

Oksidativni i fizikalni parametri ekstrakata origana i ružmarina pod utjecajem visokonaponskog električnog pražnjenja

Sirovec, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:063419>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-04**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij: Nutricionizam

Sara Sirovec

7589/N

OKSIDATIVNI I FIZIKALNI PARAMETRI EKSTRAKATA ORIGANA I RUŽMARINA POD UTJECAJEM VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA

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, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OKSIDATIVNI I FIZIKALNI PARAMETRI EKSTRAKATA ORIGANA I RUŽMARINA POD UTJECAJEM VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA

Sara Sirovec, 0058213004

Sažetak: Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj tretiranja uzoraka origana i ružmarina hladnom plazmom na oksidativne i fizikalne parametre njihovih ekstrakata. U radu je provedena ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem u trajanju od 3 i 9 minuta s 0, 25 i 50% vodenom otopinom etanola. Rezultati rada pokazali su promjene u pH vrijednosti te vrijednosti provodnosti nakon tretiranja, a nisu pokazali značajnije promjene u koncentraciji slobodnih radikala u uzorcima nakon tretiranja. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako primjenom visokonaponskog pražnjenja dolazi do određenih fizikalnih i kemijskih promjena u ekstraktima uzoraka.

Ključne riječi: fizikalne promjene, slobodni radikali, visokonaponsko pražnjenje

Rad sadrži: 28 stranica, 10 tablica, 5 slika, 33 literaturna 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: Marinela Nutrizio, mag. nutr.

Datum obrane: srpanj 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Nutrition

Department of Food Engineering

Laboratoy Technology and Analysis of Wine

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

OXIDATIVE AND PHYSICAL PARAMETERS OF OREGANO AND ROSEMARY EXTRACTS UNDER HIGH-VOLAGE ELECTRICAL DISCHARGE

Sara Sirovec, 0058213004

Abstract: The aim of this study was to determine the influence of cold plasma treatment on oxidative and physical parameters of oregano and rosemary extracts. In this study extraction assisted by high-voltage electrical discharge were performed for 3 and 9 minutes with 0, 25 and 50% of aqueous ethanol solution. The study has shown changes in pH value and conductivity after treatment, but hasn't shown significant changes in free radicals concentration after treatment. Based on the results, it can be concluded that the application of high-voltage electrical discharge results in certain physical and chemical changes in extracts.

Keywords: physical changes, free radicals, high-voltage discharge

Thesis contains: 28 pages, 10 tables, 5 figures, 33 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, 10000 Zagreb

Mentor: PhD Mara Banović, *full professor*

Technical support and assistance: Marinela Nutrizio, *MSc*

Defence Date: July 2020

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 Ekstrakcija	2
2.2 Održivost	3
2.2.1 Zelena kemija	3
2.2.2 Održive tehnike ekstrakcije	4
2.3 Visokonaponsko električno pražnjenje	4
2.3.1 Princip rada	5
2.3.2 Hladna plazma	5
2.4 Fizikalne i kemijske promjene djelovanjem visokonaponskog pražnjenja	6
2.4.1 Slobodni radikali	6
2.5 Ružmarin	7
2.5.1 Kemijski sastav ružmarina	7
2.6 Origano	8
2.6.1 Kemijski sastav origana	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1 Materijali	10
3.1.1 Uzorci	10
3.1.2 Kemikalije	10
3.1.3 Aparatura i pribor	10
3.2 Metode rada	10
3.2.1 Ekstrakcija	10
3.2.2 Određivanje pH	14
3.2.3. Određivanje provodnosti	14
3.2.4 Određivanje slobodnih radikala	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1 Utjecaj visokonaponskog pražnjenja na vrijednosti pH i električne provodnosti	21
4.2 Utjecaj visokonaponskog pražnjenja na koncentraciju slobodnih radikala	22
4.3 Razlike u koncentraciji slobodnih radikala između uzoraka origana i ružmarina	23
5. ZAKLJUČAK	24
6. LITERATURA	25

1. UVOD

U današnje vrijeme prisutna je sve veća svijest ljudi, kako za potrebom zaštite vlastitog zdravlja tako i za potrebom zaštite okoliša. Prehrambena industrija prepoznala je takvu svijest ljudi pa nastoji razviti nove tehnologije u proizvodnji i preradi hrane. Naime, standardne odnosno konvencionalne metode prerade imaju nekoliko važnih nedostataka poput degradiranja nutritivnih sastavnica hrane i štetnog djelovanja na okoliš. Upravo zbog toga, sve se više nastoje istraživati inovativne tehnologije kako zbog zaštite nutritivne vrijednosti namirnica i smanjene štetnosti na okoliš, tako i zbog njihove uloge u ostvarivanju veće profitabilnosti. Alternativni pristup termalnom procesiranju hrane počeo je dobivati na važnosti, prije svega zbog povećanih potreba potošača za novim metodama proizvodnje hrane koje čuvaju originalni nutritivni sadržaj i opću kvalitetu hrane. Cilj razvoja ovakvih metoda je slijediti strategiju Ujedinjenih naroda koja nastoji do 2030-te godine definirati održivi razvoj, reducirati CO₂ otisak, smanjiti količinu otpada te povećati recikliranje odbačenih proizvoda. Ponovna upotreba visokovrijednih sastojaka iz odbačenih prehrambenih proizvoda može ublažiti pritisak na okoliš, ali isto tako može uštedjeti velike količine novaca prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Li i sur., 2019). Prateći tu strategiju razvijaju se i nove metode ekstrakcije različitih produkata. Nastoji se da takve tehnike budu ekonomski isplative, efikasne i prihvatljive za okoliš. Glavna zadaća im je da zahtjevaju kraće vrijeme ekstrakcije, kao i manju potošnju energije i otapala te smanjenu emisiju CO₂. Neke od takvih metoda čija se primjena sve više istražuje su primjena ultrazvuka, visoki hidrostatski tlak te primjena plazme. Takve su metode netoplinске te pridonose očuvanju nutritivnih sastavnica hrane. U ovom radu istraživana je metoda ekstrakcije visokonaponskim električnim pražnjenjem kao održive metode. Ovim se postupkom generira plazma te dolazi do razvoja različitih fenomena koji uzrokuju oštećenja staničnih struktura čime se olakšava ekstrakcija željenih komponenti. U konačnici, ova metoda rezultira većim prinosima ekstrakata u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije, s neznatnim povećanjem temperature.

Cilj ovog rada je prikazati teoriju korištenja viskonaponskog pražnjenja u ekstrakciji biološki aktivnih komponenti iz uzoraka origana i ružmarina te prikazati oksidativne i fizikalne promjene koje se događaju u uzorcima nakon primjene viskonaponskog pražnjenja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Ekstrakcija

Ekstrakcija je jednostavan postupak s vrlo širokom primjenom u laboratoriju. Prilikom izolacije prirodnih produkata u laboratorijima gotovo se uvijek primjenjuje neka od metoda ekstrakcije. Ekstrakcija se definira kao proces prijenosa tvari iz krute ili tekuće faze u neko otapalo koje se ne miješa s tom fazom. Kako bi se osigurala uspješnost same ekstrakcije vrlo je važno odabrati odgovarajuće otapalo s kojim se ta ekstrakcija provodi. Kod odabira otapala treba obratiti pažnju na to da se otapalo ne miješa s fazom i da je željena tvar bolje topljiva u otapalu nego u polaznoj fazi. Prilikom ekstrakcije, u sustavima koji su u međusobnom dodiru dolazi do izjednačavanja koncentracije otopljenih tvari.

Ovisno o tome ekstrahira li se tvar iz tekuće, čvrste ili plinovite faze razlikuju se ekstrakcije tekuće-tekuće, čvrsto-tekuće te ekstrakcije plinovito-tekuće. Upravo o agregatom stanju uzoraka ovisi izbor metode ekstrakcije, ali on također ovisi i o strukturi, topljivosti, polarnosti i molekularnim masama komponenata koje se žele razdvojiti. Učinkovitost kemijske ekstrakcije ovisi o tipu otapala s različitom polarnošću, vremenu trajanja ekstrakcije i temperaturi, omjeru uzorak/otapalo kao i o kemijskom sastavu i fizikalnim karakteristikama uzoraka (Dai i Mumper, 2010). Samo vrijeme trajanja ekstrakcije pojedinih komponenti ovisno je o njihovoj topljivosti u otapalu, o temperaturi ekstrakcije, površini namirnice izloženoj otapalu, viskoznosti i protoku otapala.

Osim što se ekstrakcijske metode dijele s obzirom na faze između kojih dolazi do prijenosa analita, može ih se podijeliti i s obzirom na način provođenja i to na konvencionalne i nekonvencionalne metode ekstrakcije. Konvencionalne metode ekstrakcije uključuju vodenu destilaciju, destilaciju vodenom parom, destilaciju parom, maceraciju i infuzije (Giacometti i sur., 2018). Takve metode koriste se dugi niz godina u laboratorijima, ali u novije vrijeme sve više do izražaja dolaze mane takvih metoda. Naime ove su metode dugotrajne, zatijevaju veliku količinu otapala te emitiraju velike količine ugljikovog dioksida. Zbog ovih se nedostataka, sve više istražuju nekonvencionalne metode kojima je cilj upravo smanjiti utrošak otapala i provesti ekstrakciju u što kraćem vremenu. Neke od metoda koje se ubrajaju u nekonvencionalne metode su ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, visoki hidrostatski tlak, pulsirajuće električno polje i visokonaponsko električno pražnjenje (Li i sur., 2019).

2.2 Održivost

Posljednjih godina sve više raste svijest ljudi o potrebi zaštite okoliša te se stoga u prehrambenoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji velika pozornost pridaje zelenim i održivim tehnologijama koje se zasnivaju na prihvatljivom kompromisu između ekonomskih i ekoloških zahtjeva (Jokić, 2016). Ekstrakcija prirodnih produkata kakva se vrši u parfemskoj industriji dugo je vremena smatrana "čistom" i sigurnom u usporedbi s ekstrakcijama teških metala u kemijskoj industriji, no znanstvenici su otkrili kako i takve ekstrakcije imaju veliki utjecaj na okoliš, čak i puno veći nego što se to u početku smatralo. Takve ekstrakcije zahtijevaju velike količine energije, sirovog materijala iz kojeg se ekstrahiraju spojevi te velike količine otapala i vode.

Prehrambena industrija kao dinamična industrija u kojoj stalno dolazi do razvoja novih tehnologija i izrade novih prehrambenih proizvoda kao i razvoja novih funkcionalnih proizvoda vrlo često koristi ekstrakcijske procese između ostalog i zbog toga što se stalno razvijaju brojni novi proizvodi u koje se dodaju različiti biljni ekstrakti. Većina novih trendova u ekstrakcijskim tehnikama fokusirana je na pronalazak rješenja koji minimaliziraju korištenje otapala (Chemat i sur., 2012). Pri tome treba paziti da ovi postupci omogućuju istovremeno intenziviranje procesa, ali i isplativu proizvodnju visokokvalitetnih ekstrakta.

2.2.1 Zelena kemija

Glavna istraživačka tema u multidiscipliniranom području primjenjene kemije, biologije i prehrambene tehnologije je dizajniranje zelenih i održivih ekstrakcijskih metoda prirodnih produkata. Kako bi pomogli kemičarima u postizanju cilja održivosti znanstvenici Paul Anastas i John Warner su još 1998. godine razvili 12 načela zelene kemije prema kojima se razvijaju nove ideje o smanjenoj upotrebi supstanci štetnih za zdravlje ili okoliš, bez smanjenog učinka samog procesa te profitabilnosti.

Opća definicija zelene kemije je osmišljanje, dizajniranje i primjena kemijskih proizvoda i procesa radi smanjenja ili uklanjanja uporabe i stvaranja opasnih tvari.

Kao jedna od ideja zelene kemije razvila se takozvana zelena ekstrakcija koja se može definirati na sljedeći način „Zelena ekstrakcija je bazirana na otkrivanju i dizajniranju ekstrakcijskih procesa koji će reducirati energetske potrošnje, dozvoliti korištenje alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih produkata i osigurati sigurni i visoko kvalitetni ekstrakt" (Chemat i sur., 2012).

Unutar ovog koncepta zelene ekstrakcije razvija se i koncept zelenog ekstrakta koji predstavlja ekstrakt dobiven na način koji ima minimalan ili nikakav učinak na okoliš. Takav bi ekstrakt

trebao biti i ekonomski isplativ i održiv te se smatra kako bi se u budućnosti mogao prepoznati europskom ili međunarodnom oznakom ili standardom (Chemat i sur., 2017).

2.2.2 Održive tehnike ekstrakcije

Ekstrakcijske tehnike koje se uobičajeno koriste u prehrambenoj industriji kao što su ekstrakcija otapalima, vrućom vodom, lužinama i slično, zahtijevaju puno vremena za njihovu provedbu te se provode na visokim temperaturama što može uzrokovati degradaciju željenih komponenti iz namirnica. Zbog tih problema, ali i sve većih zahtjeva za zaštitom okoliša, prehrambena industrija sve više razvija takozvane održive, odnosno netoplinke tehnike ekstrakcije. Netoplinke tehnike jedna su od najčešće istraživanih tema u području procesiranja hrane u zadnjem desetljeću (Maza i sur., 2019). Ove tehnike primijenjuju tretiranje namirnice pri sobnoj temperaturi za razliku od klasičnih metoda obrade namirnica čime se izbjegava štetan učinak visokih temperatura na okus, boju i hranjivu vrijednost hrane, odnosno dolazi do očuvanja nutritivno vrijednih sastojaka, ali i organoleptičkih značajki namirnica.

Osim što se ovim metodama namirnice obrađuju na sobnoj temperaturi čime se omogućava očuvanje njihovih nutritivnih sastojaka, ove tehnike nastoje poboljšati efikasnost postupaka ekstrakcije čime se pak želi postići povećan prinos željenih supstanci što je osobito važno za industriju kao takvu. Istovremeno, osim što nastoje povećati efikasnost, nastoje smanjiti i štetan utjecaj na okoliš jer omogućuju potpunu eliminaciju ili redukciju potrebne količine organskih otapala, smanjeno vrijeme ekstrakcije, visoko kvalitetne ekstrakte te nižu potrošnju energije (Kovačević i sur., 2019).

Jedna od novijih tehnika koje omogućuju visoku reproducibilnost u kraćem vremenu je i ekstrakcija bioaktivnih komponenti ultrazvukom (20-100 kHz) (Caili i sur., 2006). Osim što omogućuje kraće vrijeme trajanja postupka, ova tehnika omogućuje i provođenje ekstrakcije na nižim temperaturama, jednostavnije rukovanje, te korištenje manjih količina otapala.

Osim ekstrakcije ultrazvukom, neke od održivih tehnika ekstrakcije koje zauzimaju sve veći značaj u industriji su i pulsirajuće električno polje, visoki hidrostatski tlak te viskonaponsko pražnjenje (Giacometti i sur., 2018).

2.3 Viskonaponsko električno pražnjenje

U novije vrijeme sve je veći interes za proučavanje tehnike viskonaponskog električnog pražnjenja kako zbog profitabilnosti tako i zbog smanjenog štetnog utjecaja koji ima na okoliš. Viskonaponsko električno pražnjenje je učinkovita i ekološki prihvatljiva tehnika sa širokom primjenom u različitim industrijama (Yan i sur., 2019). Smatra se zelenom ekstrakcijskom tehnikom jer omogućuje povećanu brzinu ekstrakcije komponenti pri smanjenoj potrošnji

energije. Također se pokazalo kako ova tehnologija može smanjiti potrebnu difuzijsku temperaturu, difuzijsko vrijeme i sadržaj etanola u difuzijskom otapalu (Boussetta i Vorobiev, 2014).

Ova se metoda primjenjuje još od 1970-tih godina. Prvo je primjenjena u naftnoj industriji za povećanje iskorištenja naftnih bušotina i pokazala je vrlo dobre rezultate te se od tad razmatra korištenje ovih metoda i u drugim industrijama (Yan i sur., 2019).

2.3.1 Princip rada

Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem, ekstrakcijska je metoda koja se temelji na električnom izboju između dvije elektrode te nastajanju hladne plazme. Upotrebom dovoljne razlike potencijala između elektroda, dolazi do raspada plina na pozitivne ione i elektrone, odnosno stvara se električno polje i uspostavlja se razlika potencijala. Stanice se uvode u električno polje pri čemu dolazi do otvaranja pora staničnih membrana i posljedično, osobađanja biomolekula iz stanica što se naziva fenomenom elektroporacije (Rajha i sur., 2015).

Do formiranja električnog pražnjenja dolazi u dvije faze. U prvoj ili tzv "streamer" fazi dolazi do formiranja elektrovodljivog kanala ioniziranog plina. Pri prelasku iz prve u drugu fazu jačina struje naglo raste te dolazi do električnog pražnjenja, odnosno pada jačine struje i oslobađanja energije. Za vrijeme druge ili "arc" faze dolazi do stvaranje plazme i formiranja udarnih valova visokog intenziteta koji mogu dovesti do oštećenja stanica i nastanka slobodnih radikala (Boussetta i Vorobiev, 2014).

2.3.2 Hladna plazma

Plazma se može definirati kao kvazineutralan, djelomično ili potpuno ionizirajući plin, koji se sastoji od elektrona, pozitivno i negativno nabijenih iona, slobodnih radikala, atoma i molekula u osnovnom ili pobuđenom stanju te fotona ultraljubičastog (UV) zračenja (Misra i sur., 2011). Uz kruto, tekuće i plinovito, plazma je četvrto agregatno stanje koje poznajemo u svemiru.

Kako bi došlo do nastajanja hladne plazme važno je česticama osigurati dovoljno energije iz vanjskih izvora što se postiže električnim pražnjenjem plina koje nastaje između dvije elektrode koje su priključene na vanjski izvor energije. Tako nastalo električno polje uzorkuje privlačenje elektrona prema pozitivno nabijenoj elektrodi, dok je pozitivna jezgra privučena od strane negativne elektrode (Rajha i sur., 2015).

Kada se plazma generira u laboratorijskim uvjetima, energija iz električnog polja prenosi se na elektrone koji ju prihvaćaju i ubrazavaju čime dolazi do velikog broja sudara između

elektrona, atoma i molekula u plinu. U tom se sudaranju elektroni puno više zagrijevaju od iona zato što zbog razlike u njihovoj masi ne dolazi do razmjene energije koja ovisi o omjeru njihovih masa. Zbog toga temperatura elektrona postaje viša od temperature plina pa dolazi do stvaranja termičke neravnoteže. Takva se plazma naziva neravnotežna netoplinaska plazma, odnosno hladna plazma (Kaushik i sur., 2019).

2.4 Fizikalne i kemijske promjene djelovanjem visokonaponskog pražnjenja

Visokonaponsko električno pražnjenje potiče niz kemijskih i fizikalnih promjena u otopini. Što se tiče fizikalnih promjena dolazi do stvaranja udarnih valova, stvaranja električnog polja i UV radijacije. U prvoj fazi visokonaponskog pražnjenja nastaju relativno slabi udarni valovi i manji broj mjehurića i u toj se fazi generira UV zračenje te nastaju aktivni radikali. U drugoj fazi, ti udarni valovi postaju puno jači te se generira velika količina mjehurića ispunjenih plazmom, dolazi do snažnih turbulencija u otopini, emitira se snažno UV zračenje te se produciraju visoke koncentracije slobodnih radikala. To pak dovodi do različitih promjena u stanicama biljnog materijala. Naime, UV zračenje dovodi do inaktivacije stanica jer djeluje na molekule DNA, udarni valovi i snažne turbulencije mogu uzrokovati fragmentaciju produkata, ali i mehaničko oštećenje staničnog tkiva dok velika gustoća slobodnih radikala može uzrokovati trajno oštećenje stanice zbog stranične oksidacije (Li i sur., 2019.) Upravo zbog toga, ova tehnika uzrokuje značajno oštećenje staničnih struktura i olakšan prijenos mase iz stanice u tekućinu, čime se značajno povećava prinos biokativnih spojeva.

2.4.1 Slobodni radikali

Slobodni radikali su molekule koje imaju nespareni elektron i stoga su izuzetno reaktivni, a u živom svijetu imaju vrlo važnu ulogu jer se proizvode u normalnim fiziološkim procesima (Maršić, 2005). Zbog svog nesparenog elektrona radikali su izuzetno nestabilne molekule koje se nastoje stabilizirati, odnosno postići ravnotežu tako što čim nastanu reagiraju s drugim molekulama u svojoj okolini i na taj način narušavaju njihovu stabilnost. U reakcijama slobodnih radikala uvijek nastaju novi slobodni radikali, odnosno oni pokreću takozvane lančane reakcije koje se mogu oteti kontroli te su upravo oni vrlo često uzročnici različitih bolesti i preranog starenja. Slobodni radikali, poput reaktivnih oblika kisika mogu nastati u našem organizmu ili dolaze iz okoliša (UV-zračenjem, zagađivanjem zraka, pušenjem). Ti se reaktivni oblici onda u našem organizmu raspadaju na kratkoživuće hidroksilne radikale ($\text{HO}\cdot$) koji pak reagiraju s tjelesnim proteinima i molekulama DNA zbog čega dolazi do njihovih

oštećenja koja, ako se akumuliraju, dovode do razvoja karcinoma, različitih srčanih bolesti i preranog starenja (Kovač, 2018).

2.5 Ružmarin

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je aromatična biljka iz sredozemnog podneblja iz porodice *Lamiaceae*. Razgranata je, zimzelena biljka s kratkim, kožastim, tamnozelenim listovima koja može narasti do 3 metra te cvate dva puta godišnje, u travnju i rujnu. Još od antičkih vremena koristi se u kulinarske i ukrasne svrhe, a kako je bogat bioaktivnim spojevima ima mnogo važnih ljekovitih i funkcionalnih svojstava kao što su antibakterijsko i antidijabetičko te antikancerogeno, antiupalno i antioksidacijsko djelovanje (Carrubba i sur., 2019).

Farmakološka istraživanja ružmarina pokazala su brojne zdravstvene pogodnosti ružmarina kao što je neuroprotektivni učinak inhibicijom ekspresije gena povezanih s apoptozom te poboljšanje dugotrajne memorije inhibicijom acetilkolinesteraze u frontalnom korteksu štakora (Gird i sur., 2017).

Ružmarin se može koristiti u različitim oblicima u različite svrhe, a najčešće se koristi kao svjež, u sušenom obliku ili u obliku eteričnog ulja. Eterično ulje ružmarina ovisno o kemotipu ružmarina može se koristiti kao analgetik kod reumatoidnog artritisa i bolnih mišića nakon tjelovježbe. Također može se koristiti i u kozmetici za njegu kože, inhalacijskim putem kao mukolitik te se može koristiti kod problema hladnih ruku i nogu jer određeni kemotipovi ružmarina potiču perifernu cirkulaciju.

Prema europskoj regulativi, službeno su ljekoviti listovi ružmarina i eterično ulje dobiveno destilacijom listova ružmarina (Marković, 2006), a za ekstrakciju bioaktivnih komponenti koriste se igličasti listovi.

Rezultati analitičkog istraživanja ekstrakta ružmarina pokazali su da ekstrakt sadrži visok udio fenolnih spojeva (Gird i sur., 2017).

2.5.1 Kemijski sastav ružmarina

Ružmarin ima vrlo kompleksan kemijski sastav, a fitokemijske studije pokazuju kako su najzastupljeniji spojevi ružmarina fenoli spojevi od kojih se najviše ističe ružmarinska kiselina te fenolni diterpeni, karnosol i karnozinska kiselina. Ružmarinska kiselina jak je antioksidans čija je polifenolna struktura odgovorna za suzbijanje oksidacije LDL-a što smanjenje rizik razvoja ateroskleroze krvnih žila. Također može se koristiti za ublažavanje simptoma alergije i astme, u preveniranju trovanja hranom, za stabilizaciju i učvršćivanje kapilara. Jedno od važnih svojstva ružmarinske kiseline je taj da se lako resorbira preko probavnog trakta i putem kože (Marković, 2006).

Osim ružmarinske kiseline važna aktivna komponenta ekstrakta ružmarina je i karnozinska kiselina koja pokazuje snažnu antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnosti (Slika 1). Pronađena je u svega nekoliko biljnih vrsta, ali ružmarin se smatra najbogatijim izvorom karnozinske kiseline. Kako navodi Birtić u svom istraživanju iz 2015. godine karnozinska je kiselina najzastupljeniji lipofilni antioksidans u listovima ružmarina.

Zbog svojih se ljekovitih učinaka ekstrakti ružmarina naširoko koriste u farmaceutskoj industriji, ali sve se više koriste i u prehrambenoj industriji zbog svog antioksidativnog djelovanja.



Slika 1. Strukturne formule najzastupljenijih fenolnih spojeva ružmarina (Xie i sur., 2017)

2.6 Origano

Origano (*Origanum vulgare* L.) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice *Lamiaceae*. Rasprostranjena je na mediteranskom području i azijskim zemljama na visinama od 1500 do 3600m. Aromatična je biljka visine 20-80cm s blijedoružičastim cjetovima. Izvor je različitih prirodnih produkata važnih za održavanje ljudskog zdravlja i koristi se u prirodnim terapijama (Bhatt i sur., 2020). Za sada je poznato 6 različitih kemotipova ove biljke i pokazalo se kako različiti kemotipovi sadrže i različite arome. Ekološki, ova vrsta voli topla, sunčana staništa i rastresita, često kamenita, vapnenasta tla, obično s niskim udjelom vlage (De Martino i sur., 2009).

Origano se upotrebljava već dugi niz godina i u različitim oblicima. Najčešće se koristi u obliku svježih listova, ali i kao usitnjeni i osušeni začim, a može se koristiti i u kozmetici. Vrlo često se skupljaju divlje vrste koje se suše i nakon toga odlaze u distribuciju.

Vrlo je cijenjeno eterično ulje origana koje se često koristi u aromaterapiji.

Esencijalna ulja origana pokazuju veliku antimikrobu, antioksidacijsku i antifungalnu aktivnost te su se pokazala kao vrlo efikasna u prevenciji prehlade, akutnog gastroenteritisa i poremećaja menstrualnog ciklusa (Bhatt i sur., 2020).

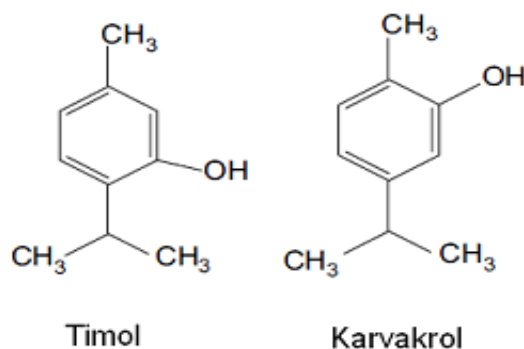
2.6.1 Kemijski sastav origana

Pojedina istraživanja origana pokazuju kako origano najviše sadrži polifenolne spojeve i to u najvećoj količini ružmarinsku i kafeinsku kiselinu. Također, sadrži značajne količine fenolnih spojeva od kojih su primjerice katehin, epikatehin, cinemaldehid i karvakrol glavne komponente topljivih ekstrakta, dok su galna kiselina i p-kumarinska kiselina dominantne u vezanim ekstraktima (De Martino i sur., 2009).

Između različitih vrsta unutar roda origana uočene su razlike u kemijskom sastavu koje su povezane s različitim faktorima poput podrijetla i kemotipa pojedine vrste, zatim uvjeta rasta, ali i primjenjenih ekstrakcijskih metoda (Bhatt i sur., 2017).

Glavni monoterpenski fenolni spojevi u origanu su karvakrol i timol (Giacometti i sur., 2018). Oni su nosioci karakterističnog mirisa origana, ali su odgovorni i za njegovu antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost (Slika 2). Ako se usporedi s drugim vrstama kao što su timijan, ružmarin ili kadulja, uočava se kako je upravo origano najučinkovitije antimikrobno sredstvo koji veoma učinkovito djeluje na neke bakterijske vrste poput *Escherichie coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus enteritidis* i *Shigabacillus* pa se njegova antibakterijska aktivnost intenzivno istražuje u svrhu produživanja trajnosti nekih proizvoda.

Osim antimikrobne, origano ima i veliku antioksidativnu aktivnost. I iako se antibakterijska i antioksidativna svojstva origana primarno pripisuju karvakrolu i timolu kao glavnim sastavnicama esencijalnog ulja origana, visoka je antioksidativna aktivnost vjerojatno rezultat sinergističkog djelovanja različitih komponenti esencijalnog ulja.



Slika 2. Strukturne formule najzastupljenijih fenolnih spojeva origana (Serrano i sur., 2008.)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Uzorci

Osušeni i usitnjeni uzorci listova ružmarina i origana (SUBAN d.o.o., Samobor, Hrvatska)

3.1.2 Kemikalije

1. 25% vodena otopina etanola
2. 50% vodena otopina etanola
3. destilirana voda

3.1.3 Aparatura i pribor

1. tehnička vaga
2. laboratorijske čaše
3. stakleni štapić
4. digitalni pH metar- (Hanna instruments, HI5521-02
pH/mV/ISE/Temperature/Conductivity/Resistivity/TDS/
Salinity Bench Meters, SAD)
5. menzura
6. filter papir
7. indikator trakice
 - Indikator trake QUANTOFIX Nitrat/nitrit 10-500mg/L NO^3 , 1-80mg/l NO^{2-} (Macherey-Nagel GmbH & Co., Njemačka)
 - Indikator trake QUANTOFIX Peroksid 0,5-25mg/L H_2O_2 (Macherey-Nagel GmbH & Co., Njemačka)
 - Indikator trake QUANTOFIX Kisik aktivni 4-25mg/L PMPS (Macherey-Nagel GmbH & Co., Njemačka)
8. generator plazme (IMP-SSPG-1200)

2.3 Metode rada

2.3.1 Ekstrakcija

Za potrebe ovog istraživanja osušeni i usitnjeni uzorci origana i ružmarina podvrgnuti su ekstrakciji visokonaponskim električnim pražnjenjem.

Izvaže se 1 gram uzorka u staklenu čašu te se nakon toga pomiješa s 50 mL vode, odnosno s 50 mL 25 i 50% vodene otopine etanola i pomiješa sa staklenim štapićem. Takva se smjesa zatim prenese u reaktor i nakon toga ekstrahira u struji argona i dušika 3 minute,

odnosno 9 minuta pri odgovarajućim uvjetima napona (Tablica 1.). Dobiveni ekstrakti profiltriraju se preko filter papira.



Slika 3. Ekstrakcija u generator (vlastita fotografija)

Za ekstrakciju je korišten plazma generator IMP-SSPG-1200 (Slika 4). Tehnički parametri generatora su sljedeći:

- podesivost maksimalne DC struja 40 mA pri 30kV
- podesivost DC napona u području 1kV do 30kV
- TCP/IP sa web serverom za daljinsko upravljanje i parametriziranje
- napajanje 230 VAC jedna faza, 50Hz
- ambijentalnu temperature od 5 °C do 40 °C
- ambijentalnu vlažnost od 10% do 90%
- forsirano zračno hlađenje



Slika 4. Uređaj za visokonaponsko pražnjenje (Anonymous, 2017)

U tablicama 1 i 2 prikazani su uvjeti pod kojima su bili tretirani usitnjeni uzorci origana.

Oznaka "ON" označava da se radi o uzroku origana tretiranog hladnom plazmom u struji dušika, dok "OA" označava da je riječ o uzorku origana tretiranog hladnom plazmom u struji argona.

Isti su ovi uvjeti primijenjeni za tretiranje usitnjenih uzoraka ružmarina, osim što je oznaka „O" (za origano) zamijenjena oznakom "R" (za ružmarin).

Tablica 1. Prikaz uvjeta tretiranja uzoraka origana dušikom

Uzorak	t/min	U/kV	$\phi(\text{etanola})/\%$
ON1	3	20	50
ON2	9	20	0
ON3	3	20	0
ON4	3	25	0
ON5	9	25	25

ON6	9	20	25
ON7	9	20	50
ON8	9	25	50
ON9	3	25	25
ON10	9	25	0
ON11	3	25	50
ON12	3	20	25

Tablica 2. Prikaz uvjeta tretiranja uzoraka origana argonom

Uzorak	t/min (min)	U/kV (kV)	ϕ (etanola)/ %
OA1	3	15	50
OA2	9	15	0
OA3	3	15	0
OA4	3	20	0
OA5	9	20	25
OA6	9	15	25
OA7	9	15	50
OA8	9	20	50
OA9	3	20	25
OA10	9	20	0
OA11	3	20	50
OA12	3	15	25

3.2.2 Određivanje pH

Određivanje vrijednost pH u otopini provedeno je prije tretiranja uzoraka hladnom plazmom pomoću digitalnog pH metra (Hanna instruments, HI5521-02 pH/mV/ISE/Temperature/Conductivity/Resistivity/TDS/ Salinity Bench Meters, SAD) Elektroda se uroni u uzorak te se nakon što se uspostavi stabilna vrijednost pH ona očita i zapiše. Isti se postupak ponovi i nakon tretiranja uzoraka.

3.2.3. Određivanje provodnosti

Kao i određivanje pH i određivanje provodnosti uzoraka izvršeno je prije i poslije tretiranja uzoraka hladnom plazmom. Slično kao i kod mjerenja pH, elektroda se uroni u uzorak i nakon pojave stabilne vrijednosti na ekranu, ta se vrijednost očita i zapiše. Isti se postupak ponovi i nakon tretiranja uzoraka.

3.2.4 Određivanje slobodnih radikala

Određivanje slobodnih radikala u otopinama uzorka provedeno je također prije i poslije tretiranja uzoraka. Korištene su indikator trakice za određivanje slobodnih radikala (Slika 5). Određivani su reaktivni oblici kisika, peroksidni radikali te reaktivni oblici dušika, konkretno nitriti i nitrati. Udio pojedinih radikala odredi se vizualno, usporedbom intenziteta obojenja s višestupanjskom skalom boja priloženom u pojedinom setu za određivanje slobodnih radikala.

Određivanje kisikovih radikala

U otopinu vode, odnosno etanola i ustinjenih uzoraka prije i nakon tretiranja urone se indikator trakice za određivanje kisikovih radikala, ostave se uronjene 10 sekundi te se očita promjena boje na indikatoru. Prema promjeni boje odredi se količina kisikovih radikala u uzorku prije i nakon tretiranja.

Određivanje nitrita i nitrata

Po sličnom postupku provedeno je i određivanje nitrita i nitrata, prije i nakon tretiranja uzoraka. U ovom slučaju, indikator trakice se urone u otopinu jednu sekundu te se promjena boje indikatora očita nakon 60 sekundi i odredi količina radikala.

Određivanje peroksidnih radikala

Određivanje peroksidnih radikala provedeno je tako što su trakice uronjene u topinu 1 sekundu i nakon 15 sekundi očitana je promjena boje. Postupak je isti prije i nakon tretiranja.



Slika 5. Indikator trakice za određivanje slobodnih radikala (vlastita fotografija)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ovo istraživanje provedeno je s ciljem dokazivanja fizikalnih i kemijskih promjena ekstrakata ružmarina i origana nakon ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem. Također cilj je bio utvrditi koliko se mijenja koncentracija slobodnih radikala u ekstraktima nakon tretiranja hladnom plazmom te na temelju dobivenih rezultata o koncentracijama pojedinih slobodnih radikala u uzorku donijeti zaključak o sigurnosti upotrebe ove metode kao metode za ekstrakciju aktivnih spojeva, najčešće fenolnih.

Fenolni spojevi su spojevi koji imaju dokazan blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje. U novije vrijeme, dokazano je da pomažu smanjiti rizik od mnogih kroničnih bolesti koje su povezane s oksidativnim stresom kao što su kardiovaskularne bolesti, različite vrste karcinoma te šećerna bolest (Xu i sur., 2017). Osim što su zanimljiv predmet istraživanja farmaceutske industriji, zbog svojih pozitivnih učinaka sve se više primijenjuju u prehrambenoj industriji koja ih želi implementirati kao dodatke s ciljem poboljšanja nutritivnog sastava namirnica. Kako bi se ti fenolni spojevi mogli koristiti u prehrambenoj, ali i ostalim industrijama, važan korak je njihova ekstrakcija iz biljnog materijala (Xu i sur., 2017).

S obzirom na to da je ekstrakcija vrlo važan korak za dobivanje fenolnih spojeva, potrebno je dobro odabrati metodu ekstrakcije. Konvencionalne metode ekstrakcije poput maceracije, infuzije i refluksa korišteni su desetljećima u laboratorijima; njihovi glavni nedostaci su dugo vrijeme trajanja ekstrakcije i korištenje otapala. Zbog navedenih nedostataka konvencionalnih metoda povećana je potreba za razvojem inovativnih metoda ekstrakcije koje skraćuju vrijeme ekstrakcije i volumen otapala (Yousif Mutalib, 2015). Jedna od novijih metoda koja se istražuje za ekstrakciju je i ekstrakcija pomoću visokonaponskog pražnjenja (Barba i sur., 2016).

U Tablicama 3-10 navedeni su rezultati mjerenja pH vrijednosti, električne provodnosti te vrijednosti slobodnih radikala (peroksidnih, nitrita, nitrata i reaktivnih oblika kisika) prije i nakon tretiranja uzoraka ružmarina i origana hladnom plazmom u struji argona, odnosno u struji dušika.

Tablica 3. Prikaz pH, električne provodnosti i masene koncentracije radikala prije tretiranja uzoraka origana hladnom plazmom u struji argona

Uzorak	pH	$\kappa/(\mu\text{S}/\text{cm})$	$\gamma(\text{Peroksidni radikal})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Nitriti})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Nitrati})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Reaktivni oblici kisika})/(\text{mg}/\text{L})$
OA1	8,628	121,8	0	1	10	0
OA2	5,967	752,4	0	1	10	15
OA3	5,713	984,1	0	1	10	15
OA4	5,781	762,1	0	1	10	8
OA5	5,872	285,6	0	1	10	0
OA6	5,971	187,1	0	1	10	4
OA7	6,002	151,5	0	0	0	4
OA8	5,938	141,4	0	1	10	0
OA9	5,865	285,3	0	1	10	4
OA10	5,815	1013	0	1	10	8
OA11	5,901	134,3	0	1	10	0
OA12	5,749	284,6	0	1	10	4

Tablica 4. Prikaz pH, električne provodnosti i masene koncentracije radikala nakon tretiranja uzoraka origana hladnom plazmom u struji argona

Uzorak	pH	$\kappa/(\mu\text{S}/\text{cm})$	$\gamma(\text{Peroksidni radikal})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Nitriti})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Nitrati})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Reaktivni oblici kisika})/(\text{mg}/\text{L})$
OA1	6,625	203,5	0	1	10	4
OA2	5,769	1075	0	1	10	8
OA3	5,767	1001	0	1	10	4
OA4	5,786	995,0	0	1	10	4
OA5	5,787	478,0	0	1	10	4
OA6	5,807	520,1	0	1	10	4
OA7	5,973	162,5	0	1	10	0
OA8	5,910	220,9	0	1	10	4
OA9	5,747	530,3	0	1	10	4
OA10	5,701	1180	0	1	10	4
OA11	5,785	236,2	0	1	10	0
OA12	5,670	459,2	0	1	10	4

Tablica 5. Prikaz pH, električne provodnosti i masene koncentracije radikala prije tretiranja uzoraka origana hladnom plazmom u struji dušika

Uzorak	pH	$\kappa/(\mu\text{S}/\text{cm})$	$\gamma(\text{Peroksidni radikal})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Nitriti})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Nitrati})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Reaktivni oblici kisika})/(\text{mg}/\text{L})$
ON1	6,330	138,6	0	1	10	0
ON2	5,897	938,3	0	1	10	8
ON3	5,903	906,1	0	1	10	8
ON4	5,771	1047	0	1	10	8
ON5	5,806	303,7	0	1	10	4
ON6	5,196	357,4	0	1	10	4
ON7	6,064	104,3	0	0	0	0
ON8	5,902	77,26	0	0	0	4
ON9	5,769	414,5	0	1	10	8
ON10	5,800	894,6	0	1	10	15
ON11	5,768	118,0	0	0	0	4
ON12	5,764	288,6	0	1	10	4

Tablica 6. Prikaz pH, električne provodnosti i masene koncentracije radikala nakon tretiranja uzoraka origana hladnom plazmom u struji dušika

Uzorak	pH	$\kappa/(\mu\text{S}/\text{cm})$	$\gamma(\text{Peroksidni radikal})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Nitriti})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Nitrati})/(\text{mg}/\text{L})$	$\gamma(\text{Reaktivni oblici kisika})/(\text{mg}/\text{L})$
ON1	6,109	217,0	0	1	10	0
ON2	5,725	1118	0	1	10	4
ON3	5,847	1058	0	1	10	4
ON4	5,816	1145	0	1	10	4
ON5	5,732	579,1	0	1	10	0
ON6	5,843	542,6	1	1	10	0
ON7	5,873	248,1	0	1	10	0
ON8	6,068	275,9	0	1	10	4
ON9	5,769	414,5	0	1	10	0
ON10	5,690	1159	0	1	10	4
ON11	5,990	260,9	0	1	10	0
ON12	5,842	393,8	0	1	10	0

Tablica 7. Prikaz pH, električne provodnosti i masene koncentracije radikala prije tretiranja uzoraka ružmarina hladnom plazmom u struji argona

Uzorak	pH	κ/(μS/cm)	γ(Peroksidni radikal)/ (mg/L)	γ(Nitriti)/ (mg/L)	γ(Nitrati)/ (mg/L)	γ (Reaktivni oblici kisika)/ (mg/L)
RA1	5,741	74,34	0	0	0	0
RA2	5,934	402,4	0	0	0	4
RA3	5,813	597,6	0	0	0	4
RA4	5,897	401,3	0	1	10	8
RA5	5,807	118,5	0	0	0	0
RA6	5,858	130,5	0	0	0	0
RA7	5,704	71,64	0	0	0	0
RA8	5,759	55,89	0	0	0	0
RA9	5,641	186,1	0	0	0	0
RA10	5,723	368,1	0	0	0	8
RA11	6,179	62,18	0	0	0	0
RA12	5,716	173,0	0	0	0	4

Tablica 8. Prikaz pH, provodnosti i koncentracije radikala nakon tretiranja uzoraka ružmarina hladnom plazmom u struji argona

Uzorak	pH	κ/(μS/cm)	γ(Peroksidni radikal)/ (mg/L)	γ(Nitriti)/ (mg/L)	γ(Nitrati)/ (mg/L)	γ (Reaktivni oblici kisika)/ (mg/L)
RA1	5,708	112,4	0	0	0	0
RA2	5,768	743,5	0	0	0	4
RA3	5,790	774,2	0	0	0	4
RA4	5,816	596,7	0	0	0	4
RA5	5,713	279,9	0	0	0	0
RA6	5,659	253,4	0	0	0	0
RA7	5,852	124,4	0	0	0	0
RA8	5,585	120,8	0	0	0	0
RA9	5,739	275,4	0	0	0	0
RA10	5,761	733,3	0	0	0	4
RA11	5,670	107,8	0	0	0	0
RA12	5,773	265,0	0	0	0	0

Tablica 9. Prikaz pH, provodnosti i koncentracije radikala prije tretiranja uzoraka ružmarina hladnom plazmom u struji dušika

Uzorak	pH	κ / (μS/cm)	γ(Peroksidni radikal) / (mg/L)	γ(Nitriti) / (mg/L)	γ(Nitrati) / (mg/L)	γ (Reaktivni oblici kisika) / (mg/L)
RN1	6,170	37,56	0	0	0	0
RN2	5,885	271,2	0	0	0	4
RN3	5,788	316,6	0	0	0	8
RN4	5,838	524,5	0	0	0	8
RN5	5,782	121,5	0	0	0	0
RN6	5,689	116,1	0	0	0	0
RN7	5,704	43,49	0	0	0	0
RN11	5,673	71,27	0	0	0	0
RN12	5,648	146,7	0	0	0	0

Tablica 10. Prikaz pH, provodnosti i koncentracije radikala prije tretiranja uzoraka ružmarina hladnom plazmom u struji dušika

Uzorak	pH	κ / (μS/cm)	γ(Peroksidni radikal) / (mg/L)	γ(Nitriti) / (mg/L)	γ(Nitrati) / (mg/L)	γ (Reaktivni oblici kisika) / (mg/L)
RN1	5,671	100,4	0	0	0	0
RN2	5,784	632,0	0	0	0	4
RN3	5,803	668,4	0	0	0	4
RN4	5,784	714,4	0	0	0	4
RN5	5,741	257,9	0	0	0	0
RN6	5,632	242,5	0	0	0	0
RN7	5,723	107,7	0	0	0	0
RN11	5,584	104,3	0	0	0	0
RN12	5,710	270,4	0	0	0	0

4.1 Utjecaj visokonaponskog pražnjenja na vrijednosti pH i električne provodnosti

Na temelju dobivenih rezultata (Tablice 3-10) može se vidjeti kako električna provodnost i pH uzoraka mijenjaju u ovisnosti o tretiranju hladnom plazmom, odnosno primjenom visokonaponskog pražnjenja, ali i u ovisnosti o udjelu etanola u otopini i trajanju samog postupka tretiranja.

Električna provodnost uzoraka najniža je kad je u otopini najveći postotak etanola, odnosno kad se kao otapalo za ekstrakciju koristi 50%-tna vodena otopina etanola. S druge strane, najviša je kad se kao otapalo koristi voda. Ovakav rezultat je i očekivan s obzirom da je voda dobar vodič električne struje. Iz rezultata se može primjetiti i kako uzorci nakon provedenog tretiranja visokonaponskim pražnjenjem imaju veću električnu provodnost nego prije tretiranja što je i u skladu s rezultatima koje su dobili Barba i suradnici u istraživanju provedenom 2015-te godine gdje su preko izračunatog Z indeksa (omjera razlike električne provodnosti prije i nakon tretiranja te razlike provodnosti netretiranog uzorka i potpuno razorenog uzorka) pokazali kako električna provodnost uzoraka raste nakon tretiranja. Također, električna provodnost uzoraka je viša nakon tretiranja u trajanju od 9 minuta nego 3 minute pod istim uvjetima napona. Pankaj i sur. 2017. navode kako je moguće da je porast električne provodnosti nakon tretiranja rezultat topljivosti plinova nastalih tijekom visokonaponskog pražnjenja.

Osim na električnu provodnost, udio etanola u uzorku pokazuje i utjecaj na pH uzorka. Tako se može vidjeti da je vrijednost pH nešto viša kada se kao otapalo koristi 50%-tna vodena otopina etanola dok nema prevelike razlike kada se kao otapalo koriste voda ili 25%-tna vodena otopina etanola. Isto tako, prema dobivenim rezultatima uočavamo blagi pad pH vrijednosti otopina uzoraka biljaka nakon tretiranja hladnom plazmom što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Pankaj i suradnici 2017-te godine. Oni su istraživanje proveli s ciljem dokazivanja utjecaja tretiranja uzoraka soka od bijelog grožđa hladnom plazmom na njegovu kvalitetu. Uzorke soka od grožđa stavili su u Petrijeve zdjelice koje su zatim stavili u Ziplock vreće koje su isprali suhim zrakom 3 minute prije termičkog tretiranja. Tretiranje su proveli na temperaturi od 24 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 46%. Uzorke su tretirali pod naponom od 80 kV jednu, dvije, tri odnosno četiri minute. Nakon obrade rezultata ustanovili su da tretiranje plazmom neznatno snižava pH uzoraka.

4.2 Utjecaj visokonaponskog pražnjenja na koncentraciju slobodnih

radikala

Slobodni radikali su molekule s nesparenim elektronom što ih čini izuzetno reaktivnim spojevima koji u organizmu pokreću lančane reakcije kako bi se stabilizirali te su uključeni u različite patološke procese i starenje organizma (Lushchak, 2014). Prevelika količina slobodnih radikala u organizmu uzrokuje oksidativni stres i povezana je s različitim bolestima kao što je Alzheimerova bolest te različite vrste karcinoma (Poprac i sur, 2017).

U ovom je radu analizirana promjena u masenoj koncentraciji slobodnih radikala nakon tretiranja uzoraka hladnom plazmom kako bi se procijenila sigurnost ove metode. Kao što je već navedeno visokonaponskim plazma pražnjenjem u tekućini dolazi do razvoja različitih kemijskih vrsta između kojih su i slobodni radikali. Oni vrlo brzo ulaze u rekombinacije s drugim molekulama zbog svog brzog gibanja u tekućini, ali i zbog velike reaktivnosti te u takvim reakcijama nastaju i neke druge molekule poput vodikovog peroksida. U ovom radu konkretno određivana je masena koncentracija reaktivnih oblika dušika (nitrita i nitrata) te reaktivnih oblika kisika (ROS) u koje ubrajamo superoksidni anion, perhidroksilni radikal, hidroksilni radikal i hipokloritnu kiselinu (Lushchak, 2014). Posebno su određivani i peroksidni radikali.

Kako navode Li i sur. u svom revijalnom radu iz 2019. godine u kojem su saželi najnovija otkrića o ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz biljaka ekstrakcijom visokonaponskim pražnjenjem, tijekom tretiranja uzoraka hladnom plazmom u otopini se generiraju različiti reaktivni oblici pa je bilo za očekivati kako će nakon tretiranja u otopinama porasti masena koncentracija reaktivnih oblika kisika i dušika. Međutim rezultati prikazani u Tablicama 3-10 pokazuju kako ne da nije došlo do povećanja koncentracije, nego je čak u većini uzoraka došlo i do smanjenja koncentracije slobodnih radikala.

Također, ovi rezultati pokazuju kako nema povećanja koncentracije slobodnih radikala pri dužem tretiranju uzoraka. Dobiveni su gotovo identični rezultati bilo da se tretiranje provodilo 9 minuta ili 3 minute.

Osim što vrijeme tretiranja nema utjecaj na povećanje koncentracije slobodnih radikala, čini se kako ni vrsta plina kojim su tretirani uzorci ne utječe na veće generiranje radikala jer je iz Tablica 3-10 vidljivo kako nema značajne razlike u povećanju koncentracije slobodnih radikala kod tretiranja uzoraka dušikom ili argonom. Ovi rezultati opet nisu sasvim u skladu s prijašnjim istraživanjima. Naime, Takamatsu i sur. proveli su istraživanje 2014. godine u kojem su nastojali otkriti koja vrsta plina najviše utječe na generiranje slobodnih radikala te koja se

vrsta i količina radikala generira nakon takvih tretiranja. Tretirali su uzorke pod naponom od 16 kHz do 9 kV, snaga plazme bila je 10 W, a temperatura plina plazmi nije prelazila 50 °C. Ispitali su svaku reaktivnu vrstu nastalu plazmama argona, helija, dušika, kisika i ugljikovog dioksida i zaključili kako se najveća količina slobodnih kisikovih radikala generira kad se koristi argon pomiješan s vodom kao radni plin, a zatim kad se uzorci tretiraju plazmom dušika pa argona.

Također, u tom radu navode kako je koncentracija reaktivnih dušikovih vrsta samo nakon tretiranja uzoraka dušikom bila ispod granice detekcije što opet nije u skladu s rezultatima ovog rada iz kojih je vidljivo kako koncentracija reaktivnih dušikovih vrsta ne raste nakon tretiranja bilo plazmom dušika, bilo plazmom argona.

4.3 Razlike u koncentraciji slobodnih radikala između uzoraka origana i ružmarina

Iz rezultata prikazanih u Tablicama 3-10 vidljivo je kako i tip biljke utječe na koncentraciju slobodnih radikala u uzorcima. Naime, može se vidjeti kako je koncentracija i nitrita i nitrata te slobodnih kisikovih radikala veća u otopinama origana i prije i poslije tretiranja hladnom plazmom. Osim toga, može se uočiti kako je koncentracija radikala veća u otopinama origana u odnosu na otopinu ružmarina neovisno o tome da li je tretiranje provedeno u struji argona ili u struji dušika. Takvi rezultati su se mogli i očekivati s obzirom da se danas zna da ružmarin posjeduje snažna antioksidacijska svojstva, najviše zbog prisutnosti karnosola i karnozinske kiseline, ali i drugih fenola poput rosmannola, epirosmannola i metil-epirosmannola koji, iako prisutni u manjim količinama, također doprinose antioksidativnoj aktivnosti (Xie i sur., 2017). Također u istraživanju koje su 2012.-te proveli Santos i suradnici s ciljem utvrđivanja antioksidativne aktivnosti u ekstraktima ružmarina i origana, rezultati su pokazali kako ružmarin ima jaču antioksidativnu aktivnost od origana što je vjerojatno razlog manje količina slobodnih radikala u ekstraktima ružmarina.

5. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata i provedene rasprave doneseni su sljedeći zaključci:

- ❖ Tretiranjem hladnom plazmom dolazi do značajnih kemijskih i fizikalnih promjena u uzorcima
- ❖ Na vrijednosti električne provodnosti utječe otapalo koje se koristi za ekstrakciju (najviša je kad se kao otapalo koristi voda, a najmanja kad se kao otapalo koristi 50%-tna vodena otopina etanola)
- ❖ Električna provodnost raste nakon tretiranja hladnom plazmom
- ❖ Nakon tretiranja uzoraka, u uzorcima ne dolazi do značajnog povećanja masene koncentracije slobodnih radikala
- ❖ Na povećanje masene koncentracije slobodnih radikala ne utječe vrijeme tretiranja
- ❖ U uzorcima ružmarina manja je masena koncentracija slobodnih radikala, od uzoraka origana
- ❖ Visokonaponsko električno pražnjenje efikasna je metoda ekstrakcije koja ne uzrokuje degradaciju namirnica ni razvoj štetnih sastojaka te bi jednom mogla u potpunosti zamijeniti klasične metode ekstrakcije

6. LITERATURA:

Anonymous (2017) Uređaj za visokonaponsko pražnjenje plazma/ high voltage electrical discharge plasma device, < <http://greenvoltex.pbf.hr/>> Pristupljeno 31. ožujka 2020.

Barba F. J., Brianceau S., Turk M., Boussetta N., Vorobiev E. (2015) Effect of alternative physical treatments (ultrasounds, pulsed electric fields and high-voltage discharges) on selective recovery of bio-compounds from fermented grape pomace. *Food and bioprocess technology* **8**: 1139-1148.

Bhatt S., Tewati G., Pande C., Punetha D., Prakash O. (2020) Antioxidative potential and compositional variation among *Origanum vulgare* L. collected from different districts of Kumaun Himalayas, Uttarakhand. *Journal of essential oil research* **32**: 121-131.

Birtić S., Dussort P., Pierre F. X., Bily A. C., Roller M. (2015) Carnosic acid. *Phytochemistry* **115**: 9-19.

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

Caili F., Haijun T., Quanhong L., Tongyji C., Werijuan D. (2006) Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrasonics Sonochemistry* **13**: 511-516.

Carruba A., Abbate L., Sarno M., Sunseri F., Mauceri A., Lupini A., Mercati F. (2020) Characterization of Sicilian rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) germplasm through a multidisciplinary approach. *Planta* **251**: 37 (<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03327-8>).

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

Dai J., Mumper R. J. (2010) Plant phenolic: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**: 7313-7352.

De Martino L., De Feo V., Formiscano C., Mignola E., Senatore F. (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. spp *hirtum* letswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules* **14**: 2735-2746.

Drmić H., Režek Jambrak A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **2**: 22-33.

Giacometti J., Bursač Kovačević, Putnik P., Gabrić D., Bilušić T., Krešić G., Stulić V., Barba F. J., Chemat F., Barbosa-Canovas G., Režek Jambrak A. (2018) Extraction of bioactive compounds and essential oils from Mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International* **113**: 245-262.

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.

Jokić S., Molnar M., Aladić K. (2016) Visokotlačne tehnike ekstrakcije ljekovitih biljaka. *Radionica u sklopu projekta Primjena mikroreaktora u praćenju antioksidacijske aktivnosti samoniklog bilja (MICRO-AA)*.

Kaushik N. K., Kaushik N., Linh N. N., Ghimire B., Pengkit A., Sornsakdanuphap J., Lee S. J., Choi E. H. (2019.) Plasma and nanomaterials: Fabrication and biomedical applications. *Nanomaterials* **9**

Kovačević D., Barba F. J., Lorenzo J. M., Rocchetti G., Lucini L., Putnik P. (2019) Innovative technologies for fruit extracts: value-added opportunities in the meat industry. The 60th International Meat Industry Conference MEATCON2019, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, **333**: 012017.

Kovač V. (2018.) Organska kemija, interna skripta, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

Li. Z., Fan Y., Xi J. (2019) Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Food Chemistry* **277**: 246-260.

Lushchak V. I. (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* **224**: 164-175.

Marković S., Ružmarin (2006), Vaše zdravlje, broj 49.

< <https://www.vasezdravlje.com/biljna-ljekarna/ruzmarin> >, Pristupljeno 6. travnja 2020.

Maršić N., Antioksidansi – čuvari našeg zdravlja (2005), Vaše zdravlje, broj 42.

< <https://www.vasezdravlje.com/hrana-i-zdravlje/antioksidansi-cuvari-naseg-zdravlja> >, Pristupljeno 7. Travnja 2020.

Maza M., Alvarez I., Raso J. (2019) Thermal and non-thermal physical methods for improving polyphenol extraction in red winemaking. *Beverages* **5**:

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

Pankaj S. K., Wan Z., Colonna W., Keener K. M. (2017) Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97**: 4016-4021.

Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodex C. J., Valko M. (2017) Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**: 592-607.

Riberio Sarkis J., Bousseta N., Blouet C., Tessaro I. C., Damasceno Ferreira Marczak C., Vorobiev E. (2015) Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **29**: 170-177.

Santos R. D., Shetty K., Cecchini A. L., Da Silva Miglioranza L. H. (2012) Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Semina-ciencias agrarias* **33**: 655-666.

Serrano M., Martinez-Romero D., Guillén F., Valverde J. M., Zapata P. J., Castillo S., Valero D. (2008) The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science and Technology* **19**: 464-471

Takamatsu T., Uehara K., Sasaki Y., Miyahara H., Matsumura Y., Iwasawa A., Ito N., Azuma T., Kohno M., Okino A. (2014) Investigation of reactive species using various gas plasmas. *Rsc Advances* **4**: 39901-39905.

Yan F., Xu J., Lin B., Peng S., Zou Q., Zhang X. (2019) Changes in pore structure and permeability of anthracite coal before and after high-voltage electrical pulses treatment. *Powder Technology* **343**: 560-567.

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 extraxtion and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines* **15**: 721-731.

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

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.

Ime i prezime studenta