

Utjecaj ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem na koncentraciju klorofila u talogu kadulje

Borovina, Danijela

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:540968>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Nutricionizam

Danijela Borovina

7184/N

**UTJECAJ EKSTRAKCIJE
VISOKONAPONSKIM PRAŽNENJEM NA
KONCENTRACIJU KLOROFILA 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. Mojca Čakić Semenčić

Zagreb, 2019.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mojci Čakić Semenčić na strpljenju i golemoj pomoći pri izradi ovoga završnog rada. Također se zahvaljujem i doc. dr. sc. Filipu Šupljiki na sugestijama i pomoći u provedbi UV/VIS spektroskopije, prof. dr. sc. Anet Režek Jambrek i doc. dr. sc. Tomislavi Vukušić na provođenju ekstrakcije potpomognute visokonaponskim pražnjenjem.

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 klorofila u talogu kadulje

Danijela Borovina, 00582079445

Sažetak: Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljnih materijala primjenom visokonaponskog pražnjenja rezultira, u usporedbi s klasičnim načinima ekstrakcije, povećanim prinosima, skraćenim vremenom, manjom potrošnjom energije i manjim utroškom otapala pa ju stoga ubrajamo u „zelene” metode ekstrakcije. U ovom radu istražen je učinak visokonaponskog pražnjenja na koncentraciju klorofila a i b u talozima preostalima nakon ekstrakcije hidrofilnih komponenti listova kadulje. Koncentracija klorofila a i b u talozima određena je primjenom UV/VIS spektroskopije i pritom je utvrđeno kako u većini slučajeva izlaganje visokonaponskom pražnjenju uzrokuje smanjenja koncentracije klorofila a i b u biljnom materijalu.

Ključne riječi: ekstrakcija, kadulja, klorofil, UV/VIS spektroskopija, visokonaponsko pražnjenje

Rad sadrži: 22 stranice, 8 slika, 1 tablicu, 42 literaturna 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. Mojca Čakić Semenčić

Datum obrane: 9. rujna 2019.

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
chlorophyll in the sage precipitate**

Danijela Borovina, 00582079445

Abstract: Extraction of bioactive components from plant materials using high voltage discharge results in, compared to conventional extraction methods, increased yields, reduced time, less energy consumption and less solvent consumption and is therefore considered as a "green" extraction method. The effect of high voltage discharge on the concentration of chlorophylls a and b in the precipitates remaining after extraction of the hydrophilic components of sage leaves is investigated in this thesis. The concentration of chlorophyll a and b in the precipitates was determined by UV/VIS spectroscopy, and it was shown that in most cases exposure to high voltage discharge causes a decrease in the concentration of chlorophyll a and b in the plant material.

Keywords: chlorophyll, extraction, high voltage discharge, sage, UV/VIS spectroscopy

Thesis contains: 22 pages, 8 figures, 1 table, 42 references

Original in: croatian

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

Mentor: Mojca Čakić Semenčić, Assistant Professor

Defence date: September 9th 2019

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

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	1
2.1	Klorofili.....	2
2.1.1	Struktura, vrste i biološka uloga klorofila	3
2.1.2	Kemijska i funkcionalna svojstva klorofila.....	4
2.1.3	Određivanje klorofila primjenom UV/VIS spektroskopije	6
2.2	Kadulja	10
2.3	Visokonaponsko pražnjenje	12
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.....	15
3.4.2	Ekstrakcija pigmenata iz taloga	15
3.4.3	UV/VIS spektroskopsko određivanje koncentracije klorofila <i>a</i> i <i>b</i>	15
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	16
5.	ZAKLJUČAK	18
6.	POPIS LITERATURE	19

1. UVOD

Klorofil je zeleni pigment koji se nalazi u zelenim dijelovima biljaka, a osim što im daje privlačnu zelenu boju dokazano djeluje i u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja. Iako je najzastupljeniji pigment u biljkama, u nefiziološkim je uvjetima izrazito nestabilan spoj.

Tijekom prerade voća i povrća dolazi do njegove degradacije koja može biti uzrokovana enzimskim ili kemijskim djelovanjem, kisikom, povišenom temperaturom ili fizičkim stresom.

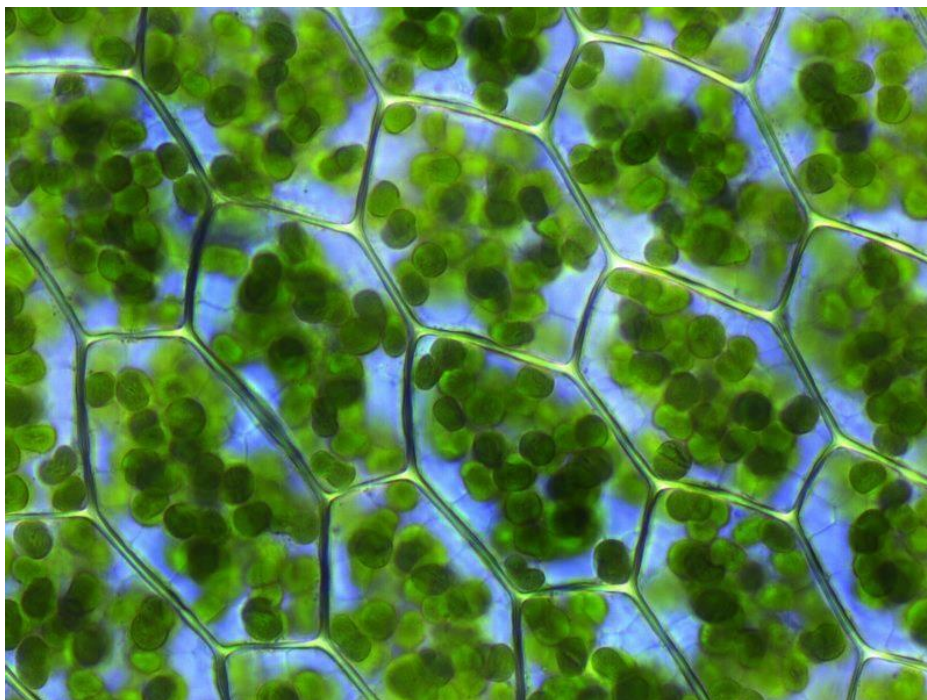
Zbog nestabilnosti brojnih bioaktivnih spojeva pri povišenim temperaturama, uobičajenima za klasične metode ekstrakcije, u posljednje se vrijeme razvijaju nove i ne-toplinske metode ekstrakcije biljnih materijala poput ultrazvuka, visokog hidrostatskog tlaka i plazme. Hladna plazma, dobivena visokonaponskim pražnjenjem, uzrokuje promjene na staničnoj strukturi biljke čime se olakšava i ubrzava proces ekstrakcije bioaktivnih komponenti a pritom ne dolazi do znatnijeg povećanja temperature.

Cilj ovog rada je istražiti učinak ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem na koncentraciju klorofila u talogu lista kadulje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Klorofil

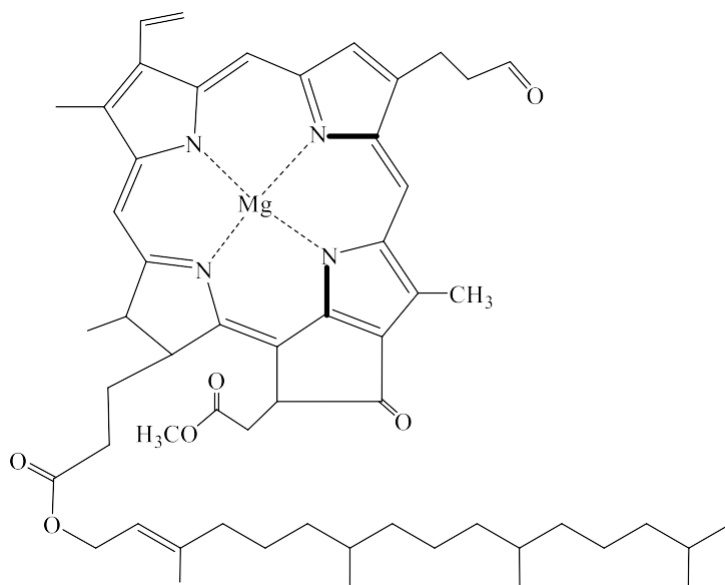
Klorofil je zeleni pigment koji daje zelenu boju različitim plodovima. Ne svrstavamo ga u ni jednu kategoriju osnovnih hranjivih tvari (ugljikohidrati, masti, proteini, vitamini i mikroelementi) jer njegov nedostatak ne uzrokuje nutritivni deficit koji može ugroziti normalne životne funkcije. Unatoč tome, njegova prisutnost u svakodnevnoj prehrani može pridonijeti u dugoročnoj prevenciji mnogih bolesti. Kao jedan od najraširenijih pigmenata ima važnu tehnološku i estetsku ulogu. S tehnološkog stajališta važno je zadržati svijetlo zelenu boju namirnice koja potječe od klorofila jer potrošač, često i nesvjesno, sudi o proizvodu na temelju njegovoga izgleda. Klorofil posjeduje i kromatska svojstva koja proizvod čine privlačnim te daju bitne vizualne i analitičke informacije o proizvodu. Kod viših biljaka klorofil nalazimo u plastidima, organelama koje su od ostatka citoplazme izolirane vlastitom membranom i sadrže vlastiti genetički materijal. Oni plastidi koji sadrže klorofile (slika 1), pa samim time posjeduju sposobnost fotosinteze, nazivaju se kloroplasti (Strasburger i sur., 1974).



Slika 1. Kloroplasti u biljnim stanicama (Anonymus 1, 2019)

2.1.1 Struktura, vrsta i biološka uloga

Klorofil ubrajamo u porfirinske sustave u kojima su α -položaji četiriju pirolovih prstena povezana metilnim mostovima (slika 2). Zbog planarne aromatske građe molekula klorofila je u fiziološkim uvjetima vrlo stabilna.



Slika 2. Struktura klorofila

Zahvaljujući kelirajućim svojstvima porfirinskog sustava u središte molekule klorofila ugrađen je ion magnezija. Osim porfirinskog prstena molekula klorofila sadrži i modificirani lanac propionske kiseline u obliku cikličkog betaketoestera. Kod viših je biljaka na porfirinski prsten esterskom je vezom povezan alkohol fitol, koji molekulu klorofila čini lipofilnom. Razlikujemo pet vrsta klorofila koji su prisutni u fotosintetskim organizmima i biljkama: a, b, c, d i e. Klorofili a i b su dvije najznačajnije skupine klorofila u biljkama, a njihova strukturna razlika nalazi se na trećem pirolnom prstenu. Na tom položaju kod klorofila a nalazimo metilnu skupinu, a kod klorofila b aldehidna grupu (Von Wettstein i sur., 1995). Klorofil a nalazi se u gotovo svim fotosintetskim organizmima dok se klorofil b nalazi u višim biljkama, te prati klorofil a kao dodatni pigment u procesu fotosinteze. Zbog apsorpcije crvenog i plavog svjetla klorofil a i b imaju karakterističnu zelenu boju. Bez prisutnosti fotosintetskog pigmenta klorofila, sa sposobnošću apsorpcije zračenja i pretvorbe u kemijsku energiju razvoj života na Zemlji bio bi nemoguć (Strasburger i sur., 1974). Sam proces pretvorbe

sunčeve energije u kemijsku, te skladištenje svjetlosne energije u obliku šećera naziva se fotosinteza. Pretpostavlja se da je klorofil a primarni pigment koji energiju izravno prenosi fotosintetskoj reakciji s obzirom da se nalazi u svim fotosintetskim organizmima (Stainer i sur., 1965). U sekundarne metabolite ubrajamo druge fotosintetske pigmente i ostale klorofile zbog zaštitne i pomoćne uloge (Taiz i Zeiger, 2010).

Kao sastavni dio jestivih biljaka klorofili su uobičajeni u ljudskoj prehrani. Međutim, ubrzo nakon branja biljaka, započinje degradacija klorofila uslijed koje mogu nastati drugi obojeni derivati ili bezbojni spojevi koji nastaju potpunom degradacijom ako se biljni materijal čuva duže vremena. Obrada povrća, osobito zagrijavanjem, također dovodi do transformacije klorofila u njegove derivate. Osim toga, gotovo svi načini obrade hrane u većoj ili manjoj mjeri uzrokuju strukturne promjene kod pigmenata, a time i promjenu njezine boje. Ipak, nema dokaza da obradom izazvane modifikacije molekule klorofila koje dovode do njegove degradacije u druge obojene derivate, uzrokuju smanjivanje njegovih funkcionalnih svojstava. Naprotiv, nastali derivati, uglavnom feofitini, mogu sačuvati ili čak pospiješiti takva svojstva (Higaski-Okai i sur., 1998; Chernomorsky i sur., 1999; Yang i sur., 1999). Suprotno tome, reakcije transformacije klorofila koje dovode do nastajanja bezbojnih produkata značajno utječu na boju hrane te smanjuju njezinu funkcionalnu aktivnost. Naime, cijepanjem porfirinskog sustava u razgradnim produktima smanjena je i njihova sposobnost interakcija s DNA i mutagenim agensima u usporedbi s intaktnim molekulama (Dashwood, 1997).

1.1.2 Kemijska i funkcionalna svojstva

U posljednje vrijeme klorofil dobiva sve veću važnost u ljudskoj prehrani, ali ne samo kao boja za prehrambene proizvode, već kao zdravi prehrambeni sastojak (Chappell i sur., 1992). U svom prirodnom okruženju, unutar kloroplasta, klorofili⁴ su prilično stabilni spojevi, no ako dođe do oštećenja organele i gubitka njezinih fizioloških svojstava, postaju iznimno nestabilni, podložni mnogim strukturnim modifikacijama. Osjetljivi su na djelovanje mnogih čimbenika kao što su temperatura i pH te djelovanje enzima, molekularnog kisika i svjetla (Lin, 1994). Razlikujemo četiri mjesta na kojima dolazi do glavnih strukturnih modifikacija molekule klorofila: (i) središte porfirinskog sustava, (ii) esterska veza fitilnog repa, (iii) izociklički prsten i, (vi) osnovna porfirinska struktura.

Klorofili i njihovi derivati su skupina spojeva koji su biološki aktivni pri koncentracijama uobičajenim u prehrani. Prve studije posvećene istraživanjima utjecaja

klorofila na kancerogene procese potječu još iz 1930-ih, u tim istraživanjima otkriveno je nakupljanje derivata porfirina u sarkomima i karcinomima dojke. Današnja istraživanja usredotočena su na preventivnu aktivnost derivata klorofila u razvoju tumora i uglavnom se bave njihovim antimutagenim i antigenotoksičnim djelovanjem (Lin, 1994).

Većina lijekova koji se koriste u liječenju tumora imaju nuspojave i mogu izazvati genotoksične učinke u zdravim stanicama. Testovi *in vitro* (Gentile i sur., 1998) i *in vivo* na miševima (Te i sur., 1997) pokazali su kako derivati klorofila smanjuju kolateralno mutageno djelovanje lijeka bez promjene antitumorskog učinka te su se dugi niz godina koristili kako bi se umanjile nuspojave lijekova s koleteralnom mutagenom sposobnošću liječenja raka (Kumar i sur., 1999). No, iznimno je bitan način upotrebe jer se ustanovilo da se najveća učinkovitost postiže oralnom i istodobnom primjenom kancerogene supstance i klorofila (Negishi i sur., 1997).

Rak debelog crijeva je među vodećim uzrocima smrti od raka u zapadnim zemljama gdje je prehrana bogata crvenim i prerađenim mesom, a siromašna voćem i povrćem. Istraživanje je pokazalo da hem, željezni porfirinski pigment crvenog mesa, može biti važan faktor rizika jer povećava citotoksičnost fekalnog sadržaja, a time i povećano izlaganje epitelnih stanica kolona luminalnim iritantima (Sesink i sur., 1999). Iako su mehanizmi koji bi objasnili negativno djelovanje prehrane bogate crvenim mesom tj. pozitivno djelovanje prehrane bogate povrćem na razvoj raka debelog crijeva još uvijek nedovoljno opisani, nedavna su istraživanja pokazala da je takav učinak povezan s klorofilom prisutnim u hrani. Preventivno djelovanje klorofila specifično je za prirodne klorofile i ne može se oponašati vodotopivim klorofilinima (de Vogel i sur., 1995). No, osim što je učinkovito sredstvo za blokiranje tijekom inicijacijske faze, istražuje se uloga klorofila kao supresijskog sredstva i moguće nove terapije usmjerene na abnormalnu staničnu proliferaciju u kolonu. Klorofil utječe na homeostazu tkiva u debelom crijevu, pa su potrebna daljna istraživanja mehanizama apoptoze u ljudskim stanicama raka debelog crijeva (Blum i sur., 2001; Dashwood i sur., 2001).

5

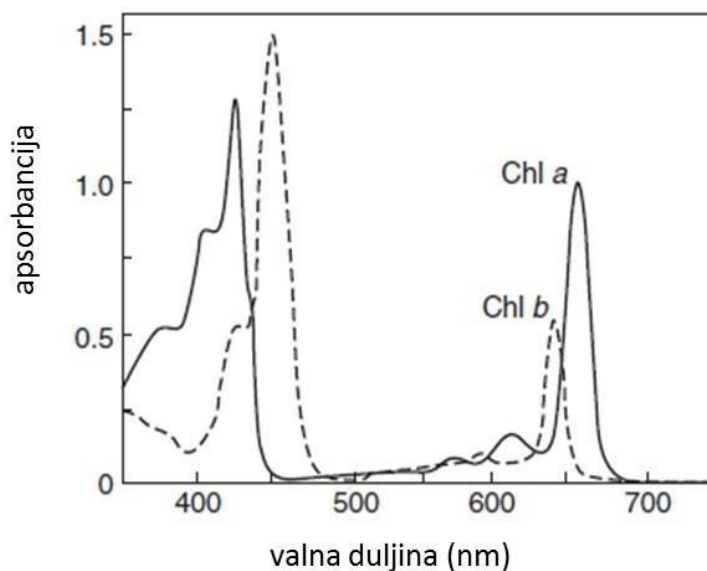
Trimetilaminurija (TMAU) je metabolički poremećaj karakteriziran nemogućnošću transformacije trimetilamina (TMA), kemijskog spoja intenzivnog mirisa po ribi, u trimetilamin-*N*-oksid (TMAO) bez mirisa. Budući da je pokazano kako klorofil u crijevima može vezati amine (Dashwood i sur., 1996) u terapiju pacijenata koji boluju od te genetske bolesti dodan je bakrov kompleks klorofila. Po završetku terapije laboratorijski su nalazi pokazali smanjenu slobodnu koncentraciju TMA u mokraći i povećanje TMAO na razinu prisutnu u normalnih osoba (Yamazaki i sur., 2004).

Unatoč tome što je najzastupljeniji pigment u prirodi i što postoji dokumentirana prooksidacijska i antioksidacijska aktivnosti, klorofil nije uključen u većinu istraživanja o antioksidacijskom djelovanju fitokemikalija. U jednoj je studiji dokazano kako derivati klorofila a učinkovitije uklanjaju radikale nego oni klorofila b (Ferruzzi i sur., 2002). Također, derivati bez metala kao što su klorini, feofitini i pirofeoptini pokazali su značajno niži antiradikalni kapacitet od derivata koji sadrže metale kao što su Mg-klorofili, Zn-feofitini, Zn-pirofeofini, Cu-feofitin a i Cu-klorofilini.

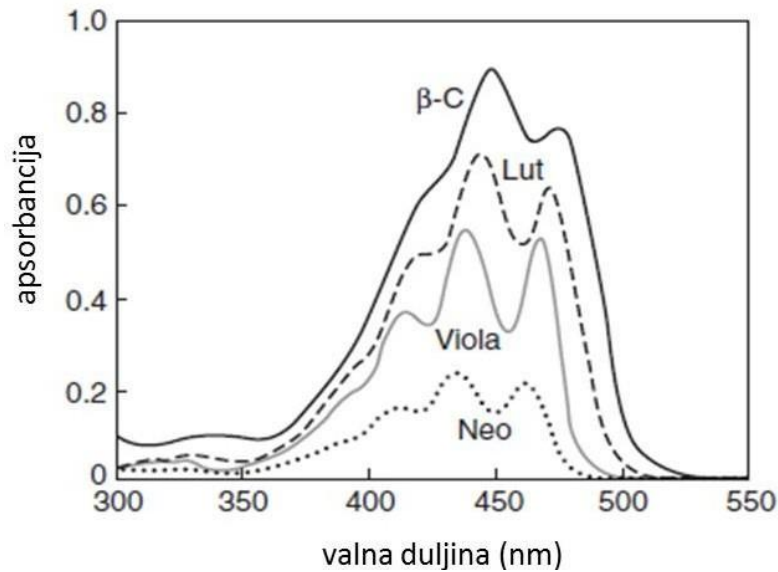
2.1.3 Određivanje klorofila primjenom UV/VIS spektroskopije

Kvantitativno određivanje klorofila a (Chl a), klorofila b (Chl b) i karotenoida u biljnim ekstraktima pomoću UV/VIS spektroskopije ovisi o više faktora: otapalu odnosno sustavu otapala korištenih za ekstrakciju, spektrofotometru i samom uzorku (Lichtenhalter i Buschmann, 2001).

Kao što je vidljivo na slikama 3 i 4, koje prikazuju UV spektre čistog Chl a, Chl b i najzastupljenijih karotenoida u listovima viših biljaka u dietileteru, apsorpcijske regije različitih pigmenata se preklapaju.



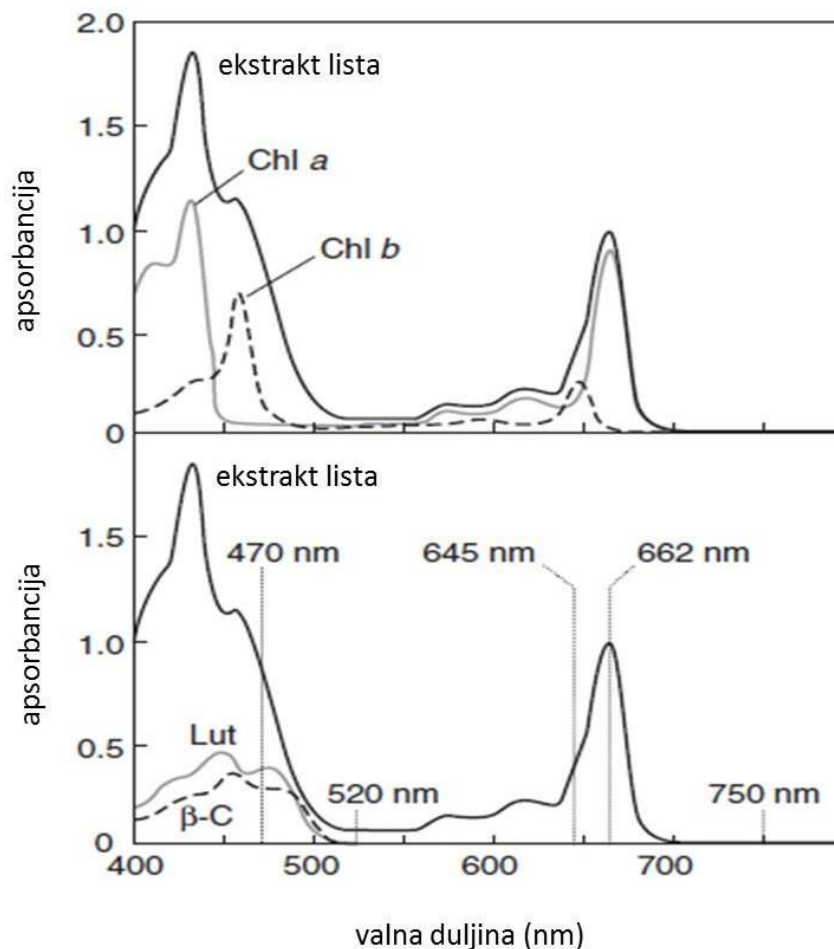
Slika 3. UV/VIS apsorpcijski spektri čistih Chl a i Chl b u dietileteru (Lichtenthaler, 2001)



Slika 4. UV/VIS apsorpcijski spektri TLC-om izoliranih najzastupljenijih karotenoida u zelenim listovima viših biljaka u dietileteru (β -C, β -karoten; Lut, lutein; Neo, neoksantin; Viola, violaksantin) (Lichtenthaler, 2001)

Apsorpcijske maksimume Chl a i Chl b nalazimo u plavom (~428 i 453 nm) i crvenom dijelu spektra (~661 i 642 nm) dok se između 400 i 500 nm uočava široka apsorpcijska vrpca izoliranih karotenoida s tri maksimuma. Položaj apsorpcijskih maksimuma pigmenta ovisi o upotrijebljenom otapalu i tipu spektrofotometra. Tako se primjerice povećanjem polarnosti otapala u kojem se vrši mjerenje apsorpcijski maksimum Chl a u crvenom dijelu spektra pomiče s 660 na 650 nm a onaj u plavoj regiji s 428 na 432 nm. Slično vrijedi i za Chl b u čijim se spektrima opaža pomicanje maksimuma s 642 na 652 nm a 452 na 469 nm. Ti pomaci proizlaze iz promjena molarnih apsorpcijskih koeficijenata i stoga se prilikom kvantitativnog određivanja pigmenta očitavaju valne duljine pri maksimumima čistih Chl a, Chl b i karotenoida u određenom otapalu.

U UV-VIS spektrima ekstrakata zelenih listova (slika 5.) koji sadrže smjesu Chl a, Chl b i karotenoida dominiraju apsorpcijski maksimumi Chl a pri $\lambda = 428$ i 661 nm dok se između 400 i 500 nm opaža široka apsorpcijska vrpca Chl b i karotenoida.



Slika 5. Apsorpcijski spektri pigmenata iz acetonskog ekstrakta duhana i čistih Chl a, Chl b, β -karotena i luteina (Lichtenthaler, 2001)

Kvantitativno određivanje pigmenata u smjesi pomoću UV-VIS spektroskopije temelji se na Lambert-Beerovom zakonu:

$$A = \alpha b c_w \quad (1)$$

8

gdje je A apsorbanca na danoj valnoj duljini svjetlosti, α je apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent ($L \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) svojstven svakoj molekularnoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, b je duljina puta svjetlosti kroz uzorak, a c_w je masena koncentracija tvari u otopini. U tom se obliku Lambert-Beerov zakon može koristiti isključivo za određivanje koncentracije pojedinačnog, izoliranog pigmenta. Naime, uslijed promjene otapala, valne duljine svjetlosti ili prisutnosti drugih kemijskih vrsta mijenja se i apsorpcijski koeficijent. Stoga se prilikom određivanja koncentracije Chl a i Chl b u ekstraktu koji sadrži oba pigmenta Lambert-Beerov

zakon modificira. Apsorbancija se izražava kao suma apsorbancija oba pigmenta jer pri apsorpcijskom maksimumu apsorbancija Chl a doprinosi apsorbanciji Chl b i obrnuto:

$$A_{\max a} = A_{(a)\max a} + A_{(b)\max a} = (\alpha_{(a)\max a} \cdot c_a \cdot b) + (\alpha_{(b)\max a} \cdot c_b \cdot b) \quad (2)$$

$$A_{\max b} = A_{(a)\max b} + A_{(b)\max b} = (\alpha_{(a)\max b} \cdot c_a \cdot b) + (\alpha_{(b)\max b} \cdot c_b \cdot b) \quad (3)$$

Ako se jednadžbe (2) i (3) preurede, uzme da je duljina puta svjetlosti 1 cm te uvede faktor z (6) slijede izrazi za koncentraciju Chl a i Chl b:

$$c_a = \left(\frac{A_{\max a}}{b} - \frac{A_{(b)\max a}}{b} \right) \cdot z \quad (4)$$

$$c_b = \left(\frac{A_{\max b}}{b} - \frac{A_{(a)\max b}}{b} \right) \cdot z \quad (5)$$

$$z = \frac{(\alpha_{(a)\max a} \cdot \alpha_{(b)\max b}) - (\alpha_{(a)\max b} \cdot \alpha_{(b)\max a})}{\alpha_{(a)\max a} \cdot \alpha_{(b)\max a} - \alpha_{(a)\max b} \cdot \alpha_{(b)\max b}} \quad (6)$$

U ekstraktima biljnog materijala koji sadrže uz klorofile i karotenoide (x + c = ksantofili i karoteni) apsorbancija pri 470 nm određena je sumom apsorbancija Chl a, Chl b i karotenoida:

$$A_{470} = A_{(x+c)470} + A_{(a)470} + A_{(b)470} \quad (7)$$

Ako se primjeni Lambert-Beerov zakon:

$$A_{(a)470} = \alpha_{(a)470} \cdot c_a \cdot b \quad (8)$$

$$A_{(b)470} = \alpha_{(b)470} \cdot c_b \cdot b \quad (9)$$

$$A_{(x+c)470} = \alpha_{(x+c)470} \cdot (c_a + c_b) \cdot b \quad (10)$$

Uzevši u obzir da je uobičajena duljina puta svjetlosti 1 cm slijedi izraz za koncentraciju karotenoida:

$$c_{(x+c)} = \frac{A_{(x+c)470} - (\alpha_{(a)470} \cdot c_a \cdot b) - (\alpha_{(b)470} \cdot c_b \cdot b)}{\alpha_{(x+c)470} \cdot b} \quad (11)$$

Ako se želi odrediti koncentracija Chl a, Chl b i karotenoida u primjerice 90%-tnom metanolnom ekstraktu koriste se literaturno dostupni podaci o ekstinkcijskim koeficijentima čistih tvari u pojedinom otapalu ili smjesi otapala pa se izrazi (4), (5) i (11) mogu pojednostavniti:

$$c_a(\mu\text{g/ml})=16,82A_{665,2}-9,28A_{652,4} \quad (12)$$

$$c_b(\mu\text{g/ml})=36,92A_{652,4}-16,54A_{665,2} \quad (13)$$

$$c_{(x+c)}(\mu\text{g/ml})=(1000A_{470}-1,91c_a-95,15c_b)/225 \quad (14)$$

2.2 Kadulja

Kadulja (*Salvia officinalis L.*), prikazana na slici 6, pripada porodici *Lamiaceae* (usnače), podporodici *Nepetoideae*, tribusu *Menthae*, subtribusu *Salviinae*, rodu *Salvia* (Drew i Sytsma, 2012). Kadulja je višegodišnja biljka koja potječe s područja južne Europe i Sredozemlja. U narodu je također poznata i s drugim nazivima poput kuš, slavulja, pelim, žalfija i dr. (Willfort, 2002). Zbog snažnog korijena izrazito je otporna na sušu, pa samim tim vrlo dobro uspijeva na siromašnom krškom području, posebno u Dalmaciji. Listovi su sivo zelene boje, prekriveni dlačicama kako bi se spriječilo isparavanje vode. Veličina cvjetova je maksimalno tri centimetra, dvospolni su i specifične ljubičaste boje. Zbog boje cvjetova i lijepog mirisa kadulja ima veliki značaj kao medonosna biljka (Trinajstić, 1992). Vrijeme cvatnje kadulje je u svibnju, lipnju i srpnju (Willfort, 2002).



Slika 6. Kadulja (Anonymus 2, 2019)

Njezino botaničko ime dolazi od latinske riječi *salvare* što bi u prijevodu značilo spasiti. Samo značenje upućuje na mnogobrojna ljekovita svojstva koja su poznata još od antičkih vremena (Dent, 2013). Znanstveno su utemeljena njezina antiseptička i protuupalna djelovanja, a u novije vrijeme sve se više istražuju i njezini virustatski i fungistatski učinci koji se pripisuju kombiniranom djelovanju sastavnica eteričnog ulja i fenolnih spojeva u kadulji (Kuštrak, 2005). Osim što se zbog navedenih svojstava upotrebljava u farmaciji, zbog svojih senzorskih karakteristika koristi se i kao začim u kulinarstvu.

Dalmatinska kadulja (*Salvia officinalis L.*) najpoznatija je samonikla vrsta koja se još naziva i ljekovita kadulja. Pripada skupini ilirsko-jadranskih endemičkih biljaka sa središtem rasprostranjenosti na dijelu Hrvatskog primorja od otoka Krka i Cresa na sjeveru do planine Biokovo na jugu (Trinajstić, 1992).

Od mnogobrojnih formi i varijeteta na području Europe najpoznatije su tri podvrste – *Lavandulifolia*, minor i major. Razlikuju se s obzirom na područje na kojem uspijevaju, te prema morfološkim karakteristikama. *Lavandulifolia* je rasprostranjena na Pirinejskom poluotoku, mirisom podsjeća na ružmarin, a sastoji se od uskih, duguljastih listova i cvjetova s kratkim stapkama. Podvrstu Minor uglavnom pronalazimo na području srednjeg Sredozemlja. Karakteristična je za područje Republike Hrvatske, a njezina su glavna obilježja su duge peteljke listova i manje dlakavi listovi. Na našem području razlikujemo tri tipa podvrste Minor, a to su: Sjevernojadranski na području Kvarnera, srednjojadranski na području Makarske te Južnojadranski na području Stona i Dubrovačkog primorja. Podvrsta Major raste na području Male Azije, istočnog Mediterana i južne Rusije. Od prethodne dvije podvrste razlikuje se veličinom (Kuštrak, 2005).

Aromatični su listovi kadulje bogati sekundarnim biljnim metabolitima, fenolnim kiselinama, flavonoidima, diterpenima i triterpenima, ali sadrže i eterično ulje (Wang i sur., 1998) koje se upotrebljava u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji te u medicini, farmakologiji i fitopatologiji.

1

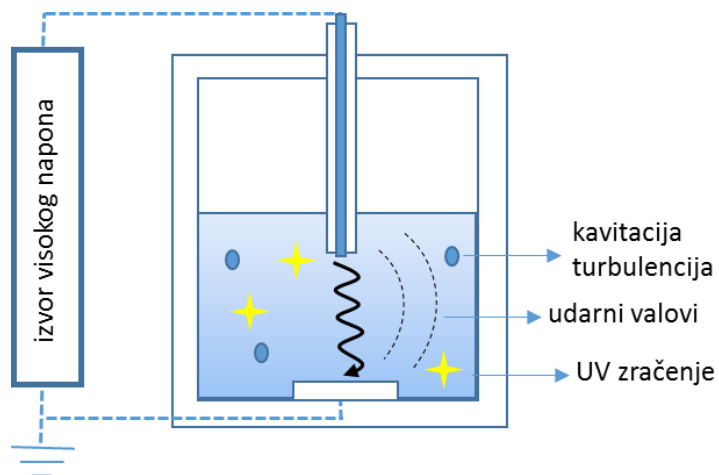
Zbog dokazanoga antioksidacijskog djelovanja koje se fenolnim spojevima, kadulja se intenzivno istražuje te je interesantna prehrambenoj industriji. Antioksidansi kadulje mogu se koristiti kao dodaci za poboljšanje kvalitete i hranjive vrijednosti hrane, odnosno kao funkcionalna hrana (Generalčić i sur., 2011)

2.3 Visokonaponsko pražnjenje

Plazma, odnosno ionizirani plin je najrasprostranjeniji oblik vidljive materije u svemiru a često se naziva i četvrtim agregatnim stanjem. Zbog slobodnih nosilaca naboja, elektrona i iona, plazma je električki vodljiva, no istodobno je električki neutralna jer sadrži jednak broj pozitivno i negativno nabijenih čestica. Osim što je dobar vodič električne struje plazma snažno reagira na električno i magnetsko polje. Da bi se plin preveo u plazmu potrebno mu je dovoditi energiju, što se u laboratoriju postiže prolaskom električnog naboja kroz plinove u električnom polju, odnosno električnim izbijanjem plinova. Ovisno o gustoći nabijenih čestica, tlaku i temperaturi plina razlikujemo više vrsta plazmi (Ercegović Ražić i Čunko, 2009). Hladna plazma je u termodinamički neravnotežnom stanju jer je temperatura elektrona mnogo veća od temperature iona i neutralnih vrsta. U takvom je stanju temperatura plina bliska sobnoj temperaturi, a pritom elektroni posjeduju dovoljnu kinetičku energiju i temperaturu da održavaju plazmu i iniciraju kemijske reakcije (Radetić, 2005). Zbog netoplinske prirode tehnologija hladne plazme nalazi primjenu u prehrambenoj industriji i biomedicini. Pritom se u prehrambenoj industriji najčešće upotrebljava za dekontaminaciju hrane, poboljšanje njezine kvalitete, razgradnju toksina i površinsku modifikaciju materijala za pakiranje. Hladna plazma djelotvorno inaktivira različite patogene i uzročnike kvarenja bez štetnih utjecaja na kvalitetu hrane. Također je utvrđen potencijal za znatnu degradaciju mikotoksina i pesticida prisutnih u poljoprivrednim proizvodima. Sadašnja su istraživanja plazme usredotočena na analizu njezine učinkovitosti protiv različitih patogena u prehrambenim proizvodima s naglaskom na otkrivanju mehanizama inaktivacije na molekularnoj razini (S.K. Pankaj i K. M. Keener, 2017).

Posljednjih se godina intenzivno proučavaju potencijali hladne plazme, stvorene visokonaponskim električnim pražnjenjem u tekućini, kao metode za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz različitih sirovina. Tehnologiju visokonaponskog električnog pražnjenja (eng. High voltage electrical discharge – HVED) ubrajamo u "zelenu" tehniku ekstrakcije jer omogućuje visoke prinose biokomponenti uz manju potrošnju energije od konvencionalnih ekstrakcijskih procesa (Boussetta, 2014). U usporedbi s drugim fizikalnim tretmanima poput pulsirajućeg električnog polja i ultrazvuka primjena HVED-a rezultira bržom ekstrakcijom. Također, dolazi do manjeg porasta temperature nego kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ili ultrazvukom, a tako su i smanjene i mogućnosti degradacije poželjnih spojeva.

Tijekom visokonaponskog električnog pražnjenja u tekućini nastaje plazmeni kanal iz kojeg se energija prenosi izravno u tekućinu i pritom inicira različite kemijske reakcije i fizikalne procese. Za razliku od mehanizama električnog pražnjenja u plinovima oni u tekućinama još uvijek nisu posve istraženi te su prisutne dvije hipoteze koje objašnjavaju nastanak vodljivog kanala u tekućinama. Prva hipoteza pretpostavlja razvoj plinovite faze u kojoj se odvijaju elektronske lavine dok druga hipoteza smatra kako do električnog sloma u tekućinama dolazi uslijed porasta broja nosioca električnog naboja uzrokovanog ionizacijom tekućine. Bez obzira koja je teorija ispravna, električno pražnjenje dovodi do stvaranja vruće i lokalizirane plazme koja snažno emitira UV zračenje visokog intenziteta, stvara udarne valove i visokoreaktivne radikale i molekulske vrste (slika 7). Izlaganjem suspenzije biljnog materijala električnom pražnjenju dolazi do olakšane ekstrakcije bioaktivnih komponenti jer udarni valovi uzrokuju kavitaciju a urušavanje kavitacijskih mjehurića dovodi do dezintegracije stanične strukture.



Slika 7. Visokonaponsko pražnjenje u tekućini

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

- 25%-tna vodena otopina etanola
- 50%-tna vodena otopina etanola
- 90%-tna vodena otopina metanola
- Destilirana voda

3.3 Aparatura i pribor

- analitička vaga
- magnetska mješalica
- UV/ViS spektrofotometar PerkinElmer Lambda 25
- Buchnerov lijevak
- laboratorijske čaše i tikvice
- kivete
- filter 0,2 μm PTFE
- staklene čaše

3.4. Metode rada

3.4.1 Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem 1

Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim pražnjenjem provedena je u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo PBF-a u sklopu projekta "*Greenvoltex*". Količina od 1 g biljnog materijala (kadulje) suspendira se u 50 ml vode, odnosno smjese etanola i vode (1:1 i 1:3), i podvrgne ekstrakciji hladnom plazmom (20 kV, 100 Hz) u struji argona u trajanju od 9 minuta. Suspenzije kontrolnih (netretiranih) uzoraka u istom se otapalu ili smjesi otapala, miješaju magnetskom mješalicom na sobnoj temperaturi 9 minuta. Kontrolni i tretirani uzorci dalje se obrađuju i analiziraju na istovjetan način.

3.4.2 Ekstrakcija pigmenata iz taloga

Suspenzije tretiranih i netretiranih uzoraka filtriraju se kroz Buchnerov lijevak kako bi se od taloga kadulje, u kojem će se određivati koncentracija klorofila, odvojio ekstrakt. Biljni ostatak (talog) potom se uz pomoć magnetske miješalice 15 minuta ekstrahira na sobnoj temperaturi s 30 ml 90%-tne vodene otopine metanola. Metanolni ekstrakt koji sadrži klorofile filtrira se kroz 0,2 µm PTFE filter.

3.4.3 UV/VIS spektroskopsko određivanje koncentracije klorofila a i b

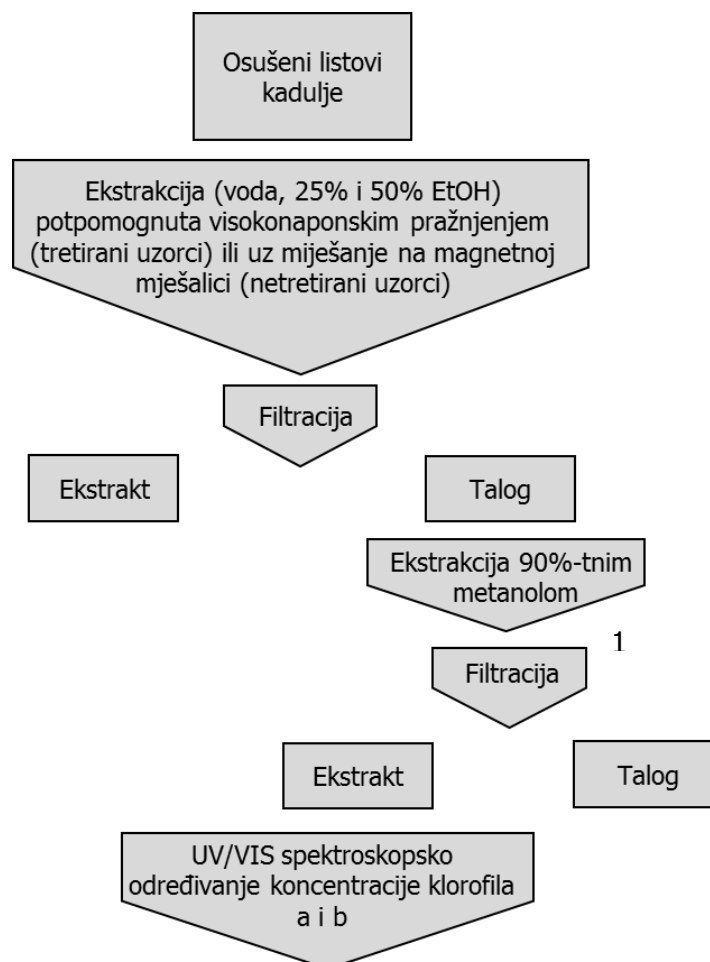
Parametri UV/VIS spektrofotometra:

- *start wavelength*: 350 nm
- *end wavelength*: 700 nm
- *data interval*: 0,5 nm
- brzina snimanja: 480 nm/min

Koncentracija klorofila a i klorofila b u 90%-tnim metanolnim ekstraktima taloga kadulje, preostalim nakon tretiranja listova kadulje hladnom plazmom i kontrolnim uzorcima, određuje se pomoću UV/VIS spektrofotometra i primjenom Lichtenhalterovih jednadžbi. Apsorbancija 90%-tnih metanolnih ekstrakata mjeri se u dvozračnom UV/VIS spektrofotometru, a pritom se u jednu kvarcnu kivetu stavlja čisti 90%-tni metanol, a u drugu ekstrakt. Očitava se apsorbancija otopine pri valnoj duljini od 665,2 i 652,4 nm, a onda se korištenjem jednadžbi (12) i (13) izračuna koncentracija klorofila a i klorofila b u ekstraktu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljnih materijala primjenom visokonaponskog pražnjenja rezultira, u usporedbi s klasičnim načinima ekstrakcije, povećanim prinosima, skraćenim vremenom, manjom potrošnjom energije i manjim utroškom otapala. Stoga je i ubrajamo u „zelene“ metode ekstrakcije. Uzorci koji su se koristili u ovom radu su talozi kadulje preostali nakon ekstrakcije osušenih listova kadulje potpomognute visokonaponskim pražnjenjem. Cilj rada bio je ispitati utjecaj podvrgavanja biljnog materijala visokonaponskom pražnjenju na koncentraciju klorofila a i b u talozima preostalima nakon ekstrakcije. Na slici 8 shematski je prikazan tijek eksperimenta. Svi tretmani hladnom plazmom, konvencionalne ekstrakcije (netretirani uzorci), ekstrakcije pigmentata iz taloga i spektroskopska određivanja njihove koncentracije ponovljeni su u tri neovisna eksperimenta.



Slika 8. Shematski prikaz eksperimenta

Osušeni i usitnjeni listovi kadulje ekstrahirani su vodom te s 25%- i 50%-tnim etanolom u ekstrakcijskom procesu potpomognutom visokonaponskim pražnjenjem. Netretirani uzorci ekstrahirani su identičnim otapalom odnosno smjesom otapala u istom razdoblju uz miješanje na magnetnoj miješalici. Nakon filtriranja suspenzija, kako bi se izdvojili ekstrakti, pristupilo se određivanju koncentracije klorofila a i b u talozima. Naime, zbog hidrofobnog fitilnog repa klorofili su lipofilne molekule, a imajući u vidu načelo "slično otapa slično" značajne koncentracije klorofila a i b u vodenim, odnosno 25%- i 50%-tnim etanolnim ekstraktima nisu očekivane. Za ekstrakciju fotosintetskih pigmenata iz taloga tretiranih i netretiranih uzoraka kao otapalo je korišten 90%-tni metanol jer su klorofil a i b u njemu dobro topljivi te su za taj sustav otapala dostupne jednadžbe (12) i (13) s pomoću kojih je određena koncentracija pigmenata u ekstraktima (tablica 1).

Tablica 1. Koncentracija klorofila a i klorofila b u 90 %-tnim metanolnim ekstraktima taloga tretiranih i kontrolnih uzoraka

uzorak	otapalo	klorofil a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	klorofil b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
kontrolni	H ₂ O	2,17±0,17	0,73±0,12
tretirani	H ₂ O	1,85±0,09	0,69±0,06
kontrolni	25% EtOH	2,45±0,16	1,25±0,16
tretirani	25% EtOH	2,0±0,16	0,89±0,06
kontrolni	50% EtOH	2,28±0,16	1,94±0,04
tretirani	50% EtOH	2,47±0,16	1,54±0,27

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost±standardna devijacija ($N = 3$)

U talozima preostalima nakon ekstrakcije listova kadulje vodom uočeno je 15 %-tno smanjivanja koncentracije klorofila a, ali i 5%-tno smanjenje koncentracije klorofila b kod tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolne. Sličan je trend opažen i u slučaju taloga zaostalih nakon ekstrakcije 25 %-tnim etanolom gdje je kod uzoraka izloženih visokonaponskom pražnjenju nađeno 18 % manje klorofila a i 29 % manje klorofila b nego kod netretiranih uzoraka. U odnosu na netretirane uzorke talozi preostali nakon visokonaponskim pražnjenjem potpomognute ekstrakcije 50%-tnim etanolom sadrže 8% više klorofila a i 21% manje klorofila b. Rezultati proizašli iz istraživanja učinka tretmana hladnom plazmom na fizikalno-kemijske parametre minimalno prerađenog kivija (Ramazzina, 2015) u kojem je opaženo približno 15%-tno smanjivanje koncentracije klorofila u slučaju tretiranih uzoraka u skladu su s provedenim istraživanjem.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Kako bi se istražio učinak visokonaponskog pražnjenja na koncentraciju klorofila a i b u talozima preostalima nakon ekstrakcije hidrofilnih sastojaka listova kadulje pripremljeni su 90%-tni metanolni ekstrakti taloga.
- Koncentracija klorofila a i b u metanolnim ekstraktima taloga određena je primjenom UV/VIS spektroskopije.
- Koncentracija klorofila a i b u uzorcima koji su bili podvrgnuti visokonaponskom pražnjenju u većini je slučajeva bila manja od koncentracije pigmenata u kontrolnim uzorcima.
- Uslijed izlaganja visokonaponskom pražnjenju dolazi do smanjenja koncentracije klorofila a i b u biljnom materijalu.

6. LITERATURA

Anonymus 1 (2019) <<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1350193>> Pristupljeno: 26. kolovoza 2019.

Anonymus 2 (2019) <<https://www.nezavisne.com/zivot-stil/zdravlje/Kadulja-najljekovitija-biljka/274087>> Pristupljeno: 26. kolovoza 2019.

Blum, C. A., Xu, M., Orner, G. A., Fong, A. T., Bailey, G. S., Stoner, G. D., Horio, D. T., Dashwood, R. H. (2001) b-Catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* **22**: 315-320.

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

Chappell, E. W., Kim, M. S., McMurtrey III, J. E. (1992) Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): An algorithm for the remote estimation of the concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids in soybean leaves. *Remote Sensing of Environment* **39**: 239-247.

Chernomorsky, S., Segelmen, A., and Poretz, R. D. (1999) Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **19**: 313-322.

Clydesdale, F. M. and Francis, F. J. (1968) Chlorophyll changes in thermally processed spinach as influenced by enzyme conversion and pH adjustment. *Food Technology* **22**: 793-796.

1

Dashwood, R. H., Yamane, S., and Larsen, R. (1996) A study of the forces stabilizing complexes between chlorophylls and heterocyclic amine mutagens. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **27**: 211-218.

Dashwood, R. H., Xu, M., Orner, G. A., Horio, D. T. (2001) Colonic cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci development in rats given 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *European Journal of Cancer Prevention* **10**: 139-145.

Dashwood, R. H. (1997) Chlorophylls as anticarcinogens. *International Journal of Oncology* **10**: 721-727.

Dent, M. (2013) *Utjecaj uvjeta ekstrakcije na sastav i količinu fenolnih spojeva kadulje*. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Devlin, R. M. (1975) Fotosíntesis, Fisiología Vegetal, Omega.

De Vogel, J., Jonker-Termont, D. S., van Lieshout, E. M., Katan, M. B., van der Meer, R. (2005) Green vegetables, red meat and colon cancer: Chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon. *Carcinogenesis* **26**: 387-393.

De Vogel, J., Jonker-Termont, D. S., Katan, M. B., van der Meer, R. (2005) Natural chlorophyll but no chlorophyllin prevents heme-induced cytotoxic and hyperproliferative effects in rat colon. *The Journal of Nutrition* **135**: 1995-2000.

Drew B. T, Sytsma K.J (2012) Phylogenetics, biogeography and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *American Journal of Botany* **9**: 933-953.

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

Ferruzzi, M. G., Böhm, V., Courtney, P. D., Schwartz, S. J. (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *Journal of Food Science* **67**: 2589-2595.

Gentile, J. M., Rahimi, S., Zwiesler, J., Gentile, G. J., Ferguson, L. R. (1998) Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutation Research* **402**: 289-298.

Generalić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Katalinić, A., Burčul, F., Katalinić, V. (2011) Influence of the phenophase on the phenolic profile and antioxidant properties of Dalmatian sage. *Food Chemistry* **127**: 427-433.

Higashi-Okai, K., Otani, S., and Okai Y. (1998) Potent suppressive activity of pheophytin a and b from the non-polyphenolic fraction of green tea (*Camellia sinensis*) against tumor promotion in mouse skin. *Cancer Letters* **129**: 223-228.

Humphrey, A. M. (1980) Chlorophyll. *Food Chemistry* **5**: 57-67.

Jackson, A. H. (1976) Structure, properties and distribution of chlorophylls. U: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2. izd., Goodwin T.W., ur., Academic Press.

Kumar, R. (1999) *Research Methodology: A Step-by-Step Guide for Beginners*, Sage Publications.

Kuštrak D. (2005) Farmakognozija-fitofarmacija, Golden marketing-Tehnička knjiga str. 270-290.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. U: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Sporns, P., ur., John Wiley and Sons, F4.3.1-F4.3.8.

Lin, R. S. I. (1994) Phytochemicals and antioxidants. U: *Functional Food*, Goldberg, I., ur., Chapman & Hall, str. 393.

Pankaj, S. K., Keener, K. M. (2017) Applications of cold plasma technology in food packaging. *Current Opinion in Food Science* **16**: 49-52.

Radetić, M. M., Jocić, D. M., Jovančić, P. M., Petrović, Z. L. (2005) Modificiranje vune niskotemperaturnom plazmom. *Tekstil* **54**: 266-278.

Negishi, T., Rai, H., Hayatsu, H. (1997) Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutation Research* **376**: 97-100.

2

Ramazzina, I., Berardinelli, A., Rizzi, F., Tappi, S., Ragni, L., Sacchetti, G., Rocculi, P. (2015) Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology* **107**: 55-65.

Sesink, A. L., Termont, D. S., Kleibeuker, J. H., Van der Meer, R. (1999) Red meat and colon cancer: The cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Research* **59**: 5704-5709.

- Stainer, R.Y., Duodoroff, M., Alderberg, E.A. (1965) El Mundo de los Microbios, Aguilar.
- Strasburger, E. (1974) Plastidios mitocondrios Tratado de Botánica, 6. izd., Marín, M., ur., Cia.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010) Plant Physiology, 5. izd., Sinauer Associates Inc., str. 782.
- Tan, C. T., Francis, F. J. (1962) Effect of processing temperature on pigments and color of spinach. *Journal of Food Science* **27**: 232-241.
- Te, C., Gentile, J. M., Baguley, B. C., Pearson, A. E., Gregory, T., Ferguson, L. R. (1997) In vivo effects of chlorophyllin on the antitumor agent cyclophosphamide. *International Journal of Cancer* **70**: 84-89.
- Trinajstić I. (1992) Endemi hrvatske flore: Ljekovita kadulja – *Salvia officinalis* L., endemična, ljekovita, medonosna i ukrasna biljka. *Priroda* **9–10**: 34-36.
- Von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C. G. (1995) Chlorophyll Biosynthesis. *The plant cell* **7**:1039-1057.
- Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., Lavoie, E. J., Huang, T. C., Ho, C. T. (1998) Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 4869-4873.
- Willfort R. (2002) Ljekovito bilje i njegova upotreba, Erudit Zagreb, str. 606.
- Yamazaki, H., Fujieda, M., Togashi, M., Saito, T., Preti, G., Cashman, J. R., Kamataki, T. (2004) Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copperchlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients. *Life Sciences* **74**: 2739-2747.
- Yang, H., Li, M., Zhang, W., Zhao, H., Zhang, Z. (1999) Characteristics of photosensitization of pheophorbide a in liposomal media. *Science in China Series C-Life Sciences* **42**: 4

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 mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Daniela Borovina
ime i prezime studenta