

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Dyscyplina naukowa: Technologia żywności i żywienia



mgr Aneta Maria Mrozek-Szetela

**Zastosowanie ozonu do stabilizacji mikrobiologicznej
wybranych serii materiałów oraz końcowych
produktów - suplementów diety**

The use of ozone for microbiological stabilization of selected series of
materials and final products - dietary supplements

Rozprawa doktorska

Promotor:
dr hab. inż. Katarzyna Wińska, profesor UPWr

Wrocław 2023

Pracę tę dedykuję swojemu Dziecku...

Antoni...

*Jesteś moim ukochanym Synem! Najwspanialszym Darem od samego Boga.
Kochałabym Cię, nawet gdybyś zgasił słońce i postrzącał wszystkie gwiazdy...*

Twoja Mama

Za wszelką pomoc i wsparcie dziękuję tym, którzy trwali przy mnie we wszystkich trudach tworzenia...

Dziękuję za wiarę, że mój sukces to tylko kwestia odpowiedniej determinacji (tę zwykle mam sporą) i czasu (z tym już nieco gorzej – bo choć znalazłam tysiąc sposobów, jak go zabić, to ani jednego, jak go wskrzesić.

Ta praca jest także dla Was, Kochani Rodzice...

Spis treści

1. Streszczenie w języku polskim	4
2. Streszczenie w języku angielskim	4
3. Wstęp	6
3.1 Zanieczyszczenia surowców roślinnych	11
3.1.1 Dekontaminacja	14
3.2 Ozon – budowa cząsteczki i właściwości chemiczne	25
3.2.1. Historia stosowania ozonu oraz regulacji prawnych z tym związanych na świecie.....	28
3.2.2. Bezpieczeństwo i zagrożenia dla ludzkiego organizmu związane z ekspozycją na ozon.....	30
3.2.3. Przeciwdrobnoustrojowe działanie ozonu.....	31
3.3. Ziola wybrane do procesu ozonowania – występowanie oraz właściwości biologiczne	34
3.3.1. Rumianek pospolity (<i>Matricaria chamomilla</i> L.)	34
3.3.2. Koper włoski (<i>Foeniculum vulgare</i> L.)	36
3.3.3. Tatarak zwyczajny (<i>Acorus calamus</i> L.)	40
3.3.4. Wrotycz pospolity (<i>Tanacetum vulgare</i> L.)	43
4. Cel pracy	46
5. Badania własne	47
5.1. Materiały.....	47
5.2. Metody	47
5.2.1. Procedura ozonowania ziół.....	47
5.2.2. Oznaczanie czystości mikrobiologicznej materiału roślinnego	50
5.2.3. Otrzymywanie i oznaczanie składu olejków eterycznych	50
5.2.4. Oznaczanie zawartości polifenoli	51
5.2.5. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej	53
6. Wyniki i dyskusja wyników.....	54
6.1. Czystość mikrobiologiczna próbek roślinnych poddanych ozonowaniu	56
6.2. Oznaczenie składu jakościowego olejków eterycznych z ozonowanych ziół	60
6.3. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH.....	67
6.4. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą ABTS	72
6.5. Zawartość związków fenolowych ogółem	77
6.6. Oznaczenie związków fenolowych za pomocą LC MS	81

6.7. Ozonowanie próbek przemysłowych	82
6.7.1. Oznaczenie czystości mikrobiologicznej próbek przemysłowych Błąd! zdefiniowano zakładki.	Nie
7. Podsumowanie i wnioski	87
8. Bibliografia	89

1. Streszczenie w języku polskim

Problem czystości materiałów ziołowych używanych do produkcji suplementów diety jest od dawna tematem dyskusji wielu grup zainteresowanych rynkiem żywności w Polsce i na świecie.

Co jakiś czas wznawiany jest dyskurs odnośnie dotyczący zbyt niskiej jakości produktów żywnościowych oferowanych na rynku zarówno lokalnym, jak i światowym. Zanieczyszczenie żywności, w tym surowców zielarskich, to oprócz niskiej wartości odżywczej oferowanego towaru drugi, najbardziej poważny problem dotyczący produktów żywnościowych.

Pomimo wyznaczonych norm (odgórnie nałożonych przez odpowiednie organizacje UE oraz ratyfikowanych w Polsce), ciągle jeszcze nie istnieje żaden organ kontroli, który jasno wskazywałby na potrzebę każdorazowego badania żywności, w tym ziół przed wprowadzeniem ich na rynek konsumencki.

Celem poniższej pracy doktorskiej było opracowanie metody higienizacji ziół oraz gotowych mieszanek ziołowych, która stanowiłaby dobry kompromis pomiędzy wysoką skutecznością dekontaminacyjną, a jak najniższym potencjałem degradującym związki biologicznie czynne, jednocześnie odpowiedzialne za efekt leczniczy danego surowca.

Niniejsza praca opisuje poszczególne etapy realizacji badań nad skutecznością użycia ozonu jako środka o wysokiej efektywności oczyszczającej wobec zanieczyszczeń mikrobiologicznych w surowcach roślinnych.

Do badań wybrano cztery gatunki popularnych na terenie Polski ziół, stosowanych w medycynie naturalnej jako skuteczne remedia w wielu dolegliwościach, a także jako produkty spożywcze. Były to: kwiatostan rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* L.), owoc kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare* L.), ziele wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare* L.) i kłącze tataraku zwyczajnego (*Acorus calamus* L.). Materiały te zostały najpierw przebadane pod kątem obecności zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Określono czystość próbek, uwzględniając ogólną liczbę drobnoustrojów, zarówno bakterii, jak i grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych. Wytyczne, niezbędne do określenia czystości mikrobiologicznej przyjęto zgodnie z procedurą zawartą w Farmakopei Polskiej, wydanie XI. Uzyskane wyniki analizowano wobec próbki wyjściowej, niepoddanej ozonowaniu.

Następnym etapem pracy było pozyskanie olejku eterycznego, który to proces odbył się na drodze destylacji z parą wodną z surowca, który wcześniej poddano procesowi ozonowania. Destylację wykonano przy pomocy aparatury Derynga. Skład olejków został ustalono na podstawie analizy GC-MS.

Aktywność przeciwutleniającą uzyskanych ekstraktów wodno-metanolowych znamionowano wykorzystując metody ABTS i DPPH. Oznaczono również zawartość związków fenolowych (ogółem) w tych ekstraktach, wykorzystując odczynnik Folin-Ciocalteu. Ponadto ustalono zawartości ilościowe referencyjnych związków fenolowych w ekstraktach pozyskanych z surowca poddanego procesowi ozonowania przy wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej.

Ostatnim etapem prowadzonych w ramach doktoratu wdrożeniowego prac było poddanie procedurze ozonowania gotowych mieszanek ziołowo-witaminowych, używanych do produkcji suplementów diety firmy Wedes Concept Piotr Rejda.

Uzyskane wyniki badań potwierdziły zasadność użycia ozonu jako skutecznego środka do stabilizacji mikrobiologicznej wybranych serii materiałów oraz końcowych produktów - suplementów diety. Stały się także fundamentem wdrożenia procesu ozonowania do linii produkcyjnej w przedsiębiorstwie Wedes Concept Piotr Rejda. Prowadzony obecnie w firmie proces produkcji suplementów diety, każdorazowo uwzględnia etap oczyszczania ozonowego substratów roślinnych, a każde opakowanie opatrzone jest adnotacją: *„do produkcji suplementu wykorzystano innowacyjny proces higienizacji materiału roślinnego zachowujący właściwości prozdrowotne”*.

2. Streszczenie w języku angielskim

The purity of herbal materials used in the production of dietary supplements has long been a topic of discussion among various groups interested in the food market in Poland and worldwide.

Periodically, the discourse regarding the low quality of food products offered on both the local and global market is resumed. Food contamination, including herbal raw materials, is the second most significant problem concerning food products, in addition to their low nutritional value.

Despite the established standards (imposed by the relevant EU organizations and ratified in Poland), there is still no control body that clearly indicates the need for regular testing of food, including herbs, before they are introduced into the consumer market.

The aim of this doctoral research was to develop methods of herbal higienization and ready-made herbal blends that would strike a good balance between high decontamination effectiveness and the lowest possible degradation potential of biologically active compounds responsible for the medicinal effect of the material.

This research describes the individual stages of studying the effectiveness of using ozone as a highly efficient cleansing agent for microbiological contaminants in plant materials.

Four species of popular herbs in Poland, used in natural medicine as effective remedies for various ailments and also as food products, were selected for the study: common chamomile flowers (*Matricaria chamomilla* L.), fennel fruits (*Foeniculum vulgare* L.), common tansy herb (*Tanacetum vulgare* L.), and sweet flag rhizome (*Acorus calamus* L.). These materials were first tested for the presence of microbiological contamination. The purity of the samples was determined, taking into account the total number of microorganisms, including bacteria, yeast-like fungi, and molds. The microbiological purity criteria were adopted according to the procedure specified in the Polish Pharmacopoeia, 11th edition. The obtained results were analyzed in relation to the non-ozonated starting sample.

The next stage of the research involved obtaining essential oil through steam distillation from the ozone-treated raw material. Distillation was performed using a Deryng apparatus. The composition of the oils was determined based on GC-MS analysis.

The antioxidant activity of the obtained water-methanol extracts was determined using the ABTS and DPPH methods. The total phenolic content in these extracts was also determined using the Folin-Ciocalteu reagent. Furthermore, the quantitative contents of reference phenolic compounds in the extracts obtained from ozone-treated raw materials were determined using liquid chromatography techniques.

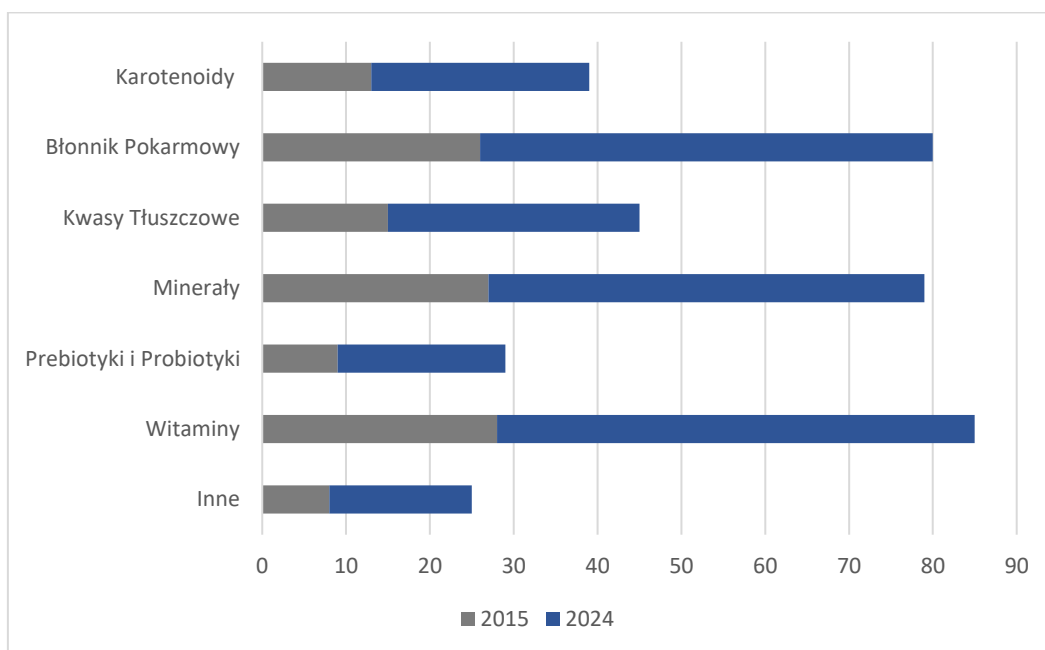
The final stage of the research carried out within the framework of the implementation doctorate was subjecting ready-made herbal-vitamin blends used in the production of dietary supplements by Wedes Concept Piotr Rejda to the ozone treatment procedure.

The conclusion of the research and the analysis of the resulting data ultimately confirmed the effectiveness of using ozone as an efficient agent for microbiological stabilization of selected series of materials and final products - dietary supplements. This became the basis for the implementation of this process into the production line of Wedes Concept Piotr Rejda.

Dietary supplements currently manufactured, taking into account the ozone purification stage of the materials used in their production, are labeled with the annotation: "*innovative plant material higienization process preserving health properties was used for supplement production*".

3. Wstęp

Rynek suplementów diety jest współcześnie jedną z najdynamiczniej rozwijających się gałęzi handlu żywnością na świecie. W samej Europie został wyceniony na ok. 15 mld USD w 2020 roku i prognozuje się, że osiągnie on CAGR (ang. *Compound Annual Growth Rate*, skumulowany roczny wskaźnik wzrostu) na poziomie 5,49% w latach 2021-2026.¹ W Polsce w 2020 roku wartość rynku suplementów diety oszacowano na 5,04 mld PLN (ok. 1,55 mld USD), co znacząco przerosło prognozy rynkowe z 2015 roku, określone na ponad 1 mld PLN mniej.² Zakładany przyrost sprzedaży suplementów diety na świecie (liczony w mln USD) przedstawia Rysunek 1.³



Rysunek 1. Prognozowany wzrost sprzedaży suplementów diety (w mln USD) dla świata.³

Według definicji wynikającej z przepisów prawa żywnościowego suplement diety to środek spożywczy, którego celem jest uzupełnienie normalnej diety, będący skoncentrowanym źródłem witamin lub składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny. Może występować w postaci pojedynczych lub złożonych kompozycji, wprowadzany do obrotu w formie umożliwiającej konieczne dawkowanie. Może także być w postaci kapsułek, tabletek, drażetek i w innych podobnych formach, saszetek z proszkiem, ampulek z płynem, butelek z kroplomierzem i w innych podobnych postaciach płynów i proszków przeznaczonych do spożywania w małych, odmierzonych ilościach jednostkowych, z wyłączeniem produktów posiadających właściwości produktu leczniczego w rozumieniu przepisów prawa farmaceutycznego.⁴

Suplementy diety wprowadzane do obrotu na terenie Rzeczypospolitej Polskiej muszą spełniać wszelkie wymogi określone w “Ustawie o bezpieczeństwie żywności i żywienia” z dnia 25 sierpnia 2006 r. oraz z “Rozporządzeniem Ministra Zdrowia w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety” z dnia 9 października 2007 r.⁵, a także z “Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie znakowania środków spożywczych” z dnia 10 lipca 2007 r.⁶

Suplementy diety różnią się między sobą zarówno pod względem składu jak i zaleceń do stosowania. Możemy rozróżniać także suplementy według formy, w jakiej są produkowane i sprzedawane oraz według grup docelowych, do których są kierowane. Najbardziej podstawowy podział obejmuje:⁷

- **Suplementy witaminowo-mineralne** – zawierają zwykle zestaw najbardziej niezbędnych dla ludzkiego organizmu składników, koniecznych dla zachowania zdrowia fizycznego i psychicznego. Niedobór witamin i minerałów może znacząco wpływać na zmniejszenie zdolności obrony przed szkodliwymi patogenami za pośrednictwem układu immunologicznego. Suplement multiwitaminowo - mineralny może być zatem dobrym zabezpieczeniem przed okresowym niedoborem składników odżywczych w diecie konsumenta. Suplementy witaminowo - mineralne występują w postaci tabletek lub kapsułek żelowych, w postaci proszków dodawanych do wody, batonów, cukierków lub lizaków przeznaczonych dla dzieci.

- **Suplementy ziołowe** – występują najczęściej w postaci suszy roślinnych, przeznaczonych do sporządzania naparów. Służą zatem nie tylko jako dobre źródło dla uzupełnienia braków składników witaminowo – mineralnych czy innych niezbędnych substancji biologicznie czynnych, ale przede wszystkim mają wskazanie do stosowania jako środek wspomagający przy leczeniu wielu chorób. Kuracje ziołami są nie tylko jednym z najstarszych sposobów przywracania zdrowia, ale również współcześnie stanowią równoległą ścieżkę wspomagania terapii konwencjonalnej. Wiele systemów „opieki zdrowotnej” starożytnych cywilizacji bazowało na naturalnych surowcach roślinnych, a współczesna farmakologia na nowo odkrywa leczniczy potencjał ziół. Jeszcze w roku 1994 WHO (Światowa Organizacja Zdrowia) oszacowała, że 80 proc. światowej populacji nadal chętnie używa tradycyjnych terapii, opartych na ziołolecznictwie jako jedyne i wystarczające remedium na dolegliwości lub stosuje terapię ziołową jako wspomagającą dla rekomendowanego przez lekarzy leczenia.

- **Pełnowartościowe suplementy diety** – sporządzone z mieszanki skoncentrowanej, poprzez odprowadzenie z żywności wody, często z dodatkiem witamin i minerałów. Dzięki takiemu procesowi suplement diety jest w pełni naturalny, dobrze skomponowany pod względem odżywczym (dzięki dodatkom mineralno – witaminowym może stanowić nawet doskonalszą alternatywę dla swojego odpowiednika w naturze), jest dobrze przyswajany przez organizm.

Minusem może być jednak cena, gdyż zwykle jest on droższy niż suplementy oparte na pojedynczych, wyizolowanych składnikach.

W ostatnich latach, wraz ze wzrostem świadomości zdrowotnej społeczeństw, lepszym wyedukowaniem oraz łatwym dostępem do wiedzy coraz więcej osób sięga po skoncentrowane składniki uzupełniające dietę. Także nowoczesny styl życia, ogólny pośpiech oraz trudniejszy dostęp do zdrowej, naturalnej żywności niejako stanowią czynnik „wymuszający” uzupełnianie codziennej diety w niezbędne składniki odżywcze, witaminy czy minerały.

Rynek suplementów diety stanowi część rynku globalnego, który - jak już wcześniej wspomniano - charakteryzuje się ciągłym wzrostem sprzedaży. Wyniki oraz analiza badań rynkowych potwierdzają, że suplementy diety stanowią ważny składnik diety niemal każdego człowieka na świecie. W Polsce według badań przeprowadzonych w 2006 r. szacuje się, że 22% osób zażywało co najmniej jeden suplement diety codziennie, częściej były to kobiety. Zauważono również, dodatnią korelację wykształcenia danej osoby z częstotliwością sięgania po suplementy.⁸

W celu poszerzenia swojej oferty sprzedażowej, a więc również zwiększenia zysków, zarówno wielkie firmy farmaceutyczne, jak i mniejsze przedsiębiorstwa produkujące suplementy diety nieustannie prowadzą analizy codziennych zachowań i decyzji podejmowanych przez konsumentów. Oferta obecnych na rynku produktów jest szeroka i precyzyjnie dopasowana do każdej grupy odbiorców. Jak wynika z opublikowanych badań, często sięgamy po suplementy w sposób dowolny i niekontrolowany przez lekarzy. Łatwa dostępność oraz sztuczne kreowanie potrzeby zdrowotnej, może zatem prowadzić do poważnego zachwiania homeostazy organizmu.⁹

W USA ponad połowa dorosłych codziennie używa co najmniej jednego rodzaju suplementu diety, najczęściej multiwitaminę. Przyczyną tego, oprócz wzrostu świadomości zdrowotnej oraz wydłużającego się wciąż cyklu trwania życia są powszechnie i często pojawiające się reklamy tego typu produktów. Europa zajmuje drugie miejsce na świecie na liście największych rynków dla dystrybucji suplementów diety. W Stanach Zjednoczonych przeprowadzono przekrojowe badanie o nazwie NHANES 2003–2006.¹⁰ Przeanalizowano stosowanie suplementów diety w populacji USA (przez okres 1 roku), z podziałem na grupy wiekowe. Sposób, w jaki konsumenci stosowali suplementy mierzono za pomocą kwestionariusza, którym udało się zbadać 49% populacji USA (44% mężczyzn, 53% kobiet). Najczęściej zgłaszano stosowanie preparatów multiwitaminowo-mineralnych (33%). Większość osób deklarowała przyjmowanie tylko jednego suplementu diety i robiła to codziennie. Omówione powyżej wyniki zaprezentowano w Tabeli 1.

Następnym rodzajem sondażu społecznego, będącym niejako kontynuacją badania NHANES 2003–2006, było zestawienie wyników badania NHANES jednak prowadzonego

w latach 2007–2011 z wynikami innych badań, które także omawiały zachowania konsumenckie w stosunku do stosowania suplementów diety. Wszystkie one dotyczyły obywateli Stanów Zjednoczonych (badanie konsumenckie CRN, 2011 r.) oraz osób na co dzień zajmujących się branżą związaną z żywnością i żywieniem (najczęściej byli to przedstawiciele zawodu dietetyka). Wyniki zestawia Tabela 2.

Tabela 1. Podział wiekowy przyjmowania suplementów.¹¹

Wiek [lata]	Mężczyźni	Kobiety
19-30	36%	43%
31-50	44%	55%
51-70	58%	72%
Powyżej 70	66%	75%

Tabela 2. Odsetek osób podających różne powody stosowania suplementów diety w badaniu NHANES 2007–2011 oraz w dwóch badaniach CRN, jedno w 2011 r. dotyczące stosowania suplementów diety przez konsumentów i jedno w 2009 r. dotyczące stosowania przez dietetyków.¹¹

Przyczyna przyjmowania suplementów	Badanie NHANES lata 2007–2011	Badanie konsumenckie CRN, 2011 r.	Badanie CRN, dietetycy, 2009 r.
<i>Poprawa ogólnego stanu zdrowia, zachowanie dobrego zdrowia</i>	45%	brak danych	brak danych
<i>Poprawa samopoczucia</i>	33%	58%	53%
<i>Zdrowe kości</i>	25%	30%	58%
<i>Uzupełnienie diety w składniki mineralne i witaminowe</i>	22%	42%	42%
<i>Zapobieganie niedoborom witaminowym, profilaktyka zdrowotna</i>	20%	26%	brak danych
<i>Zdrowe serce, niższy poziom cholesterolu</i>	15%	29%, 19%	25%, 16%
<i>Wzmocnienie odporności</i>	15%	32%, 17%	25%, 21%
<i>Zdrowe stawy, zapobieganie artretyzmowi</i>	12%	20%	15%
<i>Zwiększenie poziomu energii</i>	11%	3%	15%
<i>Skóra, włosy i paznokcie</i>	5% (tylko skóra)	17%	13%
<i>Zdrowie jelit lub okrężnicy, zdrowie układu pokarmowego</i>	5%	15%	26%
<i>Zdrowie oczu</i>	4%	13%	9%
<i>Zdrowie psychiczne lub koncentracja</i>	4%	13%	
<i>Utrata masy ciała, odchudzanie</i>	3%	14%	6%

Jednak suplementy diety to nie tylko wartość odżywcza czy uzupełnienie witamin i minerałów dla organizmu. Jak każdy produkt spożywczy, musi cechować go bezpieczeństwo stosowania. Wszelkie reguły dotyczące aspektu bezpieczeństwa związanego z żywnością i żywieniem ludzi zostały szczegółowo sprecyzowane w Ustawie z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia.¹²

Niezwykle ważne jest, aby każde przedsiębiorstwo, które produkuje suplementy diety dbało o jakość i bezpieczeństwo swojego produktu poprzez spełnianie wszystkich wytycznych dotyczących kontroli czystości, wysokiej biodostępności i bezpieczeństwa toksykologicznego. System HACCP jest obowiązkowym w Polsce systemem zapewnienia bezpieczeństwa żywności, obowiązującym także producentów suplementów diety.¹²

Przedsiębiorcy zajmujący się produkcją żywności mogą także zabiegać o akredytację ISO 22000 FSMS w zakresie bezpieczeństwa żywności oraz certyfikację GMP do oceny systemów zarządzania jakością i bezpieczeństwem dotyczących praktyki wytwarzania towarów. Wszystkie, związane z opisanymi powyżej procedurami działania, jakie podejmują przedsiębiorstwa zajmujące się produkcją żywności i żywieniem ludzi są częścią tzw. „dobrej praktyki produkcyjnej” i jednocześnie potwierdzeniem dbałości danego podmiotu wytwórczego o jakość prowadzonych w przedsiębiorstwie procesów. Składają się one na ustawiczny proces zapewniania bezpieczeństwa wytwarzanej żywności, które to potwierdza odpowiednia dokumentacja i procedury późniejszych audytów.¹³

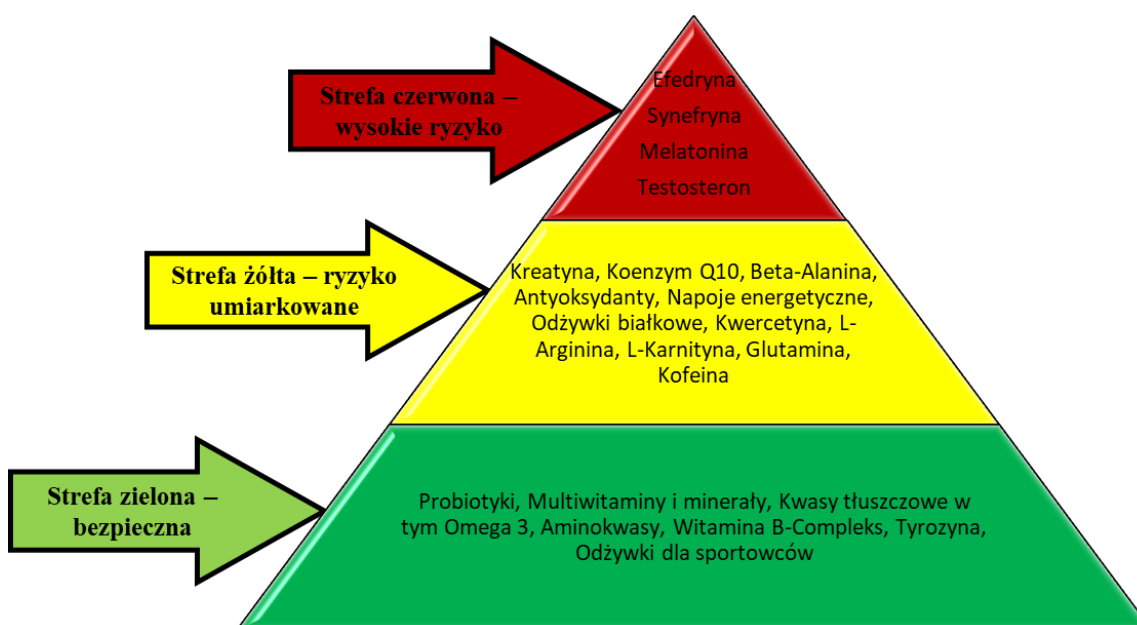
Problematyka zagrożeń związanych z przyjmowaniem suplementów diety to jednak nie tylko jakość czy czystość mikrobiologiczna stosowanego produktu. Także ilość i częstotliwość spożywania środków wspomagających ludzki organizm może mieć znaczący wpływ na zdrowie i samopoczucie konsumenta.

Poniżej zamieszczono podział suplementów diety oraz innych substancji aktywnych, spożywanych przez ludzi w celu osiągnięcia konkretnej korzyści zdrowotnej lub określonego efektu. Zestawienie, które przedstawia omawiane zjawisko zilustrowano w postaci tzw. „piramidy bezpieczeństwa” Podstawę jej tworzy tzw. „zielona strefa”, w której znalazły się produkty o dużej tolerancji bezpieczeństwa. Są to m.in.: probiotyki, multiwitamina i minerały, kwasy tłuszczowe; w tym kwas ω -3, aminokwasy, witamina B complex, tyrozyna oraz różnorakie odżywki rekomendowane dla sportowców.

Kolejnym stopniem objęte są produkty o mniejszym zakresie swobody stosowania, które to środki powinny podlegać kontroli lekarzy. Długotrwałe przyjmowanie ich, szczególnie w dawkach samodzielnie ustalonych przez konsumenta może przyczynić się do zachwiania homeostazy organizmu. W diagramie określone zostały przez tzw. „strefę żółtą”. Umieszczono

tutaj takie produkty jak: kreatyna, koenzym Q10, chrom, kofeina, β -alanina, antyoksydanty, napoje energetyzujące, odżywki białkowe, kwercetyna, glutamina, L-arginina i L-karnityna.

Czubek piramidy stanowi tzw. „strefa czerwona”. Obejmuje ona takie substancje, które mają udowodniony wpływ na ludzki organizm, jednak nie stanowią one suplementów diety w rozumieniu definicji tego sformułowania. Kolor czerwony wskazuje na duże zagrożenie wobec stosowania produktów z tej grupy. Znajdują się tutaj różnego rodzaju substancje aktywne, często o rejestracji farmaceutycznej jako leki (hormony, związki naśladujące hormony oraz substancje psychoaktywne), a używane przez ludzi niezgodnie ze wskazaniami medycznymi i poza kontrolą lekarską, często także często także poza regułami obowiązującego prawa.³ W strefie niebezpiecznej znalazły się: efedryna, synefryna, melatonina, testosteron. Omawianą powyżej piramidę prezentuje Rysunek 2.



Rysunek 2. Piramida ryzyka dla stosowania suplementów diety oraz innych substancji wpływających na ludzki organizm.³

3.1 Zanieczyszczenia surowców roślinnych

Zanieczyszczenia surowców roślinnych to problem wieloaspektowy, ponieważ potencjalne źródła kontaminacji mogą dotyczyć każdego etapu pozyskiwania materiału roślinnego – poczynając od procesu wzrostu i zbioru z miejsca uprawy aż do ostatniego etapu formułowania gotowego suplementu diety (mogącego przybrać różnorakie formy – np. suszów, herbat, kapsułek itp.). Niemniej jednak obecność drobnoustrojów takich jak wirusy, bakterie, grzyby drożdżopodobne i pleśniowe ponad normy ustalone przez odpowiednie organy do tego powołane jest zjawiskiem wysoce niekorzystnym. Z jednej strony bytowanie niepożądanych drobnoustrojów w materiale roślinnym stwarza bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia

konsumenta, a z drugiej stanowi istotny czynnik obniżający wartość rynkową surowca roślinnego. Aby zachować jak najbardziej zbliżoną do natury formę, co ma korelować z zachowaniem większości najbardziej istotnych dla osiągnięcia efektu zdrowotnego składników aktywnych w roślinie, produkty zielarskie są najczęściej przetwarzane w minimalnym stopniu. Związane jest to z degradującym wpływem na biochemiczny skład w roślinie zarówno wysokiej temperatury, podwyższonego ciśnienia czy działania substancji chemicznych o potencjale dezynfekującym. W związku z tym powstaje konieczność kontrolowania potencjalnych możliwości skontaminowania materiału roślinnego na każdym etapie jego pozyskiwania i obróbki.¹⁴ Jak już wyżej wspomniano do skażenia surowca może dochodzić na wielu etapach łańcucha produkcyjnego, na co wpływ ma wiele czynników, takich jak rodzaj uprawy (produkty z produkcji konwencjonalnych i ekologicznych),¹⁵ typ klimatu sprzyjający rozwojowi określonych patogenów czy wzrost roślin prowadzony w złych warunkach sanitarnych, który wiąże się z obecnością zwierząt oraz ich odchodów.¹⁶ Skażenie mikrobiologiczne może mieć charakter pierwotny wynikający z obecności drobnoustrojów naturalnie bytujących na roślinach (mikroflora epifityczna) lub wtórny, kiedy do surowca dostają się drobnoustroje z gleby, wody czy powietrza jak również powstałe w czasie zbioru, transportu, przetwarzania i przechowywania.¹⁷ Stopień skażenia może również zależeć od rodzaju rośliny, gdyż niektóre rośliny zawierają naturalne bariery i wydzielają substancje przeciwdrobnoustrojowe, które wywierają działanie hamujące na wzrost patogenów.¹⁸

Skażenie mikrobiologiczne zielonych produktów leczniczych zależy w dużej mierze od obowiązującego stanu prawnego i praktyk stosowanych w różnych krajach. Badanie próbek zielonych preparatów leczniczych pozyskanych ze zidentyfikowanych zielonych punktów sprzedaży detalicznej w Kadunie w Nigerii wykazało wysoki stopień zanieczyszczenia wieloma różnorodnymi rodzajami mikroorganizmów patogennych.¹⁹ W sumie przebadano 150 preparatów, z czego aż 46,67% było skażonych bakterią *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis* i *Salmonella typhimurium* 19,33%, 58,67% *Escherichia coli*, a 65,33% *Staphylococcus aureus*. Wyniki całkowitej liczby bakterii tlenowych wykazały, że najwyższą średnią liczbę $> 5 \times 10^7$ CFU/g stwierdzono w 89 (59,33%), natomiast średnią liczbę $\leq 5 \times 10^7$ CFU/g stwierdzono w 42 (28%) preparatach. Jedynie w 19 (12,67%) preparatach nie stwierdzono skażenia przekraczającego dozwolone normy.

Wyniki badań próbek domowych i komercyjnych preparatów zielonych zebranych od pacjentów w Brazylii dały podobne rezultaty.¹⁹ Wzrost bakterii stwierdzono w 51,5% próbkach, a wzrost grzybów w 35,6% próbkach. Limity bezpieczeństwa były przekroczone w 31,8% próbkach preparatów zielonych, praktycznie w równej ilości w preparatach przygotowywanych w warunkach domowych jak i komercyjnych (16,7% *versus* 15,1%). Najczęściej izolowane

bakterie to: *Staphylococcus aureus* (49,2%), *Salmonella* spp. (34,8%), *E. coli* (25,8%) i *Pseudomonas aeruginosa* (14,4%).

Z kolei badanie przeprowadzone w Niemczech oceniło zanieczyszczenie mikrobiologiczne produktów przygotowanych ze świeżych warzyw i ziół, produkowanych metodami ekologicznymi i konwencjonalnymi, dostępne w sprzedaży detalicznej.¹⁵ Bakterie z rodzaju *Enterobakterii* oraz *Pseudomonas* były dominującymi mikroorganizmami i zostały wykryte we wszystkich próbkach. Szczepy *E. coli* wykryto w 9 próbkach żywności innej niż zioła i 25 próbkach ziół (33,3%). Stwierdzono istotne różnice w liczbie bakterii pomiędzy produktami z upraw konwencjonalnych i ekologicznych: w ziołach liczba pleśni była istotnie wyższa w produktach z upraw ekologicznych, podczas gdy *E. coli* wykryto tylko w produktach z upraw konwencjonalnych. W próbkach żywności opartej na roślinach uprawianych konwencjonalnie liczba grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych była znacznie wyższa. *Salmonella enterica* – *Salmonella enteritidis* została wykryta tylko w dwóch próbkach analizowanej w tym badaniu żywności (sałatki warzywno-ziołowe), opartej na składnikach pochodzenia roślinnego, uprawianych konwencjonalnie i w jednej próbce sałaty wyprodukowanej metodami ekologicznymi (2,6%). W świeżych składnikach sałatek warzywnych i ziołach nie wykryto gronkowców koagulazo - dodatnich. Wysokie poziomy *Bacillus cereus sensu lato* wykryto w 19 produktach warzywnych (16,7%) i w 55 próbkach świeżych ziół (73,3%). *Listeria monocytogenes* nie została znaleziona na świeżych ziołach; jednakże trzy szczepy *L. monocytogenes* wyizolowano z dwóch konwencjonalnie wyprodukowanych próbek sałatek.

W Polsce pozyskiwanie ziół ze stanu naturalnego regulują akty prawne dotyczące ochrony roślin oraz akty prawne Wspólnoty Europejskiej w zakresie ekologicznej produkcji rolniczej. Zbiór surowców leczniczych prowadzony jest na wybranych stanowiskach w miejscach ekologicznie czystych, aby zapewnić wysoką jakość surowca przekładającą się na wysoką jakość ziół i preparatów ziołowych.^{20,21}

Czynniki wpływające na jakość mikrobiologiczną surowca zielarskiego przedstawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3. Czynniki determinujące jakość mikrobiologiczną ziół.¹⁸

Wiele drobnoustrojów oddziałujących na organizmy roślinne to chorobotwórcze patogeny, które poprzez wzbudzenie stresu biotycznego upośledzają ich wzrost i reprodukcję. Rośliny, aby efektywnie radzić sobie z atakiem czynnika szkodliwego wytworzyły dwutorowy system immunologiczny, który w sposób konstytutywny lub indukowany zwraca się przeciwko zagrażającemu im patogenowi. Poniżej opisano budowę i funkcje roślinnego układu odpornościowego.

3.1.1 Dekontaminacja

Dzięki procesowi dekontaminacji mikrobiologicznej można obniżyć liczbę drobnoustrojów w surowcach zielarskich do takiego poziomu, że transmisja zakażenia patogenem zostaje ograniczona do minimum lub całkowicie niemożliwa – w odróżnieniu od sterylizacji, podczas której dochodzi do całkowitego usunięcia drobnoustrojów, ze sporami i formami przetrwalnikowymi włącznie.¹⁸ Jednakże proces dekontaminacji musi być przeprowadzany zgodnie z wytycznymi i dyrektywami Unii Europejskiej oraz zasadami prawa krajowego, aby uniknąć zanieczyszczenia ziół związkami toksycznymi dla ludzi oraz takimi, które mogą zmienić ich właściwości fitoterapeutyczne i/lub sensoryczne.^{12,22,23,24}

W procesie dekontaminacji wykorzystuje się metody chemiczne lub fizyczne. Metody chemiczne, stosowane w postaci gazu, plazmy gazowej lub cieczy, wykazują się wysoką skutecznością w zakresie obniżenia poziomu drobnoustrojów w surowcu, ale wiele metod dekontaminacji prowadzi do utraty olejków eterycznych, obniżenia jakości, zmiany charakterystyki surowca i/lub powstania toksycznych związków po dekontaminacji. Z tego względu niektóre z nich wycofano.^{25,26} Fizyczne usuwanie obejmuje przepuszczanie roztworów lub gazów przez filtr zdolny do zatrzymywania mikroorganizmów oraz promieniowanie i zastosowanie skrajnych temperatur, chemiczne natomiast oparte jest na stosowaniu związków chemicznych uszkadzających drobnoustroje. Metody dekontaminacji można również podzielić na: tradycyjne, polegające na stosowaniu takich substancji jak: etanol, formaldehyd, fumigacja siarkowa, bromek metylu czy tlenek etylenu, a także zastosowaniu promieniowania jonizującego, mikrofalowego, ultrafioletowego, ekstruzji, pary wodnej, tyndalizacji czy wysokiego ciśnienia oraz metody alternatywne, do których zalicza się ozonowanie i wykorzystanie plazmy.²⁵

3.1.1.1 Dekontaminacja – metody chemiczne

Wśród metod chemicznych wyróżnia się procedury oparte o chemikalia w postaci gazu, plazmy gazowej lub cieczy. Metody chemiczne schematycznie przedstawiono na Rysunku 4.



Rysunek 4. Chemiczne metody dekontaminacji.¹⁸

Fumigacja, czyli gazowanie, jest techniką, podczas której materiał roślinny jest traktowany związkiem gazowym bezpośrednio zabijającym drobnoustroje, takie jak wirusy, bakterie, grzyby drożdżopodobne oraz pleśniowe. W odniesieniu do surowców roślinnych powinna być przeprowadzana na wczesnym etapie ich obróbki.²⁷ Fumigację przeprowadza się w zamkniętych pomieszczeniach, tj. w specjalnych komorach fumigacyjnych. Do tego rodzaju dekontaminacji wykorzystuje się szereg fumigantów o różnym stopniu efektywności i toksyczności. Komitet ds. Ziołowych Produktów Leczniczych (Committee on Herbal Medicinal Products, HMPC) działający w ramach EMA zauważa, że jakość ziołowych produktów leczniczych zależy m.in. od jakości wyjściowego materiału roślinnego. Stosowanie tlenu etylenu do dekontaminacji substancji ziołowych jest zabronione w Europie od 31 grudnia 1989 z powodu jego toksyczności. Długotrwałe narażenie na tlenek etylenu może zwiększyć ryzyko zachorowania na białaczkę, rozwoju guzów mózgu i innych nowotworów, a także może powodować uszkodzenie chromosomów i zaburzać funkcjonowanie układu rozrodczego. Natomiast bromek metylu, jeden z najczęściej stosowanych fumigantów, jest obecnie wycofywany na całym świecie zgodnie z Protokołem Montrealskim 1992, ponieważ jest to substancja zubożająca warstwę ozonową klasy I. Dla ludzi jest najbardziej niebezpieczny w miejscu fumigacji. Narażenie ludzi na wysokie stężenia bromku metylu może powodować niewydolność ośrodkowego układu nerwowego i układu oddechowego, a także uszkadzać płuca, oczy i skórę.²⁸

Fumigacja dwutlenkiem siarki, popularnie nazywana fumigacją siarkową, jest popularną metodą suszenia i dekontaminacji ziół stosowanych w tradycyjnej medycynie chińskiej. Fumigacja siarką stała się tanią alternatywą dla suszenia korzeni roślin leczniczych na słońcu, choć podnoszone są zastrzeżenia odnośnie bezpieczeństwa tego procesu i jego wpływu na obniżenie wartości leczniczych surowca. Fumigacja jest procesem szybszym i tańszym, szczególnie przy zastosowaniu do surowców posiadających duże ilości wody. Meta-analiza

wykonana przez Liu i wsp.²⁹ pozwoliła na identyfikację 16 badań oceniających wpływ fumigacji siarką na skuteczność i bezpieczeństwo ziół leczniczych. Wykazano, że proces ten zmniejszał skuteczność ziół modulujących działanie układu odpornościowego, co przypisano utracie zawartości składników aktywnych w dekontaminowanym surowcu. Fumigacja siarką zwiększała toksyczność ziół leczniczych, głównie hepatotoksyczność, co może wynikać z pozostałości dwutlenku siarki i metali ciężkich po fumigacji oraz generowania pochodnych siarki i toksycznych metabolitów. Dodatkowym efektem fumigacji siarką jest wybielenie korzeni i kłaczy roślinnych, które prowadzi do podniesienia walorów wizualnych surowca kosztem jego faktycznej jakości leczniczej. Z tego powodu chińska farmakopea zabroniła od 2005 roku fumigacji siarką w celu bielenia ziół używanych w tradycyjnej medycynie chińskiej.^{30,31} Niemniej jednak nie opracowano norm ilościowych ani przepisów dotyczących dopuszczalnych poziomów dwutlenku siarki w ziołach.³²

Ozonowanie stosuje się od 1840 roku, m.in. do konserwacji żywności. Zastosowania ozonu w kolejnych latach objęły przetwarzanie żywności, wodolecznictwo, stomatologię i inne dziedziny medycyny.^{33,34,35,36} Obecnie wykorzystywany jest do dezynfekcji, również w medycynie, ze względu na szeroki zakres działania przeciwko bakteriom zarówno Gram-dodatnim, jak i Gram-ujemnym, a także grzybom i wirusom. W literaturze dostępne są opisy wielu różnych urządzeń do dezynfekcji, sposobów aplikacji i generatorów ozonu. Badania dokumentują również różną skuteczność w zależności od stężenia tego gazu, relatywnej wilgotności, pH, zawartości materii organicznej oraz innych parametrów dezynfekowanego obiektu.³⁷ W ocenie skuteczności ozonowania trzeba brać też pod uwagę rodzaj drobnoustroju, który ma być usunięty. W przypadku grzybów pleśniowych i drożdżopodobnych, ozon hamuje wzrost ich komórek na różnych etapach rozwoju, a w przypadku wirusów, ozon uszkadza kapsyd wirusa i zakłóca cykl reprodukcyjny. Dodatkowo, zasadą jest, że komórki wegetatywne są bardziej wrażliwe niż zarodniki, a zatem bakterie są bardziej wrażliwe niż grzyby drożdżopodobne i pleśniowe. Natomiast wśród bakterii, Gram-dodatnie są bardziej wrażliwe niż Gram-ujemne ze względu na różnice w budowie ściany komórkowej.^{25,38}

Dekontaminacja ozonem znajduje swoje zastosowanie nie tylko w obróbce żywności, ale również surowców roślinnych, wykorzystywanych do produkcji suplementów diety czy leków ziołowych. Proces ten musi być jednak dopasowany do rodzaju surowca, aby zminimalizować utratę korzystnych właściwości materiału.³⁹ Jedne z pierwszych prac omawiały analizę badań nad surowcami wykorzystywanymi w tradycyjnej medycynie chińskiej, i na tej podstawie sformułowano wnioski, że metodę ozonowania można stosować na różnych etapach produkcji.^{30,37}

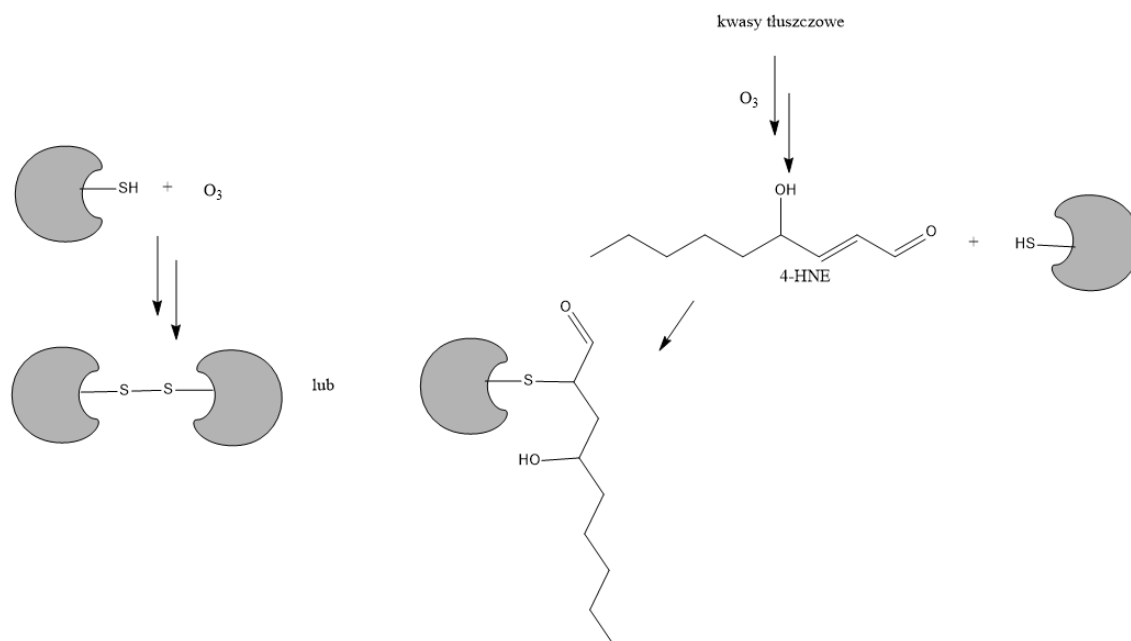
W badaniu wpływu ozonowania na pieprz (*Piper nigrum* L) stwierdzono, że ozonowanie

mielonego czarnego pieprzu spowodowało utlenienie niektórych składników olejku lotnego, podczas gdy obróbka termiczna nie miała znaczącego wpływu na składniki olejku lotnego całego ziarna pieprzu.^{27,40} W przypadku kardamonu (*Elettaria cardamomum* L.) doszło do obniżenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej.¹⁹

Mechanizm działania ozonu opisują w swojej pracy z 2018 roku również Giuliani G., Ricevuti G., Galoforo A. i Franzini M.⁴¹ Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ozonu jest dość selektywna, ograniczająca się w większości do reakcji z:^{41,42,43}

- a) nienasyconymi wiązaniami poprzez cykl addycji do wiązań podwójnych;
- b) grupami sulfhydrylowymi, licznie występujących w enzymach drobnoustrojów. Może wyjaśniać szybką inaktywację mikroorganizmów i zarodników bakterii przez ozon;
- c) polisacharydami prowadząc do rozerwania wiązań glikozydowych i powstania kwasów alifatycznych i aldehydów;
- d) pierwszorzędowymi i drugorzędowymi alkoholami alifatycznymi może prowadzić do powstania hydroksywodorodotlenków, prekursorów rodników hydroksylowych, które z kolei silnie reagują z węglowodorami;
- e) degradacji peptydoglikanu, a w szczególności *N*-acetyloglukozaminy (występującej w ścianach komórkowych bakterii zarówno Gram-(+) i Gram-(-) oraz w kapsydach wirusów);
- f) aminokwasami i peptydami;
- g) nienasyconymi kwasami tłuszczowymi poprzez relatywnie łatwe utlenienie i powstanie produktów cyklicznej addycji;
- h) zasadami azotowymi występującymi w kwasach nukleinowych, zwłaszcza tyminą, guanina i uracyl. Reakcja ozonu z nukleotydami uwalnia jony węglowodanowe i fosforanowe.

Mechanizm działania ozonu zaproponowali Cenci i wsp. 2022.⁴⁴ Udowodnili oni powstanie dimerów białkowych (poprzez grupy tiolowe) oraz reakcję z 4-hydroksynonenalem (4-HNE) powstającym w procesie degradacji kwasów tłuszczowych uwalnianych z dwuwarstwy lipidowej komórki. Rysunek 5 przedstawia schematyczny mechanizm działania ozonu na błonę komórkową komórki bakteryjnej.



Rysunek 5. Degradujące działanie ozonu na kwasy tłuszczowe uwalniane z dwuwarstwy lipidowej komórki.

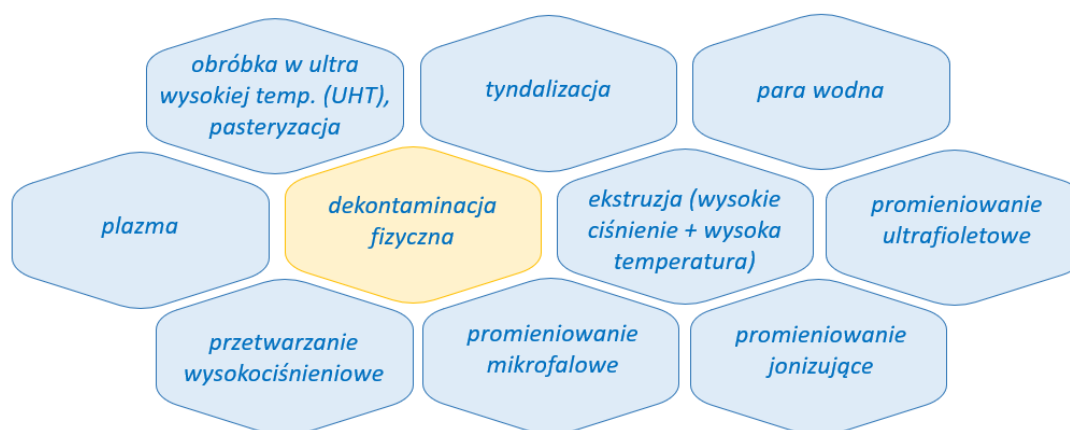
Użycie **formaldehydu**, który może być wykorzystywany w formie płynnej lub gazowej, jest niezwykle skuteczną technologią do chemicznego usuwania zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Formaldehyd, inaczej metanal lub formalina, jest związkiem syntetycznym otrzymywanym z metanolu, ale może też powstawać w czasie ogrzewania żywności bogatej w białko. Formaldehyd jest najczęściej dostępny w handlu jako 30-50% roztwór wodny, powszechnie określany jako formalina. Formaldehyd jest używany do konserwacji i dezynfekcji np. leków dla ludzi i zwierząt oraz materiałów biologicznych (szczepionki wirusowe zawierają 0,05% formaliny jako czynnik inaktywujący), do dezynfekcji oddziałów szpitalnych oraz do konserwacji i balsamowania próbek biologicznych. Formaldehyd i leki zawierające formaldehyd są również stosowane w stomatologii.⁴⁵ Formaldehyd w formie gazowej wykazuje się wysoką skutecznością bakteriobójczą i sporobójczą – najwyższą w relatywnej wilgotności 90-95%, w temperaturze 40-45°C.⁴⁶ Niemniej jednak po dezynfekcji formaldehydem w formie gazowej obserwuje się znaczną ilość formaldehydu rezydualnego. Ilość ta zależy od charakterystyki dezynfekowanego materiału.⁴⁷ Formaldehyd, charakteryzując się wysoką toksycznością, nie jest substancją obojętną dla człowieka. Ma on właściwości karcenogenne, może wywoływać alergie kontaktowe i astmę u osób z narażeniem zawodowym na tą substancję.^{48,49,50,51,52}

Formaldehyd nie jest stosowany do żywności, ale jego potencjał do usuwania zanieczyszczenia z ziół jest ograniczony jego toksycznością. Dopuszczalne dzienne stosowanie formaldehydu nie może przekraczać 0,15 mg/kg masy ciała.⁵³ Dodatkowym minusem tej metody dezynfekcji jest znaczne zmniejszenie ilości olejków eterycznych w surowcach roślinnych.¹⁹

Etanol (alkohol etylowy) może być używany do konserwacji jak i dekontaminacji. Etanol w stężeniu 60-95% ma wysokie działanie bakteriobójcze i grzybobójcze wobec form wegetatywnych; działanie to widoczne jest również przy niższych stężeniach, nawet 20%, z tym, że efektywność zależna jest nie tylko od stężenia, ale również od czasu ekspozycji, temperatury i rodzaju patogenu. Etanol jest nieskuteczny wobec zarodników bakterii.²⁵ Alkohol etylowy może być wytworzony w produkcji w sposób naturalny w wyniku fermentacji alkoholowej lub sztucznie dodany w postaci 96% w celu konserwacji produktu.⁵⁴

3.1.1.2 Dekontaminacja – metody fizyczne

Wśród metod fizycznych wyróżnia się metody wykorzystujące czynniki fizyczne, pod wpływem których dochodzi do niszczenia drobnoustrojów i/lub ich zarodników. Wyróżnia się wśród nich działanie skrajnym poziomem temperatur lub ciśnienia oraz różnego rodzaju promieniowania. Schematyczne przedstawienie fizycznych metod dekontaminacji znajduje się na Rysunku 6.



Rysunek 6. Fizyczne metody dekontaminacji.⁵⁵

Obróbka cieplna za pomocą wysokiej temperatury ma na celu konserwację poprzez termiczną degradację błony komórkowej drobnoustrojów i składników komórek drobnoustrojów. Metoda ta jest popularna do konserwowania żywności, szczególnie mleka i produktów mlecznych. W przemyśle wykorzystywanych jest kilka technik obróbki cieplnej:^{54,56}

- obróbka w ultrawysokiej temperaturze (ultrahigh temperature, UHT) sterylizuje płynny produkt w temperaturze 135-150°C przez 2-20 s;
- pasteryzacja krótkotrwała w wysokiej temperaturze (high-temperature short-time, HTST) sterylizuje płynny produkt w temperaturze 72°C lub wyższej przez 15 s lub dłużej;
- pasteryzacja niskotemperaturowa długoczasowa (low-temperature long-time, LTLT) prowadzona w temperaturze około 60°C przez 30 min.

W odniesieniu do ziół lub ziołowych produktów leczniczych, krótkotrwałą obróbkę cieplną w wysokiej temperaturze lub pasteryzację można przeprowadzić przed dalszą obróbką surowców zielarskich w celu zminimalizowania skażenia mikrobiologicznego. Takie zabiegi mogą być nieodpowiednie dla ekstraktów o dużej zawartości substancji żywicznych, ekstraktów o wysokiej lepkości (suchej pozostałości powyżej 50%) lub ekstraktów o składnikach termolabilnych lub lotnych.²⁷

Tyndalizacja (pasteryzacja funkcjonalna) jest formą sterylizacji termicznej. Proces polega na trzykrotnym podgrzewaniu surowca lub produktu do temperatury około 100°C przez 20-30 minut co 24 godziny. Tyndalizacja zakłada, że w pierwszym etapie niszczone są formy wegetatywne, a w następnych etapach formy wegetatywne, które przetrwały jako spory w pierwszych etapach. Tyndalizacja jest skuteczną metodą usuwania zagrożenia mikrobiologicznego, ale może mieć wpływ na zmianę koloru surowca.⁵⁷

Sterylizacja parą wodną jest kolejną formą sterylizacji termicznej, którą prowadzi się w specjalnych urządzeniach (autoklawach) w temperaturze 121-123°C przez 15-30 min w nasyconej parze wodnej pod nadciśnieniem powyżej 100 kPa. Zastosowanie nasyconej pary wodnej skutkuje hydrolizą, denaturacją i koagulacją enzymów i struktur komórkowych.⁵⁴ Jeśli wykorzystuje się parę wodną do zmniejszenia zanieczyszczenia mikrobiologicznego materiału roślinnego, materiał ten należy wysuszyć natychmiast po tego typu dekontaminacji, gdyż nawet niewielkie pozostałości wody mogą mieć wpływ na kolejne etapy przetwarzania.²⁷ Należy podkreślić, że sterylizacja (higienizacja) parą wodną jest jednym z najbardziej popularnych procesów kontroli zanieczyszczeń mikrobiologicznych ziół.

Ekstruzja, czyli proces wytlaczania na gorąco, to proces charakteryzujący się równoczesnym i krótkotrwałym działaniem wysokiej temperatury (120-200°C) i wysokiego ciśnienia (20 MPa).^{19,58} Technologia ta jest szeroko stosowana w przemyśle rolno-spożywczym, jednak wpływa na zmianę właściwości fizycznych i chemicznych przetwarzanego produktu, a także wpływa na zmianę jego jakości. Z tego powodu stosowany jest najczęściej dla nutraceutyków, które oferowane są w postaci wytłoczonych tabletek. Zmiana walorów fizycznych zwiększa biodostępność składników bioaktywnych, ale z tego powodu proces rzadko stosowany jest w przetwarzaniu ziół. Ekstruzję prowadzi się w ekstruderach, czyli cylindrach z umieszczonym w środku ślimakiem. W trakcie przetwarzania surowca materiał jest mieszany, zagęszczany, ściskany, upłynniany i uplastyczniany. Taką obróbkę wykorzystuje się przy produkcji np. skrobi, suchych przekąsek i karmy dla zwierząt.⁵⁸ Ekstruzja stosowana jest też przy produkcji preparatów ziołowych, np. przy obróbce owoców morwy, które są bogatym źródłem antocyjanów o korzystnym działaniu biologicznym. Podczas obróbki wodnej antocyjany stają się niestabilne, co obniża ich biodostępność. Natomiast stałe preparaty

wyłoczone z morwy zawierają dużą liczbę dostępnych antocyjanów nawet po inkubacji przez 180 minut w układzie płynów jelitowych. Tak więc proces ten zwiększa rozpuszczalność antocyjanów w wodzie i ich stabilność zapewniając przedłużone uwalnianie.⁵⁹

Efektywność mikrobiologiczna ekstruzji oparta jest na połączeniu skutków oddziaływania na komórkę bakteryjną wysoką temperaturą, co powoduje jej odwodnienie oraz wysokiego ciśnienia, co z kolei prowadzi do pęknięcia błony komórkowej.⁶⁰

Napromienianie powinno być ograniczone do wyjątkowych sytuacji, kiedy żadna inna metoda nie jest możliwa. Przy przetwarzaniu surowców należy zwracać uwagę na substancje zielone importowane z krajów trzecich, które mogły zostać napromieniowane, ale nie zostało to zgłoszone lub odpowiednio udokumentowane. Dlatego należy ustanowić odpowiedni test w celu wykrycia ewentualnego napromieniowania dla substancji zielonych z niepewnego źródła. W tej technice wykorzystywane są trzy rodzaje promieniowania jonizującego.⁶¹

promieniowanie gamma, czyli wysokoenergetyczne fotony, które generowane jest podczas spontanicznej emisji fotonów przez jądro izotopu promieniotwórczego podczas jego rozpadu (promienie gamma kobaltu-60, rzadziej cezu-137); dozwolona dawka wynosi od 2 do 10 kGy, promienie rentgenowskie (X) to fale elektromagnetyczne emitowane przez głębokie warstwy atomów i jest generowane podczas wyhamowywania elektronów. Długość fali wynosi od 0,01 do 10 nm; dozwolona dawka: 5 MeV,

Promieniowanie beta lub przyspieszone wiązki elektronów to przemieszczenie elektronów wytworzonych przez promieniotwórcze jądra atomowe podczas przemiany jądrowej; dozwolona dawka: 10 MeV.

Skuteczność dekontaminacji promieniowaniem jonizującym uzależniona jest od kilku czynników, m.in. rodzaju surowca oraz liczby i rodzaju drobnoustrojów, a także od zastosowanej dawki promieniowania. Ogólnie wegetatywne formy bakterii są bardziej wrażliwe na promieniowanie jonizujące niż grzyby drożdżopodobne i pleśniowe, a liczbę zarodników można również zmniejszyć za pomocą promieniowania rentgenowskiego i promieniowania gamma.²⁷ Użycie promieniowania regulowane jest dyrektywami unijnymi, gdyż substancje emitujące promieniowanie jonizujące są promieniotwórcze.⁶²

Efektywność procesu dekontaminacji macierzanki (*Thymus satureioides*), zioła wykorzystywanego w Maroku do przygotowywania herbaty, promieniowaniem gamma w niskich dawkach poniżej 1 kGy zostało zbadane przez Mostafa i wsp.⁶¹ Po dekontaminacji stężenie niektórych związków bioaktywnych uległo zmianie w sposób zależny od dawki. Zaobserwowano wzrost stężenia borneolu i β -kariofilenu (8,59%), nieznaczna zmiana nastąpiła w stosunku do tymolu i tlenu kariofilenu, natomiast stężenie karwakrolu, *p*-cymenu i kamfory uległo znacznemu zmniejszeniu. Promieniowanie nie miało wpływu na degradację barwnika. Nie

było różnicy w stężeniu izotopu uranu 238) i toru 232 porównując surowiec napromieniany i nienapromieniany.

Napromienianie wiązką elektronów w celu usunięcia zanieczyszczenia biologicznego z alg *Spirulina platensis* zostało zbadane przez Brasoveanu i wsp.⁶³ Potencjał antyoksydacyjny ekstraktu wykazywał akceptowalny spadek przy napromienianiu dawką do 10 kGy, a hamowanie hialuronidazy było zaburzone nawet przy napromienianiu małymi dawkami. Pomiar spektroskopowe nie wykazały istotnych modyfikacji dla dawek do 10 kGy. Liczba kolonii bakteryjnych spadała wraz ze wzrostem dawki napromieniania, jednak przy dawce 20 kGy nie stwierdzono żadnego zanieczyszczenia mikrobiologicznego, a dekontaminacja dawkami 5 kGy i 10 kGy pozostawiała dopuszczalny poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego.

Van Calenberg i wsp.⁶⁴ porównali dekontaminację za pomocą promieni X i napromieniania wiązką elektronów trzech rodzajów powszechnie stosowanych przypraw: pieprzu białego, słodkiej papryki i gałki muskatołowej. Dla testowanych przypraw suchych nie stwierdzono większych różnic w zakresie efektywności między dwiema technikami napromieniania. Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy widmami próbek napromieniowanych elektronami lub promieniami rentgenowskimi. Pomimo że promienie rentgenowskie są skuteczną metodą dekontaminacji, to większość energii potrzebnej do ich wytworzenia jest tracona w postaci ciepła, co oznacza, że efektywność odwrócenia energii jest stosunkowo niska. W związku z tym promienie rentgenowskie z powodu wysokich kosztów procedury nie są atrakcyjne na skalę przemysłową.²⁵

Przetwarzanie wysokociśnieniowe (high pressure processing, HPP), znane również jako przetwarzanie pod wysokim ciśnieniem hydrostatycznym i ultrawysokim ciśnieniem, to metoda przetwarzania, w której materiał poddawany jest działaniu podwyższonego ciśnienia do 1000 MPa (145 000 psi) przy użyciu medium przenoszącego ciśnienie (np. woda lub inne płyny). Proces służy do dezaktywacji lub zabicia mikroorganizmów przy zachowaniu właściwości organoleptycznych takie jak świeżość, smak i kolor materiału roślinnego. Przetwarzanie wysokociśnieniowe jest odpowiednie dla surowców wrażliwych na inne metody takie np. wysoka temperatura lub substancje chemiczne. Proces ten może być również wykorzystany do dezaktywacji lub aktywacji enzymów. Mechanizm działania wysokiego ciśnienia nie jest do końca poznany. Uważa się, że proces kompresji indukuje pęknięcie błony komórkowej i przemiany makrocząsteczkowe, m.in. denaturację białka. Ograniczeniem tej metody jest fakt, że subaeralnie uszkodzone drobnoustroje mogą się zregenerować i namnażać, gdy znajdą odpowiednie warunki podczas późniejszego przetwarzania i przechowywania. Zjawisko to może prowadzić do przeszacowania redukcji drobnoustrojów, a kontrola mikrobiologiczna przeprowadzona bezpośrednio do dekontaminacji ciśnieniowej może być nieadekwatna. Przetwarzanie

ciśnieniowe można być wykorzystywane do produktów stałych i cieczy, jak również do produktów pakowanych. Ciśnienie działa natychmiast i jednolicie w całym produkcie, co jest zaletą tej metody. Aby zoptymalizować proces i zindywidualizować go do rodzaju produktu i patogenu odpowiednio dobiera się pozostałe parametry procesu takie jak temperatura i czas (np. temperatura otoczenia, chłodzenia lub zamrażania i czas ekspozycji od milisekund do ponad 20 minut).²⁷

Efektywność przetwarzania wysoko ciśnieniowego została oceniona przez Neetoo i wsp.⁶⁵ Celem ich pracy było zbadanie przeżywalności i wzrostu bakterii *Salmonella* spp. i *E. coli* O157:H7 w szczypiorku podczas zastosowania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego do dekontaminacji. Przetwarzanie wysokociśnieniowe zaszczepionego bakteriami szczypiorku w warunkach suchych, na krótko zanurzonych w wodzie lub zanurzonych w wodzie na 30 min przy ciśnieniu 250-500 MPa przez 2 min w 20°C zmniejszyło populację *Salmonella* spp. oraz *E. coli* o 0,6 do >5 log CFU/g, w zależności od poziomu ciśnienia i stanu wilgotności próbki. Im mniej wody było w surowcu i im wyższa temperatura, tym ciśnienie było bardziej efektywne. Ogólnie po obróbce ciśnieniowej w 400-450 MPa (zanurzone w wodzie) lub 450-500 MPa (zwilżone) przez czas retencji 2 min w 20-40°C, dzięki i odporne na antybiotyki zmutowane szczepy *Salmonella* spp. i *E. coli* O157:H7 inokulowane na szczypiorku były niewykrywalne natychmiast po dekontaminacji jak i podczas 15-dniowego przechowywania w temperaturze 4°C.

Promieniowanie ultrafioletowe (UV) używane jest od dawna w przemyśle spożywczym. Sterylizacja promieniowaniem UV pozwala szybko i skutecznie zneutralizować mikroorganizmy. Promieniowanie UV to promieniowanie elektromagnetyczne niewidzialne dla człowieka. W zależności od skutków działania promieni UV na organizmy żywe wyróżnia się promieniowanie UV-A o długości fali od 315 do 380 nm, UV-B o długości fali od 280 do 315 nm i UV-C o długości fali od 100 do 280 nm.⁶⁶ W sterylizacji wykorzystuje się głównie promienie UV-C, które bezpośrednio uszkadzają strukturę kwasów nukleinowych organizmów żywych, w tym bakterii i wirusów, choć nie wykazują wybiórczej aktywności biobójczej. Sterylizacja jest skuteczna, jeżeli promieniowanie UV-C dociera do jak największej części odkażanego materiału. Kozak-Kalita i wsp.⁶⁷ zbadali czystość mikrobiologiczną wybranych gatunków ziół poddanych działaniu promieniowania UV-C. Próbkę ziół o wadze 1 g rozprowadzono cienką warstwą w pojemniku, a następnie poddano działaniu promieniowania UV-C przez 60, 120 i 180 s. Badanie wykazało zwiększenie czystości mikrobiologicznej badanych ziół w stosunku do próby kontrolnej o 37% dla tymianku pospolitego, 73% dla czystka lekarskiego i o 30% dla pokrzywy zwyczajnej. Dogu-Baykut i Gunes⁶⁸ wykorzystali promieniowanie UV-C do dekontaminacji tymianku pospolitego (*Thymus vulgaris* L.).

o wadze 10 g umieszczono w szklanej rurce w warunkach fluidyzacyjnych i poddawano sterylizacji przez 16, 32, 64 i 128 min. Wyniki tego badania wykazały, że promieniowanie UV-C może zmniejszyć obciążenie mikrobiologiczne tymianku bez istotnego wpływu na parametry fizyczne, chemiczne i sensoryczne.

Promieniowanie mikrofalowe należy do powszechnych metod przetwarzania żywności. Mikrofałe to promieniowanie elektromagnetyczne o długości fali klasyfikowanej pomiędzy falami podczerwonymi a falami ultrakrótkimi. Działanie mikrofalami powoduje wytworzenie wyższej temperatury wewnątrz produktu w porównaniu do tej na jego powierzchni. Dodatkową cechą jest zjawisko elektroosmozy, które w podgrzewanych cieczach wywołuje ruch wody ku powierzchni, co sprzyja jej odparowywaniu.⁵⁶ Mikrofałe skutecznie usuwają skażenie mikrobiologiczne. Przeprowadzono porównanie efektywności usuwania zanieczyszczenia mikrobiologicznego promieniowaniem gamma i promieniowaniem mikrofalowym oraz wpływu dekontaminacji na jakość pieprzu czarnego.⁶⁹ Sproszkowany czarny pieprz został napromieniowany różnymi zalecanymi dawkami promieniowania gamma (5,0 i 10,0 kGy) oraz mikrofalami przez różne okresy czasu (20, 40 i 75 s) w celu poprawy jego jakości higienicznej. Zastosowane dawki promieniowania gamma były wystarczające do zmniejszenia liczby bakterii tworzących zarodniki oraz zahamowania namnażania się grzybów i bakterii *E. coli*, które zanieczyszczały proszek z czarnego pieprzu. Dekontaminacja promieniami mikrofalowymi przez 40 s i 75 s miała taką samą skuteczność, podczas gdy odkażanie prowadzone jedynie przez 20 s było mniej skuteczne. Usuwanie skażenia mikrobiologicznego z pieprzu czarnego za pomocą promieni mikrofalowych nie powoduje dużej utraty walorów smakowych w porównaniu z zalecanymi dawkami promieniowania gamma. W innym badaniu, Chua i wsp.⁷⁰ oceniali aktywność przeciwutleniającą oraz zawartość substancji lotnych i fitosteroli w wysuszonym *Strobilanthes trobilanthes* (*Strobilanthes crispus*), które wykorzystywane jest do produkcji herbaty w Azji Południowo-Wschodniej. Surowiec został poddany obróbce suszenia metodami konwencjonalnymi i próżniowego suszenia mikrofalowego. Oceniano zawartość β -sitosteroli (fitosterole) i kwasu α -linolenowy (kwasy tłuszczowe), których zawartość była najwyższa w ziele *Strobilanthes crispus*. Największą zawartość fenoli uzyskano podczas suszenia konwencjonalnego w temperaturze 60°C, ale największą aktywność antyoksydacyjną uzyskano podczas suszenia konwencjonalnego w 40°C i mikrofalowego suszenia próżniowego (*vacuum microwave drying*, VMD) przy 9 W/g. Natomiast najwyższą całkowitą zawartość substancji lotnych i fitosteroli uzyskano podczas suszenia konwencjonalnego w temperaturze 50°C i VMD przy 9 W/g. Badanie to wykazało, że zarówno suszenie konwencjonalne jak i mikrofalowe były skuteczne w wytwarzaniu wysoce bioaktywnego surowca *Strobilanthes crispus*.

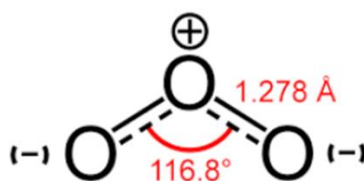
Plazma jest jedną z nietermicznych technologii, która zdobywa w ostatnim czasie duże zainteresowanie. Plazma jest częściowo lub całkowicie zjonizowanym gazem i jest uważana za czwarty stan skupienia. Proces dekontaminacji plazmą może być prowadzony w wysokiej lub niskiej temperaturze. Do wytworzenia zimnej plazmy atmosferycznej można użyć kilku różnych gazów, takich jak hel, argon, azot, helioks i powietrze. Istnieje wiele metod wytwarzania zimnej plazmy atmosferycznej, jednak każda z nich jest unikalna i może być stosowana w różnych obszarach biomedycznych.⁷¹ W jednym z badań, woda aktywowana plazmą (*plasma activated water*, PAW) wytworzona za pomocą strumienia plazmy powietrznej pod ciśnieniem atmosferycznym została wykorzystana do inaktywacji bakterii *E. coli* zaszczipionej na powierzchni ziaren soi. Proces dekontaminacji trwający 25 minut pozwolił na zmniejszenie *E. coli* (z 6,8 do 3,6 log₁₀ CFU/g), a jego działanie przeciwbakteryjne utrzymywało się przez kolejne 44 godziny. Dodatkowo proces dekontaminacji plazmą doprowadził do powstania znacznej ilości azotynów i azotanów, które spowodowały gwałtowny spadek wartości pH.³⁷

3.2. Ozon – budowa cząsteczki i właściwości chemiczne

Ozon - tritlen lub **trójtlen** (O₃) jest **alotropową, trójatomową odmianą tlenu**.^{91,92} Powstaje w wyniku reakcji fotochemicznych w stratosferze, w warunkach wyładowań wysokiego napięcia łuków elektrycznych, w smogu fotochemicznym i obecności światła ultrafioletowego (UV).⁹³ Z chemicznego punktu widzenia proces tworzenia ozonu wygląda następująco:⁹⁴

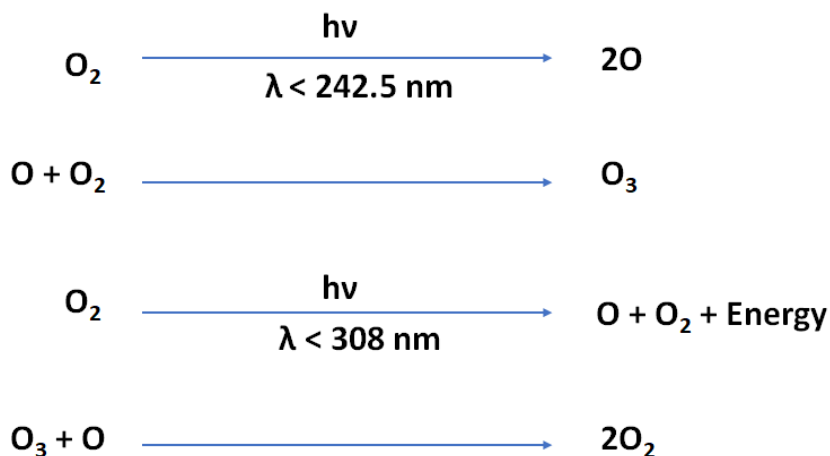


Ozon jest gazem silnie reaktywnym o właściwościach utleniających.⁹³ Cecha ta jest wynikiem ze specyficznej budowy jego cząsteczki. W powłoce walencyjnej każdego z atomów znajdują się dwa niesparowane elektrony, z których każdy zajmuje jeden orbital 2p. Oznacza to, że podczas jego tworzenia łączą się trzy atomy tlenu, z centralnym tlenem przegrupowanym w płaszczyźnie sp² od 2s i dwóch 2p orbitali atomowego pasma walencyjnego.⁹⁵ Dzięki temu przegrupowaniu trzy nowe sp² orbitale hybrydowe tworzą trójkąt z jądrem tlenu w środku. Trzy atomy tlenu w cząsteczce ozonu są ułożone pod kątem rozwartym, który wynosi w przybliżeniu 116° 49', natomiast długość wiązania szacowana jest na 1,278 Å (Rysunek 7).⁹⁶



Rysunek 7. Budowa cząsteczkowa ozonu.

Masa cząsteczkowa ozonu to 48 u. Temperatura topnienia wynosi $-194 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, wrzenia -111.9°C , a parowania -180°C . Ciśnienie krytyczne tego gazu to 54/6 atm. Gęstość to $2,14 \text{ kg/m}^3$, potencjał utleniania to $-2,07 \text{ V}$. Rozpuszczalność w wodzie w temperaturze 0°C to $0,640 \text{ l/l}$, natomiast w wodzie o temperaturze 60°C to $0,000 \text{ l/l}$.^{83,97} Poniżej (Rysunek 8) przedstawiono proces powstawania ozonu przy udziale promieniowania UV.



Rysunek 8. Reakcja powstawania ozonu przy udziale promieniowania UV.

Ozon wytwarzany z mieszaniny powietrza charakteryzuje się zabarwieniem niebieskim, jeśli jednak powstaje z tlenu o wysokiej czystości przybiera przezroczystą postać. Przy temperaturze -112°C ozon skrapla się do ciemnoniebieskiej cieczy. W porównaniu do powietrza ozon jest nieco gęstszy tj.: $2,14 \text{ g/l}$, gdzie gęstość powietrza wynosi: $1,28 \text{ g/l}$ dla temperatury 0°C i ciśnienie atmosferyczne na poziomie $1013,25 \text{ hPa}$. W porównaniu z tlenem oraz chlorem ozon ma wysoki potencjał utleniający, wynoszący $2,07 \text{ V}$, gdzie dla tlenu potencjał ten wynosi $1,23 \text{ V}$, a chloru $1,36 \text{ V}$.⁹⁶

Mechanizm rozpadu cząsteczki ozonu w wodzie przyjmuje, że rozdziela się ona na rodniki hydroksylowe, jony tlenu i wodorotlenki, a przy pH powyżej $7,5$ następuje wzmożony proces tworzenie się rodników hydroksylowych. Wolne rodniki hydroksylowe mają wyższy potencjał utleniający, wynoszący $2,80 \text{ V}$ niż sam ozon. W temperaturze pokojowej ozon jest gazem wysoce niestabilnym. Łatwo ulega degradacji.⁹⁸ Ale mimo to ma dłuższy okres półtrwania w stanie gazowym niż w roztworze wodnym. Czystość wody także ma wpływ na stabilność chemiczną cząsteczki ozonu. Mniejsza zawartość obecnych w niej soli, jak również resztkowych związków organicznych, tym obserwowana jest dłuższy czas półtrwania cząsteczki. Także temperatura wody przyspiesza ten proces.⁹⁹

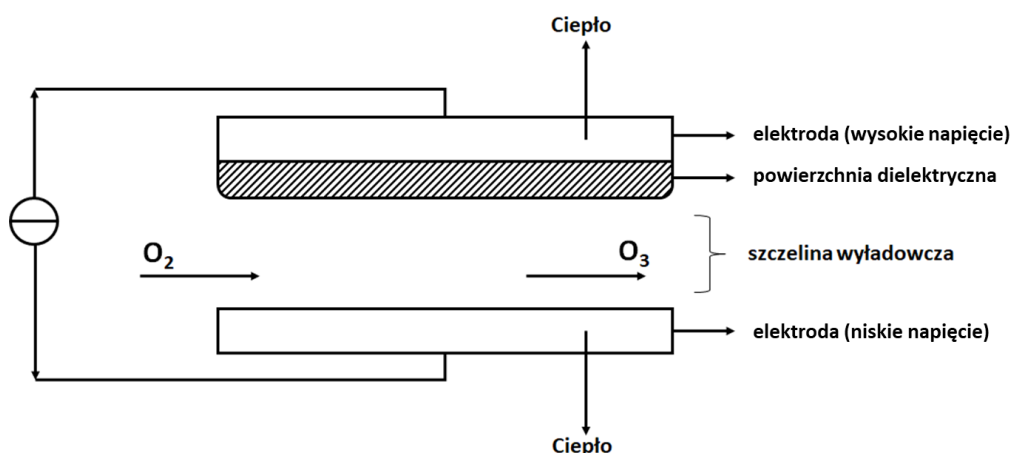
Ponieważ ozon wykazuje tendencję do samoistnego rozpadu cząsteczki, nie może być przechowywany w formie gazowej,⁹⁶ a w warunkach laboratoryjnych, musi być wytworzony *in situ*.

Ozon może być generowany za pomocą trzech technik. Są to: wyładowania koronowe, promieniowanie UV oraz elektroliza. Wyładowanie koronowe lub technika plazmowa naśladuje zjawisko elektrycznych wyładowań, naturalnie występujących w atmosferze (uderzenie pioruna). Elementem odpowiedzialnym za produkcję ozonu są tutaj elektrody wyładowań koronowych, które są zasilane bardzo wysokim napięciem (od 3 – 10 kV). Ozon generowany jest bezpośrednio z tlenu zawartego w powietrzu, które przechodząc pomiędzy dwoma blisko rozmieszczonymi elektrodami (z których jedna jest pokryta materiałem dielektrycznym) rozszczepia cząsteczki tlenu na dwa pojedyncze atomy tlenu. Te, z kolei, znajdując się w bardzo niestabilnej chemicznie formie natychmiast łączą się z innymi cząsteczkami tlenu, formując trójatomową cząsteczkę ozonu.

Promieniowanie ultrafioletowe (UV), sztucznie wytwarzane przez odpowiednie lampy UV także może generować ozon, przy założeniu, że długość fali światła wynosi 254 nm. Ta specyficzna fala uderza w cząsteczki tlenu zrywając ich wiązania i uwalniając poszczególne atomy. Kolejny etap procesu formułowania ozonu jest identyczny jak w przypadku techniki wykorzystującej wyładowania koronowe.

Elektroliza zaś jest pierwszą z zastosowanych w warunkach laboratoryjnych technik generowania ozonu.⁷² Polega ona na rozkładzie jej na jony (dysocjacji) pod wpływem napięcia wynoszącego minimum 1,229 V. W celu wytworzenia ozonu elektrolizie może zostać poddany także kwas siarkowy o stężeniu 68%.

Chociaż elektroliza wody jest skutecznym sposobem produkcji ozonu to efektywność samego procesu jest niska. Metoda wyładowań koronowych jest bardziej wydajna ekonomicznie, a także elementy wytwarzające ozon są bardziej trwałe. Gazem zasilającym może być powietrze atmosferyczne lub czysty tlen. Wyższe stężenia ozonu można osiągnąć, gdy użyty zostanie czysty tlen.¹⁰⁰ Proces produkcji ozonu przy wykorzystaniu generatora ilustruje Rysunek 9.



Rysunek 9. Schematyczne przedstawienie produkcji ozonu przy pomocy generatora.¹⁰⁰

Sztucznie wytwarzany ozon jest tak samo skuteczny jak występujący naturalnie pod warunkiem, że jego stężenie jest dokładnie kontrolowane.

3.2.1. Historia stosowania ozonu oraz regulacji prawnych z tym związanych na świecie

Historia odkrycia ozonu sięga roku 1839, gdzie podczas eksperymentów laboratoryjnych, prowadzonych przez Schönbeina,⁷² podczas poddawania wody procesowi elektrolizy zaobserwowano wytworzenie się nieznanego dotąd zapachu. Ów „cuchnący gaz” jak została nazwana ta nowa substancja lotna stała się przedmiotem zainteresowania tego i wielu innych naukowców w późniejszym czasie. Opierając się jednak na pierwszej, zaobserwowanej przez Christiana Schönbeina chemicznej właściwości nowo odkrytej substancji, uwalniającej się z wody gaz zyskał swoją nazwę. Oznaczono go słowem „ozeinem” od greckiego słowa „zapach”.^{72,73}

W latach 1880-1882 francuscy uczeni P. Hautefille i J. Chappuis prowadzili badania ozonu uwięzione jego skropleniem i opisaniem tego procesu.⁷⁴ Otrzymali oni również ozon w postaci niebieskiego gazu,⁷⁵ a także cieczy zmieszanej z dwutlenkiem węgla.⁷⁶ Publikacja Ch. J. Kenwortha „Ozone”, poruszająca kwestię zastosowania tej odmiany tlenu w leczeniu ludzi ukazała się w Stanach Zjednoczonych w 1885 roku,⁷⁷ a rok później w Niemczech potencjał chemiczny ozonu uznano za skuteczny środek dezynfekcji wody.⁷⁸

W roku 1887 Karol Olszewski opisał skroplenie ozonu za pomocą schłodzenia ciekłym tlenem pod ciśnieniem atmosferycznym (bp -183°C) i oszacował jego temperaturę wrzenia na -106 °C.⁷⁹ Wyniki pierwszych badań naukowych nad skutecznością przeciwbakteryjną ozonu, potwierdzające skuteczność dezynfekcyjną tego gazu, ukazały się w Niemczech w 1891 roku. W 1893 roku w Holandii po raz pierwszy użyto ozonu jako jedynej metody uzdatniania wody pitnej. Po upływie dwóch lat szwajcarski fizyk i chemik Jacques-Louis Soret opracował cząsteczkową formułę oraz ustalił wzór chemiczny dla ozonu O₃.⁷⁸ W 1896 roku Nikola Tesla, Serb mieszkający w Stanach Zjednoczonych, stworzył i opatentował pierwszy przemysłowy generator ozonu, a cztery lata później rozpoczęło działalność przedsiębiorstwo „Tesla Ozon Co.”, które sprzedawało generatory ozonu dla przemysłu oraz ozonowane produkty do użytku medycznego, takie jak oczyszczona oliwa.⁸⁰ W 1906 roku we Francji uruchomiono pierwszą na świecie instalację oczyszczania wody miejskiej ozonem.⁷⁸

W 1909 roku w Niemczech rozpoczęto stosowanie ozonu w przemyśle spożywczym do konserwacji mięsa, jednak po już po pięciu latach nastąpił spadek zainteresowania ozonem stosowanym w procesie dezynfekcyjnym na rzecz nowych środków i poczęto zastępować ozon chlorem.⁷⁸ W drugim roku I wojny światowej Amerykanie zapoczątkowali używanie ozonu w leczeniu trudno gojących się ran,⁸¹ niebawem w Brazylii ukazały się pierwsze publikacje

naukowe dotyczące zastosowania ozonu w leczeniu zakażeń kości.⁸² Próby skryształizowania ozonu podejmował już Karol Olszewski, ale udało się to dopiero w roku 1922 niemieckim naukowcom E. H. Riesenfeldowi i G. M. Schwabowi w wyniku bardzo powolnego schładzania w ciekłym wodorze ($-253\text{ }^{\circ}\text{C}$), określono także nową temperaturę topnienia ozonu na $-251\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁸³

W roku 1935 we Francji zaczęto stosować ozon w leczeniu chorób zatok poprzez proces insuflacji ropnych przetok tym gazem,⁸⁴ a kilka miesięcy później w tym samym kraju został on użyty w przemyśle spożywczym do obróbki skorupiaków.⁷⁸ Wkrótce (rok 1939) również w Stanach Zjednoczonych poczęto na szerszą skalę używać ozonu podczas przechowywania owoców i warzyw jako skutecznego środka przeciwko rozwojowi drożdży i pleśni. Trzy lata później także w Ameryce znalazł on zastosowanie w przechowywaniu serów i jaj.⁷⁸ W 1954 roku nastąpiło ustalenie właściwej temperatury topnienia ozonu przez amerykańskich badaczy Callaway'a Browna, Abrahama W. Bergera i Charlesa K. Hersha – została ona oparta na wartości $-193\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁸³

Zastosowanie ozonu do utleniania żelaza i manganu w wodzie pitnej miało miejsce w Niemczech w 1957 roku. W roku 1964 we Francji zbudowano pierwszą instalację przemysłową przeznaczoną do usuwania cząstek stałych pozostających po procesie ozonowania z oczyszczonych elementów. W 1965 roku w Irlandii oraz w Wielkiej Brytanii zastosowano ozon w procesie kontroli koloru wód powierzchniowych, natomiast w następnym roku w Szwajcarii użyto ozonu jako środka utleniającego mikrozanieczyszczenia chemiczne, takie jak związki fenolowe i pestycydy. W 1970 roku we Francji wykorzystano po raz pierwszy ozon do zwalczania glonów.⁷⁸ Na początku lat 70. minionego stulecia w Niemczech ukonstytuowało się „Medyczne Stowarzyszenie Terapii Ozonem”, niebawem także (1972 rok) w Stanach Zjednoczonych powołano stowarzyszenie pod nazwą „International Ozone Association” – IOA; założył je Georg Freibott jako następcę następcą zawiązanego w 1913 roku „Związku Terapii Tlenowej”.⁷⁷ W 1979 roku w Szwajcarii zastosowano ozon w leczeniu skutków niewydolności krążenia żylnego, miażdżycy zarostowej tętnic, mikroangiopatii i polineuropatii cukrzycowej.⁸⁵ W tym samym czasie w Niemczech E. Fischer wydał w Verlag für Medizin pierwszy nowoczesny profesjonalnego podręcznik ozonoterapii klinicznej – „Das Medizinische Ozon” autorstwa H. H. Wolffa.⁸⁶

Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) przyznała w 1982 roku status GRAS (Generally Recognized as Safe - ogólnie uznawany za bezpieczny) dla sprzedaży butelkowanej wody oczyszczonej ozonem, rok później zaś w Waszyngtonie odbył się Pierwszy Międzynarodowy Kongres Medyczny zastosowania ozonu w leczeniu.⁷⁸ Pierwsze zastosowanie ozonu w terapii medycznej, w szczególności leczeniu oparzeń, miało miejsce w Polsce w roku 1986.⁸⁷ Z kolei w 1987 roku w Los Angeles otwarto największą na świecie instalację

oczyszczającą wodę przy pomocy ozonu dającą możliwość dezynfekcji miliona galonów dziennie. W 1995 roku nastąpiło odnowienie zgody wydanej przez FDA oraz statusu GRAS na dezynfekcję ozonem wody butelkowanej.⁷⁸ W tym samym roku w Polsce Zygmunt Antoszewski przeprowadził pierwsze na świecie eksperymentalne podanie ozonu do bocznej komory mózgu u noworodka z powikłaniem zakaźnym po wszczępieniu zastawki Pudenza.⁸⁸ W 1997 roku niezależny zespół amerykańskich ekspertów powołany przez Electric Power Research Institute (EPRI), uznał procedurę ozonowania jako bezpieczną metodę oczyszczania (GRAS) do bezpośredniego kontaktu z żywnością, jednak już dwa lata potem w Stanach Zjednoczonych po raz pierwszy zakwestionowano używanie ozonu w przetwórstwie spożywczym. Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA) odrzucił możliwość ozonowania mięsa, powołując się na deklarację GRAS z 1982 r., która zakładała konieczność każdorazowej weryfikacji protokołu dotyczącego ozonowania żywności w celu innym niż dezynfekcja wody butelkowanej. W tej sytuacji EPRI złożył wniosek skierowany do Agencji Żywności i Leków o zezwolenie na używanie ozonu w bezpośrednim kontakcie z każdym rodzajem żywności (nie tylko wody). Agencja ta ostatecznie w roku 2001 zatwierdziła ozon jako bezpośredni dodatek do żywności.⁷⁸

Pierwsze publikacje obiecujących wyników badań nad zastosowaniem mieszaniny ozonowo-tlenowej w insulfacji głębokich ran pooperacyjnych ogłoszono we Francji w 2000 roku.⁸⁹ W 2003 roku w piśmiennictwie polskim pojawiły się pierwsze doniesienia na temat śródoperacyjnego użycia ozonoterapii w profilaktyce zakażeń w ortopedii.⁹⁰ Rok później w Stanach Zjednoczonych wydano kolejne rozporządzenia dotyczące zastosowania ozonu w celach dezynfekcyjnych przydatnych w procesie obróbki żywności zatwierdzone przez FDA.⁷⁸

3.2.2. Bezpieczeństwo i zagrożenia dla ludzkiego organizmu związane z ekspozycją na ozon

Ozon jest gazem toksycznym. Szkodliwość ekspozycyjna dla organizmów żywych jest ściśle uzależniona od stężenia oraz czasu narażenia.¹⁰¹ Próg wykrywalności zapachowej ozonu dla człowieka kształtuje się na poziomie 0,01–0,04 ppm. Maksymalny, bezpieczny limit ekspozycji na osobę to 0,1ppm przez 8 godzin.¹⁰² Przy krótkotrwałej ekspozycji (maksymalna średnia ośmiogodzinna dobową dawką) szacowanej na poziomie 0,1–1,0 ppm, objawy ze strony ludzkiego organizmu obejmują bóle głowy, podrażnienie dróg oddechowych - w tym suchość w gardle, krwawienia z nosa, podrażnienie oczu.¹⁰³ Przy wyższych poziomach narażenia tj.: powyżej 1 do 100 ppm objawy stają bardziej poważne i należą do nich: podrażnienie płuc, silne zmęczenie, ból w klatce piersiowej, zaburzenia oddychania, zmniejszenie zużycia tlenu, suchy kaszel, śpiączka i w końcu śmierć. Im mniejszy jest organizm, na który oddziałuje ozon tym krótszy jest potrzebny czas ekspozycji, który wywoła objawy zatrucia. Np. dla małych zwierząt

wystarczy dwugodzinne narażenie dawką 15–20 ppm aby je uśmiercić, natomiast zwiększenie dawki powyżej 1700 ppm skróci czas nadejścia śmierci do zaledwie kilku minut.¹⁰⁴

Przytaczając opublikowane badania,^{105,106} można przyjąć, że rozkład ozonu zachodzi w trzech etapach:

1. inicjacja
2. promocja
3. hamowanie.

Podczas etapu inicjacji generowane są wolne rodniki, takie jak anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik wodoronadtlenkowy, co w konsekwencji prowadzi do powstania wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego. Te właśnie rodniki są jednym z czynników przyczyniających się do rozkładu ozonu.

Etap promocji obejmuje regenerację wodoronadtlenku i rodników ponadtlenkowych poprzez reakcje z udziałem promotorów, których funkcje pełnią: kwas mrówkowy, kwas glioksalowy, pierwszorzędowe alkohole i grupy aryłowe. Natomiast na etapie hamowania następuje zajęcie rodników hydroksylowych poprzez jony, takie jak wodorowęglany, węglany, trzeciorzędowe alkohole i grupy alkilowe, bez regeneracji jonu rodnika ponadtlenkowego. Rozpad cząsteczki ozonu przedstawiono poniżej.⁹⁴



Jony wodorowęglanowe są zwykle obecne w komórkach drobnoustrojów. Mogą pełnić one funkcje antyoksydacyjne, chroniąc w ten sposób komórkę gospodarza przed zniszczeniem.¹⁰⁷

3.2.3. Przeciwdrobnoustrojowe działanie ozonu

Ozon posiada szerokie spektrum działania antydrobnoustrojowego.^{105,106,108} Wysoka reaktywność ozonu to zasługa utleniających właściwości wolnych rodników, które powstają w procesie rozpadu jego cząsteczki.¹⁰⁸ Dezynfekujące działanie ozonu jest procesem złożonym i jest związane z jego utleniającą aktywnością wobec różnych składników komórkowych, stanowiących elementy składowe ściany i błony komórkowej komórki bakteryjnej jak np.: składniki z grupy lipidów czy białek.¹⁰⁹ Także inne elementy, będące składnikami niezbędnymi w procesie życia i namnażania komórki jak kluczowe enzymy czy kwasy nukleinowe podlegają niszczącemu działaniu ozonu.¹¹⁰ Tlen singletowy czyli jedna z form tlenu, który charakteryzuje brakiem niesparowanych elektronów, za to wyższą energią atomową,¹¹¹ będący konsekwencją rozpadu cząsteczki ozonu wchodzi w reakcję z wiązaniami wodorowymi między komplementarnymi zasadami utrzymującymi strukturę helisy DNA lub RNA (tRNA).¹¹² Także

polipeptydowe łańcuchy białek, tworzących kod genetyczny komórki ulegają uszkodzeniu na skutek działania ozonu.¹¹³

Powołując się na wyniki kolejnych badań^{114,115,116} przytoczono dwa główne kierunki tłumaczące niszczący mechanizm działania ozonu, w oddziaływaniu na biologiczne struktury żywej komórki:

- (1) ozon utlenia grupy sulfhydrylowe i aminokwasy, enzymy, peptydy i białka do mniejszych peptydów;
- (2) ozon utlenia wielonienasycone kwasy tłuszczowe do nadtlenków kwasów.

W wyniku następstwa tego procesu komórka bakteryjna jest dezaktywowana i obumiera. Przeciwdrobnoustrojowe działanie ozonu sprawdzano na różnych rodzajach mikroorganizmów, w tym bakteriach Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, jak również ich zarodnikach i komórkach przetrwalnikowych.^{117,118}

Dla zbadania skuteczności oczyszczającego działania ozonu wobec mikroorganizmów związanych z przetwarzaniem i przechowywaniem żywności wybrano szczepy reprezentujące zarówno grupę Gram-dodatnią jak i Gram-ujemną. Były to następujące rodzaje mikroorganizmów: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Enterococcus faecalis*, natomiast grupę bakterii Gram-ujemne reprezentowali: *Pseudomonas aeruginosa* i *Yersinia enterocolitica*, grzyby pleśniowe i drożdżopodobne takie jak: *Candida albicans* oraz pałeczki *Zygosaccharomyces* i zarodniki *Aspergillus niger*.¹¹⁸

Z kolei, dwa niezależne badania wykonane przez Foegedinga w 1985 roku,¹¹⁹ a następnie przez Khadre'a w roku 2001,¹⁰⁶ polegające na użyciu ozonu wobec form przetrwalnikowych bakterii rodzaju *Bacillus* sugerują, że gaz ten unieczynnia spory bakteryjne poprzez degradację składników zewnętrznej warstwy otoczki cysty (składniki te stanowią około 50% objętości cysty), odsłaniając w ten sposób korę i rdzeń komórki przetrwalnikowej.

Badacze Young i Setlow w 2004 roku wykazali natomiast, że ozon nie niszczy komórek przetrwalnikowych bakterii poprzez uszkodzanie kwasów nukleinowych w jądrze komórkowym, ale upośledza jej zdolności do przekształcenia się w biologicznie aktywny organizm.¹²⁰

Jednoznacznie ustalono natomiast, że zarówno ozon o molekularnej strukturze jak i wolne rodniki powstające w wyniku jego rozpadu odgrywają tę samą rolę mechanizmie inaktywacji komórki mikroorganizmu, chociaż nie uzgodniono, która z form jest skuteczniejsza. Niektórzy badacze sugerowali także, że bezpośrednia reakcja z cząsteczkami ozonu jest dominującym mechanizmem niszczącym strukturę komórkową drobnoustroju.^{121,122,123}

Dane literaturowe wskazują, że za inaktywację komórki bakteryjnej odpowiedzialne są pośrednie reakcje z wolnymi rodnikami tlenowymi, powstałymi w wyniku rozpadu cząsteczki

ozonu.¹²⁴ Sposób oddziaływania ozonu na komórkę bakteryjną, poprzez niszczenie jej ściany komórkowej jest szybszą i skuteczniejszą metodą od wielu innych, w których także używa się substancji o charakterze dezynfekcyjnym (najczęściej opartym o konieczność wnikięcia środka do wnętrza komórki).¹⁰¹

Scott i Leshner, w swoim badaniu stwierdzili, że ozon poprzez działanie niszczące strukturę osłonową komórki powoduje wyciek zawartości na zewnątrz, w następstwie czego komórka ulega lizie.¹¹²

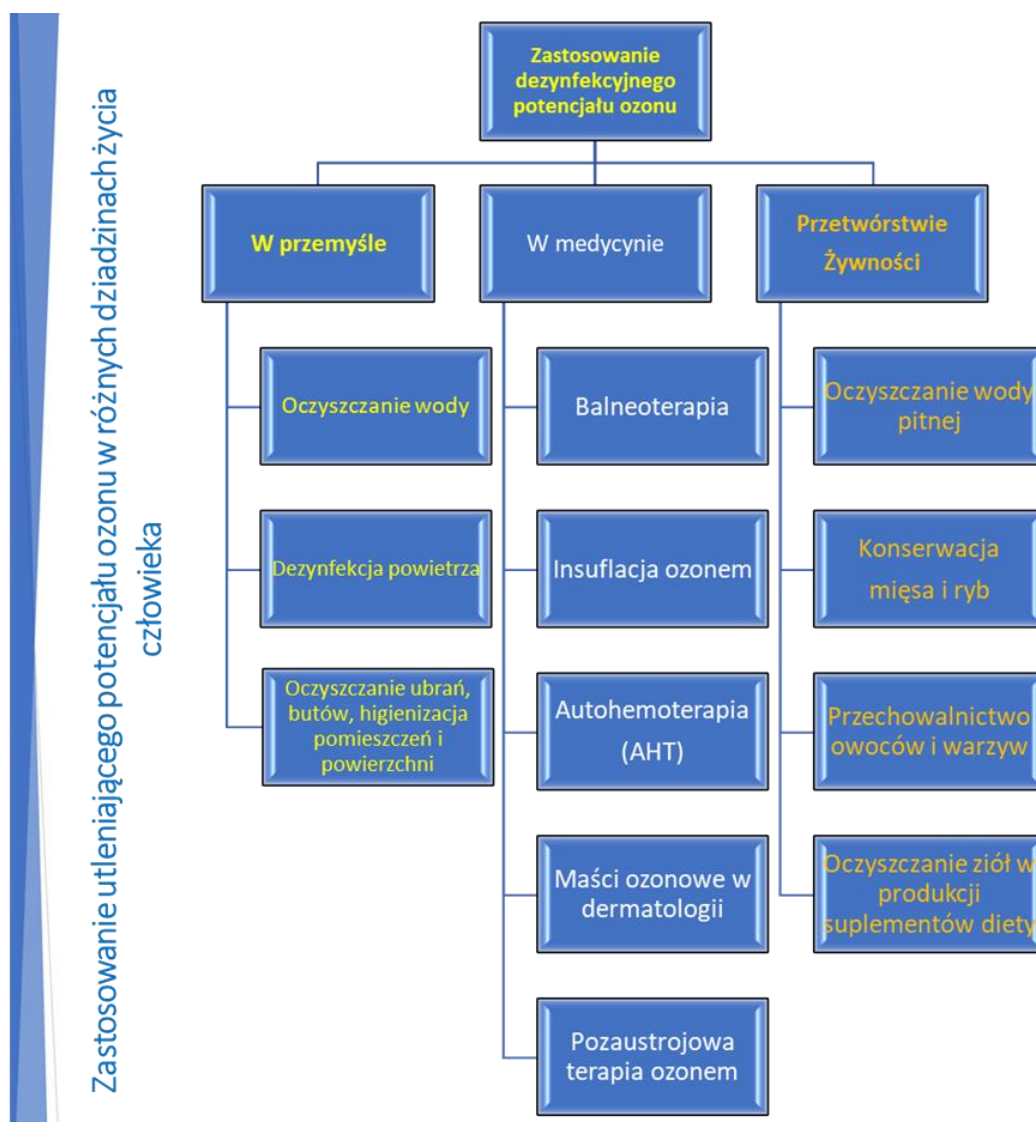
Z kolei inni badacze, pod kierownictwem Fincha,^{121,125} także skupiający się na dezynfekującym działaniu ozonu ustalili, że komórki bakterii *E. coli* wymagały 0,06 mg/l ozonu, aby ulec całkowitej inaktywacji.

Podsumowując powyżej przytoczone badania większość drobnoustrojów wykazuje wysoką wrażliwość na dezynfekujące działanie ozonu.^{101,112,121,125}

Naukowcy Stewart i Raquepas już w 1995¹²⁶ roku opracowali metodę analizy skuteczności środków dezynfekujących wobec mikroorganizmów tworzących biofilm, opartą o teorie szybkości dyfuzji. Badacze mierzyli szybkość penetracji środka dezynfekującego do biofilmu bakteryjnego, a następnie obserwowali, jak postępują zmiany w strukturze i zachowaniu mikroorganizmu. Z powyższego badania wyciągnięto wniosek, że silny środek utleniający, taki jak ozon lub chlor szybko i z łatwością przenikają do wnętrza komórki, ponieważ niszczy kluczowe składniki struktury biofilmu. Jednak czas penetracji biofilmu był znacznie dłuższy niż oczekiwano na podstawie teorii dyfuzji. Sformułowano zatem kolejny wniosek, który mówił, że tworzony przez mikroorganizmy biofilm jest dobrym i skutecznym sposobem obrony przed działaniem chemicznych środków dezynfekujących.

W innych doniesieniach o naukowych eksperymentach oceniali efektywność dezynfekcyjną wobec biofilmu tworzonego przez bakterie gatunków *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas aeruginosa*.^{126,127} Wyniki ich obserwacji wykazały, że ozon był najskuteczniejszym środkiem w niszczeniu biofilmu przytoczonych tu mikroorganizmów, poprzez degradację egzopolisacharydów z matrycy biofilmu, uwalniając w ten sposób drogę penetracji środka dezynfekującego do wnętrza komórki.

Szerokie zastosowanie ozonu w różnych gałęziach przemysłu, w tym także obróbce żywności przedstawia zamieszczony poniżej Rysunek 10.



Rysunek 10. Zastosowanie ozonu w przemyśle, medycynie i przetwórstwie żywności. Opracowanie własne na podstawie literatury.^{109,97,114,128,129,130}

3.3. Ziola wybrane do procesu ozonowania – występowanie oraz właściwości biologiczne

3.3.1. Rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla* L.)

Rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla*) jest gatunkiem rośliny z rodziny astrowatych (*Asteraceae*). Rośliny tego gatunku spotykane są powszechnie w klimacie umiarkowanym, tj. w Europie, Azji i Ameryce, a także w północnej i południowej Afryce. Niektóre gatunki są naturalizowane w Australii. Rumianek można znaleźć na ziemiach bogatych w składniki odżywcze. Występuje na łąkach, nieużytkach rolnych i poboczach dróg; jest również uprawiany jako zioło.^{130,37} Rośnie najlepiej w temperaturach od 7°C do 26°C i rocznych opadach od 400 do 1400 mm na sezon. Roślina ta może wytrzymać zimną pogodę, ale wzrasta lepiej w pełnym

słońcu i wymaga długich letnich dni i wysokich temperatur dla optymalnego zbioru olejków eterycznych.⁹³

Rumianek jest ziołem jednorocznym. Posiada łodygę o wysokości do 60 cm, rozgałęzioną z liśćmi pierzastymi, kwiaty zebrane w koszyczki oraz cienkie, wrzecionowate korzenie. Kwiaty rumianku są promieniście symetryczne, szypułkowe, heterogamiczne, pojedyncze o średnicy od 10 do 30 mm. Owocami rumianku są żółtawobrazowe podłużne niełupki o jajowatym kształcie, nieco bocznie spłaszczone z niepozornymi trzema-pięcioma żeberkami.^{93,130}

Głównym składnikiem rumianku, dzięki któremu roślina to zawdzięcza swoje właściwości jest olejek eteryczny, pochodne kumaryn, flawonoidy (np. 7-glikozyd apigeniny), kwasy fenolowe (w tym izomery kwasu chlorogenowego) obecne w koszyczku rumianku. Z punktu widzenia ziołolecznictwa największe znaczenie ma olejek eteryczny, który stanowi 0,4-2,0% kwiatów. Główne składniki olejku to terpenoidowe α -bisabolol i jego tlenki ($\leq 78\%$) oraz produkty degradacji seskwiterpenoidowego laktonu – matrycyny, azuleny, w tym chamazulen (1–15%). Olejek eteryczny rumianku zawiera również farnezen (12–28%), spatulenol i spiroetery, w tym *cis/trans*-en-yn-dicykloetery (8-20%).^{37,131,132} Herbata przygotowana z kwiatostanu rumianku zawiera zaledwie 10-15% olejku eterycznego zawartego w kwiatach. W kwiatach rumianku, oprócz olejku, wartościowy jest też śluz stanowiący ok. 10% główki kwiatu. Zawiera on aminokwasy, polisacharydy i kwasy tłuszczowe.¹³¹ Sposób uprawy ziela nie ma istotnego wpływu na skład i jakość olejku eterycznego. Jednak jego skład może się znacznie różnić w zależności od regionu uprawy i sposobu przetwarzania surowca oraz pomiędzy roślinami rosnącymi dziko a hodowanymi w populacjach roślin uprawnych.^{133,134}



Rysunek 11. Rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla* L.).¹³⁵

Właściwości lecznicze rumianku znane są od stuleci. Pierwsza pisemna wzmianka o rumianku pochodzi ze starożytnego Egiptu. „Papyrus Ebersa” jest pierwszym zielnikiem zawierającym opis zastosowania ponad 800 roślin do celów medycznych. Dokument ten pochodzi z około 1500 r. p.n.e., choć prawdopodobnie jest to reedycja znacznie starszych źródeł. Starożytni Egipcjanie używali zmiażdżonych kwiatów rumianku do łagodzenia podrażnienia i stanów zapalnych skóry oraz w celach kosmetycznych.¹³⁰ Obecnie ziele rumianku wykorzystywane jest znacznie szerzej. Na pierwszy plan charakterystyki tego ziele wysuwają się jego właściwości przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe przeciwko niektórym bakteriom, grzybom i wirusom, za co odpowiadają kumaryna, flawonoidy, kwasy fenolowe i kwasy tłuszczowe.^{130,136} Pomimo że miejscowe zastosowanie rumianku w postaci płukanki w stanach zapalnych błony śluzowej jamy ustnej budzi kontrowersje, wiele badań dokumentuje jego działanie ochronne na błonę śluzową i skuteczność w leczeniu lub zapobieganiu owrzodzeniu jamy ustnej wywołanemu przez chemioterapię lub radioterapię.^{137,138} W randomizowanym podwójnie ślepych badaniu na grupie kobiet poddawanych radioterapii podczas leczenia raka piersi wykazano, że mikrocząstki (*Matricaria chamomilla*) pokryte chitozanem nie wpływają co prawda na zmniejszenie stopnia popromiennego zapalenia skóry, ale zmniejszają toksyczność stopnia drugiego i powyżej, poprawiają regenerację skóry i zmniejszają nasilone objawy miejscowe.¹³⁹ W leczeniu kandydozy sromu i pochwy krem z wyciągiem z rumianku wykazał porównywalną skuteczność z miejscowym preparatem klotrimazolu zachowując jednocześnie bezpieczeństwo stosowania, gdyż pacjentki nie zgłaszały żadnych działań niepożądanych.¹⁴⁰ W literaturze pojawia się też wiele doniesień na temat zastosowania rumianku w preparatach doustnych i ich korzystnego wpływu na gospodarkę cukrową i lipidową,¹⁴¹ stres antyoksydacyjny,¹⁴² funkcję nerek w zespole policystycznych jajników poprzez mechanizmy antyoksydacyjne, obniżające testosteron i antyapoptotyczne,¹⁴³ objawy emocjonalne związane z cyklami miesięczkowymi¹⁴⁴ oraz wiele innych. Stąd właściwe przygotowanie surowca do dalszej obróbki ma ogromną wartość w kontekście zapewnienia wysokiej jakości preparatów leczniczych, uzyskiwania powtarzalnych wyników w badaniach klinicznych, a także wzrastającego zainteresowania stosowaniem produktów pochodzenia naturalnego wśród pacjentów i specjalistów.

3.3.2. Koper włoski (*Foeniculum vulgare* L.)

Koper włoski (*Foeniculum vulgare*) jest rośliną dwuletnią lub byliną wydającą nasiona dłużej niż dwa lata. Należy do rodziny selerowatych (*Apiaceae*). Pochodzi z Europy Południowej, ale rozprzestrzenił się w jako gatunek zawleczony w różnych rejonach świata. Dziko występuje głównie w strefie śródziemnomorskiej, choć tam też najczęściej jest

uprawiany.¹⁴⁵ W Polsce jest często uprawiany w ogrodach do celów spożywczych, ale występuje też powszechnie w formie dziczyznej.¹⁴⁶ Koper od wieków wykorzystywany był do celów leczniczych i spożywczych. W medycynie ludowej ceniono go ze względu na właściwości wykrztuśne oraz poprawiające pracę przewodu pokarmowego. Do tej pory w wielu krajach Azji Południowo -Wschodniej jest spożywany po posiłku (*mukhwas*) ze względu na właściwości odświeżające oddech i wspomagające trawienie, a w Iranie stanowi uzupełniające i alternatywne leczenie nieswoistego zapalenia jelit.¹⁴⁷

Koper włoski osiąga rośnie do wysokości 2 m. Łodygi kopru są rozgałęzione, obłe i pokryte sinawym nalotem. Charakterystyczne liście są trzykrotnie pierzaste, widlasto rozgałęzione. Drobne żółte kwiaty mają pięciokrotną budowę i są ułożone w baldachy. Okres kwitnienia trwa od lipca do września. Owocem kopru jest brunatna lub zielona rozłupnia osiągająca długość do 12 mm. Surowcem leczniczym są owoce kopru włoskiego (*Fructus Foeniculi*). Dojrzałe baldachy zbiera się w całości i suszy w temperaturze do 35°C, a następnie wysuszone owoce sortuje się według wielkości.¹⁴⁶



Rysunek 12. Koper włoski (*Foeniculum vulgare* L.).¹³⁵

Odpowiednio wysuszone owoce kopru zawierają 1-4% olejku koprowego, a także flawonoidy, pochodne kumaryny i sole mineralne. Olejek koprowy (*Oleum Foeniculi*) uzyskuje się na drodze destylacji, a jego skład zależy od odmiany rośliny i warunków hodowli. Surowiec lepszej jakości uzyskuje się z roślin rosnących na obszarach ciepłych, osłoniętych od wiatru

i dobrze nasłonecznionych.¹⁴⁶ Skład jakościowy olejku pozyskany od roślin rosnących w różnych warunkach i zebranych w różnym czasie, może się różnić, jednak procentowa zawartość bioaktywnych składników dominujących, takich jak anetol, estragol, α -terpineol i fenchon pozostają zbliżone.¹⁴⁸ Olejek eteryczny z nasion kopru włoskiego ma silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwutleniające. Oprócz tych zastosowań wykazano, że olejek ten wykazuje także działanie m.in. przeciwzapalne, przeciwskurczowe, przeciwzakrzepowe. Może być także stosowany jako środek przeczyszczający, przeciwnowotworowy, przeciwbólowy, przeciwcukrzycowy, trawienny, roztoczebójczy, moczopędny, leczący zaburzenia nerwowe i o charakterze hepatoprotekcyjnym. Ponadto olejek eteryczny z kopru włoskiego ma działanie przeciwgrzybicze i działanie roztoczebójcze. Zawarty w olejku z kopru włoskiego fenchon (monoterpenoid) może być zastosowany w leczeniu gruźlicy. *trans*-Anetol to także należy z kolei do pochodnych fenylopropanoidów, który wykazuje istotne działanie biologiczne, w tym może pełnić funkcję przeciwzapalną, neuroprotekcijną, antynocyceptywną w organizmie oraz być odpowiedzialnym za działanie przeciwdrgawkowe, przeciwannezyjne i przeciwnowotworowe.¹⁴⁹

Zgodnie z monografią EMEA (European Medicines Agency) produkty lecznicze wyprodukowane z nasion kopru włoskiego mogą być stosowane na podstawie ugruntowanego zastosowania u dzieci powyżej 4 roku życia i u dorosłych.¹⁵⁰

Właściwości regulujące pracę przewodu pokarmowego i ochronne w stosunku do śluzówki jelit wykorzystywane w medycynie ludowej znalazły potwierdzenie w badaniach naukowych. Das i wsp.¹⁴⁷ zbadali wpływ ekstraktu z nasion kopru włoskiego na funkcję bariery nabłonka jelitowego oraz szlak przetwornika sygnału i aktywatora transkrypcji (*signal transducer and activator of transcription*, STAT), który jest aktywny w nieswoistym zapaleniu jelit. Model eksperymentalny obejmował zarówno badania *in vitro* jak *in vivo*. W badaniu zaobserwowano ochronny wpływ na przeznabłonkową oporność elektryczną, wzrost mRNA związanego z połączeniami ścisłymi, zmniejszenie aktywności szlaku STAT oraz zmniejszenie wskaźników stanu zapalnego u myszy. Autorzy mają nadzieję na wykorzystanie potencjalnego leczniczego efektu kopru we wspomagającej terapii nieswoistego zapalenia jelit. Hamowanie aktywacji ludzkich granulocytów obojętnochłonnych sugeruje potencjalne zastosowanie olejku koprowego również w innych chorobach przewlekłych takich jak przewlekła obturacyjna choroba płuc, zespół ostrej niewydolności oddechowej lub łuszczyca.¹⁵¹

W badaniu eksperymentalnym prowadzonym przez Zakernezhad i wsp.¹⁵² ekstrakt z kopru podawano w dawkach 50, 100 i 200 mg/kg na dzień. Największy spadek cholesterolu całkowitego odnotowano u myszy w dawce 100 mg/kg/dzień, trójglicerydów w dawce 100 i 200 mg/kg/dzień, LDL w grupie leczonej dawką 100 mg/kg/dzień, a największy wzrost HDL

odnotowano w grupie otrzymującej 100 mg ekstraktu/kg/dzień. Nie stwierdzono wpływu na stężenie leptyny w surowicy, ale ekspresja białka receptora leptyny u wszystkich myszy została podwyższona – najbardziej w dawce 50 mg/kg/dzień. W innym badaniu przeprowadzonym przez Hong i wsp.¹⁵³ zbadano wpływ terapii wziewnej u otyłych szczurów. W olejku koprowym stwierdzono, że największą zawartość i intensywność zapachu wykazywał *trans*-anetol. U zwierząt wdychających olejek stwierdzono spadek tłuszczu całkowitego i wisceralnego, podwyższony poziom cholesterolu i trójglicerydów oraz obniżony poziom insuliny, jak również obniżenie ciśnienia krwi i tętna.

Synergistyczne oddziaływanie wykazano pomiędzy amoksycyliną i olejkiem eterycznym z kopru dla *Enterococcus faecalis* i *E. coli*, co może być odpowiedzią na rosnącą lekooporność patogenów w leczeniu wielu chorób.¹⁵⁴ Za działanie roztoczebójcze odpowiedzialne są głównie *trans*-anetol i fenchon.¹⁵⁵ Pozytywne efekty uzyskano w leishmaniozie skórnej wywoływanej przez wiciowce.¹⁵⁶ Również cała charakterystyka nasion kopru, a szczególnie szereg efektów biologicznych występujących u ptaków, w tym lepszą wydajność, wyższą proliferację komórek odpornościowych, zmniejszony stres oksydacyjny i zwiększone miana przeciwciał przeciwko chorobom zakaźnym, sugeruje na potencjalne zastosowanie kopru w hodowli drobiu jako ekologiczna alternatywa dla antybiotyków.¹⁵⁷

Zawarty w owocach kopru anetol posiadająca również aktywność estrogenową (fitoestrogen, prawdopodobnie poprzez możliwość tworzenia dimerów), dzięki któremu koper włoski ma działanie galaktagotyczne. W niewielkich badaniach stwierdzono wzrost objętości mleka u matek karmiących przyjmujących preparaty z kopru, zawartości tłuszczu i przyrostu masy ciała u niemowląt, jednak nie stwierdzono wzrostu stężenia prolaktyny w surowicy u matek karmiących. Napar z kopru jest bezpieczny dla niemowląt i skuteczny w łagodzeniu objawów kolki, stąd jego obecność w mleku matki w zwykłych dawkach jest również korzystna dla niemowląt. Zaleca się ograniczać stosowanie kopru do 2 tygodni, gdyż dłuższe stosowanie i/lub stosowanie dużych dawek może wywoływać działania uboczne w postaci biegunki i podwyższonych poziomów enzymów wątrobowych. Po przyjęciu kopru możliwe jest też wystąpienie reakcji alergicznych, zatem matki, u których wystąpiła alergia na marchew, seler lub inne rośliny z rodziny selerowatych powinny unikać kopru ze względu na możliwe pojawienie się objawów alergii krzyżowej.¹⁵⁸

W literaturze opublikowano wyniki szeregu badań *in vitro* nad wpływem olejku koprowego na linie komórek nowotworowych. Olejek stosowano samodzielnie i w połączeniu z innymi substancjami w stosunku do komórek raka piersi (linia komórkowa MCF-7),¹⁵⁹ raka wątroby (linia komórkowa HHL-5) [311], raka płuc (linie komórkowe NCI-H446 i NCI-H661)¹⁶⁰ i raka żołądka (linia komórkowa AGS).¹⁶¹ Mechanizm działania opiera się na zaburzeniu cyklu

rozwoju komórek nowotworowych, indukcji apoptozy i toksyczności wobec ludzkich komórek nowotworowych.

3.3.3. Tatarak zwyczajny (*Acorus calamus* L.)

Tatarak zwyczajny (*Acorus calamus* L.) jest wieloletnią, aromatyczną byliną należącą do rodziny tatarakowatych (Obrazkowate, *Acoraceae*). Roślina ta, a szczególnie jej kłącze, jest wykorzystywana jako pachnące ziele w tradycyjnej medycynie ajurwedyjskiej (indyjskiej) i chińskiej. Znana jest również pod nazwami ludowymi takimi jak ajer lub tatarskie ziele, a także pod ajurwedyjską nazwą *vacha*.¹⁶² Rodzina *Acoraceae* liczy około 110 rodzajów i ponad 1800 gatunków roślin kłączowych lub bulwiastych. Rodzaj *Acorus* obejmuje około 40 gatunków, jednak tylko kilka z nich przebadano pod kątem ich składu chemicznego i aktywności biologicznej. Tatarak zwyczajny został skrupulatnie zbadany ze względu na właściwości lecznicze i jego znaczenie farmakologiczne potwierdzone długoterminowym stosowaniem w medycynie ludowej.¹⁶³ Surowcem leczniczym jest kłącze (*Rhizoma Calami*), które zbiera się wiosną i oczyszczone suszy w temperaturze do 35°C.¹⁴⁶

Tatarak jest rozpowszechniony na całym świecie. Spotyka się go w Azji, Ameryce, Afryce, Australii i Europie.¹⁶⁴ Tatarak został zawleczony do Polski prawdopodobnie w XIII wieku podczas najazdów tatarskich (stąd jego nazwa), ale rozprzestrzenił się dopiero w XV-XVI wieku. Zgodnie z jedną z hipotez, rozdrobnione kawałki kłącza tataraku były dodawane do bukłaków w celu poprawienia walorów smakowych wody. Wyrzucane w pobliżu wodopojów dawały początek nowym populacjom roślin.^{164,165} Obecnie tatarak występuje powszechnie, szczególnie na nizinach, terenach podmokłych, w okolicach stawów i jezior. Jest określany mianem rośliny inwazyjnej lub zadomowionego gatunku obcego.¹⁶⁶ Pomimo, że jest gatunkiem obcym, tatarak nie ma dużego wpływu na rodzime gatunki roślin szuwarowych, stąd różne klasyfikowanie inwazyjności tej rośliny.

Dla tataraku charakterystyczne są długie, mieczowate, ostro zakończone na szczycie liście o długości do 100 cm i 1,5-2 cm. Liście wyrastają bezpośrednio z kłączy, które osiąga około 1 cm średnicy i długość 10-20 cm. Kłącze pokryte jest od góry białawą skórką od spodu przechodzącą w barwę zielonkawą, różowawą, czasem brunatną. Środek kłącza jest zwykle biały o silnym zapachu cynamonu i kamfory.^{167,168,169}

W Polsce z powodu panującego tutaj klimatu, tatarak rozmnaża się jedynie wegetatywnie z kłączy, gdyż z kwiatów nie powstają owoce ani nasiona. Kwiaty tataraku są malutkie, o średnicy do 2 mm, stłoczone w zielono-żółtym kwiatostanie znajdującym się na szczycie łodygi kwiatonośnej, która ma przekrój trójkątny, lekko spłaszczony i osiąga wysokość około 40–50 cm. Tatarak kwitnie od maja do czerwca, jednak po zakończeniu kwitnienia, kwiaty stają się

suche i brązowe pozbawione owoców. Owoce w postaci czerwonych jagód wytwarzają jedynie rośliny diploidalne rosnące w Azji. Triploidalne rośliny rosnące w Europie nie wytwarzają owoców.^{170,171}



Rysunek 13. Tatarak zwyczajny (*Acorus calamus* L.).¹³⁵

Tatarak jest rośliną olejkodajną. Świeże kłącze zawiera od 2 do 4% olejku eterycznego, którego skład ilościowy jest zróżnicowany w zależności od pory zbiorów i rodzaju surowca. Według Parki i wsp.¹⁷² olejek tatarakowy zawiera głównie α -azaron oraz β -azaron (35,3–90,6%) i Z-izoelemycynę (1,7–7,3%). Wśród innych składników wymienia się linalol, cyperenon, cyperol, saflor, eugenol, kamforę i szereg innych substancji aktywnych,^{164,172} które zapewniają szereg właściwości leczniczych. Właściwości azaronu został docenione przez EMEA i opisane w monografii poświęconej tej substancji.¹⁷³ W literaturze wspomina się o wielu zastosowaniach tego zioła. Wśród nich dominują zaburzenia przewodu pokarmowego i układu trawiennego, np. choroby wątroby, utrata apetytu, kolki, skurcze, biegunki, wzdęcia, niestrawność, a także jako środek przeciwwrobaczny. Stosowany był również w chorobach układu nerwowego, bezsenności, hysterii, epilepsji i utracie pamięci. Poza tym doceniano jego właściwości w stanach zapalnych, w tym dróg oddechowych oraz innych narządów.¹⁶³ Obecnie część z tych wskazań znalazła potwierdzenie w badaniach naukowych. Niemniej jednak zwraca się również uwagę na zawartość β -azaronu, który z jednej strony jest głównym składnikiem bioaktywnym, a z drugiej zaś strony odpowiada za toksyczność i działania uboczne tataraku, stąd ograniczono jego

zawartość w preparatach doustnych. Dzienny limit spożycia β -azaronu z ziołowych produktów leczniczych ustalono na 0,115 mg na dzień.^{174,175}

W pracy przeprowadzonej na Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu¹⁷⁶ zbadano wrażliwość bakterii beztlenowych wyizolowanych z zakażeń jamy ustnej i górnych dróg oddechowych poddanych działaniu olejku tatarakowego. Po 48 godzinnej hodowli bakterii stwierdzono, że olejek tatarakowy hamuje wzrost beztlenowych pałeczek: Gram-ujemnych: *Bacteroides ureolyticus*, *Porphyromonas asaccharolytica* i *Porphyromonas levii* oraz Gram-dodatnich *Actinomyces israeli*, *Bifidobacterium dentium* i *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Przy czym bakterie Gram-dodatnie wykazały się większą wrażliwością niż bakterie Gram-ujemne. Ponadto w badaniach biochemicznych i eksperymentalnych wykazano działanie przeciwzapalne oparte na zahamowaniu produkcji cytokin prozapalnych oraz działanie immunomodulujące oparte na zahamowaniu proliferacji mitogenu (fitohemaglutyniny), jednojądrzastych komórek krwi obwodowej stymulowane antygenami, tlenku azotu i produkcji *interleukiny 2*.¹⁶³ Oba te mechanizmy mogą być podstawą do stosowania ekstraktu w chorobach infekcyjnych i zakażeniach, np. zapaleniu oskrzeli.

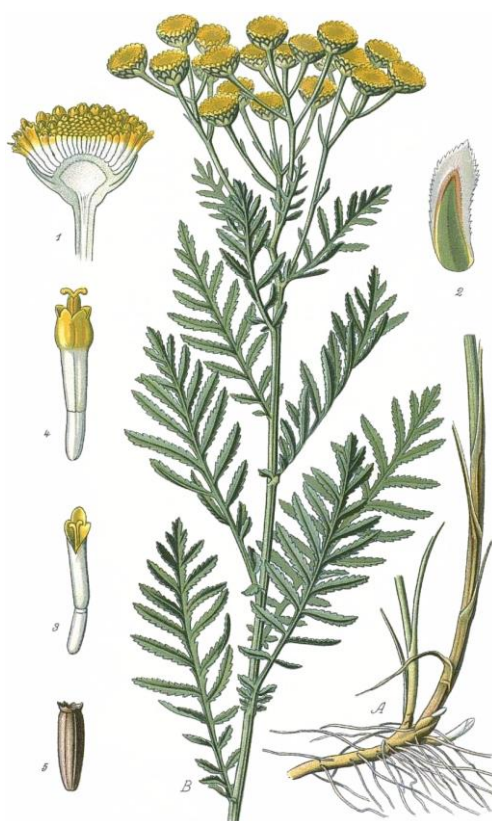
Neurologia jest dziedziną, w której dobre efekty neuroprotektoryjne, wynikające z zastosowania ekstraktu z tataraku zostały potwierdzone wieloma badaniami. W przeglądzie systematycznym literatury poświęconej drgawkom epileptycznym zaobserwowanym u pacjentów z Azji, Afryki i Ameryki Łacińskiej¹⁷⁷ zidentyfikowano aż 12 badań opisujących wpływ zastosowania ekstraktu z tataraku w zapobieganiu drgawkom oraz innym, patologicznym objawom ze strony ośrodkowego układu nerwowego, w tym w leczeniu bólów głowy i odwracaniu skutków toksycznego działania leków. Dobre efekty uzyskiwano w leczeniu demencji i zapobieganiu utracie pamięci,¹⁷⁸ depresji,¹⁷⁹ bólu neuropatycznego.¹⁸⁰ Oprócz działania neuroprotektoryjnego udowodniono właściwości antyoksydacyjne ekstraktu z tataraku, który dzięki niszczeniu wolnych rodników spowalnia procesy starzenia się organizmu i sprzyja zapobieganiu rozwojowi wielu chorób.¹⁶³ Zastosowanie ekstraktu z tataraku w celu obniżenia poziomu lipidów u ludzi ma długą tradycję w medycynie ludowej, ale znalazło także swoje potwierdzenie w badaniu eksperymentalnym prowadzonym w indyjskim ośrodku przez Parab i Mengi.¹⁸¹ Wykazano w nim, że 50% ekstrakt alkoholowy z tataraku (100 i 200 mg/kg) oraz saponiny (10 mg/kg) wyizolowane z ekstraktu wykazują istotną aktywność obniżającą stężenie lipidów. Ekstrakt wodny wykazywał taką aktywność jedynie w dawce 200 mg/kg. Działanie obniżające poziom lipidów oraz inne właściwości wyciągu z kłącza tataraku stwarzają możliwości zastosowania go we wspomagającym leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego.¹⁸²

3.3.4. Wrotycz pospolity (*Tanacetum vulgare* L.)

Wrotycz pospolity (*Tanacetum vulgare* L.), zwany również złocieniem pospolitym, jest wieloletnią rośliną zielną posiadającą długą historię stosowania w leczeniu różnych schorzeń. Zioło to należy do rodziny astrowatych (*Asteraceae*).¹⁸³ Jego nazwa rodzajowa, *Tanacetum*, pochodzi od greckiego słowa „*athanatos*” oznaczającego nieśmiertelność. W starożytności jego długowiecznym kwiatom przypisywano wyjątkową moc odmładzającą i zdolność do ochrony martwych ciał przed rozkładem.¹⁸⁴

Roślina ta ma krótkie rozgałęzione kłaczki, zwarty korzeń i rośnie do wysokości około 1,5 metra. Łodygi są sztywne, słabo rozgałęzione i gęsto pokryte liśćmi, które są dość duże, pierzastosieczne i rosnące naprzemianległe. Pomarańczowożółte kwiaty są duże, zebrane w drobne, płaskie koszyczki. Wrotycz kwitnie od maja do czerwca. Owocem jest pięciozęberkowa brunatnoszara niełupka. Surowcem leczniczym są koszyczki kwiatowe (*Flos Tanaceti*), które zbierane są na początku kwitnienia, a następnie suszone w temperaturze 30°C. Kwiaty wrotyczu zawierają 1-1,5% aktywnego olejku esencjonalnego. Cała roślina jest trująca z powodu dużej zawartości tujonu.^{146,185}

Wrotycz występuje natywnie w Europie i Azji, ale został zawleczony również do Ameryki Północnej. Porasta tereny do wysokości 2000 m n.p.m. Można go znaleźć dziko na łąkach, miedzach, zboczach, w zaroślach i nad brzegami wód.¹⁴⁶



Rysunek 14. Wrotycz pospolity (*Tanacetum vulgare* L.)¹⁸⁶

Aktywność biologiczna wrotyczu pospolitego dotyczy przede wszystkim działania antyoksydacyjnego, cytotoksycznego, przeciwbakteryjnego i przeciwzapalnego. Należy pamiętać, że właściwości przeciwutleniające roślin to jeden z najważniejszych wskaźników do oceny ich potencjalnego zastosowania w leczeniu. Ekstrakt metanolowy z nadziemnych części wrotyczu wykazywał działanie wychwytyjące wolne rodniki. W teście metodą DPPH uzyskano wynik EC_{50} wynoszący 37 $\mu\text{g/ml}$.¹⁸⁷ Aćimović i Puvača podają, że za działanie antyoksydacyjne w przypadku wrotyczu odpowiadają α -pinen i tlenek kariofilenu.¹⁸⁸ Inną substancją aktywną jest partenolid, seskwiterpenowy lakton, który występuje w liściach wrotyczu. Zawartość partenolidu w ekstraktach chloroformowych z wrotyczu pospolitego zebranych ze stanowisk w Serbii wynosiła 177,51 μg w 100 mg materiału roślinnego.¹⁸⁸

Preparaty z wrotyczu muszą zawierać co najmniej 0,2% partenolidu w Zjednoczonym Królestwie, a we Francji co najmniej 0,1% zawartości danego produktu. Jest to substancja o wielokierunkowym działaniu, niskiej toksyczności i dużym potencjale do wykorzystania w wielu schorzeniach.¹⁸⁹ Wrotycz zawiera jednak znacznie więcej substancji bioaktywnych – Ak i wsp.¹⁹⁰ przebadali gruntownie skład wrotyczu i wykazali obecność kilku grup fitochemicznych, przy czym zidentyfikowali aż 107 związków, w tym kwasy fenolowe, flawonoidy, terpenoidy i kwasy tłuszczowe. EMEA opracowała monografię jedynie dla ziela złocienia maruna (*Tanacetum parthenium*), który na podstawie zasady ugruntowanego stosowania może być stosowane u dorosłych i dzieci powyżej 18 roku życia. U młodszych dzieci agencja nie poleca jego stosowania z powodu braku danych na temat skuteczności i bezpieczeństwa.¹⁹¹

Onozato i wsp.¹⁸³ wykazali działanie przeciwwirusowe przeciwko wirusowi opryszczki (HSV-1) nadziemnych części wrotyczu w warunkach *in vitro*. Wykazano, że partenolid chroni komórki przed infekcją wirusową zakłócając replikację wirusa po etapie jego penetracji do komórki. W innych badaniach wykazano, że partenolid hamuje aktywację NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), czyli kompleksu białkowego działającego jako czynnik transkrypcyjny, zapobiegając tym samym indukcji NF- κ B, tj. kompleksu białkowego odpowiedzialnego za propagację procesu zapalnego. Zatem czynnik transkrypcyjny NF- κ B jest kluczowym regulatorem komórkowej odpowiedzi zapalnej i immunologicznej oraz częstym celem środków przeciwzapalnych i przeciwwirusowych.¹⁹² Działanie przeciwwirusowe i cytotoksyczne wykazano również w innych badaniach.¹⁹³

Oprócz działania przeciwwirusowego ekstrakt z wrotyczu wykazuje działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Zbadano zatem działanie wyciągu wodnego z wrotyczu przeciwko bakteriom pobranym od kobiet po menopauzie z rozpoznaniem nawracających infekcji dróg moczowych.¹⁹⁴ Ekstrakt skutecznie hamował wzrost koagulazo-ujemnych gronkowców (CNS; colagulase negative *Staphylococcus*) w próbkach moczu i wzrost zarówno

S. aureus oraz CNS w próbkach wydzieliny pochwowej. W innym badaniu wykazano skuteczność etylowego z wrotyczu przeciwko *Candida albicans*.¹⁹⁵ Wykazano, że ekstrakt zwiększał efektywność działania chlorheksydyny, dzięki czemu wydaje się uzasadnione wykorzystanie takiego połączenia w leczeniu endodontycznym.

Działanie przeciwzapalne i ułatwiające gojenie się ran zostało wykazane w modelach eksperymentalnych *in vivo*.¹⁹⁶ Działanie to nie jest przypisywane jednej substancji, a raczej efektowi synergicznego działania wielu substancji zawartych we wrotyczu. Szybsze następowanie faz gojenia się ran (proces zapalny, proliferacja i remodelling) potwierdzono również w badaniu histopatologicznym. Działanie przeciwzapalne związane jest również z hamowaniem produkcji tlenu azotu.¹⁹⁷

Udowodniono także działanie antyoksydacyjne ekstraktu z wrotyczu.^{193,197} Za to działanie odpowiadają głównie terpenoidy takie jak α -pinen, β -kariofilen i tlenek kariofilenu wyekstrahowane z olejku wrotyczy. Działanie antyoksydacyjne, przeciwstarzeniowe i przeciwzapalne przekłada się na działanie neuroprotekcyjne. W eksperymentalnym modelu choroby Alzheimera zaobserwowano istotną zmianę ekspresji genów biorących udział w patogenezie tej choroby (gen *Syp* i gen *Psen1*), co wskazuje na potencjalne właściwości zmniejszające demencję oraz ułatwiające uczenie przestrzenne i pamięć.¹⁹⁸

Wielu badaczy donosi o działaniu hamującym wzrost komórek nowotworowych. Vasileva i wsp.¹⁹⁹ badali wpływ ekstraktu z wrotyczu na kilka linii ludzkich komórek rakowych. Do badań włączono następujące linie komórek nowotworowych: inwazyjny gruczolakorak przewodowy piersi (linia MCF-7), potrójnie ujemny gruczolakorak piersi (linia MDA-MB-231), niedrobnokomórkowy rak płuc (linia H1299), niedrobnokomórkowy rak pęcherzykowy (linia A549), rak szyjki macicy (linia HeLa), rak wątrobowokomórkowy (linia HepG2), rak okrężnicy (linia HT-29) i rak prostaty (linia PC3). Badanie wykazało, że wyciąg z wrotyczu zawiera substancje o wysokiej selektywnej aktywności wobec komórek nowotworowych. W innym badaniu, wodny ekstrakt z wrotyczu zebranego w Bułgarii znacznie zmniejszył żywotność komórek rakowych linii MCF-7 raka piersi w sposób zależny od dawki i czasu.²⁰⁰

Aktywność odstraszająca wrotyczu pozwala na jego użycie w zapobieganiu chorobom przenoszonym przez owady, jak również wykorzystanie go w alternatywnej ekologicznej strategii kontroli upraw. Działanie to oparte jest na olejkach esencjonalnych zawierających złożone mieszaniny terpenów, terpenoidów i składników alifatycznych. Olejek wrotyczu pospolitego zawiera największe stężenie β -tujonu i kamfory.²⁰¹ Ze względu na dużą zawartość β -tujonu, wrotycz jest również stosowany zewnętrznie w preparatach przeciwko pasożytom, np. wszy i świerzbowiec. Jego skuteczność została potwierdzona w działaniu przeciw pasożytniczym przeciwko owsikom, glistom ludzkim i przywrze.²⁰²

4. Cel pracy

Celem pracy było przetestowanie procedury ozonowania w procesie higienizacji wybranych surowców roślinnych i produktów – suplementów diety, jak również określenie jej wpływu na zmiany w profilu jakościowym i ilościowym wytypowanych metabolitów wtórnych. Procedura ta docelowo będzie miała zastosowanie w produkcji suplementów diety produkowanych w przedsiębiorstwie Wedes Concept Piotr Rejda. Założeniem opracowanego procesu było otrzymanie produktu charakteryzującego się wysoką czystością mikrobiologiczną przy zachowaniu profilu metabolitów wtórnych roślin. Przeprowadzony proces był optymalizowany w skali laboratoryjnej (do 1 kg surowca).

5. Badania własne

5.1. Materiały

Do badań wykorzystano następujące zioła:

- kłącze tataraku zwyczajnego (*Acorus calamus* L.),
- ziele wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare* L.),
- owoc kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare semen* L.),
- koszyczek rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* L.)

Wszystkie surowce roślinne do badań zakupiono w firmie Aromatika Adam Iwańczuk w roku 2020. Wykorzystano również wybrane mieszanki ziołowe – składniki oferowanych suplementów diety, wytwarzanych w firmie Wedes Concept Piotr Rejda.

5.2. Metody

5.2.1. Procedura ozonowania ziół

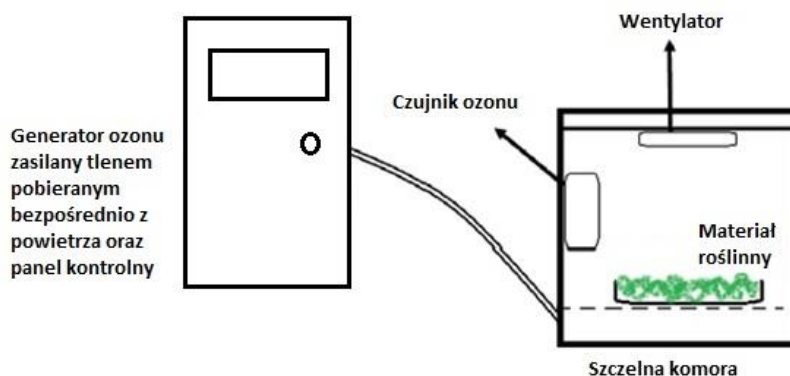
Ozon wykorzystywany do dekontaminacji był wytwarzany przez generator ozonu Korona L20 SPALAB (Laboratorium Korona, Piotrków Trybunalski, Polska), który do produkcji gazu wykorzystuje powietrze atmosferyczne. Urządzenie używane podczas badań laboratoryjnych przedstawia Rysunek 15. Wydajność generatora wynosiła 20 g ozonu na godzinę.



Rysunek 15. Generator ozonu *Korona L20 SPALAB*.

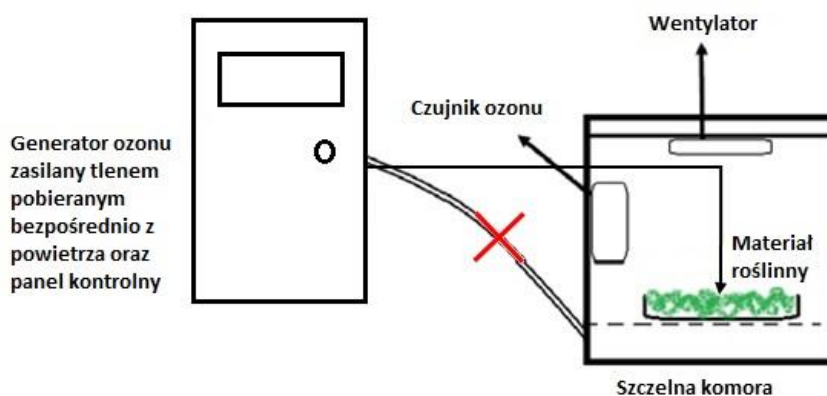
Sposób stworzenia modelu ozonowania materiałów użytych w niniejszej pracy jest projektem autorskim, na który złożyły się wnioski wyciągnięte z pierwszych prób

przeprowadzonych badań według sugestii popartych przeglądem literatury. Początkowo przewód wyprowadzający ozon z generatora skierowany pod membranę hermetycznej komory służącej jako miejsce do dekontaminacji próbek roślinnych. Schemat ten przedstawiono na Rysunku 16.



Rysunek 16. Model pierwszego zastosowanego w badaniach własnych sposobu ozonowania próbek materiału roślinnego.

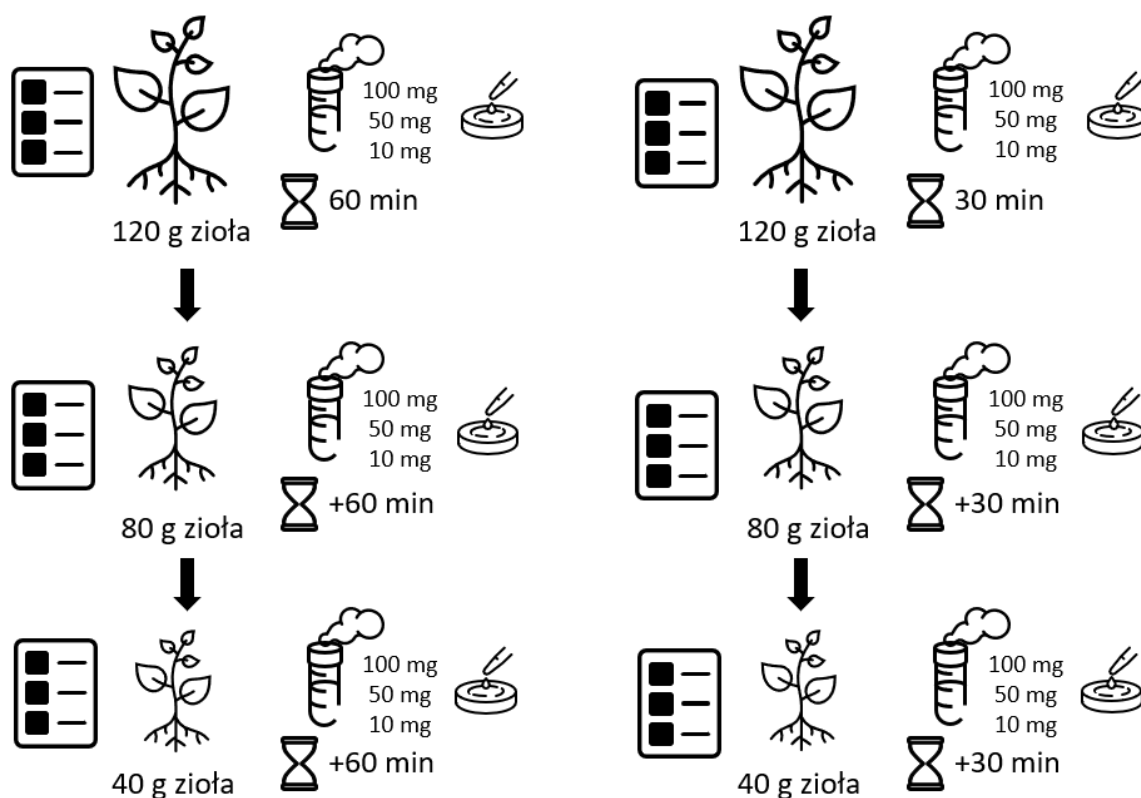
Uzyskane w ten sposób wyniki analiz mikrobiologicznych oczyszczanych surowców nie były zgodne z oczekiwaniami, co oznacza, że ogólna liczna drobnoustrojów nie podlegała zakładanej redukcji. Wobec tego stworzono nowy, autorki model, w którym ujście przewodu wyprowadzającego ozon skierowane jest bezpośrednio na próbkę poddawaną działaniu gazu. Model ten prezentuje Rysunek 17.



Rysunek 17. Model poprawionego na podstawie własnych doświadczeń schematu ozonowania próbek materiału roślinnego.

Proces dekontaminacji przeprowadzono w reaktorze w sposób ciągły, a poziom jego natężenia podlegał stałemu monitorowaniu przy pomocy czujnika ozonu. Proces prowadzono przez odpowiednio dobrany dla rodzaju materiału czas.

Proces ozonowania przeprowadzano w prostokątnym naczyniu szklanym (reaktorze) o pojemności 10 l, w temperaturze pokojowej ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$). Wszystkie próbki były dekontaminowane ozonem w trzech natężeniach gazu – 10 mg/m^3 , 50 mg/m^3 i 100 mg/m^3 oraz dwóch przedziałach czasowych tj. 30 i 60 minut. Rysunek 18 przedstawia proces dekontaminacji wykorzystany w niniejszej pracy.



Rysunek 18. Schemat badania procesu dekontaminacji ozonem z uwzględnieniem masy próbek i czasu ozonowania.

Wszystkie zioła, tj. tatarak zwyczajny (*Acorus calamus*), wrotycz pospolity (*Tanacetum vulgare*), nasiona kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare semen*), rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla*) oraz wybrane mieszanki ziołowe poddano identycznemu procesowi dekontaminacji przy udziale ozonu. Wyjściowa próbka badawcza każdego zioła zawierała 120 g suchej masy, którą początkowo w całości poddano ekspozycji na ozon. Czas ozonowania wynosił 30 lub 60 minut przy natężeniu gazu 10 mg/m^3 , 50 mg/m^3 lub 100 mg/m^3 . Następnie, odsypano 40 g materiału i został on zamrożony. Kolejne 80 g surowca poddano dalszej dekontaminacji przez 30 lub 60 min. i odpowiedniej dawce natężenia gazu. W kolejnym etapie ozonowania 40 g materiału z poprzedniego etapu odsypano i zamrożono, a pozostałe 40 g poddano dalszemu ozonowaniu przez kolejne 30 lub 60 minut i ustalonej dawce ozonu (10 mg/m^3 , 50 mg/m^3 i 100 mg/m^3). Materiał roślinny dekontaminowany był w czasie od 30 do 60 minut i stężeniu ozonu od 10 mg do 100 mg/l. Każdą z uzyskanych próbek poddano analizie mikrobiologicznej oraz

pod kątem zmienności istotnych związków biologicznie czynnych. Proces ozonowania dla każdego z wariantów przeprowadzono trzykrotnie.

5.2.2. Oznaczanie czystości mikrobiologicznej materiału roślinnego

Wpływ ozonowania na czystość mikrobiologiczną badanych preparatów ziołowych określono wg wymagań Farmakopei Polskiej, wyd. XI.²⁰³

Badane próbki potraktowano jako produkty nierozpuszczalne w wodzie. W celu określenia ilości drobnoustrojów 1g odpowiednio potraktowanego wcześniej ozonem rumianku zawieszono w 100 ml bulionu z hydrolizatem kazeiny oraz soi. Dla każdej badanej próby wykonano 6 kolejnych 10-krotnych rozcieńczeń stosując ten sam rozpuszczalnik. Korzystając z metody posiewu powierzchniowego, w celu określenia ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych (Total Aerobic Microbial Count, TAMC), 100 µl próbki z każdego poziomu rozcieńczenia przenoszono na agar zawierający hydrolizat kazeiny oraz soi (podłoże tryptozowo-sojowe) oraz odpowiednio na podłoże MacConkey'a (dla Gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacterales*). Natomiast dla określenia ogólnej liczby drożdży i pleśni (Total Yeasts/Molds Count, TYMC) próbki posiewano na podłoże Sabouraud z dekstrozą. Badanie metodą bezpośredniego posiewu wykonano co najmniej 3 krotnie na badanym podłożu dla każdej oznaczanej próbki.

Do każdego oznaczenia nastawiono kontrole: ujemną (zawierającą samo badane podłoże) oraz „0” (zawierającą produkt wyjściowy, tj. materiał roślinny przed procesem ozonowania).

Posiane płytki inkubowano w temp. 30°C przez 72 godziny. Średnie obliczone z wyrosniętych kolonii przeliczano na CFU/ml i określano liczbę drobnoustrojów w 1g preparatu. W interpretacji wyników kolonie grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych, wykrytych na podłożu z hydrolizatem kazeiny oraz soi zaliczono do liczby TAMC, z kolei kolonie bakterii wykryte na podłożu Sabouraud z dekstrozą zaliczono do liczby TYMC. Wyniki próbek po ozonowaniu porównano do próbki „0” przed ozonowaniem.

5.2.3. Otrzymywanie i oznaczanie składu olejków eterycznych

Wysuszony surowiec roślinny (2g) umieszczono w kolbie okrągłodennej o pojemności 250 ml, następnie dodano 100 cm³ wody destylowanej i prowadzono hydrodestylację za pomocą aparatu Derynga. Przed rozpoczęciem właściwej destylacji dodano 1 cm³ wzorca 2-undekanonu w stężeniu 1mg/ml w cykloheksanie (wg. publikacji). Destylację prowadzono przez 3 godziny, po czym zebrano warstwę organiczną zawierającą zawieszony olejek eteryczny. Próbki do momentu przeprowadzenia analizy GC-MS przechowywano w temperaturze -20 °C.

Destylację przeprowadzono dla następujących prób:

- wysuszony surowiec bez ozonowania jako próba kontrolna

- surowiec roślinny po 3 krotnym ozonowaniu dawką 10 mg/m³ przez 30 min
- surowiec roślinny po 3 krotnym ozonowaniu dawką 10 mg/m³ przez 60 min
- surowiec roślinny po 3 krotnym ozonowaniu dawką 50 mg/m³ przez 30 min
- surowiec roślinny po 3 krotnym ozonowaniu dawką 50 mg/m³ przez 60 min
- surowiec roślinny po 3 krotnym ozonowaniu dawką 100 mg/m³ przez 30 min
- surowiec roślinny po 3 krotnym ozonowaniu dawką 100 mg/m³ przez 60 min

Otrzymaną próbkę poddano analizie metodą chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem mas (GC-MS, Saturn 2000 Varian Chrompack lub Shimadzu QP 2020) używając kolumny ZB-5 (5% fenylometylopolisiloksanu) (30 m × 0,53 mm × 0,25 μm). Jony cząsteczkowe i fragmentacyjne otrzymano metodą jonizacji elektronami (EI, 70 eV). użytym gazem nośnym był hel - przepływ 1 ml/min, stosując współczynnik podziału 1:20. Program temperaturowy był następujący: 45°C przez 0 min, narost 2°C/min 45-150 narost 25°C/min do 270 °C i 5 min w temp. 270°C (Shimadzu) oraz 60 °C przez 2 min, następnie 4 °C do 240 °C (Varian Saturn WorkStation 2000/2000). Identyfikacji związków dokonano przy użyciu: a) dostępnych w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy wzorców czystych substancji; b) obliczonych indeksów retencji Kovaca c) porównania widm EI MS z literaturowymi, tj. bazą NIST20. Do wyznaczenia indeksów Kovaca zastosowano serię *n*-alkanów C-8 do C-28 (Neochem, Niemcy), porównując z danymi literaturowymi, tj. baza danych NIST, <https://webbook.nist.gov> z dnia 10 maja 2022, średnimi wartościami indeksów retencji w bazie NIST20) oraz bazą MassFinder. Widma masowe EI MS interpretowano przy użyciu oprogramowania AMDIS v. 2.73.

5.2.4. Oznaczanie zawartości polifenoli

5.2.4.1. Oznaczenie zawartości polifenoli ogółem

Oznaczenie wykonano wg publikacji Mamat i wsp.²⁰⁴ Skrócony opis przedstawiono poniżej.

Ekstrakty przygotowane zostały z 0.2 g suszonego materiału roślinnego, który zawieszony został w 5 ml 50 % metanolu i umieszczony w łaźni ultradźwiękowej przez 10 min. Po 24 h proces powtórzono a następnie przesączono przez filtr silikażelowy uzyskane ekstrakty. Wszystkie ekstrakty wykonano w trzech powtórzeniach.

Do próbek typu Eppendorf przeniesiono po 20μl odpowiedniego ekstraktu materiału roślinnego i 180μl odczynnika Folin-Ciocalteu. Po 5 minutach inkubacji dodano 1,2 ml wody destylowanej i 400μl 20% roztworu Na₂CO₃ i całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po zmianie barwy roztworu z zielonej na granatową przeniesiono po 200μl

próbki w 3 powtórzeniach na płytkę 96-dołkową. Absorbancję zmierzono przy 750 nm. Osobno sporządzono krzywą wzorcową kwasu galusowego rozpuszczonego w metanolu.

5.2.4.2. Oznaczenie związków polifenolowych za pomocą LCMS

Okolo 100 mg sproszkowanego materiału roślinnego macerowano w 2 ml roztworu MeOH łązni ultradźwiękowej przez okres 1h. Po odwirowaniu i odseparowaniu frakcji organicznej czynność powtórzono dwukrotnie. Połączone frakcje organiczne odparowano na wyparce obrotowej, dodano 2 ml MeCN i po przefiltrowaniu (PTFE, 0,22 μ m) poddano analizie.

Analizę LC-MS przeprowadzano przy wykorzystaniu sprzętu Shimadzu HPLC Prominence- i LC-2030C sprzężonego z potrójnym kwadropolowym spektrometrem mas (Shimadzu LCMS-8045). Rozdział związków w ekstraktach dokonano na kolumnie z fazą odwróconą (Kinetex 2,6 μ m C18 100A, 100 \times 3 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Niemcy) w temperaturze 35 $^{\circ}$ C. Do analizy zastosowano dwie fazy ruchome: woda z 0,1% kwasem mrówkowym (eluent A) oraz acetonitryl z 0,1% kwasem mrówkowym (eluent B). Stosowane rozpuszczalniki wykazują czystość > 99.95%. Szybkość przepływu faz przez kolumnę wynosiła 0.3 ml/min, a gradient był następujący zaczynając od 10% rozpuszczalnika B, następnie do 20% B do 5 min, potem 60% B do 10 min, następnie do 10% B do osiągnięcia w czasie 13 min, a na koniec 10% do 17 min. Nastrzyk próbki wynosił 1 μ l.

Analizę przeprowadza się w jonizacji typu *electro-spray* (ESI), pracuje ona w jonizacji negatywnej oraz pozytywnej w zależności od związku chemicznego, a napięcie rozpylania jonów jest ustawione na 4000 V. Związki bioaktywne analizowano metodą monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM). Przykładowe parametry MRM podano w Tabeli 1. Pozostałe parametry MS ustawiono następująco: przepływ gazu nebulizującego 3 L/min, przepływ gazu ogrzewającego 10 L/min, temperatura interfejsu 300 $^{\circ}$ C, temperatura desolvatacji 526 $^{\circ}$ C, temperatura bloku cieplnego 400 $^{\circ}$ C oraz przepływ gazu suszącego 10 l/min.

Analiza porównawcza została wykonana przy wykorzystaniu czystych substancji wzorcowych i krzywych kalibracyjnych. Analizę otrzymanych wyników wykonano w programie LabSolution Postrun Analysis.

Ze względu na brak znakowanych izotopowo wzorców, zdecydowano się na wykonanie analizy porównawczej frakcji polifenolowej. Za 100% przyjęto zawartości w materiale roślinnym, niepoddanym procesowi ozonowania. Wyniki przedstawiono jako zmianę procentową w materiale roślinnym.

5.2.5. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej

Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodami ABTS i DPPH ekstraktów wykonano według metod opisanych w publikacji Tsivelika i wsp.²⁰⁵ Ekstrakty przygotowane zostały z 0.2 g suszonego materiału roślinnego, który zawieszony został w 50 % metanolu i umieszczony w łaźni ultradźwiękowej przez 10 min. Po 24 h proces powtórzono a następnie przesączono uzyskane ekstrakty. Wszystkie ekstrakty wykonano w trzech powtórzeniach.

5.2.5.1. Metoda DPPH

10mg DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) rozpuszczono w metanolu w kolbie jednomiarowej o objętości 50 ml, uzyskując 0,5 mmolowy roztwór. Następnie dla każdego, ekstraktu w 3 powtórzeniach wariantu ozonowania, przygotowano szereg rozcieńczeń. Do probówek typu Eppendorf zawierających odpowiednio 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l, 200 μ l, 250 μ l ekstraktu dodano wodę destylowaną do objętości 2 ml) i przeniesiono na płytkę 96-dołkową przeniesiono 100 μ l. Następnie dodano 100 μ l uprzednio przygotowanego roztworu DPPH do każdego dołka. Dodatkowo naniesiono w trzech powtórzeniach 100 μ l roztworu DPPH i 100 μ l metanolu jako próbę kontrolną. Następnie płytkę inkubowano w ciemności przez 30 minut. Odczytu absorbancji dokonano przy długościach fali 517 nm wykorzystując czytnik płytek BioTek Synergy H1. Aby przeliczyć aktywność w powszechnie przyjętych jednostkach μ g/ml konieczne było wyznaczenie w trzech powtórzeniach suchej masy ekstraktów.

5.2.5.2. Metoda ABTS

Przygotowano roztwory 7 mM roztwór ABTS i 2,4 mM roztwór nadsiarczanu potasu, które połączono razem i inkubowano w ciemności przez 1 dzień. Następnie dla każdego z trzech ekstraktów, każdego wariantu ozonowania, przygotowano szereg rozcieńczeń w probówkach typu Eppendorf (50 μ l, 100 μ l, 150 μ l, 200 μ l, 250 μ l ekstraktu uzupełniono destylowaną wodą do objętości 2 ml). Na czystą płytkę 96-dołkową przeniesiono w trzech powtórzeniach po 150 μ l rozcieńczonego ekstraktu i dodano 50 μ l roztworu ABTS+K₂S₂O₈. Całość inkubowano w ciemności przez 30 minut. Odczytu absorbancji dokonano przy długościach fali 734 nm wykorzystując czytnik płytek BioTek Synergy H1. Aby przeliczyć aktywność przeciwutleniającą wyizolowanych związków w powszechnie przyjętych jednostkach tj. μ g/ml konieczne było uzyskanie w trzech powtórzeniach suchej masy ekstraktów.

6. Wyniki i dyskusja wyników

Tematem pracy doktorskiej było wykorzystanie procesu ozonowania jako skutecznego sposobu dekontaminacji surowców zielarskich, wykorzystywanych w procesie produkcji suplementów diety w przedsiębiorstwie Wedes Concept Piotr Rejda.

Pomimo zakupu ziół, proszków witaminowych oraz mineralnych z pewnych źródeł tj. dopuszczonych do handlu z Unią Europejską odpowiednimi zezwoleniami, a co za tym idzie objętych kontrolą jakości, firma miała wątpliwości co do czystości mikrobiologicznej nabywanych towarów. Świadczyły o tym wyniki analiz mikrobiologicznych, zleczanych przez przedsiębiorstwo Wedes Concept każdorazowo przed wykorzystaniem zakupionych surowców roślinnych do produkcji nowych partii suplementów diety. System wewnętrznej kontroli, stosowany w firmie jest praktykowany od samego początku jej istnienia, a związany jest przede wszystkim z dbałością o czystość i bezpieczeństwo mikrobiologiczne produkowanych suplementów oraz zdrowie i bezpieczeństwo potencjalnych klientów. Wiele ziół używanych w recepturze suplementów diety pochodzi z obszaru Wschodniej Azji (głównie Republiki Chińskiej oraz wschodnich terenów Chińskiej Republiki Ludowej), zatem sam transport (ze względu na czas trwania oraz warunki) do krajów Europy niesie duże niebezpieczeństwo zanieczyszczenia surowca. Niejednokrotnie także zdarzało się, że świeżo zakupione materiały roślinne kierowano do utylizacji, ponieważ przeprowadzone na zlecenie formy badania czystości mikrobiologicznej pokazywały, że surowiec jest mocno zanieczyszczony (powyżej granicy dopuszczalnej przez prawo) i może stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia konsumenta. Tego typu zdarzenia implikowały problemy natury ekonomicznej, gdyż sam zakup oraz późniejsza konieczność utylizacji generowały duży i bezzwrotny koszt dla przedsiębiorstwa. Po przeprowadzeniu analizy dostępnej literatury na temat różnorodności oraz skuteczności wykorzystywanych w przeszłości metod służących oczyszczaniu produktów żywnościowych, w tym ziół (np. higienizacja parą wodną, etanolem, przy użyciu mikrofal, podwyższonego ciśnienia czy też promieniowania jonizującego), zarząd firmy zgodnie uznał, iż żadna z nich nie jest na tyle dobra, żeby zostać przyjętą i wdrożoną do procesu produkcyjnego w przedsiębiorstwie. Jednak zapotrzebowanie na skuteczny sposób dekontaminacji surowców roślinnych pozostało i stworzyło koncepcyjny fundament do poszukania i dopasowania innej, lepszej i bardziej ekonomicznie uzasadnionej metody niż stosowane dotychczas. W ten sposób we współpracy Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu opracowano metodę opartą na użyciu ozonu jako środka dekontaminującego zioła.

Podczas badań laboratoryjnych opracowano autorski sposób wykorzystania ozonu jako czynnika w procesie oczyszczania surowców zielarskich oraz gotowych mieszanek sproszkowanych ziół, które stanowią zawartość suplementów diety (w tym kapsułek) produkowanych przez firmę Wedes Concept Piotr Rejda. Cały proces dekontaminacyjny przeprowadzono zgodnie z wytycznymi i dyrektywami Unii Europejskiej (dzięki czemu uniknięto zanieczyszczenia ziół i gotowych mieszanek dodatkowymi związkami toksycznymi dla ludzi oraz takimi, które mogą zmienić ich właściwości fitoterapeutyczne i/lub sensoryczne 353), jednakże w sposób nowy i opracowany w trakcie badań podczas pracy w laboratorium. Do głównych zalet wykorzystujących ozon jako środek dekontaminujący należą relatywnie duża skuteczność, szerokie zakres działania bójkowego jak również brak toksyczności. Ozon łatwo przenika do materiału roślinnego i nie zmienia jego zapachu. Metoda ta nie jest pozbawiona wad, do których należy m.in. zróżnicowana skuteczność zależna od rodzaju drobnoustroju, gdyż niektóre mikroorganizmy wykazują oporność na działanie ozonu.^{206,207} Jest to technologia przyjazna dla środowiska, ekonomicznie uzasadniona oraz nie wymagająca wielu skomplikowanych urządzeń czy dodatkowego personelu obsługującego.²⁰⁸

Do tej pory nie ustalono optymalnych parametrów ozonowania, gdyż skuteczność procesu zależy od wielu czynników, włączając rodzaj materiału roślinnego poddawanego dekontaminacji. W literaturze dostępne są opisy parametrów ozonowania dla wybranych ziół oraz w przemyśle spożywczym.^{209,210}

Parametry ozonowania dobrano na podstawie dostępnej literatury pomimo różnic w zakresie wielkości i rodzaju próbek oraz samego procesu. Na podstawie informacji zawartych w publikacji Kazi i wsp.²¹¹ postanowiono zastosować podobny schemat aparatury do ozonowania próbek roślinnych. Komora, do której podawany był ozon wyposażona była w wentylator, miernik poziomu ozonu a sam ozon podawany był od dołu komory. Zastosowano proponowane w tej publikacji natężenia ozonu w wysokości od 1, 2, 3, 4, 5 ppm w różnym czasie 15, 30, 45, 60 min. Po przebadaniu otrzymanych próbek pod kątem czystości mikrobiologicznej okazało się, że metoda była nieskuteczna. W wszystkich wariantach liczba mikroorganizmów tylko nieznacznie spadała. Również powtórzenie procedury trzykrotnie nie wpływało na zadawalającą poprawę wyników. Na podstawie następnych eksperymentów ustalono, że ozon powinien być podawany na bezpośrednio na warstwę ziół umieszczonych w perforowanym naczyniu, a sam proces ozonowania powinien być wykonywany trzykrotnie w odstępach 24 godzinnych. Jako modelowe wybrano trzy stężenia ozonu 10 mg/ m³, 50 mg/ m³ i 100 mg/m³ przez 30 lub 60 minut.

6.1. Czystość mikrobiologiczna próbek roślinnych poddanych ozonowaniu

Wpływ ozonowania na czystość mikrobiologiczną badanego preparatów ziołowych określono wg wymagań Farmakopei Polskiej, wyd. XI.²⁰³

Celem badania czystości mikrobiologicznej było określenie ogólnej liczby flory tlenowej (bakterii i/lub grzybów) oraz wykluczenie lub stwierdzenie obecności wybranych drobnoustrojów. Na podłoże stałe nałożono próby pobrane po każdym kolejnym cyklu ozonowania. Oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych (Total Aerobic Microbial Count, TAMC) oraz ogólnej liczbie drożdży i pleśni (Total Yeast and Mould Count - TYMC). Płytki inkubowano w temperaturze pokojowej w zakresie 15-25°C przez 3 dni. Następnie odczytano próby a wyniki przedstawiono w Tabelach 3-6.

Zdjęcie przykładowej płytki, na którą nakładano próby materiałów roślinnych przed ozonowaniem przedstawia Rysunek 19, natomiast zdjęcie płytki z materiałem roślinnym po każdym kolejnym cyklu ozonowania prezentuje Rysunek 20.



Rysunek 19. Przykład szalki Petriego z narośniętymi mikroorganizmami obecnymi w ziołach nie poddanych ozonowaniu.



Rysunek 20. Przykład szalki Petriego z narośniętymi mikroorganizmami obecnymi w ziołach poddanych ozonowaniu.

Wyniki badań obecności mikroorganizmów obecnych w rumianku wskazują, że już pierwsze ozonowanie przy nawet najniższym stężeniu ozonu redukowało ilość TAMC o jeden rząd wielkości. Podwyższenie stężenia ozonu oraz wydłużenie czasu ekspozycji powodowało najczęściej redukcję ilości mikroorganizmów. Najniższą ilość bakterii tlenowych obserwowano przy stężeniu ozonu 100mg/m³. Podobną zależność można również zauważyć w przypadku TYMC, gdzie ilość ozonu miała większy wpływ niż czas ekspozycji. Warto zauważyć, że całkowita redukcja bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* nastąpiła przy dawce ozonu 50 mg/m³ i czasie ekspozycji 60 minut.

Tabela 3. Wyniki badań przeciwdrobnoustrojowych dla rumianku (*Matricaria chamomilla*).

TAMC	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
10 mg/m ³ 50 mg/m ³ 100 mg/m ³	1,06E+05						
		2,23E+04	2,80E+04	1,47E+04	2,26E+04	2,06E+04	4,18E+03
		4,17E+03	3,50E+03	4,50E+03	1,70E+04	7,22E+03	4,56E+03
		3,43E+03	4,05E+03	2,53E+03	3,27E+03	2,51E+03	1,95E+03

TYMC	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
10 mg/m ³ 50 mg/m ³ 100 mg/m ³	1,12E+03						
		7,33E+02	5,67E+02	4,67E+02	5,00E+02	3,83E+02	3,50E+02
		6,50E+02	3,00E+02	3,33E+02	6,17E+02	3,83E+02	2,00E+02
		4,50E+02	3,00E+02	2,83E+02	4,67E+02	3,56E+02	2,00E+02

Enterobac	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
10 mg/m ³ 50 mg/m ³ 100 mg/m ³	1,00E+02a						
		1,01E+02a	1,00E+02a	0,00E+00b	1,00E+0a2	6,67E+01a	0,00E+00
		6,67E+01a	0,00E+00b	0,00E+00b	0,00E+00b	0,00E+00	0,00E+00
		3,33E+01a	0,00E+00b	0,00E+00b	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Legenda: K – kontrola przed ozonowaniem; NB – nie badano; TAMC – TYMC - ; E – bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*; I,II,III – ilość cykli ozonowania

Podczas badań przeciwdrobnoustrojowych owoców kopru włoskiego stwierdzono mniejszą skuteczność ozonu niż w przypadku ziela rumianku. Natomiast warto podkreślić, że wyjściowo materiał roślinny zawierał mniejszą ilość mikroorganizmów. Jednakże trzykrotne ozonowanie w dawce 100mg/m³ spowodowało redukcję TAMC o dwa rzędy wielkości. W przypadku TYMC celem redukcji ilości mikroorganizmów niezbędne wydaje się trzykrotne ozonowanie. Z kolei bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae* w ogóle nie były obecne w tym materiale roślinnym.

Tabela 4. Wyniki badań przeciwdrobnoustrojowych dla kopru włoskiego, (*Foeniculum vulgare*)

TAMC	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
10 mg/m ³ 50 mg/m ³ 100 mg/m ³	6,88E+03						
		1,07E+03	5,40E+02	2,40E+02	2,86E+03	4,80E+02	4,17E+02
		9,45E+02	5,00E+02	3,18E+02	6,58E+02	5,00E+02	3,10E+02
		5,91E+02	6,60E+02	7,10E+02	3,27E+03	2,26E+02	6,45E+01

TYMC	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
10 mg/m ³ 50 mg/m ³ 100 mg/m ³	6,33E+02						
		2,00E+02	1,50E+02	3,33E+01	2,67E+02	1,83E+02	6,67E+02
		1,33E+02	1,33E+02	8,33E+01	1,00E+02	5,00E+01	5,00E+01
		5,00E+02	1,67E+02	1,17E+02	1,67E+02	1,17E+02	3,33E+01

Enterobac	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
10 mg/m ³ 50 mg/m ³ 100 mg/m ³	0,00E+00						
		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
		0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Legenda: K – kontrola przed ozonowaniem; NB – nie badano; TAMC – TYMC - ; E – bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*; I,II,III – ilość cykli ozonowania

Badając ilość mikroorganizmów obecnych w ziele wrotyczu można zauważyć, że trzykrotne ozonowanie w czasie 60min przy dawce ozonu 100mg/m³ dało porównywalne wyniki TAMC i TYMC co przy takim samym czasie ekspozycji i trzykrotnym ozonowaniu w dawce ozonu 50 mg/m³. Z kolei ilość bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* została obniżona o dwa rzędy przy trzykrotnym ozonowaniu najwyższą dawką ozonu w czasie 60 minut.

Tabela 5. Wyniki badań przeciwdrobnoustrojowych dla wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare* L.)

TAMC	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
10 mg/m ³	1,06E+05 ^a	1,05E+05	1,76E+05	1,45E+05	3,18E+04	1,90E+04	1,98E+04
50 mg/m ³		1,83E+05	1,74E+05	8,46E+04	2,67E+04	3,78E+04	9,47E+03
100 mg/m ³		2,87E+05	2,87E+04	2,52E+04	7,50E+03	9,67E+03	9,00E+03

TYMC	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
10 mg/m ³	2,24E+04	1,90E+04	6,96E+04	3,07E+04	2,67E+04	6,80E+03	5,00E+03
50 mg/m ³		5,27E+04	3,32E+04	1,80E+04	3,67E+04	7,67E+03	3,73E+03
100 mg/m ³		1,68E+04	7,33E+03	4,33E+03	7,00E+03	4,33E+03	3,00E+03

Enterobac	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
10 mg/m ³	5,60E+04	7,85E+04	1,45E+04	1,54E+04	1,37E+04	1,33E+04	7,33E+03
50 mg/m ³		1,87E+04	9,47E+03	2,39E+03	2,90E+04	1,23E+04	1,00E+04
100 mg/m ³		2,00E+04	5,00E+03	2,15E+03	1,67E+03	1,00E+03	3,33E+02

Legenda: K – kontrola przed ozonowaniem; NB – nie badano; TAMC – TYMC - ; E – bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*; I,II,III – ilość cykli ozonowania

Wydaje się, że mikroorganizmy bytujące na kłęczu tataraku są najmniej wrażliwe na ozon, ponieważ nawet trzykrotne ozonowanie w dawce 100 mg/m w czasie 60 minut pozwoliło obniżyć wartość TAMC do $2,63 \times 10^{-4}$ a wartość TYMC do $6,33 \times 10^{-3}$. Z kolei całkowitą eliminację ilość bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* uzyskano już przy trzykrotnym ozonowaniu w najniższej dawce ozonu.

Tabela 6. Wyniki badań przeciwdrobnoustrojowych dla tataraku zwyczajnego (*Acorus calamus* L.)

TAMC	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
	6,79E+04						
10 mg/m ³		5,97E+04	3,47E+04	3,23E+04	6,15E+04	3,46E+04	2,77E+04
50 mg/m ³		5,67E+04	4,72E+04	2,28E+04	5,00E+04	3,35E+04	2,62E+04
100 mg/m ³		6,42E+04	4,20E+04	1,52E+04	4,70E+04	2,45E+04	2,63E+04

TYMC	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
	2,78E+04						
10 mg/m ³		2,43E+04	2,10E+04	9,67E+03	1,43E+04	1,67E+04	6,67E+03
50 mg/m ³		4,00E+04	1,07E+04	2,00E+04	2,30E+04	9,00E+03	5,20E+03
100 mg/m ³		1,53E+04	1,03E+04	6,33E+03	1,83E+04	1,07E+04	6,33E+03

Enterobac	K	30 min			60 min		
		I	II	III	I	II	III
	4,00E+03						
10 mg/m ³		3,33E+02	3,33E+02	0,00E+00	3,33E+02	0,00E+00	0,00E+00
50 mg/m ³		3,33E+02	2,33E+02	0,00E+00	3,33E+02	0,00E+00	0,00E+00
100 mg/m ³		2,33E+03	4,67E+02	0,00E+00	1,33E+02	0,00E+00	0,00E+00

Legenda: K – kontrola przed ozonowaniem; NB – nie badano; TAMC – TYMC - ; E – bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*; I,II,III – ilość cykli ozonowania

Podsumowując tę część badań, z całą stanowczością można potwierdzić, że ozonowanie jest przydatną metodą do higienizacji ziół. Nasze wcześniejsze badania wykazały, by ozonowanie było skuteczne niezbędne jest przeprowadzenie trzykrotnego ozonowania w odstępie 24 h. Podobną procedurę ozonowania zastosowała Brodowska i wsp.¹⁷ otrzymując dobra czystość mikrobiologiczną badanego materiału. Powtórzenie procesu ozonowania eliminację części drobnoustrojów występujących zarówno w formie wegetatywnej jak i przetrwalnikowej w badanej próbce. Podwyższona czystość mikrobiologiczna półproduktów Naszej firmy pozwoli uzyskać wartości dedykowane dla leków.

6.2. Oznaczenie składu jakościowego olejków eterycznych z ozonowanych ziół

Materiał roślinny nie poddany ozonowaniu oraz próbki otrzymane po trzykrotnym ozonowaniu poddano destylacji z para wodną z wykorzystaniem aparatu Derynga. Jako wzorzec wewnętrzny stosowano 2-undekanon rozpuszczony w cykloheksanie. Otrzymane ekstrakty analizowano wykorzystując do tego celu chromatograf gazowy sprzężony z spektrometrem mas. Należy pamiętać, że względna zawartość procentowa składników olejków eterycznych może

zależć od takich czynników jak odmiana lub chemotyp rośliny ale również czynników środowiskowych a nawet warunków ekstrakcji.

Głównymi składnikami otrzymanego olejku z ziela wrotyczu pospolitego były β -tujon, borneol, 1,8-cyneol, chryzantenon i kamfora (Tabela 7). Zawartość tych składników w olejku z roślin poddanych ozonowaniu nie zmieniała się znacząco. Również nienasycone związki terpenowe nie ulegały degradacji podczas kontaktu z ozonem. We wszystkich zastosowanych wariantach ozonowania nie obserwowaliśmy znaczących zmian w jego profilu jakościowym i ilościowym. Należy wysnuć wniosek iż pod kątem zachowania frakcji lotnych są możliwe do stosowania w procesie produkcji.

Tabela 7. Profil chemiczny (%*) olejków eterycznych otrzymanych z destylacji wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare*)

RT [min]	Nazwa	Ri exp	Ri lit	Kontrola	10 mg/m ³	10 mg/m ³	50 mg/m ³	50 mg/m ³	100 mg/m ³	100 mg/m ³
					30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
6.41	tricyklen	928	927	0.19	0.16	0.15	0.22	0.17	0.16	0.19
6.54	α -tujen	933	932	0.29	0.12	0.14	0.17	0.16	0.16	0.17
6.72	α -pinen	940	939	1.77	1.46	1.35	1.67	1.73	1.33	1.77
7.15	kamfen	955	955	2.52	2.49	2.35	3.14	2.2	2.29	2.6
7.86	sabinen	979	976	0.33	0.21	0.47	0.2	0.22	0.27	0.42
7.96	β -pinen	982	980	0.37	0.38	0.3	0.44	0.45	0.34	0.46
8.36	dehydro-1,8-cyneol	993	991	0.05	0.11	0.09	0.1	0.07	0.09	0.09
8.60	(3E)-2,5,5-trimetyl-3,6-heptadien-2-ol	1000	999	0.32	0.15	0.11	0.25	0.18	0.15	0.24
8.80	α -felandren	1008	1007	0.09	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.03
9.19	α -terpinen	1021	1018	0.36	0.08	0.14	0.19	0.17	0.15	0.26
9.43	p-cymen	1029	1026	1.38	0.57	0.99	1.07	1.12	1.13	1.28
9.63	1,8-cyneol	1036	1035	5.24	6.47	5.47	4.32	4.89	5.69	5.56
10.59	γ -terpinen	1065	1062	4.53	1.84	1.38	1.49	1.99	1.59	2.03
10.82	cis-hydrat sabinenu	1072	1070	0.36	0.36	0.45	0.06	0.27	0.41	0.14
11.35	3,3,6-trimetylhepta-1,5-dien-4-ol	1086	1083	0.3	0.17	0.14	0.12	0.19	0.18	0.16
11.54	terpinolen	1091	1088	0.15	0.33	0.07	0.1	0.12	0.09	0.12
11.86	transhydrat sabinenu	1100	1098	0.26	0.27	0.47	0.09	0.37	0.45	0.22
12.03	zw. nieoznaczony	1105		0.05	0.05	0.26	0.05	0.2	0.12	0.1
12.10	α -tujon	1108	1102	0.84	0.61	0.46	1.25	0.65	1.14	0.59
12.46	β -tujon	1119	1114	42.11	34.57	38.27	40.13	40.05	39.11	37.04
12.64	zw. nieoznaczony	1125		0.62	0.94	0.2	0.07	0.85	0.82	0.84
12.74	chryzantenon	1128	1127	1.3	4.9	5.17	2.41	6.15	3.72	5.13
13.10	iso-3-tujanol	1139	1138	0.27	0.17	0.29	0.28	0.28	0.25	0.24
13.25	trans-pinokarweol	1144	1139	1.1	0.68	1.03	0.64	1.04	0.98	0.9
13.41	kamfora	1149	1146	16.17	20.91	20.87	21.31	15.84	18.09	18.62
14.04	zw. nieoznaczony	1167		0.47	0.95	0.83	1.15	1.1	1.04	1.04
14.15	borneol	1170	1168	10.46	13.26	11.19	10.78	11.17	13.05	11.88
14.58	terpinen-4-ol	1182	1177	1.74	0.99	1.64	1	1.09	1.33	1.49
15.05	α -terpineol	1194	1188	0.29	0.2	0.36	0.23	0.33	0.3	0.29
15.22	myrtenol	1198	1195	0.98	0.41	0.38	0.41	1.13	0.65	0.68
15.51	zw. nieoznaczony	1207	-	0.17	0.37	0.31	0.2	1.22	0.34	0.33
15.63	trans - piperytol	1212	1208	0.74	0.69	0.19	1.02	0.24	0.36	0.16
16.50	octan trans-chryzantenyli	1239	1238	1.2	1.42	0.99	1.05	0.86	1.15	1.15
18.22	octan bornyly	1289	1285	1.47	1.46	1.69	2.02	1.43	1.15	1.52
27.36	spatulenol	1583	1578	0.88	1.18	0.98	1.27	1.09	1.03	1.21
27.52	tlenek kariofilenu	1588	1583	0.6	1.1	0.8	1.08	0.94	0.85	1.04
Zawartość O. E.(%)				0,51	0,48	0,46	0,53	0,54	0,48	0,51

RI lit. - literaturowy indeks retencji (baza NIST20, NISTWebbook -

<https://webbook.nist.gov/>); RI exp. - indeks retencji wyznaczony eksperymentalnie względem *n*-alkanów; * - względem detektora MS

Otrzymany olejek eteryczny z owoców kopru włoskiego charakteryzował się podobnym profilem związków do wyników opisanych w publikacjach.^{212,213} Olejki eteryczne z owoców kopru składają się z mieszaniny frakcji monoterpenu i fenylopropanoidów, których głównymi składnikami były *trans*- anetol, estragol, fenchon i limonen (Tabela 8). Analizując wyniki otrzymanych olejków eterycznych również w tym wypadku możemy stwierdzić, że ozon nie wpływał na skład zarówno głównych składników jak i szczególnie wrażliwych na działanie ozonu nienasyconych terpenów czy terpenoidów.

Tabela 8. Profil chemiczny (%*) olejków eterycznych otrzymanych z destylacji owoców kopru (*Foeniculum vulgare*).

RT [min]	Nazwa	Ri exp	Ri lit	Kontrola	10 mg/m ³	10 mg/m ³	50 mg/m ³	50 mg/m ³	100 mg/m ³	100 mg/m ³
					30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
6.73	α -pinen	939	939	0.88	0.87	0.77	0.77	1.00	0.96	0.90
7.86	β -pinen	977	979	0.32	0.3	0.22	0.24	0.27	0.27	0.26
8.36	mircen	992	990	0.12	0.14	0.13	0.18	0.13	0.19	0.15
9.42	p-cymen	1027	1024	0.26	0.21	0.19	0.2	0.25	0.20	0.28
9.57	limonen	1032	1029	5.41	5.49	4.21	4.18	5.05	5.11	5.27
9.63	cyneol	1033	1031	0.11	0.03	0.07	0.11	0.13	0.10	0.15
9.84	β -trans-ocymen	1041	1037	0.16	0.26	0.22	0.22	0.22	0.26	0.22
11.50	fenchon	1089	1086	2.8	2.43	2.33	2.8	3.32	2.72	3.14
13.41	kamfora	1147	1046	0.12	0.1	0.12	0.11	0.16	0.13	0.16
15.45	estragol	1204	1202	88.01	89.34	90.98	90.29	88.52	89.13	88.44
16.48	octan fenchylu	1236	1232	0.19	0.18	0.04	0.11	0.15	0.07	0.15
16.81	karwon	1245	1243	0.24	0.18	0.21	0.15	0.28	0.19	0.34
18.22	anetol	1288	1288	0.43	0.46	0.52	0.64	0.52	0.66	0.55
Zawartość EO (%)				1,80	1,82	1,81	1,83	1,75	1,74	1,83

RI lit. - literaturowy indeks retencji (baza NIST20, NISTWebbook - <https://webbook.nist.gov/>); RI exp. - indeks retencji wyznaczony eksperymentalnie względem n-alkanów; * - względem detektora MS

W 1973 roku Schilcher wykazał po raz pierwszy, że skład olejków eterycznych z kwiatów rumianku może charakteryzować się zmiennym składem chemicznym.²¹⁴ Fakt ten został potwierdzony wielokrotnie w badaniach innych naukowców, w których wykazano, że olejek ten składa się głównie z utlenionych seskwiterpenów, głównie pochodnych bisabolanu.^{215,216,217} Również w przeprowadzonych analizach głównymi składnikami otrzymanego ekstraktu były tlenek bisabololu A, tlenek alfa-bisabolonu A, bisabolol B (Tabela 9). Związki te nie ulegały degradacji i ich zawartość w olejku po ozonowaniu jest porównywalna z próbka kontrolną. Oznaczenie ilościowe wykazały niewielki ubytek frakcji olejkowej. Jego najwyższy ubytek obserwowany (niemal 23%) był obserwowany dla wariantu 100 mg/m³ przy czasie 60 minut.

Tabela 9. Profil chemiczny (%*) olejków eterycznych otrzymanych z destylacji rumianku (*Matricaria chamomilla* L.)

RT [min]	Nazwa	Ri exp	Ri lit	Kontrola	10	10	50	50	100	100
					mg/m ³ 30 min	mg/m ³ 60 min	mg/m ³ 30 min	mg/m ³ 60 min	mg/m ³ 30 min	mg/m ³ 60 min
5.94	Ester etylowy kwasu 2-metylobutanowego	851	848	1.09	0.81	1.51	0.32	0.11	0.72	0.3
9.86	Ester propylowy kwasu 2- metylobutanowego	947	943	0.46	0.37	0.55	0.13	0.08	0.34	0.17
12.68	(3E)-2,5,5-trimetyl-3,6-heptadien-2-ol	998	997	0.35	0.33	0.62	0.15	0.15	0.29	0.18
13.95	o-cymen	1022	1021	0.2	0.55	0.91	0.23	0.26	0.54	0.39
16.27	3,3,6-Trimethyl-1,5-heptadien-4-one	1061	1061	1.84	1.74	2.57	0.65	0.54	1.65	0.68
17.67	3,3,6-trimethylhepta-1,5-dien-4-ol	1082	1083	0.46	0.36	0.47	0.17	0.08	0.39	0.12
18.71	linalol	1097	1096	0.21	0.21	0.34	0.1	0.06	0.19	0.08
19.59	zw. nieoznaczony	1111		0.22	0.1	0.35	0.26	0.25	0.77	0.59
21.25	2-borananon	1138	1139	0.49	0.32	0.15	0.06	0.04	0.13	0.05
22.74	izoborneol	1161	1167	0.72	0.42	0.47	0.18	0.1	0.35	0.09
23.55	terpinen-4-ol	1173	1177	0.18	0.18	0.68	0.2	0.14	0.4	0.15
25.00	estragol	1193	1192	1.24	0.67	0.21	0.08	0.06	0.18	0.05
30.73	anetol	1280	1284	0.18	0.17	0.17	0.06	0.04	0.1	0.04
33.51	ester metylowy kwasu dekanowego	1322	1323	0.64	0.39	0.94	0.35	0.31	0.67	0.33
35.37	eugenol	1352	1359	0.28	0.25	0.24	0.1	0.07	0.19	0.1
37.21	kwas dekanowy	1380	1372	9.52	4.92	0.55	0.27	0.25	0.44	0.31
39.06	(Z) kariofilen	1408	1408	0.2	0.1	0.3	0.14	0.11	0.18	0.15
41.74	E-beta farnezen	1454	1456	5.27	6.9	2.75	5.48	4.83	3.73	5.07
42.31	zw. nieoznaczony	1463		0.3	0.24	0.35	0.13	0.11	0.22	0.15
42.85	dauca-5,8-dien	1471	1472	0.26	0.02	0.23	0.13	0.08	0.16	0.1
43.14	zw. nieoznaczony	1476		0.24	0.29	9.84	8.13	4.76	10.21	4.44
43.66	germakren D	1484	1484	0.41	0.34	0.36	0.14	0.18	0.16	0.14
43.81	cadina-4,9-dien	1486	1484	0.35	0.28	0.38	0.31	0.21	0.37	0.17
44.91	germakren A	1504	1509	1.42	0.85	0.25	0.18	0.12	0.23	0.13
45.80	izoszybunon	1520	1518	0.95	0.52	0.4	0.18	0.16	0.25	0.14
48.50	spathulenol	1567	1567	5.42	3.2	0.4	0.27	0.19	0.36	0.14
50.08	zw. nieoznaczony	1593		1.92	1.04	1.09	0.62	0.49	0.85	0.56
50.80	zw. nieoznaczony	1608		0.76	1.05	0.65	0.41	0.28	0.46	0.35
51.38	epoksyd cedrenu β	1622	1622	0.68	0.5	0.5	0.8	0.57	1.09	0.64
52.12	tau-kadinol	1640	1638	2.03	1.05	0.98	3.25	2.9	3.11	3.08
52.94	tlenek bisabololu B	1660	1660	14.42	12.98	13.77	11.28	10.41	10.92	12.2
53.07	zw. nieoznaczony	1663		1.42	1.22	1.23	0.9	1	0.96	1.32
53.92	tlenek alfa.-bisabolonu A	1683	1683	9.07	11.9	13.8	9.69	11.88	11.4	10.49
53.98	zw. nieoznaczony	1685		1.07	0.8	1.57	1.06	1.3	1.02	0.77
54.05	zw. nieoznaczony	1686		1.44	1.5	1.76	0.84	0.77	0.66	0.93
55.01	chamazulen	1731	1730	2.13	1.5	0.64	1.59	1.67	1.12	1.44
55.50	tlenek bisabololu A	1744	1748	32.16	44.81	46.26	51.13	54.58	44.94	53.61
Zawartość EO (%)				0,52	0,45	0,47	0,43	0,50	0,47	0,40

RI lit. - literaturowy indeks retencji (baza NIST20, NISTWebbook -

<https://webbook.nist.gov/>); RI exp. - indeks retencji wyznaczony eksperymentalnie względem *n*-alkanów; * - względem detektora MS

Głównymi składnikami uzyskanego olejku z kłączy (*Acorus calamus*) są związki tj. akorenon, β-azaron, dehydroksyzokalamendiol, epishyobunon oraz kamfora (Tabela 10). Opublikowane wcześniej wyniki potwierdzają, że dominującymi lotnymi składnikami tego olejku są seskwiterpenowe tlenowe pochodne.^{218,219} W przeciwieństwie do pozostałych

przedstawionych wcześniej wyników, olejek eteryczny z kłączy tataraku wykazuje zmienność składu w zależności od stężenia ozonu. Pod wpływem ozonu degradacji ulegają najważniejsze składniki tj. dehydroksyzokalamendiol, akorenon oraz β -azaron,

Tabela 10. Profil chemiczny (%*) olejków eterycznych otrzymanych z destylacji (*Acorus calamus*)

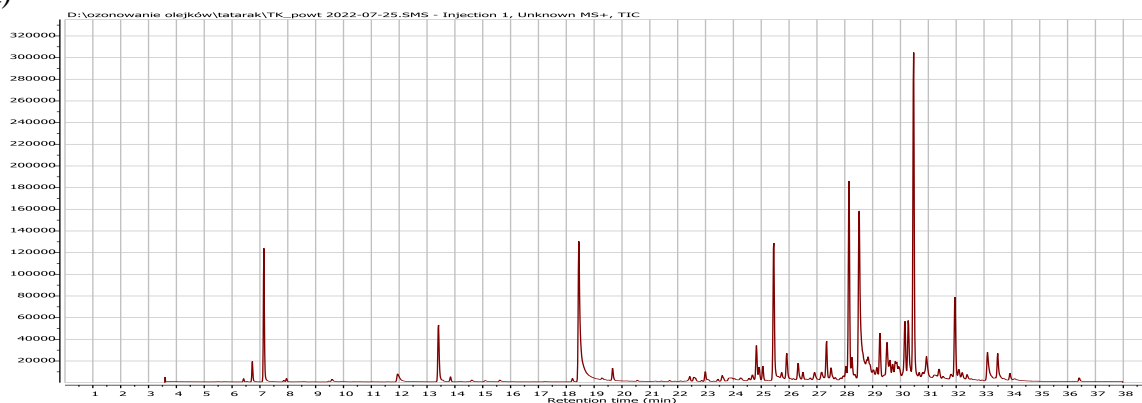
RT [min]	Nazwa	Ri exp	Ri lit	Kontrola	10	10	50	50	100	100	
					mg/m ³ 30 min	mg/m ³ 60 min	mg/m ³ 30 min	mg/m ³ 60 min	mg/m ³ 30 min	mg/m ³ 60 min	
6.73	α -pinen	940	939	1.01	0.4	0.52	0.39	0.44	0.53	1.28	
7.14	kamfen	955	955	6.72	2.82	4.09	2.81	3.42	3.84	10.29	
7.86	sabinen	979	976	0.07	0.01	0.03	0.03	0.03	0.04	0.06	
7.96	β -pinen	982	980	0.15	0.07	0.09	0.08	0.09	0.08	0.12	
9.59	limonen	1035	1029	0.18	0.1	0.14	0.11	0.14	0.14	0.16	
11.94	linalool	1102	1100	0.9	1.44	1.69	1.25	1.61	1.48	2.81	
13.41	kamfora	1149	1146	4.1	4.87	7.46	4.35	7.27	5.92	17.91	
14.61	terpinen-4-ol	1183	1177	0.15	0.25	0.36	0.23	0.32	0.29	0.37	
15.08	α -terpneol	1192	1188	0.11	0.14	0.25	0.16	0.23	0.18	0.42	
15.61	zw. nieoznaczony	1211		0.15	0.3	0.38	0.28	0.38	0.36	0.46	
18.22	octan izobornylu	1289	1285	0.21	0.2	0.34	0.24	0.4	0.23	0.68	
22.43	β -cedren	1420	1420	0.36	0.28	0.3	0.17	0.32	0.28	0.73	
22.57	arystolena	1424	1423	0.46	0.48	0.52	0.35	0.49	0.49	0.93	
22.99	β -gurjunen	1438	1435	0.51	0.48	0.61	0.45	0.57	0.51	1.67	
24.83	epishyobunon	1497	1483	1.82	2.07	2.87	2.26	2.34	2.29	2.91	
24.93	zw. nieoznaczony	1499		0.51	0.59	0.62	0.44	0.49	0.54	0.64	
25.45	shybuton	1518	1506	9.09	11.38	14.57	10.72	12.57	11.54	16.48	
25.92	α -kalakoren	1535	1532	1.78	1.4	1.85	2.63	2.39	2.48	1.91	
26.33	β -kalakoren	1549	1543	1.2	0.56	1.73	0.67	1.22	0.92	1.76	
27.35	spathulenol	1583	1578	2.33	1.71	1.96	1.64	1.88	1.54	1.51	
27.50	tlenek kariofilenu	1588	1582	0.66	0.53	1.71	0.42	1.76	0.97	1.36	
28.15	dehydroksy- izokalamendiol	1610	1593	10.9	10.96	2.09	4.81	2.14	5.18	1.45	
28.52	β -azaron	1624	1630	15.34	15.29	13.17	15.24	13.42	14.55	7.47	
29.27	zw. nieoznaczony	1756		2.11	4.11	5.68	5.01	4.64	4.82	4.14	
29.52	α -kadinol	1660	1654	1.79	1.2	2.4	2.3	1.95	1.76	1.06	
30.17	zw. nieoznaczony	1810		3.5	2.63	1.79	3.6	2.02	2.78	0.83	
30.28	zw. nieoznaczony	1817		3.16	3.59	3.41	3.42	3.21	3.61	1.79	
30.47	akorenon	1694	1686	20.89	19.65	18.54	19.67	19.13	19.12	13.44	
31.96	zw. nieoznaczony	1918		5.44	6.32	6.94	8.77	8.5	7.31	4.09	
33.13	zw. nieoznaczony	1988		2.63	3.04	1.57	3.53	2.63	2.53	0.17	
33.49	zw. nieoznaczony	2009		1.78	3.13	2.29	3.98	3.99	3.69	1.12	
Zawartość EO (%)					1,40	1,32	1,35	1,34	1,28	1,24	1,20

RI lit. - literaturowy indeks retencji (baza NIST20, NISTWebbook -

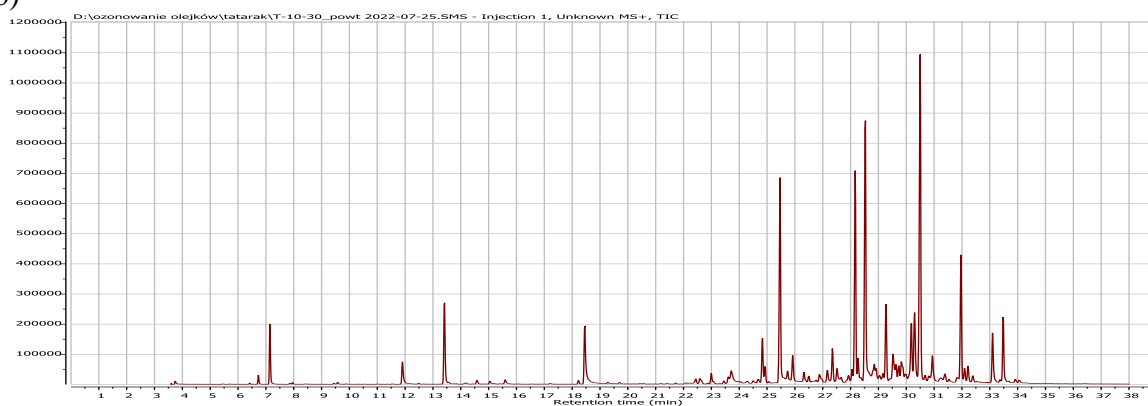
<https://webbook.nist.gov/>); RI exp. - indeks retencji wyznaczony eksperymentalnie względem *n*-alkanów; * - względem detektora MS

Zmiana profilu składników lotnych jest szczególnie dobrze zauważalna podczas porównania chromatogramów olejków eterycznych tataraku przed ozonowaniem oraz przy ekspozycji w niskim stężeniu ozonu 10mg/m^3 , jak również 100mg/m^3 , w czasie odpowiednio 30 i 60 min. (Rysunek 21). W każdym z zastosowanych wariantów ozonowania zauważono spadek ilościowy frakcji lotnych. Największe ubytki były obserwowane dla wariantu 100 mg/m^3 dla 60 minut, gdzie wartości te spadły z 1,4 do niemal 1,2 %. Najniższe ubytki zauważone były dla 10 mg/m^3 przy 60 minutach procesu. Zauważono też korelację ubytku akorenonu z dawką i czasem procesu ozonowania. Można tu stwierdzić, że wariant $100\text{ mg} / \text{m}^3$ jest najbardziej destruktywny dla związków lotnych i nie powinien być stosowany.

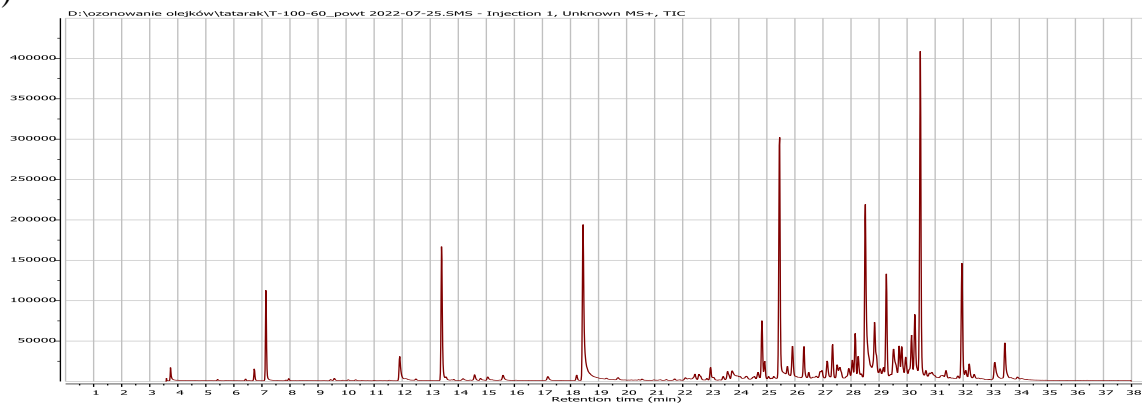
a)



b)



c)



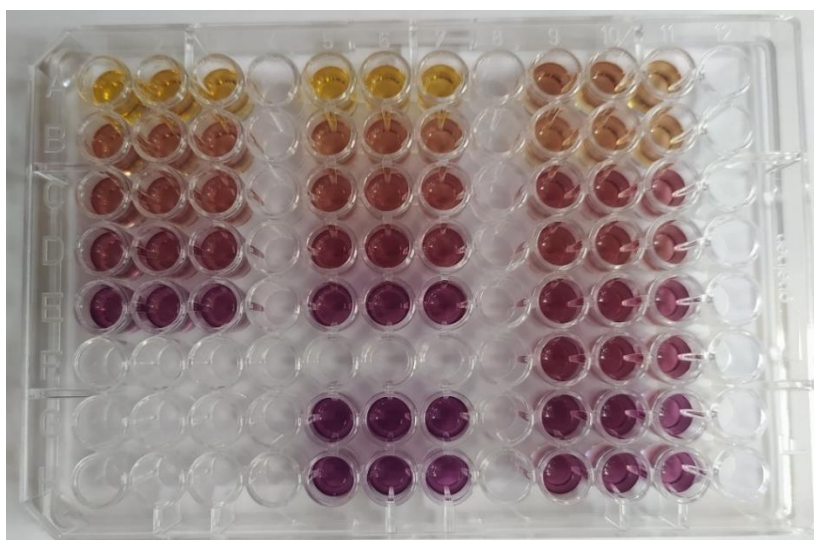
Rysunek 21. Chromatogramy ozonowania tataraku: a) Próba kontrolna, b) Próba 10/30 min. c) próba 100/60 min.

Podsumowując powyższe informacje, można wysunąć wniosek, że najbardziej wrażliwe na degradację pod wpływem ozonu są składniki olejków należące do grupy seskwiterpenów. Dlatego olejki z wrotyczu, kopru i rumianku nie różniły się znacznie składem. Z kolei olejek tatarakowy, zawierający w swoim składzie w dużo związków z tej grupy był wrażliwy na działanie ozonu.

6.3. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH

W testach *in vitro* oznaczania aktywności przeciwutleniającej wykorzystuje się zdolność antyoksydantów do usuwania wolnych rodników. Obie metody (ABTS oraz DPPH) polegają na niszczeniu stabilnych wolnych rodników. Test DPPH daje informację o najbardziej reaktywnych składnikach, a test ABTS o składnikach o wartościach pośrednich. Oba testy są metodami uzupełniającymi się.

Metoda DPPH jest spektrofotometryczną metodą oznaczania zdolności przeciwutleniającej do neutralizacji fioletowego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (2,2'-diphenylo-1-picrylhydrazyl oznaczanego jako DPPH. Rodnik DPPH umieszczony w roztworze alkoholowym przyjmuje barwę purpurową wykazującą maksimum absorbancji przy fali o długości 515 nm. Dodanie antyoksydantów do roztworu z DPPH powoduje zmianę barwy roztworu na żółtą, co spowodowane jest reakcją polegającą na wychwycie elektronów antyoksydantów. Zmianę barwy mierzy się obiektywnie metodą spektrofotometryczną (Rysunek 22). Procedura pomiaru jest prosta i polega na przygotowaniu serii roztworów badanej substancji z alkoholowym roztworem DPPH. Tak przygotowane próbki inkubuje się w stałej temperaturze 25°C bez dostępu światła. Po upływie wyznaczonego czasu przeprowadza się pomiary absorbancji przy długości fali 517 nm i porównuje z próbką kontrolną.



Rysunek 22. Zdjęcie przykładowej płytki oznaczenia aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH

Znaczne różnice w poziomie zmiatania wolnych rodników DPPH przez ekstrakty otrzymane z roślin uprawnych poddanych procesowi ozonowania są tematem wielu prac naukowych. Niestety tylko w kilku z nich skupiono się na zbadaniu tej aktywności w roślinach suszonych lub też przechowywanych do celów konsumpcyjnych. Wyniki przedstawione przez naukowców wskazują, że aktywność przeciwutleniająca zmienia się w zależności od sposobu ozonowania, czasu ozonowania, czasu przechowywania oraz rodzaju materiału roślinnego. Opublikowane przez nich wyniki wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych prac, które umożliwiłyby poznanie mechanizmów zachodzących w komórkach roślin podczas procesów higienizacji.

Pierwszym polarnym ekstraktem, ocenionym pod kątem aktywności przeciwutleniającej był otrzymany w procesie maceracji kwiatostanów rumianku. Porównując wyniki możemy zauważyć, że w wariacie ozonowania 10mg/m³ w czasie 60 min. oraz 50 mg/m³ przez 30 min. obserwowano nieznacznie wyższe wartości EC₅₀. Natomiast próbki poddane ozonowaniu przy wyższych stężeniach ozonu charakteryzowały się lepszą zdolnością wychwytywania wolnych rodników niż próbka kontrolna (Tabela 11).

Tabela 11. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z rumianku (*Matricaria chamomilla*) metodą DPPH

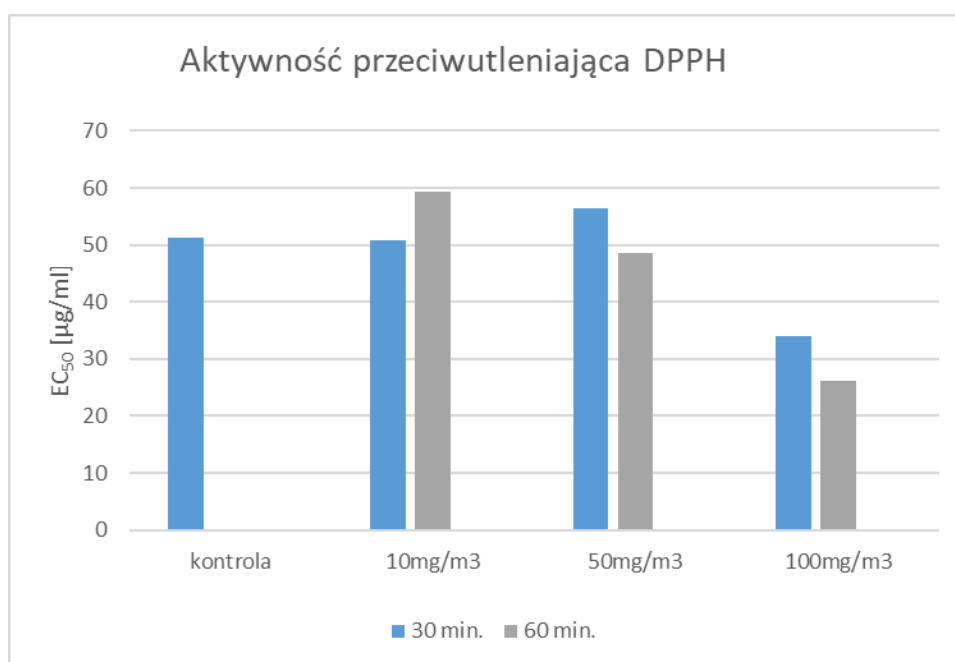
Wariant ozonowania	EC ₅₀ [μg/ml]
kontrola	51.25±8.8
10/30	50.81±2.3
10/60	59.33±4.4
50/30	56.47±2.2
50/60	48.69±4.9
100/30	33.95±2.8
100/60	26.25±3.6

Próbki ziela wrotyczu pospolitego poddane ozonowaniu charakteryzowały się podobnym profilem wartości EC₅₀ co próbki ozonowanych koszyczków rumianku. Również w tym przypadku obserwowano spadek zdolności zmiatania wolnych rodników dla wariantów 10 mg/m³ przez 60 min. oraz 50 mg/m³ przez 30 min. Jednakże próbka poddana ozonowaniu w najłagodniejszych warunkach charakteryzowała się niższą wartością EC₅₀ niż próbka kontrolna (Tabela 12).

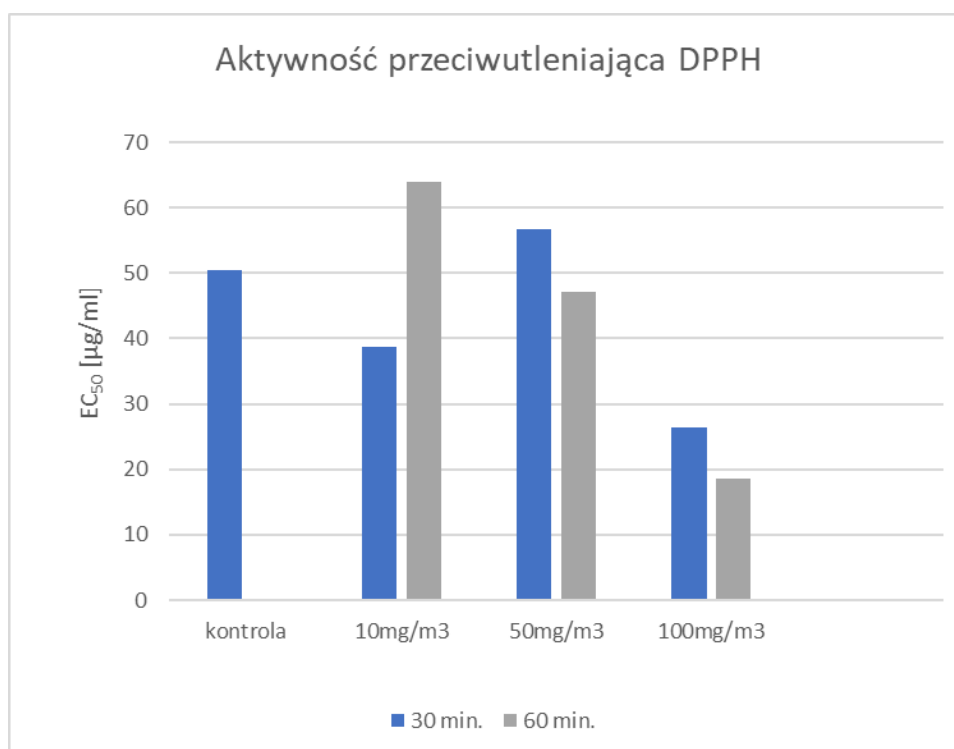
Tabela 12. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare*) metodą DPPH.

Wariant ozonowania	EC ₅₀ [μg/ml]
kontrola	50.49±6.9
10/30	38.75±2.7
10/60	63.84±4.2
50/30	56.67±7.6
50/60	47.06±2.4
100/30	26.31±1.7
100/60	18.67±2.5

Porównując wykresy aktywności przeciwutleniających metodą DPPH dla rumianku pospolitego oraz wrotyczu pospolitego zauważamy, że mają one bardzo podobne linie trendu. Przy niskich wartościach natężenia ozonu ekstrakty wykazywały niższą aktywność zmiatania wolnych rodników. Lepszą aktywność wykazywały ekstrakty przy zastosowaniu natężenia 100mg/ m³ (Rysunek 23 i 24).



Rysunek 23. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z rumianku (*Matricaria chamomilla*) metodą DPPH



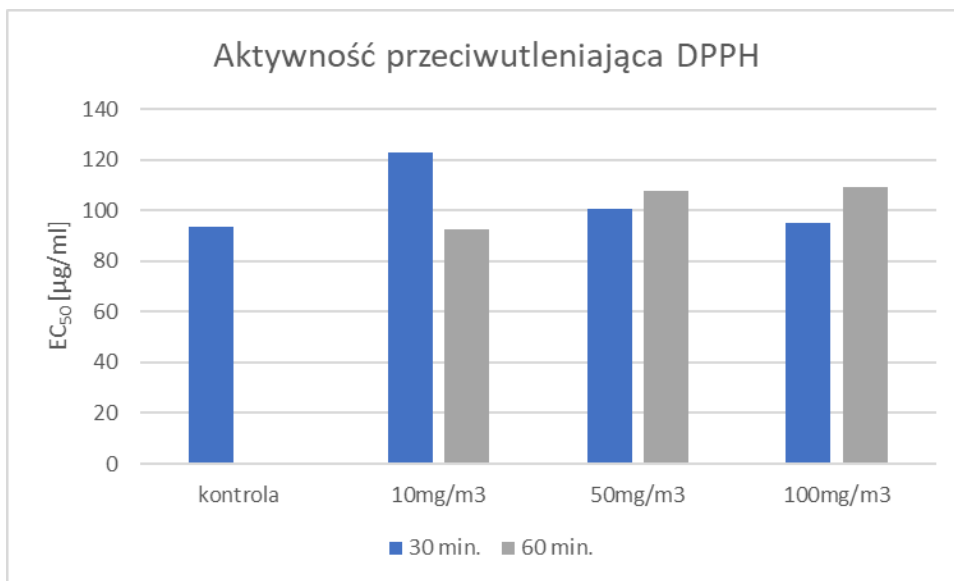
Rysunek 24. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare*) metodą DPPH

W teście aktywności przeciwutleniającej DPPH ekstraktów z kopru włoskiego zauważalne są większe różnice w zdolności zmiatania wolnych rodników. Najwyższą wartością EC₅₀ charakteryzował się wariant ozonowania 10 mg/m³ przez 30 min. (Tabela 13).

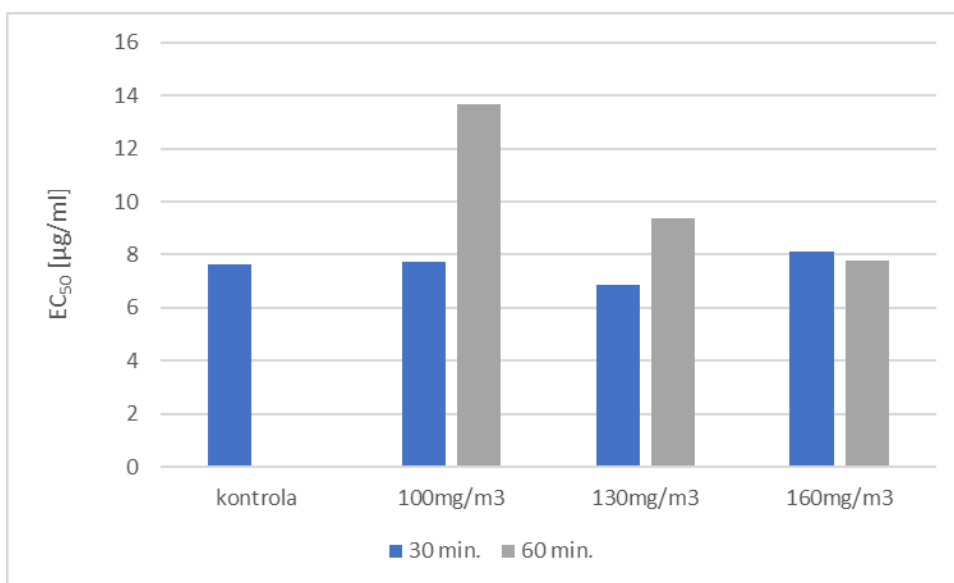
Tabela 13. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare*) metodą DPPH

Wariant ozonowania	EC ₅₀ [µg/ml]
kontrola	93.36±5.3
10/30	123.05±2.1
10/60	92.59±9.9
50/30	100.49±3.0
50/60	107.93±13.3
100/30	95.29±6.8
100/60	109.37±2.6

Owoce kopru poddane procesowi ozonowania zachowują zdolność zmiatania wolnych rodników na podobnym poziomie jak próbka kontrolna (Rysunek 25). Wyniki te są zbieżne z wynikami otrzymanymi przez Brodowską i wsp.¹⁷ gdzie ozonowaniu poddawane były owoce jałowca. Dla porównania przedstawiono wykres aktywności przeciwutleniającej na podstawie zamieszonych w publikacji danych (Rysunek 26).



Rysunek 25. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare*) metodą DPPH

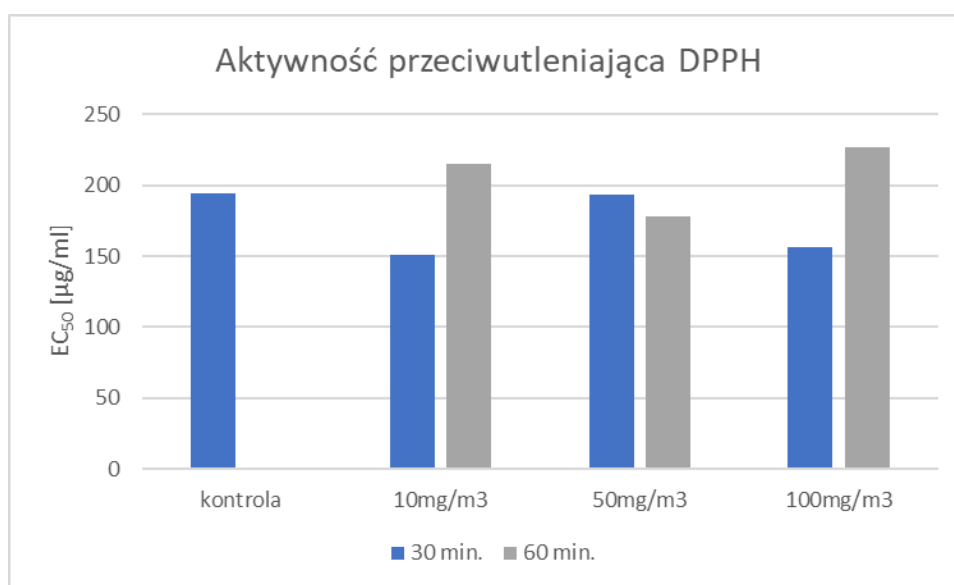


Rysunek 26. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z nasion jałowca (*Juniperus communis* L.) metodą DPPH.¹⁷

Krótkie czasy ekspozycji na ozon nie wpływały negatywnie na właściwości przeciwutleniające ekstraktów metanolowo-wodnych tataraku. Wartości EC₅₀ oscylowały w granicach od 150.89 do 193.28 µg/ml (Tabela 14, Rysunek 27).

Tabela 14. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z tataraku zwyczajnego (*Acorus calamus* L.) metodą DPPH.

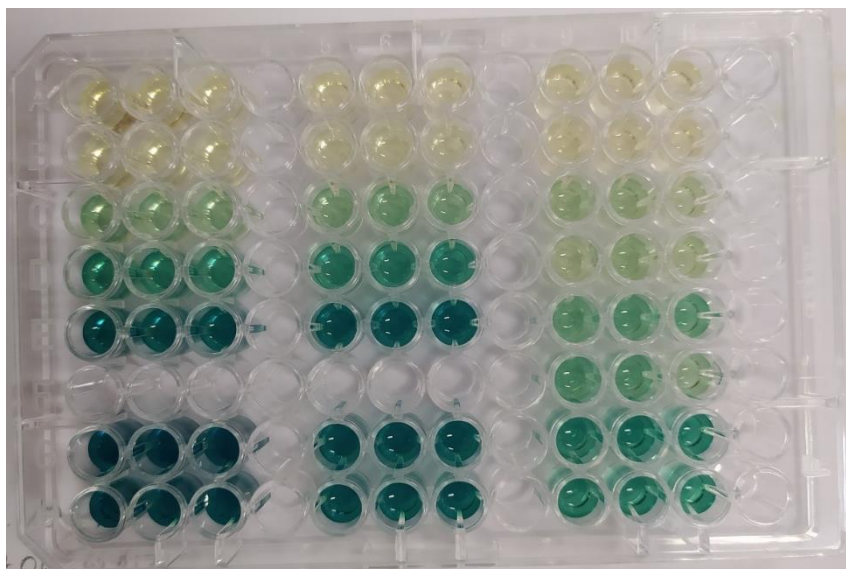
Wariant ozonowania	EC ₅₀ [µg/ml]
kontrola	194.33±13.6
10/30	150.89±13.2
10/60	215.33±20.8
50/30	193.28±21.0
50/60	177.72±17.9
100/30	156.27±9.3
100/60	226.33±10.8



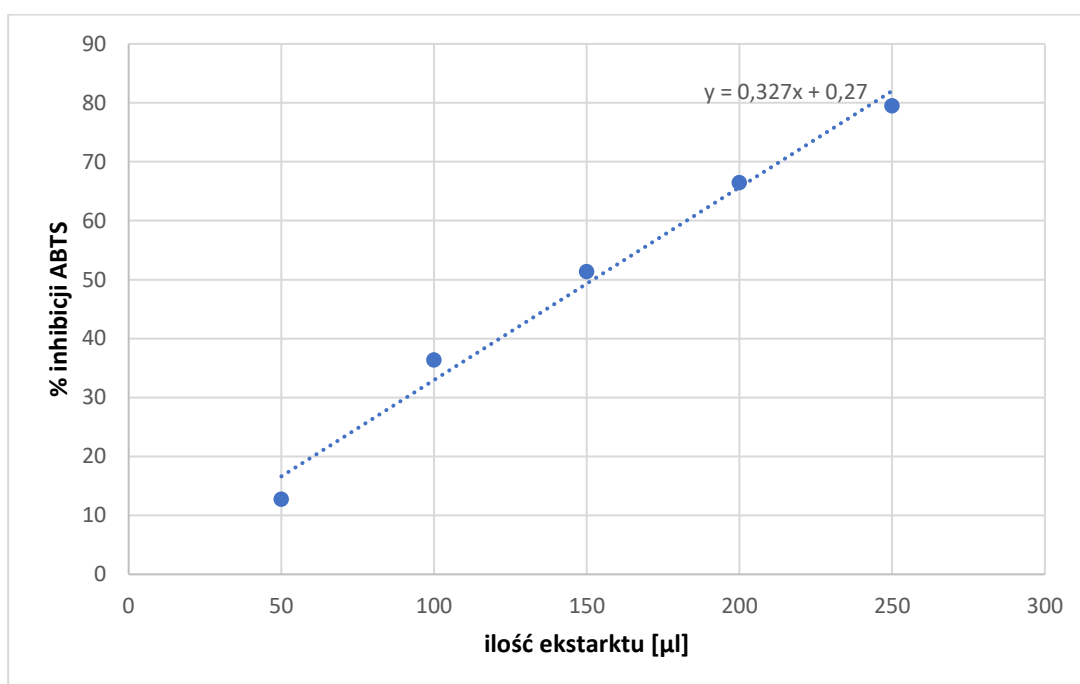
Rysunek 27. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z tataraku zwyczajnego (*Acorus calamus*) metodą DPPH.

6.4. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą ABTS

Test ABTS jest w założeniu podobny do testu DPPH, gdyż oba testy to testy oparte na mechanizmie przeniesienia pojedynczego elektronu. ABTS jest to metoda spektrofotometryczna prowadzona *in vitro* służąca do oznaczania zdolności przeciwutleniaczy do neutralizacji niebieskiego kationorodnika powstającego z soli diamonowej 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu (ABTS) pod wpływem działania nadsiarczanu sodu. Rezultatem tej reakcji jest spadek absorbancji roztworu (Rysunek 28). Pomiar spektrofotometryczny prowadzi się przy fali 734 nm o długości.



Rysunek 28. Zdjęcie przykładowej płytki oznaczenia aktywności przeciwutleniającej metodą ABTS.



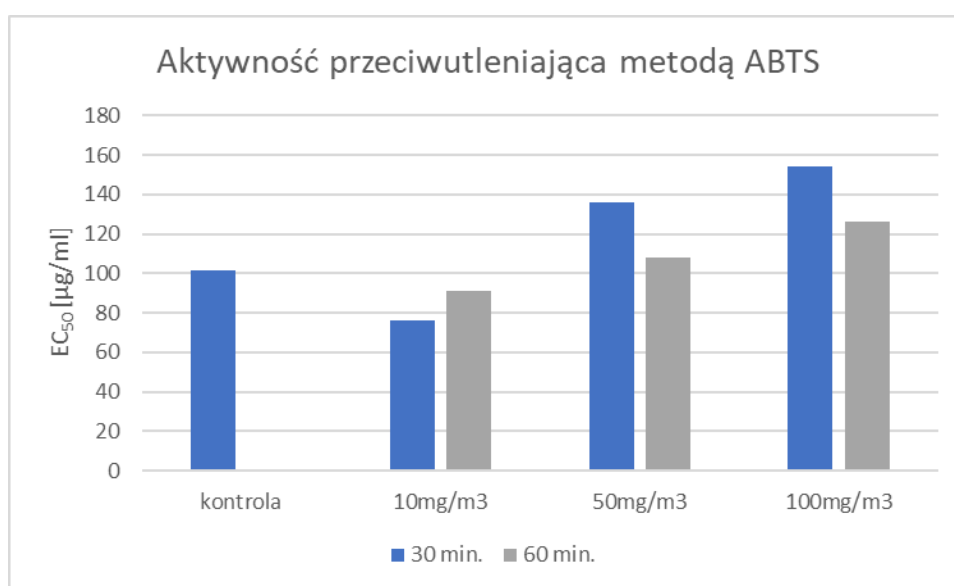
Rysunek 29. Przykładowa krzywa zależności % inhibicji ABTS od ilości ekstraktu

Aktywności przeciwutleniająca na podstawie metody ABTS ekstraktu metanolowo-wodnego rumianku pospolitego zmienia się pod wpływem ekspozycji na ozon (Tabela 15). Na zdolność do zmiatania wolnych rodników wpływa nie tylko stężenie ozonu ale również czas w jakim wykonywany był eksperyment.

Tabela 15. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z rumianku (*Matricaria chamomilla* L.) metodą ABTS.

Wariant ozonowania	EC ₅₀ [μg/ml]
kontrola	101.67±6.1
10/30	76.13±6.9
10/60	91.25±8.2
50/30	135.85±7.6
50/60	107.80±5.3
100/30	154.23±7.0
100/60	126.00±7.0

Analizując wykres przedstawiony na Rysunku 30 zauważamy, że największe zmiany obserwowane są dla próbek ozonowanych przez 30 minut zarówno dla stężenia ozonu 50 jak 100 mg/m³.

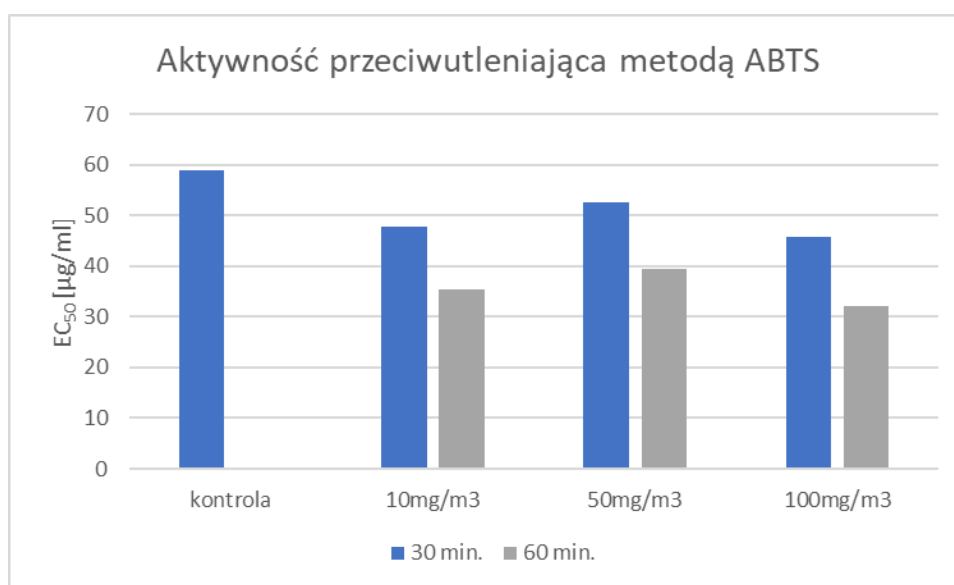


Rysunek 30. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z rumianku (*Matricaria chamomilla*) metodą ABTS

Ekstrakty otrzymane z wrotyczu pospolitego wykazują w tej metodzie zupełnie inny trend. Dla ekspozycji 60 minut wartości EC₅₀ ozonowanych ziół pozostawał na stabilnym poziomie i oscylowały w granicach 32.17 do 39.47 μg/ml dla 60 minutowej ekspozycji oraz 45.69 do 52.70 μg/ml dla 30 minutowej (Tabela 16, Rysunek 31).

Tabela 16. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare* L.) metodą ABTS

Wariant ozonowania	EC ₅₀ [μg/ml]
kontrola	59.02±4.8
10/30	47.71±0.6
10/60	35.32±3.9
50/30	52.70±6.9
50/60	39.47±4.1
100/30	45.69±1.6
100/60	32.17±0.8

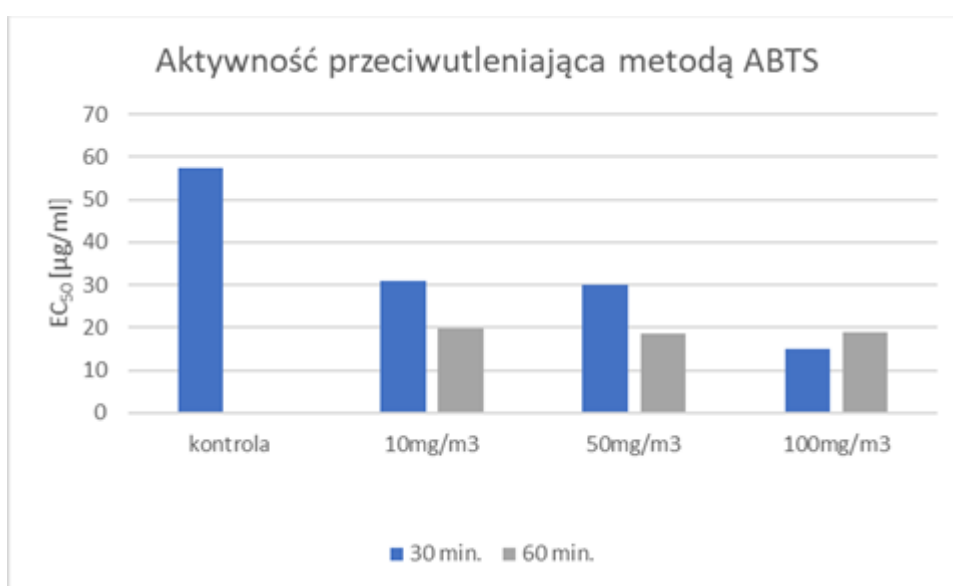


Rysunek 31. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare*) metodą ABTS.

Pomiar aktywności przeciwutleniającej metodą ABTS wykazał znaczące różnice między wartościami EC₅₀ ekstraktu kontrolnego z kopru włoskiego a ekstraktami otrzymanymi po ozonowaniu (Tabela 17, Rysunek 32). Wszystkie próbki poddane ozonowaniu charakteryzowały się lepszymi zdolnościami w zmiataniu wolnych rodników niż próbka nie poddana ozonowaniu.

Tabela 17. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z kopru włoskiego - (*Foeniculum vulgare*) metodą ABTS.

Wariant ozonowania	EC ₅₀ [μg/ml]
kontrola	57.36±5.7
10/30	30.86±2.3
10/60	19.95±3.2
50/30	29.94±3.0
50/60	18.61±1.4
100/30	14.85±0.6
100/60	18.94±1.1

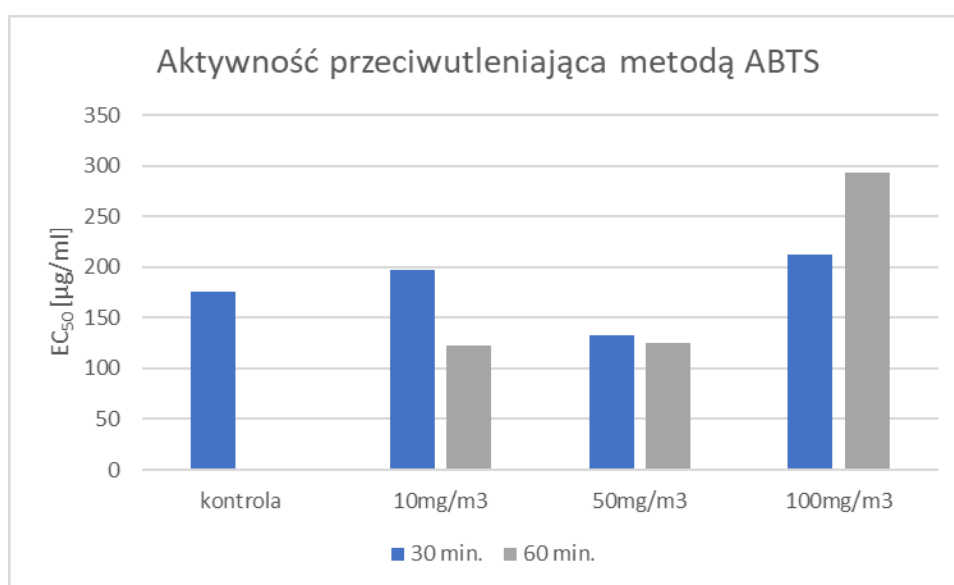


Rysunek 32. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare*) metodą ABTS

Wyniki eksperymentu wykazały negatywny wpływ dużych dawek ozonu na właściwości przeciwutleniające kłaczy tataraku. Zarówno przy ekspozycji przez 30 min. jak 60 min. wartość EC₅₀ obu ekstraktów znacząco wzrosła (Tabela 18, Rysunek 33). Prawdopodobnie związane jest to z degradacją związków a szczególnie z rozpadem wiązań podwójnych w cząsteczkach związków naturalnych. Również w metodzie z DPPH obserwowane jest w tych natężeniach ozonu, znacznie zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej.

Tabela 18. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z tataraku zwyczajnego (*Acorus calamus* L.) metodą ABTS.

Wariant ozonowania	EC ₅₀ [μg/ml]
kontrola	175.27±5.3
10/30	196.78±5.1
10/60	122.4±11.6
50/30	133.00±17.3
50/60	125.61±25.7
100/30	212.44±15.9
100/60	293.2±34.2



Rysunek 33. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z tataraku zwyczajnego (*Acorus calamus*) metodą ABTS.

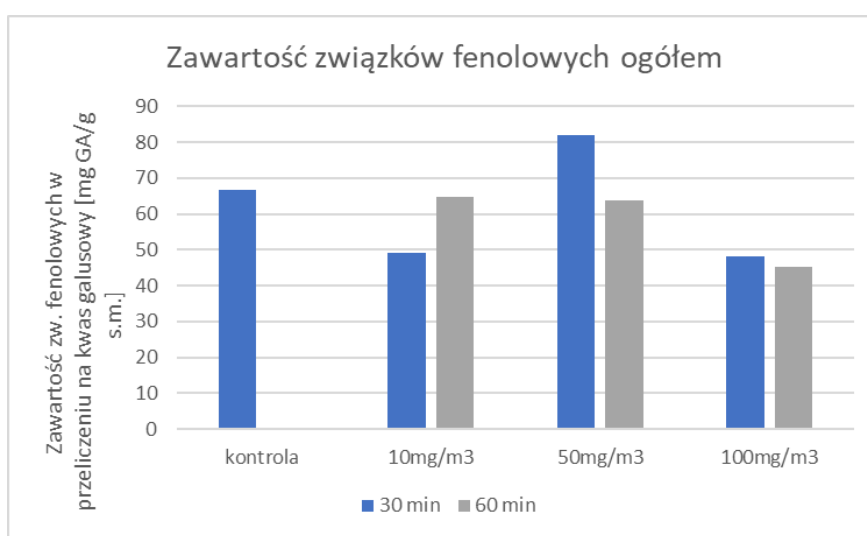
6.5. Zawartość związków fenolowych ogółem

Związki fenolowe to związki biologicznie aktywnie powszechnie występujące w roślinach. Należą do metabolitów wtórnych i są bardzo zróżnicowane pod względem budowy chemicznej, właściwości biologicznych i fizycznych. Występują we wszystkich częściach roślin zarówno tych nadziemnych jak i podziemnych. Odgrywają istotną rolę w procesach biochemicznych roślin a także kształtują cechy sensoryczne roślin uprawnych.²²⁰ Wykazują dużą aktywność przeciwutleniającą i przeciwwolnorodnikową dlatego ich ilość może być ściśle skorelowana z właściwościami przeciwutleniającymi roślin i otrzymanych z nich produktów.

Zawartość związków fenolowych ogółem w poszczególnych ekstraktach prezentują Tabele 19-22 i Rysunki 34-37.

Tabela 19. Oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem w ekstrakcie z rumianku pospolitym (*Matricaria chamomilla*).

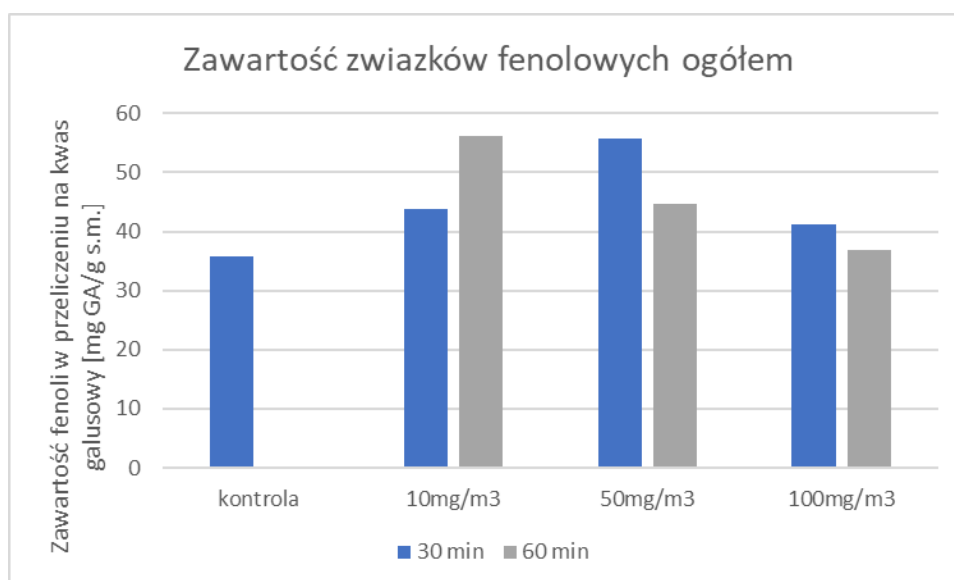
Wariant ozonowania	Zawartość fenoli w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GA/g s.m.]
kontrola	66.7±2.1
10/30	81.8 ±4.5
10/60	64.8 ±1.6
50/30	49.2±3.8
50/60	63.9±5.7
100/30	48.1±2.3
100/60	45.1±3.7



Rysunek 34. Oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem w ekstrakcie z rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* L.).

Tabela 20. Oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem w ekstrakcie z wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare*).

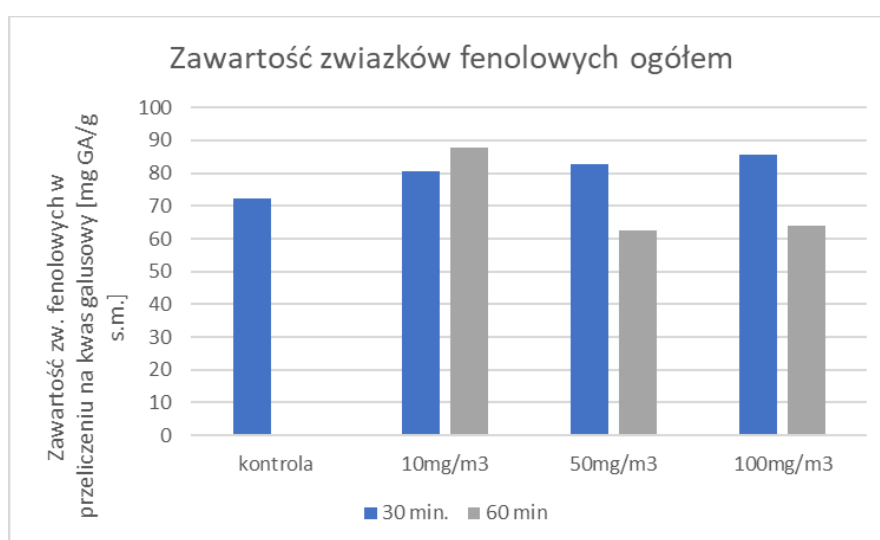
Wariant ozonowania	Zawartość polifenoli w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GA/g s.m.]
kontrola	35.8±1.97
10/30	56.13±2.31
10/60	43.7±4.29
50/30	44.65±4.30
50/60	36.8±3.52
100/30	41.2±1.98
100/60	55.7±3.84



Rysunek 35. Oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem w ekstrakcie z wrotyczu pospolitym (*Tanacetum vulgare L.*).

Tabela 21. Oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem w ekstrakcie z kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare*).

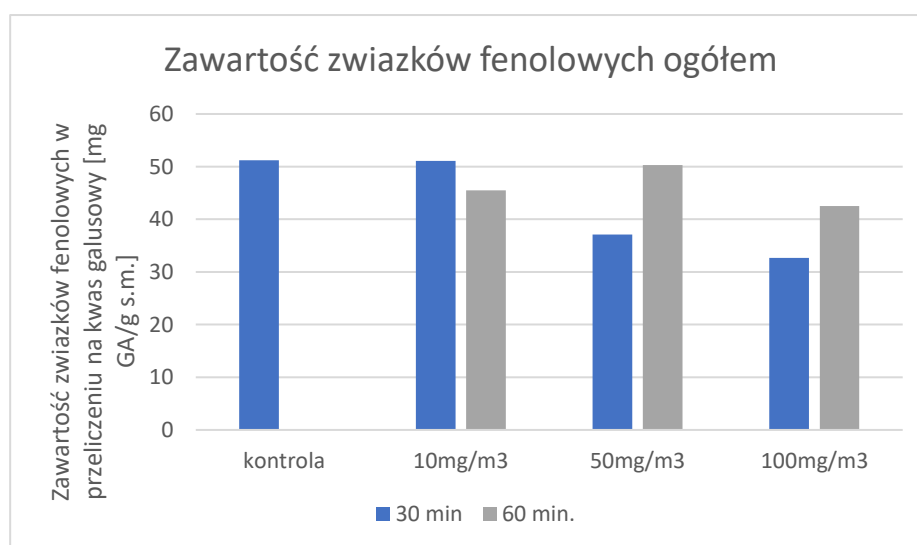
Wariant ozonowania	Zawartość fenoli w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GA/g s.m.]
kontrola	72.3±1.41
10/30	80.6±3.03
10/60	87.7±3.28
50/30	82.8±0.60
50/60	62.6±1.58
100/30	85.7±4.10
100/60	64.0±1.71



Rysunek 36. Oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem w ekstrakcie z kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare*).

Tabela 22. Oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem w ekstrakcie z tataraku zwyczajnego (*Acorus calamus*).

Wariant ozonowania	Zawartość fenoli w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GA/g s.m.]
kontrola	51.2±0.65
10/30	51.1±0.92
10/60	45.5±1.69
50/30	37.14±0.86
50/60	50.3±1.07
100/30	32.7±1.71
100/60	42.54±1.5



Rysunek 37. Oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem w ekstrakcie z tataraku zwyczajnego (*Acorus calamus*)

Podsumowując możemy stwierdzić, że zastosowanie dużych stężeń ozonu na badane zioła umiarkowanie wpłynęła na możliwą degradację związków fenolowych. Przy niższych stężeniach ozonu obserwowano w ekstraktach z rumianku pospolitego, wrotyczu pospolitego i kopru włoskiego większą zawartość oznaczanych fenoli. Podobne wyniki obserwowali również inni badacze. W badaniach przeprowadzonych przez Brodowska i wsp.¹⁷ obserwowano wzrost zawartości związków fenolowych w próbkach poddanych ozonowaniu w porównaniu do próbki kontrolnej. Całkowita zawartość fenoli była około 2-krotnie wyższa w próbce 100/30 (15,47 mg CE/g ekstraktu) niż w próbce kontrolnej (9,81 mg CE/g ekstraktu). Natomiast dla próbki 130/30 wartość ta wynosiła 12,91 mg CE/g ekstraktu.

6.6. Oznaczenie związków fenolowych za pomocą LC MS

Wykonano dodatkowo profilowanie celowane wybranych związków techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Z dostępnego pakietu wzorców wyizolowano cząsteczki o budowie kwasów fenolowych i ich pochodnych jak również flawonoidów. Ze względu na brak dostępnych wzorców znakowanych izotopowo, zdecydowano się na wykonanie względnych, do prób nieozonowanych, analiz porównawczych. Jako wartość referencyjną przyjęto pole powierzchni sygnałów pochodzących z ekstraktów ziół, niepoddanych ozonowaniu. Dla wrotyczu, zidentyfikowano kwas chlorogenowy, kwercetynę kemferol oraz fisetynę. Zaobserwowano zmiany względnych zawartości w obrębie zastosowanych wariantów. Otrzymane wyniki wskazują nieznaczny spadek poziomu kemferolu w wariancie 60 minut procesu ozonowania (Tabela 23).

Tabela 23. Zmiany zawartości wybranych związków fenolowych w wrotyczu pospolitym. Za 100 % przyjęto zawartość w próbkach „Kontrola”

Związek	Wariant ozonowania					
	10/30	50/30	100/30	10/60	50/60	100/60
Kwas chlorogenowy	108,2	94,3	115,9	102,9	112,6	118,6
Kwercetyna	127,3	111,2	90,8	112,6	104,6	106,7
Kemferol	103,2	112,8	103,2	90,6	88,3	88,9
Fisetyna	97,5	101,0	102,4	83,5	87,6	106,1

W próbkach kopru włoskiego zidentyfikowano jedynie kwas chlorogenowy. Ozonowanie przy najwyższym stężeniu, 100 mg/m³ powodowało niemal 20% degradację cząsteczek kwasu (Tabela 24).

Tabela 24. Zmiany zawartości wybranych związków fenolowych w koprze włoskim. Za 100 % przyjęto zawartość w próbkach „Kontrola”

Związek	Wariant ozonowania					
	10/30	50/30	100/30	10/60	50/60	100/60
Kw. chlorogenowy	105,3	105,6	83,5	102,1	105	82,4

Dla próbek rumianku zidentyfikowano siedem związków o charakterze fenolowym. Największe spadki zaobserwowano dla kw. 3-metoksyhydrocynamonowego i chlorogenowego, przy najdłuższych ekspozycjach (Tabela 25).

Tabela 25. Zmiany zawartości wybranych związków fenolowych w rumianku pospolitym. Za 100 % przyjęto zawartość w próbkach „Kontrola”

Związek	Wariant ozonowania					
	10/30	50/30	100/30	10/60	50/60	100/60
Kw. ferulowy	106,06	107,75	116,16	102,03	115,13	114,95
Kw. kofeinowy	92,60	92,38	115,04	82,14	96,98	103,40
Kw. chlorogenowy	97,77	89,92	80,37	94,74	91,96	84,84
Kw. 3- metoksyhydrocynamonowy	110,16	97,15	99,18	91,29	84,07	85,43
Kw. dihydrokawowy	99,34	96,23	107,96	95,20	93,78	105,2
Al. konoferylowy	108,90	105,96	118,55	109,38	107,83	92,41
Kw. α -metylocynamonowy	86,57	80,54	105,56	105,30	113,00	91,62

Dla kłączy tataraku oznaczono trzy związki z grupy związków fenolowych. Ozonowanie spowodowało niewielką degradację kwasu chlorogenowego przy najdłuższym czasie ekspozycji. Niewielkie wahania zawartości alkoholu koniferylowego mogą wynikać z przemian chemicznych potencjalnych prekursorów (Tabela 26).

Tabela 26. Zmiany zawartości wybranych związków fenolowych w tataraku. Za 100 % przyjęto zawartość w próbkach „Kontrola”

Związek	Wariant ozonowania					
	10/30	50/30	100/30	10/60	50/60	100/60
Kw. chlorogenowy	94,3	103	94,5	98,6	92,9	89,6
Ester dimetylowy kwasu kawowego	89,6	84,3	106,8	93,6	83,6	97,3
Al. koniferylowy	96,3	113,6	112,1	110,2	106,3	105,3

6.7. Ozonowanie próbek przemysłowych

Ostatnim etapem pracy doktorskiej było poddanie procesowi ozonowania gotowych mieszanek ziołowo – witaminowych, wprowadzonych na rynek konsumencki w roku 2017. Mieszanki te produkowane i dystrybuowane są przez firmę Wedes Concept Piotr Rejda. Obecnie dostępnych jest 13 receptur, w niniejszej pracy prezentowane są wyniki z badań mikrobiologicznych dla trzech mieszanek.

Proces pracy nad gotowym proszkiem stanowiącym zawartość żelatynowej kapsułki firmy Wedes Concept Piotr Rejda obejmował cykl ozonowania według schematu zastosowanego dla pojedynczych surowców, jednak po przeanalizowaniu wyników badań dla pierwotnie badanych surowców uznano, że zastosowanie dawki 10mg/m³ nie przynosi oczekiwanych rezultatów

dekontaminacyjnych więc ją pominięto. Nowy schemat także zakładał trzy powtórzenia, jednak tylko dla stężenia ozonu $50\text{mg}/\text{m}^3$ i $100\text{mg}/\text{m}^3$ oraz dwóch przedziałach czasowych 30 oraz 60 minut. Następnie przeprowadzono badanie mikrobiologiczne dla wszystkich próbek poddanych ozonowaniu, z uwzględnieniem próby kontrolnej (mieszanka ziołowo-witaminowa nie ozonowana).

Mikrobiologiczna jakość suplementów diety była oceniana na podstawie wyników przeprowadzanych badań czystości drobnoustrojowej. Badania przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Farmakopei. Kryteria akceptacji zostały oparte na ogólnej liczbie drobnoustrojów tlenowych (TAMC), ogólnej liczbie grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych (TYMC) oraz ogólnej liczbie bakterii Gram-ujemnych należących do rzędu Enterobacterales (E). Najbardziej skontaminowana wyjściowo okazała się mieszanka ziołowo-witaminowa ze wskazaniem do stosowania wspomagająco pracę wątroby i układu trawiennego. Dla tego preparatu najlepszym okazał się czas ozonowania 60 min przy stężeniu $\text{O}_3 = 50 \text{ mg}/\text{m}^3$, biorąc pod uwagę całkowitą ilość drobnoustrojów. Zaobserwowano reedukację drobnoustrojów z $2,35 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{g}$ do $3,33 \times 10^2 - 7 \times 10^3 \text{ CFU}/\text{g}$. Zmniejszenie ilości drobnoustrojów o 2-3 rzędy jest wynikiem zadowalającym, gwarantującym jakość i skuteczność działania preparatu.

Z kolei dla mieszanki ziołowo-witaminowej stosowanej w schorzeniach związanych z układem krwionośnym najlepsze efekty uzyskano dla czasu 30 min i O_3 wynoszącym $100 \text{ mg}/\text{m}^3$. W warunkach tych poziom wszystkich drobnoustrojów z ilości $5,5 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{g}$ został zredukowany do ilości $5 \times 10^3 - 3,3 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{g}$. W tym przypadku zaobserwowano już mniejsze działanie ozonu, niż w przypadku 1 mieszaniny, jednak reedukacja drobnoustrojów o 1 rząd jest wynikiem równie zadowalającym.

Natomiast dla mieszanki ziołowo-witaminowej wspomagającej układ odpornościowy ozonowanie nie było konieczne, gdyż preparat wyjściowo nie był skontaminowany drobnoustrojami. Wyniki badań przedstawiają Tabele 27, 28, 29.

Tabela 27. Zestawienie wyników z oznaczenia czystości mikrobiologicznej próbki pochodzącej z gotowej mieszanki ziołowo – witaminowej ze wskazaniem do stosowania w problemach z wątrobą i układem trawiennym.

TAMC	K [CFU/]	Stężenie O ₃ [mg/m ³]	Ilość po 30 min [CFU/ml]			Ilość po 60 min [CFU/ml]		
			I	II	III	I	II	III
	2,35E+05		NB	NB	NB	0,00E+00	7,00E+03	3,33E+02
		50	NB	NB	NB	0,00E+00	7,00E+03	3,33E+02
		100	3,40E+04	6,70E+04	1,30E+05	NB	NB	NB
TYMC	K [CFU/ml]	Stężenie O ₃ [mg/m ³]	Ilość po 30 min [CFU/ml]			Ilość po 60 min [CFU/ml]		
			I	II	III	I	II	III
	9,00E+03		NB	NB	NB	1,07E+04	5,00E+02	1,00E+03
		50	NB	NB	NB	1,07E+04	5,00E+02	1,00E+03
		100	6,67E+02	5,00E+02	5,00E+02	NB	NB	NB
E	K [CFU/ml]	Stężenie O ₃ [mg/m ³]	Ilość po 30 min [CFU/ml]			Ilość po 60 min [CFU/ml]		
			I	II	III	I	II	III
	0,00E+00		NB	NB	NB	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
		50	NB	NB	NB	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
		100	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	NB	NB	NB

Legenda: K – kontrola przed ozonowaniem; NB – nie badano; TAMC – TYMC - ; E – bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*; I,II,III – ilość cykli ozonowania.

Tabela 28. Zestawienie wyników z oznaczenia czystości mikrobiologicznej próbki pochodzącej z gotowej mieszanki ziołowo – witaminowej ze wskazaniem do stosowania w problemach z układem naczyń krwionośnym.

TAMC	K [CFU/ml]	Stężenie O ₃ [mg/m ³]	Ilość po 30 min [CFU/ml]			Ilość po 60 min [CFU/ml]			
			I	II	III	I	II	III	
5,50E+04		50	NB	NB	NB	6,22E+04	2,50E+02	7,50E+04	
			100	0,00E+00	3,33E+04	5,00E+03	NB	NB	NB
TYMC	K [CFU/ml]	Stężenie O ₃ [mg/m ³]	Ilość po 30 min [CFU/ml]			Ilość po 60 min [CFU/ml]			
			I	II	III	I	II	III	
0,00E+00		50	NB	NB	NB	0,00E+00	5,00E+02	5,00E+02	
			100	6,67E+02	0,00E+00	0,00E+00	NB	NB	NB
E	K [CFU/ml]	Stężenie O ₃ [mg/m ³]	Ilość po 30 min [CFU/ml]			Ilość po 60 min [CFU/ml]			
			I	II	III	I	II	III	
0,00E+00		50	NB	NB	NB	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
			100	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	NB	NB	NB

Legenda: K – kontrola przed ozonowaniem; NB – nie badano; TAMC – TYMC - ; E – bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*; I,II,III – ilość cykli ozonowania.

Tabela 29. Zestawienie wyników z oznaczenia czystości mikrobiologicznej próbki pochodzącej z gotowej mieszanki ziołowo – witaminowej ze wskazaniem do stosowania jako środek wspomagający układ odpornościowy, szczególnie polecany dla osób o zwiększonej aktywności fizycznej.

TAMC	K [CFU/ml]	Stężenie O ₃ [mg/m ³]	Ilość po 30 min [CFU/ml]			Ilość po 60 min [CFU/ml]			
			I	II	III	I	II	III	
0,00E+00			NB	NB	NB	5,00E+03	1,00E+04	1,90E+04	
			50	NB	NB	NB	NB	NB	NB
			100	0,00E+00	2,50E+02	0,00E+00	NB	NB	NB
TYMC	K [CFU/ml]	Stężenie O ₃ [mg/m ³]	Ilość po 30 min [CFU/ml]			Ilość po 60 min [CFU/ml]			
			I	II	III	I	II	III	
0,00E+00			NB	NB	NB	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
			50	NB	NB	NB	NB	NB	NB
			100	0,00E+00	1,00E+03	0,00E+00	NB	NB	NB
E	K [CFU/ml]	Stężenie O ₃ [mg/m ³]	Ilość po 30 min [CFU/ml]			Ilość po 60 min [CFU/ml]			
			I	II	III	I	II	III	
0,00E+00			NB	NB	NB	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
			50	NB	NB	NB	NB	NB	NB
			100	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	NB	NB	NB

Legenda: K – kontrola przed ozonowaniem; NB – nie badano; TAMC – TYMC - ; E – bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*; I,II,III – ilość cykli ozonowania

7. Podsumowanie i wnioski

Powrót do natury to coraz szerzej rozwijający się trend współczesnego świata. Pomimo zaawansowanych osiągnięć nauki, także dotyczących tworzenia nowych, coraz skuteczniej działających leków wiele osób zauważa, że rozwiązanie większości problemów zdrowotnych daje nam sama przyroda. Ten nowy – stary kierunek szukania w naturze remedium na wszelkie choroby już od jakiegoś czasu przeżywa swój renesans. Jest on coraz szerzej przyjmującym się sposobem radzenia sobie z wieloma dolegliwościami. Wszelka farmakologia stosowana w każdym zakątku świata swoje podwaliny utworzyła przecież na tym, co oferowała przyroda. Dziś na nowo zaczynamy doceniać siłę natury i w niej szukać sposobu na zdrowie, młodość i długowieczność.

Prezentowana praca to wynik realnego zapotrzebowania na znalezienie nowych, bardziej skutecznych metod oczyszczania surowców roślinnych niezbędnych w komponowaniu receptur suplementów diety czy leków na bazie ziół. Zapotrzebowanie firmy na opracowanie metody skutecznego higienizowania ziół w kierunku otrzymania czystości wymaganej dla leków skłoniło do wyłonienia skutecznej procedury wykorzystania ozonu do tego celu. Wykorzystane do tego celu półprodukty roślinne charakteryzowały się inną strukturą i właściwościami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi. Na podstawie przeprowadzonych badań opracowano i wdrożono metodę ozonowania mieszanek witaminowo-ziolowych produkowanych w firmie Wedes Concept Piotr Rejda.

Wnioski:

Najistotniejszą częścią metody było opracowanie sposobu i miejsca podawania ozonu na materiał roślinny, który powinien znajdować się w perforowanym naczyniu umożliwiającym swobodny przepływ gazu. Natomiast wylot dyszy powinien znajdować się bezpośrednio nad warstwą materiału roślinnego.

Aby otrzymać wymagana czystość mikrobiologiczną materiału roślinnego niezbędne jest przeprowadzenie procesu ozonowania trzykrotnie w odstępach 24 h.

Najbardziej skuteczną dawką ozonowania pod względem czystości mikrobiologicznej okazały się być warianty ozonowania: 50 mg/m³ przez 60 minut, 100 mg/m³ przez 30 minut oraz 100 mg/m³ przez 60 minut. Stabilność składu chemicznego ziół poddanych ozonowaniu uzyskano w niższych dawkach i wartościach czasów ekspozycji. Ozonowanie kłączy tataraku przy każdej dawce ozonu i czasie ekspozycji powoduje znaczną zmianę w składzie frakcji lotnej, w związku z tym nie jest to dobra metoda higienizacji kłączy tej rośliny. Dla pozostałych roślin, czyli koszyczków rumianku pospolitego, ziela wrotyczu oraz owoców kopru włoskiego

najskuteczniejszą metoda jest trzykrotne ozonowanie w dawce 50 mg/m³ przez 60 minut, 100 mg/m³ przez 30 minut. W tych wariantach otrzymuje się zadawalającą czystość mikrobiologiczną przy minimalnych stratach związków biologicznie aktywnych.

8. Bibliografia

1. *Europe Dietary Supplements Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2022-2027)*. <https://www.marketresearch.com/Mordor-Intelligence-LLP-v4018/Europe-Dietary-Supplements-Growth-Trends-30711950/> (2023-05-08).
2. *Suplementy diety w świetle kontroli NIK. Najwyższa Izba Kontroli*; 2017.
3. Banerjee, S. Dietary supplements market in India is rapidly growing-An Overview. *IMS Manag. J.* **2018**, *10*, 1–6.
4. *Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Dz.U. 2006 nr 171 poz. 1225. Art. 3 ust. 3. pkt. 39.*
5. *Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety. Dz. U. z 2007 r. Nr 196, poz. 1425 z późn. zm.*
6. *Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie znakowania środków spożywczych. Dz. U. z 2007 r. Nr. 137, poz. 966 z późn. zm.*
7. Csorba, L. M. Dietary Supplements consumer protection in a global market. *Econ. Altern* **2018**, *4*, 549–565.
8. Jarosz, M. *Suplementy diety a zdrowie. Porady lekarzy i dietetyków*; PZWL, 2008.
9. Bojarowicz, H.; Dźwigulska, P. Suplementy diety. Część I . Suplementy diety a leki – porównanie wymagań prawnych. *Hygeia Public Heal.* **2012**, *47*, 427–432.
10. Dillard, C. J.; Bruce German, J. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1744–1756.
11. Dickinson, A.; MacKay, D. Health Habits and Other Characteristics of Dietary Supplement Users: A Review. *Nutr. J.* **2014**, *13*, 14.
12. *Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Dz.U. 2006 nr 171 poz. 1225.*
13. Md. Faruque, A.; Syed Amir, A.; Fakhruddin, A. A.; Javed, A. A.; Md. Rizwan, A. S. Nutraceutical Market and its Regulation. *Am. J. Food Technol.* **2011**, *6*, 342–347.
14. Mendoza, I. C.; Luna, E. O.; Pozo, M. D.; Vásquez, M. V.; Montoya, D. C.; Moran, G. C.; Romero, L. G.; Yépez, X.; Salazar, R.; Romero-Peña, M.; León, J. C. Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. *LWT - Food Sci. Technol.* **2022**, *165*, 113714.
15. Becker, B.; Stoll, D.; Schulz, P.; Kulling, S.; Huch, M. Microbial Contamination of Organically and Conventionally Produced Fresh Vegetable Salads and Herbs from Retail Markets in Southwest Germany. *Foodborne Pathog. Dis.* **2018**, *16*, 269–275.
16. McKee, L. H. Microbial contamination of spices and herbs: A review. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 1–11.
17. Joanna Brodowska, A.; Śmigielski, K.; Nowak, A.; Brodowska, K.; Catthoor, R.; Czyżowska, A. The Impact of Ozone Treatment on Changes in Biologically Active Substances of Cardamom Seeds. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, C1649–C1655.
18. Kneifel, W.; Czech, E.; Kopp, B. Microbial contamination of medicinal plants - A review. *Planta Med.* **2002**, *68*, 5–15.
19. Abba, D.; Inabo, H. I.; Yakubu, S. E.; Olonitola, O. S. Contamination of herbal medicinal products marketed in Kaduna metropolis with selected pathogenic bacteria. *African J.*

Tradit. Complement. Altern. Med. **2009**, 6, 70–77.

20. Dal, D.; Ghisleni, M.; De Souza Braga, M.; Kikuchi, I. S.; Braşoveanu, M.; Nemţanu, M. R.; Dua, K.; De, T.; Pinto, J. A. The Microbial Quality Aspects and Decontamination Approaches for the Herbal Medicinal Plants and Products: An in-Depth Review The Microbial Quality Aspects and Decontamination Approaches for the Herbal Medicinal Plants and Products: An in-Depth Review. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, 22, 4264–4287.
21. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 r. ustanawiające szczegółowe zasady wdrażania rozporządzenia Rady (WE) nr 834/2007 w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych w odniesieniu do produkcji ekologicznej.
22. Zawiadomienie Komisji w sprawie wytycznych dotyczących ograniczania ryzyka mikrobiologicznego w odniesieniu do świeżych owoców i warzyw na etapie produkcji podstawowej poprzez przestrzeganie zasad higieny (2017/C 163/01). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/ALL/?uri=CELEX%3A52017XC0523%2803%29> (2023-06-03).
23. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0625> (2023-06-03).
24. Reflection paper on microbiological aspects of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products. 2014-06-04.
25. Przetaczek-Rożnowska, I.; Kuźniak, M. Źródła Zanieczyszczeń Mikrobiologicznych Ziół Leczniczych I Przypraw Oraz Metody Ich Dekontaminacji. *Postępy Fitoter.* **2016**, 17, 59–62.
26. Reflection paper on fumigants draft. 2006-10-06.
27. Lou, Y. Research on Herbal Fumigation Treatment of Psoriasis - Proceedings of the 2016 International Conference on Economics, Social Science, Arts, Education and Management Engineering; Atlantis Press, 2016; ss 78–81.
28. Fowles, J.; Mitchell, J.; McGrath, H. Assessment of cancer risk from ethylene oxide residues in spices imported into New Zealand. *Food Chem. Toxicol.* **2001**, 39, 1055–1062.
29. Liu, H.; Wang, S.-Y.; Zhu, J.-H.; Kong, M.; Zhou, S.-S.; Li, S.-L.; Zhu, H. Effects and contributory factors of sulfur-fumigation on the efficacy and safety of medicinal herbs evaluated by meta-analysis. *J. Ethnopharmacol.* **2022**, 293, 115250.
30. Jiang, X.; Huang, L. F.; Zheng, S. H.; Chen, S. L. Sulfur fumigation, a better or worse choice in preservation of Traditional Chinese Medicine? *Phytomedicine* **2013**, 20, 97–105.
31. Kan, W. L. T.; Ma, B.; Lin, G. Sulfur Fumigation Processing of Traditional Chinese Medicinal Herbs: Beneficial or Detrimental? *Front. Pharmacol.* **2011**, 2, 84.
32. Alegbeleye, O.; Daramola, O. B.; Adetunji, A. T.; Ore, O. T.; Ayantunji, Y. J.; Omole, R. K.; Ajagbe, D.; Adekoya, S. O. Efficient removal of antibiotics from water resources is a public health priority: a critical assessment of the efficacy of some remediation strategies for antibiotics in water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, 29, 56948–57020.
33. Pérez-Santonja, J. J.; Güell, J. L.; Gris, O.; Dorrego, X. M. V.; Pellicer, E.; Benítez-Delcastillo, J. M. Liposomal Ozonated Oil in Ocular Infections: A Review of Preclinical and Clinical Studies, Focusing on Its Antiseptic and Regenerative Properties. *Clin. Ophthalmol.* **2022**, 16, 1953–1962.
34. Badhe, H.; Kalaskar, R.; Balasubramanian, S.; Kamki, H.; Kalaskar, A. Antimicrobial

- Effect of Ozone Therapy in Deep Dentinal Carious Lesion: A Systematic Review. *Int. J. Clin. Pediatr. Dent.* **2022**, *15* (S2), S252–S260.
35. Oliveira Modena, D. A.; de Castro Ferreira, R.; Froes, P. M.; Rocha, K. C. Ozone Therapy for Dermatological Conditions: A Systematic Review. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2022**, *15*, 65–73.
 36. Irie, M. S.; Dietrich, L.; de Souza, G. L.; Soares, P. B. F.; Moura, C. C. G.; da Silva, G. R.; Paranhos, L. R. Ozone disinfection for viruses with applications in healthcare environments: a scoping review. *Braz. Oral Res.* **2022**, *36*, 0006.
 37. Grys, A.; Kania, M.; Baraniak, J. Chamomile – common herb plant with multiple phytochemical properties. *Postępy Fitoter.* **2014**, *15*, 90–93.
 38. Mrozek-Szetela, A.; Rejda, P.; Wińska, K. A review of hygienization methods of herbal raw materials. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 8268.
 39. Hu, Y.; Wang, Y.; Wu, Z.; Lan, J.; Zhang, L.; Yang, M. Preliminary study on suitability of ozone sterilization in traditional Chinese medicine and its preparation. *Zhongguo Zhong yao za zhi (China J. Chinese Mater. Medica)* **2015**, *40*, 3137–3141.
 40. Zhao, J.; Cranston, P. M. Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *68*, 11–18.
 41. Giuliani, G.; Ricevuti, G.; Galoforo, A.; Franzini, M. Microbiological aspects of ozone: bactericidal activity and antibiotic/antimicrobial resistance in bacterial strains treated with ozone. *Ozone Ther.* **2018**, *3*, 7971.
 42. Rey, R. P.; Sellés, A. N.; Baluja, C.; Otero, M. L. Ozonation Kinetics Of Glucosamine And N-Acetyl Glucosamine In Aqueous Medium. *Ozone Sci. Eng.* **1995**, *17*, 463–467.
 43. Ishizaki, K.; Shinriki, N.; Ikehata, A.; Ueda, T. Degradation of Nucleic Acids with Ozone. I. Degradation of Nucleobases, Ribonucleosides and Ribonucleoside-5'-Monophosphates. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1981**, *29*, 868–872.
 44. Cenci, A.; Macchia, I.; La Sorsa, V.; Sbarigia, C.; Di Donna, V.; Pietraforte, D. Mechanisms of Action of Ozone Therapy in Emerging Viral Diseases: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Advantages With Reference to SARS-CoV-2. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 871645.
 45. Formaldehyde, 2-Butoxyfile and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. Volume 88. W *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*; World Health Organization, 2004.
 46. Casella, M. L.; Schmidt-Lorenz, W. Disinfection with Gaseous Formaldehyde. Third Part: Bactericidal and Sporicidal Effectiveness of Gaseous Formaldehyde and Level of Residues in Dependence on Concentration, Temperature and Relative Humidity. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **1989**, *188*, 533–549.
 47. Casella, M. L.; Schmidt-Lorenz, W. Disinfection with Gaseous Formaldehyde. Second Part: Influence of Test Materials on Formaldehyde Residues and the Bactericidal and Sporicidal Effectiveness. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **1989**, *188*, 449–465.
 48. Kang, D. S.; Kim, H. S.; Jung, J. H.; Lee, C. M.; Ahn, Y. S.; Seo, Y. R. Formaldehyde exposure and leukemia risk: a comprehensive review and network-based toxicogenomic approach. *Genes Environ.* **2021**, *43*, 13.
 49. Lam, J.; Koustas, E.; Sutton, P.; Padula, A. M.; Cabana, M. D.; Vesterinen, H.; Griffiths, C.; Dickie, M.; Daniels, N.; Whitaker, E.; Woodruff, T. J. *Exposure to formaldehyde and*

- asthma outcomes: A systematic review, meta-analysis, and economic assessment*; 2021; T. 16.
50. Wilkinson, S. M.; Badulici, S.; Giménez-Arnau, A.; Dickel, H.; Gonçalo, M.; Hervella, M.; Isaksson, M.; Johansen, J. D.; Mahler, V.; Thyssen, J. P.; Uter, W. The European baseline series: Criteria for allergen inclusion with reference to formaldehyde releasers. *Contact Dermatitis* **2021**, *85*, 125–128.
 51. Bernardini, L.; Barbosa, E.; Charão, M. F.; Brucker, N. Formaldehyde toxicity reports from in vitro and in vivo studies: a review and updated data. *Drug Chem. Toxicol.* **2022**, *45*, 972–984.
 52. Krzysztofik, B.; Drózdź, T.; Wrona, P. *Metody zabezpieczania i utrwalania surowców oraz produktów żywnościowych*; Polskie Towarzystwo Inżynierii Rolniczej: Kraków, 2015.
 53. Griffiths, M. W.; Walkling-Ribeiro, M. 7 - Microbial decontamination of milk and dairy products. W *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*; Demirci, A., Ngadi, M. O. B. T.-M. D. in the F. I., Red.; Woodhead Publishing, 2012; ss 190–238.
 54. Deak, T.; Mohácsi-Farkas, C. Thermal Treatment. W *Food Safety Management. A Practical Guide for the Food Industry*; Andersen, V., Lelieveld, H., Motarjemi, Y. B. T.-F. S. M. (Second E., Red.; Academic Press: San Diego, 2023; ss 405–419.
 55. Vasilyak, L. M. Physical Methods of Disinfection (A Review). *Plasma Phys. Reports* **2021**, *47*, 318–327.
 56. Stumbo, C. R. Thermobacteriology in Food Processing. W *Food Science and Technology*; Academic Press, 2013.
 57. Keratimanoch, S.; Takahashi, K.; Kuda, T.; Okazaki, E.; Geng, J. T.; Osako, K. Effects of tyndallization temperature on the sterility and quality of kamaboko. *Food Chem.* **2022**, *366*, 130692.
 58. Mitrus, M.; Wójtowicz, A.; Mościcki, L. Modyfikacja skrobi ziemniaczanej metodą ekstruzji. *Acta Agrophysica* **2010**, *16*, 101–109.
 59. Go, E.-J.; Ryu, B.-R.; Ryu, S.-J.; Kim, H.-B.; Lee, H.-T.; Kwon, J.-W.; Baek, J.-S.; Lim, J.-D. An Enhanced Water Solubility and Stability of Anthocyanins in Mulberry Processed with Hot Melt Extrusion. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12377.
 60. Walker, P.; Kelley, T. Selected fractionated composition and microbiological analysis of institutional food waste, pre- and postextrusion. Final Report. *Illinois Counc. Food Agric. Res.* **1997**.
 61. Mostafa, M.; Lamyae, L.; Safa, M.; Ouhammou, M.; Mouhib, M.; Mirdaq, M. A. Case Study of Bacterial Decontamination of an Aromatic and Medicinal Plant: Decontamination of *Thymus Satureioides* by Gamma Radiation at Low Doses and Impact on Hygienic and Physicochemical Quality. W *Alternative Medicine*; Akram, M., Red.; IntechOpen: Rijeka, 2021; s Ch. 15.
 62. *The use of Ionising Radiation in the Manufacture of Medicinal Products*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/use-ionising-radiation-manufacture-medicinal-products_en.pdf (2023-05-07).
 63. Brasoveanu, M.; Nemtanu, M.; Minea, R.; Grecu, M. N.; Mazilu, E.; Radulescu, N. Electron beam irradiation for biological decontamination of *Spirulina platensis*. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **2005**, *240*, 87–90.

64. Van Calenberg, S.; Vanhaelewyn, G.; Van Cleemput, O.; Callens, F.; Mondelaers, W.; Huyghebaert, A. Comparison of the Effect of X-ray and Electron Beam Irradiation on Some Selected Spices. *LWT - Food Sci. Technol.* **1998**, *31*, 252–258.
65. Neetoo, H.; Nekoozadeh, S.; Jiang, Z.; Chen, H. Application of high hydrostatic pressure to decontaminate green onions from Salmonella and Escherichia coli O157:H7. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 1275–1283.
66. Salminen, A.; Kaarniranta, K.; Kauppinen, A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. *Inflamm. Res.* **2022**, *71*, 817–831.
67. Kozak-Kalita, M. J.; Sobczak, P.; Zawislak, K.; Mazur, J.; Panasiewicz, M.; Żukiewicz-Sobczak, W. A. Influence of UV-C radiation on the microbiological purity in selected species of herbs. *Heal. Probl. Civiliz.* **2018**, *12*, 285–290.
68. Dogu-Baykut, E.; Gunes, G. Ultraviolet (UV-C) radiation as a practical alternative to decontaminate thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J. Food Process. Preserv.* **2019**, *43*, e13842.
69. Ahmed Emam, O.; Ahmed Farag, S.; Haliem Aziz, N. Comparative effects of gamma and microwave irradiation on the quality of black pepper. *Z Leb. Unters Forsch* **1995**, *201*, 557–561.
70. Chua, L. Y. W.; Chua, B. L.; Figiel, A.; Chong, C. H.; Wojdyło, A.; Szumny, A.; Shean, T.; Choong, Y. Antioxidant Activity, and Volatile and Phytosterol Contents of *Strobilanthes crispus* Dehydrated Using Conventional and Vacuum Microwave Drying Methods. *Molecules* **2019**, *24*, 1397.
71. Hoffmann, C.; Berganza, C.; Zhang, J. Cold Atmospheric Plasma: Methods of production and application in dentistry and oncology. *Med. Gas Res.* **2013**, *3*, 21.
72. Rubin, M. B.; Friedrich, C. The history of ozone. The Schönbein period , 1839-1868. *Bull. Hist. Chem.* **2001**, *26*, 40–56.
73. Rubin, M. B. The history of ozone. II. 1869-1899 (1). *Bull. Hist. Chem.* **2002**, *27*, 81–106.
74. Hautefeuille, P. G.; Chappuis, J. Sur la liquéfaction de l'ozone. *J. Phys. Theor. Appl.* **1882**, *11*, 493–494.
75. Hautefeuille, P. G.; Chappuis, J. Sur la Liquéfaction de l'Ozone et sa Couleur à l'État Gazeux. *Compt. Rendus* **1880**, *91*, 522–525.
76. Hautefeuille, P. G.; Chappuis, J. Sur la Liquéfaction de l'Ozone en Présence de l'Acide Carbonique et sur sa Couleur a l'État Liquide. *Compt. Rendus* **1880**, *91*, 815–817.
77. Kenworth, C. J. *Ozone*; Florida Medical Association, 1885.
78. Stolarski, R. S. History of the Study of Atmospheric Ozone. *Ozone Sci. Eng.* **2001**, *23*, 421–428.
79. Olszewski, K. Bestimmung des Siedepunktes des Ozons und der Erstarrungstemperatur des Áthylens. *Monatsh. Chem.* **1887**, *8*, 69–72.
80. Szaflik, J. *Ozon – wróg czy przyjaciel?*. Biuletyn Informacyjny Stowarzyszenia nRetina AMD Polska. <http://idn.org.pl/psrp/ozon.html> (2023-07-07).
81. Tesla, N. *My Inventions: The Autobiography of Nikola Tesla*; Arcturus Publishing Ltd, 2019.
82. de Souza, Y. M.; Fontes, B.; Martins, J. O.; Sannomiya, P.; Brito, G. S.; Younes, R. N.; Rasslan, S. Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. *Clinics* **2010**, *65*, 195–202.

83. Rubin, M. B. The history of ozone. IV. The isolation of pure ozone and determination of its physical properties. *Bull. Hist. Chem.* **2004**, *29*, 99–106.
84. Aubourg, P. Colibacillose Aigue, colibacillose Chronique: ameliorations Kliniki par notabli un traitement d'ozonowa. *Bull. Mem. Paris* **1936**, *140*, 644–645.
85. Polydorou, O.; Pelz, K.; Hahn, P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *Eur. J. Oral Sci.* **2006**, *114*, 349–353.
86. Travagli, V.; Zanardi, I.; Valacchi, G.; Bocci, V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review. *Mediators Inflamm.* **2010**, 610418.
87. Antoszewski, Z.; Skowron, J.; Wachowski, J.; Urbańczyk, L.; Kulej, J. Krótka historia zastosowania ozonoterapii po raz pierwszy w polskiej medycynie oraz techniki stosowania ozonu u chorych oparzonych. *Med. 2000* **1992**, 23–24.
88. Antoszewski, Z.; Wieczorkiewicz, B.; Mandat, K.; Madej, P.; Gubała-Kacała, M. Podawanie mieszaniny tlenowo-ozonowej do bocznej komory mózgu w leczeniu powikłań po wszczepieniu zastawki Pudenza. W *Ozonoterapia i jej zastosowanie w medycynie*; Bielsko Biała: Alfa-Medica Press, 1997.
89. BiaŁoszewski, D.; Bocian, E.; Bukowska, B.; Czajkowska, M.; Sokół-Leszczyńska, B.; Tyski, S. Antimicrobial activity of ozonated water. *Med. Sci. Monit.* **2010**, *16*, MT71-75.
90. BiaŁoszewski, D. Zastosowanie ozonoterapii śródoperacyjnej jako profilaktyki zakażeń w chirurgii narządu ruchu ze szczególnym uwzględnieniem alloplastyk stawowych – doniesienie wstępne wstępne. *Ortop. Traumatol. Rehabil.* **2003**, *5*, 781–786.
91. Gillies, J. Z.; Gillies, C. W.; Lovas, F. J.; Matsumura, K.; Suenram, R. D.; Kraka, E.; Cremer, D. van der Waals Complexes of Chemically Reactive Gases: Ozone-Acetylene. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6408–6415.
92. Mustafa, M. G. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *9*, 245–265.
93. Mihyaoui, A. El; Esteves Da Silva, J. C. G.; Charfi, S.; Castillo, M. E. C.; Lamarti, A.; Arnao, M. B. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): A Review of Ethnomedicinal Use, Phytochemistry and Pharmacological Uses. *Life* **2022**, *12*, 479.
94. Hartmann, D. L.; Wallace, J. M.; Limpasuvan, V.; Thompson, D. W. J.; Holton, J. R. Can ozone depletion and global warming interact to produce rapid climate change? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 1412–1417.
95. Fernando, J. B. *Ozone Reaction Kinetics for Water and Wastewater Systems*; CRC Press CLL, 2004.
96. Manley, T. C.; Niegowski, S. J. Ozone. W *Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley & Sons, 1967; ss 410–432.
97. Varga, L.; Szigeti, J. Use of ozone in the dairy industry: A review. *Int. J. Dairy Technol.* **2016**, *69*, 157–168.
98. Pehkonen, A. The effect of dissolved ozone on the corrosion behaviour of some stainless steels. Praca doktorska. Helsinki University of Technology. **2001**.
99. Rice, R. G.; Bollyky, L. J.; Lacy, W. J. *Analytical aspects of ozone treatment of water and wastewater - a monograph. Final report. United States*; 1987.
100. Prabha, V.; Barma, D.; Singh, R.; Madan, A. Ozone Technology in Food Processing: A Review. *Trends Biosci.* **2015**, *6*, 4031–4047.
101. Pascual, A.; Llorca, I.; Canut, A. Use of ozone in food industries for reducing the

- environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, S29–S35.
102. Ozone. <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/22480/7/3/1> (2023-05-09).
 103. WHO. *WHO Global Air Quality Guidelines: Particulate Matter (PM_{2.5} and PM₁₀), Ozone, Nitrogen Dioxide, Sulfur Dioxide and Carbon Monoxide*; World Health Organization: Geneva PP - Geneva, 2021.
 104. Rakness, K. L. *Ozone in Drinking Water Treatment: Process Design, Operation, and Optimization*; American Water Works Association, 2005.
 105. Staehelin, J.; Hoigne, J. Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environ. Sci. Technol.* **1985**, *19*, 1206–1213.
 106. Khadre, M. A.; Yousef, A. E.; Kim, J.-G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 1242–1252.
 107. Zuma, F.; Lin, J.; Jonnalagadda, S. B. Ozone-initiated disinfection kinetics of *Escherichia coli* in water. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **2009**, *44*, 48–56.
 108. Manousaridis, G.; Nerantzaki, A.; Paleologos, E. K.; Tsiotsias, A.; Savvaidis, I. N.; Kontominas, M. G. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. *Food Microbiol.* **2005**, *22*, 1–9.
 109. Guzel-Seydim, Z. B.; Greene, A. K.; Seydim, A. C. Use of ozone in the food industry. *LWT - Food Sci. Technol.* **2004**, *37*, 453–460.
 110. Murray, R. G.; Steed, P.; Elson, H. E. The Location of the Mucoprotein in Sections of the Cell Wall of *Escherichia Coli* and Other Gram-Negative Bacteria. *Can. J. Microbiol.* **1965**, *11*, 547–560.
 111. Laing, M. The three forms of molecular oxygen. *J. Chem. Educ.* **1989**, *66*, 453.
 112. Scott, D. B.; Leshner, E. C. Effect of Ozone on Survival and Permeability of *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* **1963**, *85*, 567–576.
 113. Komanapalli, I. R.; Lau, B. H. Ozone-Induced Damage of *Escherichia Coli* K-12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *46*, 610–614.
 114. Sunnen, G. V. Ozone in Medicine: Overview and Future Directions. *J. Adv. Med.* **1988**, *1*, 159–174.
 115. Çatal, H.; İbanoğlu, Ş. Structure, Physico-chemical and Microbiological Properties of Ozone-oxidized Wheat, Corn, Potato and Rice Starches. *J. Food Sci. Eng.* **2012**, *2*, 196–205.
 116. Victorin, K. Review of the Genotoxicity of Ozone. *Mutat. Res.* **1992**, *277*, 221–238.
 117. Ishizaki, K.; Shinriki, N.; Matsuyama, H. Inactivation of *Bacillus* spores by gaseous ozone. *J. Appl. Bacteriol.* **1986**, *60*, 67–72.
 118. Restaino, L.; Frampton, E. W.; Hemphill, J. B.; Palnikar, P. Efficacy of Ozonated Water against Various Food-Related Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3471–3475.
 119. Foegeding, P. M. Ozone inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spore populations and the importance of the spore coat to resistance. *Food Microbiol.* **1985**, *2*, 123–134.
 120. Young, S. B.; Setlow, P. Mechanisms of *Bacillus Subtilis* Spore Resistance to and Killing

- by Aqueous Ozone. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 1133–1142.
121. Finch, G. R.; Smith, D. W.; Stiles, M. E. Dose—response of *Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. *Water Res.* **1988**, *22*, 1563–1570.
 122. Labatiuk, C. W.; Belosevic, M.; Finch, G. R. Inactivation of *Giardia muris* Using Ozone and Ozone-Hydrogen Peroxide. *Ozone Sci. Eng.* **1994**, *16*, 67–78.
 123. Hunt, N. K.; Mariñas, B. J. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone. *Water Res.* **1997**, *31* (6), 1355–1362.
 124. Blatchley, E. R. I.; Hunt, K. N.; Smith, J. J. E. Ozone Disinfection in Drinking Water. *World Water Congr.* **2001**, 1–5.
 125. Finch, G. R.; Yuen, W. C.; Uibel, B. J. Inactivation of *Escherichia coli* using ozone and ozone - hydrogen peroxide. *Environ. Technol.* **1992**, *13*, 571–578.
 126. Stewart, P. S.; Raquepas, J. B. Implications of reaction-diffusion theory for the disinfection of microbial biofilms by reactive antimicrobial agents. *Chem. Eng. Sci.* **1995**, *50*, 3099–3104.
 127. Tachikawa, M.; Yamanaka, K.; Nakamuro, K. Studies on the Disinfection and Removal of Biofilms by Ozone Water Using an Artificial Microbial Biofilm System. *Ozone Sci. Eng.* **2009**, *31*, 3–9.
 128. Trzaskowska, M.; Cieśllicki, B. J. Zastosowanie ozonu w produkcji bezpiecznej żywności. *Przem. Spożywczy* **2018**, *72*, 16–20.
 129. Kim, J.-G.; Yousef, A. E.; Khadre, M. A. Ozone and Its Current and Future Application in the Food Industry. *Adv. Food Nutr. Res.* **2003**, *45*, 167–218.
 130. Sharifi-Rad, M.; Nazaruk, J.; Polito, L.; Morais-Braga, M. F. B.; Rocha, J. E.; Coutinho, H. D. M.; Salehi, B.; Tabanelli, G.; Montanari, C.; Del Mar Contreras, M.; Yousaf, Z.; Setzer, W. N.; Verma, D. R.; Martorell, M.; Sureda, A.; Sharifi-Rad, J. *Matricaria* Genus as a Source of Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy and Food Applications. *Microbiol. Res.* **2018**, *215*, 76–88.
 131. McKay, D. L.; Blumberg, J. B. A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria Recutita* L.). *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 519–530.
 132. Miraj, S.; Alesaeidi, S. A Systematic Review Study of Therapeutic Effects of *Matricaria Recutita* Chamomile (Chamomile). *Electron. physician* **2016**, *8*, 3024–3031.
 133. Salamon, I.; Honcariv, R. Growing condition and breeding of chamomile regarding the essential oil qualitative-quantitative characteristics in Slovakia. *Herba Pol.* **1994**, *40* (July 1994), 68–74.
 134. Szoke, É.; Máday, E.; Marczal, G.; Lemberkovics, É. Analysis of biologically active essential oil components of chamomiles in Hungary (in vivo - In vitro). *Acta Hort.* **2004**, *597*, 275–284.
 135. Brandt, W.; Gürke, M.; Köhler, F. E.; Pabst, G.; Schellenberg, G.; Vogtherr, M. *Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, s; Fr. Eugen Köhler: Gera-Untermhaus, 1887; T. 1.*
 136. Wang, W.; Wang, Y.; Zou, J.; Jia, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Wang, C.; Sun, J.; Guo, D.; Wang, F.; Wu, Z.; Yang, M.; Wu, L.; Zhang, X.; Shi, Y. The Mechanism Action of German Chamomile (*Matricaria recutita* L.) in the Treatment of Eczema: Based on Dose–Effect Weight Coefficient Network Pharmacology. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 706836.

137. Salehi, B.; Lopez-Jornet, P.; Pons-Fuster López, E.; Calina, D.; Sharifi-Rad, M.; Ramírez-Alarcón, K.; Forman, K.; Fernández, M.; Martorell, M.; Setzer, W. N.; Martins, N.; Rodrigues, C. F.; Sharifi-Rad, J. Plant-Derived Bioactives in Oral Mucosal Lesions: A Key Emphasis to Curcumin, Lycopene, Chamomile, Aloe Vera, Green Tea and Coffee Properties. *Biomolecules* **2019**, *9*, 106.
138. de Lima Dantas, J. B.; Freire, T. F. C.; Sanches, A. C. B.; Julião, E. L. D.; Medrado, A. R. A. P.; Martins, G. B. Action of *Matricaria Recutita* (Chamomile) in the Management of Radiochemotherapy Oral Mucositis: A Systematic Review. *Phyther. Res.* **2022**, *36*, 1115–1125.
139. Garbuio, D. C.; Ribeiro, V. D. S.; Hamamura, A. C.; Faustino, A.; Freitas, L. A. P. de; Viani, G.; Carvalho, E. C. de. A Chitosan-Coated Chamomile Microparticles Formulation to Prevent Radiodermatitis in Breast: A Double-Blinded, Controlled, Randomized, Phase II Clinical Trial. *Am. J. Clin. Oncol.* **2022**, *45*, 183–189.
140. Shiravani, Z.; Poordast, T.; Alamdarloo, S. M.; Najib, F. S.; Hosseinzadeh, F.; Shahraki, H. R. Chamomile Extract versus Clotrimazole Vaginal Cream in Treatment of Vulvovaginal Candidiasis: A Randomized Double-Blind Control Trial. *J. Pharmacopuncture* **2021**, *24*, 191–195.
141. Hajizadeh-Sharafabad, F.; Varshosaz, P.; Jafari-Vayghan, H.; Alizadeh, M.; Maleki, V. Chamomile (*Matricaria Recutita* L.) and Diabetes Mellitus, Current Knowledge and the Way Forward: A Systematic Review. *Complement. Ther. Med.* **2020**, *48*, 102284.
142. Perestrelo, B. O.; Carvalho, P. M. de; Souza, D. N.; Carneiro, M. J.; Cirino, J. P. G.; Carvalho, P. O.; Sawaya, A. C. H. F.; Oyama, L. M.; Nogueira, F. N. Antioxidant Effect of Chamomile Tea on the Salivary Glands of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Braz. Oral Res.* **2022**, *36*, e034.
143. Alahmadi, A. A.; Alahmadi, B. A.; Wahman, L. F.; El-Shitany, N. A. Chamomile Flower Extract Ameliorates Biochemical and Histological Kidney Dysfunction Associated with Polycystic Ovary Syndrome. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28*, 6158–6166.
144. Najafi Mollabashi, E.; Ziaie, T.; Bostani Khalesi, Z. The Effect of *Matricaria Chamomile* on Menstrual Related Mood Disorders. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. X* **2021**, *12*, 100134.
145. Crescenzi, M. A.; D'Urso, G.; Piacente, S.; Montoro, P. UPLC-ESI-QTRAP-MS/MS Analysis to Quantify Bioactive Compounds in Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) Waste with Potential Anti-Inflammatory Activity. *Metabolites* **2022**, *12*, 701.
146. Macku, J.; Krejca, J. *Atlas roślin Lecznicych. Przetłumaczone przez Apoloniusz Rymkiewicz*; Zakład Narodowy im. Ossolińskich, 1989.
147. Das, B.; Rabalais, J.; Kozan, P.; Lu, T.; Durali, N.; Okamoto, K.; McGeough, M. D.; Lee, B. J.; Barrett, K. E.; Marchelletta, R.; Sivagnanam, M. The Effect of a Fennel Seed Extract on the STAT Signaling and Intestinal Barrier Function. *PLoS One* **2022**, *17*, e0271045.
148. Božović, M.; Garzoli, S.; Vujović, S.; Sapienza, F.; Ragno, R. *Foeniculum vulgare* Miller, a New Chemotype from Montenegro. *Plants*. **2022**, s 42.
149. Barakat, H.; Alkabeer, I. A.; Aljutaily, T.; Almutairi, M. S.; Algheshairy, R. M.; Alhomid, R. M.; Almutairi, A. S.; Mohamed, A. Phenolics and Volatile Compounds of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seeds and Their Sprouts Prevent Oxidative DNA Damage and Ameliorates CCl₄-Induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Rats. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2318.
150. *Community herbal monograph on Foeniculum vulgare Miller subsp. vulgare var. vulgare*,

fructus. https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-foeniculum-vulgare-miller-subsp-vulgare-var-vulgare-fructus_en.pdf (2023-05-04).

151. Korinek, M.; Handoussa, H.; Tsai, Y.-H.; Chen, Y.-Y.; Chen, M.-H.; Chiou, Z.-W.; Fang, Y.; Chang, F.-R.; Yen, C.-H.; Hsieh, C.-F.; Chen, B.-H.; El-Shazly, M.; Hwang, T.-L. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Volatile Oils: Fennel and Cumin Inhibit Neutrophilic Inflammation via Regulating Calcium and MAPKs. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 674095.
152. Zakernezhad, F.; Barati, M.; Sanadgol, N.; Movahhedi, M.; Majd, A.; Golab, F. The Association Between Fennel Extract, Serum Lipid Profile, and Leptin Receptor Expression. *Basic Clin. Neurosci.* **2021**, *12*, 711–720.
153. Hong, S. J.; Yoon, S.; Jo, S. M.; Jeong, H.; Youn, M. Y.; Kim, Y. J.; Kim, J. K.; Shin, E.-C. Olfactory Stimulation by Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) Essential Oil Improves Lipid Metabolism and Metabolic Disorders in High Fat-Induced Obese Rats. *Nutrients* **2022**, *14*, 741.
154. Karadağ, A. E.; Çaşkurlu, A.; Demirci, B.; Demirci, F. Binary Synergistic Combinations of Lavender and Fennel Essential Oils with Amoxicillin. *Planta Med.* **2023**, *89*, 800–807.
155. Aboelhadid, S. M.; Arafa, W. M.; Abdel-Baki, A.-A. S.; Sokmen, A.; Al-Quraishy, S.; Hassan, A. O.; Kamel, A. A. Acaricidal Activity of *Foeniculum Vulgare* against *Rhipicephalus Annulatus* Is Mainly Dependent on Its Constituent from Trans-Anethone. *PLoS One* **2021**, *16*, e0260172.
156. Mostafa, G.; Nahid, J.; Javad, S. S.; Alireza, D.; Ebrahim, S. S. Effect of *Foeniculum Vulgare* Aqueous and Alcoholic Seed Extract against Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. *Ethiop. J. Health Sci.* **2021**, *31* (file:///C:/Users/Dell/Documents/PRACA 31.12.2020/INNI/Aneta Mrožek OZON/literatura/35203880.nbib), 401–408.
157. Khan, R. U.; Fatima, A.; Naz, S.; Ragni, M.; Tarricone, S.; Tufarelli, V. Perspective, Opportunities and Challenges in Using Fennel (*Foeniculum Vulgare*) in Poultry Health and Production as an Eco-Friendly Alternative to Antibiotics: A Review. *Antibiotics* **2022**, *11*, 278.
158. *Drugs and Lactation Database (LactMed®) [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Child Health and Human Development; 2006-. Fennel.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501793/> (2023-04-03).
159. Sharifalhosseini, M.; Es-Haghi, A.; Vaezi, G.; Shajjee, H. Biosynthesis and Characterisation of Solid Lipid Nanoparticles and Investigation of Toxicity against Breast Cancer Cell Line. *IET nanobiotechnology* **2021**, *15*, 654–663.
160. Ke, W.; Wang, H.; Zhao, X.; Lu, Z. *Foeniculum Vulgare* Seed Extract Exerts Anti-Cancer Effects on Hepatocellular Carcinoma. *Food Funct.* **2021**, *12*, 1482–1497.
161. Haghghi, S. R.; Asadi, H.; Baghizadeh, A. Antiproliferative and Antibacterial Properties of ethanolic Extract and Essential Oil of *Trachyspermum ammi* and *Foeniculum vulgare* Seeds on Gastric Cancer, *Artemia salina* Larvae and Pathogenic bacteria. *Ethno Pharm. Prod. EPP* **2021**, *2*, 42–50.
162. Sharma, V.; Singh, I.; Chaudhary, P. *Acorus Calamus* (The Healing Plant): A Review on Its Medicinal Potential, Micropropagation and Conservation. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 1454–1466.
163. Rajput, S. B.; Tonge, M. B.; Karuppayil, S. M. An Overview on Traditional Uses and Pharmacological Profile of *Acorus Calamus* Linn. (Sweet Flag) and Other *Acorus* Species. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 268–276.

164. Kędzia, A.; Kędzia, A. W. Przeciwbakteryjna aktywność olejku tatarakowego (Oleum Calami) wobec bakterii beztlenowych. *Postępy Fitoter.* **2019**, *20*, 96–101.
165. Łuczaj, Ł. *Dzikie rośliny jadalne Polski*; Chemigrafia, 2004.
166. Tokarska-Guzik, B.; Dajdok, Z.; Zając, M.; Zając, A.; Urbisz, A.; Danielewicz, W.; Hołdyński, C. *Rośliny obcego pochodzenia w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem gatunków inwazyjnych - Alien plants in Poland with particular reference to invasive species*; Generalna Dyrekcja Ochrony Środowiska, 2012.
167. *Flora of North America - Acorus Linnaeus*. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=100307 (2023-02-09).
168. Kędzia, A.; Hołderna-Kędzia, E. Ocena aktywności olejku tatarakowego (Calami aetheroleum) wobec bakterii tlenowych i mikroaerofilnych. *Postępy fitoterapii* **2021**, *3*, 163–168.
169. *Sweet Flag (Calamus). Missouri Department of Conservation*. <https://mdc.mo.gov/discover-nature/field-guide/sweet-flag-calamus> (2023-02-08).
170. Andersson, S. C. Carotenoids, Tocochromanols and Chlorophylls in Sea Buckthorn Berries (*Hippophae rhamnoides*) and Rose Hips (*Rosa* sp.). Variation during Ripening, and among Cultivars/Species and Years. Praca doktorska. Swedish University of Agricultural Sciences. **2009**.
171. Simkin, A. J.; Moreau, H.; Kuntz, M.; Pagny, G.; Lin, C.; Tanksley, S.; McCarthy, J. An Investigation of Carotenoid Biosynthesis in *Coffea Canephora* and *Coffea Arabica*. *J. Plant Physiol.* **2008**, *165*, 1087–1106.
172. Parki, A.; Chaubey, P.; Prakash, O.; Kumar, R.; Pant, A. K. Seasonal Variation in Essential Oil Compositions and Antioxidant Properties of *Acorus Calamus* L. Accessions. *Med. (Basel, Switzerland)* **2017**, Nr 4, 81.
173. *Public statement on the use of herbal medicinal products containing asarone. European Medicines Agency*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/public-statement-use-herbal-medicinal-products-containing-asarone_en.pdf (2023-02-08).
174. Uebel, T.; Hermes, L.; Haupenthal, S.; Müller, L.; Esselen, M. α -Asarone, β -asarone, and γ -asarone: Current status of toxicological evaluation. *J. Appl. Toxicol.* **2021**, *41*, 1166–1179.
175. Liang, J.; Tian, Y.-X.; Yang, F.; Zhang, J.-P.; Skibsted, L. H. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chem.* **2009**, *115*, 1437–1442.
176. Chen, C.; Spriano, D.; Meier, B. Reduction of Beta-Asarone in *Acori Rhizoma* by Decoction. *Planta Med.* **2009**, *75*, 1448–1452.
177. Auditeau, E.; Chassagne, F.; Bourdy, G.; Bounlu, M.; Jost, J.; Luna, J.; Ratsimbazafy, V.; Preux, P.-M.; Boumediene, F. Herbal Medicine for Epilepsy Seizures in Asia, Africa and Latin America: A Systematic Review. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *234*, 119–153.
178. Farooqui, A. A.; Farooqui, T.; Madan, A.; Ong, J. H.-J.; Ong, W.-Y. Ayurvedic Medicine for the Treatment of Dementia: Mechanistic Aspects. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2018**, *2018*, 2481076.
179. Pushpa, V. H.; Padmaja, S. K.; Suresha, R. N.; Vaibhavi, P. S.; Kalabharathi, H. L.; Satish, A. M.; Naidu, S. Antidepressant activity of methanolic extract of *Acorus calamus* leaves in Albino mice. *Int. J. Pharm. Technol.* **2013**, *5*, 5458–5465.
180. Forouzanfar, F.; Hosseinzadeh, H. Medicinal Herbs in the Treatment of Neuropathic Pain:

A Review. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2018**, *21*, 347–358.

181. Parab, R. S.; Mengi, S. A. Hypolipidemic Activity of *Acorus Calamus* L. in Rats. *Fitoterapia* **2002**, *73*, 451–455.
182. Olas, B.; Brys, M. Is It Safe to Use *Acorus Calamus* as a Source of Promising Bioactive Compounds in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases? *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *281*, 32–36.
183. Onozato, T.; Nakamura, C. V.; Cortez, D. A. G.; Dias Filho, B. P.; Ueda-Nakamura, T. *Tanacetum Vulgare*: Antiherpes Virus Activity of Crude Extract and the Purified Compound Parthenolide. *Phyther. Res.* **2009**, *23*, 791–796.
184. Devrnja, N.; Krstić-Milošević, D.; Janošević, D.; Tešević, V.; Vinterhalter, B.; Savić, J.; Čalić, D. In Vitro Cultivation of Tansy (*Tanacetum Vulgare* L.): A Tool for the Production of Potent Pharmaceutical Agents. *Protoplasma* **2021**, *258*, 587–599.
185. Radulović, N. S.; Genčić, M. S.; Stojanović, N. M.; Randjelović, P. J.; Stojanović-Radić, Z. Z.; Stojiljković, N. I. Toxic Essential Oils. Part V: Behaviour Modulating and Toxic Properties of Thujones and Thujone-Containing Essential Oils of *Salvia officinalis* L., *Artemisia Absinthium* L., *Thuja Occidentalis* L. and *Tanacetum Vulgare* L. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *105*, 355–369.
186. Masclef, A. *Atlas des plantes de France utiles, nuisibles et ornamentales*; Paul Klincksieck, 1891.
187. Šukele, R.; Lauberte, L.; Kovalcuka, L.; Logviss, K.; Bārzdīņa, A.; Brangule, A.; Horváth, Z. M.; Bandere, D. Chemical Profiling and Antioxidant Activity of *Tanacetum Vulgare* L. Wild-Growing in Latvia. *Plants* **2023**, *12*, 1968.
188. Acimovic, M.; Puvača, N. *Tanacetum vulgare* L. -A Systematic Review. *J. Agron. Technol. Eng. Manag.* **2020**, *3*, 416–422.
189. Koprowska, K.; Czyz, M. Molekularne mechanizmy działania partenolidu - Stary lek z nową twarzą. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2010**, *64*, 100–114.
190. Ak, G.; Gevrenova, R.; Sinan, K. I.; Zengin, G.; Zheleva, D.; Mahomoodally, M. F.; Senkardes, I.; Brunetti, L.; Leone, S.; Di Simone, S. C.; Recinella, L.; Chiavaroli, A.; Menghini, L.; Orlando, G.; Ferrante, C. *Tanacetum Vulgare* L. (Tansy) as an Effective Bioresource with Promising Pharmacological Effects from Natural Arsenal. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *153*, 112268.
191. *Community herbal monograph on Tanacetum parthenium (L.) Schulz Bip., herba. European Medicines Agency.* https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-tanacetum-parthenium-l-schulz-bip-herba_en.pdf (2023-02-08).
192. Hehner, S. P.; Hofmann, T. G.; Dröge, W.; Schmitz, M. L. The Antiinflammatory Sesquiterpene Lactone Parthenolide Inhibits NF-Kappa B by Targeting the I Kappa B Kinase Complex. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 5617–5623.
193. Vilhelmova, N.; Simeonova, L.; Nikolova, N.; Pavlova, E.; Gospodinova, Z.; Antov, G.; Galabov, A.; Nikolova, I. Antiviral, Cytotoxic and Antioxidant Effects of *Tanacetum Vulgare* L. Crude Extract In Vitro. *Folia Med. (Plovdiv)*. **2020**, *62*, 172–179.
194. Chiavari-Frederico, M. O.; Barbosa, L. N.; Carvalho Dos Santos, I.; Ratti da Silva, G.; Fernandes de Castro, A.; de Campos Bortolucci, W.; Barboza, L. N.; Campos, C. F. de A. A.; Gonçalves, J. E.; Menetrier, J. V.; Jacomassi, E.; Gazim, Z. C.; Wietzikoski, S.; Dos Reis Lívero, F. A.; Wietzikoski Lovato, E. C. Antimicrobial Activity of Asteraceae Species against Bacterial Pathogens Isolated from Postmenopausal Women. *PLoS One* **2020**, *15*,

195. Kameri, A.; Koçani, F.; Hashani, Z.; Kurteshi, K.; Kamberi, B.; Kurti, A.; Haziri, A. Antifungal and Synergistic Effects of the Ethyl Acetate Extract of *Tanacetum Vulgare* (L.) Against *Candida Albicans*. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **2019**, *25*, 179–186.
196. Özbilgin, S.; Akkol, E. K.; Ergene Öz, B.; Ilhan, M.; Saltan, G.; Acikara, Ö. B.; Tekin, M.; Keleş, H.; Süntar, I. In Vivo Activity Assessment of Some *Tanacetum* Species Used as Traditional Wound Healer along with Identification of the Phytochemical Profile by a New Validated HPLC Method. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2018**, *21*, 145–152.
197. Coté, H.; Boucher, M.-A.; Pichette, A.; Legault, J. Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum Vulgare* L. Essential Oil and Its Constituents. *Medicines* **2017**, *4*, 34.
198. Daneshmand, P.; Saliminejad, K.; Dehghan Shasaltaneh, M.; Kamali, K.; Riazi, G. H.; Nazari, R.; Azimzadeh, P.; Khorram Khorshid, H. R. Neuroprotective Effects of Herbal Extract (*Rosa Canina*, *Tanacetum Vulgare* and *Urtica Dioica*) on Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **2016**, *8*, 120–125.
199. Vasileva, A.; Iliev, I.; Lozanov, V.; Dimitrova, M.; Mitev, V.; Ivanov, I. In vitro study on the antitumor activity of *Tanacetum vulgare* L. extracts. *Bulg. Chem. Commun.* **2019**, *51*, 249–255.
200. Gospodinova, Z.; Antov, G.; Angelova, S.; Krasteva, M. In vitro antitumor potential of Bulgarian *Tanacetum vulgare* L. on human breast adenocarcinoma cells. *Int. J. Pharma Sci.* **2014**, *4*, 468–472.
201. Lazarević, J.; Kostić, I.; Milanović, S.; Šešlija Jovanović, D.; Krnjajić, S.; Čalić, D.; Stanković, S.; Kostić, M. Repellent Activity of *Tanacetum Parthenium* (L.) and *Tanacetum Vulgare* (L.) Essential Oils against *Leptinotarsa Decemlineata* (Say). *Bull. Entomol. Res.* **2021**, *111*, 190–199.
202. Godinho, L. S.; Aleixo de Carvalho, L. S.; Barbosa de Castro, C. C.; Dias, M. M.; Pinto, P. de F.; Crotti, A. E. M.; Pinto, P. L. S.; de Moraes, J.; Da Silva Filho, A. A. Anthelmintic Activity of Crude Extract and Essential Oil of *Tanacetum Vulgare* (Asteraceae) against Adult Worms of *Schistosoma Mansoni*. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 460342.
203. *Farmakopea Polska XI*; Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych, 2017.
204. Mamat, W.; Tajudin, S.; Abdul Aziz, M. Y.; Othman, A.; Ali, A. Evaluation of the DPPH Radical Scavenging Activity, Total Phenolic Content and Total Flavonoid Content of Different Solvent Extracts of *Catunaregam tomentosa* (Blume ex DC) Tirveng Leaves. *J. Agrobiotechnology* **2021**, *12*, 1–7.
205. Tsivelika, N.; Irakli, M.; Mavromatis, A.; Chatzopoulou, P.; Karioti, A. Phenolic Profile by HPLC-PDA-MS of Greek Chamomile Populations and Commercial Varieties and Their Antioxidant Activity. *Foods* **2021**, *10*, 2345.
206. Broadwater, W. T.; Hoehn, R. C.; King, P. H. Sensitivity of Three Selected Bacterial Species to Ozone. *Appl. Microbiol.* **1973**, *26*, 391–393.
207. Falla, J. A.; Block, J. C. Technical Note: Influence of Exopolysaccharides on Bacterial Resistance to Ozone. *Ozone Sci. Eng.* **1987**, *9*, 259–264.
208. Mundy, B.; Kuhnel, B.; Hunter, G.; Jarnis, R.; Funk, D.; Walker, S.; Burns, N.; Drago, J.; Nezgod, W.; Huang, J.; Rakness, K.; Jasim, S.; Joost, R.; Kim, R.; Muri, J.; Nattress, J.; Oneby, M.; Sosebee, A.; Thompson, C.; Walsh, M.; Schulz, C. A Review of Ozone Systems Costs for Municipal Applications. Report by the Municipal Committee – IOA Pan

- American Group. *Ozone Sci. Eng.* **2018**, *40*, 266–274.
209. Xue, W.; Macleod, J.; Blaxland, J. The Use of Ozone Technology to Control Microorganism Growth, Enhance Food Safety and Extend Shelf Life: A Promising Food Decontamination Technology. *Foods*. 2023, s 814.
 210. Brodowska, Agnieszka J Śmigielski, K. Ozonation – an alternative decontamination method for raw plant materials. *Biotechnol. Food Sci.* **2013**, *77*, 37–43.
 211. Kazi, M.; Parlapani, F. F.; Boziaris, I. S.; Vellios, E. K.; Lykas, C. Effect of Ozone on the Microbiological Status of Five Dried Aromatic Plants. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 1369–1373.
 212. Barazani, O.; Cohen, Y.; Fait, A.; Diminshtein, S.; Dudai, N.; Ravid, U.; Putievsky, E.; Friedman, J. Chemotypic differentiation in indigenous populations of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* in Israel. *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 721–731.
 213. Miguel, M. G.; Cruz, C.; Faleiro, L.; Simões, M. T. F.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G. *Foeniculum Vulgare* Essential Oils: Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 319–328.
 214. Schilcher, H. Neuere Erkenntnisse bei der Qualitätsbeurteilung von Kamillenblüten bzw. Kamillenöl. *Planta Med.* **1973**, *23*, 132–144.
 215. Wagner, C.; Friedt, W.; Marquard, R. A.; Ordon, F. Molecular analyses on the genetic diversity and inheritance of (–)- α -bisabolol and chamazulene content in tetraploid chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rausch.). *Plant Sci.* **2005**, *169*, 917–927.
 216. Satyal, P.; Shrestha, S.; Setzer, W. N. Composition and Bioactivities of an (E)- β -Farnesene Chemotype of Chamomile (*Matricaria Chamomilla*) Essential Oil from Nepal. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*, 1453–1457.
 217. Rubiolo, P.; Belliardo, F.; Cordero, C.; Liberto, E.; Sgorbini, B.; Bicchi, C. Headspace-Solid-Phase Microextraction Fast GC in Combination with Principal Component Analysis as a Tool to Classify Different Chemotypes of Chamomile Flower-Heads (*Matricaria Recutita* L.). *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 217–225.
 218. Raal, A.; Orav, A.; Gretchushnikova, T. β -Asarone content and essential oil composition of *Acorus calamus* L. rhizomes from Estonia. *J. Essent. Oil Res.* **2016**, *28*, 299–304.
 219. Loying, R.; Gogoi, R.; Sarma, N.; Borah, A.; Munda, S.; Pandey, S. K.; Lal, M. Chemical Compositions, In-vitro Antioxidant, Anti-microbial, Anti-inflammatory and Cytotoxic Activities of Essential Oil of *Acorus calamus* L. Rhizome from North-East India. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2019**, *22*, 1299–1312.
 220. Jeszka, M.; Flaczyk, E.; Kobus-Cisowska, J.; Dziedzic, K. Związki fenolowe – charakterystyka i znaczenie w technologii żywności. *Nauk. Przyr. Technol.* **2010**, *4*, 19.
-