

Utjecaj ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem na koncentraciju karotenoida u talogu kadulje

Čermak, Dražena

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:518912>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno–biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Dražena Čermak

7220/N

**UTJECAJ EKSTRAKCIJE VISOKONAPONSKIM PRAŽNENJEM NA
KONCENTRACIJU KAROTENOIDA U TALOGU KADULJE**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno–istraživačkog projekta: Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa „zelenim otapalima“ primjenom visokonaponskog pražnjenja (IP-2016-06-1913)

Mentor: doc. dr. sc. Filip Šupljika

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno–biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: biotehničke znanosti
Znanstveno polje: nutricionizam

Utjecaj ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem na koncentraciju karotenoida u talogu kadulje

Dražena Čermak, 0058208551

Sažetak: Utjecaj ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem na koncentraciju karotenoida u talogu usitnjenih listova kadulje ispitan je pomoću ultraljubičaste i vidljive spektrofotometrije (UV-Vis spektrofotometrije). Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem nova je nekonvencionalna zelena metoda koja poboljšava ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz biljnih materijala. Prednost ove metode u tome je što se biljni materijal prilikom ekstrakcije znatno ne zagrijava pa ne dolazi to termičke degradacije osjetljivih bioaktivnih komponenti. Masena koncentracija ukupnih karotenoida, ksantofila i karotena u 90-postotnim metanolnim ekstraktima taloga kadulje, preostalim nakon tretiranja listova kadulje hladnom plazmom, te netretiranim uzorcima određena je primjenom Lichtenthalerovih jednadžbi nakon mjerenja apsorbancije na UV-Vis spektrofotometru. Pokazano je kako se djelovanjem visokonaponskog pražnjenja na kadulju u većini slučajeva smanjuje masena koncentracija karotenoida.

Ključne riječi: ekstrakcija, kadulja, karotenoidi, UV-Vis spektrofotometrija, visokonaponsko pražnjenje

Rad sadrži: 23 stranice, 5 slika, 2 tablice, 34 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno–biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Filip Šupljika

Datum obrane: 15. lipnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

The effect of high voltage discharge extraction on the concentration of carotenoids in the sage precipitate

Dražena Čermak, 0058208551

Abstract: The effect of high voltage discharge extraction on the concentration of carotenoids in the sage leaves precipitate was examined using a UV/Vis spectrophotometry. High voltage discharge extraction is a new, unconventional, green method which increases the extraction of bioactive components from plant materials. The advantage of this extraction method is the fact that it does not heat up the plant materials and, therefore, it does not cause the degradation of bioactive components susceptible to high temperatures. Mass concentrations of total carotenoids, carotens and xantophylls in 90% methanol extracts of precipitates were determined by Lichtenthaler's equations after an absorbance measurements using UV/Vis spectrophotometry. The results indicate that generally high voltage discharge extraction causes a reduction in mass concentration of carotenoids in plant materials.

Keywords: carotenoids, extraction, high voltage discharge, sage, UV/Vis spectrometry

Thesis contains: 23 pages, 5 figures, 2 tables, 34 references

Original in: Croatian

The thesis, in printed and electronic form, is deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Filip Šupljika, Assistant Professor

Defence date: June 15th 2020

Ovo istraživanje financirano je sredstvima znanstvenog projekta „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa „zelenim otapalima“ primjenom visokonaponskog pražnjenja“ Hrvatske zaklade za znanost (IP-2016-06-1913)

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
2.1	Karotenoidi	2
2.1.1	Svojstva, distribucija i biološka uloga karotenoida.....	4
2.1.2	Određivanje ukupnih karotenoida primjenom UV-Vis spektroskopije	7
2.2	Kadulja	10
2.3	Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem.....	11
3.	MATERIJALI I METODE	14
3.1	Biljni materijal.....	14
3.2	Kemikalije.....	14
3.3	Aparatura i pribor.....	14
3.4	Metode rada	14
3.4.1	Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem.....	14
3.4.2	Ekstrakcija pigmenata iz taloga	15
3.4.3	UV-Vis spektroskopsko određivanje koncentracije ukupnih karotenoida.....	15
4.	REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1	Uvod	16
4.2	Koncentracija karotenoida u talozima uzoraka tretiranih visokonaponskim pražnjenjem i kontrolnim uzorcima.....	16
4.3	Usporedba koncentracija karotenoida u talozima biljnih materijala tretiranih visokonaponskim pražnjenjem i kontrolnim uzorcima.....	17
5.	ZAKLJUČAK	19
6.	POPIS LITERATURE.....	20

1. UVOD

Karotenoidi su skupina žutih, narančastih i crvenih pigmenata koji su vrlo rašireni u prirodi, a posebno u biljnom svijetu. Pri dozrijevanju voća, karotenoidni pigmenti se esterificiraju, čime se nakupljaju te je intenzitet boje povezan sa zrelošću ploda. Karotenoidi su lipofilne molekule koje mogu apsorbirati vidljivi dio svjetlosti. Budući da su lipofilni, ne otapaju se u vodenom mediju već se najčešće nalaze u staničnim organelima plastidima – kloroplastima i kromoplastima.

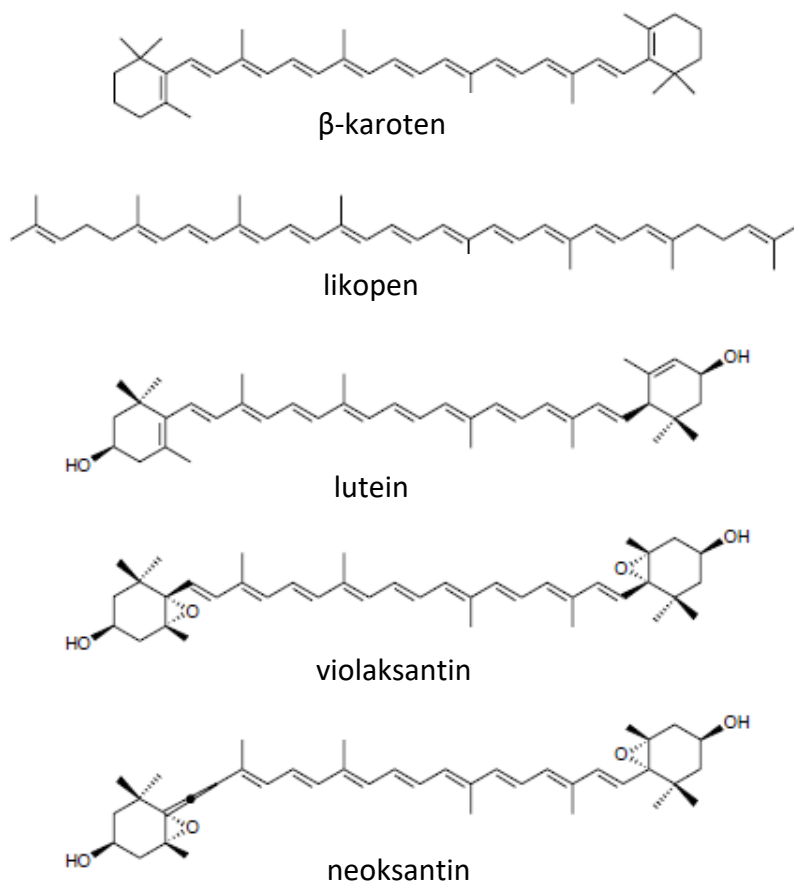
Karotenoidi su antioksidansi i prekursori vitamina A, moduliraju detoksikacijske enzime, jačaju imunološki sustav, reguliraju međustanične komunikacije, izazivaju stanične apoptoze i reguliraju ekspresiju gena. Važan su mikronutrijent i imaju brojne funkcije u tijelu, poput očuvanja vida i zaštite od slobodnih radikala. U prehrambenoj industriji upotrebljavaju se kao bojila pomoću kojih se poboljšava postojeća ili daje nova boja proizvodima te povećavaju nutritivna vrijednost i lipofilni antioksidativni potencijal.

Upravo zbog toga nastoje se usavršiti učinkovite metode ekstrakcije i proizvodnje pigmenata pomoću biljnih materijala i bakterija kao zamjena za kemijsku sintezu u laboratoriju. Budući da ne dolazi do stvaranja topline, ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem nameće se kao mogući način ekstrakcije karotenoida. U ovom radu istražio se učinak ekstrakcije potpomognute visokonaponskim pražnjenjem na koncentraciju karotenoida u biljnom materijalu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Karotenoidi

Karotenoidi su skupina žutih, narančastih i crvenih pigmenata koji su vrlo rašireni u prirodi, a posebno u biljnom svijetu jer ih se godišnje proizvede oko 10^8 tona. Povijest karotenoida započinje 1831. godine kad je Wackenroder izolirao narančasti pigment iz korijena mrkve i nazvao ga „carotene“ po latinskoj riječi „carota“ (Fernandes i sur, 2018). Berzelius je žutom pigmentu u jesenjem lišću dao naziv „xanthophylls“, a 1929. godine nekoliko je znanstvenih radova von Eulera, Karrera i Moorea prikazalo povezanost karotenoida i vitamina A, otkrivajući tako njihovu nutritivnu vrijednost. Daljnjim razvojem znanosti i analitičkih metoda broj otkrivenih karotenoida porastao je s 11 iz 1934. na više od 1178 danas (Fernandes i sur, 2018).



Slika 1. Strukturne formule nekih karotenoida (Hurst, 2008).

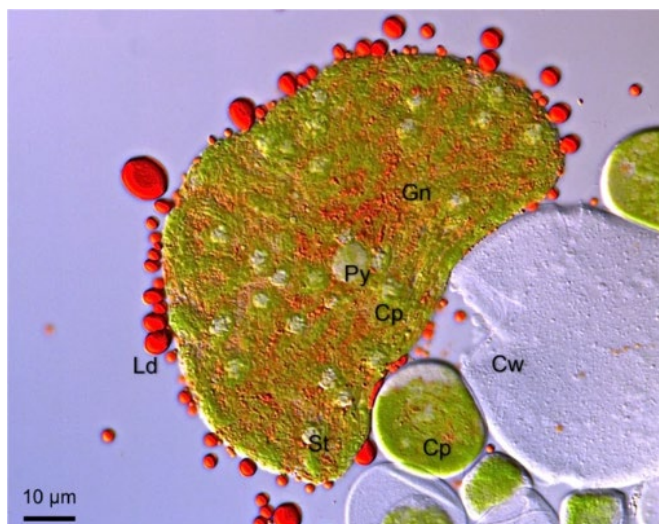
Karotenoidi, koji se prirodno pojavljuju u voću i povrću, imaju cikličku ili alifatsku strukturu od četrdeset ugljikovih atoma (Slika 1). Svi imaju sustavno ime koje je odobrila Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC), a često i trivijalno ime koje podsjeća na prirodni izvor iz kojeg su izolirani (Weedon i Moss, 1995).

Tablica 1. Prirodni izvori karotenoida (Hurst, 2008).

<i>KAROTENOIDI</i>	<i>PRIRODNI IZVORI</i>
<i>Karoteni</i> <i>α-karoten, β-karoten, γ-karoten, δ-karoten,</i> <i>ζ-karoten, ε-karoten</i>	voće i povrće, posebice mrkva, batat, plodovi palme; šipak je dobar izvor γ-karotena; mutirana delta rajčica ima δ-karoten kao glavni karoten
<i>likopen i neurosporen</i>	rajčica (<i>Lycopersicon esculentum</i>), lubenica, šipak (<i>Rosa spp.</i>)
<i>fitofluen i fitoen</i>	voće, cvijeće i korijenje (mrkva) bogato karotenoidima
<i>Ksantofili</i>	
<i>anteraksantin</i>	prašnici i latice brojnog žutog cvijeća; također u voću i povrću
<i>astaksantin</i>	perje ptica, riba (losos), beskralježnjaci (jastozi, <i>Homarus gammarus</i>)
<i>biksin i norbiksin</i>	sjemenke anato (<i>Bixa orellana</i>)
<i>kantaksantin</i>	uglavnom sintetički, prirodni izvor su neke cijanobakterije i zelene alge
<i>kapsantin, kapsantin-5, 6-epoksid, kapsorubin</i>	zrelo voće <i>Capsicum annum</i>
<i>krocetin</i>	cvijeće <i>Crocus sativus</i>
<i>kukurbitaksantin A</i>	<i>Cucurbita maxima</i>
<i>laktuakaksantin</i>	listovi <i>Lactuca sativa</i>
<i>lutein, violaksantin, neoksantin, mutatoksantin</i>	zeleno voće, povrće i cvijeće
<i>luteoksantin, neokrom, auroksantin</i>	u povrću i voću podvrgnutom fermentaciji ili obradi u kiselim uvjetima
<i>tubiksantin</i>	šipak (<i>Rosa spp.</i>)
<i>zeaksantin, β-kriptoksantin, α-kriptoksantin, kriptoksantin-5, 6-epoksid</i>	sjemenke (kukuruz), cvijeće, voće: mango, papaja, kaki

2.1.1 Svojstva, distribucija i biološka uloga karotenoida

Karotenoidi se mogu pronaći u životinjama koje ih unose hranom te biljkama i bakterijama koje ih mogu sintetizirati (Tablica 1). Kod životinja, karotenoidi se skladište u različitim tkivima. Počevši od najranijeg stadija života, žumanjak jajeta bogat je ksantofilima luteinom, zeaksantinom i β -karotenom koji su važni za razvoj i nutritivnu potporu embrija. Kod beskralješnjaka, karotenoidi se udružuju u karotenoproteine koji egzoskeletu daju različite boje, od zelene, plave i ljubičaste do sive (Goodwin, 1976). Boja je nerijetko zaštitne prirode jer organizme prilagođava okolišu i tako štiti od predatora, a može služiti i za zaštitu od nepovoljnih životnih uvjeta (Slika 2), poput štetnog radioaktivnog djelovanja.

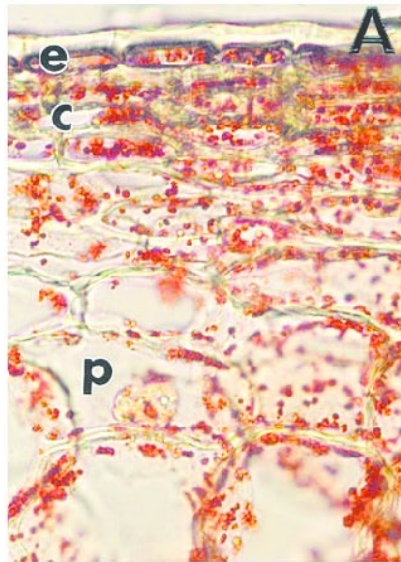


Slika 2. Jednostanična zelena alga *Haematococcus pluvialis* sadrži brojne kapljice bogate ksantofilom astaksantinom koji ju štiti od nepovoljnih životnih uvjeta, poput jakog svjetla. Cp – kloroplast, Cw – stanična stijenka, Gn – praznine u kloroplastima, Ld – lipidna kapljica s astaksantinom, St – granule škroba, Py - pirenoidi (Ota i sur., 2018)

U biljnom svijetu karotenoidi se mogu pronaći u velikom rasponu koncentracija, a preraspodjela je nasumična. U zelenom bilju dominantni su klorofili i β -karoten, dok su ksantofili prisutni u vrlo malim koncentracijama u slobodnom obliku. Pri dozrijevanju voća, karotenoidni pigmenti se esterificiraju, čime se nakupljaju u plastidima te je intenzitet boje povezan sa zrelošću ploda. Dominiraju ksantofili pa tako kukuruz sadrži najviše luteina i zeaksantina, mango β -kriptoksantina i zeaksantina, rajčica likopena, a postoje i slučajevi u

kojima su karotenoidi specifični samo za određenu vrstu, poput kapsantina i kapsorubina koji daju specifičnu crvenu boju biljkama roda *Capsicum*.

Karotenoidi su lipofilne molekule koje mogu apsorbirati vidljivi dio svjetlosti. Budući da su lipofilne molekule, ne otapaju se u vodenom mediju već se najčešće nalaze u staničnim organelima plastidima – kloroplastima i kromoplastima. Kloroplasti su ispunjeni klorofil-karotenoid-protein kompleksima (fotosistem) na tilakoidnim membranama, gdje karotenoidi imaju pomoćnu ulogu u apsorpciji sunčeve svjetlosti i fotosintezi (Frank i Cogdell, 1993). Pri fotosintezi, karotenoidi imaju i dodatnu ulogu zaštite vrlo reaktivnih tripleta klorofila od oksidacije za vrijeme prikupljanja svjetlosne energije. Kromoplasti sadrže karotenoide nakupljene u plastoglobulama – strukturama bogatima lipidima (Slika 3).



Slika 3. Poprečni presjek perikarpa ploda *Capsicum annuum* (A) sadrži brojne kromoplaste koji mu daju crvenu boju. c - kolenhim, e - epiderma, p – parenhim. (Weryszko-Chmielewska i Michałojć, 2011)

Apsorpcija vidljivog dijela elektromagnetskog spektra moguća je jer molekule karotenoida imaju kromofor - π -konjugirani elektronski sustav, odnosno niz nezasićenih dvostrukih veza između ugljikovih atoma koje apsorbiraju svjetlost, a što se opisuje Lambert-Beerovim zakonom. Vrijednosti valnih duljina apsorbiranog zračenja ovisit će o veličini kromofora, odnosno o broju konjugiranih veza. Važno je naglasiti da su upravo zbog mnogobrojnih dvostrukih veza molekule karotenoida izuzetno podložne oksidaciji i izomerizaciji pod utjecajem svjetlosti, temperature i niske pH-vrijednosti, što se mora uzeti u obzir pri odabiru metoda za ekstrakciju i analizu karotenoida.

Maksimum apsorpcije funkcija je broja konjugiranih dvostrukih veza u molekuli koje se označavaju rimskim brojevima. Na položaj maksimuma apsorpcije može se utjecati uvođenjem novih konjugiranih dvostrukih veza - čime se uvodi batokromni pomak prema višim valnim duljinama, kiselom sredinom - čime se uvodi hipsokromni pomak, izomerizacijom - gdje se maksimum približava ultraljubičastom dijelu elektromagnetskog spektra te upotrebom otapala različite polarnosti. Napolarna ili vrlo malo polarna otapala u pravilu ne utječu na pomak apsorpcijskog maksimuma, dok polarna i vrlo polarna otapala daju znatne batokromne pomake. Neka od najčešće upotrebljivanih pogodnih otapala su heksan, petrolej, dietileter, metanol i etanol, dok otapala kao što su aceton, kloroform, benzen i piridin treba izbjegavati.

Karotenoidi su antioksidansi i prekursori vitamina A, što je moguće jer molekule sadrže barem jednu nesupstituiranu skupinu na β -prstenu (Krinsky, 1988). Najvrjedniji je β -karoten zato što ga čine dvije molekule vitamina A, dok ostali karotenoidi sadržavaju samo jednu. Iako bi se iz toga dalo zaključiti da jedna molekula β -karotena u konačnici daje dvije molekule vitamina A, u organizmu se to ne događa. Probava pigmenata uključuje njihov unos u kapljice lipida koje će tvoriti micelle, apsorpciju micela u crijevima, transport krvotokom u hilomikronima i metabolizam tijekom kojeg dolazi do gubitaka zbog smanjene bioiskoristivosti, posebno ako je unos masti nizak ili unos prehrambenih vlakana vrlo visok (Faulks i Soughton, 2005). Kuhanjem se bioiskoristivost karotenoida povećava. Karotenoidi se u organizmu prevode u retinol u mukozi tankog crijeva uz pomoć enzima β -karoten-15,15'-dioksidaze, koji djeluje na β -karoten i cijepa ga na dvije molekule retinala koje se prevode u retinol i pohranjuju u jetri. Godine 1967. istraživanjem pod pokroviteljstvom Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) i Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), utvrđeno je da se samo trećina karotenoida apsorbira u crijevu, a od toga se samo polovica β -karotena prevede u retinol. Iz svega navedenog može se zaključiti da je tek šestina β -karotena iskorištena za dobivanje vitamina A. Početkom 21. stoljeća, točnije 2001. godine, definiran je RAE – ekvivalent aktivnosti retinola, tako da 1 mg RAE = 12 mg β -karotena, dok je za sve ostale omjer 1 : 24. Ove je odnose važno imati na umu znajući da su sve biljne namirnice bogate β -karotenom i ostalim prekursorima, dok životinjske namirnice ne sadrže β -karoten već retinilne estere koji se hidroliziraju u retinol. Osim provitaminskog djelovanja, karotenoidi moduliraju detoksikacijske enzime, jačaju imunološki sustav, reguliraju međustanične komunikacije, izazivaju stanične apoptoze i reguliraju ekspresiju gena. Antioksidativno djelovanje karotenoida očituje se kroz reakciju sa slobodnim radikalima koji inhibiraju inicijaciju lančane reakcije oksidacije molekula i štite lipoproteine niske gustoće (LDL) od oksidacije. Epidemiološke studije povezuju konzumiranu

količinu karotenoida (više od 4 mg/dan) (Biesalski i sur., 1997) sa smanjenim rizikom od pojave kroničnih bolesti, a ta se količina vrlo lako dostiže dnevnim unosom od 5 obroka voća i povrća.

Karotenoidi se u prehrambenoj industriji upotrebljavaju kao bojila kojima se poboljšava postojeća ili daje nova boja proizvodima te povećavaju nutritivna vrijednost i lipofilni antioksidativni potencijal proizvoda (Downham i Collins, 2000). Dodaju se izravno u proizvode bogate lipidima, poput maslaca, sira i ulja jer se u takvom mediju mogu otopiti, ali i u hranu za stoku i perad čime se osigurava obogaćivanje mlijeka i jaja β -karotenom prirodnim putem. U industriji se sintetski može proizvesti osam karotenoida u mikrokristaliničnoj formi koja se dodaje u proizvode bogate mastima ili u obliku koloida koji se dodaju u hranu bogatu vodom. Sve se više naginje proizvodnji karotenoida prirodnim putem jer je prihvatljiviji za okoliš pa je tako moguća ekstrakcija iz prirodnih izvora ili proizvodnja pomoću mikroorganizama. Iako je ekstrakcija dobra alternativna metoda kemijskoj sintezi, pitanje je koliko je uporaba organskih otapala sigurna, u kojoj mjeri ta otapala zaostaju uz pigmente te što još otapaju osim željenih pigmenta. Proizvodnja karotenoida mikroorganizmima metoda je koja će se sigurno sve više upotrebljavati u budućnosti, a posebno s razvojem genetičkog inženjerstva i proširivanjem znanja o sintezi karotenoida i genetici koja stoji iza tog procesa. Danas se nastoji uvesti proizvodnja upotrebom bakterija, plijesni i mikroalgi.

Karotenoidi se kao suplementi upotrebljavaju za liječenje hipovitaminoze ili za smanjenje nuspojava eritropoetske protoporfirije te kao zaštitni čimbenik protiv radijacije u pacijenata oboljelih od raka. Manjak vitamina A u tijelu uzrokuje noćno sljepilo jer je onemogućena sinteza proteina i diferencijacija stanica, dok višak može biti čimbenik u razvoju osteoporoze. Suplementi se ne preporučaju pušačima budući da je među njima uočena veća incidencija raka pluća, koja se može objasniti prooksidacijskim djelovanjem β -karotena u okolini s reaktivnim kisikovim česticama iz duhanskog dima i visokom tlaku kisika u plućima (Palozza i sur., 1995).

2.1.2 Određivanje ukupnih karotenoida primjenom UV-Vis spektroskopije

UV-Vis spektroskopija upotrebljava se za određivanje prisutnosti n -konjugiranog elektronskog sustava neke molekule promatrajući učinke vezane za emisiju i apsorpciju

elektromagnetskog zračenja valne duljine od 200 do 800 nm, točnije pobuđivanje valentnih elektrona i njihov prijelaz u više energetske nivoe. Apsorpcija je opisana Lambert–Beerovim zakonom:

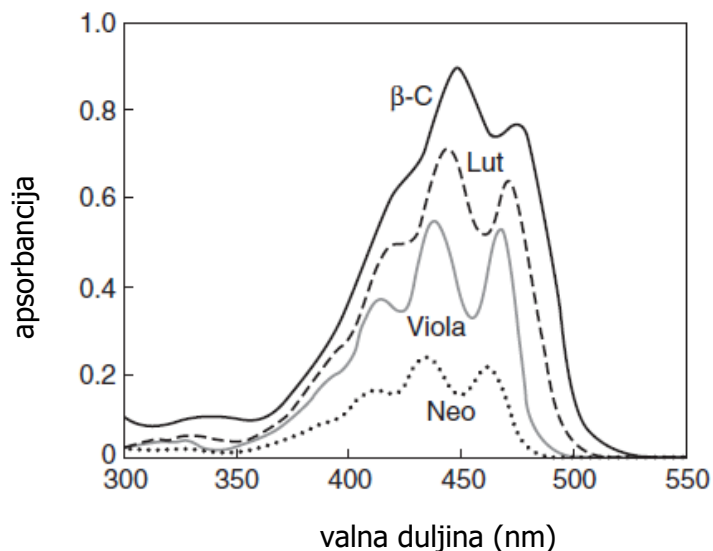
$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

pri čemu je A apsorbancija, I_0 je intenzitet ulazne zrake, a I intenzitet zrake nakon prolaska kroz uzorak, ili:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

pri čemu je ε molarni apsorpcijski koeficijent ($L/cm^1 mol^{-1}$), c množinska koncentracija (mol/L) i l duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm).

Kvantitativno određivanje klorofila i karotenoida u biljnim materijalima zahtjevno je jer ovisi o vrsti uzorka, otapalu za ekstrakciju i spektrofotometru. Ujedno, te stavke utječu i na apsorpcijske maksimume pigmenata (Lichtenthaler, 1987) vidljive na Slici 4. Prikazani karotenoidi imaju široku apsorpcijsku vrpcu s tri maksimuma u plavom dijelu spektra, između 400 i 500 nm, ovisno o samoj molekuli.



Slika 4. Apsorpcijski spektar značajnijih karotenoida iz fotosintetskih biomembrana zelenih listova viših biljaka u dietil-eteru (čisto otapalo). Karotenoidi su izolirani iz ekstrakta pomoću tankoslojne kromatografije po Lichtenthaleru i Pfisteru (1978). β -C - β -karoten, Lut - lutein, Neo - neoksantin, Viola - violaksantin.

S obzirom na to da promjenom otapala dolazi do pomaka apsorpcijskog maksimuma, važno je maksimume apsorpcije očitavati na točnoj valnoj duljini, koja je za karotenoide na 470 nm (A_{470}) i u točno određenom otapalu. Klorofil b pri danoj valnoj duljini također apsorbira znatnu količinu svjetlosti; stoga je važno precizno odrediti njegovu količinu u uzorku kako bi se dobila i točna količina karotenoida. Vrijednost apsorpcije pri 470 nm (A_{470}) za ukupne karotenoide, ksantofile i karotene ($x + c$) moguće je odrediti u zbroju s apsorpcijama klorofila a i b pomoću Lambert–Beerovog zakona:

$$A_{470} = A_{(a)470} + A_{(b)470} + A_{(x+c)470}$$

odnosno:

$$A_{(a)470} = \varepsilon_{(a)470} \cdot c_a \cdot l$$

$$A_{(b)470} = \varepsilon_{(b)470} \cdot c_b \cdot l$$

$$A_{(x+c)470} = \varepsilon_{(x+c)470} \cdot c_{x+c} \cdot l$$

Ako se u jednadžbe umjesto duljine puta l uvrsti debljina kivete od 1 cm, koncentracija ukupnih karotenoida, ksantofila i karotena može se izdvojiti kao:

$$c_{(x+c)} = \frac{A_{(x+c)470} - (\varepsilon_{(a)470} \cdot c_a) - (\varepsilon_{(b)470} \cdot c_b)}{\varepsilon_{(x+c)470}}$$

Masene koncentracije pigmentata, u $\mu\text{g/mL}$, mogu se izračunati pomoću empirijskih jednadžbi koje su dane za različita otapala, dok će u ovom radu biti upotrijebljene jednadžbe za 90-postotni metanol:

$$\gamma_a / \mu\text{g mL}^{-1} = 16,28 A_{665,2} - 9,28 A_{652,4}$$

$$\gamma_b / \mu\text{g mL}^{-1} = 36,92 A_{652,4} - 16,54 A_{665,2}$$

$$\gamma_{(x+c)} / \mu\text{g mL}^{-1} = \frac{(1000 A_{470} - 1,91 \gamma_a - 95,15 \gamma_b)}{225}$$

2.2 Kadulja

Kadulja (lat. *Salvia officinalis* L.) sredozemna je biljka iz porodice usnača (lat. *Lamiaceae*) koja se može pronaći pod mnogim drugim nazivima poput bijelog kolpera, divljeg kuša, prave kadulje, ljekovite kadulje, slavulje, kalavera, pitomog pelina i džinger trave. Potječe s balkanskog poluotoka, a uspijeva u vapnenačkim kamenjarima, uz umjerenu izloženost suncu. Klija pri temperaturama od 12 do 15 °C od svibnja do kraja lipnja. Samonikla je biljka dalmatinskog zaleđa, Dalmacije i Primorja, a zbog svojstava, osim u Europi, upotrebljava se i u Sjevernoj Americi. Višegodišnja je biljka koja može cvasti do 7 godina, otporna na sušu zbog drvenastog korijena koji duboko prodire u tlo. Mlada je stabljika zelena, a kasnije odrveni, dok su svijetlozeleni listovi jajastog oblika i prekriveni gustim dlačicama. Cvat kadulje ljubičaste je boje, raste u klasu od 2 do 8 cvjetova. Sjeme je tamnosmeđe boje i otvrdne kada je zrelo, što je najčešće u kolovozu, a može proklijati i nakon 3 do 4 godine. Eterično ulje kadulje nalazi se u nadzemnom dijelu biljke, posebno u listovima, a nakon sušenja udio mu je do 2,7 %. Uglavnom se iskorištavaju mladi ogranci, listovi i herba te cvijet (Grlić, 1985).

Herba se kosi vučenim samoutovarnim strojem na visini od 8 do 10 cm, čime se u dva otkosa po hektaru dobije do 8 tona svježeg bilja. Nakon berbe, biljni se materijal prosijava na sitima kako bi se uklonile nečistoće. Zatim se reže da bi se povećala dodirna površina biljnog materijala sa suhim zrakom radi ubrzanja sušenja. Suši se u komorama ili tunelskim sušarama cirkulacijom vrućeg zraka pri temperaturi do 40 °C, pri čemu se udio vode u biljci smanjuje s 90 % na 5 do 10 %. Suhi se listovi izdvajaju od ostatka herbe trljanjem i ventiliranjem. Krupni listovi izdvajaju se kao materijal za čajeve, a sitniji idu na daljnju obradu i mljevenje za proizvodnju začina. Herba, odvojena od listova prosijavanjem, dalje se upotrebljava za destilaciju eteričnog ulja. Sušenjem 8 tona svježeg ubranog bilja dobije se do 2 tone sušenog proizvoda (Grlić, 1985).

Kadulja je bogata monoterpenskim ketonima, koji čine 60 % ukupne aktivne tvari. Najvažniji su antioksidansi ružmarinska kiselina i luteolin 7-O- β -glukuronid (Kowalczyk i sur., 2020), a osim njih sadrži i karnozol, karnozinsku kiselinu, kofeinsku kiselinu, rozmanol i rozmadial, genkvanin i cirsimaritin (Cuvelier i sur., 1996). Ružmarinska i karnozinska kiselina te karnozol imaju izrazito visok antioksidativni kapacitet tako da kadulja i ružmarin imaju

najvišu antioksidativnu aktivnost od svog začinskog bilja (Chipault i sur., 1952; Lu i Yeap Foo, 2001). Komponente kadulje najčešće se izdvajaju ekstrakcijom etanolom i metanolom, a zatim je potrebna vakuumska destilacija vodenom parom kako bi se uklonio alkohol i proizvod učinio sigurnim za daljnju uporabu.

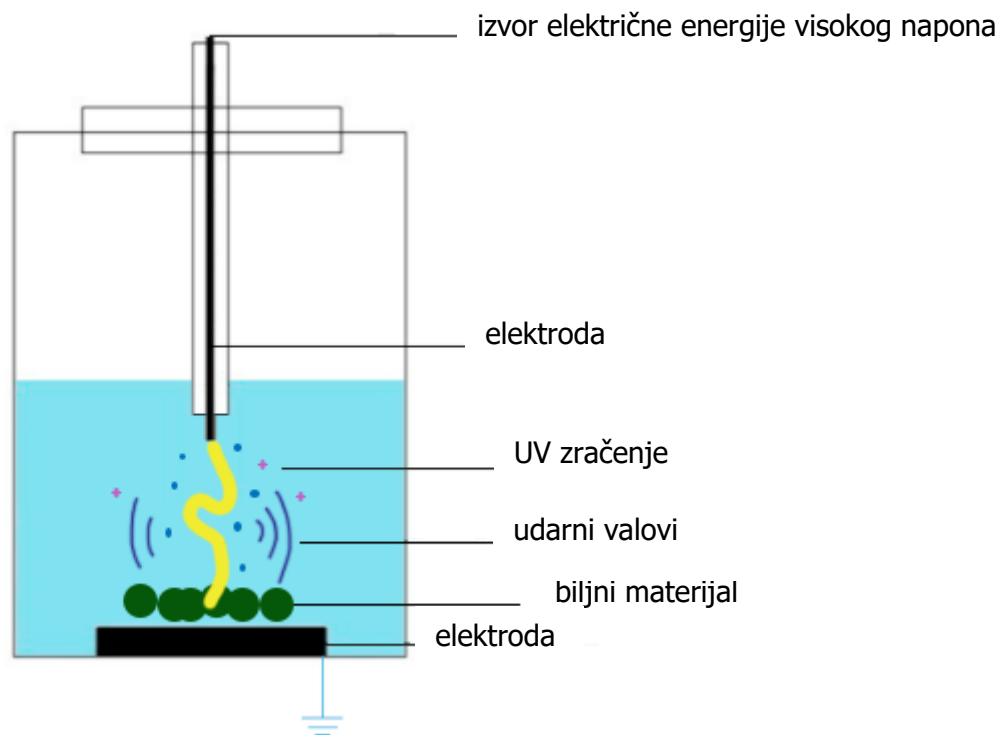
Zbog svog sastava, kadulja ima antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, antiviralno, antimutageno i gastroprotektivno djelovanje i povoljno djeluje kod dijabetesa (Grdiša i sur., 2015). Poboljšava raspoloženje i koncentraciju te sekundarno pamćenje kod starijih ljudi jer djeluje pozitivno na bolesti živčanog sustava i pamćenje (Khan i sur., 2011; Eidi i sur., 2006). Biljka i njena eterična ulja upotrebljavaju se u prehrambenoj industriji kao začim, a u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji u proizvodnji parfema, šampona, deterdženata, preparata za znojenje te preparata za masnu i osjetljivu kožu (Grdiša i sur., 2015). U medicini je aktivni sastojak preparata za njegu zubi (Kermanshah i sur., 2009) te kombiniranih biljnih pripravaka za liječenje akutnog i kroničnog bronhitisa.

U domaćinstvu se od kadulje pripremaju čajevi, sirupi i rakija. Sirupi se pripremaju od cvatova i mogu se piti neograničeno s obzirom na to je koncentracija tujona u vrijeme berbe mala pa ne može doći do trovanja. Rakija se mora piti u malim količinama jer se radi od zrelog lišća koje ima veću koncentraciju tujona i kamfora te u kombinaciji s alkoholom može doći do trovanja u vidu oštećenja živčanog sustava i demencije (Baricevic i sur., 2001). Čajevi se upotrebljavaju za ispiranje desni, usta i grla i oblaganje rana radi dezinfekcije, protiv prehlade, upale mokraćnih putova, stvaranja čireva i upale žući. Tijekom trudnoće i dojenja, savjetuje se izbjegavanje preparata koji sadrže kadulju (Grdiša i sur., 2015).

2.3 Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem

Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem nova je nekonvencionalna zelena metoda koja poboljšava ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz biljnih materijala (Brianceau i sur., 2016). Pražnjenje u otapalu, zahvaljujući visokom naponu, između dviju elektroda stvara plazmu koja pokreće kemijske i fizikalne reakcije u tekućini. Način na koji plazma nastaje u otopinama još nije sa sigurnošću poznat, no dostupne su dvije teorije - u jednoj je ona rezultat nastanka mjehurića u kojima se slobodni elektroni ubrzavaju zbog prisutnosti električnog polja, što dovodi do sudaranja s drugim česticama i njihove ionizacije, dok je u drugoj rezultat

povećanja broja nosioca naboja u ioniziranoj tekućini. I u jednom i u drugom slučaju plazma emitira UV zračenje visokog intenziteta, udarne valove i hidrosilne radikale koji pridonose mehaničkom i oksidativnom oštećenju biljnog materijala, a posljedično i ekstrakciji znatnih količina željenih spojeva u otapalo (Slika 5). Prednost ove metode u tome je što se biljni materijal prilikom ekstrakcije ne zagrijava znatno pa ne dolazi to termičke degradacije osjetljivih bioaktivnih komponenti.



Slika 5. Shematski prikaz visokonaponskog pražnjenja u otopini

Plazma je četvrto stanje tvari, ionizirani plin koji sadrži jednaki broj nabijenih čestica iona i elektrona koji se slobodno kreću i omogućavaju protok električne energije. Opisuje se pomoću temperature čestica, gustoće čestica i jačine stacionarnog magnetskog polja (Milošević, 2008) te je u prirodi vidljiva kao polarna svjetlost, munja za vrijeme oluje, plamen i sunce, dok se u znanosti i industriji istražuje tek od sredine 20. stoljeća. Prirodno nastaje dovođenjem velike količine energije plinu, pri čemu se povećavaju kinetička energija atoma, temperatura i broj međusobnih sudara te se atomi razdvajaju na pozitivno nabijene ione i

negativno nabijene elektrone. Nastaju pobuđene čestice koje emitiraju fotone, što je vidljivo kao svjetlost ili bljesak. U laboratorijima se dobiva korištenjem električne energije koja prenosi energiju na elektrone u plinu ili tekućini, čime se nastoji postići sudaranje između čestica.

Začeci istraživanja s plazmom između 1960. i 1990. godine otkrivaju skromnu mogućnost uporabe u dezinfekciji i sterilizaciji (Laroussi, 2008), npr. medicinskih instrumenata. Međutim, znanstvenici su uvidjeli da bi hladna plazma mogla biti vrlo uspješna zamjena za konvencionalne metode obrade hrane zato što se ne upotrebljavaju toplina, visok tlak niti vakuum (Laroussi, 1996). Umjesto topline, pri sobnoj temperaturi uočena su tri mehanizma inaktiviranja mikroorganizama (Moisan i sur., 2002): djelovanje reaktivnih radikala na stanične membrane te oštećenje membrana i molekula DNA UV zračenjem. Primjene su moguće u prehrambenoj industriji za dekontaminaciju namirnica i prehrambenih proizvoda poput mesa (Misra i Jo, 2017), produljenje roka trajanja namirnica (Wang i sur., 2016), izradu aktivnog i inteligentnog pakiranja hrane (Pankaj i Keener, 2017), poboljšanje funkcionalnih svojstava namirnica poput kraćeg vremena kuhanja i ekstrakciju bioaktivnih komponenti te u agronomiji za poboljšanje germinacije sjemena, razgradnju pesticida i kao insekticid (Sarangapani i sur., 2018).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Biljni materijal

- osušeni i ultracentrifugalnim mlinom ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Njemačka) usitnjeni listovi kadulje (Franck, Zagreb, Hrvatska)

3.2 Kemikalije

- destilirana voda
- 25-postotna vodena otopina etanola
- 50-postotna vodena otopina etanola
- 90-postotna vodena otopina metanola
- aceton

3.3 Aparatura i pribor

- analitička vaga
- laboratorijske tikvice i čaše
- menzura
- magnetska miješalica
- zaporna ura (štoperica)
- Büchnerov lijevak
- kvarcne kivete
- mikrofiltrar s porama od 0,2 μm
- UV-Vis spektrofotometar PerkinElmer Lambda 25

3.4 Metode rada

3.4.1 Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem

Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim pražnjenjem provedena je u Laboratoriju za održivi razvoj PBF-a u sklopu projekta „Greenvoltex“. Određena masa biljnog materijala, odnosno kadulje ($m = 1$ g) suspendirana je u 50 mL destilirane vode odnosno smjese etanola i destilirane vode (1 : 1 i 1 : 3, nakon čega je podvrgnuta ekstrakciji hladnom plazmom (20

kV, 100 Hz) u struji argona u trajanju od 9 minuta. Suspenzije kontrolnih (netretiranih) uzoraka ($m = 1$ g) u istom otapalu ili smjesi otapala pripremljene su miješanjem biljnog materijala (kadulje) magnetskom mješalicom na sobnoj temperaturi 9 minuta. Daljnja obrada i analiza kontrolnih i tretiranih uzoraka provodila se na identičan način.

3.4.2 Ekstrakcija pigmenata iz taloga

Tretirani i kontrolni uzorci kadulje filtrirani su kroz Büchnerov lijevak dva puta kako bi se odvojio talog od ekstrakta. U talog se zatim ulilo 30 mL 90-postotne vodene otopine metanola te se smjesa na magnetskoj mješalici ekstrahirala petnaest minuta. Smjesa je filtrirana kroz mikrofiltrar s veličinom pora od 0,2 μm kako bi se otopina metanola za analizu odvojila od taloga kadulje.

3.4.3 UV-Vis spektroskopsko određivanje koncentracije ukupnih karotenoida, ksantofila i karotena

Parametri snimanja na UV-Vis spektrofotometru:

- početna valna duljina: 350 nm
- konačna valna duljina: 700 nm
- interval: 0,5 nm
- brzina snimanja: 480 nm min⁻¹

Masena koncentracija ukupnih karotenoida, ksantofila i karotena u 90-postotnim metanolnim ekstraktima taloga kadulje, preostalim nakon tretiranja listova kadulje hladnom plazmom, te netretiranim uzorcima određena je primjenom Lichtenthalerovih jednadžbi (Poglavlje 2.1.2) nakon mjerenja apsorbancije na UV-Vis spektrofotometru.

Mjerenja su provedena na dvoznačnom UV-Vis spektrofotometru tako da se u jednu kvarcnu kivetu stavilo otapalo (90-postotna vodena otopina metanola), a u drugu ekstrakt. Očitana je apsorbancija uzorka pri valnim duljinama od 665,2 nm, 652,4 nm i 470 nm, a zatim je masena koncentracija ukupnih karotenoida, ksantofila i karotena u ekstraktu izračunata pomoću Lichtenthalerovih jednadžbi (Poglavlje 2.1.2).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Uvod

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljnih materijala djelovanjem visokonaponskog električnog pražnjenja pokazala se metodom koja zahtijeva manji utrošak otapala i energije te traje kraće, a rezultira povećanim prinosima. U ovome su radu upotrijebljeni tretirani uzorci usitnjenih listova kadulje dobiveni ekstrakcijom visokonaponskim pražnjenjem te netretirani usitnjeni listovi kadulje kao kontrolna skupina. Cilj pokusa bio je istražiti utjecaj ekstrakcije listova kadulje visokonaponskim pražnjenjem na koncentraciju karotenoida u nastalom talogu. Cjelokupni eksperiment, od ekstrakcije hladnom plazmom do ekstrakcije otopinom metanola i filtracije, ponovljen je tri puta, neovisno jedan o drugome.

4.2 Koncentracija karotenoida u talozima uzoraka tretiranih visokonaponskim pražnjenjem i kontrolnim uzorcima

Osušeni, usitnjeni listovi kadulje podvrgnuti su ekstrakciji visokonaponskim pražnjenjem u vodi, 25-postotnoj i 50-postotnoj vodenoj otopini etanola, a netretirani uzorci ekstrahirani su u jednakim smjesama otapala miješanjem u magnetskoj miješalici. Obje su grupe uzoraka profiltrirane te podvrgnute ekstrakciji u 90-postotnoj vodenoj otopini metanola, a zatim mjerenju apsorbancije spektrofotometrom. Karotenoidi su hidrofobne, lipofilne molekule, što znači da se dobro otapaju u nevodenim otapalima i mastima. Za izračun koncentracije karotenoida potrebno je, uz same karotenoide, poznavati i koncentracije klorofila *a* i *b* koji svojstva topljivosti dijele s karotenoidima. Zbog toga se u početnim otapalima za ekstrakciju (vodi te 25-postotnim i 50-postotnim vodenim otopinama etanola) ne može pronaći znatnija količina otopljenih pigmenata. Stoga je daljnja ekstrakcija provedena otopinom metanola u kojoj će se pigmenti puno uspješnije ekstrahirati te će im biti moguće odrediti masenu koncentraciju koristeći se jednadžbama iz poglavlja 2.1.2. Dobivene koncentracije klorofila *a* i *b* te karotenoida izražene su kao $\mu\text{g mL}^{-1}$, a prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Masena koncentracija klorofila *a* i *b* te karotenoida u 90-postotnim metanolnim ekstraktima taloga tretiranih i netretiranih uzoraka

<i>uzorak</i>	otapalo	γ_a	$\bar{\gamma}_a / \mu\text{g mL}^{-1}$	γ_b	$\bar{\gamma}_b / \mu\text{g mL}^{-1}$	$K_{(x+c)}$	$\bar{\gamma}_{(x+c)} / \mu\text{g mL}^{-1}$
		(klorofil a) / $\mu\text{g mL}^{-1}$		(klorofil b) / $\mu\text{g mL}^{-1}$		(karotenoidi) / $\mu\text{g mL}^{-1}$	
<i>netretirani</i>	voda	2,42	2,19±	0,89	0,73±	1,81	1,57±
		2,06	0,20	0,60	0,15	1,43	0,21
		2,08		0,69		1,47	
<i>tretirani</i>	voda	1,98	1,85±	0,77	0,69±	1,36	1,24±
		1,75	0,12	0,67	0,07	1,18	0,10
		1,81		0,64		1,18	
<i>netretirani</i>	25- postot na	2,34	2,45±	1,11	1,25±	1,94	1,99±
		2,68	0,20	1,47	0,19	2,08	0,08
		2,33		1,18		1,96	
<i>tretirani</i>	otopin a etanola	1,79	1,99±	0,82	0,89±	1,32	1,53±
		1,99	0,20	0,91	0,07	1,59	0,19
		2,19		0,96		1,69	
<i>netretirani</i>	50- postot na	2,11	2,28±	1,99	1,94±	1,85	1,81±
		2,39	0,15	1,94	0,05	1,81	0,03
		2,34		1,89		1,78	
<i>tretirani</i>	otopin a etanola	2,49	2,47±	1,71	1,54±	1,97	1,94±
		2,81	0,34	1,74	0,33	2,06	0,13
		2,12		1,16		1,79	

4.3. Usporedba koncentracija karotenoida u talozima biljnih materijala tretiranih visokonaponskim pražnjenjem i kontrolnim uzorcima

Nakon ekstrakcije listova kadulje vodom uočeno je smanjenje koncentracije klorofila *a* za 15 % i klorofila *b* za 5 % kod tretiranih uzoraka u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Smanjena koncentracija pigmenata zabilježena je i u talozima ekstrahiranim s vodenim otopinama etanola. Kod uzoraka tretiranih visokonaponskim pražnjenjem smanjila se

koncentracija klorofila *a* i *b* za 18 % te 29 % u 25-postotnoj vodenoj otopini etanola, a u 50-postotnoj vodenoj otopini etanola koncentracija klorofila *b* smanjena je za 21 %, ali je koncentracija klorofila *a* viša za 18 % u usporedbi s netretiranim uzorcima.

Masene koncentracije karotenoida u tretiranim uzorcima prate sličan trend smanjenja kao i koncentracije klorofila *a*. Zabilježeno je smanjenje koncentracije karotenoida u talozima tretiranim visokonaponskim pražnjenjem ekstrahiranim s vodom i 25-postotnom vodenom otopinom etanola u vrijednosti od 20 % i 23 % u odnosu na netretirane uzorke, a kod ekstrakcije s 50-postotnom vodenom otopinom etanola zabilježen je porast koncentracije od 6 %. Do smanjenja masene koncentracije karotenoida u tretiranim uzorcima moglo je doći zbog djelovanja slobodnih radikala na pigmente za vrijeme ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem i nepažljivog rukovanja posuđem prilikom vakuum filtracije.

Buniowska i sur. (2015) proučavali su bioraspoloživost i antioksidativni kapacitet bioaktivnih komponenata u korama naranči nakon primjene visokonaponskog električnog pražnjenja i pulsirajućeg električnog polja različitih energija. Uočili su smanjenje masene koncentracije ukupnih karotenoida primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja veće energije koje objašnjavaju nastankom veće količine slobodnih reaktivnih spojeva koji su uništili dio karotenoida. Relativna bioraspoloživost karotenoida prilikom probave *in vitro*, nakon tretiranja visokonaponskim električnim pražnjenjem, iznosila je 75,3%, odnosno 24,7% karotenoida je ostalo neiskorišteno.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata i rasprave nameću se sljedeći zaključci:

1. Koncentracija karotenoida u ekstraktima listova kadulje tretiranim visokonaponskim pražnjenjem u većini slučajeva bila je niža od koncentracije u kontrolnim (netretiranim) uzorcima.
2. Najviša koncentracija karotenoida zabilježena je nakon ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem u 50-postotnoj vodenoj otopini etanola, a najniža u 25-postotnoj vodenoj otopini etanola.
3. Djelovanjem visokonaponskog pražnjenja smanjuje se koncentracija karotenoida u ekstraktima biljnog materijala.

6. POPIS LITERATURE

Baricevic D., Sosa S., Loggia R., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A., Zupancic A. (2001) Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: The relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* **75**: 125 - 132.

Biesalski H. K., Bohles H., Esterbauer H., Furst P., Gey F., Hundsdorfer G., Kasper H., Sies H., Weisburger J. (1997) Antioxidant vitamins in prevention. *Clinical Nutrition* **16**: 151–155.

Brianceau S., Vitrac X., Turk M., Vorobiev E. (2016) High Voltage Electric Discharges Assisted Extraction of Stilbenes from Grape Stems. U: Jarm T., Kramar P. (eds) 1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies. IFMBE Proceedings, vol 53. Springer, Singapore.

Buniowska M., Carbonell-Capella J., Zulueta A., Frigola A., Esteve M. J. (2015) Bioaccessibility of Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from Orange Peel after Pulsed Electric Fields and High Voltage Electrical Discharges. *MOJ Food Processing & Technology* **1(3)**: 00017

Chipault J. R., Mizuno G. R., Hawkins J. M., Lundberg W. O. (1952) The antioxidant properties of natural spices. *Food Research* **17**: 46 - 55

Cuvelier M. E., Richard H., Berset C. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**: 645 - 652

Downham A., Collins P. (2000) Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology* **35**: 5 – 22.

Eidi M., Eidi A., Bahar M. (2006) Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. *Nutrition* **22**: 321 - 326.

FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives, WHO Tech. Rep. Ser. 362, 1967.

Faulks R.M., Southon S. (2005) Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1740** (2): 95 – 100.

Fernandes A. S., do Nascimento T. C., Jacob-Lopes E., De Rosso V. V., Queiroz Zepka L. (2018) Carotenoids: A Brief Overview on Its Structure, Biosynthesis, Synthesis, and Applications. <<https://www.intechopen.com/books/progress-in-carotenoid-research/introductory-chapter-carotenoids-a-brief-overview-on-its-structure-biosynthesis-synthesis-and-applic>> Pristupljeno 18. veljače 2020.

Frank H.A., Cogdell, R.J. (1993) The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis, U: Carotenoids in Photosynthesis, Young, A., Britton, G., ur, Chapman and Hall, London, United Kingdom, str. 252 – 326.

Goodwin T.W. (1976) Distribution of carotenoids, in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Vol. 1, Goodwin T.W., ur., Academic Press, London, New York, and San Francisco, str. 225 – 261.

Grdiša M., Jug-Dujaković M., Lončarić M., Carović-Stanko K., Ninčević T., Liber T., Radosavljević I., Šatović Z. (2015) Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): A Review of Biochemical Contents, Medical Properties and Genetic Diversity. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **80** (2): 69 – 78

Grlić Lj. (1985) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 1. izdanje, ITRO August Cesarec.

Hurst J. W. (2008) Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals, 2. izdanje, Taylor & Francis Group. str 227 - 336.

Kermanshah H., Kamangar S., Arami S., Mirsalehian A., Kamalineghad M., Karimi M., Jabalameli F. (2009) In vitro evaluation of antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* and *Pimpinella anisum* against cariogenic bacteria. *Journal of Dental Medicine* **22**: 149 – 154.

Khan A., Najeeb-ur R., Alkharfy K., Gilani A. (2011) Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Salvia officinalis* are mediated through activation of K⁺ channels. *Bangladesh Journal of Pharmacology* **6**: 111 – 116.

Krinsky, N.I. (1988) Membrane antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences* **551**: 17 – 32.

Laroussi M. (1996) Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Transaction on Plasma Science* **24** (3): 1188 – 1191.

Laroussi M. (2008) The biomedical applications of plasma: a brief history of the development of a new field of research. *IEEE Transactions on Plasma Science* **36** (4): 1612 – 1614.

Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148**: 350 – 382.

Lichtenthaler, H. K., Pfister, K. (1978) *Praktikum der Photosynthese*. Quelle & Meyer Verlag, Heidelberg

Lu Y., Yeap Foo L. (2001) Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron Lett* **42**: 8223 -8225.

Milošević S. (2008) *Plazma, svjetlost i spektroskopija*. Institut za fiziku, Zagreb.

Misra N. N., Jo C. (2017) Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry. *Trends in Food Science & Technology* **64**: 74 - 86.

Moisan M., Barbeau J., Crevier M., Pelletier J., Phillip N., Saoudi B. (2002) Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure Applied Chemistry* **74**: 349 – 358.

Ota S., Morita A., Hirata A., Sekida S., Okuda K., Ohya Y., Kawano S. (2018) Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Reports* **8**: 5617.

Palozza P., Calviello G., Bartoli G. M. (1995) Prooxidant activity of β – carotene under 100% oxygen pressure in rat liver microsomes. *Free Radical Biology & Medicine* **19** (6): 887 – 892.

Pankaj S. K., Keener K. M. (2017) Cold plasma: background, applications and current trends. *Current Opinion in Food Science* **16**: 49 – 52.

Sarangapani C., Patange A., Bourke P., Keener K., Cullen P.J. (2018) Recent Advances in the Application of Cold Plasma Technology in Foods. *Annual Review of Food Science and Technology* **9**: 609 – 629.

Wang J., Zhuang H, Hinton A, Zhang J. (2016) Influence of in-package cold plasma treatment on microbiological shelf life and appearance of fresh chicken breast fillets. *Food Microbiology* **60**: 142 – 146.

Weedon, B. C. L., Moss, G.P. (1995) Structure and nomenclature. U: Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and Analysis, Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., ur., Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, str., 27 – 70.

Weryszko-Chmielewska E., Michałojć Z. (2011) Anatomical traits of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit. *Acta Agrobotanica* **64 (4)**: 181 – 188.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Čeruođe Dvoržanić

ime i prezime studenta