

Utjecaj različitih procesnih parametara na antibakterijsku i antioksidativnu aktivnost ekstrakata listova kadulje (*Salvia officinalis* L.) dobivenih ekstrakcijom superkričnim CO₂

Čavčić, Dalma

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:930877>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Dalma Čavčić

Utjecaj različitih procesnih parametara na antibakterijsku i antioksidativnu aktivnost ekstrakata listova kadulje (*Salvia officinalis* L.) dobivenih ekstrakcijom superkričnim CO₂

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer; znanstveni
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH PARAMETARA NA ANTIBAKTERIJSKU I
ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST EKSTRAKATA LISTOVA KADULJE (*Salvia officinalis* L.)
DOBIVENIH EKSTRAKCIJOM SUPERKRITIČNIM CO₂

Dalma Čavčić

Rad je izrađen: na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka

Mentor: dr. sc. Valentina Pavić, doc.

Kratak sažetak: Kadulja sadrži fitokemikalije koje su u današnje vrijeme od sve veće važnosti u istraživanju alternativnih anitbiotika i antioksidansa. Istraživanja su pokazala kako velika koncentracija reaktivnih kisikovih jedinki može uzrokovati različite bolesti, poput raka i neurodegenerativnih bolesti. Cilj ovog istraživanja je utvrditi kako različiti uvjeti ekstrakcije superkritičnim CO₂ listova kadulje (*Salvia officinalis* L.) utječu na ukupnu antibakterijsku i antioksidacijsku aktivnost određivanjem ukupnog sadržaja fenolnih spojeva, ukupne antioksidacijske i antibakterijske aktivnosti na četiri različite bakterije. U ovom istraživanju, rezultati su pokazali da veći tlak pridonosi većem prinosu ekstrakcije, dok viša temperatura ima negativan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata listova kadulje, kao i na ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva. Također, dokazana je izvrsna povezanost ukupnog sadržaja fenolnih spojeva s antioksidacijskom aktivnošću ekstrakata.

Broj stranica: 50

Broj slika: 10

Broj tablica: 6

Broj literaturnih navoda: 93

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: kadulja, ekstrakcija superkritičnim CO₂, koncentracija ukupnih fenolnih spojeva, antibakterijska i antioksidacijska aktivnost

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr. sc. Valentina Pavić, doc., mentor i član
2. Dr. sc. Mirna Velki, doc., član
3. Dr. sc. Zorana Katanić, doc., član
4. Dr. sc. Filip Stević, doc., zamjena člana

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology

Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

IMPACT OF DIFFERENT PROCESS PARAMETERS ON ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SAGE LEAF EXTRACTS (*Salvia officinalis* L.) GAINED WITH SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION

Dalma Čavčić

Thesis performed at: Subdepartment of Biochemistry and Plant Ecophysiology

Supervisor: Valentina Pavić, PhD, Assistant Professor

Short abstract: Sage contains phytochemicals that are increasingly important in the research of alternative antibiotics and antioxidants today. Studies have shown that a high concentration of reactive oxygen species can cause different diseases, such as cancer and neurodegenerative diseases. The aim of this study was to determine how different extraction conditions with supercritical CO₂ of sage leaves (*Salvia officinalis* L.) affect total antibacterial and antioxidant activity by determining the total phenolic content, total antioxidant and antibacterial activity against four different bacteria. In this study, the results demonstrated that higher pressure contributes to a higher extraction yield whereas higher temperature had negative effect on the antioxidant activity of sage leaves extracts as well as the overall concentration of phenolic compounds. Furthermore, an excellent correlation between the total content of phenolic compounds and the antioxidant activity of the extracts has been demonstrated.

Number of pages: 50

Number of figures: 10

Number of tables: 6

Number of references: 93

Original in: Croatian

Keywords: sage, supercritical CO₂ extraction, total phenolic content, antibacterial and antioxidant activity

Date of thesis defence:

Reviewers:

1. Valentina Pavić, PhD, Assistant Professor, supervisor and reviewer
2. Mirna Velki, PhD, Assistant Professor, reviewer
3. Zorana Katanić, PhD, Assistant Professor, reviewer
4. Filip Stević, PhD, Assistant Professor, substitute reviewer

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

*Zahvaljujem prvenstveno mentorici doc.dr.sc. Valentini Pavić za
strpljenje, stručnu pomoć i savjete tijekom izrade i pisanja
diplomskog rada. Hvala Vam!*

*Hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi bili podrška i oslonac
tijekom studentskih dana i na taj način obogatili to životno razdoblje.*

*Na kraju, hvala mojoj obitelji, pogotovo mojoj sestri Dini, na
neizmjerljivoj podršci i ljubavi bez kojih ne bi ovo sve bilo moguće.*

Veliko hvala!

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Kadulja	1
1.2. Upotreba kadulje	2
1.3. Aktivne komponente kadulje	2
1.4. Ekstrakcija superkritičnim fluidima	4
1.4.1. Ekstrakcija superkritičnim CO ₂	6
1.5. Antioksidacijska aktivnost.....	7
1.5.1. Oksidacijski stres.....	7
1.5.2. Antioksidansi.....	9
1.5.3. Metode određivanje antioksidacijske aktivnosti	10
1.6. Antibakterijska aktivnost i svojstva bakterija	12
1.6.1. <i>Bacillus subtilis</i>	12
1.6.2. <i>Escherichia coli</i>	12
1.6.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.6.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.6.5. Metode određivanja antibakterijske aktivnosti	15
1.6.6. Metoda minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)	16
1.7. Cilj rada	18
2. MATERIJALI I METODE	19
2.1. Biljni materijal.....	19
2.2. Ekstrakcija uzoraka i kemijska karakterizacija ekstrakata	19
2.3. Određivanje koncentracije ukupnih fenola –TPC (eng. <i>Total Phenolic Concentration</i>)	20
2.3.1. Folin-Ciocalteu metoda	20
2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	21
2.4.1. DPPH metoda	21

2.5. Određivanje antibakterijske aktivnosti.....	21
2.5.1. Hranjiva podloga	21
2.5.2. Izvor bakterijskih organizama i određivanje gustoće bakterijske suspenzije.....	22
2.5.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije	23
2.6. Statistička obrada podataka	25
3. REZULTATI.....	26
3.1. Utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije superkritičnim CO ₂ na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata	27
4. RASPRAVA.....	34
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA	42

1. UVOD

1.1. Kadulja

Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.) višegodišnja je biljka u obliku polugrma iz porodice Lamiaceae. Stabljika je razgranata, povijena, u donjem dijelu drvenasta, a može narasti i do 110 cm visine (Hulina, 2011). Listovi su sivkastozelene boje, naborani, usko eliptični na drškama i nasuprot poredani. Cvjetovi su veličine 2-3 cm, dvospolni i jednodomni te su skupljeni u pršljenaste cvatove na vrhu stabljike (Hercegovac, 2016). Čaška je cjevasto zvonasta i dvousnata obrasla dlakama. Vjenčić je duži od čaške, može biti plave ili ljubičaste boje. Donja usna je duža od gornje i ima tri režnja, dok gornja usna ima samo dva režnja. Dva prašnika su prirasla za vjenčić te ima jedan tučak s nadržalom plodnicom. Plod kadulje je kalavac koji dozrijeva od srpnja do rujna, dok sama kadulja cvate od svibnja do srpnja, u trajanju dvadesetak dana.

Prirodno raste na kamenitim staništima u priobalnom području i na otocima Mediterana, no zbog svoje ljekovitosti postala je tražena kultura za uzgoj te se može uzgajati na hladnijim područjima jer je biljka otporna na sušu i mraz (Kušan, 1956).

Latinsko podrijetlo imena *Salvia* proizlazi iz glagola *salvare* što u prijevodu znači spasiti (Baričević i sur., 2000). Njezina ljekovitost poznata je još od doba Egipćana, kada se osim u ljekovite svrhe, koristila i za pročišćavanje domova, ali i za mumificiranje i balzamiranje.



Slika 1. Kadulja (*Salvia officinalis* L.) (izvor: Web1)

1.2. Upotreba kadulje

Kadulja se koristi u borbi protiv temperature i znojenja kao antipiretik, djeluje na simptome reume i bronhitisa kao i na poremećaje živčanog sustava (Newall i sur., 1996). Najčešće se koriste listovi kadulje koji se suše i pravi se čaj (Lima i sur., 2005), ali može se koristiti i u obliku tinktura. Brojne su pogodnosti kaduljinog čaja, neke od njih su antiseptička, antimikrobna (Bozin i sur., 2007), protuupalna i antimitagena svojstva. Također, kadulja je poznata najviše po svom antioksidacijskom djelovanju zbog čega se, uz ružmarin sve više istražuje i uzgaja (Culiveir i sur., 1996). Antioksidacijsko djelovanje kadulje pripisuje se spojevima kao što su karnozinska kiselina, karnozol i ružmarinska kiselina (Darjmati i sur., 1982). Najčešće izolirani spojevi iz kadulje za koje se smatra da pridonose njezinom antioksidacijskom djelovanju su diterpeni, triterpeni, flavonoidi i fenoli (Wang i sur., 2013).

Unatoč razvoju tehnologije u industriji i proizvodnji hrane, velik i značajan zdravstveni problem je očuvanje hrane pri transportu i konzumaciji. Odnosno, u današnje vrijeme tradicionalni konzervansi se pokušavaju zamijeniti prirodnim tvarima kao što su ljekovita bilja, začini, esencijalna ulja i slične tvari. Također, sve više hrane životinjskog podrijetla biva zaraženo humanim patogenima. Prekomjernom upotrebom antibiotika razvila se rezistencija na velik broj sojeva patogena. Jedan od takvih patogena je *Salmonella* sp. koja uzrokuje trovanje hranom diljem svijeta. Istraživanjem utjecaja ekstrakta kadulje na nekoliko humanih patogena pronađenih u mesu goveda, potvrđeno je njezino snažno antimikrobno djelovanje na *Salmonella* sp. te umjereno djelovanje na gljivu *Candida albicans* (Hayouni i sur., 1992). Zbog pojave sve veće rezistencije patogena na određene antibiotike, nužna su daljnja istraživanja ljekovitih bilja kao što su kadulja, ružmarin i dr.s ciljem poboljšanja i razvoja proizvodnje hrane.

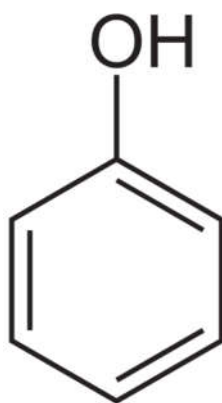
1.3. Aktivne komponente kadulje

Tijekom svog razvoja biljke proizvode primarne i sekundarne metabolite koji joj omogućavaju daljnji rast i razvoj te obranu od nametnika. Primarnim metabolitima nazivamo tvari koje nastaju pretvorbom drugih tvari i direktno su uključene u sam razvoj biljke. Sekundarni metaboliti su tvari koje nastaju iz primarnih metabolita te nisu uključene u razvoj biljke, nego imaju važnu ulogu u obrani biljke od nametnika i biljojeda (Bennet, 1974). Sekundarni metaboliti podijeljeni su u tri skupine ovisno o njihovoj biosintezi: terpeni i steroidi, fenoli i alkaloidi. Polifenoli su pronađeni u gotovo svim višim biljkama, pogotovo jer su uključeni u

sintezu lignina, dok su alkaloidi specifični za rod i vrstu biljke te su rijetko detektirani (Bourgard i sur., 2001). Kadulja je bogata biološki aktivnim komponentama, posebice sekundarnim metabolitima. U izolatima lista kadulje pronađene su ružmarinska i karnozinskakiselina, komponente kojima se pripisuje antioksidacijska sposobnost kadulje (Cuvelier i sur., 1994). Osim toga, pronađen je velik broj diterpenoida i fenolnih spojeva (Miura i sur., 2002). Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja kadulje pripisuje se α -tujonu, β -tujonu i 1,8-cineolu (Hussain i sur., 2011). Također, od fenolnih kiselina, detektirana je i kavena kiselina i njeni derivati (Kametou i sur., 2005).

Fenolne spojeve jednostavno možemo podijeliti na jednostavne fenole i polifenole, koji imaju više od jedne fenolne jedinice, no mnogo je podjela fenolnih spojeva.

Fenoli su spojevi koji se sastoje od aromatskog prstena i vezane jedne ili više hidroksilnih skupina. No, osim hidroksilnih skupina, na aromatskom prstenu mogu se nalaziti i druge funkcionalne skupine, kao što su esteri i metil-esteri. Zbog svoje antioksidacijske aktivnosti imaju velik značaj u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Također, na organizam djeluju protuupalno, antimikrobno, antimutageno te imaju još brojna pozitivna djelovanja. Polifenoli imaju ulogu u obrani biljke od nametnika i biljojeda, ali i od UV zračenja. U ljudskom organizmu utječu na antioksidacijsku aktivnost enzima i vitamina tijekom povećane koncentracije reaktivnih kisikovih jedinki. Polifenoli dijele se na flavonoide i neflavonoide, koji se značajno razlikuju u bioraspoloživosti i funkcijama u ljudskom organizmu (Tsao i sur., 2010).



Slika 2. Osnovna struktura fenola (izvor: Web2)

Flavonoidi su spojevi koji se sastoje od dva aromatska prstena međusobno povezana s piranskim prstenom. U skupinu flavonida pripadaju: flavoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoni i

antocijanidini. U manjoj koncentraciji u biljkama se nalaze halkoni, kumarini i auron. Flavonodi su pronađeni u većini ljekovitih biljaka. Osim u kadulji, pronađeni su i u ružmarinu, lovoru i drugim ljekovitim biljkama (Bozin i sur., 2007).

U skupinu neflavonoida ubrajamo fenolne kiseline, stilbene i lignane. Fenolne kiseline i njeni derivati su uključeni u mnoga istraživanja zbog svojih potencijalnih pozitivnih utjecaja na ljudski organizam. Razlikujemo derivate hidroksibenzojeve kiseline i derivate hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline fenolni su spojevi koji imaju sedam atoma ugljika te im je opća strukturna formula C₆-C₁.

Jedne od značajnih kiselina su: vanilinska, protokatehinska, galna, siriginska, *m*- i *p*-hidroksibenzojeva kiselina i druge (Pietta i sur., 2003).

Hidroksicimetne kiseline i njezini derivati su fenolne skupine opće strukturne formule C₆-C₃. Prisutne su u različitim dijelovima biljaka, a ponajviše su pronađene u povrću i voću. Većinom su pronađene u konjugiranom obliku te u obliku estera. U hidroskicimetne kiseline ubrajamo: *o*- i *p*-kumarinsku, kavenu, ferulinsku i sinapinsku kiselinu.

1.4. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

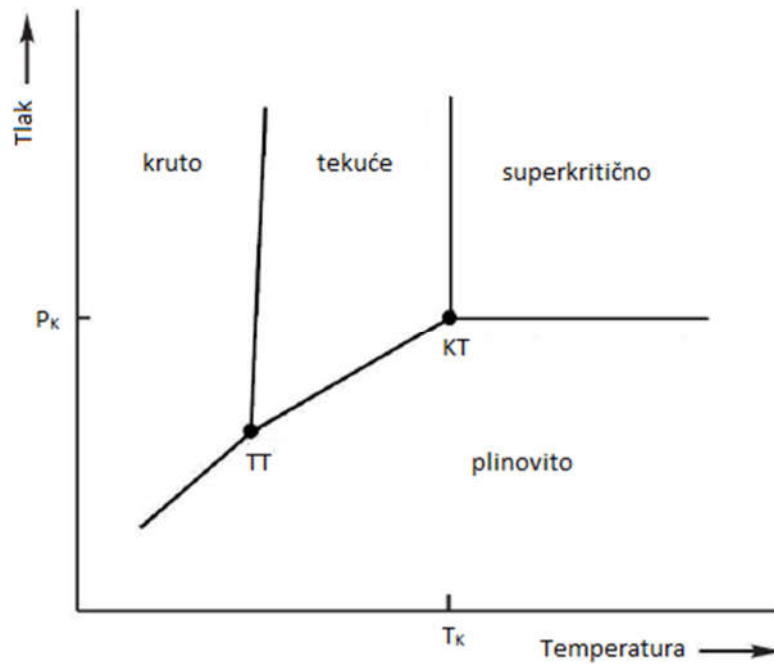
Ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) postala je alternativna metoda konvencionalnoj ekstrakciji zbog pokušaja smanjenja upotrebe organskih otapala u laboratorijima. Danas je to standardna metoda za ekstrakciju, frakciju, pročišćavanje lipida i esencijalnih ulja. Naime, hladnim prešanjem dobiva se ulje bolje kvalitete jer prilikom procesa nema termičkog degradiranja aktivnih komponenti kao što su fenoli, flavonoidi i tokoferoli (Teh i sur., 2013). Ekstrakcija superkritičnim fluidima je zahtjevnija jer se odvija pod visokim tlakom, isto tako je i skuplja metoda ekstrakcije. Aladić (2015) definira ekstrakciju superkritičnim fluidima kao operaciju prijenosa tvari temeljenu na činjenici da pojedini plinovi postaju dobra otapala za određene kemijske spojeve u blizini svoje kritične točke. Ukoliko se nalazi na nižoj temperaturi od kritične temperature, tvar neće prijeći u superkritično stanje, neovisno o povećanju tlaka. Nepolarni fluidi ekstrahirat će nepolarne komponente, dok je za ekstrakciju polarnih komponenti potrebno kootapalo i polarni fluid. Najčešće upotrebljavana polarna otapala su amonijak i metanol jer se lako postižu potrebni uvjeti za ekstrakciju. Također, superkritična otapala mogu biti podijeljena kao: otapala nisko kritične temperature (eng. *low*-T_c) i otapala visoko kritične temperature (eng. *high*-T_c).

Plinovi koji se mogu kondenzirati smatraju se otapalima niske kritične temperature. U takva otapala ubrajamo ugljikov(IV) oksid, etan, propan i dr. Gustoća je jedan od važnijih čimbenika ekstrakcije superkritičnim fluidima te je ovisna o promjenama tlaka i temperature. Veća gustoća korištenog superkritičnog fluida povećava interakciju fluida i materijala koji se ekstrahira te je rezultat veća količina ekstrakta (Aladić, 2015).

Brojne su prednosti ekstrakcije superkritičnim fluidima, poput: otapala potrebna za ovakvu ekstrakciju većinom su povoljna i sigurna za korištenje, može se postići veća selektivnost tijekom separacije, razdvajanje ekstrakta brzo je i lako, moguća je ekstrakcija termolabilnih komponenti te se može primijeniti na sustave različitog kapaciteta od preparativnih do industrijskih postrojenja (Jokić, 2011).

Prema Jokić (2011), ekstrakcija superkritičnim fluidima odvija se u 5 faza: difuzija superkritičnog fluida do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje, prodiranje i difuzija superkritičnog fluida kroz vanjski sloj sfernog omotača, krutog, inertnog materijala te potom kontakt superkritičnog fluida s otopljenom tvari na površini neizreagirane jezgre i ekstrakcija otopljene tvari. Nakraju otopljena tvar difundira u superkritičnom fluidu kroz film superkritičnog fluida koji okružuje česticu u glavnu struju fluida.

Čimbenici koji utječu na tijek ekstrakcije superkritičnim fluidima su: tlak, temperatura, vrijeme ekstrakcije i protok otapala, gustoća, viskoznost te difuznost otapala i komponente koja se ekstrahira, interakcije između molekula otapala, topljive supstance i netopljivog dijela krutog materijala u kojemu se nalazi topljiva komponenta, dodatak različitih kootapala te veličina i raspodjela čestica, poroznost čestica i sloja (Jokić, 2011).

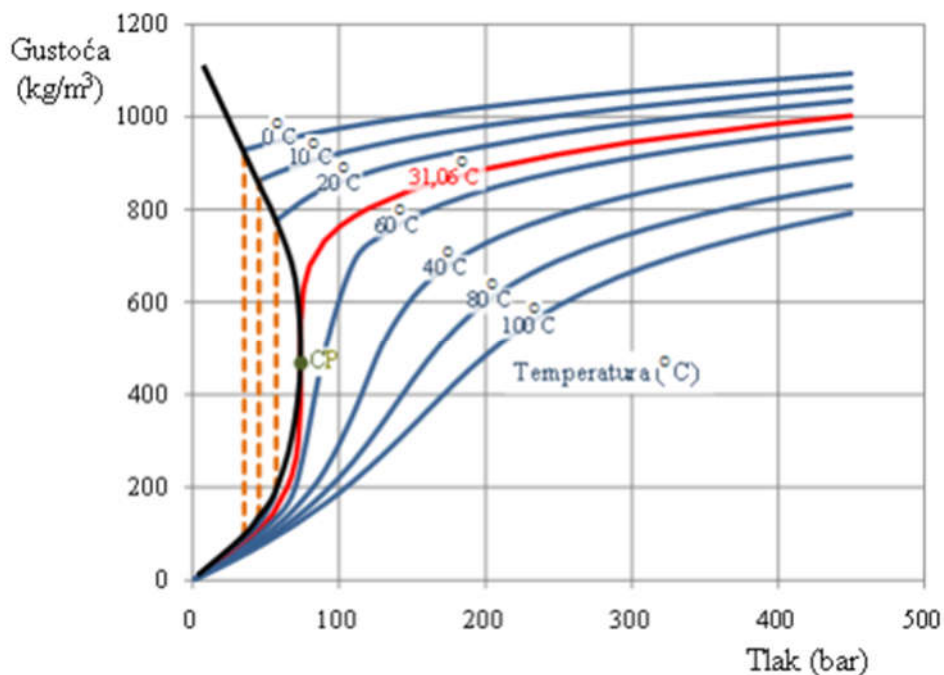


Slika 3. Fazni dijagram temperatura-tlak (preuzeto i prilagođeno iz Aladić, 2015)

1.4.1. Ekstrakcija superkričnim CO_2

Ugljikov(IV) oksid je jedan od češće korištenih superkričnih fluida. On je ekološki prihvatljiv, netoksičan, nezapaljiv, nezagađujuć i za razliku od organskih otapala, relativno povoljan. Također, CO_2 ima visoku difuznost, viskoznost i manju površinsku napetost od kovencionalnih otapala (Diaz-Reinoso i sur., 2006). Ekstrakcija superkričnim CO_2 spada u "čistu tehnologiju" jer nema ostataka štetnih za okoliš i kao takav, ima važno mjesto u prehrambenoj industriji.

CO_2 otapa većinom nepolarne spojeve, no otapa i blago polarne uz dodatak kootapala (npr. metanola). Ketoni, esteri i alkoholi su vrlo topljivi, dok proteini, šećeri, voćne kiseline i mineralne soli su netopljivi. Superkrični CO_2 ima sposobnost odvajanja spojeva koji imaju manju sposobnost isparavanja, imaju veću molekularnu masu i/ili su više polarni, s porastom tlaka (Jokić, 2011). U superkričnom stanju, iznad kritične vrijednosti temperature i tlaka, gustoća se može podešavati promjenom tlaka ili temperature.



Slika 4. Ovisnost gustoće CO₂ o temperaturi i tlaku (Jokić, 2011)

1.5. Antiokidacijska aktivnost

1.5.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres definira se kao poremećaj ravnoteže između produkcije oksidansa i sustava za obranu od takvih spojeva (Halliwell i sur., 1999). U oksidanse ubrajamo reaktivne kisikove jedinice (eng. *Reactive Oxygen Species*-ROS), reaktivne dušikove spojeve (eng. *Reactive Nitrogen Species*-RNS) i druge radikale. U reaktivne kisikove jedinice ubrajamo superoksidni anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$) te vodikov peroksid (H_2O_2), dok u reaktivne dušikove jedinice ubrajamo dušikov oksid (NO), dušikov dioksid (NO_2), dušičnu kiselinu (HNO_2), peroksinitrit (ONOO^-), peroksinitritnu kiselinu (ONOOH) i alkil peroksinitrat.

Svaka atomska orbitala može sadržavati najviše dva elektrona koji moraju biti suprotnog spina. Slobodni radikali mogu se definirati kao bilo koja vrsta sposobna za nezavisno postojanje koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell, 1991). Većina biomolekula su neradikali, koji sadrže samo uparene elektrone.

Nisu sve reaktivne jedinice radikali, no i te jedinice oksidacijom elektrona postanu radikali te uzrokuju oštećenja biomolekula. Oksidansi u organizmu mogu nastati na brojne različite načine, kao što su: izlaganje ionizirajućoj radijaciji, kemijskim reakcijama, enzimatski, redoks reakcijama i slično. Važan izvor nastanka oksidacijskog stresa u organizmu je nastanak reaktivnih kisikovih jedinica pri nepotpunoj redukciji kisika u respiratornom lancu mitohondrija te obrambeni sustav posredovan NADPH oksidazom, proizvodnja superoksid radikala i stvaranje hipokloraste kiseline (Abuja i sur., 2011).

Reaktivne kisikove jedinice poznati su medijatori unutarstaničnih signalnih kaskada. Prekomjerna proizvodnja ROS-a može dovesti do oksidacijskog stresa, gubitka stanične funkcije i nakraju apoptoze ili nekroze. Ravnoteža između oksidansa i antioksidansa organizma ključna je za stanične funkcije, regulaciju i prilagodbu na različite uvjete rasta. Tioredoksin reduktaze (trxr) zajedno s tioredoksinom (TRX) čini oksidoreduktazni sustav s antioksidacijskim redoks regulatornim ulogama (Nordberg, 2001).

Veliko opterećenje oksidacijskog stresa u organizmu uzrokuje teška oštećenja staničnih struktura što za posljedicu može imati staničnu smrt (Niviere i sur., 1995). Lipidna peroksidacija složena je lančana razgradnja nezasićenih masnih kiselina potaknuta reaktivnim kisikovim jedinkama i reaktivnim dušikovim jedinkama (Svingen i sur., 1978). Pojava lipidne peroksidacije u biološkim membranama može dovesti do poremećaja funkcije i smanjene fluidnosti što je povezano s brojnim bolesnim stanjima. Veliku ulogu u procesu nastanka i razvoja karcinoma imaju reaktivne kisikove jedinice (Cerruti, 1985). Superoksidni anion i vodikov peroksid klasificirani su pod tumorske inicijatore. U karcinogenezi aktivni kisik ima važnu ulogu u fazi promocije, tijekom koje se genska ekspresija iniciranih stanica modulira utječući na gene koji reguliraju diferencijaciju i rast stanica. U fazi progresije, uglavnom se benigne tvorevine stimuliraju na brži rast i zloćudnost. Poznato je da aktivni kisik inducira kromosomske aberacije te da ima ulogu u fazi progresije. Prema Waris i Ashan (2006) povećana koncentracija reaktivnih kisikovih jedinica i smanjena sposobnost antioksidacijskih enzima mogu uzrokovati razvoj neurodegenerativnih bolesti i dijabetesa.

Također, mozak je izrazito osjetljiv na toksično djelovanje reaktivnih kisikovih jedinica (Ames i sur., 1993). Stanice mozga energiju pretežito stvaraju u respiratornom lancu mitohondrija, pri čemu se oslobađaju vodikov peroksid i superoksidni anion. U tkivu mozga smanjena je aktivnost enzima katalaze, superoksid dismutaze i glutation reduktaze, pa se nastale

citotoksične molekule ne mogu dovoljno brzo ukloniti (Pellegrini i Giampietro, 1994). Sukladno tome, oksidativni stres ima veliku ulogu u razvoju degenerativnih bolesti poput Parkinsonove, Huntingrove i Alzheimerove bolesti (Ames i sur., 1993).

1.5.2. Antioksidansi

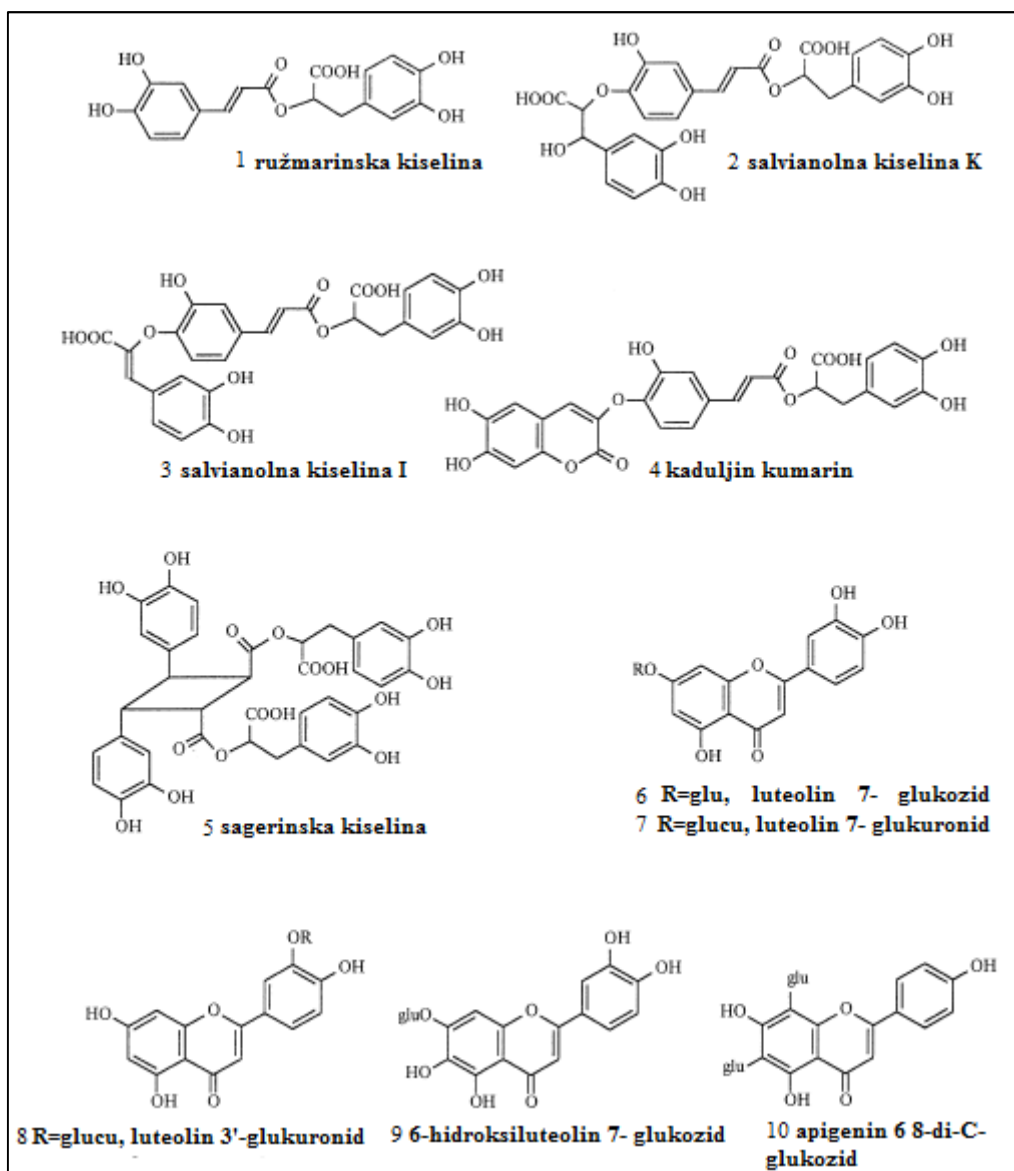
Reaktivne kisikove jedinice konstantno nastaju u ljudskom tijelu i uklanjaju se antioksidansima. Antioksidans je tvar koja, kada je prisutna u niskim koncentracijama u odnosu na oksidirajući supstrat, značajno odgađa ili sprječava oksidaciju tog supstrata. Antioksidansi mogu djelovati tako da hvataju biološki važne reaktivne kisikove jedinice, sprječavajući njihovo nastajanje ili popravljajući štetu koju su uzrokovali.

Organizmi koriste enzime kao što su superoksid dismutaze, katalazu i glutation peroksidazu kao zaštitu od nastanka reaktivnih kisikovih jedinica. Organizmi skladište što više iona željeza i bakra u obliku skladišnih ili transportnih proteina (Halliwell, 1986). Vezani ioni željeza i bakra u obliku transferina ne mogu stimulirati lipidnu peroksidaciju ili nastajanje slobodnih radikala. Isto vrijedi i za ione bakra vezane za proteine plazme ili albumina. Važnost vezanja iona željeza i bakra u proteine pokazana je istraživanjem bolesnika oboljelih od hemokromatoze. Pregledom patologije bolesnika kod kojih kelati iona željeza slobodno difundiraju putem krvi ustanovljeno je da ti bolesnici pate još od poremećaja jetre, dijabetesa, hepatoma i drugih bolesti. Jedan od glavnih antioksidansa u plazmi je askorbinska kiselina koja može neutralizirati oksidanse u prisutnosti metalnih iona (Halliwell i sur., 1990).

Osim primarne zaštite organizma koja uključuje enzime, postoji i sekundarna zaštita. Stanična membrana i plazmatski lipoproteini sadrže tokoferol, topljivu lipidnu molekulu koja djeluje kao antioksidans. Radikali tijekom lipidne peroksidacije reagiraju s antioksidansom umjesto s masnim kiselinama zbog činjenice da se vrlo lako uklanja OH- skupina tokoferola. Reakcija se prekida jer nastaje tokoferil radikal koji je slabo reaktivan pa ne oštećuje komponente masnih kiselina te ne inicira lipidnu peroksidaciju (Nimse i Pal, 2015). Radikali tokoferola mogu migrirati na površinu membrane i reagirati s askorbinskom kiselinom, te prijevratiti u α -tokoferol (Wefers, 1988).

Ranija istraživanja antioksidacijskog djelovanja kadulje bila su ograničena na diterpenoide (Cuvelier i sur., 1994), dok su novija istraživanja usmjerena na fenolne glikozide, flavonoide te

na ružmarinsku i druge kiseline pronađene u uzorcima kadulje (Lu i sur., 2001). Pronađeni izolirani kemijski spojevi iz kadulje s antioksidacijskim djelovanjem prikazani su na Slici 5.



Slika 5. Polifenoli s antioksidacijskim djelovanjem iz vrste *Salvia officinalis* (preuzeto i prilagođeno iz Lu i sur., 2001)

1.5.3. Metode određivanje antioksidacijske aktivnosti

Metode koje se koriste pri određivanju antioksidacijske aktivnosti dijele se u tri kategorije: spektrokemijske, elektrokemijske i kromatografske metode. ABTS, DPPH, FRAP i ORAC su

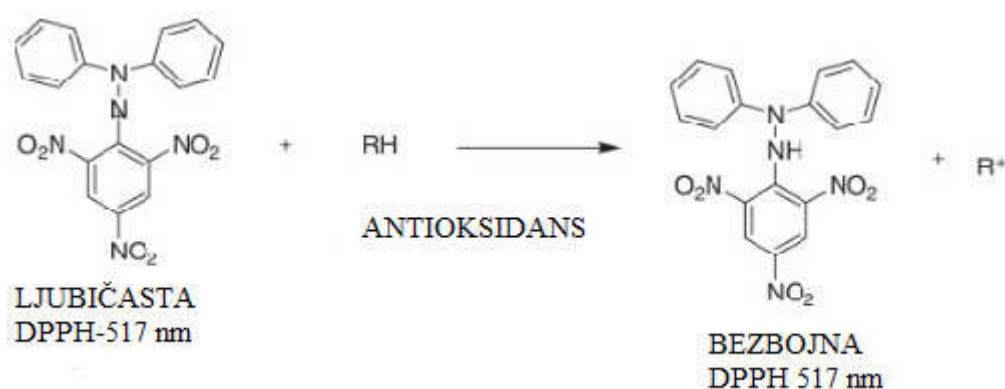
spektrofotometrijske metode. DPPH metoda temelji se na mjerenju redukcije 2,2-difenilpikrilhidrazil radikala upotrebom antioksidansa (Thaipong i sur., 2006). ABTS metoda koristi se za mjerenje sposobnosti uklanjanja radikala pomoću flavonoida i fenola. ORAC i FRAP metode najčešće se koriste za određivanje antioksidansa u povrću i voću te voćnim ekstraktima.

1.5.3.1. DPPH metoda

DPPH metodu razvio je Blois (1958) s ciljem utvrđivanja antioksidacijske aktivnosti pomoću stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenilpikrilhidrazila (DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394,33$). Neparni elektron atoma dušika u DPPH reduciran je primanjem atoma vodika od antioksidansa do odgovarajućeg hidrazina (Contreras-Guzman i Srong, 1982).

DPPH radikal stabilni je radikal zbog delokalizacije elektrona preko cijele molekule, pa on ne dimerizira kao ostali slobodni radikali (Nithya i Madhavi, 2017). Također, delokalizacija uzrokuje ljubičastu boju s apsorbancijom na 520 nm u etanolnoj otopini. Tijekom reakcije DPPH radikala sa spojem koji može donirati vodikov atom, dolazi do gubitka ljubičaste boje (Kedare i Singh, 2011).

To je brza, jednostavna, jeftina i široko korištena metoda koja se može koristiti određivanje antioksidacijske aktivnosti hrane i kvantifikaciju antioksidansa u biološkim sustavima.



Slika 6. Shema redukcije DPPH (preuzeto i prilagođeno iz Nithya i Madhavi, 2017)

1.6. Antibakterijska aktivnost i svojstva bakterija

1.6.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis široko je rasprostranjena bakterija sposobna za rast u mnogim okruženjima. Nedavno, komparativna analiza njezina genoma otkrila je da sojevi ove vrste također pokazuju znatnu raznolikost genoma. Identifikacija specifičnih gena sojeva mogla bi objasniti kako je ova bakterija postala tako dobro prilagođena na različite uvjete okoliša. *B. subtilis* može biti pronađen u mnogim različitim okruženjima: terestričkim i akvatičnim sustavima, što čini ovu bakteriju široko rasprostranjenom. Međutim, kao i svi članovi roda *Bacillus*, *B. subtilis* može tvoriti vrlo rezistentne dormantne endospore kada se nađe u nepovoljnim uvjetima okoliša, kao primjerice nedostatak nutrijenata (Sonenshein i sur., 2002). Ove spore su lako nošene vjetrom. Također, neka istraživanja ukazuju na blagotvorna djelovanja ove bakterije nakon procesa fermentacije. Istraživana je kao probiotik te se smatra da potpomaže održavanju vlastite bakterijske zajednice crijeva ili pomaže obnoviti postojeću zajednicu (Hong i sur., 2005). U Japanu, ova bakterija se nalazi u nekoliko komercijalno dostupnih fermentiranih prehrambenih proizvoda kao što je primjer soja *Natto*.

1.6.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli koliformna je bakterija koja nastanjuje probavni sustav ljudi i životinja. Kada se namnoži, postane uzrok brojnim infekcijama. Najčešće su to infekcije probavnog i mokraćnog sustava, no može uzrokovati upalu pluća, meningitis kod novorođenčadi i sepsu (Roberts i sur., 1955). Pripada gram-negativnim bakterijama, prepoznatljiva je po svom štapićastom obliku te se može kretati pomoću rotacije trepetljiki. Fakultativno anaerobna je vrsta bakterije, što znači da živi u uvjetima bez kisika, ali može ga iskoristiti ako je prisutan. Služi kao indikator fekalne kontaminacije vode i hrane. Nisu svi sojevi ove bakterije patogeni, no nekoliko njih mogu izazvati ozbiljne zdravstvene probleme.

Enterotoksigena *E. coli* (ETEC) dovodi do pojave putničkog proljeva, enteropatogena *E. coli* (EPEC) čest je uzročnik proljeva kod djece, enteroinvazivna *E. coli* (EIEC) izaziva dizenteriju, enterohemoragična *E. coli* (EHEC) dovodi do pojave hemoragičnog kolitisa ili hemolitičko-uremičkog sindroma (HUS), enteroagregativna *E. coli* (EAggEC) povezuje se s proljevima kod

djece u nerazvijenim zemljama, dok je enteroadherentna *E. coli* (EAEC) uzrok proljeva kod djece te putničkog proljeva u Meksiku i Sjevernoj Africi (Levine, 1987).

Za razliku od drugih sojeva, EHEC može dovesti do vrlo ozbiljnih zdravstvenih problema zbog toga što otpušta jedan ili više toksina poznatih pod nazivom *Shiga-like* toksini (Karch i sur., 2005). Velik broj slučajeva novorođenačkog meningitisa uzrokovan je upravo bakterijom *E. coli*, a sojevi koji sadrže kapsularni antigen K1 povezuju se i s novorođenačkom sepsom. U roku od nekoliko dana nakon rođenja dojenčad stekne *E. coli* uglavnom od majke i druge bliske okoline. Bakterija brzo nastani debelo crijevo (Sack, 1975). Iz razloga koji nisu u potpunosti jasni, ovaj mikroorganizam selektivno zauzima samo distalni dio probavnog trakta te je na ovom mjestu relativno stalan, obično ne uzrokuje bolesti i na neki način je koristan za domaćina.

1.6.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa pokazao se kao važan patogen u narušavanju zdravstvenog stanja ljudi i njihovog oporavka u protekla dva desetljeća. Uzrokuje između 10- 20% infekcija u većini bolnica. Infekcije bakterijom *Pseudomonas* česte su kod bolesnika s opekotinama, oboljelima od cistične fibroze, akutne leukemije, transplantata i ovisnika o narkoticima (Bodey i sur., 1983). Pacijenti koji su hospitalizirani tijekom duljeg razdoblja često imaju povećan rizik od razvoja infekcije od ove bakterije. Ozbiljnije infekcije koje može prouzročiti ova bakterija su: maligni vanjski otitis, endoftalmitis, endokarditis, meningitis i upala pluća. Oporavak od infekcije bakterijom *Pseudomonas* ovisi o težini bolesnikove temeljne bolesti. Posljednjih godina, *Pseudomonas* postao je rezistentan na mnoge lijekove s antipseudomonalnom aktivnosti, uključujući penicilin, cefalosporin i druge. Jedno istraživanje pokazalo je da najveća osjetljivost ove bakterije na kolistin i meropenem, a najmanja na cefepim (Stanković i sur., 2015).

U istraživanju o najčešćim infekcijama u bolnicama utvrđeno je da je ovaj organizam uzrokovao 343 infekcija po 100 000 otpuštenih pacijenata ili 12% svih prijavljenih infekcija. Najčešće su bile u pitanju infekcije mokraćnog sustava (10%), infekcije rana (9%), infekcije respiratornog trakta (17%) te 11% druge infekcije čiji je uzrok *Pseudomonas* (Bennet, 1974).

P. aeruginosa ima vanjsku membranu, peptidoglikanski sloj i citoplazmatsku membranu. Najudaljeniji sloj je polisaharidni sloj konzistencije poput sluzi. Svaka komponenta organizma

ima virulentna svojstva i ima različite učinke na obrambene mehanizme domaćina. Vanjska membrana od iznimne je važnosti za rast i razvoj ovog organizma na mjestima zaraze. Također, kontrolira adheziju i formiranje mikrokolonija, dok druge komponente kontroliraju prolaz hranjivih tvari i isključenje humoralnih i sintetičkih antibakterijskih agensa. Virulentni faktori ove bakterije smatraju se: ekstracelularne proteaze koje uzrokuju oštećenje stanica, eksotoksin A toksičan za makrofage, fosfolipaze, polisaharidi toksični za neutrofile, lipopolisaharidi i lipid A (Rolsten i Bodey, 1992).

1.6.4. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je gram-pozitivna bakterija kuglastog oblika, a često je nalazimo na sluznici nosa, u respiratornom traktu te na koži. Fakultativni je anaerob koji može rasti bez prisustva kisika. Iako *S. aureus* nije uvijek patogen, čest je uzrok infekcija kože i respiratornih infekcija te trovanja hranom. *Staphylococcus aureus* (MRSA) je meticilin rezistentna bakterija koja uzorkuje infekcije u bolnicama kod pacijenata već desetljećima. U Americi se godišnje zabilježi 100 000 oboljelih od infekcije *S. aureusom* te čak 20 000 smrtnih slučajeva (Klevens i sur., 2007). Obično se nalazi u nosu i na koži zdravih ljudi i može uzrokovati infekciju s kliničkim manifestacijama u rasponu od pustule do sepse i smrti. Većina ljudi kolonizirana je sa *S. aureus*, no njezina prisutnost u i na tijelu ne mora uzrokovati bolesti. Kada se inficiraju, pojedinci mogu ostati kolonizirani na duži period i biti potencijalni prijenosnici ove bakterije. Rizikni faktor su ljudi oboljeli od šećerne bolesti, kirurški operirani ljudi, ljudi s čestom ili dugotrajnom primjenom antibiotika, uvođenje katetera i sondi, starije osobe, hospitalizacija na dulji period, intravenozna korištenja sredstava, morbidna pretilost te kronični bolesnici.

1960-ih i 1980-ih godina zbog prekomjerne upotrebe antibiotika, ova bakterija postala je najprije rezistentna na meticilinske i penicilinske antibiotike (Wang i sur., 2013). Danas, MRSA je rezistentna na većinu uobičajenih beta laktamskih antibiotika, kao što su eritromicin, klindamicin, aminoglikozidi, fluorokinoloni i rifampin. Najčešće se liječi vankomicinom, no zabilježen je porast rezistencije i na ovaj antibiotik, kao i potpuna rezistencija kod soja *Staphylococcus aureus* rezistentnog na vankomicin (VRSA) (CDC, 2002).

Ova bakterija ne smije biti prisutna u vodi za piće, gotovom proizvodu kao niti u vodi za kupanje i rekreaciju. Uzorkovanjem 10 različitih vodenih staništa, pokazalo se da nakon višestrukog tretiranja dezinficijensima najveći postotak preživljavanja ima izolat iz broskog

spremnika, a najmanji postotak izolat uzet iz boćate vode rijeke Cetine (Kovačić i sur., 2018). Izolat iz brodskog spremnika u više navrata je bio izoliran nakon dezinfekcije klorom. Može se pretpostaviti da je ovaj soj razvio različite mehanizme prilagodbe na nepovoljne uvjete okoliša koji bi mogli uključivati i oligotrofiju. Smatra se da je povećani salinitet na mjestu uzorkovanja izolata iz boćate vode rijeke Cetine imao utjecaj na slabiju prilagođenost na uvjete oligotrofije i najmanji postotak preživljavanja.

1.6.5. Metode određivanja antibakterijske aktivnosti

Ljekovite biljke stoljećima se koriste kao lijekovi za liječenje ljudskih bolesti jer sadrže komponente terapijskih vrijednosti. Prihvatanje tradicionalne medicine kao alternativnog oblika liječenja i razvitka rezistencije mikroba na velik broj postojećih antibiotika, uzrokovalo je veću usmjerenost istraživanja na farmakologijski učinak ljekovitog bilja kao što su kadulja, ružmarin i dr. (Hammer i sur., 1999).

Antibakterijska ispitivanja trebala bi biti jednostavna, brza, reproduktivna, financijski nezahtjevna i iskoristiva. Postoji više metoda koje se koriste za određivanje antibakterijske aktivnosti biljnih pripravaka i uzoraka. Razlikujemo difuzijske i dilucijske metode. Difuzijskim metodama pripadaju: disk difuzijska metoda i difuzijska metoda bušenjem kanalića u agaru, a dilucijskim metodama pripadaju: agar dilucijska metoda, tankoslojna kromatografija, E test i „*Time-kill*“ metoda.

Difuzijske metode su atraktivne zbog svoje jednostavnosti i niske cijene, no kao i sve druge metode s agarom, i ova metoda zahtjeva vrijeme i rad. Disk difuzijska metoda temelji se na postavljanju diska s antibakterijskim sredstvom na agaru s prethodno inokuliranom bakterijom. Postupak je takav da se u Petrijevu zdjelicu izlije bakterijom inokuliran Muller Hinton agar (Kelmanson i sur., 1999). Diskovi natopljeni određenim koncentracijama antibakterijskim sredstvom se prenose na površinu agra poslije čega slijedi inkubacija pri 37°C u trajanju nekoliko sati. Broj sati varira ovisno o kojem antibakterijskom sredstvu je riječ u eksperimentu. Nakon inkubacije mjeri se promjer zone inhibicije rasta bakterija. Jedan od nedostataka ove metode su moguće pogreške prilikom mjerenja zone inhibicije rasta. Prema Janssen i sur. (1987) ova metoda se ne bi trebala koristiti za ispitivanje eteričnih ulja zbog njihove hidrofobnosti i nemogućnosti jednake difuzije tih tvari kroz medij.

Disk difuzijska metoda ne može uvijek biti pouzdana metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti ljekovitog bilja, posebice kod ispitivanja manje polarnih komponenti (Klančnik i sur., 2010). Difuzijska metoda bušenjem kanalića u agaru slična je disk difuzijskoj metodi. Sterilnim bušačem rupa prave se kanalići različitih promjera u inokuliranom agaru, no najčešće od 6 do 8 mm (Balouri i sur., 2016). U izbušene kanaliće pipetom se dodaju ranije pripremljene koncentracije ekstrakata. Nakon 24 h inkubacije pri 37°C, mjeri se promjer oko kanalića, odnosno zona inhibicije u milimetrima. Kao i disk difuzijska metoda, ni ova metoda nije pogodna za testiranje nepolarnih uzoraka.

Za razliku od disk difuzijske metode, metoda razrjeđivanja agara pokazala se kao pouzdanija metoda jer se može detektirati antibakterijska aktivnost i pri manjim koncentracijama.

Tankoslojna kromatografija je metoda koja se koristi za bioaktivne komponente izolirane na TLC podlogama koja povezuje te komponente s antibakterijskom aktivnošću (Ahmad i sur., 2016). Položaj zona na kromatogramu određen je R_f - vrijednošću za svaki uzorak. R_f vrijednost karakteristična je za pojedinu tvar u točno određenom kromatografskom sustavu. R_f vrijednost je faktor zadržavanja (retencijski faktor) odnosno veličina migracije u odnosu na otapalo. E test je kvantitativna metoda koja se temelji na difuziji prethodno formiranog antimikrobnog gradijenta sačinjenog od plastičnih trakica položenih na inokulirani agar, a vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije se bilježe izravno s ljestvice na vrpci na mjestu gdje zona inhibicija presijeca traku (Huang i sur., 1992).

1.6.6. Metoda minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Metoda minimalne inhibitorne koncentracije pripada u dilucijske metode koje se mogu izvoditi na tekućoj ili krutoj podlozi. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) definira se kao najniža koncentracija antimikrobnih komponenti koja će inhibirati vidljivi rast mikroorganizama nakon inkubacije i subkulture na mediju bez antibiotika. MIC se koristi u dijagnostičkim laboratorijima uglavnom za potvrdu rezistencije, ali i za istraživanje novih antimikrobnih spojeva (Andrews, 2001). Također, korisna je kao monitoring metoda za razvoj rezistencije antibiotika (Wiegand i Hancock, 2008). Ispitivani uzorak se serijski razrijedi, nanese se na bakteriološku podlogu (bujon), podloga u pravilu ne treba biti dodatno tretirana s antibiotikom te se potom nanese inokulum određene bakterije. Period inkubacije traje do 24 sata pri

temperaturi od 37°C nakon čega se golim okom prati zamućenje, odnosno porast kolonija na podlozi (Zgoda i Porter, 2001).

Uz mjerenje antibakterijske aktivnosti, koriste se još termini minimalna baktericidna koncentracija (MBK), koja označava minimalnu koncentraciju potrebnu za potpuno uništenje svih organizama na podlozi, te bakteriostatična koncentracija koja označava minimalnu koncentraciju potrebnu za zaustavljanje rasta i razvoja bakterija, no ne i uništenje bakterija. Najbolji pokazatelj inhibicije određene bakterije je omjer MBC/MIC, jer razvoj kolonija na podlozi može biti nepouzdan zbog toga što koncentracija ekstrakta ili antibiotika može pasti ispod koncentracije koja je prvotno nanescena na podlogu ili medij (Heifets i sur., 1992).

1.7. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi kako različiti uvjeti ekstrakcije superkričnim CO₂ utječu na ukupnu antioksidacijsku i antibakterijsku aktivnost ekstrakata listova kadulje (*Salvia officinalis* L.) određivanjem ukupne koncentracije fenolnih spojeva, ukupne antioksidacijske i antibakterijske aktivnosti na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal

Ovaj rad je proveden na listovima kadulje (*Salvia officinalis* L.). Uzorci kadulje dobiveni su iz ljekarne iz Mostara, Bosna i Hercegovina (Vextra d.o.o.) u proljeće 2016. Vlažnost listova kadulje određena je prema AOAC službenom metodom 925.40 te je iznosila $12,42 \pm 0,06\%$. Uzorci su prosijani kroz okomito vibracijsko sito (Labortechnik GmbH, Ilmenau, Njemačka). Sva mjerenja su obavljena u triplicatu te su uzorci podvrgnuti ekstrakciji.

2.2. Ekstrakcija uzoraka i kemijska karakterizacija ekstrakata

CO₂ korišten za ekstrakciju superkritičnim fluidom bio je čist 99,97% (w/w). Sva otapala su analitički gradirana i uzeta iz J. T. Baker (PA, SAD). Ekstrakcije su provedene u različitim uvjetima prema Box-Behnken dizajnu (BBD). Dinamični način ekstrakcije za SFE je korišten gdje SC-CO₂ neprekidno prolazi kroz uzorak. Masa biljnog materijala u ekstraktoru (50 g) i vrijeme ekstrakcije (90 min) bili su konstantni tijekom pokusa. Protok CO₂ izmjeren je pomoću Matheson FM-1050 (E800). Svaki ciklus ekstrakcije trajao je 90 min jer duže vrijeme ekstrakcije nije značajno povećalo prinos ekstrakta. Dobiveni prinos ekstrakta određen je vaganjem s preciznošću od $\pm 0,0001$ g. Prinos ekstrakcije izražen je kao% (g ekstrakta/100 g uzorka).

Tablica 1. Utjecaj temperature, tlaka i protoka CO₂ na prinos ekstrakcije

Ciklus	Tlak (Mpa)	t (°C)	Stopa protoka CO₂ (kg/h)	Prinos (%)
1	10	40	2	0,659
2	20	40	1	3,385
3	20	40	3	4,026
4	10	50	3	1,144
5	20	50	2	3,768
6	30	50	3	7,361
7	30	50	1	5,238
8	20	60	3	5,477
9	10	50	1	0,242

10	10	60	2	0,365
11	20	50	2	3,305
12	30	60	2	4,316
13	20	50	2	2,552
14	30	40	2	3,803
15	20	60	1	4,891
16	20	50	2	4,528

2.3. Određivanje koncentracije ukupnih fenola –TPC (eng. *Total Phenolic Concentration*)

2.3.1. Folin-Ciocalteu metoda

Korištena je spektrofotometrijska metoda naziva Folin–Ciocalteu metoda radi određivanja ukupne koncentracije fenolnih spojeva. Ova metoda temelji se na smjesi fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline, odnosno poznatijeg imena Folin–Ciocalteu reagensa, s fenolnim spojevima u umjereno alkalnim uvjetima pri čemu dolazi do razvitka plave boje.

Postupak:

U reakcijsku smjesu dodano je 0,5 ml vodom razrijeđenog ekstrakta kadulje (1:2) i 2,5 ml destilirane vode te je potom dodan Folin-Ciocalteu reagens volumena 0,5 ml. Prije dodavanja reagensa u reakcijsku smjesu, reagens je razrijeđen s destiliranom vodom omjera 1:10. Reakcijska smjesa je vorteksirana, poslije 3 minute dodano je najprije 2 ml zasićene otopine Na_2CO_3 , a potom je dodana destilirana voda do 10 ml. Uzorci su dobro promiješani te su potom stavljeni u tamu 90 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon 90 minuta mjerena je apsorbancija pri 700 nm. Na isti način pripremljena je i slijepa proba gdje je voda zamijenila vodom razrijeđeni ekstrakt kadulje. Radila su se tri ponavljanja svakog uzorka, a rezultati su dobiveni prema kalibracijskoj krivulji galne kiseline i izraženi su u miligramima ekvivalenata galne kiseline (GAE) po gramu kadulje.

2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

2.4.1. DPPH metoda

U ovom istraživanju za određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti uzoraka kadulje korištena je modificirana DPPH metoda prema Shih i sur. (2017).

Postupak:

750 μL razrijeđene otopine ekstrakata kadulje (konačna koncentracija $25 \mu\text{g mL}^{-1}$) pomiješano je sa 750 μL metanolne otopine DPPH radikala (0,2 mM) kako bi konačna koncentracija DPPH bila 0,1 mM. Reakcijska smjesa je vorteksirana i držana u tami 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta, mjerena je apsorbancija pri 517 nm. Kao standard korištena je askorbinska kiselina, a za kontrolu korištena je 0,1 mM otopina DPPH. Uzorci su mjereni u tri ponavljanja te je sposobnost hvatanja DPPH radikala izračunata prema:

$$\% \text{ hvatanja DPPH radikala} = ((A_b + A_s - A_m) / A_b) * 100$$

gdje su: A_s – apsorbancija otopine ekstrakta 517 nm (slijepa proba),

A_m – apsorbancija 0,1 mM otopine smjese ekstrakata i DPPH radikala pri 517 nm,

A_b - apsorbancija 0,1 mM otopine DPPH radikala pri 517 nm

2.5. Određivanje antibakterijske aktivnosti

2.5.1. Hranjiva podloga

U ovom istraživanju korištena je neselektivna čvrsta hranjiva podloga, bujon Müller Hinton, za nasadivanje bakterije. Za hranjivu podlogu volumena 500 mL potrebno je izvagati 11 g Müller Hintona, 2,5 g kvasca i 7,5 g agara. Zatim je potrebno dodati 5 mL glicerola te do 500 mL 0,25 M otopine fosfatnog pufera PBS (eng. *Phosphate buffer saline*) s podešenom pH vrijednosti na 7,4. Smjesu je potrebno promiješati te kuhati 10 minuta. Nakon kuhanja podloge, potrebno je autoklavirati 15 minuta pri 121°C te izliti u Petrijeve posude. Dodatnim hlađenjem, podloge se stvrdnjavaju te se na taj način omogućuje nasadivanje bakterijskih kultura. Podloge s nasadenim bakterijama inkubiraju se pri 37°C tijekom noći (16 sati).

Također je korišten i tekući Müller Hinton bujon za mikrotitarske pločice. Za pripremu bujona volumena 1 L, potrebno je otopiti 22 g Müller Hintona u 1 L hladne destilirane vode, zatim zagrijati smjesu do potpunog otapanja te autoklavirati na 121°C tijekom 15 minuta. Nakon obavljenog postupka smjesu je potrebno ohladiti i čuvati u hladnjaku.

2.5.2. Izvor bakterijskih organizama i određivanje gustoće bakterijske suspenzije

U ovom radu korištena su četiri humana patogena dobivena iz kliničkih uzoraka s Mikrobiološkog odjela Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Osijeku. Korištene su dvije gram-pozitivne bakterije: *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* te dvije gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterije su čuvane u hladnjaku u dubokom agaru.

Gustoća bakterijskih suspenzija određena je prema McFarlandovom standardu čiji je princip uspoređivanje sa suspenzijom poznatog zamućenja, a koja se nalazi u ampuli jednakog promjera. Uporaba McFarland standarda neophodna je pri standardizaciji mikrobioloških metoda, a standardi su sukladni brojevima na McFarland skali. U ovom istraživanju korišten je Standard 0,5 kod kojeg koncentracija bakterija iznosi $150 \times 10^6/\text{ml}$. Apsorbancija bakterijske suspenzije mjerena je u sterilnoj fiziološkoj otopini pri 600 nm.

Tablica 2. Vrijednost standarda na McFarland skali

Standard	Koncentracija bakterija¹ x10⁶/ml	Teoretska optička gustoća² na 550 nm
0,5	150	0,125
1	300	0,25
2	600	0,50
3	900	0,75
4	1200	1,00
5	1500	1,25

¹Koncentracija bakterija ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost.

²Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći bakterijske suspenzije.

2.5.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata odrađeno je na sterilnim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica (TPP Techno Plastic Products AG Trasadingen, Švicarska) s ukupnim volumenom od 200 μL . U svaku jažicu dodano je 100 μl sterilnog Müller Hinton bujona. U prvu jažicu prvog reda pločice je dodano 100 μl otapala (negativna kontrola). Prva jažica drugog reda pločice predstavljala je pozitivnu kontrolu pa je dodano 100 μl razrijeđenog antibiotika, u ovom istraživanju gentamicina (BioChemica, Njemačka). U svaku prvu jažicu u sljedećim redovima dodano je po 100 μl pojedinog ispitivanog uzorka ekstrakata kadulje. Nakon izrade serijskih razrjeđenja ispitivanih uzoraka ($250\text{-}0,122 \mu\text{g mL}^{-1}$), u svaku je jažicu dodano 20 μl neposredno pripremljene bakterijske suspenzije. Odnosno, inokulirano je 300×10^3 bakterija (gustoća korištene bakterijske suspenzije je 0,5 na McFarland skali, što iznosi 150×10^6 bakterija mL^{-1}).

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije tako priređene pločice inkubirane su na 37°C tijekom 18 sati. Nakon inkubacijskog perioda u svaku je jažicu dodano 50 μL trifetil tetrazolij klorida (TTC eng. *2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride*). TTC reagens se koristi kao indikator reducirajućih tvari u podlozi što je vidljivo prema promjeni boje medija. U našem istraživanju korišten je TTC reagens otopljen u sterilnoj fiziološkoj otopini u koncentraciji 0,5 mg mL^{-1} . Promjene nastale rastom, očitane su nakon dodavanja TTC reagensa i dodatne inkubacije u trajanju tri sata na 37°C . Rezultati su očitavani golim okom. Naime, promjena boje u ružičastu uz pojavu zamućenja ili taloga na dnu mikrotitarske pločice znak je rasta bakterija. Pojava taloga i promjena boje dodatno su uspoređivani s kontrolnim jažicama. Najveće razrjeđenje ekstrakta pri kojem nije došlo do pojave zamućenja predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju pojedinog uzorka.

Za određivanje stope inhibicije rasta i IC_{50} (koncentracije potrebne za 50 % inhibicije rasta) tako priređene pločice inkubirane su na 37°C tijekom 24 sati. Rast bakterija praćen je mjerenjem optičke gustoće (OD) pri 600 nm na 0 h (OD_1) i 24 h (OD_2) pomoću čitača Tecan Spark Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG, Švicarska). Inhibicija rasta određena je sljedećom formulom:

$$\text{Inhibicija rasta (\%)} = ((\text{OD}_{\text{kontrola}} - \text{OD}_{\text{kor}}) / \text{OD}_{\text{kontrola}}) \times 100$$

Gdje su: $\text{OD}_{\text{kontrola}}$ pozitivne kontrole pri 24 h

$$\text{OD}_{\text{kor}} = \text{OD}_2 - \text{OD}_1.$$

IC₅₀ određena je sljedećom formulom:

$$IC_{50} = 10((\text{Log}(A) - \text{Log}(B)) \times ((C - 50)/(C - D)) + \text{Log}(B))$$

Gdje su: A- koncentracija pri kojoj je %inhibicije rasta < 50%

B- koncentracija pri kojoj je %inhibicije rasta > 50%

C- %inhibicije rasta koji je > 50%

D- %inhibicije rasta koji je < 50%

2.6. Statistička obrada podataka

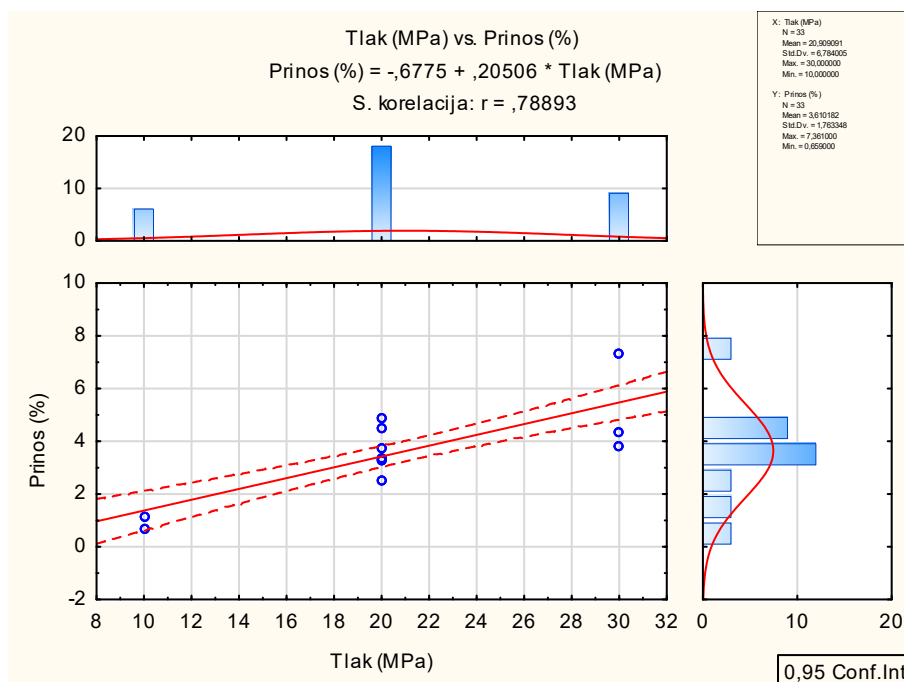
Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilk testom. Obzirom na to da podaci ne slijede normalnu raspodjelu, za usporedbu ekstrakata kadulje prema koncentraciji ukupnih fenola, antioksidacijskoj i antibakterijskoj aktivnosti korišten je neparametarski Spearmanov koeficijent korelacije. Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkom programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od $\alpha=0,05$.

3. REZULTATI

Analizom rezultata prikazan je utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije superkričnim CO₂ na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost te antibakterijsko djelovanje ekstrakata kadulje. U Tablici 3 prikazane su korelacije varijabli, a prema Spearmanovom koeficijentu crveno označene korelacije su statistički značajne vrijednosti, a značajnost koeficijenta korelacije je $p < 0,05$. Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije dobivene vrijednosti prinosa ekstrakcije su vrlo dobro do izvrsno povezane s varijablom tlaka (Slika 6, $r = 0,79$; $p < 0,05$).

Tablica 3. Prikaz korelacijskih odnosa uvjeta i parametara u provedenom istraživanju

Varijabla	Tlak (Mpa)	Temperatura (°C)	Stopa protoka CO ₂ (kg/h)	Prinos (%)	TPC (mg _{GAE} g suhe tvari ⁻¹)	DPPH (%)
Tlak (Mpa)	1,000000	0,222222	-0,000000	0,788931	0,411951	-0,005860
Temperatura (°C)	0,222222	1,000000	0,000000	0,389511	-0,542977	-0,618109
Stopa protoka CO ₂ (kg/h)	-0,000000	-0,000000	1,000000	0,019882	0,065152	0,147244
Prinos (%)	0,788931	0,389511	0,019882	1,000000	0,178646	-0,176465
TPC (mg _{GAE} g suhe tvari ⁻¹)	0,411951	-0,542977	0,065152	0,178646	1,000000	0,840847
DPPH (%)	-0,005860	-0,618109	0,147244	-0,176465	0,840847	1,000000



Slika 7. Prikaz povezanosti tlaka (MPa) i prinosa ekstrakcije (%) ($r=0,78893$; $p<0,05$)

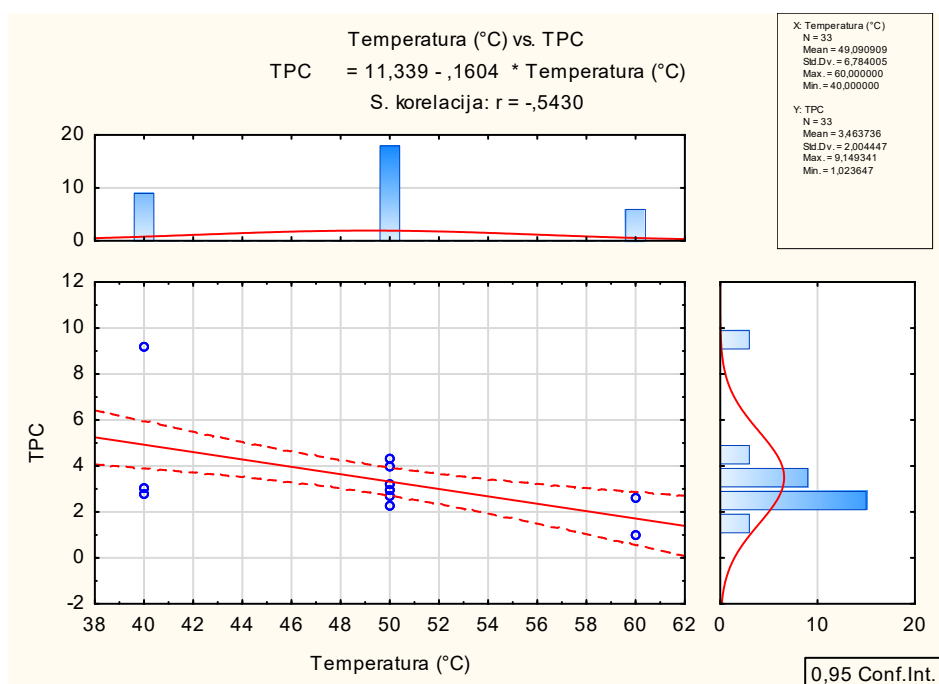
3.1. Utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije superkritičnim CO₂ na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata

Pri ekstrakciji superkritičnim CO₂ najviša koncentracija ukupnih fenolnih spojeva iznosila je 9,15 mgGAE/g u uvjetima ekstrakcije pri 40°C tijekom 90 min, pri tlaku 30 MPa te stopi protoka CO₂ 2 kg h⁻¹. Najniža koncentracija ukupnih fenolnih spojeva iznosila je 1,02 u uvjetima ekstrakcije pri 60°C tijekom 90 min, pri tlaku od 30 MPa te stopi protoka CO₂ 2 kg h⁻¹ (Tablica 4, uzorak 12). Srednja vrijednost ukupnih fenolnih spojeva u ovom istraživanju iznosi 3,46 mgGAE/g. Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije dobivene vrijednosti su slabo povezane s varijablom tlaka (Tablica 3, $r=0,4119$; $p<0,05$). Međutim, prema Spearmanovom koeficijentu korelacije dobivene vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva (Slika 8, $r= -0,5429$; $p<0,05$) i antioksidacijska aktivnost (Slika 9, $r= -0,618$; $p<0,05$) su umjereno negativno povezane s varijablom temperature.

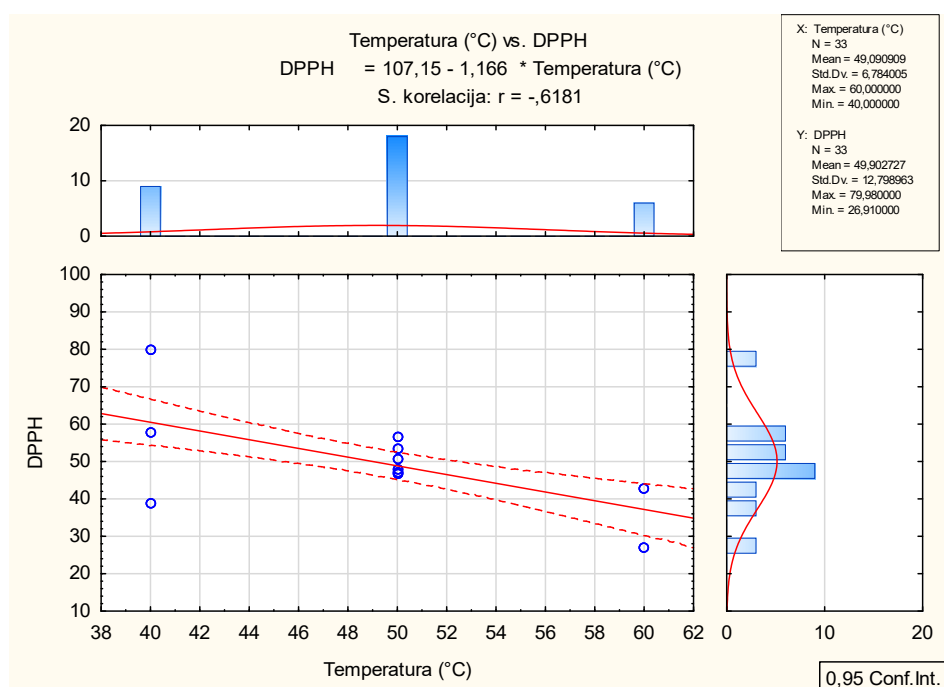
Tablica 4. Ukupni sadržaj fenolnih spojeva superkritičnih ekstrakata listova kadulje izražen kao $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{suhe tvari}}^{-1}$ i DPPH aktivnost superkritičnih ekstrakata listova kadulje pri koncentraciji $25\mu\text{g mL}^{-1}$

Uzorak	Ukupni sadržaj fenolnih spojeva ($\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{suhe tvari}}^{-1}$)	DPPH %
1	2,79±0,06	57,71±0,33
2	3,08±0,05	38,99±0,32
3	NO	NO
4	2,26±0,01	46,87±3,60
5	3,97±0,13	53,53±3,37
6	4,32±0,03	47,05±1,77
7	NO	NO
8	NO	NO
9	NO	NO
10	NO	NO
11	2,72±0,07	56,72±0,65
12	1,02±0,02	26,91±0,91
13	3,17±0,01	48,01±0,86
14	9,15±0,09	79,98±0,68
15	2,65±0,07	42,62±1,69
16	2,96±0,01	50,54±1,98

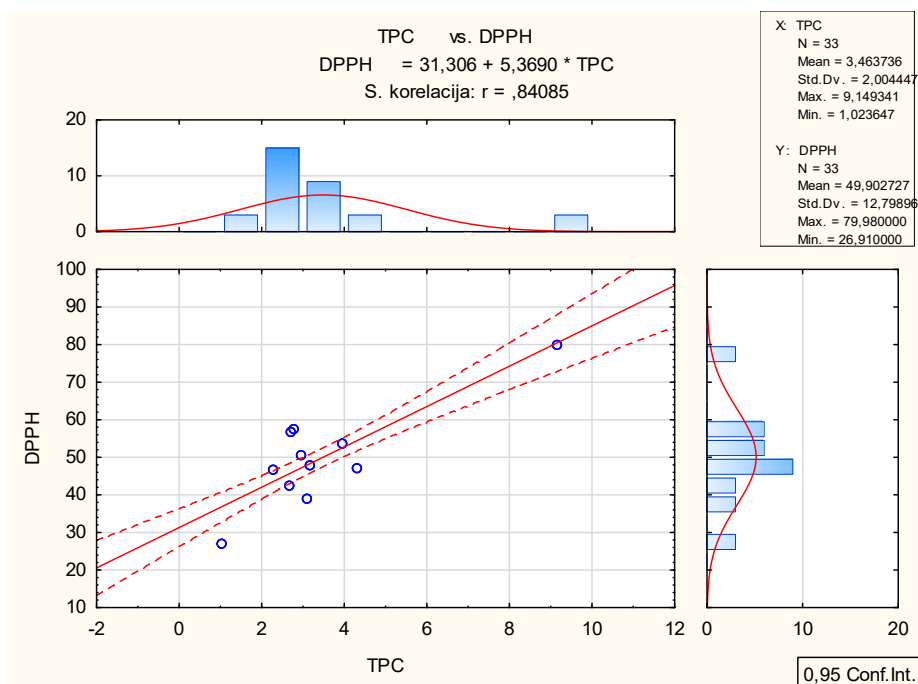
NO: nije određeno



Slika 8. Prikaz povezanosti temperature (°C) i ukupnog sadržaja fenolnih spojeva (mg_{GAE} g_{suhe tvari}⁻¹) TPC, ($r=-0,54$; $p<0,05$)



Slika 9. Prikaz povezanosti temperature (°C) i antioksidacijske aktivnosti (%) DPPH, ($r=-0,62$; $p<0,05$)



Slika 10. Prikaz povezanosti ukupnog sadržaja fenolnih spojeva ($\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{suhe tvari}}^{-1}$) TPC i antioksidacijske aktivnosti (%) DPPH, ($r=0,8408$; $p<0,05$)

Na Slici 10 vidljiva je povezanost ukupnih fenolnih spojeva (TPC) i ukupne antioksidacijske aktivnosti (DPPH). Prema Spearmanovom koeficijentu korelacije dobivene vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva su vrlo dobro do izvrsno povezane s antioksidacijskom aktivnošću ($r=0,84$; $p<0,05$).

3.2. Utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije superkritičnim CO_2 na antibakterijsko djelovanje

Superkritični ekstrakti listova kadulje testirani su na *in vitro* antibakterijsko djelovanje protiv *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus*. Rezultati MIC i IC_{50} prikazani su u Tablici 5.

Kao što je prikazano u Tablici 5, svi su ispitivani ekstrakti pokazali dobro antibakterijsko djelovanje protiv *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus*. Međutim, ekstrakti su bili aktivniji protiv gram-pozitivnih bakterija nego protiv gram-negativnih bakterija. Vidljivo je i da su vrijednosti MIC u skladu s vrijednostima IC_{50} , ali nisu tako precizne.

Tablica 5. Usporedba minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i IC₅₀ superkritičnih ekstrakata listova kadulje protiv *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* (µg mL⁻¹)

Uzorak	MIC (µg mL ⁻¹)				IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
1	31,25	31,25	15,625	31,25	29,53± 0,16	28,54± 0,05	12,45± 0,08	17,17± 0,09
2	31,25	31,25	15,625	31,25	27,89± 0,07	26,28± 1,76	12,69± 0,07	23,90± 0,10
3	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
4	31,25	31,25	15,625	15,625	27,03 ± 0,55	25,75 ± 0,52	13,97 ± 0,07	14,53 ± 0,04
5	31,25	31,25	15,625	31,25	31,18± 0,05	16,33±0,26	12,77± 0,06	22,75± 0,13
6	31,25	31,25	15,625	15,625	31,08± 0,08	17,82± 0,39	10,82± 0,02	14,61± 0,08
7	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
8	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
9	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
10	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
11	31,25	31,25	15,625	15,625	28,43± 0,36	22,23±0,61	12,70± 0,08	14,10± 0,10
12	62,50	31,25	15,625	15,625	39,68± 0,21	22,36± 0,79	14,02± 0,16	14,12± 0,18
13	62,50	31,25	15,625	15,625	37,80± 0,83	23,78± 0,44	13,18± 0,08	12,46± 0,10
14	31,25	31,25	15,625	15,625	24,85± 0,08	23,57± 1,21	12,51± 0,11	15,04± 0,13
15	31,25	31,25	15,625	15,625	20,29± 0,62	27,98± 1,24	13,01± 0,16	13,75± 0,04
16	62,50	31,25	15,625	15,625	40,44± 0,19	23,61± 0,53	13,43± 0,04	17,91± 0,67
G	0,976	0,976	1,953	3,906	0,58±0,10	0,91± 0,07	1,83±0,01	3,06±0,06

ND nije određeno
G-Gentamicin

Minimalna inhibitorna koncentracija dobivena uzorkovanjem *E. coli* iznosi 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dobivena kod osam različitih uzoraka (Tablica 5, uzorci 1, 2, 4, 5, 6, 11, 14 i 15). Najveća koncentracija iznosi 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod tri uzorka dobivena različitim uvjetima ekstrakcije (Tablica 5, uzorci 12, 13 i 16). Najveći IC_{50} iznosi 40,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod uzorka dobivenog pri 50°C tijekom 90 min, pri tlaku 20 MPa te stopi CO_2 2 kg h^{-1} . Najmanji IC_{50} iznosi 20,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod uzorka dobivenog u uvjetima ekstrakcije pri 60°C tijekom 90 min, pri tlaku od 20 MPa i stopi CO_2 1 kg h^{-1} (Tablica 5, uzorak 15).

Minimalna inhibitorna koncentracija dobivena uzorkovanjem *P. aeruginosa* iznosi 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod svih uzoraka dobivenih pri različitim uvjetima ekstrakcije, što je ujedno i najveća MIC izmjerena kod ove bakterije. Najveći IC_{50} kod *P. aeruginosa* iznosi 28,54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod uzorka dobivenog pri 40°C tijekom 90 min, pri tlaku od 10 MPa i stopi CO_2 2 kg h^{-1} . Najmanji IC_{50} iznosi 16,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod uzorka dobivenog u uvjetima ekstrakcije pri 50°C tijekom 90 min, pri tlaku od 20 MPa i stopi CO_2 2 kg h^{-1} (Tablica 5, uzorak 5).

Kod *B. subtilis* minimalna inhibitorna koncentracija iznosi 15,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$, koja je ujedno i najveća izmjerena MIC (Tablica 5). Najveći IC_{50} iznosi 14,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod uzorka dobivenog pri 60°C tijekom 90 min, pri tlaku od 30 MPa i stopi CO_2 2 kg h^{-1} (Tablica 5, uzorak 12). Najmanji IC_{50} iznosi 10,82 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod uzorka dobivenog u uvjetima ekstrakcije pri 50°C tijekom 90 min, pri tlaku od 30 MPa i stopi CO_2 3 kg h^{-1} .

Najniža minimalna inhibitorna koncentracija dobivena uzorkovanjem *S. aureus* bila je 15,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod osam uzoraka dobivenih različitim uvjetima ekstrakcije. Najveća MIC vrijednost iznosi 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod tri uzorka dobivenih različitim uvjetima ekstrakcije (Tablica 5, uzorci 1, 2 i 5). Najmanji IC_{50} iznosi 12,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod uzorka dobivenog pri 50°C tijekom 90 min, pri tlaku od 20 MPa i stopi CO_2 2 kg h^{-1} . Najveći IC_{50} iznosi 23,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod uzorka dobivenog pri 40°C tijekom 90 min, pri tlaku od 20 MPa i stopi CO_2 1 kg h^{-1} (Tablica 5, uzorak 2).

Kod bakterije *E. coli* pri 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ najveća inhibicija rasta je 99,05 \pm 1,19%, a najmanja 93,04 \pm 0,19%. Pri 15,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ najmanja inhibicija rasta je 14,45 \pm 1,18%, a najveća 40,72 \pm 1,30% što je prikazano u Tablici 6. Kod *P. aeruginosa* pri 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ najveća inhibicija rasta je 99,5 \pm 0,15%, a najmanja 91,42 \pm 1,56%, dok pri 15,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ najveća inhibicija rasta iznosi 49,63 \pm 0,08%, a najmanja 31,53 \pm 3,22% (Tablica 6). U slučaju *B. subtilis* pri 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ najveća inhibicija rasta iznosi 99,48 \pm 0,10%, a najmanja 97,39 \pm 0,42%. Pri 15,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ najmanja inhibicija rasta je 60,99 \pm 1,31%, dok je najveća 76,79 \pm 0,88% (Tablica 6). Za bakteriju

S. aureus najmanja inhibicija rasta pri 62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ je 97,00 \pm 0,86%, a najveća 98,32 \pm 0,06%. Pri 15,625 $\mu\text{g ml}^{-1}$ najmanja inhibicija rasta je 21,97 \pm 1,17%, a najveća 74,93 \pm 0,30% (Tablica 6).

Tablica 6. Inhibicija rasta bakterija superkritičnim ekstraktima listova kadulje protiv bakterija *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*

Uzorak	Inhibicija rasta %							
	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>	
	62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15,625 $\mu\text{g ml}^{-1}$	62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15,625 $\mu\text{g ml}^{-1}$	62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15,625 $\mu\text{g ml}^{-1}$	62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15,625 $\mu\text{g ml}^{-1}$
1	98,34 \pm 0,35	16,73 \pm 0,51	96,62 \pm 1,84	31,93 \pm 3,22	98,84 \pm 0,29	72,19 \pm 0,22	98,32 \pm 0,06	46,33 \pm 0,15
2	93,04 \pm 0,19	20,10 \pm 0,59	91,42 \pm 1,56	35,39 \pm 0,57	98,26 \pm 0,44	71,80 \pm 0,83	97,56 \pm 0,22	21,97 \pm 1,17
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	97,17 \pm 0,28	14,45 \pm 1,18	97,36 \pm 0,30	38,30 \pm 0,79	99,48 \pm 0,10	61,62 \pm 0,43	98,31 \pm 0,12	57,57 \pm 0,36
5	95,82 \pm 0,28	23,91 \pm 0,34	93,30 \pm 0,65	49,41 \pm 0,22	97,39 \pm 0,42	68,05 \pm 0,74	96,57 \pm 0,87	32,24 \pm 0,16
6	99,05 \pm 1,19	39,22 \pm 0,06	95,91 \pm 0,96	49,63 \pm 0,08	98,33 \pm 0,38	76,79 \pm 0,88	97,80 \pm 0,57	55,47 \pm 0,77
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	95,75 \pm 1,62	28,04 \pm 1,18	95,07 \pm 1,29	44,10 \pm 1,02	98,88 \pm 0,22	72,31 \pm 0,39	97,74 \pm 0,19	56,69 \pm 0,59
12	94,96 \pm 0,35	20,21 \pm 3,00	97,78 \pm 1,37	31,93 \pm 3,22	99,00 \pm 0,22	60,99 \pm 1,31	97,98 \pm 0,09	60,77 \pm 1,56
13	97,41 \pm 0,82	26,80 \pm 3,62	98,07 \pm 0,41	41,50 \pm 3,88	98,72 \pm 0,22	67,30 \pm 0,10	97,37 \pm 0,66	74,93 \pm 0,30
14	97,03 \pm 0,24	37,76 \pm 0,25	99,15 \pm 0,15	39,71 \pm 2,95	99,28 \pm 0,18	71,42 \pm 0,64	97,55 \pm 0,18	52,30 \pm 0,60
15	97,47 \pm 1,10	40,72 \pm 1,30	97,45 \pm 0,70	42,32 \pm 2,04	99,41 \pm 0,45	69,85 \pm 0,65	98,24 \pm 0,29	61,11 \pm 0,29
16	96,77 \pm 0,41	28,47 \pm 3,18	97,26 \pm 2,11	40,38 \pm 1,19	98,81 \pm 0,11	65,04 \pm 0,58	97,00 \pm 0,86	46,29 \pm 1,28
G	98,18 \pm 0,76	95,00 \pm 0,17	99,83 \pm 0,02	96,83 \pm 0,02	99,86 \pm 0,14	94,83 \pm 0,71	98,58 \pm 0,56	97,00 \pm 0,67

4. RASPRAVA

U ovom radu istraživana je utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije superkritičnim CO₂ na ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva, antioksidacijsku i antibakterijsku aktivnost ekstrakta listova kadulje.

Metodom Folin-Ciocalteu dobivena je ukupna koncentracija fenolnih spojeva kod ekstrakta listova kadulje. Najveća koncentracija fenolnih spojeva dobivena je tijekom 90 minuta pri temperaturi 40°C i tlaku 30 MPa te stopi protoka CO₂ 2 kg h⁻¹, a najmanja koncentracija dobivena je tijekom 90 minuta pri 60°C i tlaku 30 MPa te stopi protoka CO₂ 2 kg h⁻¹.

Superkritična ekstrakcija fluidima metoda je koja iskorištava snagu otapala superkritičnih tekućina ili plinova na temperaturi i tlaku blizu kritične točke. Superkritična ekstrakcija fluidima ili plinom posebno je učinkovita za izolaciju tvari srednje molekularne mase i relativno niske polarnosti. Jedna od prednosti ovakvog tipa ekstrakcije je moguća primjena umjerenih temperatura, što omogućuje ekstrakciju labilnih tvari niske volatilnosti (Williams, 1981). U usporedbi s tekućim otapalima, superkritični fluid ima visoku difuzivnost i nisku gustoću i viskoznost, omogućujući tako brzu ekstrakciju i odvajanje faza. Snaga otapanja superkritičnog fluida može se mijenjati u širokom rasponu promjenom tlaka ili temperature, a tekućina se lako nadoknađuje iz ekstrakta i iz ostatka ekstrakcije kao rezultat njegove visoke isparljivosti.

Prema Schneideru (1978) superkritični plinovi poput CO₂ ili C₂H₆ nisu dobra otapala. Naprotiv, u tom istraživanju pokazali su se kao izrazito loša otapala u usporedbi s fluidnim otapalima. Snaga otapanja ovih plinova izrazito ovisi o temperaturi i tlaku, ali i o veličini molekulske mase i polarnosti tvari koje se otapaju. U ovom radu Spermanovim testom korelacije utvrđena je pozitivna povezanost povećanja tlaka s većim prinosom ekstrakcije.

Ugljikov(IV) oksid jedan je od češće korištenih superkritičnih fluida. Koristi se jer je ekološki prihvatljiv te spada u tzv. „čistu tehnologiju“. Također, netoksičan je pa se može koristiti i u prehrambenoj industriji. Još jedna od pogodnosti korištenja ovog fluida je što je relativno povoljan i ne iziskuje puno vremena tijekom ekstrakcije. CO₂ otapa većinom nepolarne spojeve, no otapa i blago polarne uz dodatak kootapala kao npr. metanola ili etanola.

U istraživanju Durlinga i sur. (2007) ispitan je utjecaj veličine čestice, temperature, omjer otapalo-kadulja i omjer etanol- voda na ekstrakciju aktivnih spojeva kao što su ružmarinska kiselina, karnozinska kiselina i eterično ulje kadulje. Optimalni uvjeti koji su dali najveći prinos

ekstrakcije navedenih aktivnih spojeva su promjer čestica 1 mm, temperature 40°C, omjer otapalo-kadulja 6:1 i 55-75% etanola u vremenu ekstrakcije 3 sata. U ovom radu tijekom superkritične ekstrakcije tlak utječe na veći prinos ekstrakcije, dok temperatura negativno utječe na količinu fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost ispitivanih uzoraka.

Iz ranijih istraživanja poznato je da velik utjecaj na prinos ekstrakcije ima veličina čestice, ali i sam odabir otapala. Dapkevicius i sur. (1998) su u istraživanju utjecaja različitih načina izolacije na antioksidacijsku aktivnost aromatičnih biljki imali najveći prinos ekstrakcije pri korištenju polarnih otapala. U ovom radu koristio se CO₂ koji otapa većinom nepolarne spojeve, no topljivost se može pospješiti dodatkom kootapala poput etanola. No, u istraživanju Rababah i sur. (2010) veće količine etanola uzrokovale su međureakcije s aktivnim spojevima iz biljnih ekstrakata te su smanjili antibakterijsko djelovanje ispitivanih ekstrakata.

Kao što je već navedeno ranije, fenolni spojevi su odgovorni za antioksidacijsku aktivnost kadulje. Oni se obično ekstrahiraju pomoću etanola. No, ekstrakti kadulje su pokazali najveću antioksidacijsku aktivnost upotrebom drugih otapala kao što su superkritični CO₂, aceton i metanol (Dapkevicius i sur., 1998). Ekstrakcija vodenom kupelji aktivnih spojeva kadulje pokazala se boljim rješenjem nego ultrazvučna ekstrakcija, hidrodestilacija i maceracija sa 70%-tnim etanolom (Olanketo i sur., 2002).

Eterična ulja kadulje se obično dobivaju parnom destilacijom, no takvim načinom dobivanja termolabilni spojevi se mogu degradirati. Ekstrakcija superkritičnim CO₂ je odlična alternativna metoda dobivanja eteričnog ulja, no osim ulja dobivaju se i drugi spojevi. Reverchon i sur. (1995) su opisali uvjete ekstrakcije pri kojima se dobiva veći prinos monoterpena iz kadulje. Samo su monoterpeni, njihovi derivati i kutikularni voskovi dobiveni pri tlaku od 9 MPa i temperaturi od 50°C, koji se mogu lako odvojiti od ulja daljnom izolacijom što superkritičnu ekstrakciju čini idealnim načinom dobivanja eteričnog ulja.

Eterično ulje kadulje dobiveno hidrodestilacijom nije pokazalo značajno antioksidacijsko djelovanje (Dorman i sur., 2003). Antioksidacijsko djelovanje ekstrakata dobiveno hidrodestilacijom i ultrazvučnom metanolnom ekstrakcijom bilo je slično i slabije aktivnosti od ekstrakata dobivenih maceracijom sa 70%-tnim etanolom. Također, aktivne komponente mogu se ekstrahirati i vodenom ekstrakcijom s povišenom temperaturom (eng. *Pressured Hot Water Extraction*- PHWE). To je ekološki prihvatljiv način ekstrakcije i ne zahtijeva mnogo vremena. Za usporedbu, PHWE traje samo sat vremena, dok maceracija sa 70%-tnim etanolom traje tri dana. Također, metode se značajno razlikuju i u količini potrebnog biljnog materijala.

U uobičajenim postupcima ekstrakcije, sastav ekstrakta varira ovisno o korištenom otapalu i njegovoj polarnosti. U istraživanju koje su proveli Olanketo i sur. (2002) najpolarnije otapalo, voda koja se koristila u hidrodestilaciji, ekstrahiralo je samo polarne spojeve. Eterično ulje sadrži hlapljive spojeve, ali ne sadrži diterpenske spojeve. Drugo najpolarnije otapalo, 70%-tni etanol, također ekstrahira neke manje polarne spojeve. Metanol je najmanje polarno otapalo od ispitanih i manje polarni spojevi su s njim lako ekstrahirani. Međutim, među konvencionalnim tehnikama ekstrakcije najveća antioksidacijska aktivnost postignuta je maceracijom sa 70%-tnim etanolom, a također je s ovim otapalom postignut najveći oporavak ružmarinske kiseline.

Antioksidacijsko djelovanje ekstrakta listova kadulje mjereno je DPPH metodom. Najveća antioksidacijska aktivnost dobivena je tijekom ekstrakcije pri temperaturi 40°C i tlaku 30 MPa te stopi protoka CO₂ 2 kg h⁻¹, a najmanja pri 60°C i tlaku 30 MPa te stopi protoka CO₂ 2 kg h⁻¹.

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti može se koristiti ORAC metoda (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) koja mjeri antioksidacijsku inhibiciju peroksil radikala HAT reakcijskim mehanizmom (Prior i sur., 2003). Izvor radikala je 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid (APPH) koji se raspada konstantnom brzinom pri 37°C te na taj način generira peroksil radikale. Djelovanje antioksidansa ovisi o konstanti brzine reakcije i koncentraciji antioksidansa i fluorescetne probe. Kako se antioksidans troši, reakcija se ubrzava te se stvara nefluorescentni produkt. Ovo se može jednostavno kvantificirati mjerenjem fluorescencije (Živko, 2012). ORAC je standardizirana metoda koja se koristi u prehrambenoj industriji za određivanje antioksidacijskih vrijednosti proizvoda. Nedostatak ove metode je dugo trajanje izvođenja, no moguće je istovremeno ispitivanje velikog broja uzoraka.

Osim hvatanja slobodnih radikala DPPH metodom korištenom u ovom radu, može se koristiti i TEAC metoda (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) koja se temelji na smanjenju apsorbancije otopine uslijed smanjenja koncentracije nastalog ABTS radikal-kationa. ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) je supstrat peroksidaze, koji se u prisutnosti H₂O₂ oksidira do intenzivno obojenog radikal-kationa i čija se koncentracija može mjeriti spektrofotometrijski pri 600-750 nm. Nastali ABTS radikal-kation reagira s antioksidansima prisutnima u uzorku i pritom se uzorak obezboji (Mandić, 2017).

Prednost TEAC metode je što se može koristiti za određivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa primjenom adekvatnog otapala. No, nedostatak je što neki polifenoli mogu sporo reagirati s ABTS radikal-kationom pa mjerenje može biti vremenski zahtjevno. Za određivanje

antioksidacijske aktivnosti uzoraka može se koristiti i FRAP metoda (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) koja se temelji na redukciji željezo(III)-tripiridiltriazin kompleksa (žute boje) u njegov reducirani Fe(II)-oblik (plave boje) u prisutnosti antioksidansa (Mandić, 2017).

Korištenjem više različitih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka kadulje, dobili bi se precizniji i značajniji rezultati koji bi nam dali bolji uvid u antioksidacijski značaj kadulje.

Biološki aktivne komponente kadulje mogu se podijeliti u monoterpene, diterpene, triterpene i fenolne spojeve, koji se potom dalje dijele u dvije skupine: fenolne kiseline, u koje pripadaju kavena, vanilinska, ferulinska i ružmarinska kiselina, i flavonoide, kojima pripadaju luteolin, apigenin i kvercetin (Lu, 2002). U velikoj koncentraciji, od monoterpena, u kadulji se nalaze α - i β -tujon, 1,8-cineol i kamfor. Prisutni su i diterpeni poput karnozinske kiseline, karnozola i metilkarnozata. Također, prisutni su i triterpeni poput oleanoične i ursolne kiseline (Cuvelier i sur., 1996). Antioksidacijsko djelovanje kadulje pripisano je sadržaju spomenutih fenolnih spojeva, posebno diterpena kao što je karnozinska kiselina, karnozol i metilkarnozata (Roby i sur., 2013). Biološke posljedice prekomjernog nakupljanja reaktivnih kisikovih jedinki i smanjene aktivnosti antioksidacijskih enzima su mutacije, kromatidne izmjene, kromosomske aberacije, citotoksičnost, kancerogeneza i stanična degeneracija povezane sa starenjem i razvitkom bolesti (Lu i sur., 2007).

Spermanovim testom korelacije utvđena je izvrsna povezanost ukupnog sadržaja fenolnih spojeva s antioksidacijskom aktivnošću ekstrakata kadulje. Relativno visoka temperatura tijekom ekstrakcije pogoduje topljivosti tvari i povećava koeficijent difuzije, ali nakon određene temperaturne vrijednosti fenolni spojevi se mogu denaturirati (Spigno i sur., 2007). Prema Kim i sur. (2006), temperatura od 60°C nije značajno utjecala na stabilnost polifenola i antioksidacijsku aktivnost kod ekstrakta suhog crvenog grožđa. Odnosno, primjećeno je povećanje antioksidacijske aktivnosti zbog polimerizacije fenola pri 60°C.

U ovom radu viša temperatura je imala negativan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata kadulje. Naravno, fenolni spojevi kadulje i crvenog grožđa se razlikuju. Crveno grožđe sadrži antocijanine i tanine, čija se degradacija povećava s većim porastom temperature u pH intervalu 2-4 (Maccarone i sur., 1985).

Prema istraživanju Delamare i sur. (2007), ekstrakti esencijalnog ulja kadulje (*Salvia officinalis* L.) izvrsno su inhibirali rast bakterija roda *Bacillus*, dok je zabilježen minimalan inhibitorni

učinak na *E. coli* i *S. aureus*. U ovom radu, ekstrakti su se pokazali učinkovitiji prema gram-pozitivnim bakterijama. Razlog nedosljednosti je različitost uzoraka prilikom istraživanja te razlika u sadržaju tvari između ekstrakata lista kadulje i esencijalnog ulja kadulje. Također, dokazano je da različiti utjecaji, bili geografski ili genetički, pa i razlika između vrsta kadulje, utječu na sastav ulja i ekstrakata kadulje (Ahmadi i Mirza, 1999). No, razlika može biti i u tome što ekstrahirani aktivni spojevi kadulje različito penetriraju kroz stijenke i membrane određenih skupina bakterija (Mehmood i sur., 2015).

Horiuchi i sur. (2007) su izolirali iz kadulje (*Salvia officinalis* L.) oleanolnu kiselinu, ursolnu kiselinu, triterpen uvaol, betulinsku kiselinu i betulin te mjerili njihovo antibakterijsko djelovanje na različite vrste bakterija koje predstavljaju rizik zdravlju ljudi. Neke od ispitivanih bakterija su bile meticilin rezistentni *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa*. Oleanolna i ursolna kiselina nisu pokazale inhibitorno djelovanje na rast gram-negativnih bakterija. Smatra se da te komponente gram-negativne bakterije efluksom izbace iz stanica. Osim efluksnih pumpi pomoću kojih izbacuju molekule antibiotika van stanice, gram-negativne bakterije imaju vanjsku polupropusnu membranu koja usporava ulazak antibiotika. Neke bakterije, poput *P. aeruginosa* mogu mijenjati ciljno mjesto djelovanja antibiotika ili inaktivirati antibiotik prirodnim ili stečenim bakterijskim enzimima. Takvi mehanizmi dovode do multirezistentnih sojeva bakterija i predstavljaju prijetnju zdravlju ljudi zbog otežanog, u nekim slučajevima i onemogućenog liječenja (Gužvinec i sur., 2012). U istraživanju Khalila i Li-a (2011) gdje su ispitivali inhibitorni učinak esencijalnog ulja kadulje na *E. coli* i *P. aeruginosa*, učinak na te dvije bakterije bio je samo privremeno bakteriostatičan. Za usporedbu, esencijalno ulje je djelovalo inhibitorno u relativno malom vremenskom intervalu na *S. aureus*. U istraživanju antimikrobne aktivnosti medicinskih biljaka Kokoska i sur. (2002), ekstrakti kadulje s etanolom pokazali su snažno antibakterijsko djelovanje na *B. cereus*, *E. coli*, i *S. aureus*. No, u istraživanju Shan i sur. (2007), *S. aureus* se pokazao najosjetljivijim na 46 ispitivana uzorka, dok je *E. coli* bila rezistentna na velik broj uzoraka. Osjetljivost *S. aureus* se pripisuje strukturi stanične stijenke i vanjske membrane ove bakterije. U ovom istraživanju, kao i u ovom radu, gram-pozitivne bakterije su bile osjetljivije nego gram-negativne.

Osim što različiti patogeni narušavaju zdravlje ljudi, narušavaju i kvalitetu hrane koju konzumiramo. Jedan od takvih patogena je bakterija roda *Salmonella*. Tradicionalni konzervansi hrane pokušavaju se zamijeniti prirodnim tvarima, gdje sve veću pozornost dobivaju kadulja i ružmarin koji se od davnina koriste kao začini ili tinkture. Hayouni i sur. (2008) ispitivali su djelovanje dvije vrste kadulje na patogene koji se prenose hranom. Obje vrste kadulje pokazale

su antibakterijsko djelovanje protiv *Candida albicans* i dva patogena roda *Salmonella* u mljevenoj govedini. Problem je što uzorci od 2% znatno mijenjaju miris i okus mesa, no i manje koncentracije su se pokazale djelotvornima. Značaj ovog istraživanja je da ekstrakti kadulje posjeduju antimikrobno djelovanje te se stoga mogu primjenjivati u prehramenoj industriji kao prirodni konzervansi te u farmaceutskoj industriji.

Kao što je prikazano u Tablici 5, svi su ispitivani ekstrakti pokazali dobro antibakterijsko djelovanje protiv *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus*. Ekstrakti su bili aktivniji protiv gram-pozitivnih bakterija od gram-negativnih bakterija. Glavni razlog razlika u osjetljivosti bakterija mogao bi biti vanjska membrana koja okružuje staničnu stjenku gram-negativnih bakterija, što ograničava difuziju spojeva kroz njegovo lipopolisaharidno prekrivanje, kako je ranije izvješteno (Vaara, 1992). Najbolja antibakterijska aktivnost bila je protiv *B. subtilis*, a najmanja aktivnost protiv *E. coli*. Kao što je izvješteno, karnozinska kiselina, karnozol, rozmanol i feruginol također su odgovorni za biološku aktivnost kadulje (*Salvia* sp.), zajedno s fenolnom, ružmarinskom i salvianolnom kiselinom (Matkowski, 2008).

Jedna od mogućih metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti uzoraka koja se još mogla koristiti je disk difuzijska metoda koja se temelji na postavljanju diska s antibakterijskim sredstvom na agaru s prethodno inokuliranom bakterijom. Rezultati metode su kvalitativni i svrstavaju bakterije kao osjetljive, srednje osjetljive ili otporne u odnosu na antimikrobno sredstvo (Balouiri i sur. 2016). No, ova metoda nije uspješna kod ispitivanja manje polarnih spojeva. U istraživanju Klančnik i sur. (2010) MIC vrijednosti disk difuzijska metode pokazale su se 3-20 puta većima od MIC vrijednosti dobivene metodom razrijeđivanja agara.

Osim MIC vrijednosti koristi se i minimalna baktericidna koncentracija (eng. *Minimum Bactericidal Concentration*- MBC). To je najniža koncentracija uzorka koja ubija određenu bakteriju, a izražava se također u mg/L. MBC je u pravilu veća od MIC vrijednosti do 32 puta, no ako je njihov omjer veći od 32, smatra se da je ta određena bakterija tolerantna na ispitivani uzorak (Bedenić, 2009).

Uzorci lista kadulje ekstrahirani superkritičnim CO₂ pokazali su dobro antibakterijsko i antioksidacijsko djelovanje. Sljedeći poželjni korak bio bi izolirati molekule koje uzrokuju antibakterijsku i antioksidacijsku aktivnost. Od izoliranih molekula koje uzrokuju antibakterijsku aktivnost, treba odrediti optimalnu djelotvornu koncentraciju koja bi djelovala na gram-negativne bakterije prije nego što se uključe mehanizmi rezistencije tih bakterija (efluks). Takva istraživanja pridonijela bi proširenju postojećih antibiotika na koje je rezistentan

veliki broj bakterija. Poželjno je odrediti koji su fenolni spojevi djelotvorniji za antioksidacijsko djelovanje kadulje te daljnja istraživanja utjecaja fenolnih spojeva na razvoj određenih bolesti. Činjenica je da su u današnje vrijeme, zbog prekomjerne upotrebe antibiotika i različitih kemikalija prilikom proizvodnje hrane, potrebna daljnja istraživanja prirodnih tvari kako bi se našla adekvatna zamjena za uobičajena sredstva.

5. ZAKLJUČCI

Analizom utjecaja različitih uvjeta superkritične ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola, antioksidacijsku aktivnost te antibakterijsko djelovanje listova kadulje, ovim su istraživanjem izvedeni sljedeći zaključci:

- U ispitivanim superkritičnim ekstraktima kadulje zabilježen je najveći ukupni sadržaj fenola (TPC) ($9,15 \pm 0,09 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{suhe tvari}}^{-1}$) i najveće antioksidacijsko djelovanje ($79,98 \pm 0,68\%$), pri koncentraciji od $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ uzorka dobivenog pri 30 MPa i 40°C s protokom CO_2 2 kg h^{-1} .
- Optimalni uvjeti za dobivanje najveće koncentracije ukupnih fenolnih spojeva listova kadulje tijekom superkritične ekstrakcije su 30 MPa i 40°C s protokom CO_2 2 kg h^{-1} .
- Optimalni uvjeti za dobivanje najveće antioksidacijske aktivnosti listova kadulje tijekom superkritične ekstrakcije su 30 MPa i 40°C s protokom CO_2 2 kg h^{-1} .
- Pri višem tlaku tijekom superkritične ekstrakcije dolazi do većeg prinosa ekstrakcije.
- Pri višoj temperaturi tijekom superkritične ekstrakcije dolazi do smanjenja prinosa ukupnih fenolnih spojeva i ukupne antioksidacijske aktivnosti.
- Potvrđena je izvrsna pozitivna povezanost između ukupnih fenolnih spojeva i ukupne antioksidacijske aktivnosti.
- U ovoj studiji potvrđena je antibakterijska učinkovitost za superkritične ekstrakte listova kadulje u odnosu na sve testirane sojeve, posebno gram-pozitivni *B. subtilis*.
- Gram-negativno testirani sojevi bili su manje osjetljivi, što se može povezati s manjom propusnošću njihove površine za fenolne spojeve.

6. LITERATURA

- Abuja, P. M., Albertini, R. (2001) Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica chimica acta* 306: 1-17.
- Ahmad, S., AbdEl-Salam, N. M., Ullah, R. (2016) In vitro Antimicrobial Bioassays, DPPH Radical Scavenging Activity and FTIR Spectroscopy Analysis of *Heliotropium bacciferum*. *BioMed Research International* 2016, 3818945.
- Ahmadi, L., Mirza, M. (1999) Essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl from Iran. *Journal of Essential Oil Research* 11: 289-290.
- Aladić, K. (2015) Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis sativa* L.) ulja superkritičnim CO₂ iz pogače nakon hladnog prešanja. Doktorska disertacija. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Prehrambeno - tehnološki fakultet, Osijek.
- Aleksovski, S. A., Sovova, H. (2007) Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. *The Journal of Supercritical Fluids* 40: 239-245.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 7915-7922.
- Andrews, J. M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 48: 5-16.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6: 71–79.
- Baricevic, D., Bartol, T. (2000) The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus V., *Pharmacology*. U: Kintzios, S. E. (ur.) Sage: *The Genus Salvia*. Harwood Academic Publishers, Abingdon, Marston.
- Bedenić, B. (2009) Antibakterijski lijekovi. U: Medicinska mikrobiologija, Uzunović-Kamberović, S. (ur.) Štamparija Fojnica doo, Zenica, 221-252.
- Bennett, J. V. (1974) Nosocomial infections due to *Pseudomonas*. *Journal of Infectious Diseases* 130: 4-7.

- Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V., Jadeja, L. (1983) Infections caused by *Pseudomonasaeruginosa*. *Reviews of infectious diseases* 5: 279-313.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science* 161: 839-851.
- Boyce, J. M., Havill, N. L., Kohan, C., Dumigan, D. G., Ligi, C. E. (2004) Do infection control measures work for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Infection Control & Hospital Epidemiology* 25: 395-401.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry* 55: 7879-7885.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2002) *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin- United States. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 51: 565.
- Cerruti, P. A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381.
- Chen Y, Xiao H, Zhen J, Liang G. (2015) Structure-ThermodynamicsAntioxidant Activity Relationships of Selected Natural Phenolic Acids and Derivatives: An experimental and theoretical evaluation. *Plos One* 24:10.
- Contreras- Guzman, E. S., Strong, F. C. (1982) Determination of tocopherols (vitamin-E) by reduction of cupric ion. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 65: 1215–1222.
- Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73: 645-652.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T. A., Linssen, J. P. (1998) Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 140-146.
- Delamare, A. P. L., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. (2007) Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* 100: 603-608.

- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2006) Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2441-2469.
- Djarmati, Z., Jankov, R. M., Djordjević, A., Ribar, B., Lazar, D., Engel, P. (1992) Carnosic acid 12-methyl ether- γ -lactone, a ferruginol-type diterpene from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 31: 1307-1309.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M. J. (2003) Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food chemistry* 83: 255-262.
- Duncan, A. C., Jäger, A. K., van Staden, J. (1999) Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology* 68: 63-70.
- Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., Perry, N. B. (2007) Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry* 101: 1417-1424.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Rotheneder, M. (1989) Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Research Communications* 6: 67-75.
- Gužvinec, M., Butić, I., Jelić, M., Bukovski, S., Lucić, S., Tambić Andrašević, A. (2012) Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki glasnik* 32: 71-80.
- Halliwell, B. (1990) How to characterize a biologic antioxidant. *Free Radical Research Communications* 9: 569-71.
- Halliwell, B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine* 91: 14-22.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 246: 501-514.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., M., C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn Oxford University Press, New York.

- Hamdi, M. (2008) Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125: 242-251.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86: 985-990.
- Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., Heifets, L. B., Lindholm-Levy, P. J., Comstock, R. D. (1992) Clarithromycin minimal inhibitory and bactericidal concentrations against *Mycobacterium avium*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 145: 856-858.
- Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., Hamdi, M. (2008) Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinusmolle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125: 242-251.
- Hercegovac, A. (2016) Uzgoj kadulje (*Salvia* sp.). Doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Osijek.
- Hong, H. A., Duc, L. H., Cutting, S. M. (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 813-835.
- Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T. (2007) Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30: 1147-1149.
- Huang, M. B., Baker, C. N., Banerjee, S. H. A. I. L. E. N., Tenover, F. C. (1992) Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of staphylococci, enterococci, *Campylobacter jejuni*, and gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 3243-3248.
- Hulina, N. (2011) Više biljke stablašice- Sistematika i gospodarsko značenje. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Iqbal, T., Bhatti, I. A. (2011) Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils. *Pakistan Journal of Botany* 43: 1315-1321.
- Jokić, S., Rajić, M., Bilić, B., Molnar, M. (2016) Supercritical Extraction of Scopoletin from *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Flowers. *Phytochemical Analysis PCA* 27: 290–295.

- Jokić, S., Svilović, S., Zeković, Z., Vidović, S., Velić, D. (2011) Solubility and kinetics of soybean oil and fatty acids in supercritical CO₂. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113: 644-651.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Gono-Bwalya, A. B., Van Zyl, R. L., Van Vuuren, S. F., Lourens, A. C. U., Baser, K. H. C., Demirci, B., Lindsey, K. L., van Staden, J., Steenkamp, P. (2005) The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *Journal of Ethnopharmacology* 102: 382-390.
- Karch, H., Tarr, P. I., Bielaszewska, M. (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology* 295: 405-418.
- Kedare, S. B., Singh, R. P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* 48: 412-422.
- Khalil, R., Li, Z. G. (2011) Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. *African Journal of Biotechnology* 10: 8397-8402.
- Kim, S. Y., Jeong, S. M., Park, W. P., Nam, K. C., Ahn, D. U., Lee, S. C. (2006) Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry* 97: 472-479.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S. S. (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 81: 121-126.
- Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L. H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J. M., Craig, A. S., Zell, E. R., Fosheim, G. E., McDougal, L. K., Carey, R. B., Fridkin, S. F. (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Jama* 298: 1763-1771.
- Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., Vanek, T. (2002) Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 82: 51-53.
- Kovačić, A., Tafra, D., Hrenović, J., Goić-Barišić, I., Dumanić, T. (2018) Survival of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* in distilled water. *Hrvatske vode* 26: 181-186.
- Kušan, F. (1956). Ljekovito i drugo korisno bilje. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb 7-648.

- Levine, M. M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *The Journal of Infectious Diseases* 155, 377–389.
- Lima, C. F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2005) The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 383-389.
- Lu, W., Ogasawara, M. A., Huang, P. (2007) Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discovery Today: Disease Models* 4: 67-73.
- Maccarone, E., Maccarrone, A., Rapisarda, P. (1985) Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *Journal of Food Science* 50: 901-904.
- Mandić, V. (2017) Razvoj i validacija novog tipa HPLC detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka u hrani. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Matkowski, A. (2008) Plant in vitro culture for the production of antioxidants—a review. *Biotechnology advances* 26: 548-560.
- Mehmood, B., Dar, K. K., Ali, S., Awan, U. A., Nayyer, A. Q., Ghous, T., Andleeb, S. (2015) In vitro assessment of antioxidant, antibacterial and phytochemical analysis of peel of *Citrus sinensis*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science* 28: 231-239.
- Miura, K., Kikuzaki, H., & Nakatani, N. (2002) Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1845-1851.
- Newall, C., Anderson, L. A., Phillipson, J. D. (1996) Sage. U: Newall, C. A., Anderson, L. A., Phillipson, J. D. (ur.) *Herbal Medicines- A Guide for Health-care Professionals*. The Pharmaceutical Press, London.
- Nimse, S. B., Pal, D. (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances* 5: 27986-28006.
- Nithya, P., Madhavi, C. (2017) Antioxidant activity of 3-arylidene-4-piperidones in the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl scavenging assay. *Journal of Taibah University for Science* 11: 40-45.

Niviere, V., Fontecave, M. (1995) Biological sources of reduced oxygen species. U: Analysis of free radicals in biological systems. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland: 11- 19.

Nordberg, J., Arnér, E. S. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* 31: 1287-1312.

Ollanketo, M., Peltoketo, A., Hartonen, K., Hiltunen, R., Riekkola, M. L. (2002) Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. *European Food Research and Technology* 215: 158-163.

Pavić, V., Jakovljević, M., Molnar, M., Jokić, S. (2019) Extraction of carnosic acid and carnosol from sage (*Salvia officinalis* L.) leaves by supercritical fluid extraction and their antioxidant and antibacterial activity. *Plants* 8: 16.

Pellegrini-Giampietro, D. E. (1994) Free radicals and the pathogenesis of neuronal death: cooperative role of excitatory amino acids. U: *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Springer, Boston, MA:59- 71.

Pietta, P., Minoggio, M., Bramati, L. (2003) Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry* 28: 257-312.

Prior, R. L., Hoang, H. A., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang D., Ou, B., Jacob, R. (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3273-3279.

Rababah, T. M., Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K., Yang, W. (2010) Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth and pomegranate. *Journal of Food Science* 75: 626-632.

Roberts, R. B., Cowie, D. B., Abelson, P. H., Bolton, E. T., Britten, R. J. (1955) Studies of biosynthesis of *Escherichia coli*. *Studies of Biosynthesis of Escherichia coli* 607: 521.

Rolston, K. V., Bodey, G. P. (1992) *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cancer Patients: Infectious complications of cancer. *Cancer Investigation* 10: 43-59.

Rot, T. (2015) Optimizacija procesa proizvodnje lješnjakovog ulja. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno - tehnološki fakultet, Osijek.

- Sack, R. B. (1975) Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology* 29: 333-354.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., Corke, H. (2007) The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* 117: 112-119.
- Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., Losick, R. (2002) *Bacillus subtilis*: From Cells to Genes and from Genes to Cells. U: Sonenshein, A., Losick, R., Hoch, J. (ur.) *Bacillus Subtilis* and Its Closest Relatives. American Society for Microbiology Press, Wasinghton DC.str. 3–5.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D. M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81: 200-208.
- Stanković-Nedeljković, N., Tiodorović, B., Kocić, B., Ćirić, V., Milojković, M., Waisi, H. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* serotypes and resistance to antibiotics from wound swabs. *Vojnosanitetski preglad* 72: 996-1003.
- Svingen, B. A., O'Neal, F. O., Aust, S. D. (1978) The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation. *Photochemistry and Photobiology* 28: 803-809.
- Teh, S. S., Birch, J. (2013) Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis* 30: 26-31.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. H. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 669-675.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-1246.
- Vaara, M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56: 395-411.
- Wang, B., Jessamine, P., Desjardins, M., Toye, B., Ramotar, K. (2013) Direct *mecA* polymerase chain reaction testing of blood culture bottles growing Gram-positive cocci and the clinical potential in optimizing antibiotic therapy for staphylococcal bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 75: 37-41.
- Waris, G., Ahsan, H. (2006) Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*: 5: 14.

Wefers, H., Sies, H. (1988) The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *European Journal of Biochemistry* 174: 353-357.

Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R. E. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3: 163.

Zgoda, J. R., Porter, J. R. (2001) A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology* 39: 221-225.

Živko, T. (2012) Određivanje antioksidativnog učinka, ukupnih fenola i tanina u plodu rogača. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.

Web izvori:

Web1. <https://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/kadulja-225/>

Web2. <https://biophoretics.com/biochemicals-a-z/1376-phenol-hydroxybenzene-analytical-grade-cas-108-95-2-serva.html>