, ali bez uranjanja u redoks sustav $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (aktivacija elektrode).

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti otopina standarda i čaja od kadulje primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora pomoću CV, prikazan je na **Slici 10**.



Slika 10 Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti pomoću elektrokemijskog DNA biosenzora

Elektrokemijski parametri praćeni cikličkom voltametrijom su se obradili kako su opisali Ziyatdinova i Labuda (2011.), Hlavata i sur. (2014.) i Tomac i sur. (2020.).

Udio preživjele DNA izražen u postotcima (%), nakon inkubacije elektrokemijskog DNA biosenzora u otopini za stvaranje slobodnih radikala (Cu^{2+} i H_2O_2), s otopinama standarda i čaja od kadulje izražen je kao relativni odziv elektrokemijskog DNA biosenzora, a prikazan je **Jednadžbom (1)**

$$\Delta I_{rel}(\%) = \frac{I_{\text{surv DNA}} - I_{\text{SWCNT}}}{I_{\text{DNA}} - I_{\text{SWCNT}}} \cdot 100 \quad (1)$$

I_{SWCNT} - struja anodnog pika u redoks sustavu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ izmjerenu bez sloja DNA;

I_{DNA} - struja anodnog pika izmjerena u redoks-sustavu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ na elektrodi sa slojem DNA,

$I_{\text{surv DNA}}$, struja anodnog pika izmjerena u redoks-sustavu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ na DNA/SWCNT elektrodi nakon perioda inkubacije u otopini koja sadrži otopinu za stvaranje slobodnih hidroksil radikala, s otopinama standarda i čaja od kadulje.

Rezultati elektrokemijskog određivanja antioksidacijske aktivnosti otopina standarda i čaja od kadulje primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora izraženi su kao % neoštećene DNA.

3.2.2. Pravokutnovalna voltometrija kao metoda praćenja antioksidacijske aktivnosti u uzorku čaja od kadulje

Za praćenje antioksidacijske aktivnosti u uzorku čaja od kadulje primijenila se pravokutnovalna voltometrija kao elektrokemijska tehnika. Kao standard u ovoj tehnici korišten je Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) u rasponu masenih koncentracija od 10 do 100 mg L⁻¹, kao osnovni elektrolit 0,1 mol L⁻¹ H₃PO₄ i 50 % NaOH. Pravokutnovalna voltometrija provela se u troelektrodnoj ćeliji koja se sastojala od radne elektrode od staklastog ugljika, platinske žice kao pomoćne elektrode i Ag/AgCl kao referentne elektrode. Uzorak čaja od kadulje je pripremljen prema postupku opisanom u poglavlju 3.2. te se za ovo ispitivanje koristilo razrjeđenje, *DF* = 10. Uvjeti pravokutnovalne voltetrije su prikazani u **Tablici 3**.

Tablica 3 Uvjeti snimanja pravokutnovalnih voltamograma

Početni potencijal / V	-0,5
Potencijal / V	0,7
Konačni potencijal / V	-0,5
Korak potencijala / mV	5
Brzina polarizacije / mV s ⁻¹	50

3.2.3. Spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola u uzorku čaja od kadulje

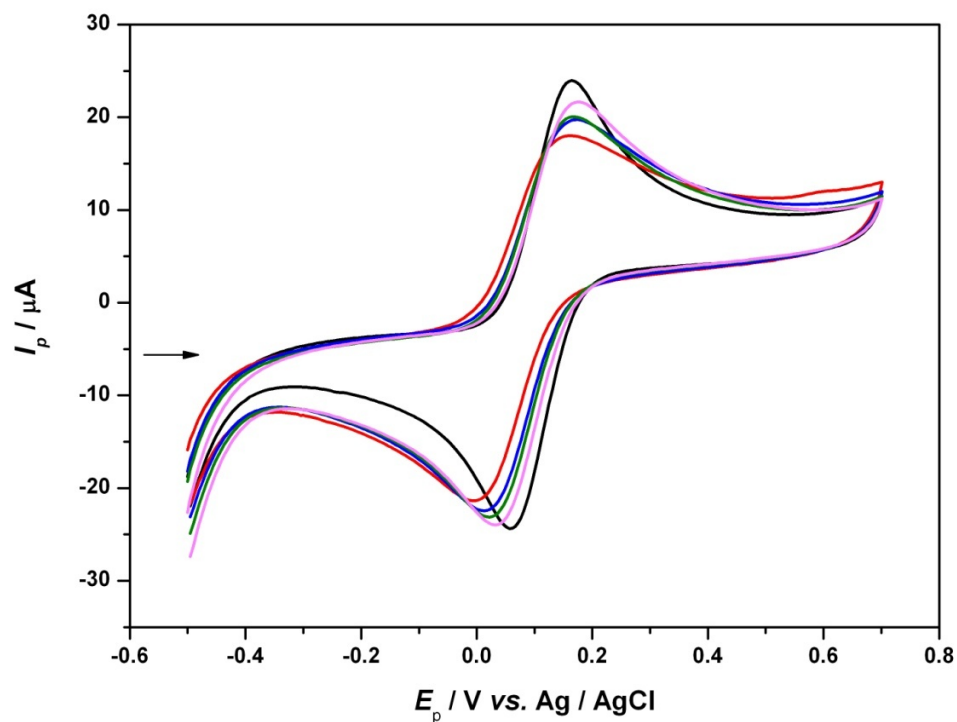
Ovu metodu su izvorno razvili Folin i Ciocalteu 1927. godine. Primjenom ove metode se određuju ukupni polifenoli u nekom realnom uzorku te se temelji na reakciji polifenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom (Folin-Ciocalteu reagens) koji omogućava mjerenja u vidljivom području spektra (Robards i Antolovich, 1997; Magalhaes i sur., 2006). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Mjeri se spektrofotometrom pri valnoj duljini od 765 nm.

Za određivanje ukupnih polifenola u uzorku čaja od kadulje slijedio se propis autora Waterhouse (2002). Pripravile su se različite masene koncentracije galne, kafeinske i ferulične kiseline, te (+)-katehina u rasponu od 10 do 500 mgL⁻¹. Otpipetiralo se 20 µL pripremljenih

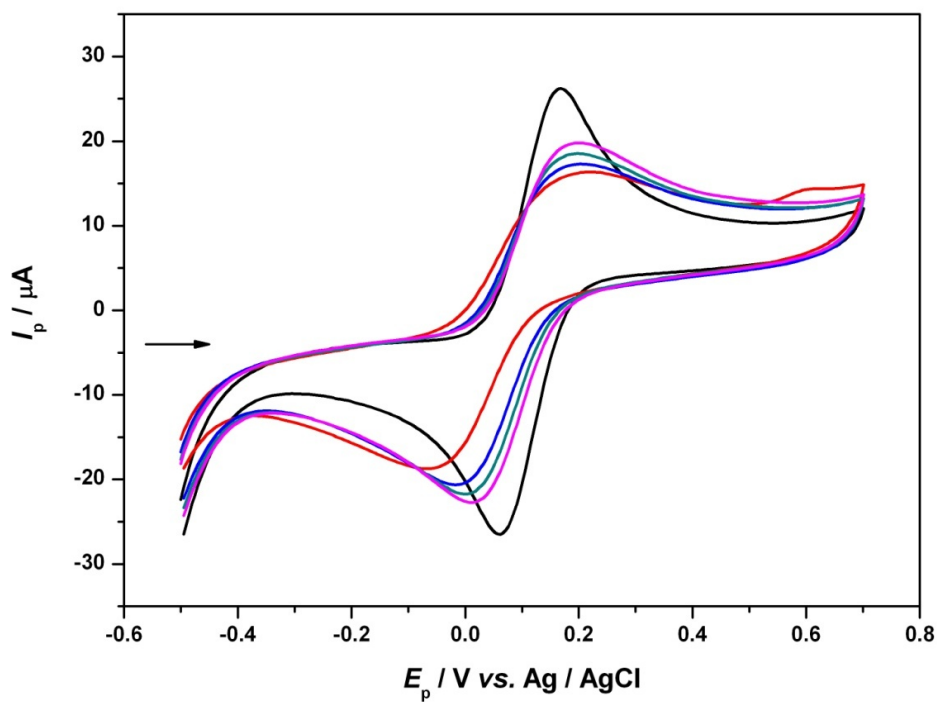
masenih koncentracija galne, kafeinske i ferulične kiseline, 1580 μL destilirane vode, 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 300 μL Na_2CO_3 . Otopine su se inkubirale na 30 °C kroz 40 minuta po isteku vremena su se očitale apsorbancije pri valnoj duljini od 765 nm. Za pojedinu masenu koncentraciju napravljene su tri paralele. Isti postupak je primijenjen za uzorak čaja od kadulje, a s ciljem kvantifikacije sadržaja ukupnih polifenola.

4. REZULTATI

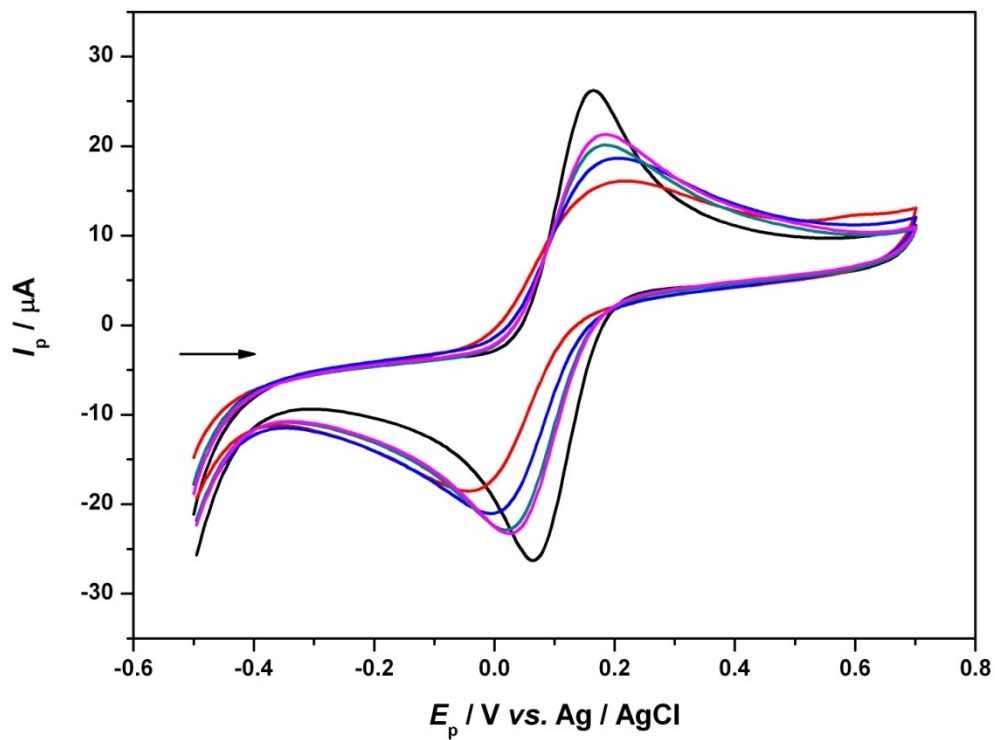
4.1. Određivanje antioksidacijskog učinka primjenom elektrokemijskog DNA biosenzora



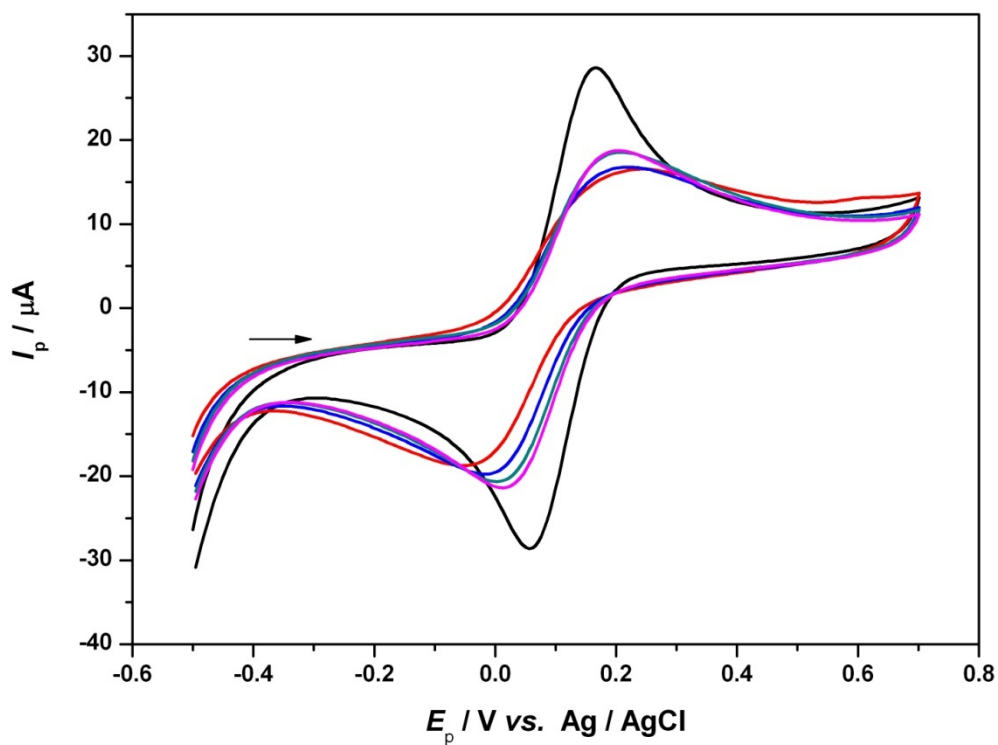
Slika 11 Ciklički voltamogrami $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,0 snimljeni pri brzini polarizacije od 50 mV s^{-1} na DNA/SWCNTCOOH/SPCE prije (—) i nakon inkubacije biosenzora u otopini za stvaranje hidroksil radikala u 2 min (—), 5 min (—), 15 min (—) te čista SWCNT-COOH/SPCE (—)



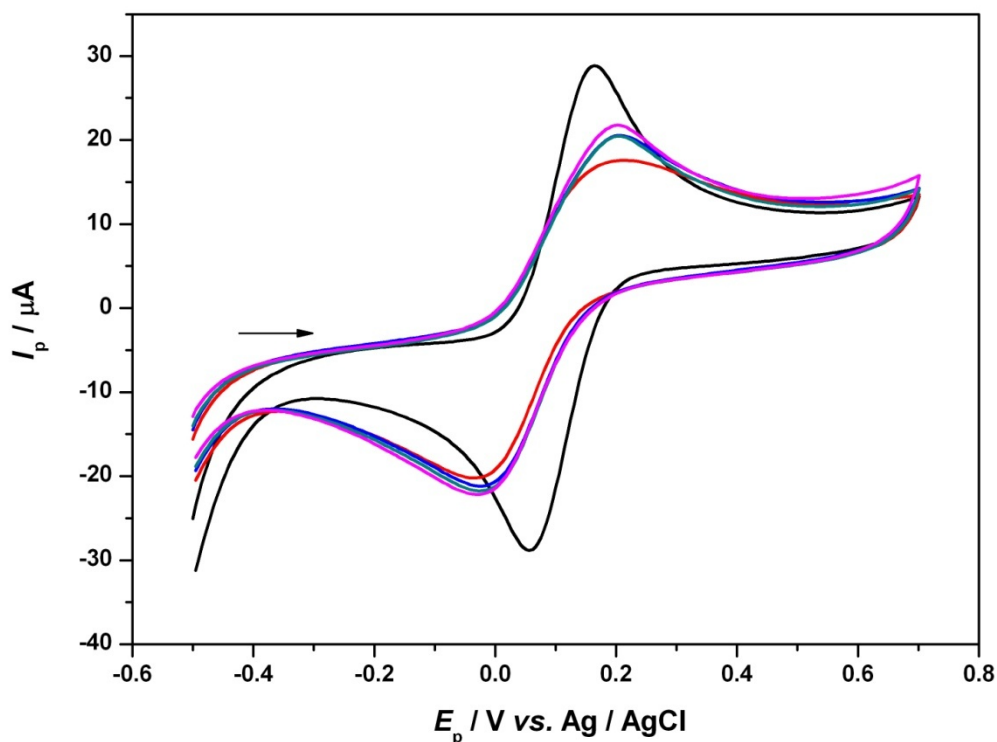
Slika 12 Ciklički voltamogrami $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,0 snimljeni pri brzini polarizacije od 50 mV s^{-1} na DNA/SWCNTCOOH/SPCE prije (—) i nakon inkubacije biosenzora u otopini za stvaranje hidroksil radikala u koju je dodano 50 mg L^{-1} (+)-katehina u 2 min (—), 5 min (—), 15 min (—) te čista SWCNT-COOH/SPCE (—)



Slika 13 Ciklički voltamogrami $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,0 snimljeni pri brzini polarizacije od 50 mV s^{-1} na DNA/SWCNTCOOH/SPCE prije (—) i nakon inkubacije biosenzora u otopini za stvaranje hidroksil radikala u koju je dodano 50 mg L^{-1} ferulične kiseline u 2 min (—), 5 min (—), 15 min (—) te čista SWCNT-COOH/SPCE (—)



Slika 14 Ciklički voltamogrami $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,0 snimljeni pri brzini polarizacije od 50 mV s^{-1} na DNA/SWCNTCOOH/SPCE prije (—) i nakon inkubacije biosenzora u otopini za stvaranje hidroksil radikala u koju je dodano 50 mg L^{-1} kafeinske kiseline u 2 min (—), 5 min (—), 15 min (—) te čista SWCNT-COOH/SPCE (—)

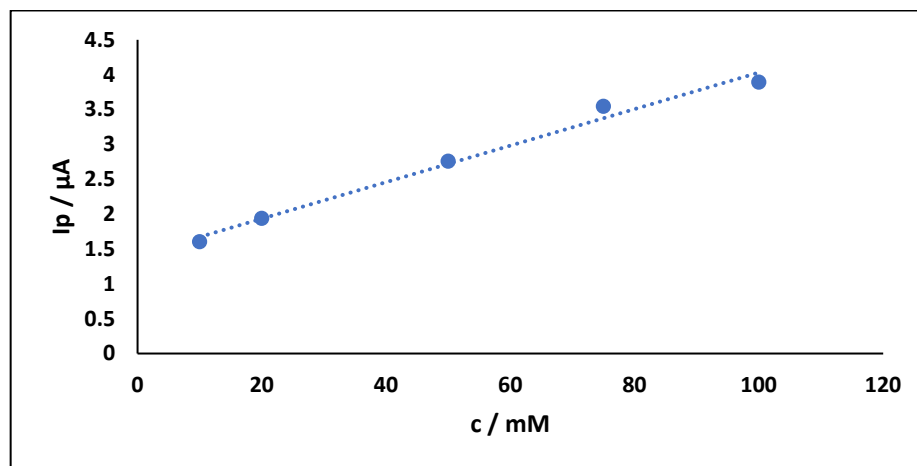


Slika 15 Ciklički voltamogrami $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,0 snimljeni pri brzini polarizacije od 50 mV s^{-1} na DNA/SWCNTCOOH/SPCE prije (—) i nakon inkubacije biosenzora u otopini za stvaranje hidroksil radikala u koju je dodano 1:2 (v/v) čaja od kadulje (DF=2) u 2 min (—), 5 min (—), 15 min (—) te čista SWCNT-COOH/SPCE (—)

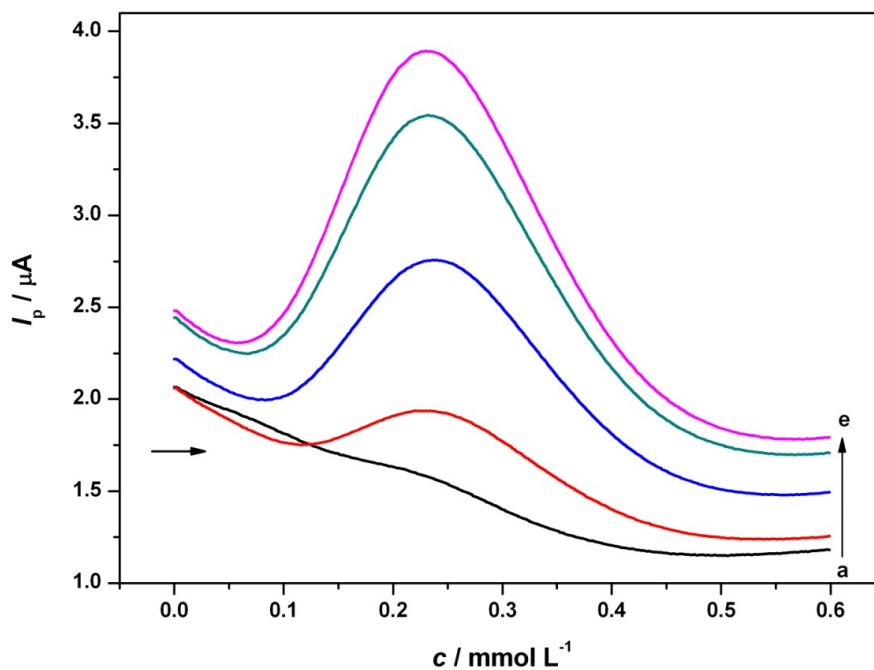
Tablica 4 Antioksidacijski učinak nekih polifenola i čaja kadulje određen elektrokemijskim DNA biosenzorom prema **Slici 11** i uvjetima u **Tablici 2**

Uzorak	Relativni udio preživjele DNA / % $\Delta I_{a,rel}$
Bez antioksidansa	39,06
(+)-Katehin	64,91
Ferulična kiselina	72,87
Kafeinska kiselina	81,67
Čaj od kadulje	62,97

4.2. Pravokutnovalna voltametrija kao metoda praćenja antioksidacijske aktivnosti u uzorku čaja od kadulje

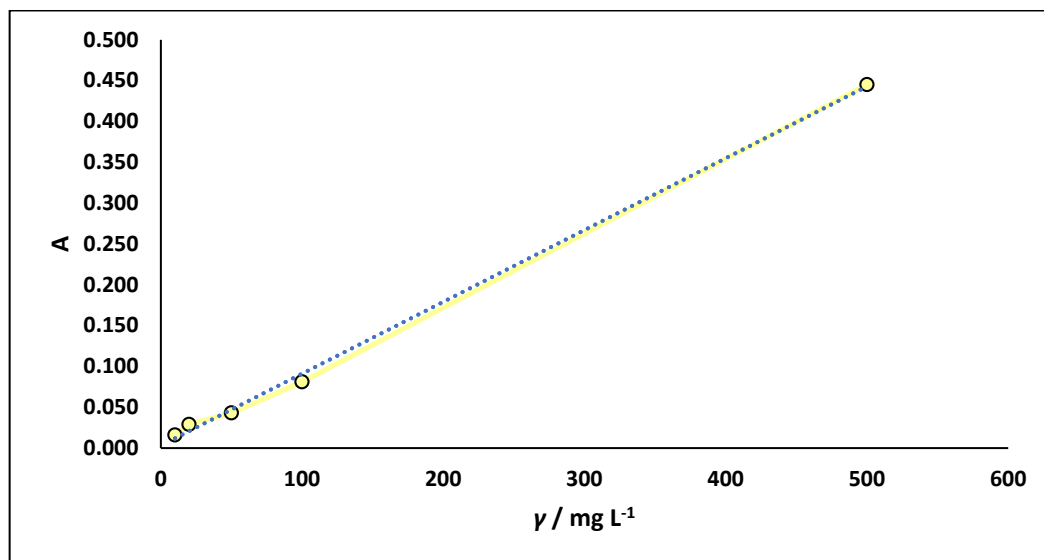


Slika 16 Kalibracijska krivulja Troloxa dobivena primjenom elektrokemijske tehnike pravokutnovalne voltametrije

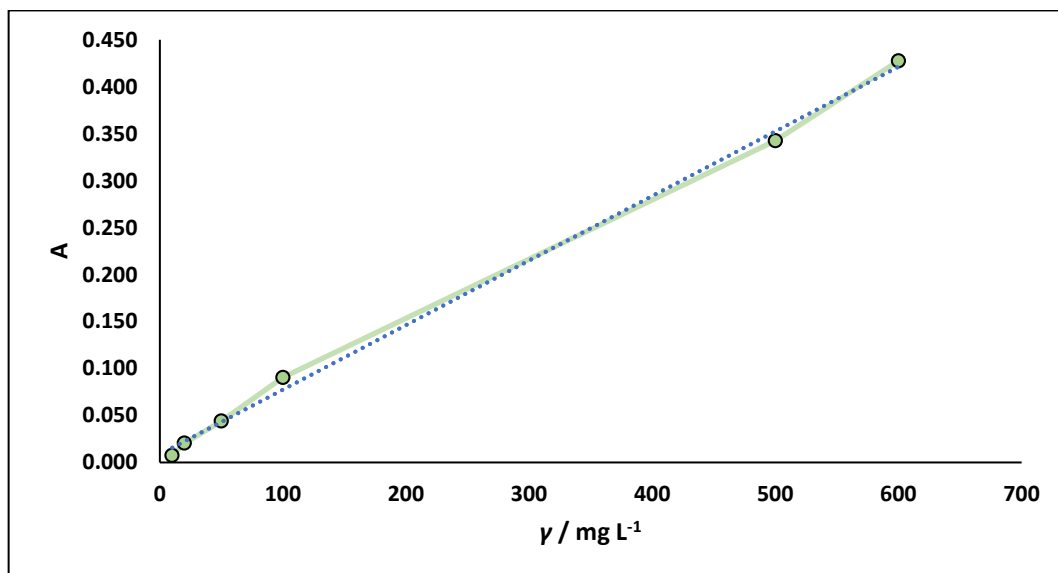


Slika 17 Pravokutnovalni voltamogrami Troloxa slijedećih koncentracija: a – 10 mmol L⁻¹, b - 20 mmol L⁻¹, c - 50 mmol L⁻¹, d - 75 mmol L⁻¹ i e - 100 mmol L⁻¹ snimljeni prema uvjetima u **Tablici 3**

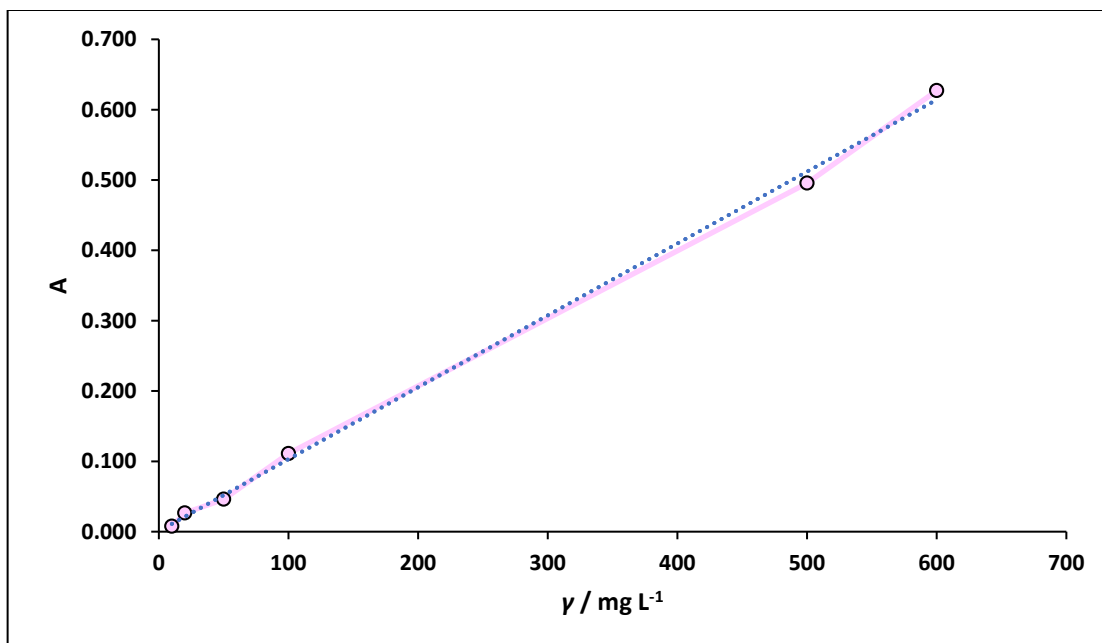
4.3. Spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola u uzorku čaja od kadulje



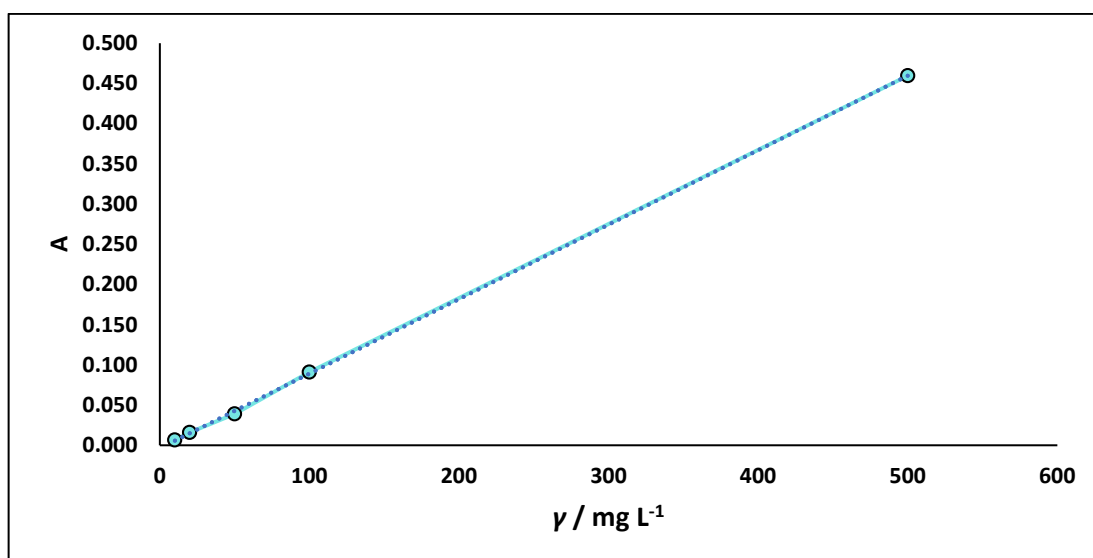
Slika 18 Kalibracijska krivulja (+)-katehina dobivena spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom određivanja ukupnih polifenola



Slika 19 Kalibracijska krivulja ferulične kiseline dobivena spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom određivanja ukupnih polifenola



Slika 20 Kalibracijska krivulja kafeinske kiseline dobivena spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom određivanja ukupnih polifenola



Slika 21 Kalibracijska krivulja galne kiseline dobivena spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom određivanja ukupnih polifenola

Tablica 5 Količina ukupnih polifenola u čaju od kadulje dobivena spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom određivanja ukupnih polifenola

Jednadžba pravca korištena za izračun	Količina ukupnih polifenola u čaju od kadulje
Jednadžba 3	620 mg KE L ⁻¹
Jednadžba 4	789 mg FKE L ⁻¹
Jednadžba 5	701 mg KKE L ⁻¹
Jednadžba 6	628 mg GKE L ⁻¹

5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu primijenio se elektrokemijski DNA biosenzor za određivanje antioksidacijskog učinka polifenolnih spojeva ((+) – katehin, ferulična i kafeinska kiselina) iz uzorka čaja kadulje, a za praćenje antioksidacijskog učinka koristila se elektrokemijska tehnika cikličke voltametrije. S ciljem određivanja sadržaja polifenolnih spojeva u čaju od kadulje primijenila se standardna spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola te u svrhu određivanja moguće antioksidacijske aktivnosti čaja od kadulje primijenila se elektrokemijska tehnika pravokutnovalna voltametrija.

Antioksidacijski učinak polifenolnih spojeva, (+)-katehina, ferulične i kafeinske kiseline iz uzorka čaja od kadulje određen je pomoću elektrokemijskog DNA biosenzora, a učinak se pratio primjenom elektrokemijske tehnike cikličke voltametrije. Ciklički voltamogrami $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,0 snimljeni pri brzini polarizacije od 50 mV s^{-1} na elektrokemijskom DNA biosenzoru prije i nakon inkubacije biosenzora u otopini za stvaranje hidroksil radikala (**Slika 11**), ispitanih polifenolnih spojeva (**Slike 12-14**) i uzorka čaja kadulje (**Slike 15**) kroz vremenski period od 15 minuta. Iz cikličkih voltamograma uočava se promjena u strukturi DNA molekule uslijed dodatka otopine za stvaranje hidroksil radikala, polifenolnih spojeva i čaja od kadulje. Promjene u strukturi DNA molekule mogu nastati djelovanjem kemijskih tvari, utjecaja iz okoline te slobodnih radikala (Dizdaroglu i Jaruga, 2012.). Iz cikličkih voltamograma uočava se da se razlika između potencijala anodnog i katodnog pika raste, a strujni odziv opada. Na osnovi teorijskih spoznaja elektrokemije, to ukazuje da se na površini elektrokemijskog DNA biosenzora se odvijaju promjene koje otežavaju prolaz elektrona prema površini biosenzora (Tomic i sur., 2020). Odnosno porast struja rezultat je djelovanja slobodnih radikala i djelomičnog oštećenja strukture DNA sloja. S ciljem izražavanja stupnja antioksidacijskog učinka ispitivanih polifenolnih spojeva i čaja od kadulje primjenom **Jednadžbe 1** izračunali su se postotci relativnog smanjenja strujnog odziva anodnih pikova preživjele DNA na površini DNA biosenzora nakon 15 minuta inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala ($\Delta I_{rel}/\%$). Rezultati provedene analize prikazani su u **Tablici 3**. Iz vrijednosti prikazanih u **Tablici 4** uočava se da najveći postotak preživjele DNA odnosno stupanj neoštećenja nakon inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala pokazuje otopina kafeinske kiseline (81,67 %), zatim slijedi otopine ferulične kiseline (72,87 %), zatim (+)-katehin (oko 64,91 %) i naposljetku čaj od kadulje (oko 62,97 %). Stoga se može zaključiti da najjače antioksidacijsko djelovanje od svih ispitivanih polifenolnih spojeva ima kafeinska kiselina, dok najmanji stupanj (+)-katehin. Usporedbom postotka preživljavanja DNA u otopini za stvaranje slobodnih radikala s otopinom polifenolnih spojeva i uzorka čaja od kadulje prikazanog u **Tablici 4** s postotkom preživljavanja DNA u otopini za stvaranje slobodnih radikala bez prisustva polifenolnih spojeva i čaja od kadulje uočava se da je antioksidacijski učinak ispitanih

otopina i uzorka visoka jer je postotak preživljavanja DNA blizu 100%. Ova tehnika do sada nije primijenjena na uzorak čaja od kadulje te je iz toga razloga provedena pravokutnovalna voltometrija uz primjenu Trolox otopine kao standarda i standardna spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda određivanja ukupnih polifenola.

Pravokutnovalna voltometrija je provedena prema eksperimentalnim parametrima iz **Tablice 3**. Kao standard u ovoj metodi korištena je otopina Troloxa. S ciljem određivanja antioksidacijskog učinka uzorka čaja od kadulje kreirana je kalibracijska krivulja u rasponu koncentracija od 10 do 100 mmol L⁻¹ Troloxa (**Slika 17**). Pripadajući pravokutnovalni voltamogrami koncentracija 10 - 100 mmol L⁻¹ Troloxa na osnovi čijih ukupnih strujnih odziva je kreirana kalibracijska krivulja prikazani su na **Slici 17**. Na **Slici 17** uočava se linearno rastući strujni odziv povećanjem koncentracije te **Jednadžba 2** glasi

$$I_p(\mu A) = 0,0262c(\text{mmolL}^{-1}) + 1,4101 \quad (2)$$

Koeficijent korelacije, R^2 , iznosi 0,9862. Ovom tehnikom određen je iznos antioksidacijskog učinka kao mmol Trolox ekvivalenta L⁻¹ (mmolTE L⁻¹) te iznosi 212,11 mmolTE L⁻¹.

Nadalje, određen je sadržaj ukupnih polifenola spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom s ciljem kvantifikacije ukupnih polifenola. Udio polifenola je izražen kao mg (+)-katehina, kafeinske i ferulične kiseline L⁻¹ (mg KE, KKE, FKE, GKE L⁻¹). Kreirane su kalibracijske krivulje u rasponu koncentracija od 10 do 500 mg L⁻¹ za (+)-katehin, feruličnu, kafeinsku i galnu kiselinu (**Slike 18-20**). Na **Slikama 18-20** uočava se linearna ovisnost apsorbancije povećanjem masene koncentracije te su dobivene slijedeće ovisnosti za (+)-katehin, feruličnu, kafeinsku i galnu kiselinu (**Jednadžbe 3-6**):

$$A = 0,0009\gamma(\text{mg L}^{-1}) + 0,0032 \quad (3)$$

i R^2 iznosi 0,9984,

$$A = 0,0007\gamma(\text{mg L}^{-1}) + 0,0088 \quad (3)$$

i R^2 iznosi 0,9977,

$$A = 0,0001\gamma(\text{mg L}^{-1}) + 0,0008 \quad (3)$$

i R^2 iznosi 0,9984 te

$$A = 0,0009\gamma(\text{mg L}^{-1}) - 0,0036 \quad (3)$$

i R^2 iznosi 0,9999.

Količina ukupnih polifenola prikazana je u **Tablici 5**. Prema sadržaju ukupnih polifenola, a izraženih zasebno kao (+)-katehin, ferulična, kafeinska i galna kiselina ekvivalenti, čaj od kadulje sadržava u rasponu od 620 do 789 mg L⁻¹ što je u skladu s proučenom literaturom (Lu i Foo, 2002; Khiya i sur., 2019).

6. ZAKLJUČAK

Na osnovi ovog diplomskog rada može se zaključiti:

- Kadulja je izvor polifenolnih spojeva, a ponajprije kafeinske, ružmarinske i ferulične kiseline.
- Provedenim određivanjem antioksidacijskog učinka pomoću elektrokemijskog DNA biosenzora i cikličke voltametrije uočava se da najveći postotak preživjele DNA odnosno stupanj neoštećenja nakon inkubacije u otopini za stvaranje slobodnih radikala pokazuje otopina kafeinske kiseline (81,67 %), zatim slijedi otopine ferulične kiseline (72,87 %), zatim (+)-katehin (oko 64,91 %) i naposljetku čaj od kadulje (oko 62,97 %).
- Primjenom pravokutnovalne voltametrije uz otopinu Troloxa kao standarda u ovom istraživanju dobiveno je da uzorak čaja od kadulje ima antioksidacijski učinak koji iznosi 212,11 mmolTE L⁻¹.
- Prema sadržaju ukupnih polifenola, a izraženih zasebno kao (+)-katehin, ferulična, kafeinska i galna kiselina ekvivalenti, čaj od kadulje sadržava u prosjeku 704,5 mg L⁻¹.

7. LITERATURA

- Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. Arh Hig Rada Toksikol, 2008, 59, 205-212.
- Bival Štefan M. Biološki učinci fenolnih kiselina iz odabranih vrsta porodice Lamiaceae. Doktorski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015.
- Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J: The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition* 5:87, 2018.
- Dizdaroglu M, Jaruga P: Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46:382-419, 2012.
- Dubravec D, Dubravec K: Biljne vrste livada i pašnjaka. Školska knjiga, Zagreb, 2001.
- Generalić I, Skroza D, Ljubenković I, Katalinić A, Burčul F, Katalinić V: Influence of the phenophase on the phenolic profile and antioxidant properties of Dalmatian sage. *Food Chemistry* 127:427-433, 2011.
- Generalić I, Skroza D, Šurjak J, Možina S.S, Ljubenković I, Katalinić A, Katalinić V: Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & Biodiversity* 9:441-457, 2012.
- Hardman WE: Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutrition Research and Practice* 8:233-240, 2014.
- Hlavata L, Vyskočil V, Benikova K, Borbelyova M, Labuda J: DNA-based biosensors with external Nafion and chitosan membranes for the evaluation of the antioxidant activity of beer, coffee and tea. *Central European Journal of Chemistry*, 12:604-611, 2014.
- Jakobek Barron L: Nastavni materijali iz kolegija Instrumentalne metode II. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.
- Kamatou G.P, Viljoen A.M, Steenkamp P: Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry* 119:684- 688, 2010.
- Khiya Z, Hayani M, Gamar A, Kharchouf S, Amine S, Berrekhis F, Bouzoubae A, Zair Z, El Hilali F: Valorization of the *Salvia officinalis* L. of the Morocco bioactive extracts: Phytochemistry, antioxidant activity and corrosion inhibition. *Journal of King Saud University – Science* 31:322-335, 2019.
- Khiya Z, Oualcadi Y, Gamar A, Berrekhis F, Zair T, El Hilali F: Correlation of Total Polyphenolic Content with Antioxidant Activity of Hydromethanolic Extract and Their Fractions of the *Salvia officinalis* Leaves from Different Regions of Morocco. *Journal of Chemistry* 8585313, 2021.
- Kilmartin PA: Electrochemical detection of Natural Antioxidants: Principles and Protocols.

- Antioxidants and Redox Signaling 3:941-955, 2001.
- Labuda J, Brett AMO, Evtigyn G, Fojta M, Mascini M, Ozsoz M, Palchetti I, Palček E, Wang J: Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts terms and methodology (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 82:1131-1187, 2010.
- Lu Y, Foo Ly: Polyphenolic of Salvia- a review. Phytochemistry 59:117-40, 2002.
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL, Rangel AO: Automatic method for the determination of Folin–Ciocalteu reducing capacity in food products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 5241–5246, 2006.
- Nikolić T: Flora Croatica baza podataka. Botanički zavod, Zagreb, 2005.
- Piljac I. Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2010.
- Robards K, Antolovich M: Analytical chemistry of fruit bioflavonoids a review. Analyst 122: 11R–34R, 1997.
- Robards K, Prenzler P.D, Tucke G, Swatsitang P, Glover W: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry 66: 401-436, 1999.
- Saikrithika S, Kumar AS: Electrochemical Detections of Tea Polyphenols: A Review. Electroanalysis, 32:2343-2360, 2020.
- Singleton V.L, Orthofer R, Lamela-Raventós R.M: Flavanoids and other polyphenols. Methods in Enzymology 299, 152, 1999a.
- Singleton V.L, Orthofer R, Lamela-Raventós R.M: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299, 1179, 1999b.
- Šeruga M: Laboratorijske vježbe iz fizikalne kemije. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 1988.
- Taletović A, Banjanin B, Poljaković M, Srabović M, Vuković S: Optimizacija izolacije, identifikacija kofeina iz različitih supstrata. Magistarski rad. Farmaceutsko zdravstveni fakultet, Travnik, 2014.
- Tomac, I; Šeruga, M; Labuda, J: Evaluation of antioxidant activity of chlorogenic acids and coffee extracts by an electrochemical DNA-based biosensor. Food chemistry, 325, 126787, 2020.
- Trinajstić I: Endemi hrvatske flore: Ljekovita kadulja – *Salvia officinalis* L.: endemična, ljekovita, medonosna i ukrasna biljka. Priroda 9/10=782/783: 34-36, 1992.

- Walch S, Tinzoh LN, Zimmermann BF, Stühlinger W, Lachenmeier DW: Antioxidant Capacity and Polyphenolic Composition as Quality Indicators for Aqueous Infusion of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *Front Pharmacol* 2:79, 2011.
- Wang J: *Analytical Electrochemistry*. Wiley-WHC Publishers, New York, 2000.
- WEB 1: <https://www.selleckchem.com/products/rosmarinic-acid.html> (preuzeto 21.9.2022.)
- WEB 2:
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry) (preuzeto 21.9.2022.)
- WEB 3: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/potentiometry> (preuzeto 21.9.2022.)
- WEB 4: <https://pineresearch.com/shop/kb/applications/rde-and-rrde/three-electrode-setups/> (preuzeto 21.9.2022.)
- WEB 5: <https://www.ossila.com/pages/cyclic-voltammetry-applications> (preuzeto 21.9.2022.)
- WEB 6: https://www.metrohm.com/fi_fi/discover/blog/20-21/trace-metal-analysis-with-solid-state-electrodes---part-4.html (preuzeto 21.9.2022)
- Willfort R: *Ljekovito bilje i njegova upotreba*. Erudit Zagreb, Zagreb, 2002.
- Zdunska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztejn H: Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacology and Physiology* 31:332–336, 2018.
- Zhang L, Han Z, Granato D: Polyphenols in foods: Classification, methods of identification, and nutritional aspects in human health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1043-4526, 2021.
- Ziyatdinova G, Labuda J: Complex electrochemical and impedimetric evaluation of DNA damage by using DNA biosensor based on a carbon screen-printed electrode. *Analytical Methods* 3:2777-2782, 2011.