Visokonaponsko pražnjenje u ekstrakcijama bioaktivnih komponenata iz lista masline i ružmarina

Golubić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:241482

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Petra Golubić
7202/PT

VISOKONAPONSKO PRAŽNJENJE U EKSTRAKCIJAMA BIOAKTIVNIH KOMPONENATA IZ LISTA MASLINE I RUŽMARINA

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:
„Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa "zelenim otapalima" primjenom visokonaponskog pražnjenja" (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Mentor: Prof. dr. sc. *Mara Banović*

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

VISOKONAPONSKO PRAŽNJENJE U EKSTRAKCIJAMA BIOAKTIVNIH KOMPONENATA IZ LISTA MASLINE I RUŽMARINA

Petra Golubić, 0058207965

Sažetak: Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj ne-toplinske metode ekstrakcije, odnosno ekstrakcije uz visokonaponsko pražnjenje, na udio ekstrahiranih fenolnih spojeva iz lista masline i ružmarina i na boju ekstrakta u odnosu na klasičnu metodu ekstrakcije. U radu su korištena tzv. „zelena otapala" koja su ekološki prihvatljiva, netoksična i nezapaljiva. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim pražnjenjem i klasična ekstrakcija provodile su se 3 i 9 minuta s 0, 25 i 50 % vodenom otopinom etanola. Rezultati rada su pokazali da se ekstrakcijom potpomognutom visokonaponskim pražnjenjem dobije veći prinos ukupnih fenola i da je tretirani ekstrakt jače obojen od netretiranog. Na temelju rezultata može se zaključiti da je ekstrakcija uz visokonaponsko pražnjenje efikasnija metoda od klasične ekstrakcije.

Ključne riječi: ekstrakcija, fenolni spojevi, plazma, visokonaponsko pražnjenje
Rad sadrži: 34 stranice, 9 slika, 9 tablica, 58 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Prof. dr. sc. Mara Banović
Pomoć pri izradi: Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak
Datum obrane: 10. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

USE OF HIGH - VOLTAGE DISCHARGE IN EXTRACTIONS OF BIOACTIVE COMPONENTS FROM OLIVE LEAF AND ROSEMARY

Petra Golubić, 0058207965

Abstract: The aim of this final work was to determine the influnece of non-thermal treatment ‚high–voltage electrical discharge (HVED), on the increase on the yield of extracted phenolic compounds from olive leaf and rosemary, and the color of extract compared to classical extraction method. „Green solvents" were used in this study because they are environmentally acceptable, non-toxic and non-flammable. The extraction assisted by HVED and classical extraction were performed for 3 and 9 minutes with 0, 25 and 50 % of aqueous ethanol solution. The study has shown that the extraction assiseted by HVED had higher total phenol yield and that treated extract is more colored than the non-treated one. Based on the results, it can be concluded that the extraction assisted by HVED is more efficent method than the classical extraction.

Keywords: extraction, high-voltage discharge, phenolic compounds, plasma
Thesis contains: 34 pages, 9 figures, 9 tables, 58 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: *Prof. dr. sc. Mara Banović*
Technical support and assistance: *Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak*
Defence date: 10th of September, 2018.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Ekstrakcija 2
2.1.1. Zelena ekstrakcija 3
2.2. Visokonaponsko električno pražnjenje 3
2.2.1. Mehanizam djelovanja visokonaponskog pražnjenja 6
2.2.2. Plazma 6
2.2.3. Primjena plazme 7
2.3. Polifenolni spojevi 8
2.4. List masline 9
2.4.1. Kemijski sastav i primjena fenola iz lista masline 9
2.5. Ružmarin 10
2.5.1. Kemijski sastav i primjena fenola iz ružmarina 11
3. EKSPERIMENTALNI DIO 12
3.1. Materijali 12
3.1.1 Uzorci 12
3.1.2. Reagensi 12
3.1.3. Aparatura i pribor 13
3.2. Metode rada 13
3.2.1. Ekstrakcija 13
3.2.2. Određivanje pH vrijednosti 17
3.2.3. Određivanje elektroprovodnosti 17
3.2.4. Određivanje temperature 17
3.2.5. Određivanje ukupnih fenola 17
3.2.6. Određivanje boje 19
4. REZULTATI I RASPRAVA 20
4.1.Utjecaj uvjeta na uspješnost procesa ekstrakcije 23
4.2.Usporedba rezultata ukupnih fenola ekstrahiranih klasičnom ekstrakcijom i ekstrakcijom uz visokonaponsko pražnjenje 26
5. ZAKLJUČAK 28
6. LITERATURA 29

1. UVOD

U prehrambenoj industriji, kao i u drugim granama industrije, razvojem tehnologije dolazi do razvoja novih tehnika procesiranja čiji je cilj unaprjeđivanje već postojećih tehnika, ali i mogućnost novih načina obrade pojedinih namirnica koji su ekološki i ekonomski prihvatljiviji od postojećih načina obrade te ih mogu u potpunosti zamijeniti. Uz razvoj tehnologije kao jednog od pokretača, navodi se i drugi pokretač razvoja novih tehnika procesiranja hrane, a to je svijest potrošača koji sve više zahtjeva minimalno procesiranu i visoko nutritivno vrijednu hranu. Kao odgovor na ovakve zahtjeve potrošača javljaju se ne-toplinske metode obrade kao što su ultrazvuk, visoki hidrostatski tlak i primjena plazme. Ne-toplinske metode, kao što im i sam naziv govori, temelje se na primjeni temperatura koje su znatno niže od temperatura kod klasičnih metoda obrade pa time omogućuju očuvanje prirodno prisutnih nutritivno vrijednih sastojaka pojedine namirnice. Nove ne-toplinske metode ekstrakcije, osim što uklanjanju negativan utjecaj visoke temperature na degradaciju sastojaka, također nastoje poboljšati energetsku efikasnost postupka smanjenjem vremena ekstrakcije, volumena utrošenog otapala i nastanka otpadnih materijala tijekom ekstrakcije koje je potrebno propisno zbrinuti. Jedna od ne-toplinskih metoda ekstrakcije, čiji se učinak proučava u ovom radu, temelji se na primjeni hladne plazme koja se najčešće generira visokonaponskim pražnjenjem. Tijekom obrade hladnom plazmom dolazi do pojave različitih fenomena koji kao posljedicu imaju oštećenje stanične strukture što rezultira olakšanom ekstrakcijom, odnosno većim prinosima ekstrakta u određenom vremenu u odnosu na klasičnu ekstrakciju, uz neznatno povišenje temperature. Zbog povećanog zanimanja prehrambene i farmaceutske industrije za aktivnim spojevima iz biljaka koji su pokazali pozitivan učinak u prevenciji i liječenju raznih bolesti te spojeva koji se koriste kao prirodni dodaci prehrani, javlja se potreba za razvojem načina na koji bi se takvi aktivni spojevi izdvajali iz biljnog materijala. Ekstrakcijom biljnog materijala odgovarajućim otapalom dolazi do izdvajanja tvari iz unutrašnjosti biljne stanice koje su dobro topljive u korištenom otapalu. Najvažnije bioaktivne tvari koje se ekstrahiraju su sekundarni biljni metaboliti, odnosno fenolni spojevi.

Cilj ovog rada je prikazati teorijske osnove visokonaponskog pražnjenja u ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz lista masline i ružmarina, te usporediti učinak ekstrakcije potpomognute visokonaponskim pražnjenjem i klasične ekstrakcije na temelju podataka o udjelu ekstrahiranih fenolnih spojeva i podacima za komponente boje ekstrakta.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je proces izdvajanja neke tvari iz čvrste (krute) tvari ili tekuće smjese odgovarajućim otapalom u kojem je tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka u smjesi. Princip ekstrakcije je molekularna difuzija u kojoj dolazi do izjednačavanja koncentracija otopljenih tvari u sustavima koji dođu u međusobni dodir. Molekularna difuzija matematički se opisuje prvim Fickovim zakonom (Lovrić, 2003).

Ekstrakcijske se metode priprave uzorka mogu podijeliti prema fazama između kojih dolazi do prijenosa analita pa govorimo o ekstrakciji tekuće-tekuće, ekstrakciji čvrsto-tekuće ili ekstrakciji plinovito-tekuće. Izbor metode priprave uzorka ovisi o njegovu agregatnom stanju (Kaštelan – Macan i Petrović, 2013). Osim o agregatnom stanju uzorka, izbor metode ekstrakcije ovisi i o strukturi, molekularnim masama, polarnosti, topljivosti i drugim svojstvima komponenata koje želimo izolirati ili razdvojiti (Raynie, 2004). Tvar koja se iz smjese odjeljuje ekstrakcijom prelazi u otopinu te se za njeno izdvajanje u čistom obliku primjenjuje otparivanje ili kristalizacija ili oba postupka istovremeno.

Ekstrakcijske metode se, osim osnovne podijele prema fazama između kojih dolazi do prijenosa analita, mogu podijeliti i s obzirom na način provođenja procesa ekstrakcije pri čemu razlikujemo konvencionalne i nekonvencionalne (moderne) metode ekstrakcije.

Konvencionale metode ekstrakcije kao što su maceracija, infuzija i obični refluks koriste se desetljećima u laboratorijima za ekstrakciju. Njihov glavni nedostatak je dugo vrijeme postupka ekstrakcije i velik utrošak otapala (Yousif Mutalib, 2015).

Zbog navedenih nedostatka konvencionalnih metoda ekstrakcije i zbog napretka tehnologije, dolazi do povećanja broja modernih metoda ekstrakcije kojima je primarni cilj smanjenje vremena ekstrakcije i utroška otapala. Neki od primjera modernih metoda su ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, mikrovalnim zračenjem i visokonaponskim pražnjenjem (hladna plazma).

Primjena modernih metoda ekstrakcije, u usporedbi s konvencionalnim metodama, rezultira većom efikasnošću ekstrakcije, utroškom manjeg volumena otapala i većim prinosom, odnosno većim masenim udjelom željenih bioaktivnih komponenti iz čvrstog biljnog materijala (Yousif Mutalib, 2015).

2.2.1. Zelena ekstrakcija

Razvojem ljudske svijesti o nužnosti očuvanja okoliša i smanjenja onečišćenosti razvila se posebna grana kemije koja se naziva „zelena" kemija. Glavni koncept „zelene" kemije je korištenje vještina i znanja kemije kako bi se smanjila ili uklonila upotreba opasnih tvari tijekom planiranja, proizvodnje i primjene kemikalija sa ciljem smanjenja opasnosti za zdravlje osobe koja upravlja određenim procesom i za okoliš (Anastas, 1999).

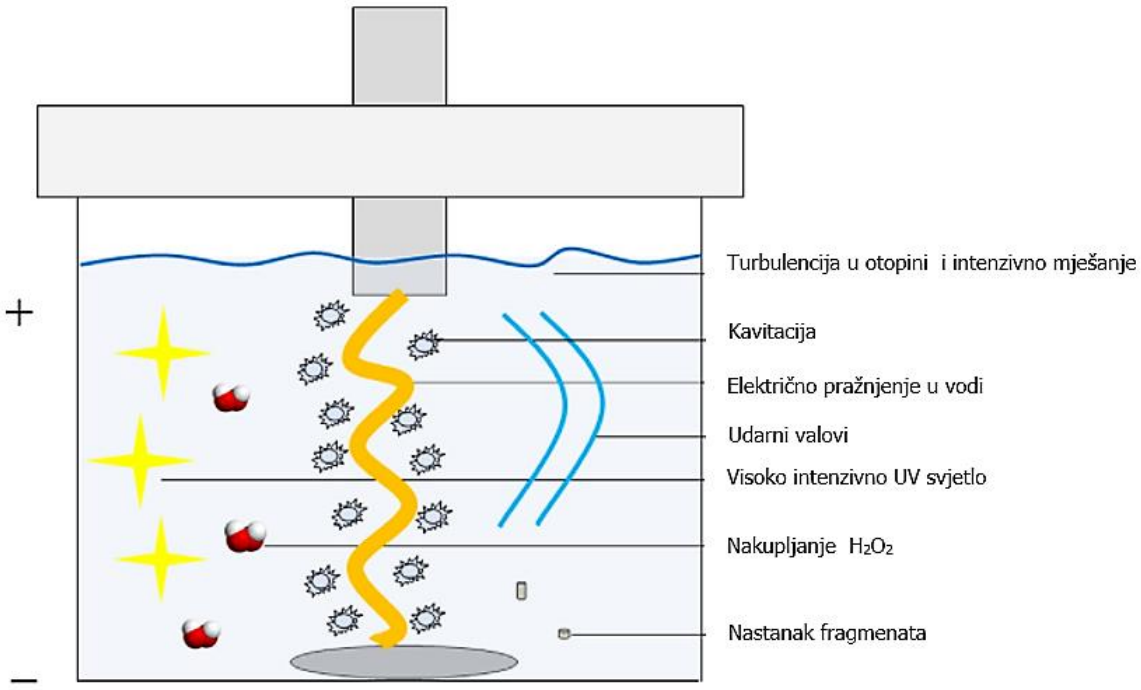
Unutar područja „zelene" kemije razvijaju se poboljšani i novi načini postupaka prerade sirovina sa ciljem dobivanja što većeg iskorištenja uz što manji utrošak energije. Jedan od poboljšanih načina postupaka prerade je i postupak ekstrakcije.

„Zelena" ekstrakcija se temelji na otkrivanju i osmišljavanju ekstrakcijskih procesa koji bi smanjili potrošnju energije, omogućili upotrebu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda i osigurali siguran i kvalitetan ekstrakt/proizvod. Za provođenje zelene ekstrakcije na laboratorijskoj i na industrijskoj razini nužno je zadovoljiti tri uvjeta:

1. Poboljšanje i optimiziranje postojećih procesa
2. Upotreba nespecifičnih uređaja
3. Inovacija u procesima i postupcima, ali i u otkrivanju alternativnih otapala (Chemat i sur., 2012).

2.2. Visokonaponsko električno pražnjenje

Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem jedna je od ne-toplinskih metoda ekstrakcije koja se primjenjuje u prehrambenoj industriji, a temelji se na fenomenu električnog sloma u otopini. Električni slom u vodi izaziva oštećenje strukture stanica i fragmentaciju čestica čime je omogućena bolja i brža ekstrakcija unutarstaničnih komponenti (Rajha i sur., 2015) pa se zbog toga visokonaponsko električno pražnjenje (eng. *High voltage electrical discharge* – HVED) koristi u ekstrakciji bioaktivnih komponenti. Pojava električnog sloma dovodi do tekućinske turbulencije i intenzivnog miješanja, pojave emisije UV svjetla visokog intenziteta, stvaranje vodikovog peroksida (H_2O_2), proizvodnju udarnih valova i kavitacijskih mjehurića (Boussetta i sur., 2014). Navedene pojave koje se još nazivaju i sekundarni fenomeni prikazane su na slici 1. Javljaju se tijekom tretmana biljnog materijala u određenom otapalu visokonaponskim električnim pražnjenjem i omogućuju lakšu ekstrakciju biljnog materijala.



Slika 1. Prikaz mehanizma visokonaponskog pražnjenja u otopini (Rajha i sur., 2015)

Prilikom HVED tretmana između dvije elektrode u ionskim otopinama dolazi do električnog pražnjenja i zatim posljedično do stvaranja plazme. Čestice u otopini se neprestano kreću i sudaraju, a dovođenjem električne energije povećava se učestalost sudara tih čestica. Električna struja nastaje usmjerenim gibanjem nosioca električnog naboja zbog razlike potencijala. U plinovima i elektrolitima nosioci naboja su pozitivni i negativni ioni i elektroni. (Komen, 2018). Tijekom neelastičnih sudara elektrona i neutralnih molekula u otopini dolazi do prijenosa energije s elektrona na neutralnu molekulu te kao rezultat nastaju pobuđene i ionizirane molekule. Povećanjem energije sudara proporcionalno se i povećava vjerojatnost pobude atoma ili molekule u više energetsko stanje, njihova disocijacija ili ionizacija atoma (Milošević, 2008).

2.2.1 Mehanizam djelovanja visokonaponskog pražnjenja

Tijekom električnog pražnjenja u otopini dolazi do niza fizikalnih i kemijskih promjena. U fizikalne promjene ubrajaju se sljedeći fenomeni koji nastaju tijekom električnog pražnjenja: UV radijacija, stvaranje udarnih valova, snažno električno polje i kavitacija. Osim fizikalnih, u otopini dolazi do kemijskih promjena zbog odvijanja kemijskih reakcija u kojima nastaju reaktivne tvari.

U vodenim otopinama ekscitacijom i ionizacijom nastaje vodikov peroksid, ozon te hidroksilni, vodikovi i kisikovi radikali. Nastale čestice mogu biti kratko živuće poput radikala i dugo živuće u koje se ubrajaju ioni i neutralne molekule s visokim oksidacijskim potencijalom (Kirkpatrick i Locke, 2005; Joshi i sur., 1995).

Reakcije inicijacije u vodi započinje disocijacijom i ionizacijom molekula vode zbog njihovih neelastičnih sudara s visokoenergetskim elektronima prema sljedećem mehanizmu (Kozakova, 2011) :

$$H_2O + e^{-*} \rightarrow OH^{\cdot} + H^{\cdot} + e^{-} \quad /1/$$

$$H_2O + e^{-*} \rightarrow {}^{\cdot}H_2O^{+} + 2e^{-} \quad /2/$$

$${}^{\cdot}H_2O^{+} + H_2O \rightarrow H_3O^{+} + OH^{\cdot} \quad /3/$$

Nastali radikali mogu međusobno reagirati uz nastanak stabilnih molekula poput H_2, H_2O_2 i H_2O ili mogu reagirati s drugim molekulama vode u otopini :

$$H^{\cdot} + H^{\cdot} \rightarrow H_2 \quad /4/$$

$$OH^{\cdot} + OH^{\cdot} \rightarrow H_2O_2 \quad /5/$$

$$H^{\cdot} + OH^{\cdot} \rightarrow H_2O \quad /6/$$

Dvije sumarne reakcije koje se odvijaju istodobno prikazuju nastajanje glavnih produkata kao što su hidroksilni i vodikov radikal, vodikov peroksid i vodik:

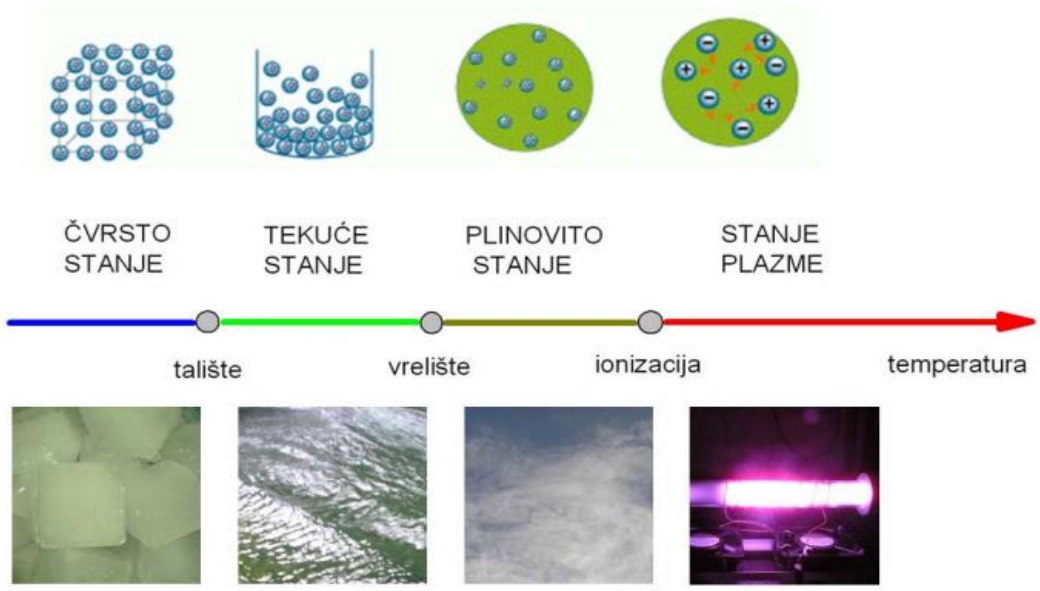
$$H_2O \rightarrow OH^{\cdot} + H^{\cdot} \quad /7/$$

$$2\,H_2O \rightarrow H_2O_2 + H_2 \quad /8/$$

2.2.2 Plazma

Plazma je ionizirani plin koji se sastoji od elektrona, iona i neutralnih čestica koje mogu biti u osnovnom ili pobuđenom stanju. Plazma nastaje uz pomoć električne energije – električno polje prenosi energiju na elektrone u plinu. Energija elektrona prenosi se na neutralne čestice u plinu putem sudara. Kad je energija elektrona dovoljno velika u sudaru s neutralnom česticom dolazi do promjene elektronske strukture čestice (Milošević, 2008) i tako nastaje

ionizirani plin – plazma. Plazma je četvrto osnovno stanje materije (slika 2) i kvazineutralan plin jer makroskopski gledano plazma ne posjeduje električni naboj, no sadrži nosioce naboja i kao takav dobro provodi električnu energiju i reagira na elektromagnetska polja (Tendero i sur., 2006). Plazmu je moguće opisati pomoću tri osnovna parametra: temperature čestica, gustoće čestica i jačine stacionarnog magnetskog polja (Milošević, 2008).



Slika 2. Ilustracija agregatnih stanja i njihovih promjena (Milošević, 2008)

Oblici i vrste plazmi su brojni zbog čega se plazme mogu klasificirati prema više kriterija: energiji i gustoći nabijenih čestica, temperaturi te tlaku plina pri kojem nastaje plazma (Ercegović Ražić i Čunko, 2009).

Plazma se prema temperaturi pri kojoj se primjenjuje dijeli na hladnu plazmu i vruću plazmu. Vruću plazmu karakterizira stanje termičke ravnoteže jer je temperatura svih čestica u plazmi jednaka. Temperatura je obično iznad 6000 K (Schlüter i sur., 2013). Hladna plazma ima nejednaku temperaturu čestica, a najvišu temperaturu imaju elektroni. Ukupna temperatura hladne plazme je niska i obično je to vrijednost sobne temperature što omogućava visoku primjenu u prehrambenoj industriji bez opasnosti od degradacije poželjnih spojeva. Zbog svoje ne-toplinske prirode, tretmani hladnom plazmom pokazali su minimalan ili nikakav utjecaj na fizikalna, kemijska, nutritivna i senzorska svojstva različitih proizvoda (Pankaj i sur., 2018).

2.2.3. Primjena plazme

Plazma se zbog svojih svojstva ekološke prihvatljivosti i fleksibilnosti primjenjuje u raznim područjima poput elektronike, tekstilne industrije, aeronautike, biomedicinskom području te prehrambenoj industriji (Misra i sur., 2011).

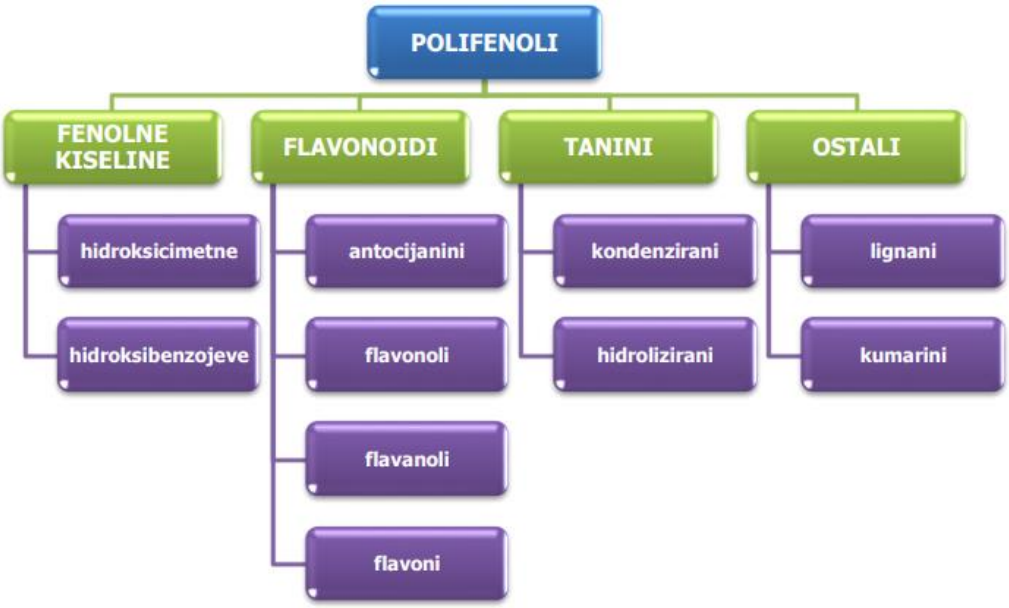
Primjena hladne plazme u prehrambenoj industriji demonstrirana je za dekontaminaciju hrane, inaktivaciju enzima, uklanjanje toksina, pakiranje hrane i obradu otpadnih voda. Kako bi tehnologija hladne plazme mogla ostvariti puni potencijal u smislu komercijalizacije i industrijalizacije u prehrambenoj industriji, nužna su daljnja istraživanja sa ciljem preciznog razumijevanja mehanizma djelovanja plazme i kontrole nad svojstvima kvalitete krajnjeg proizvoda (Pankaj i sur., 2018).

Najstarija i jedina dosad industrijalizirana primjena hladne plazme u prehrambenoj industriji je primjena kod dezinfekcije vode pomoć ozona. Ozon (O_3) spada u red najboljih kemijskih sredstava za dezinfekciju vode s mnoštvo prednosti pred klorom (Mijatović i Matošić, 2010). Jedan od razloga zašto se plazma još ne koristi u obradi hrane je taj što još nisu dovoljno istraženi utjecaji na njene sastojke. Uglavnom dolazi do smanjenja enzimske aktivnosti, a uočena je fragmentacija kao i promjene u sekundarnoj strukturi proteina (Knorr i sur., 2011). Zbog fizikalnih i kemijskih učinaka plazme na materijal podvrgnut tretmanu, predviđa se da bi plazma mogla pronaći široku primjenu u poboljšanju postupaka ekstrakcije. Pulsirajuće električno polje koje se koristi za generiranje plazme dovodi do elektroporacije tj. do stvaranja pora u membrani stanice. Kao posljedica polarizacije iona u membrani dolazi do njene kompresije i naposljetku pucanja (Fincan i sur., 2004). Na taj način komponente koje se ekstrakcijom želi izdvojiti iz materijala postaju dostupnije i sam proces ekstrakcije se provede brže i efikasnije. Zbog niske temperature pri tretmanu pogodna je za ekstrakciju bioaktivnih spojeva (Misra i sur., 2011) jer ne dolazi do njihove degradacije.

2.3. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji predstavljaju najbrojniju i najrašireniju grupa spojeva u višim biljkama. Osnovna struktura polifenola je aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina sa širokim rasponom polimerizacije (Bravo, 1998). Ovi spojevi predstavljaju vrlo raznoliku skupinu fitokemikalija koje su sintetizirane iz fenilalanina i tirozina (Harborne, 1982). Biljke u svom sastavu mogu sadržavati jednostavne fenole, fenolne kiseline, kumarine, favonoide, stilbene, hidrolizirane i kondenzirane tanine,

liganane i lignine (Naczk i Shahidi, 2006). Osnovna podjela polifenolnih spojeva prikazana je na slici 3.



Slika 3. Osnovna podjela polifenola (Bravo, 1998)

Polifenolni spojevi u biljkama imaju fiziološku ulogu, uključeni su u rast i reprodukciju biljke te služe za obranu od ultraljubičastog zračenja, biljojeda i patogena (Bravo, 1998). U hrani su značajni zbog svoje antioksidacijske aktivnosti. Ona ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina u molekuli te o pH vrijednosti medija (Belitz i sur., 2009). Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva pripisuju se njihovom redoks svojstvu koje im omogućava da djeluju kao reducirajuće sredstvo, odnosno kao donori vodika i hvatači kisika. Fenolni spoj se može definirati kao antioksidans kada u relativno niskim koncentracijama u odnosu na supstrat može odgoditi, usporiti ili spriječiti oksidaciju, a novonastali radikal koji je rezultat te reakcije mora biti stabilan (Rice-Evans i sur., 1997; Kaur i Kapoor, 2001). Fenoli također imaju sposobnost vezanja prijelaznih metala, aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004).

2.4. List masline

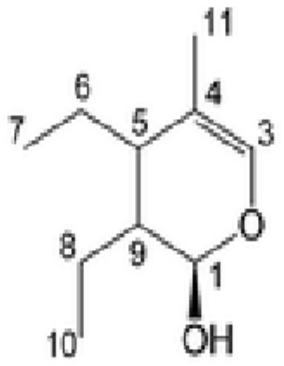
Maslina (*Olea europaea* L.) je višegodišnja zimzelena biljka iz porodice maslina (Oleaceae L.). Maslina je jedna od najstarijih i najčešće kultiviranih biljaka Mediterana. Rod Olea podrazumijeva 35 do 40 različitih vrsta rasprostranjenih na području južne Afrike i Azije, istočne Australije, Nove Kaledonije i Novog Zelanda (Fabbri i sur., 1995).

Masline se prvenstveno uzgajaju zbog njihovog ploda od kojeg se proizvodi maslinovo ulje. Jedna je od najvažnijih uzgajanih biljaka na području Mediterana gdje se nalazi preko 98 % postojećih nasada u svijetu, što ukazuje na ekonomsku važnost te važnost iskorištavanja nusproizvoda njene prerade (Pereira i sur., 2007). Lišće masline, koje je nusproizvod uzgoja maslina, predstavlja bogat i jeftin izvor polifenola koji se mogu ekstrahirati i koristiti za razvoj proizvoda koji promiču zdravlje i dobrobit čovjeka (Rahmanian i sur., 2015).

2.4.1. Kemijski sastav i primjena fenola iz lista masline

U listu masline prisutno je uglavnom pet skupina fenolnih spojeva : oleuropeozidi (oleuropein i verbaskozid), flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid luteolin i diosmetin), flavanoli (rutin), flavan-3-oli (katehin) i supstituirani fenoli (tirozol, hidoksitirozol, vanilin, vanilinska kiselina i kafeinska kiselina) (Sabry, 2014).

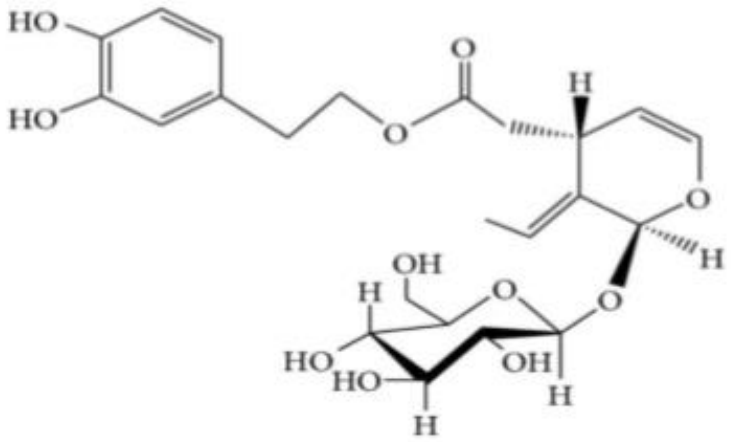
Najvažnija skupina fenola u listu masline su sekoiridoidi (Talhaoui i sur., 2014). Sekoiridoidi su obično prisutni u obliku glikozida, a sintetiziraju se sekundarnim metabolizmom terpena. Sekoiridoidima prisutnima u porodici biljaka Oleaceae svojstvena je prisutnost elenolne kiseline u glukozidnom ili aglikonskom obliku. Građeni su od pentil-etil alkohola (hidroksitiosola i tirosola), elenolne kiseline i često glukoznog ostatka (slika 4). Ti su spojevi zaslužni za gorčinu i pikantnost maslinovog ulja (Bendini i sur. 2007).



Slika 4. Opća struktura sekoiridoida (Obied i sur., 2009)

Oleuropein, glavni sekoiridoid, složeni je fenol koji je u visokoj koncentraciji prisutan u listu masline, a u niskoj koncentraciji je prisutan u maslinovom ulju u kojem je odgovoran za blago gorak okus (slika 5). Istraživanja su pokazala da je oleuropein važan fenol koji djeluje antitumorski i pokazuje brojna antioksidativna, hipolipidemijska, antivirusna, antimikrobna,

antiateogenetska, kardioprotektivna, antihipertenzivna i protuupalna svojstva (Visioli i Galli 1998; Singh i sur., 2008). Zbog navedenih svojstava, oleuropein je komercijalno dostupan kao dodatak prehrani u mediteranskim zemljama (Omar, 2010).



Slika 5. Kemijska struktura oleuropeina (Xie i sur., 2015)

2.5. Ružmarin

Ružmarin (lat. *Rosmarinus officinalis*) je razgranati, zimzeleni grm koji može narasti i do dva metra visine. Postoje i puzajući, odnosno niski oblici koji se mogu saditi kao pokrivači tla (Schaffner i sur., 1999). Listovi imaju vrlo kratku peteljku, usko su suličasti, kožasti, tamnozeleni, odozgo malo hrapavi, odozdo bjelkasto pusteni, s bijelom prugom. Cvijet je blijedomodar, dvousnat. Biljka cvate dva puta godišnje, u travnju i rujnu (Marković, 2006).

Ružmarin je autohton u europskim zemljama koje se nalaze na obalama Sredozemnog mora. Ružmarin je višenamjenska biljka budući da se zahvaljujući svome cvatu može koristiti kao dekorativna biljka, a zbog svojih senzorskih svojstava kao začin ili čaj. Za primjenu u medicini i prehrani važan je ekstrakt dobiven iz sušenih listova ružmarina (Mena, 2016). Rezultati analitičkog istraživanja ekstrakta ružmarina pokazali su da ekstrakt sadrži visok udio fenolnih spojeva (Gird i sur., 2017).

2.5.1 Kemijska svojstva i primjena fenola iz lista ružmarina

Između brojnih biljnih ekstrakata za koje je poznato da posjeduju antioksidativnu aktivnost, ekstrakt ružmarina jedan je od najšire komercijaliziranih biljnih ekstrakata (Alfonso i sur., 2013).

Većina aktivnih komponenti ekstrakta ružmarina identificirane su kao karnozinska kiselina, karnosol i ružmarinska kiselina (slika 6) (Xie i sur., 2017). Navedeni spojevi se široko koriste u farmaceutskoj industriji. Karnozinska kiselina štiti od degeneracije rožnice, oštećenja mrežnice izazvane svijetlom i senilne makularne degradacije. Ružmarinska kiselina služi za liječenje i ublažavanje simptoma alergijskih reakcija i u prevenciji trovanja hranom (Verbanec, 2010).

Osim u farmaceutskoj industriji, ekstrakt ružmarina se koristi i u prehrambenoj industriji gdje zahvaljujući antioksidacijskim svojstvima prisutnih spojeva u ekstraktu nalazi primjenu u smanjenju autooksidacije i fotooksidacije ulja i masti. U nekim primjenama, učinkovitost ekstrakta ružmarina usporediva je sa djelovanjem sintetskih antioksidanasa kao što su BHA, BHT i TBHQ (Xie i sur., 2017).



Slika 6. Aktivne komponente ekstrakta ružmarina (Xie i sur.,2017)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

- Osušeni i ultracentrifugalnim mlinom ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Njemačka) usitnjeni listovi masline i ružmarina (Franck, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Reagensi

- otapalo: destilirana voda i etanol:voda (različiti omjeri)
- 30%-tna vodena otopina etanola
- Folin-Ciocalteu reagens
- standardna otopina galne kiseline
    - Priprema: Odvaže se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u danom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- zasićena otopina natrijeva karbonata, Na_2CO_3
    - Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom se ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 sata filtrira.

3.1.3. Aparatura i pribor

- generator (IMP-SSPG-1200)
- Büchnerov lijevak
- odmjerne tikvice volumena 10 ml, 25 ml i 100 ml
- mikropipeta i pipete volumena 2 ml, 5 ml, 20 ml i 25 ml
- tehnička vaga Mettler (točnosti ±0,01g)
- analitička vaga Kern ABT 220-4M
- laboratorijske čaše
- stakleni štapići
- vodena kupelj
- spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- staklene kivete

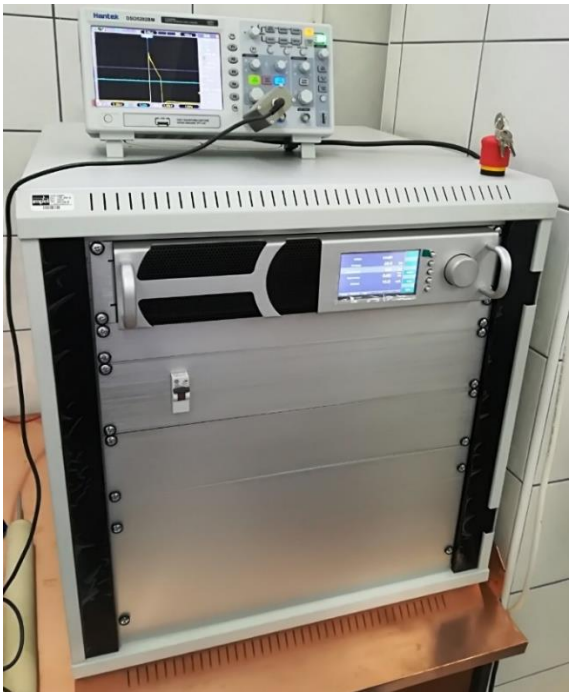
- digitalni pH metar (pH 340i/ SET, WTW)
- digitalni konduktometar (λ 340i/ SET, WTW)
- infracrveni termometar (PCE-777, PCE Instruments)
- kolorimetar CM-3500d
- ultracentrifugalni mlin ZM 200

3.2. Metode rada

3.2.1. Ekstrakcija

Prilikom ovog istraživanja osušeni i usitnjeni uzorci lista masline i ružmarina bili su podvrgnuti ekstrakciji hladnom plazmom i klasičnoj ekstrakciji otapalom određenog omjera destilirane vode i etanola. Ekstrakcija tzv. tretiranih uzoraka se odvijala u generatoru IMP-SSPG-1200 koji generira hladnu atmosfersku plazmu u uzorku (slika 7).

Prije ekstrakcije izvaže se masa 1 g osušenog materijala te se pomiješa s 50 mL odgovarajućeg otapala. Dobivena smjesa uzorka namijenjenih tretiranju hladnom plazmom i otapala ekstrahira se u reaktoru u struji argona određeno vrijeme pri odgovarajućim uvjetima napona (tablice 1 i 2). Smjesa uzorka i odabranog otapala stavi se u laboratorijsku čašu i ekstrahira uz povremeno miješanje staklenim štapićem. Dobiveni ekstrakti se nakon provedene ekstrakcije filtriraju preko Büchnerovog lijevka.

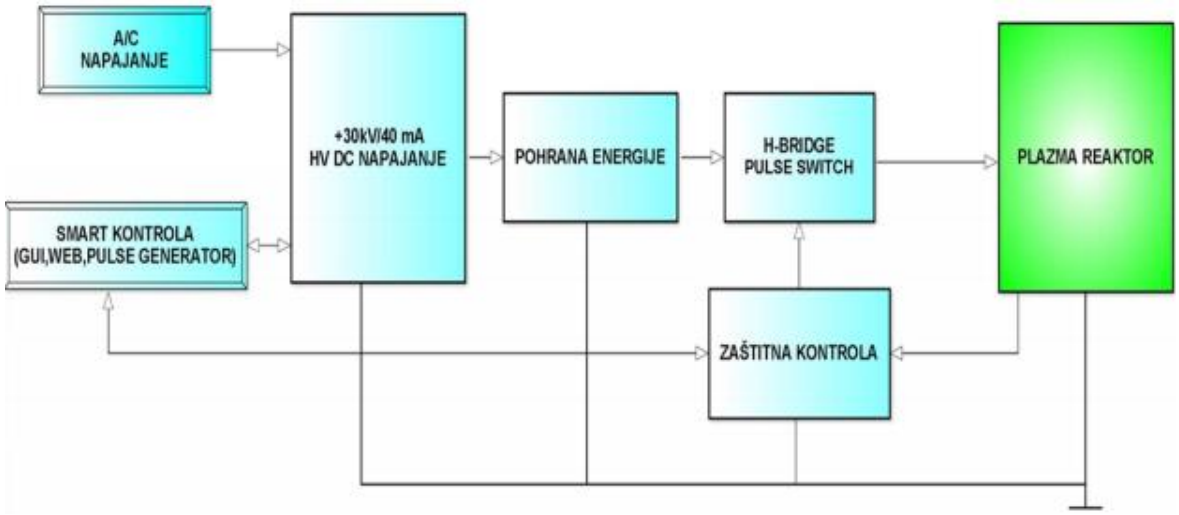


Slika 7. Plazma generator (Anonymous, 2017)

Tehnički parametri plazma generatora IMP-SSPG-1200:

- podesivost DC napon u području 1kV do 30kV
- podesivost maksimalne DC struja 40 mA@30kV
- solid state generiranje pravokutnih impulsa iz HV DC napona (max. 100 kHz)
- industrijski komunikacijski standardi RS485 MODBUS za proširivost prema vanjskim uređajima (analogni i digitalni I/O modul, senzori, pretvarači….)
- TCP/IP s web serverom za daljinsko upravljanje i parametriziranje
- napajanje 230 VAC jedna faza, 50Hz
- ambijentalna temperatura 5º C do 40º C
- ambijentalna vlažnost 10% do 90%
- forsirano zračno hlađenje

Princip rada generatora je generiranje visokog DC napona pomoću moderne *solid state* tehnologije. Jedan valni oblik napona pretvara se u drugi. Izmjenični napon (AC) pretvara se u istosmjerni napon (DC) te u visoko frekventni napon (HF).



Slika 8. Blok dijagram plazma generatora (Anonymous, 2017)

U tablicama 1 i 2 prikazane su oznake uzoraka i uvjeti tretiranja hladnom plazmom lista masline i ružmarina, dok su u tablicama 3 i 4 prikazane oznake i uvjeti klasične ekstrakcije istih uzoraka.

Oznaka "LA" označava da se radi o uzorku lista masline, a oznaka "RA" o uzorku ružmarina tretiranog hladnom plazmom u struji plemenitog plina argona.

Tablica 1. Prikaz uvjeta tretiranja uzoraka lista masline

Uzorak	**Masa uzorka (g)**	**Vrijeme (min)**	**Udio etanola (%)**	**Napon (kV)**
LA 4	1	3	0	20
LA 5	1	9	25	20
LA 8	1	9	50	20
LA 9	1	3	25	20
LA 10	1	9	0	20
LA 11	1	3	50	20

Tablica 2. Prikaz uvjeta tretiranja uzoraka ružmarina

Uzorak	**Masa uzorka (g)**	**Vrijeme (min)**	**Udio etanola (%)**	**Napon (kV)**
RA 4	1	3	0	20
RA 5	1	9	25	20
RA 8	1	9	50	20
RA 9	1	3	25	20
RA 10	1	9	0	20
RA 11	1	3	50	20

Usporedno s uzorcima koji su tretirani hladnom plazmom, postupak klasične ekstrakcije provodio se na istim uzorcima (list masline i ružmarin) jednake mase onima koji su tretirani hladnom plazmom sa ciljem uočavanja koji će od navedena dva načina ekstrakcije na kraju eksperimenta pokazati veći prinos fenola, odnosno uspješniju ekstrakciju.

Netretirani uzorci su označeni drugačije nego tretirani; prvi broj označuje vrijeme ekstrakcije u minutama, "N" je oznaka da netretiranog uzorka, "L" je oznaka za list masline (kad je umjesto "L" napisano slovo "R" radi se o ružmarinu), sljedeći broj 0, 25 ili 50 označava postotak etanola u korištenom vodenom otapalu i "1" na kraju označava da se radi o uzorku mase jednog grama.

Tablica 3. Prikaz uvjeta klasične ekstrakcije uzoraka lista masline

Uzorak	Masa uzorka (g)	Vrijeme (min)	Udio etanola (%)
3NL0/1	1	3	0
9NL0/1	1	9	0
3NL25/1	1	9	25
9NL25/1	1	3	25
3NL50/1	1	9	50
9NL50/1	1	3	50

Tablica 4. Prikaz uvjeta klasične ekstrakcije uzoraka ružmarina

Uzorak	Masa uzorka (g)	Vrijeme (min)	Udio etanola (%)
3NR0/1	1	3	0
9NR0/1	1	9	0
3NR25/1	1	9	25
9NR25/1	1	3	25
3NR50/1	1	9	50
9NR50/1	1	3	50

3.2.2. Određivanje pH vrijednosti

Mjerenje pH vrijednosti nakon tretmana vrši se očitavanjem vrijednosti na pH-metru (pH 340i/SET, WTW, elektroda HI11310). Kalomel elektroda mora biti uronjena u uzorak 5 minuta nakon čega se očita pH-vrijednost.

3.2.3. Određivanje elektroprovodljivosti

Određivanje elektroprovodljivosti uzorka nakon tretmana vrši se pomoću konduktometra (λ 340i/ SET, WTW, elektroda HI763100). Elektroda se uroni u uzorak i drži do stabilizacije vrijednosti na konduktometru koja se potom očita.

3.2.4. Određivanje temperature

Temperatura uzorka prije i nakon tretmana se mjeri digitalnim infracrvenim termometrom (Infrared Tehrmometer, PCE-777, PCE Instruments).

3.2.5. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima temelji se na kolorimetrijskoj reakciji koja je posljedica reakcije fenolnih spjeva s Folin-Ciocalteu-ovim reagensom (FC reagens). Intenzitet nastalog obojenja mjeri se primjenom spektrofotometrijske metode pri 760 nm (Ough i Amerine, 1998.). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni.

Postupak određivanja

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 µL ekstrakta, 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T=50°C u vodenoj kupelji. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Nakon termostatiranja uzorci se ohlade pod vodom, te se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm.

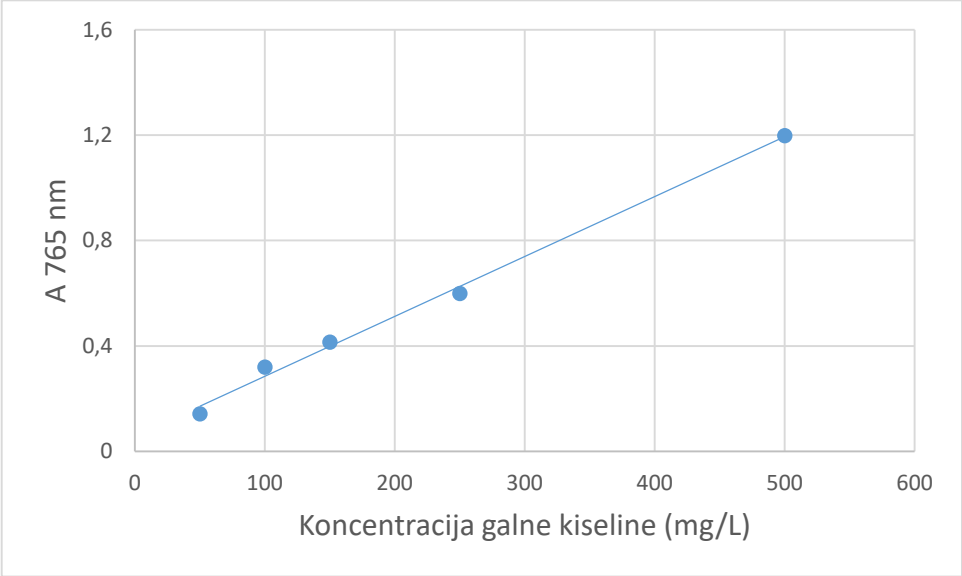
Izrada baždarnog dijagrama

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 µL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 µL Folin Ciocalteu reagesna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve

skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C u vodenoj kupelji. Za slijepu probu uzima se 100 µL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm.

Račun

Koncentracija ukupnih fenola u uzorku izračunava se, uzimajući u obzir razrjeđenja uzoraka, prema jednadžbi pravca koja se dobije pomoću programa Excel.



Slika 9. Baždarni dijagram za ukupne fenole (mg/L galne kiseline)

Jednadžba pravca : y = 0,0023x + 0,0581

R^2=0,9954

Y - apsorbancija pri 765 nm

x - koncentracija galne kiseline (GAE) (mg/L)

R^2- koeficijent determinacije

3.2.6. Određivanje boje

Određivanje boje tretiranih i netretiranih uzoraka ekstrakata lista masline i ružmarina vršilo se kolorimetrom CM3500d (Konica Minolta, Japan) pri čemu su izmjerene L*, a* i b* vrijednosti CIELAB metodom (CIE, 1976). Kolorimetar je prije mjerenja baždaren bijelom i crnom pločicom isporučenima s instrumentom. Kontrola mjerenja se obavlja preko softvera SpectraMagic NX.

Za analizu je uzeto 10 mL uzorka (ekstrakta), koje je stavljeno u plastične kivete dimenzija (v/š/d; 5/3,5/1 cm). Sva mjerenja provedena su u SCI (Specular Component Included) modu. Objektivno mjerenje boje temelji se na parametrima trodimenzionalnog spektra boja (L*, a*, b*), korištenjem uređaja koji rade na principu mjerenja stupnja reflektirane svjetlosti od mjerne površine. Parametar L* je mjera svjetlosti iskazana vrijednostima od 0 do 100 (0 = crno; 100 = bijelo). Vrijednost a* je iskazana vrijednostima od -60 do 60, a predstavlja spektar od crvene (pozitivne vrijednosti) do zelene (negativne vrijednosti) boje, pri čemu veća pozitivna vrijednost a* parametra karakterizira crveniju boju. Vrijednost b* parametra ukazuje na spektar nijansi između žute i plave boje, a njegova veća vrijednost označava i veću izraženost žutog dijela spektra.

Kombinacijom a* i b* vrijednosti dobiva se boja uzorka, pri čemu L* predstavlja svjetlinu te boje. Tako se iz vrijednosti a* i b* mogu izračunati vrijednosti za ton boje (H°) i zasićenost boje (C). Vrijednost H° predstavlja vizualni doživljaj boje (0° – 90° je crveno–narančasta boja, 90° – 180° je žuto–zelena, 180° – 270° plavo–zelena, a od 270° do 360° plavo–ljubičasta boja), a C vrijednost predstavlja intenzitet ili zasićenost boje (što su vrijednosti niže, zasićenost boje je slabija) (Vukušić, 2016). Kut boje (H°) leži između 0° i 90° ako su a* i b* koordinate pozitivne; između 90° i 180° ako je koordinata b* pozitivna i koordinata a* negativna; između 180° i 270° ako su a* i b* koordinate negativne te između 270° i 360° ako je koordinata a* pozitivna i koordinata b* negativna (Kipphan, 2001).

Vrijednosti C i H° računaju se prema sljedećim formulama :

$C = \sqrt{a^2 + b^2}$

$H° = \arctan\left(\frac{b}{a}\right)$

Ukupna promjena boje (ΔE) izračuna se na temelju izmjerenih vrijednost boje uzorka (L*a*b) prema formuli :

$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog eksperimentalnog rada bio je provesti klasičnu ekstrakciju odabranih mediteranskih biljaka zelenim otapalima i ekstrakciju zelenim otapalima potpomognutu visokonaponskim pražnjenjem te na temelju rezultata o ukupnim fenolima i o boji ekstrakta donesen je zaključak koji način ekstrakcije je efikasniji.

Fenolni spojevi su biološki važni spojevi s brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje te su zbog toga sve traženiji u prehrambenoj industriji kao dodaci pojedinim namirnicama u svrhu poboljšanja njihovog nutritivnog sastava i u farmaceutskoj industriji kao lijekovi ili dodaci prehrani. Kako bi se mogli koristiti u komercijalne svrhe, ključan korak je postupak ekstrakcije, odnosno „izvlačenje" željenih fenolnih spojeva iz biljnog materijala u obliku ekstrakta koji se potom koristi u različitim granama industrije (Balasundram i sur., 2006).

Budući da je ekstrakcija ključan korak u dobivanju fenolnih spojeva, bitno je postupak ekstrakcije provesti u što kraćem vremenu, sa čim manjim utroškom otapala i energije i s ekološki prihvatljivim metodama (Tomsone i sur., 2012). Zbog navedenih razloga, slijedeći trend modernizacije postojećih i osmišljavanja novih metoda, u prehrambenoj se industriji u posljednje vrijeme javljaju nove metode ekstrakcije (Chemat i sur., 2012; Xu i sur. 2017). Jedna od novih metoda ekstrakcija je ekstrakcija koja se provodi uz pomoć visokonaponskog pražnjenja.

U tablicama 5 – 8 prikazani su rezultati mjerenja provodnosti, pH vrijednosti i temperature, tijekom ekstrakcije tretiranih i netretiranih uzoraka lista masline i ružmarina. Također su navedene i dobivene vrijednosti ekstrahiranih ukupnih fenola (mg GAE/g uzorka) i karakteristike boje (L, a i b vrijednosti ekstrakta) ispitivanih uzoraka.

Tablica 5. Rezultati ekstrakcije netretiranih uzoraka lista masline i ružmarina

Uzorak	**Provodnost mS/ cm**	**pH vrijednost**	**Temperatura °C**	**Ukupni fenoli mg GAE/g uzorka**
3NL0/1	516,0	5,54	20,8	5,32
9NL0/1	349,0	5,45	19,7	15,85
3NL25/1	139,2	6,07	20,1	13,35
9NL25/1	141,6	6,21	20,0	16,04
3NL50/1	36,6	6,88	21,0	14,06
9NL50/1	41,3	6,51	21,0	20,61
3NR0/1	526,0	6,09	21,8	9,50
9NR0/1	517,0	5,96	21,2	10,41
3NR25/1	240,7	6,02	20,9	7,58
9NR25/1	154,4	5,80	22,0	7,75
3NR50/1	68,5	6,03	21,9	8,26
9NR50/1	56,4	5,98	23,7	9,78

Tablica 6. Rezultati ekstrakcije tretiranih uzoraka lista masline i ružmarina

Uzorak	**Provodnost mS/ cm**	**pH vrijednost**	**Temperatura** (prije tretmana) **°C**	**Temperatura** (nakon tretmana) **°C**	**Ukupni fenoli mg GAE/g uzorka**
LA4	233,3	5,28	23,7	25,1	26,69
LA5	126,4	5,77	24,3	26,1	36,17
LA8	59,0	6,25	23,2	24,4	65,99
LA9	94,6	6,00	23,8	24,5	30,77
LA10	285,7	5,18	24,5	29,9	21,21
LA11	49,6	6,36	24,5	24,6	42,60
RA4	325,0	5,62	24,2	25,9	7,21
RA5	157,4	5,98	23,0	28,9	26,34
RA8	65,7	6,27	25,5	25,9	21,12
RA9	106,8	6,11	24,7	25,8	22,34
RA10	421,0	5,61	23,8	29,5	16,77
RA11	46,7	6,54	24,2	25,0	14,86

Tablica 7. Prikaz podataka za boju ekstrakta netretiranog lista masline i ružmarina

Uzorak	**L_0**	**a_0**	**b_0**	**H°**	**C_0**
3NL0/1	81,86	4,96	42,70	83°22'	42,99
9NL0/1	82,06	6,59	46,76	81°58'	47,22
3NL25/1	89,56	0,06	30,53	89°53'	30,53
9NL25/1	91,02	-0,37	31,26	90°40'	31,26
3NL50/1	94,12	-3,82	27,89	97°48'	28,15
9NL50/1	91,03	-3,82	38,68	95°38'	38,87
3NR0/1	86,01	3,87	35,77	83°49'	35,98
9NR0/1	82,09	7,09	44,15	80°52'	44,72
3NR25/1	95,13	-0,77	15,26	92°53'	15,28
9NR25/1	93,55	-0,41	20,56	91°08'	20,56
3NR50/1	95,32	-1,16	13,79	94°48'	13,84
9NR50/1	94,11	-0,77	15,79	92°47'	15,81

Rezultati boje za netretirane uzroke prikazane u tablici 7 služe kao standard za usporedbu sa tretiranim uzorcima lista masline i ružmarina čiji su rezultati prikazani u tablici 8.

Tablica 8. Prikaz podataka za boju ekstrakta tretiranog lista masline i ružmarina

Uzorak	**L_1**	**a_1**	**b_1**	**H°**	**C_1**
LA4	80,40	8,10	48,30	80°28'	48,97
LA5	80,45	4,78	47,39	84°14'	47,63
LA8	85,95	-2,71	38,36	94°02'	38,46
LA9	82,62	2,21	37,57	86°38'	37,63
LA10	78,98	9,06	50,87	79°54'	51,67
LA11	84,57	-2,25	36,37	93°32'	36,44
RA4	84,95	3,72	38,07	84°25'	38,25
RA5	90,25	-0,73	30,17	91°23'	30,18
RA8	91,24	-2,84	33,36	94°51'	33,48
RA9	92,84	-1,43	24,87	93°17'	24,91
RA10	81,04	5,72	43,5	97°29'	43,87
RA11	94,56	-2,81	23,5	96°49'	23,67

U tablici 9 prikazani su podaci koji se temelje na vrijednostima L, a, b i C za tretirane i netretirane uzorke. Svakom tretiranom uzorku pridružen je standard (netretirani uzorak) koji mu odgovara prema vremenu ekstrakcije i udjelu etanola u otapalu te se na taj način iz razlike vrijednosti određenih parametara uzorka i standarda nastoji prikazati razlika u jačini obojenja ekstrakta, a time i razlika u uspješnosti provedene ekstrakcije.

Tablica 9. Usporedba vrijednosti a, b, L i C uzoraka i pripadajućih standarda te izračun ukupne promjene boje (ΔE)

Uzorak	**Standard**	**Δa** (a_1-a_0)	**Δb** (b_1-b_0)	**ΔL** (L_1-L_0)	**ΔC** (C_1-C_0)	**ΔE** ($\sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$)
LA4	3NL0/1	3,14	5,6	-1,46	5,99	6,58
LA10	9NL0/1	2,47	4,11	-3,08	4,45	5,70
LA9	3NL25/1	2,15	7,04	-6,94	7,10	10,12
LA5	9NL25/1	5,15	16,13	-10,57	16,37	19,96
LA11	3NL50/1	1,57	8,48	-9,55	8,29	12,87
LA8	9NL50/1	1,11	-0,32	-5,08	-0,41	5,21
RA4	3NR0/1	-0,15	2,3	-1,06	2,27	2,54
RA10	9NR0/1	-1,37	-0,65	-1,05	-0,84	1,84
RA9	3NR25/1	-0,66	9,61	-2,29	9,63	9,90
RA5	9NR25/1	-0,32	9,61	-3,3	9,61	10,17
RA11	3NR50/1	-1,65	9,71	-0,76	9,83	9,88
RA8	9NR50/1	-2,07	17,57	-2,87	17,67	17,92

4.1. Utjecaj uvjeta na uspješnost procesa ekstrakcije

Na temelju eksperimentalno dobivenih rezultata može se donijeti zaključak da vrijeme tretmana, udio etanola u otopini i način provođenja ekstrakcije bitno utječu na svojstva dobivenog ekstrakta (tablice 5-8).

Elektroprovodnost uzoraka ovisi o udjelu etanola u vodenoj otopini. Voda je poznata kao dobar vodič električne struje, stoga je bilo i očekivano da će uzorci kod kojih je korišteno otapalo sa nižim udjelom etanola pokazivati veću elektroprovodnost od onih uzoraka za čiju je ekstrakciju korišteno otapalo s većim udjelom etanola (tablica 5). Tretirani uzorci pokazuju manju provodnost električne struje od netretiranih uzoraka (tablica 6).

Udio etanola u otapalu, osim na elektroprovodnost, ima utjecaj i na udio ukupnih fenola u analiziranim ekstraktima lista masline i ružmarina. Općenito se za ekstrakciju polifenola iz prirodnih izvora obično koriste alkoholna otapala (Spigno i sur., 2007). Odabir idealnog otapala ključan je za proces ekstrakcije budući da otapalo određuje količinu i vrstu fenolnih spojeva koji se ekstrahiraju. Prema navodima nekih autora (Naczik i Shadidi, 2006; Zarena i Sankar, 2009), izdvajanje polifenola iz biljnog materijala ovisi o topljivosti fenolnih spojeva u otapalu koje je korišteno tijekom procesa ekstrakcije. U svakom biljnom materijalu nalaze se fenolni spojevi različitih kemijskih karakteristika i polarnosti te zbog toga treba pažljivo birati otapalo kojim će se proces provoditi kako bi uspješnost ekstrakcije bila što veća. Rezultati ukupnih fenola za netretirane uzorke lista masline i ružmarina iz tablice 5 razlikuju se s obzirom na udio etanola u otapalu korištenom za ekstrakciju. Primjerice kod lista masline, udio ukupnih fenola u uzorku 3NL0/1 koji je ekstrahiran samo s deioniziranom vodom iznosi 5,32 mg GAE/g što je gotovo tri puta manje od udjela ukupnih fenola u uzorku 3NL50/1 koji je ekstrahiran sa 50%-tnom otopinom etanola. Iz navedenog primjera može se zaključiti da su fenolni spojevi lista masline dobro topljivi u etanolu te da se njihov udio u ekstraktu povećava s povećanjem udjela etanola u otapalu korištenom tijekom ekstrakcije. Suprotno tome, kod ružmarina nije uočen takav trend povećanja udjela ukupnih fenola s povećanjem udjela etanola u otapalu što ukazuje na to da su u ružmarinu prisutni fenolni spojevi koji se po kemijskim karakteristikama i topljivosti u etanolu razlikuju od onih u listu masline. U uzorcima ružmarina u istim uvjetima ekstrakcije povećanje udjela etanola u otapalu imalo je blago negativan utjecaj na ukupne fenole u ekstraktu što se uočava na primjeru uzorka ružmarina 3NR0/1 koji je ekstrahiran samo s deioniziranom vodom te su ukupni fenoli iznosili 9,5 mg GAE/g, dok su u uzorku ružmarina 3NR50/1 koji je ekstrahiran s 50%-tnim etanolom ukupni fenoli iznosili 8,26 mg GAE/g (tablica 5).

Sljedeći parametar koji je određivan u ekstraktima uzoraka je pH vrijednost. Uspoređivanjem pH vrijednosti, uočeno je da postoji ovisnost između pH vrijednosti ekstrakta i udjela etanola u vodenoj otopini korištenoj prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva. Uzorci s većim udjelom etanola imaju nešto viši pH u odnosu na uzorke s manjim udjelom etanola. Povišenje pH vrijednosti je posljedica veće ekstrakcije fenolnih spojeva koji sadrže minimalno jednu hidroksilnu skupinu koja povećava pH vrijednost (Bravo, 1998).

Klasična ekstrakcija odvijala se na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje i nakon završetka ekstrakcije izmjerena je temperatura koja se za sve netretirane uzorke ne razlikuje za više od 4°C. Kod provođenja ekstrakcije potpomognute visokonaponskim pražnjenjem temperatura je mjerena na početku i na kraju tretmana hladnom plazmom. Razlike u

temperaturi uzoraka prije i nakon tretmana nisu bile veće od 6°C (tablica 6) te se na temelju toga može potvrditi da je metoda ekstrakcije uz pomoć visokonaponskog pražnjenja uistinu ne-toplinska metoda obrade.

Analiza ukupnih fenola provedena je sa ciljem procjene uspješnosti ekstrakcija koje su provedene na različite načine. Kod obje vrste, tretiranih i netretiranih uzoraka lista masline i ružmarina, udio ukupnih fenola bio je veći što je vrijeme ekstrakcije bilo duže (tablice 5 i 6). Uzorci tretirani hladnom plazmom imaju veći udio ukupnih fenola od netretiranih uzoraka. Kao što je već ranije navedeno, primjenom visokonaponskog pražnjenja dolazi do pojave električnog sloma koji u vodenoj otopini izaziva oštećenje strukture stanica biljnog materijala i fragmentaciju čestica čime je omogućena bolja i brža ekstrakcija unutarstaničnih komponenti (Rajha i sur., 2015).

Pigmenti su prirodne tvari, nosioci boje, a nalaze se u stanicama i tkivima biljaka. Žute i narančaste boje potječu od karotenoida, crvene, plave i ljubičaste boje od flavanoidnih spojeva, a zelena boja potječe od klorofila. Boja se mjeri pomoću različitih kolorimetara. Takvi uređaji mjere karakteristiku svjetla odbijenog od površine materijala kojem se mjeri boja (Jašić, 2013).

U analizi boje korišten je kolorimetar CM-3500d i obradom podataka dobivene su vrijednosti koje se nalaze u tablicama 7, 8 i 9. Na temelju podataka o tonu boje (H°) za ekstrakte netretiranih uzoraka lista masline (tablica 7) može se zaključiti da je vizualni doživljaj boje uzoraka koji su bili ekstrahirani otapalom s nižim udjelom etanola (0 i 25%) različit od uzoraka ekstrahiranih sa 50%-tnom otopinom etanola. Kod uzoraka koji su ekstrahirani otapalom s nižim udjelom etanola ton boje je crven, dok je kod uzoraka ekstrahiranih otapalom s višim udjelom etanola ton boje zelen. Kod netretiranog ružmarina ton boje za uzorke ekstrahirane destiliranom vodom (0% etanola) je crven, a za ostale netretirane uzorke ružmarina ton boje je zelen. Kod tretiranih uzoraka lista masline uočava se isti trend tona boje, dakle uzorci ekstrahirani sa 0 i 25 % otopinom etanola su crveni. Crveni ton boje kod tretiranog ružmarina prisutan je kod uzorka RA4 koji je ekstrahiran samo destiliranom vodom, dok ostali uzorci tretiranog ružmarina pokazuju ton zelene boje. Ukupna promjena boje (ΔE) pozitivna je za sva mjerenja (tablica 9) što ukazuje na to da je obojenje jače kod tretiranih nego kod netretiranih uzoraka (standarda).

U tablici 9 prikazane su vrijednosti Δa, Δb, ΔL, ΔC i ΔE. Pozitivna vrijednost Δa znači da je uzorak (tretirani) crveniji od standarda (netretirani), a negativna vrijednost Δa znači da je uzorak zeleniji od standarda. Pozitivna vrijednost Δb označuje da je uzorak žući od standarda,

a negativna vrijednost Δb označuje da je uzorak plaviji od standarda. Pozitivna vrijednost ΔL označuje da je uzorak svjetliji, a negativna vrijednost ΔL da je uzorak tamniji od standarda. Za list masline svi uzorci su crveniji od standarda, 83% uzoraka je žuće od standarda, a 100% uzoraka je tamnije od standarda. Svi uzorci ružmarina su zeleniji od pripadajućih standarda, također je 83% žuće od standarda i svi uzorci su tamniji od standarda. Pozitivna vrijednost ΔC ukazuje na veću zasićenost boje u uzorku nego u standardu. Na temelju ovih podataka o intenzivnijem obojenju tretiranih uzoraka, čija je masa i korišteno otapalo jednako netretiranim uzorcima, može se zaključiti da je prilikom tretmana hladnom plazmom došlo do oštećenja stanične strukture te da su pigmenti koji se nalaze unutar biljnih stanica izašli na površinu stanice i pritom uzrokovali jače obojenje ekstrakta. Budući da je došlo do oštećenja stanice, olakšan je i sam proces ekstrakcije bioaktivnih komponenata (Fincan i sur., 2004).

4.2. Usporedba rezultata ukupnih fenola ekstrahiranih klasičnom ekstrakcijom i ekstrakcijom uz visokonaponsko pražnjenje

Rezultati ukupnih fenola dobivenih klasičnom ekstrakcijom listova masline ovog istraživanja slični su rezultatima objavljenim u znanstvenom rada Abaza i sur. (2011). U tom znanstvenom radu ispitivan je utjecaj vrste otapala na udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata dobivenih iz listova masline. Klasičnu ekstrakciju su provodili na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata koristeći četiri različita otapala: deioniziranu vodu, 80%-tni metanol, 70% etanol i 80%-tni aceton. Udio ukupnih fenola u ekstraktu 70%-tnog etanola iznosio je 24.36±0.85 mg GAE/g što je više od najveće vrijednosti ukupnih fenola za netretirani list masline u ovom istraživanju koja je za uzorak 9NL50/1 iznosila 20,61 mg GAE/g. Rezultat iz znanstvenog rada Abaza i sur. (2011) u skladu je s provedenim istraživanjem i zaključcima jer su u tom radu koristili otapalo s većim udjelom etanola i ekstrakcija se provodila vremenski duže pa je udio ukupnih fenola bio očekivano veći od udjela za uzorak 9NL50/1. Također, u navedenom znanstvenom radu rezultati su pokazali da su najveći udio ukupnih fenola imali uzorci koji su ekstrahirani 80%-tnim acetonom (24.93±0.77 mg GAE/g), dok su najmanji udio ukupnih fenola (16.52±0.62 mg GAE/g) imali uzorci koji su ekstrahirani samo deioniziranom vodom.

U znanstvenom radu Elboughdiri (2018) je proučavao utjecaj vremena, omjera otapalo-krutina, koncentracije etanola i temperature na prinos fenolnih spojeva u ekstrakciji lista masline. Kao metoda rada je odabrana klasična ekstrakcija etanolom i vodom budući da se radi o široko rasprostranjenim otapalima zbog sigurnosnih i količinskih razloga (Seda, 2010). Promjene u

koncentraciji etanola utječu na fizikalna svojstva samog otapala kao npr. na: gustoću, dinamičku viskoznost i dielektričnu konstantu. Navedene promjene pri različitim koncentracijama etanola u otapalu utječu na topljivost komponenti biljnog materijala što ima značajan utjecaj na ekstrakciju polifenolnih spojeva (Cacace i Mazza, 2003). Iz navedenih razloga Elboughdiri (2018) je za provođenje ekstrakcije odabrao 50, 60, 70 i 80%-tni etanol. Na udio ukupnih fenola u ekstraktu bitan utjecaj imaju i ostali uvjeti ekstrakcije kao što su stabilnost suhih listova masline, vrijeme i temperatura te je ekstrakcija provođena pri različitim uvjetima sa ciljem određivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije. Optimalni uvjeti ekstrakcije u ovom istraživanju su sljedeći: vrijeme ekstrakcije 20 sati, temperatura 40°C, omjer otapalo-krutina 30:1, 80%-tni etanol.

U istraživanju kojeg su proveli Wissam i sur. (2016) sa ciljem optimizacije ekstrakcijskih uvjeta fenolnih spojeva i antioksidansa iz listova sirijske masline proučavani su efekti otapala, vremena i temperature na udio ukupnih fenola u ekstraktu. Ekstrakcija je također bila klasična. Jedna od ekstrakcija u tom istraživanju provedena je pod sljedećim uvjetima: trajala je 2 sata, koristio se 40%-tni etanol i temperatura je iznosila 60°C, a rezultat ukupnih fenola je iznosio 66,3 mg GAE/g. Uspoređujući taj rezultat s rezultatima ovog istraživanja koje se provodilo na sobnoj temperaturi i gdje je najveći udio ukupnih fenola kod netretiranih uzoraka iznosio već spomenutih 20,61 mg GAE/g, može se zaključiti da je ekstrakcija ukupnih fenola iz lista masline efikasnija ako se provodi na temperaturama višim od sobne temperature. Zagrijavanje može omekšati biljno tkivo i oslabiti fenol - protein i fenol – polisaharid interakcije te time olakšati ekstrakciju fenola iz biljnog materijala (Shi i sur, 2003). Tijekom ekstrakcije na povišenoj temperaturi može doći do degradacije polifenolnih spojeva uzrokovane hidrolizom, unutarnjim redoks-reakcijama i polimerizacijama koje mogu negativno utjecati na prinos bioaktivnih spojeva tijekom ekstrakcije (Cacace i Mazza, 2003). Određeni fenolni spojevi kao npr. flavanoidi osjetljivi su na toplinu pa se zbog izbjegavanja degradacije takvih spojeva mora pripaziti na temperaturu pri kojoj se provodi ekstrakcija. Primjer degradacije fenolnih spojeva vidljiv je u radu Wissam i sur. (2012) gdje je udio ukupnih fenola kod ekstrakcije provedene na 60°C niži nego na 40°C pri istim uvjetima otapala i vremena ekstrakcije.

Do razvoja ne-toplinskih metoda ekstrakcije došlo je upravo zbog izbjegavanja degradacije fenolnih spojeva i sa ciljem povećanja prinosa ekstrakcije. Usporedbom rezultata ekstrakcije ukupnih fenola na 60°C iz znanstvenog rada Wissam i sur. (2012) koji je iznosio 66,3 mg GAE/g i rezultata dobivenog ekstrakcijom na sobnoj temperaturi (24,4°C) uz visokonaponsko električno pražnjenje tijekom ovog istraživanja za uzorak LA8 koji je iznosio 65,99 mg GAE/g može se zaključiti da ova ne-toplinska metoda ekstrakcije uz visokonaponsko pražnjenje može

zamijeniti klasičnu metodu ekstrakcije koja se provodi na gotovo tri puta višoj temperaturi te je zbog toga potreban dodatan utrošak energije i postoji opasnost od degradacije fenolnih spojeva.

U znanstvenom radu Abramovič i sur. (2012) objavljeni su rezultati klasične ekstrakcije fenola iz ružmarina. Ekstrakcija je provedna sa 96%-tnim etanolom na 60°C u trajanju od sat vremena, a ukupni fenoli u ekstraktu su iznosili 92 mg GAE/g. Uspoređujući taj rezultat s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju može se zaključiti da na udio ekstrahiranih fenola iz ružmarina velik utjecaj ima temperatura na kojoj se provodila ekstrakcija jer je klasičnom ekstrakcijom na sobnoj temperaturi najveća vrijednost ukupnih fenola u ekstraktu iznosila 11,67 mg GAE/g (uzorak 9NR0/1). Udio etanola u otapalu, s obzirom na bliske vrijednosti ukupnih fenola pri različitim udjelima etanola u tablici 5, nema značajan utjecaj na udio ukupnih fenola u dobivenom ekstraktu.

Prinos ukupnih fenola u ekstraktima uzoraka istih biljaka koji su podvrgnuti različitim metodama ekstrakcija veći je u uzorcima koji su bili ekstrahirani uz visokonaponsko pražnjenje, nego u uzorcima koji su bili ekstrahirani klasičnom metodom.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista masline i ružmarina pomoću visokonaponskog pražnjenja provedena je uspješno

2. Tretirani uzorci imaju veći prinos ukupnih fenola i intenzitet obojenja od netretiranih uzoraka

3. Udio ukupnih fenola u ekstraktu ovisi o načinu provođenja ekstrakcije (klasična ili uz visokonaponsko pražnjenje), vrsti biljnog materijala, udjelu etanola u otapalu i temperaturi tijekom ekstrakcije

5. Najveći prinos fenolnih spojeva utvrđen je kod ekstrakcije uzorka lista masline uz visokonaponsko pražnjenje pri uvjetima: 9 minuta, 50%-tna otopina etanola

6. Ne-toplinska metoda ekstrakcije uz visokonaponsko pražnjenje nameće se kao efikasna metoda koja bi u budućnosti mogla zamijeniti klasičnu metodu ekstrakcije

6. LITERATURA

Abaza L., Manai Djebali H., Youssef N.B., Faouzia H.,Zarrouk M., Methenni K.(2011) Chétoui olive leaf extracts: Influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y Aceties* **62**: 96-104.

Abramovič H., Terpinc P., Generalić I., Skroza D., Klančnik A., Katalinić V., Smole Možina S.(2012) Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary (*Rosemarinus officinalis*) and vine (*Vitis vinifera*) leaves. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **4**: 1-8.

Anastas P.T.(1999) Green chemistry and the role of analytical methodology development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **29**:67-175.

Anonymous (2017) Uređaj za visokonaponsko pražnjenje plazma/ high voltage electrical discharge plasma device, < http://greenvoltex.pbf.hr/ > Pristupljeno 3.kolovoza 2018.

Balasundram N., Sundram K., Samman S.(2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191-203.

Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. (2009) Food Chemistry, 4. izd., Springer, Berlin. str. 822 - 825.

Bendini A., Cerretan L., Carrasco-Pancorbo A., Gómez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Lercker G. (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* **12**:1679-1791.

Boussetta N., Vorobiev E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie* **17**: 197 – 203.

Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317-333.

Cacace J.E., Mazza G. (2003) Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science* **68**: 240-248.

Chemat F., Vian M.A., Cravotto G. (2012) Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences* **13**: 8615-8627.

Elboughdiri N. (2018) Effect of Time, Solvent-Solid Ratio, Ethanol Concentration and Temperature on Extraction Yield of Phenolic Compounds From Olive Leaves. *Engineering, Technology & Applied Science Research*, **8**: 2805-2808.

Ercegović Ražić S. E., Čunko R. (2009) Modifikacija svojstava tekstilija primjenom plazme *Tekstil* : časopis za tekstilnu tehnologiju i konfekciju **58:** 55-74.

Fabbri A., Hormaza J. I., Polito V. S. (1995) Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**: 538 - 542.

Fincan M., DeVito F., Dejmek P. (2004) Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. *Journal of Food Engineering* **64**: 381-388.

Gird C.E., Nencu I. Popescu M.L., Costea T., Dutu L.E., Balaci T.D., Olaru O.C. (2017) Chemical, antioxidant and toxicity evaluation of rosemary leaves and its dry extract. *Farmacia* **65**: 978-983.

Harborne J.B. (1982) Introduction to Ecological Biochemistry, 2.izd., Academic Press, London. str. 251-256.

Joshi A. A., Locke B. R., Arce P., Finney W. C. (1995) Formation of hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and aqueous electrons by pulsed streamer corona discharge in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials* **41**:3 – 30.

Kaštelan – Macan M., Petrović M. (2013) Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb. str. 142. – 160.

Kaur C., Kapoor H.C. (2001) Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's Health. *International Journal of Food Science and Technology* **36**: 703-725.

Kazazić S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradiklana aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**: 279-290.

Kipphan H., (2001). Handbook of Print Media, 1.izd. Springer, Berlin, str. 100-108.

Kirkpatrick M. J., Locke, B. R. (2005) Hydrogen, Oxygen, and Hydrogen Peroxide Formation in Aqueous Phase Pulsed Corona Electrical Discharge. *Industrial* & *Engineering Chemistry Research* **44**: 4243-4248.

Knorr D., Froehling A., Jaeger H., Reineke K., Schlueter O., Schoessler K. (2011) Emerging Technologies in Food Processing. *Annual Review of Food Science and Technology* **2:** 203–235.

Komen V., Elektrotehnika, interni materijal, Veleučilište u Rijeci, <https://www.veleri.hr/files/datotekep/nastavni_materijali/k_sigurnost_1/ELEK_POG_03.pdf > Pristupljeno 5. kolovoza 2018.

Kozakova Z. (2011) Electric Discharges in Water Solutions. Habilitation thesis, Brno University of Technology, Brno.

Lovrić T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb. str 299.

Marković S., Ružmarin (2006), Vaše zdravlje, broj 49. <https://www.vasezdravlje.com/izdanje/clanak/961/ >, Pristupljeno 4. kolovoza 2018.

Mena P., Cirlini M., Tassotti M., Herrlinger K.A., Dall´Asta C., Del Rio D.(2016) Phytochemical Profiling of Flavonoids, Phenolic Acids, Terpenoids and Volatile Fraction of a Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract. *Molecules* **21**: 1576.

Mijatović I., Matošić M. (2013) Tehnologija vode, interna skripta, Prehrambeno - biotehnološki fakultet, Zagreb.

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

Misra N. N., Tiwari B. K., Raghavarao K. S. M. S. and Cullen P. J. (2011) Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens. *Food Engineering Reviews* **3**: 159-170.

Naczk M. i Shahidi F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1523–1542.

Obied H., Prenzler P., Ryan D., Servili M., Taticchi A., Esposto S., Robards K. (2009) Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from Olea europaea L. *Natural product reports* **25**: 1167 - 1179.

Omar S.H.(2010) Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica* **78**: 133-154.

Pankaj S. K. , Wan Z., Keener K. M. (2018) Effects of Cold Plasma on Food Quality: A Review. *Foods* **7**: 4.

Pereira A. P., Ferreira I. C. F. R., Marcelino F., Valentão P., Andrade P. B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J. A. (2007) Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. *Cv*. Cobrançosa) Leaves. *Molecules* **12**: 1153 – 1162.

Rahmanian N., Jafari S.M., Wani T.A. (2015) Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science and Technology* **42**:150–172.

Rajha H., Boussetta N., Louka N., Maroun R. G., Vorobiev E. (2015) Electrical, mechanical and chemical effects of high-voltage electrical discharges on polyphenol extraction from vine shoots. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **31**: 60-66.
Raynie D.E. (2004) Modern Extraction Techniques. *Analytical Chemistry* **76**: 4659–4664.

Rice-Evans C.A., Miller N.T., Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **4**: 304.309.

Sabry O. (2014) Review: Beneficial Health Effects of Olive Leaves Extracts. *Journal of Natural Sciences Researc* **4**: 19.

Schaffner W., Häfelfinger B., Ernst B. (1999) Ljekovito bilje: kompendij. Leo-commerce, Rijeka. str. 239.

Schlüter O., Ehlbeck J., Herte C., Habermeyer M., Roth A., Engel K. H., Holzhauser T., Knorr D., Eisenbrand G. (2013) Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods. *Molecular Nutrition & Food Research* **57:** 920–927.

Seda E.B. (2010) The effects of time, temperature, solvent:solid ratio and solvent composition on extraction of total phenolic compound from dried olive (olea europaea l.) leaves*. The Journal of Food,* **35**: 4-7.

Shi J, Yu JM, Pohorly J, Young C, Bryan M, Wu Y. (2003) Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food, Agricultural and Environment* **1**: 42-47.

Singh I., Mok M., Christensen A.M., Turner A.H., Hawley J.A. (2008) The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **18**: 127–132.

Spigno G., Tramelli L., De Faveri D.M. (2007) Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics*., Journal of Food Engineering* **81**: 200-208.

Talhaoui N., Gómez-Caravaca A.M., León L., De la Rosa R., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2014) Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves. *Food Science and Technology* **58**: 28–34.

Tendero C., Tixier C., Tristant P., Desmaison J., Leprince P. (2006) Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochimica Acta Part B* **61**: 2-30.

Tomsone L., Kruma Z., Galoburda R. (2012) Comparison of Different Solvents and Extraction Methods for Isolatin of Phenolis Compounds from Horeseradish Roots (Armoracia rusticana). *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* **6**: 236-241.

Verbanec, D.,(2010) Alergije i ružmarinska kiselina, <http://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/18304/Alergije-i-ruzmarinska-kiselina.html>, Pristupljeno 4. kolovoza 2018.

Vukušić T. (2016) Primjena hladne plazme pri obradi voćnih sokova, doktorski rad, Prehrambeno – biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb.

Wissam Z., Ali A., Rama H.(2016) Optimization of extraction for the recovery of phenolic compounds and antioxidants from Syrian olive leaves. *Journal od Pharmacognosy and Phytochemistry* **5**: 390-394.

Xie P., Huang L., Zhang C., You F., Wang C., Zhou H. (2015) Reduced-Pressure Boiling Extraction of Oleuropein Coupled with Ultrasonication from Olive Leaves (Olea europaea L.). *Advances in Materials Science and Engineering* **6**: 1-8.

Xie, J., VanAlstyne, P., Uhlir, A., Yang, X., (2017) A review on rosemary as a natural antioxidation solution, *European Journal of Lipid Science and technology,* **6**: 11-17.

Xu C.C., Wang B., Pu Y.Q., Tao J.S., Zhang T. (2017) Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines* **15**: 721-731.

Yousif Mutalib L. (2015) Comparasion between conventional and modern methods for extraction of Rosmarinus officinalis leaves. *Zanco Journal of Medical Sciences* **19**: 1029 - 1034.

Zarena A.S, Sankar K.U. (2009) A study of antioxidant properties from *Garcinia mangostana* L. pericarp extract. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* **8**: 23-34.

Izjava o izvornosti

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

Petra Golubić

ime i prezime studenta