

VARIJACIJE U SADRŽAJU FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI SVJEŽIH I OSUŠENIH LISTOVA RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis* L.) S OBZIROM NA PROVENIJENCIJU – PODRUČJE MOSTARA, BOSNA I HERCEGOVINA

VARIATIONS IN THE PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF FRESH AND DRIED ROSEMARY LEAVES (*Rosmarinus
officinalis* L.) WITH REGARD TO PROVENANCE – THE AREA
OF MOSTAR, BOSNIA AND HERZEGOVINA

Dženita ALIBEGIĆ^{1*}, Esmera KAJTAZ¹, Haris NIKŠIĆ¹, Željko ŠPANJOL², Boris DORBIĆ³

SAŽETAK

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi antioksidacijsku aktivnost i sadržaj ukupnih fenola svježeg i osušenog lista ružmarina s obzirom na provenijenciju iz urbane i ruralne sredine, te usporediti dobivene rezultate s rezultatima komercijalnog uzorka. Listovi biljnog materijala *R. officinalis* skupljeni su tijekom svibnja i lipnja 2024. god. u ljetnom/sunčanom periodu. Homogenizirani uzorak podvrgnut je maceraciji na sobnoj temperaturi uz uporabu destilirane vode i 70%-tne otopine etanola. Ukupni sadržaj fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidacijska aktivnost procijenjena je DPPH „scavenging“ metodom te izražena primjenom standarda Trolox-a kao ekvivalenta ($\mu\text{mol TE/g}$). Udio ukupnih fenola kretao se od $36,11 \pm 0,96$ do $233,07 \pm 1,66$ mg GAE/g, ovisno o vrsti korištenog otapala i stanja biljnog materijala. Na temelju prikupljenih podataka može se zaključiti da se primjenom 70% etanola značajno povećava učinkovitost ekstrakcije ukupnih fenola iz ružmarina. Najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti imali su etanolni ekstrakti ($712,70 \pm 1,90$ – $934,06 \pm 0,77$ $\mu\text{mol TE/g}$), bez obzira na provenijenciju biljnog materijala urbane/ruralne sredine i stanja uzorka (suhi/svježi). Vodeni ekstrakti pokazuju niže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, bez obzira na provenijenciju i stanje uzorka ($164,13 \pm 4,04$ do $247,30 \pm 3,56$ $\mu\text{mol TE/g}$), pri čemu se ističe vodeni ekstrakt komercijalnog uzorka ($867,70 \pm 1,98$ $\mu\text{mol TE/g}$). Primjenom One-Way ANOVA testa ustanovljeno je da nema razlike u antioksidacijskoj aktivnosti uzoraka u odnosu na provenijenciju iz urbane/ruralne sredine ($0,317 > 0,05$), ali ta razlika postoji kada je u pitanju sadržaj ukupnih fenola analiziranih uzoraka ($0,015 < 0,05$). Rezultati t-testa ukazuju na postojanje razlike u antioksidacijskoj aktivnosti analiziranih uzoraka s obzirom na uporabu različitog otapala u procesu ekstrakcije ($0,013 < 0,05$), ali ne i za sadržaj ukupnih fenola ($0,137 > 0,05$).

KLJUČNE RIJEČI: ružmarin, fenoli, antioksidacijska aktivnost, provenijencija.

¹ Dženita Alibegić, studentica, Esmera Kajtaž, studentica, prof. dr. sc. Haris Nikšić, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Bosna i Hercegovina

² Prof. dr. sc. Željko Španjol, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Zagreb

³ Izv. prof. dr. sc. Boris Dorbić, Sveučilište u Splitu, Samostalni studij Mediteranska poljoprivrede, Split

* dopisni autor: Dženita Alibegić, email: dz.alibegic@gmail.com

UVOD INTRODUCTION

Ljekovite biljke čine posebnu skupinu biljaka koje sadrže različite biološki aktivne spojeve kao što su eterična ulja, alkaloidi, flavonoidi, saponini, tanini, vitamini, polisaharidi, organske kiseline, smole i druge tvari. Ove tvari imaju značajan utjecaj na ljudski organizam te se mnoge biljne vrste zbog svojih svojstava koriste u medicini, farmaceutskoj industriji (uključujući galenske laboratorije) (González-Minero i sur., 2020), kao i u prehrambenoj industriji za proizvodnju čajeva i začina (Ivanišová i sur., 2021) te u drugim prerađivačkim sektorima. Kada je u pitanju uzgoj i samonikli rast aromatičnog i ljekovitog bilja, neizostavno je spomenuti utjecaj geografskih, pedoloških i prirodnih uvjeta. Raznolikost reljefnih i klimatskih obilježja doprinijeli su prisutnosti velikog broja aromatičnih i ljekovitih biljnih vrsta na prostoru Mediterana, među kojima važno mjesto zauzima i ružmarin (Roša, 2010). Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je biljna vrsta iz porodice *Lamiaceae* (Carrubba i sur., 2020). Spontano raste na planinama, liticama i kamenitim mjestima, u blizini mora, posebice u mediteranskom području, a rasprostranjena je u Africi, Europi i Aziji (Komppely i sur., 2019). Danas je raširen u mnogim vegetacijskim zajednicama duž područja eumediteranske, a posebno stenomediteranske vegetacijske zone.

Na našim prostorima zajednice ružmarina su sasvim udomaćene i pripadaju bušicama zapadnomediteranskih zajednica ružmarina (red. *Rosmarinetalia*) (Kovačić i sur., 2008).

Bušici

Razred: *Erico-Cistetea* Trinajstić (1978) 1985.

Sredozemni bušici na bazičnoj podlozi

Red: *Rosmarinetalia* Br.-Bl. 1931 em. 1951

Zapadnomediteranski bušici ružmarina

Sveza: *Rosmarino-Ericion manipuliflorae* Br.-Bl. 1931 (Trinajstić, 1990)

***Erico manipuliflorae-Rosmarinetum* H-ić 1958**

Bušik ružmarina s mnogocvjetnom resikom).

Bušik ružmarina rasprostranjen je u svom tipičnom obliku u sastavu stenomediteranske vegetacijske zone mediteransko-litoralnog vegetacijskog pojasa na otocima Hvaru, Visu, Biševu i Svecu. U oskudnijoj formi javlja se i na otocima Braču i Lastovu. U florističkom sastavu bušika javljaju se sljedeće vrste: *Rosmarinus officinalis*, *Erica multiflora*, *Cistus monpelienis*, *Cistus incanus*, *Cistus salvifolius*, *Fumana laevipes*, *Fumana arabica*, *Ononis minutissima* i druge (Trinajstić, 1998, 2008; Vukelić, 2012).

Ljekoviti dijelovi ružmarina su: cvijet (*Rosmarini flos*), izdanci u cvatu (*Rosmarini herba*), list (*Rosmarini folium*) i eterično ulje (*Rosmarini aetheroleum*). Najčešće se koriste njegovi listovi. Ružmarin može doseći visinu od približno

1 m do 2,5 m. Stabljike su četverokutne uspravne i imaju tendenciju lignificiranja u drugoj godini. Gusto su prekrivene sitnim, igličastim listovima bez peteljki. Listovi su linearni, s cijelim, blago zaokrenutim rubovima koji su odozgo tamnozeleni, a odozdo svjetliji. Ružmarin cvjeta od početka lipnja do kolovoza. Cvjetovi su vrlo mali, bijeli ili ljubičastoplavi, skupljeni u terminalne grozdaste cvatove (Pawłowska i sur., 2020). Ružmarin je aromatična biljna vrsta izražene antioksidacijske aktivnosti zahvaljujući relativno visokom sadržaju fenolnih spojeva (Ou i sur., 2018). Ružmarin se može koristiti u svježem stanju, osušen u obliku eteričnog ulja ili ekstrakta. Kao ukrasna biljna vrsta često se koristi u hortikulturi prilikom uređenja zelenih površina i park šuma na Mediteranu (Dorbić i Temim, 2018; Gašparović i sur., 2022). Ružmarin može inducirati različite farmakološke učinke zbog interakcije između njegovih molekula i organskih sustava. Učinci koje pokazuje ova biljka uključuju sposobnost ublažavanja: astme, ateroskleroze, antioksidacijsko i protuupalno djelovanje ružmarinske kiseline, kontrola hiperkolesterolemije i oksidativnog stresa te ublažavanje fizičkog i mentalnog umora, antiulkusno djelovanje. Ružmarin je poznat po svom antivirusnom i antimikrobnom djelovanju, kao i po svojoj sposobnosti da ublaži depresivno ponašanje. (Oliveira i sur., 2019). Njegove aktivne tvari kao na primjer carnosol koji je fenolni diterpenoid koji ima protuupalno, antitumorsko i antioksidacijsko djelovanje (Lee i Im, 2021). Ružmarinska kiselina ima širok spektar farmakoloških učinaka: antioksidacijsko, antiapoptotičko, antitumorsko i antiinflamatorno djelovanje (Luo i sur., 2020). Spojevi koji imaju antioksidacijsko djelovanje iz ekstrakta ružmarina i eteričnog ulja ružmarina mogu usporiti oksidaciju lipida u biološkim sustavima, kao i u prehrambenim proizvodima. Prema istraživanju Nieto i sur. (2018) antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje ružmarina uveliko ovisi o fazi plodonošenja, prirodi ekstrakta, kao i načinu ekstrakcije, prisutnosti inhibitora te sinergističkom učinku s drugim komponentama, kao i koncentraciji aktivnog ekstrakta. Ružmarin i njegovi proizvodi nalaze široku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj te kozmetičkoj industriji. Ružmarin se ponajprije koristi zbog svog eteričnog ulja i visokog udjela fenolnih spojeva koji pokazuju bioaktivna svojstva poput antioksidativnog, antifungalnog, antibakterijskog i protuupalnog djelovanja, a sve to pozitivno utječe na ljudsko zdravlje. Prema Irakli i sur. (2023) antioksidacijski i fenolni spojevi iz ružmarina poboljšavaju obranu organizma i ublažavaju oksidativni stres. Ružmarinov čajni oparak povoljno djeluje na detoksikaciju organizma (Dorbić i sur., 2022). Osim blagotvornog učinka na zdravlje ljudi, potražnja prehrambene industrije za prirodnim antioksidansima i konzervansima čini fenolne ekstrakte ružmarina atraktivnim i funkcionalnim sastojkom prilikom formulacije prehrambenih proizvoda (Irakli i sur., 2023). Procjena antioksidacijskog potencijala

ekstrakata ružmarina je bitna zbog varijacija u antioksidacijskim komponentama koje se mogu dobiti ovisno o korištenom otapalu. Prema Al Jaafreh (2024) primjenom različitih otapala moguće je ekstrahirati komponente ružmarina koje mogu imati različite učinke na antioksidacijsko djelovanje. Kod biljaka postoji višerazinska i složena mreža antioksidacijskog sustava koja djeluje suprotstavljajući prema štetnim reaktivnim vrstama, među kojima se najviše ističu reaktivne kisikove vrste, a sve s ciljem održavanja homeostaze unutar stanice (Dumanović i sur., 2021). Antioksidacijska aktivnost odnosi se na uklanjanje reaktivnih vrsta kisika (ROS) odnosno štetnih reaktivnih kisikovih molekula koje nastaju prirodnim fiziološkim djelovanjem, na primjer starenjem, infekcijom, toksinima ili pretjeranom tjelovježbom (Wang i sur., 2022; Nunes-Silva i Freitas-Lima, 2015; Marschall i Tudzynski, 2016). Predstavljaju skupine slobodnih radikala, reaktivnih molekula i iona izvedenih iz O_2 . Reaktivne kisikove vrste nastaju kao normalni produkt staničnog metabolizma kod biljaka, a različiti okolišni stresovi mogu dovesti do prekomjerne proizvodnje istih, uzrokujući progresivno oksidativno oštećenje te na kraju smrt stanice (Sharma i sur., 2012). Antioksidacijska svojstva fenola mogu se predstaviti i kroz mehanizam, odnosno sposobnost modifikacije kinetike peroksidacije mijenjanjem "paketa" lipida i smanjenjem fluidnosti membrane. Navedene promjene mogu dovesti do ograničavanja difuzije slobodnih radikala i smanjenja reakcije peroksidacije (Takahama i Oniki, 1992; prema Dumanović i sur., 2021). Bioaktivna svojstva ružmarina ponajprije se pripisuju fenolnim spojevima. Biljke proizvode fenolne spojeve uglavnom za njihov rast, razvoj i zaštitu. Navedeni spojevi aromatičnog benzenskog prstena su itekako bitni tijekom interakcija biotičkog i abiotičkog stresa u biljci. Oni čine bitan dio sekundarnih metabolita biljaka i igraju vitalnu ulogu u različitim fiziološkim i mehaničkim aktivnostima. Međutim, važno je uzeti u obzir da ova biološka svojstva ovisе o različitim faktorima. Cilj ovoga rada je utvrditi varijacije u sadržaju ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti svježeg i osušenog lista ružmarina u ovisnosti od njegovog porijekla iz urbane i ruralne sredine, te rezultate usporediti s komercijalnim uzorkom. Također, istraživanja Chrysargyris i sur. (2020) pokazuju da lokalitet i nadmorska visina utječu na razinu polifenola u ljekovitom bilju, a analiza istog je jedan od ciljeva ovoga rada.

MATERIJALI I METODE MATERIALS AND METHODS

Biljni materijal – *Plant material*

Biljni materijal *R. officinalis* prikupljen je u svibnju 2024. godine iz urbane sredine (Lokacija: Latitude: 43°21'34"N; Longitude 17°48'54"E; Zalik, grad Mostar, BiH; nadmorska visina: 67 m) i ruralne sredine (Lokacija: Latitude:

43.1836124; Longitude 17.7909700; selo Pijesci, Općina Mostar, BiH; nadmorska visina: 250 m). Svježi uzorci biljnog materijala *R. officinalis* prikupljeni su u lipnju 2024. godine na opisanim lokacijama iz urbane i ruralne sredine. Berba lišća obavljena je u jutarnjim satima, između 9 i 10 h ujutro. Za potrebe ovoga istraživanja koristili su se listovi ružmarina. Botaničku pripadnost prikupljenog biljnog materijala *Rosmarinus officinalis* potvrdio je izv. prof. dr. sc. Boris Dorbić; prof. struč. stud. korištenjem relevantne florističke literature (Kovačić i sur., 2008; Nikolić i sur., 2020). Biljni materijal stavljen je na sušenje u prozračne drvene kutije u tankom sloju, na otvorenom prozračnom mjestu (pod strehom u hladu) do provedbe analiza.

Kemikalije – *Chemicals*

Folin-Ciocalteu reagens – Kemika Zagreb (Hrvatska), Natrij karbonat (Na_2CO_3) – Centrohem (Srbija), Galna kiselina ($C_7H_6O_5H_2O$) – Fluka Chemica (Švicarska), destilirana voda, etanol (C_2H_6O) – Gram – Mol (Hrvatska), TROLOX -6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina – ($C_{14}H_{18}O_4$) – Tokyo Chemical Industry (Japan), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil – ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) – Sigma – Aldrich – (USA).

Aparatura – *Apparatus*

Evolution 60s UV-Visible Spectrophotometer, MEMMERT vodena kupelj, IKA Lab Dancer Vortex, Mettler Toledo analitička vaga.

Procedura za ekstrakciju uzoraka listova biljnog materijala *Rosmarinus officinalis* – *Procedure for the extraction of leaf samples of Rosmarinus officinalis plant material*

Osušeni i usitnjeni listovi biljnog materijala podvrgnuti su maceraciji u destiliranoj vodi i 70 %-tnoj vodenoj otopini etanola pri sobnoj temperaturi u svrhu ekstrakcije. U Erlenmayerovu tikvicu od 100 mL izvagano je 1 g usitnjenog biljnog materijala, potom dodano 25 mL otapala (destilirana voda i vodena otopina etanola) te ostavljeno na maceraciji u vremenu od 72 sata. Po završetku maceracije sadržaj tikvice je filtriran kroz lijevak s filter papirom u odmjernu tikvicu od 25 mL, te nadopunjen do oznake korištenim otapalom. Na isti način provedena je maceracija i svježeg biljnog materijala.

Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih fenola – *Folin-Ciocalteu method for the determination of total phenols*

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola korištena je metoda prema Folin-Ciocalteu (Singleton i Rosi, 1965), a analiza je provedena sredinom lipnja 2024. godine u laboratoriju katedre za farmakognoziju na Farmaceutskom fakultetu

Univerziteta u Sarajevu. Metoda se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju sadržaja ukupnih fenola u reakcijskoj smjesi ispitivanog ekstrakta, destilirane vode, Folin-Ciocalteu reagensa (smjesa fosfomolibdatne i fosforvolframatne kiseline) i 20 % otopine natrij-karbonata. Reakcijska otopina poprima intenzivno plavu boju, a intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji fenolnih spojeva. Koncentracija ukupnih fenola, koristeći galnu kiselinu kao standard, izračunata je prema jednadžbi smjera dobivenoj u softverskom programu Excel 2010. Na apscisu su nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), dok su vrijednosti apsorpcije, izmjerene na 765 nm pomoću Evolution 60s UV-Visible spektrofotometra, nanosene na ordinatu.

Postupak određivanja ukupnih fenola – *Procedure for the determination of total phenols*

Prethodno razrijeđeni alikvot volumena 125 μL ekstrakta ružmarina otpipetiran je u staklenu epruvetu, nakon čega je dodano 625 μL Folin-Ciocalteu reagensa te 10 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodano je 1,9 mL zasićene otopine natrij karbonata. Dobivena smjesa je potom izmiješana korištenjem Vorteks mješalice, nakon čega su uzorci postavljeni na termostatiranje u vodenu kupelj pri temperaturi od 50 °C u vremenu od 25 minuta. Po završetku provedeno je spektrofotometrijsko mjerenje apsorpcije pri valnoj duljini od 765 nm korištenjem UV-Vis spektrofotometra (Evolution 60s UV-Visible Spektrofotometar).

DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti – *Determination of antioxidant activity by DPPH method*

Goldschmidt i Renn su 1922. godine otkrili DPPH radikal (Goldschmidt i Renn, 1922; prema Gulcin i Alwasel, 2023). Blois je 1958. godine razvio metodu za određivanje antioksidacijske aktivnosti koristeći stabilni slobodni DPPH radikal (Blois, 1958; prema Gulcin i Alwasel, 2023). DPPH metoda je i danas jedna od najčešće korištenih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Postupak se temelji na miješanju biljnih ekstrakata s DPPH otopinom, te se nakon određenog vremena mjeri njihova apsorpcija (Gulcin, 2023). DPPH, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil predstavlja široko korišteni stabilni organski dušikov radikal specifične tamnoljubičaste boje, s jakom apsorpcijom na 517 nm koja se objašnjava elektronom DPPH•. Molekule antioksidanasa reduciraju radikal pri čemu dolazi do transformacije u 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilin blijedožuti stabilan spoj, a zbog sparivanja elektrona smanjuje se i apsorpcija (Bora, 2023). U ovoj reakciji dolazi do smanjenja stabilnog slobodnog DPPH radikala. Slobodni DPPH radikal dolazi u interakciju s neparnim elektronom i stvara maksimalnu apsorpcijsku valnu duljinu od 517 nm (ljubičasto obojenje). Antioksidansi reagiraju s DPPH i stvaraju izvod vodika (naprimjer antioksidans "hvata" slobodne ra-

dikale), a to rezultira redukcijom DPPH do DPPH-H, te smanjenjem apsorpcije DPPH, (Baliyan i sur., 2022). Kao slijepa proba koristi se otopina pripravljena miješanjem 5 mL 25 mM DPPH otopine s 5 mL metanola. Referentna otopina koristi se kao baza pri usporedbi s uzorcima, a čija se apsorpcija mjeri na 517 nm pomoću spektrofotometra. Apsoorbancija uzorka i slijepe probe se mjeri nakon perioda inkubacije od 30 minuta, a potom se izračunava postotak (I %) inhibicije slobodnog DPPH radikala. Izračunavanje postotka inhibicije s pomoću jednadžbe:

$$\%I = \frac{A_r - A_c}{A_r} \cdot 100$$

Pri čemu je:

- % I – postotak inhibicije;
- A_r – apsorpcija slijepe probe;
- A_s – apsorpcija uzorka, (Dăineanu i sur., 2024).

Aktivnost hvatanja radikala ili RSA [%] izračunava se uporabom formule:

$$RSA[\%] = \left(1 - \left(\frac{A_{sample}}{A_{blank}} \right) \right) * 100\%$$

Pri čemu je:

- A_{sample} – apsorpcija ispitivanog uzorka;
- A_{blank} – apsorpcija slijepe probe.

Isctavanjem Trolox kalibracijske krivulje, izračunava se koncentracija Trolox ekvivalenta (TE), odnosno cTE sljedećom formulom:

$$cTE \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{RSA * -b_{cal}}{m_{cal}}$$

pri čemu je:

- b_{cal} – sjecište kalibracijske krivulje;
- m_{cal} – nagib kalibracijske krivulje.

U sljedećem koraku, vrijednost TEAC određuje se s pomoću molarne mase Trolox koja iznosi 250,3 g/mol i koncentracije otopine uzorka c_{sample} :

$$TEAC \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \right] = \frac{c_{TE} * 1}{c_{sample} * M_{TROLOX}} \text{ (Rumpf i sur., 2023).}$$

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH metode – *Procedure for the determination of antioxidant activity by DPPH method*

Antioksidacijska aktivnost uzorka određivana je prema metodi Aoshima i sur. (2004). U 100 μL ekstrakta uzorka dodano je 2,9 mL prethodno pripremljenog DPPH reagensa i promiješano. Reakcijska smjesa je ostavljena na sob-

noj temperaturi 30 minuta, nakon čega je mjereno DPPH obezbojenje u odnosu na slijepu probu na 517 nm uporabom UV-Vis spektrofotometra (Evolution 60s UV-Visible Spektrofotometar).

Statistička analiza – *Statistical analysis*

Svi uzorci su analizirani u triplikatima, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost \pm ST DEV. Dobiveni rezultati su izračunati uporabom Excel 2010. softverskog programa. Uz softverski program Excel 2010., korišten je i IBM SPSS softver verzija 27. za provjeru statističkih razlika u odnosu na provenijenciju iz urbane i ruralne sredine te komercijalni uzorak, kao i provjeru statističkih razlika u odnosu na uporabu različitih otapala: etanol 70 % i destilirana voda. U ovoj analizi korišteni su parametrijski testovi: One-Way ANOVA i t-test.

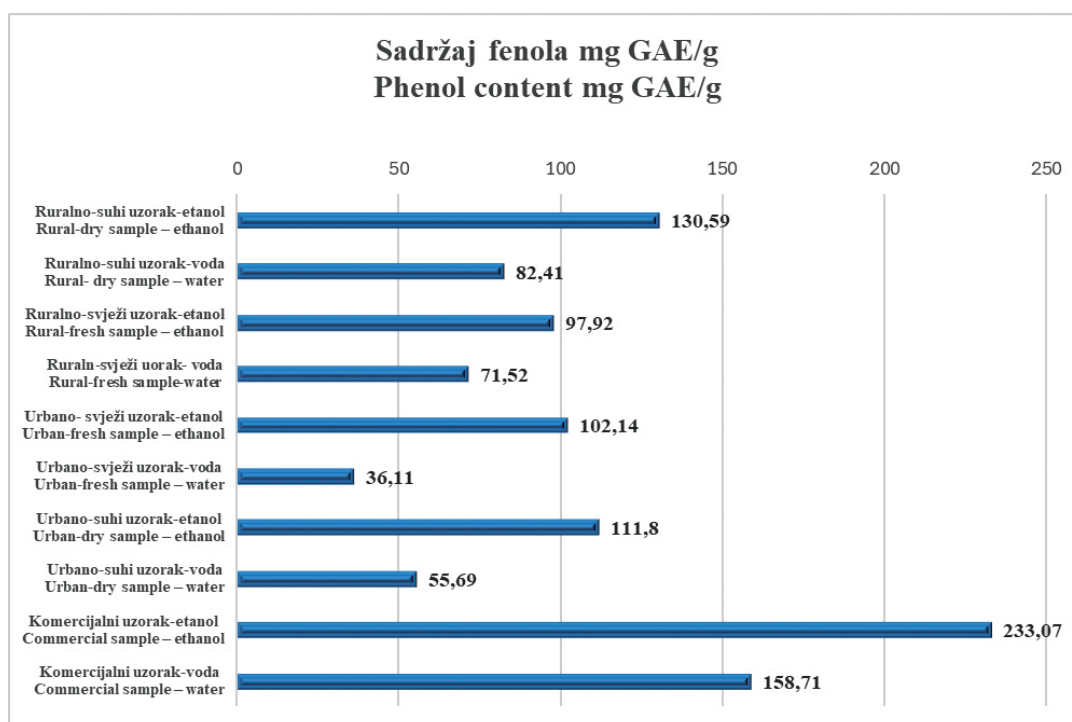
REZULTATI I DISKUSIJA RESULTS AND DISCUSSION

Određivanje sadržaja ukupnih fenola – *Determination of the total phenolic content*

Fenolne molekule su najvažnije klase prirodnih antioksidansa i u velikoj su korelaciji s antioksidacijskim djelovanjem u biljnim tkivima. Svrha istraživanja bila je usporediti polifenolni profil ekstrakata ružmarina dobivenih iz suhog i svje-

žeg lista biljnog materijala prikupljenog s različitih nadmorskih visina, te procijeniti njihovo antioksidacijsko djelovanje. Srednje vrijednosti ukupnih fenola u ovisnosti od primijenjenog otapala, nadmorske visine te stanja biljnog materijala (suhi ili svježi) prikazane su na grafikonu 1.

Iz grafikona 1. može se uočiti da udio ukupnih fenola varira u rasponu od $36,11 \pm 0,96$ do $233,07 \pm 1,66$ mg GAE/g, ovisno o vrsti korištenog otapala i stanja biljnog materijala. Uporabom vodene otopine etanola 70 % postiže se veći ekstrakcijski prinos u svim uzorcima ružmarina u odnosu na uzorke koji su ekstrahirani s vodom. Najveći udio fenola pokazuje suhi komercijalni uzorak, čija vrijednost iznosi $233,07 \pm 1,66$ mg GAE/g koji je ekstrahiran u etanolu, dok najmanji udio fenola pokazuje suhi uzorak ružmarina sakupljen u urbanoj sredini, a čija vrijednost iznosi $36,11 \pm 0,96$ mg GAE/g, a koji je ekstrahiran u vodi. Prema istraživanju Hu i sur. (2016) pri koncentraciji etanola od oko 70 %, prisutnost vode u otapalu uzrokuje umjereno bubrenje materijala lista ružmarina, čime se olakšava prodiranje otapala u materijal. S druge strane velika količina vode u otapalu dovodi do prekomjernog bubrenja materijala i nepovoljnog polariteta otapala, što doprinosi smanjenom prinosu ekstrakcije. U istraživanju Minh-Tam i sur. (2021) utvrđena je značajna varijacija u sadržaju fenola ovisno o vrsti i koncentraciji korištenog otapala. Sadržaj fenola kre-



*Svi uzorci su analizirani u triplikatima.

*All samples were analyzed in triplicate.

Grafikon 1. Srednje vrijednosti sadržaja ukupnih fenola u ovisnosti od primijenjenog otapala, nadmorske visine te stanja biljnog materijala (suhi ili svježi).

Graph 1. Mean values of total phenolic content depending on the applied solvent, altitude, and state of the plant material (dry or fresh).

tao se od 59 mg GAE/g kada je korišten 70 % etanol kao otapalo, do 37,5 mg GAE/g u uzorku koji je ekstrahirano vodom. Istraživanje koje su proveli Dhoubi i sur. (2023) pokazalo je da je najveća ukupna koncentracija fenola u ružmarinu zabilježena kada je etanol korišten kao otapalo (85 mg GAE/g). Ovi rezultati mogu se objasniti afinitetom polifenola, koji su polarni spojevi, prema polarnim otapalima kao što je etanol. Istraživanje Ahmeda i sur. (2022) ukazuje na veći sadržaj fenolnih spojeva korištenjem etanola u odnosu na druga otapala. U ovoj studiji sadržaj fenolnih spojeva u ružmarinu iznosio je $26,43 \pm 1,55$ mg GAE/g. U istraživanju Kheiria i sur. (2021) objavljeno je da se sadržaj fenola u ekstraktu ružmarina kretao od 85,8 do 137,3 mg GAE/g. Njihovi rezultati su relativno slični rezultatima ovoga istraživanja. Suprotno tomu, sadržaj ukupnih fenola u vodenim ekstraktima koje su istraživali Afonso i sur. (2013) iznosila je $16,67 \pm 0,40$ mg GAE/g, što predstavlja značajno niže vrijednosti u usporedbi s rezultatima dobivenim ovim istraživanjem. Na sadržaj fenola jasno utječu visinske varijacije, pri čemu su uzorci s veće nadmorske visine pokazali veći sadržaj fenola u usporedbi s uzorcima s niže nadmorske visine. Uzorci s viših nadmorskih visina pokazali su veći sadržaj fenola koji su varirali u rasponu od $71,52 \pm 0,48$ do $130,59 \pm 0,83$ mg GAE/g, dok su uzorci s niže nadmorske visine pokazali relativno manji sadržaj fenola koji su varirali u rasponu od $36,11 \pm 0,96$ do $102,14 \pm 1,92$ mg GAE/g. Studije koje su proveli Yeddes i sur. (2019) o učinku bioklimatskog područja na fenolne i antioksidacijske aktivnosti ružmarina pokazali su da postoji jaka korelacija između antioksidacijske aktivnosti i sadržaja fenola ovisno o bioklimatskom području. Sadržaj fenola kretao se od 39,15 mg GAE/g za područje s većom nadmorskom visinom do 26,66 mg GAE/g za područje s nižom nadmorskom visinom. Ovi rezultati korespondiraju s rezultatima ove studije koji ukazuju da uzorci s većih nadmorskih visina pokazuju veći sadržaj fenolnih spojeva.

Proces sušenja je ključni faktor koji omogućava očuvanje kvalitete ljekovitog bilja i njihovih bioaktivnih ekstrakata i spojeva. Za sušenje svježeg biljnog materijala koriste se različiti načini kao što su sušenje na zraku, sušenje u sušarama (Ahmed i sur., 2021). Svježe bilje iz porodice Lamiaceae obično sadrži 75 – 80 % vode, a udio vode mora se smanjiti na manje od 15 % radi njihovog očuvanja (Diaz-Maroto i sur., 2002). U ovom radu svježi biljni uzorci sušeni su na zraku kako bi se osiguralo očuvanje kvalitete ljekovitog bilja. Proces sušenja značajno je utjecao na ukupan sadržaj fenolnih spojeva. Rezultati istraživanja pokazuju da je ukupan sadržaj fenolnih spojeva znatno veći u osušenim listovima ružmarina u usporedbi sa svježim listovima. Sadržaj fenolnih spojeva varirao je od $55,69 \pm 1,44$ mg GAE/g za vodeni ekstrakt ružmarina s niže nadmorske visine koji je sušen na zraku do 233,07 mg GAE/g za komercijalni etanolni ekstrakt ružmarina. Studija provedena od Biezanowska-

Tablica 1. One-Way ANOVA za provenijenciju iz urbane/ruralne sredine i t-test za primjenu različitih otapala: etanol 70 % i voda, za rezultate sadržaja ukupnih fenola.

Table 1. One-way ANOVA for provenance from the urban/rural environment and t-test for the application of different solvents: ethanol 70% and water, for total phenol content results.

Provenijencija – Provenance			Otapalo – Solvent		
F	Df	p	t	Df	p
8,051	9	0,015	1,657	8	0,137

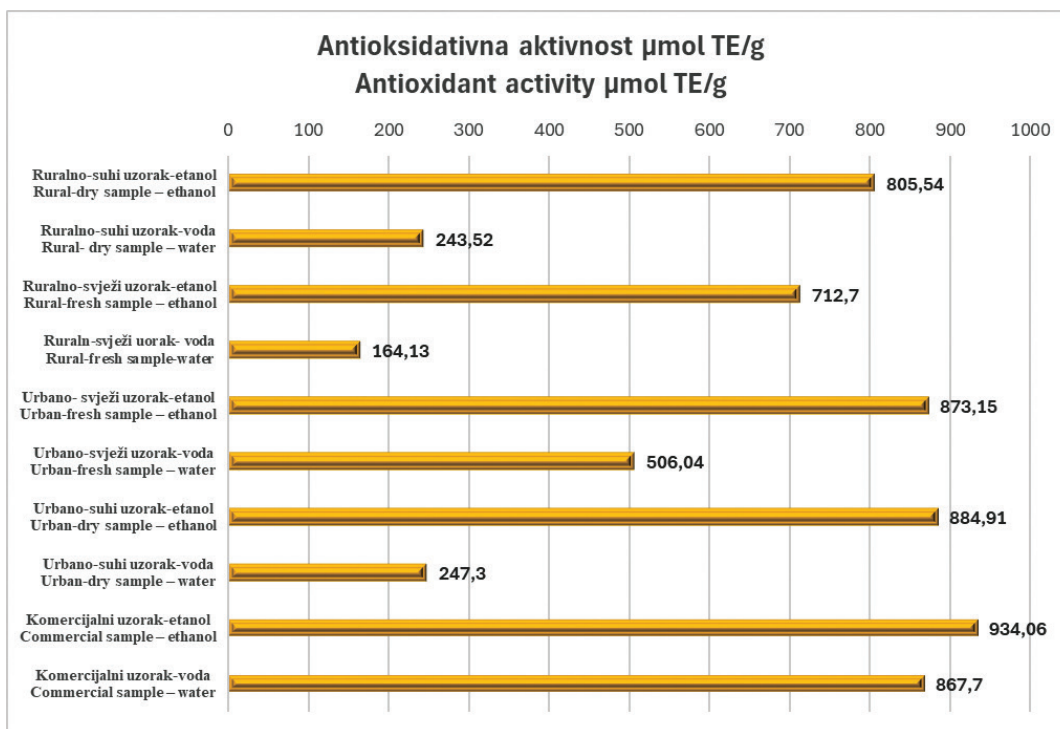
Kopeć i Piątkowska (2022) pokazuje znatno veće vrijednosti sadržaja fenolnih spojeva kod komercijalnih uzoraka ružmarina u odnosu na svježu biljku. Vrijednosti komercijalnih uzoraka iznosile su $579,39 \pm 152,41$ mg GAE/g, dok su vrijednosti fenolnih spojeva svježe biljke ružmarina iznosile $423,31 \pm 2,39$ mg GAE/g. Navedeni rezultati su u skladu s rezultatima ovoga istraživanja, koji ukazuju da komercijalni uzorci pokazuju veći sadržaj fenolnih spojeva u odnosu na svježe uzorke. Većina studija ukazuje na promjene u boji i isparljivim spojevima aromatičnog bilja nakon sušenja (Di Cesare i sur., 2003; prema Diaz-Maroto i sur., 2002), što je slučaj i u ovom radu. Analizom dobivenih rezultata može se zaključiti da 70%-tni ekstrakti etanola doprinose značajnijem ekstrakcijskom kapacitetu za izolaciju ukupnih fenola iz ružmarina. Osim toga, veća nadmorska visina te uzorci koji su sušeni na zraku također pospješuju ekstrakcijski kapacitet za izolaciju fenolnih spojeva.

Iz tablice 1. je vidljivo da primjenom One-Way ANOVA testa postoji razlika ($0,015 < 0,05$) u sadržaju ukupnih fenola analiziranih uzoraka u odnosu na provenijenciju iz urbane/ruralne sredine, a bitno je napomenuti isticanje vrijednosti uzoraka komercijalnog biljnog materijala (i vodenog i etanolnog). Ne postoji razlika u sadržaju ukupnih fenola analiziranih uzoraka s obzirom na uporabu različitog otapala u procesu ekstrakcije ($0,137 > 0,05$).

Određivanje antioksidacijske aktivnosti – *Determination of antioxidant activity*

Prilično je teška identifikacija svake pojedinačne komponente koja ima antioksidacijski učinak, te je za istu potrebno mnogo vremena i truda. Iz tog razloga, u praksi se primjenjuje nekoliko metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti cijeloga ekstrakta (Adris i sur., 2019). Antioksidacijska aktivnost iz listova biljnog materijala ružmarina određivana je uporabom DPPH metode. Prema istraživanju Yeddera i sur. (2019) visoka antiradikalna aktivnost lista biljnog materijala ružmarina u ljetnom periodu usko je povezana s visokim sadržajem ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, kondenziranih tanina te karnozne kiseline.

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom korišteni su 70 %-tni etanol i voda kao otapala, odnosno etanolni i vodeni ekstrakti svježeg i osušenog biljnog materijala ružmarina iz urbane i ruralne sredine, kao i ekstrakti komer-



*Svi uzorci su analizirani u triplicatima.

*All samples were analyzed in triplicate.

Grafikon 2. Rezultati DPPH metode za analizirane uzorke izraženi primjenom standarda Trolox-a kao ekvivalenta ($\mu\text{mol TE/g}$).
Graph 2. Results of the DPPH method for the analyzed samples expressed using Trolox standards as equivalents ($\mu\text{mol TE/g}$).

cijalnog biljnog materijala. Određivanje antioksidacijske aktivnosti iz ekstrahiranih uzoraka ružmarina primjenom različitih otapala podrazumijeva ispitivanje učinkovitosti upotrijebljenih otapala u ekstrakciji. Najučinkovitije otapalo u ekstrakciji smatra se ono upotrijebljeno otapalo čiji ekstrakt rezultira s najvećom antioksidacijskom aktivnošću (Al-Jaafreh, 2024). Procjena DPPH rezultata, odnosno sposobnosti uklanjanja radikala izražena je primjenom standarda Trolox-a kao ekvivalenta ($\mu\text{mol TE/g}$), prikazano grafikonom 2. Rezultati DPPH metode za analizirane uzorke predstavljeni su preko linearne kalibracijske krivulje Trolox-a s koeficijentom regresije $R^2 = 0,998$. Analizirani ekstrakti podijeljeni su u tri grupe s obzirom na provenijenciju iz urbane i ruralne sredine te komercijalni biljni materijal. Najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti imali su etanolni ekstrakti (od $712,70 \pm 1,90$ do $934,06 \pm 0,77 \mu\text{mol TE/g}$) bez obzira na provenijenciju biljnog materijala urbane/ruralne sredine i stanja uzorka (suhi/svježi). Prema istraživanju Bianchin i sur. (2020) etanolni ekstrakt ružmarina je imao sadržaj od $4745,72 \pm 0,47 \mu\text{mol TE/g}$, što ukazuje na izuzetno visoke antioksidacijske vrijednosti izražene kao Trolox (TE), a studija sugerira da bi se analizirani ekstrakti mogli koristiti kao prirodni antioksidansi u proizvodima od mesa. Prema istraživanju Al-Jaafreh (2024) pri usporedbi s Troloxom, ekstrakcija polarnim otapalima pokazivala je najjači antioksidacijski učinak, dok je ekstrakcija s nepolarnim otapalima imala najniži antioksidacijsku aktivnost.

Razlike u antioksidacijskoj aktivnosti vidljive su kod vodenih ekstrakata, čije su vrijednosti od $164,13 \pm 4,04$ do $867,70 \pm 1,98 \mu\text{mol TE/g}$. Vodeni ekstrakti pokazuju niže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti bez obzira na provenijenciju i stanje uzorka. Ističe se samo vodeni ekstrakt komercijalnog uzorka. Drugim riječima, etanolni ekstrakt komercijalnog uzorka s vrijednošću od $934,06 \pm 0,77 \mu\text{mol TE/g}$ skoro je 5,69 puta veći od vodenog ekstrakta ruralnog područja, čija je vrijednost iznosila $164,13 \pm 4,04 \mu\text{mol TE/g}$. Razlike u vrijednostima antioksidacijske aktivnosti primjenom ORAC metode za etanolni i vodeni ekstrakt su vidljive i u istraživanju Kotenkova i Kupaeva (2021), pri čemu su rezultati za uzorak suhog ružmarina u etanolnom ekstraktu iznosili $728,25 \pm 2,14 \mu\text{mol-equiv. Trolox/g}$, a za vodeni ekstrakt $299,98 \pm 16,74 \mu\text{mol-equiv. Trolox/g}$. Odnosno, ukupni antioksidacijski kapacitet etanolnog ekstrakta ružmarina bio je 2,43 puta veći od vodenog ekstrakta (Kotenkova, Kupaeva, 2021).

Aktivnost hvatanja slobodnih radikala u metanolnom ekstraktu *Rosmarinus officinalis*, određivali su Adris i sur. (2019), pri čemu je vrijednost antioksidacijske aktivnosti prema DPPH metodi iznosila $259,67 \pm 0,48 \mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari. U istraživanju metabolomike i kemometrije, De Falco i sur. (2022) ispitivali su antioksidacijsku aktivnost ekstrakata lišća sedam biljnih vrsta, a među njima i ekstrakt ružmarina, koji je prema DPPH metodi izražen kao mM/

Tablica 2. One-Way ANOVA za provenijenciju iz urbane/ruralne sredine i t-test za primjenu različitih otapala: 70%-tni etanol i voda, za rezultate antioksidacijske aktivnosti.

Table 2. One-way ANOVA for provenance from the urban/rural environment and t-test for the application of different solvents: ethanol 70% and water, for antioxidant activity results

Provenijencija – Provenance			Otapalo – Solvent		
F	df	p	t	df	p
1,360	9	0,317	4,252	4	0,013

TE g suhe tvari s vrijednošću $1,04 \pm 0,01$. Usporedbe radi, antioksidacijska aktivnost prema DPPH metodi ispitivanog uzorka esencijalnog ulja ružmarina koje su provodili Barakat i Ghazal (2016) iznosila je $234,7 \pm 7,1$ $\mu\text{mol TE/g}$.

Uvidom u rezultate prikazane u tablici 2. može se zaključiti da primjenom One-Way ANOVA testa nema razlike u antioksidacijskoj aktivnosti uzoraka u odnosu na provenijenciju iz urbane/ruralne sredine ($0,317 > 0,05$), s tim što je bitno napomenuti isticanje uzoraka komercijalnog biljnog materijala (i vodenog i etanolnog). Razlike se ogledaju u antioksidacijskoj aktivnosti analiziranih uzoraka s obzirom na uporabu različitog otapala u procesu ekstrakcije ($0,013 < 0,05$).

ZAKLJUČAK CONCLUSION

Analiziranjem dobivenih rezultata nakon provedenog istraživanja može se zaključiti da ekstrakti lista biljke ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) imaju visoku antioksidacijsku aktivnost i bogat su izvor fenolnih spojeva, što je potvrđeno DPPH metodom za određivanje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti i udjelima ukupnih fenola određenih spektrofotometrijskim metodama. Visoka antiradikalna aktivnost lista biljnog materijala ružmarina usko je povezana s visokim sadržajem ukupnih fenola.

Rezultati dobiveni određivanjem ukupnih fenola kreću se od $36,11 \pm 0,96$ do $233,07 \pm 1,66$ mg GAE/g, ovisno o vrsti korištenog otapala i stanja biljnog materijala (suhi/svježi). Pregledom dobivenih rezultata zaključuje se da vodeni ekstrakti etanola 70 % značajno doprinose većem ekstrakcijskom kapacitetu za izolaciju ukupnih fenola iz ružmarina.

Najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti imali su etanolni ekstrakti ($712,70 \pm 1,90$ do $934,06 \pm 0,77$ $\mu\text{mol TE/g}$) bez obzira na provenijenciju biljnog materijala urbane/ruralne sredine i stanja uzorka (suhi/svježi). Vodeni ekstrakti pokazuju niže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti bez obzira na provenijenciju i stanje uzorka. Primjenom One-Way ANOVA testa vidljivo je da postoji razlika ($0,015 > 0,05$) u sadržaju ukupnih fenola analiziranih uzoraka u odnosu na provenijenciju iz urbane/ruralne sredine, a bitno je napomenuti isticanje vrijednosti uzoraka komercijalnog biljnog materijala (vodenog i etanolnog), a ispitivanje postojanja razlike bio je jedan od ciljeva rada. U sadržaju ukupnih fenola analiziranih uzoraka ne postoji razlika s obzi-

rom na uporabu različitog otapala u procesu ekstrakcije ($0,137 > 0,05$). Kada govorimo o antioksidacijskoj aktivnosti primjenom One-Way ANOVA testa može se zaključiti da nema razlike u antioksidacijskoj aktivnosti uzoraka u odnosu na provenijenciju iz urbane/ruralne sredine ($0,317 > 0,05$), s tim što je i u ovom slučaju bitno napomenuti isticanje uzoraka komercijalnog biljnog materijala (i vodenog i etanolnog). Razlike se ogledaju u antioksidacijskoj aktivnosti analiziranih uzoraka s obzirom na uporabu različitog otapala u procesu ekstrakcije ($0,013 < 0,05$).

Dobiveni rezultati ukazuju na značaj i potencijal ružmarina kao biljnog materijala ili mogućeg predmeta daljnjih istraživanja u kontekstu pregleda značajnih bioloških aktivnosti. Istraživanjem naglašavamo značajnost nastavka istraživanja i bioaktivnih komponenti lista ružmarina s ciljem potpunijeg objašnjenja i potencijalne primjene u industriji kozmetike ili farmaceutskoj industriji. Na temelju dobivenih rezultata daljnja istraživanja će se usredotočiti na detaljniju procjenu bioaktivnih komponenti biljke ružmarin.

LITERATURA LITERATURE

- Adris, A. A., M. A. Tower, A. A. A. Soutan, A. A. Bellail, A. A. I. Faozia, 2019: Antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* L. growing naturally in El-Jabal El-Akhdar province –Libya and its effect on keeping quality of cold serola dumeriri fillets. *J. Food and Dairy Sci.*, Mansoura Univ., Vol. 10 (2): 23 – 30. doi: 10.21608/JFDS.2019.36149.
- Afonso, M. S., A. M. de O Silva, E. Bt Carvalho, D. P. Rivelli, S. Bm Barros, M. M. Rogero, A. M. Lottenberg, R. P. Torres, J. Mancini-Filho, 2013: Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Nutr Metab (Lond)*, 2;10(1):19. doi: 10.1186/1743-7075-10-19.
- Al-Jaafreh, A. M., 2024: Evaluation of antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and different types of solvent extractions. *Biomedical & Pharmacology Journal*. 17(1), p. 323-339. doi: <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/2860>.
- Aoshima, H., H. Tsunoue, H. Koda, Y. Kiso, 2004: Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52. (16):5240-4. doi: 10.1021/jf049817s.
- Baliyan, S., R. Mukherjee, A. Priyadarshini, A. Vibhuti, A. Gupta, R.P. Pandey, C.-M. Chang, 2022: Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *ficus religiosa*. *Molecules* 27:1326. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>.
- Barakat, H., G. A. Ghazal, 2016: Antifungal and Antioxidant Activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*L.) Essential Oil. *J. Food and Dairy Sci.*, Mansoura Univ., Vol. 7 (5): 273 – 282. doi: 10.21608/jfds.2016.43002.
- Bianchin, M., D. Pereira, J. de Florio Almeida, C. de Moura, R. Simionatto Pinheiro, L. F. Serafini Heldt, C. Windson Isidoro Haminiuk, S. Teresinha Carpes, 2020: Antioxidant properties of lyophilized rosemary and sage extracts and its effect to prevent lipid oxidation in Poultry Pâté. *Molecules* 25:5160. doi: 10.3390/molecules25215160.

- Biezanowska-Kopeć, R., E. Piątkowska, 2022: Total Polyphenols and Antioxidant Properties of Selected Fresh and Dried Herbs and Spices. *Appl. Sci.* 12(10): 4876. doi: <https://doi.org/10.3390/app12104876>.
- Blois, M.S., 1958: Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181: 1199-1200. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>.
- Bora, G., 2023: A short review on the principles of DPPH ABTS, FRAP, CUPRAC and Folin-Ciocalteu assay: advantages and disadvantages. *Eur. Chem. Bull.* 12 (Special Issue 5), 539 – 552. doi: 10.31838/ecb/2023.12.si5.065.
- Carrubba A., L. Abbate, M. Sarno, F. Sunseri, A. Mauceri, A. Lupini, F. Mercati, 2020: Characterization of Sicilian rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) germplasm through a multidisciplinary approach. *Plant.* 251:37. doi: 10.1007/s00425-019-03327-8.
- Chrysargyris, A., M. Mikallou, S. Petropoulos, N. Tzortzakis, 2020: Profiling of Essential Oils Components and Polyphenols for Their Antioxidant Activity of Medicinal and Aromatic Plants Grown in Different Environmental Conditions. *Agronomy* 10(5): 727. doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy10050727>.
- Dăineanu, N., S. Mihai, I. Stoicescu, D. Dumitrescu, A. Popescu, C. E. Gîrd, 2024: A comparative analysis of the phytochemical profiles of *Ionicera japonica* thunb. *Flos thunb.* Species native to the mountainous and Coastal Regions of Romania. Article. Not peer-reviewed version: Preprints.org. doi: 10.20944/preprints202405.1494.v1.
- De Falco, B., L. Grauso, A. Fiore, G. Bonanomi, V. Lanzotti, 2022: Metabolomics and chemometrics of seven aromatic plants: Carob, eucalyptus, laurel, mint, myrtle, rosemary and strawberry tree. *Phytochemical Analysis* 33:696–709. doi: 10.1002/pca.3121.
- Dhouibi, N., S. Manuguerra, R. Arena, C. M. Messina, A. Santulli, S. Kacem, H. Dhaouadi, A. Mahdhi, 2023: Impact of the Extraction Method on the Chemical Composition and Antioxidant Potency of *Rosmarinus officinalis* L. Extracts. *Metabolites*, 13(2), 290. doi: <https://doi.org/10.3390/metabo13020290>.
- Di Cesare, L. F., E. Forni, D. Viscardi, R. C. Nani, 2003: Changes in the Chemical Composition of Basil Caused by Different Drying Procedures. *J. Agric. Food Chem.* 51,12: 3575–3581. doi: <https://doi.org/10.1021/jf021080o>.
- Díaz-Maroto, M., M. C. Hidalgo, M. Perez-Coello, MD. Cabezudo, 2022: Effect of different drying methods on the volatile components of parsley (*Petroselinum crispum* L.). *European Food Research and Technology.* 215 (3):227-230. doi: 10.1007/s00217-002-0529-7.
- Dorbić, B., E. Temim, 2018: Valorizacija dendro elemenata u parkovima i pejsažnim površinama na području Šibensko-kninske županije. *Annales-Anali za Istrske in Mediteranske Studije-Series Historia et Sociologia.* 28 (1): 167-192, doi: 10.19233/ASHS.2018.12.
- Dorbić, B., T. Bačić, E. Friganović, 2022: Percepcija, ponašanje i znanje ispitanika o čajevima odabranih vrsta aromatičnog i ljekovitog bilja u cilju detoksikacije organizma. *Agronomski glasnik*, 84 (1-2): 42-72. doi: <https://doi.org/10.33128/ag.84.1-2.4>.
- Dumanović, J., E. Nepovimova, M. Natić, K. Kuča, V. Jačević, 2021: The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. Review article. *Front. Plant Sci., Sec. Plant Cell Biology* Volume 11. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>.
- Gašparović, I., Ž. Španjol, B. Dorbić, N. Vrh, I. Tolić, M. Vojinović, S. Stevanović, 2022: Krajobrazno-ekološka valorizacija u kontekstu zaštite i revitalizacije Park šume Hober u Korčuli-R. Hrvatska. *Šumarski list: znanstveno-stručno i staleško glasilo Hrvatskoga šumarskog društva*, 146 (5-6): 225-241. doi: <https://doi.org/10.31298/sl.146.5-6.5>.
- Goldschmidt, S., K. Renn, 1922: Zweiwertiger Stickstoff: Über das α , α -Diphenyl- β -trinitrophenyl-hydrazyl. (IV. Mitteilung über Amin-Oxydation). Volume 55. Issue 3. Pages 628-643. doi: <https://doi.org/10.1002/cber.19220550308>.
- González-Minero, F. J., L. Bravo-Díaz, A. Ayala-Gómez, 2020: *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary): An Ancient Plant with Uses in Personal Healthcare and Cosmetics. *Cosmetics.* doi: <https://doi.org/10.3390/cosmetics7040077>.
- Gulcin, I., S. H. Alwasel, 2023: DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes.* 11(8), 2248. doi: <https://doi.org/10.3390/pr11082248>.
- Hu CJ, Y. Gao, Y. Liu, X-Q. Zheng, J-H. Ye, Y-R. Liang, 2016: Studies on the mechanism of efficient extraction of tea components by aqueous ethanol, *Food Chemistry*, Volume 194, 312-318. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.029.
- Hwang, S. J., J. H. Lee, 2022: Comparison of antioxidant activities expressed as equivalents of standard antioxidant. *Food Sci. Technol., Campinas*, 43, e121522, 2023. doi: <https://doi.org/10.1590/fst.121522>.
- Irakli, M., A. Skendi, E. Bouloumpasi, S. Christaki, C. G. Biliaderis, P. Chatzopoulou, 2023: Sustainable Recovery of Phenolic Compounds from Distilled Rosemary By-Product Using Green Extraction Methods: Optimization, Comparison, and Antioxidant Activity. *Molecules.* 28(18), 6669. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28186669>.
- Ivanišová, E., M. Kačaniová, T. A. Savitskaya, D. D. Grinshpan, 2021: Medicinal Herbs: Important Source of Bioactive Compounds for Food Industry, Herbs and Spices. *New Processing Technologies.* doi: 10.5772/intechopen.98819.
- Kheiria, H., A. Mounir, Q. María, J. M. José, S. Bouzid, 2021: Total Phenolic Content and Polyphenolic Profile of Tunisian Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Residues. *Natural Drugs from Plants.* doi: 10.5772/intechopen.97762.
- Kompelly A., S. Kompelly, B. Vasudha, B. Narender, 2019: *Rosmarinus officinalis* L.: An updated review of its phytochemistry and biological activity. *J. Drug Deliv. Ther.;* 9:323-330. doi: 10.22270/jddt.v9i1.2218.
- Kotenkova, E. A., N. V. Kupaeva, 2021: Onion husk (*Allium cépa*) as a promising source of natural antioxidants. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 640 052002. doi:10.1088/1755-1315/640/5/052002.
- Kovačić, S i sur., 2008: Flora Jadranske obale i otoka 250 najčešćih vrsta. Školska knjiga, Zagreb.
- Lee, J. E., D. S. Im, 2021: Suppressive Effect of Carnosol on Ovalbumin-Induced Allergic Asthma. *Biomolecules & Therapeutics;* 29(1): 58 63. doi: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2020.050>.
- Luo, C., L. Zou, H. Sun, J. Peng, C. Gao, L. Bao, R. Ji, Y. Jin, S. Shuangy, 2020: A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol.* 11:153. doi: 10.3389/fphar.2020.00153.
- Marschall R., P. Tudzynski, 2016: Reactive oxygen species in development and infection processes. *Semin Cell Dev Biol.* doi: 10.1016/j.semcdb.2016.03.020.
- Nguyen-Kim, M-T., Q-C. Truong, M-T. Nguyen, B-H. Cao-Thi, T-D. Tong, T. P. Dao, T. H. Tran, L. Van Tan, X-T. Le., 2021: Optimized extraction of polyphenols from leaves of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) grown in Lam Dong province, Vietnam, and evaluation of their antioxidant capacity, *Open Chemistry.* doi: <https://doi.org/10.1515/chem-2021-0061>.
- Nieto, G., G. Ros, J. Vastillo, 2018: Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines (Basel).* Sep; 5 (3): 98. doi: 10.3390/medicines5030098.

- Nikolić, T., 2020: Flora Croatica 3 - Vaskularna flora Republike Hrvatske. Zagreb: Alfa d.d.
- da Silva Albená, N., L.C. Freitas-Lima, 2015: The Association between Physical Exercise and Reactive Oxygen Species (ROS) Production, Journal of Sports Medicine & Doping Studies. doi: 10.4172/2161-0673.1000152.
- Oliveira, J.R., S. E. A. Camargo, L.D. Oliveira, 2019: Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. Journal of Biomedical Science volume 26, Article number: 5. doi: <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0499-8>.
- Ou J., J. Huang, D. Zhao, B. Du, M. Wang, 2018: Protective effect of rosmarinic acid and carnosic acid against streptozotocin-induced oxidation, glycation, inflammation and microbiota imbalance in diabetic rats. Food function, 9:851–860. doi: 10.1039/C7FO01508A.
- Pawłowska, K., K. Janda, K. Jakubczyk, 2020: Properties and use of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Life Sci.;66(3):76-82. doi: 10.21164/pomjlifesci.722.
- Roša, J., 2010: Koraci do ekoznaka za ljekovito i aromatično bilje. Šumarski list br. 3–4, CXXXIV. 169-177. <https://hrcaak.srce.hr/56999>.
- Rumpf, J., R. Burger, M. Schulze, 2023: Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. International Journal of Biological Macromolecules 233:123470. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>.
- Sharma, P., A. Bhushan Jha, R. Shanker Dubey, M. Pessaraki, 2012: Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidant defense mechanism in plants under stressful conditions. Hindawi Publishing Corporation Journal of Botany Volume 2012, Article ID 217037, 26 pages. doi: 10.1155/2012/217037.
- Singleton, V. L., J. A. Rossi, 1965: Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.
- Snoussi, A., I. Essaidi, H. Ben Haj Koubaier, H. Zrelli, I. Alsafari, T. Živoslav, J. Mihailović, M. Khan, T. Ćirković Veličković, N. Bouzouita, 2021: Drying methodology effect on the phenolic content, antioxidant activity of Myrtus communis L. leaves ethanol extracts and soybean oil oxidative stability. BMC Chemistry 15:31. doi: 10.1186/s13065-021-00753-2.
- Takahama, U., T. Oniki, 1992: Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. Plant Cell Physiol. 33, 379–387. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078265>.
- Trinajstić, I., 1990: Šumska vegetacija otoka Braća. Glas. Šum. Pokuse 26, 183-205.
- Trinajstić, I., 1998: Fitogeografsko raščlanjenje klimazonalne šumske vegetacije Hrvatske. Šumarski list, CXXII, 9-10, 407-421.
- Trinajstić, I., 2008: Biljne zajednice Republike Hrvatske. Akademija šumarskih znanosti, Zagreb; 180 str.
- Vukelić, J., 2012: Šumska vegetacija Hrvatske. Sveučilište u Zagrebu; Šumarski fakultet u Zagrebu; Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb; 404 str.
- Wang, N., Q. Yu, D. Wang, H. Ren, C. Xu, C. Ning, N. Li, H. Fan, Z. Ai, 2022: Synergistic antiaging effects of jujube polysaccharide and flavonoid in D-Galactose-Induced aging mice. Original Article. Food Sci. Technol 42. doi: <https://doi.org/10.1590/fst.46222>.
- Yeddes, W., A. Chalghoum, W. Aidi-Wannes, R. Ksouri, M. Saidani Tounsi, 2019: Effect of bioclimatic area and season on phenolics and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. Journal of Essential Oil Research 31: 432-443. doi: <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1577305>.
- Zeroual, A., E. H. Sakar, F. Mahjoubi, M. Chaouch, A. Chaqroune, M. Taleb, 2022: Effects of Extraction Technique and Solvent on Phytochemicals, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Cultivated and Wild Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Taounate Region (Northern Morocco). Biointerface Research in Applied Chemistry, 12; 6, 8441 – 8452, doi: <https://doi.org/10.33263/BRIAC126.84418452>.

SUMMARY

The objective of this study was to determine the antioxidant activity and total phenolic content of fresh and dried rosemary leaves from urban and rural areas and to compare the results with those of a commercial sample. Rosemary plant material (*R. officinalis*) was collected during May and June 2024 in the summer/sunny period. The homogenized samples were macerated at room temperature using distilled water and a 70% ethanol solution. The total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method, while antioxidant activity was assessed using the DPPH scavenging method and expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{mol TE/g}$).

The total phenolic content ranged from 36.11 ± 0.96 to 233.07 ± 1.66 mg GAE/g, depending on the type of solvent used and the state of the plant material. Based on the collected data, it can be concluded that using 70% ethanol significantly increases the efficiency of total phenolic extraction from rosemary. The highest antioxidant activity values were found in ethanol extracts ($712.70 \pm 1.90 - 934.06 \pm 0.77$ $\mu\text{mol TE/g}$), regardless of the provenance of plant material (urban/rural) or sample state (dry/fresh). Water extracts showed lower antioxidant activity values, regardless of the provenance and sample state (164.13 ± 4.04 to 247.30 ± 3.56 $\mu\text{mol TE/g}$), with the commercial sample water extract standing out (867.70 ± 1.98 $\mu\text{mol TE/g}$).

One-way ANOVA testing revealed no difference in antioxidant activity between samples from urban and rural areas ($0.317 > 0.05$), but there was a difference in the total phenolic content of the analyzed samples ($0.015 < 0.05$). T-test results indicated a difference in antioxidant activity based on the use of different solvents in the extraction process ($0.013 < 0.05$), but not in the total phenolic content ($0.137 > 0.05$).

KEY WORDS: rosemary, phenols, antioxidant activity, provenance