



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Aleksandra Gavarić, master inženjer

**Savremene metode ekstrakcije očajnice  
(*Marrubium vulgare* L.) i sušenje odabranih ekstrakata,  
hemijski sastav i biološke aktivnosti**

**-DOKTORSKA DISERTACIJA-**

Mentor: Prof. dr Senka Vidović

Novi Sad, 2020.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU****TEHNOLOŠKI FAKULTET**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	
<b>Redni broj:</b> <b>RBR</b>	
<b>Identifikacioni broj:</b> <b>IBR</b>	
<b>Tip dokumentacije:</b> <b>TD</b>	Monografska dokumentacija
<b>Tip zapisa:</b> <b>TZ</b>	Tekstualni štampani materijal
<b>Vrsta rada (dipl., mag., dokt.):</b> <b>VR</b>	Doktorska disertacija
<b>Ime i prezime autora:</b> <b>AU</b>	Aleksandra Gavarić
<b>Mentor (titula, ime, prezime, zvanje):</b> <b>MN</b>	Dr Senka Vidović, vanredni profesor
<b>Naslov rada:</b> <b>NR</b>	Savremene metode ekstrakcije očajnice ( <i>Marrubium vulgare</i> L.) i sušenje odabranih ekstrakata, hemijski sastav i biološke aktivnosti
<b>Jezik publikacije:</b> <b>JP</b>	Srpski, latinica
<b>Jezik izvoda:</b> <b>JI</b>	srp. / eng.
<b>Zemlja publikovanja:</b> <b>ZP</b>	Republika Srbija
<b>Uže geografsko područje:</b> <b>UGP</b>	AP Vojvodina
<b>Godina:</b> <b>GO</b>	2020.
<b>Izdavač:</b> <b>IZ</b>	autorski reprint
<b>Mesto i adresa:</b> <b>MA</b>	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
<b>Fizički opis rada:</b> <b>FO</b>	(7 poglavlja / 155 stranica / 35 slika / 34 tabele / 447 referenci / 18 priloga)
<b>Naučna oblast:</b> <b>NO</b>	Tehnološko inženjerstvo
<b>Naučna disciplina:</b> <b>ND</b>	Farmaceutsko inženjerstvo
<b>Predmetna odrednica, ključne reči:</b> <b>PO</b>	<i>Marrubium vulgare</i> , ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom, ekstrakcija subkritičnom vodom, mikrotalasna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija, <i>spray drying</i> tehnika sušenja, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost, antihiperглиkemijska aktivnost

<b>UDK</b>	
<b>Čuva se:</b> <b>ČU</b>	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
<b>Važna napomena:</b> <b>VN</b>	Nema
<b>Izvod:</b> <b>IZ</b>	<p>U okviru ove disertacije ispitane su mogućnosti primene savremenih metoda za dobijanje tečnih ekstrakata (ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija i ekstrakcija subkritičnom vodom) i lipofilnih ekstrakata (ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom) bogatih polifenolima iz nadzemnog dela očajnice (<i>Marrubium vulgare</i> L.). Tečni ekstrakti su optimizovani primenom eksperimentalnog dizajna i metode odzivne površine, i podvrgnuti su <i>spray drying</i> tehnici sušenja. Tečni i suvi ekstrakti su detaljno ispitani po pitanju hemijskog sastava i biološke aktivnosti, antimikrobne i <i>in vitro</i> antihiperглиkemijske aktivnosti.</p> <p>Za svaku od navedenih ekstrakcionih tehnika ispitan je uticaj glavnih parametara: ultrazvučna ekstrakcija (temperatura, vreme ekstrakcije i snaga ultrazvuka), mikrotalasna ekstrakcija (koncentracija etanola, vreme ekstrakcije i snaga mikrotalasa) i ekstrakcija subkritičnom vodom (temperatura, vreme ekstrakcije i koncentracija HCl u ekstragensu). Kod tečnih ekstrakata dobijenih ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom na optimizovanim uslovima utvrđeno je prisustvo hlorogenske kiseline i kvercetina koji nisu detektovani u maceratima. Ispitana je antimikrobna aktivnost oba ekstrakta i utvrđeno da je <i>B. cereus</i> najosetljiviji bakterijski soj, dok je u slučaju kvasaca <i>S. cerevisiae</i> posebno osetljiv na oba ekstrakta. Pored ove aktivnosti ispitana je i <i>in vitro</i> antihiperглиkemijska aktivnost oba ekstrakta prema <math>\alpha</math>-amilazi i <math>\alpha</math>-glukozidazi, pri čemu ultrazvučni ekstrakt pokazuje veću antihiperглиkemijsku aktivnost (50,63% inhibira <math>\alpha</math>-amilazu i 48,67% inhibira <math>\alpha</math>-glukozidazu) što se potencijalno može objasniti prisustvom hlorogenske kiseline (33,11 <math>\mu\text{g/mL}</math>) i kvercetina (34,88 <math>\mu\text{g/mL}</math>). U subkritičnom ekstraktu, dobijenom na optimalnim uslovima, detektovano je jedino prisustvo hidroksi metilfurfurala usled čega ovaj ekstrakt nije podvrgnut ispitivanju antimikrobne i antihiperглиkemijske aktivnosti.</p> <p>U cilju ekstrakcije lipofilnih komponenata <i>M. vulgare</i> primenjene su destilacija etarskog ulja (0,05%), <i>Soxhlet</i> ekstrakcija (3,23%) i ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom na pritiscima 100, 200 i 300 bar i temperaturama 40, 50 i 60 °C. Najdominantnija komponenta u svim dobijenim superkritičnim ekstraktima je hemotaksonomski marker marubiin koji nije identifikovan u <i>Soxhlet</i> ekstraktu.</p> <p>Tečni ekstrakti dobijeni ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom na optimizovanim uslovima i macerat su osušeni <i>spray drying</i> tehnikom (uz dodatak 10 i 50% maltodekstrina) u cilju dobijanja stabilnije forme suvog ekstrakta. Suvim ekstraktima su određene najznačajnije</p>

	fizičke osobine i hemijski sastav kao i antimikrobna i antihiperglukemijska aktivnost kako bi se procenila mogućnost njihove inkorporacije u funkcionalnu hranu, dijetetske suplemente ili u formulaciji različitih gotovih proizvoda koji se primenjuju preventivno ili radi poboljšanja zdravlja ljudi.
<b>Datum prihvatanja teme od strane Senata:</b> <b>DP</b>	30.01.2020.
<b>Datum odbrane:</b> <b>DO</b>	
<b>Članovi komisije:</b> <b>KO</b>	<p><b>predsednik:</b> dr Zoran Zeković, redovni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu</p> <p><b>član:</b> dr Senka Vidović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu</p> <p><b>član:</b> dr Ljiljana Popović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu</p> <p><b>član:</b> dr Stela Jokić, redovni profesor, Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku</p> <p><b>član:</b> dr Rita Ambrus, vanredni profesor, Institut za farmaceutsku tehnologiju i regulatorne poslove u Segedinu</p>

University of Novi Sad

Faculty of Technology

<b>KEY WORD DOCUMENTATION</b>	
<b>Accession number:</b> ANO	
<b>Identification number:</b> INO	
<b>Document type:</b> DT	Monograph documentation
<b>Type of record:</b> TR	Textual printed material
<b>Contents code:</b> CC	PhD thesis
<b>Author:</b> AU	Aleksandra Gavarić
<b>Mentor:</b> MN	Dr Senka Vidović
<b>Title:</b> TI	Contemporary methods of extraction of white horehound ( <i>Marrubium vulgare</i> L.) and drying of selected extracts, chemical composition and biological activities
<b>Language of text:</b> LT	Serbian
<b>Language of abstract:</b> LA	Serbian / English
<b>Country of publication:</b> CP	Republic of Serbia
<b>Locality of publication:</b> LP	Vojvodina
<b>Publication year:</b> PY	2020
<b>Publisher:</b> PU	Author's reprint
<b>Publication place:</b> PP	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
<b>Physical description:</b> PD	(7 chapters / 155 pages / 35 figures / 34 tables / 447 references / 18 appendices)
<b>Scientific field</b> SF	Technological Engineering
<b>Scientific discipline</b> SD	Pharmaceutical Engineering
<b>Subject, Key words</b> SKW	<i>Marrubium vulgare</i> , supercritical extraction, subcritical extraction, microwave assisted extraction, ultrasound assisted extraction, spray drying, antioxidant activity, antimicrobial activity, antihyperglycemic activity
UC	

<b>Holding data:</b> <b>HD</b>	Library of Faculty of Technology, Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1
<b>Note:</b> <b>N</b>	None
<b>Abstract:</b> <b>AB</b>	<p>Within the scope of this dissertation, the possibilities of applying modern methods for obtaining liquid (ultrasonic extraction, microwave extraction and subcritical water extraction) and lipophilic extracts (extraction with supercritical carbon dioxide) rich in polyphenols from the aboveground part of white horehound (<i>Marrubium vulgare</i> L.) were examined. Liquid extracts were optimized using an experimental design and response surface method, and subjected to <i>spray drying</i>. Liquid and dry extracts have been extensively examined for their chemical composition and biological activity, antimicrobial and <i>in vitro</i> antihyperglycaemic activities.</p> <p>For each of these extraction techniques, the influence of the main parameters was examined: ultrasonic extraction (temperature, extraction time and ultrasound power), microwave extraction (ethanol concentration, extraction time and microwave power) and subcritical water extraction (temperature, extraction time and HCl concentration in the extractant). Liquid extracts obtained by ultrasonic and microwave extraction under optimized conditions revealed the presence of chlorogenic acid and quercetin, which were not detected in macerates. The antimicrobial activity of both extracts was examined and <i>B. cereus</i> was found to be the most sensitive bacterial strain, whereas in the case of yeast <i>S. cerevisiae</i> was particularly sensitive to both extracts. In addition to this activity, the <i>in vitro</i> antihyperglycaemic activities of both extracts against <math>\alpha</math>-amylase and <math>\alpha</math>-glucosidase were investigated, with ultrasound extract showing higher antihyperglycaemic activity (50.63% inhibited <math>\alpha</math>-amylase and 48.67% inhibited <math>\alpha</math>-glucosidase) which could potentially be explained by the presence of chlorogenic acid (33.11 <math>\mu\text{g/mL}</math>) and quercetin (34.88 <math>\mu\text{g/mL}</math>). In the subcritical extract, obtained under optimal conditions, only the presence of hydroxy methylfurfural was detected, and this extract was not subjected to antimicrobial and antihyperglycaemic activity.</p> <p>For the extraction of lipophilic components of <i>M. vulgare</i>, distillation of essential oil (0.05%), Soxhlet extraction (3.23%) and extraction with supercritical carbon dioxide at pressures of 100, 200 and 300 bar and at temperatures of 40, 50 and 60 ° C were applied. The most dominant component in all the supercritical extracts obtained is the chemotaxonomic marker marubiin, which was not identified in the Soxhlet extract.</p> <p>The liquid extracts obtained by the ultrasound and microwave extraction under optimized conditions and the macerate were spray dried (with the addition of 10 and 50% maltodextrin) to</p>

	<p>obtain a more stable form of the dry extract. Dry extracts underwent determination of the most important physical properties and chemical composition as well as antimicrobial and antihyperglycemic activities to evaluate their incorporation into functional foods, dietary supplements or in the formulation of various finished dosage forms that are administered preventively or to improve human health.</p>
<p><b>Accepted on Senate on:</b> <b>AS</b></p>	<p>30<sup>th</sup> January 2020</p>
<p><b>Defended:</b> <b>DE</b></p>	
<p><b>Thesis Defend Board:</b> <b>DB</b></p>	<p><b>president:</b> dr Zoran Zeković, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad</p> <p><b>member:</b> dr Senka Vidović, associate professor, Faculty of Technology, Novi Sad</p> <p><b>member:</b> dr Ljiljana Popović, associate professor, Faculty of Technology, Novi Sad</p> <p><b>member:</b> dr Stela Jokić, full professor, Faculty of Food Technology, Osijek</p> <p><b>member:</b> dr Rita Ambrus, associate professor, Institute of Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs, Szeged</p>

## **Zahvalnica**

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo, Tehnološki fakultet Novi Sad; u laboratoriji Katedre za mikrobiologiju, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad; u laboratoriji Instituta za farmaceutsku tehnologiju i regulatorne poslove, Segedin (Mađarska); u laboratoriji Katedre za projektovanje tehnoloških procesa i konstrukcijskih materijala, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek (Hrvatska) i laboratoriji Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd, a u okviru realizacije projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br. TR31013.*

*Koristim ovu priliku da se zahvalim svima onima koji su dali doprinos izradi moje doktorske disertacije.*

*Na prvom mestu se zahvaljujem mom mentoru prof. dr Senki Vidović koja me je uvela u svet nauke i prenela mi svoje znanje i posvećenost naučno-istraživačkom radu. Takođe joj se zahvaljujem za nesebičnu podršku i prijateljski odnos koji su dodatno doprineli da istrajem na ovom putu.*

*Dr Jeleni Vladić se posebno zahvaljujem na stručnom vođenju eksperimentalnog rada u delu sušenja tečnih ekstrakata i ekstrakcije subkritičnom vodom kao i za pomoć pri interpretaciji dobijenih rezultata.*

*Prof. dr Zoranu Zekoviću se zahvaljujem na korisnim stručnim sugestijama u toku izrade ovog rada.*

*Prof. dr Draganu Radnoviću i Ani Volarić se zahvaljujem na pomoći pri odabiru bakterijskih sojeva, protokola i analizi antimikrobne aktivnosti.*

*Koleginici Jeleni Čakarević se zahvaljujem na pomoći pri određivanju antihiperглиkemijske aktivnosti odabranih tečnih i suvih ekstrakata.*

*Svim kolegama sa Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo se zahvaljujem na pomoći a hem. tehničaru Slavici Ostojić na dobroj atmosferi i tehničkoj pomoći u laboratoriji.*

*Najtoplije se zahvaljujem svojoj porodici na neizmernom strpljenju, razumevanju i podršci.*

*Aleksandra Gavarić*



# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPŠTI DEO .....	3
2.1. <i>Marrubium vulgare</i> L. ....	3
2.2. Taksonomija i rasprostranjenost .....	3
2.3. Biljna droga i biljni proizvodi/preparati .....	4
2.4. Hemijski sastav .....	6
2.4.1. Etarsko ulje .....	6
2.4.2. Fenolna jedinjenja .....	11
2.4.3. Fenipropanoidni i feniletanoidni glikozidi .....	12
2.4.4. Diterpen marubiin .....	12
2.5. Biološka aktivnost .....	14
2.5.1. Antioksidativna aktivnost .....	14
2.5.2. Antimikrobna aktivnost .....	15
2.5.3. Antihiperглиkemijska aktivnost .....	17
2.6. Savremene metode ekstrakcije .....	19
2.6.1. Ultrazvučna ekstrakcija (UAE) .....	20
2.6.2. Parametri koji utiču na UAE .....	22
2.6.3. Mikrotalasna ekstrakcija (MAE) .....	26
2.6.4. Parametri koji utiču na MAE .....	27
2.6.5. Ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE) .....	32
2.6.6. Parametri koji utiču na SWE .....	33
2.6.7. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom (SC-CO <sub>2</sub> ) .....	37
2.6.8. Parametri koji utiču na SC-CO <sub>2</sub> .....	39
2.7. Sušenje tečnih ekstrakata <i>spray drying</i> tehnikom .....	41
2.7.1. Princip <i>spray drying</i> procesa .....	42
2.7.2. Nosači .....	46
2.7.3. Maltodekstrini .....	47
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	49
3.1. Biljni materijal .....	49
3.2. Hemikalije .....	49
3.3. Uređaji .....	49
3.4. Ispitivanje biljnog materijala .....	50

3.4.1. Određivanje veličine čestica usitnjenog biljnog materijala .....	50
3.4.2. Određivanje sadržaja etarskog ulja .....	50
3.4.3. Određivanje sadržaja vlage .....	50
3.5. Ekstrakcija biljnog materijala .....	51
3.5.1. Konvencionalna ekstrakcija .....	51
3.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija .....	51
3.5.3. Mikrotalasna ekstrakcija .....	52
3.5.4. Ekstrakcija subkritičnom vodom .....	52
3.5.5. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom .....	53
3.5.6. <i>Soxhlet</i> ekstrakcija .....	54
3.6. Hemijska karakterizacija tečnih ekstrakata .....	55
3.6.1. Sadržaj ukupnih fenola .....	55
3.6.2. Sadržaj ukupnih flavonoida .....	55
3.6.3. HPLC analiza fenolnih kiselina i hidroksimetil furfurala (HMF) .....	56
3.7. Hemijska karakterizacija lipofilnih ekstrakata .....	56
3.7.1. GC–MS analiza isparljivih komponenti .....	56
3.8. Biološka aktivnost tečnih ekstrakata .....	57
3.8.1. Antioksidativna aktivnost .....	57
3.8.2. Antimikrobna aktivnost .....	58
3.8.3. Antihiperглиkemijska aktivnost .....	59
3.9. Eksperimentalni dizajn i optimizacija ekstrakcije .....	60
3.10. Dobijanje suvih ekstrakata <i>spray drying</i> tehnikom .....	62
3.10.1. Priprema napojne smeše .....	63
3.10.2. Efikasnost <i>spray drying</i> procesa .....	63
3.10.3. Fizičke osobine suvih ekstrakata .....	64
3.11. Hemijska karakterizacija suvih ekstrakata .....	64
3.11.1. HPLC analiza fenolnih kiselina .....	64
3.12. Biološka aktivnost suvih ekstrakata .....	64
3.12.1. Antimikrobna aktivnost .....	64
3.12.2. Antihiperглиkemijska aktivnost .....	64
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>65</b>
4.1. Karakterizacija biljnog materijala <i>M. vulgare</i> i određivanje koncentracije etanola za dalju primenu u procesu ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja .....	65
4.2. Ultrazvučna (UAE) i mikrotalasna (MAE) ekstrakcija .....	68
4.2.1. Provera adekvatnosti modela UAE i MAE .....	68
4.2.2. Uticaj parametara UAE i MAE .....	73

4.2.3. Optimizacija UAE i MAE procesa .....	76
4.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE).....	78
4.3.1. Provera adekvatnosti modela SWE .....	78
4.3.2. Uticaj parametara SWE.....	80
4.3.4. Optimizacija SWE procesa.....	82
4.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom.....	83
4.4.1. Prinosi i hemijski sastav lipofilnih ekstrakata .....	83
4.5. Hemijska karakterizacija tečnih ekstrakata .....	91
4.5.1. HPLC analiza fenolnih kiselina.....	91
4.5.2. HPLC analiza HMF.....	95
4.6. Biološka aktivnost tečnih <i>M. vulgare</i> ekstrakata.....	97
4.6.1. Antimikrobna aktivnost.....	97
4.6.2. Antihiperглиkemijska aktivnost .....	100
4.7. <i>Spray drying</i> odabranih tečnih ekstrakata .....	103
4.7.1. Efikasnost <i>spray drying</i> procesa.....	103
4.7.2. Fizičke osobine suvih ekstrakata .....	104
4.8. Hemijska karakterizacija suvih ekstrakata .....	106
4.8.1. HPLC analiza fenolnih kiselina.....	106
4.9. Biološka aktivnost suvih ekstrakata <i>M. vulgare</i> .....	108
4.9.1. Antimikrobna aktivnost.....	108
4.9.2. Antihiperглиkemijska aktivnost .....	109
5. ZAKLJUČCI .....	110
6. LITERATURA.....	114
7. PRILOG.....	146

# 1. UVOD

Zahvaljujući geografskim, geološkim i geomorfološkim karakteristikama, kao i prirodnim uslovima (klima, zemljište, itd.) na prostoru centralnog Balkana raste veliki broj različitih biljnih vrsta. Područje Srbije poseduje bogatu floru koja je i taksonomski veoma raznovrsna (Stevanović i sar., 1995). Uprkos tome, u široj upotrebi je tek oko 250 – 300 vrsta, od kojih najveći broj raste spontano u prirodi. Tokom poslednjih četrdeset godina insistira se na ispitivanju lekovitog bilja koje sve češće ulazi u sastav gotovih lekova i time redukuje upotrebu sintetskih lekova praćenu neželjenim farmakološkim delovanjima. Mnoge biljne droge koriste se u svom nativnom obliku, neke kao sirovina za izradu standardizovanih ekstrakata, od kojih se kasnije izrađuju fitopreparati, dok se značajan broj droga koristi za izolovanje određenih hemijskih jedinjenja, koja dalje služe kao polazna sirovina u sintezi nekih lekova (Tasić, Šavikin, Menković, 2009).

Prirodni biljni proizvodi, posebno biljni ekstrakti, danas se uglavnom dobijaju primenom konvencionalnih metoda ekstrakcije. Klasični postupci ekstrakcije imaju niz nedostataka kao što su niska efikasnost procesa, veliki utrošak energije i vremena, upotreba toksičnih rastvarača, termička degradacija jedinjenja, negativan uticaj na životnu sredinu i proizvodnja ekstrakata neodgovarajućeg kvaliteta. Iz tog razloga se u savremenoj proizvodnji ekstrakata biljnog porekla teži razvoju ekstrakcionih postupaka koji se zasnivaju na primeni "zelenih" netoksičnih rastvarača uz njihovu smanjenu potrošnju, a istovremeno se obezbeđuje povećan prinos i ujednačen visok kvalitet krajnjeg proizvoda. "Zeleni" pomak u industriji prirodnih proizvoda je u skladu sa zahtevima tržišta za nenenaturisanim biodegradabilnim ekstraktima bez prisustva kontaminanata (Chemat i sar., 2015).

Zbog svega navedenog, ispitivanja u okviru ove disertacije su usmerena na mogućnost primene savremenih metoda ekstrakcije (ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija, ekstrakcija subkritičnom vodom i ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom) za proizvodnju tečnih i lipofilnih ekstrakata iz nadzemnog dela *Marrubium vulgare* L. Svaka ekstrakciona tehnika je posebno optimizovana u kontekstu definisanja uticajnih parametara ekstrakcije u cilju dobijanja maksimalnog prinosa ekstrakcije, ciljnih grupa jedinjenja i bioloških osobina ekstrakata. Ispitana je *in vitro* antihiperглиkemijska aktivnost i definisan potencijal inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze odabranih tečnih ekstrakata, odnosno ultrazvučnog i mikrotalasnog ekstrakta, dobijenih pri optimalnim uslovima ekstrakcije. Takođe, antibakterijska aktivnost optimalnih ekstrakata je ispitana na odabranim bakterijskim sojevima mikrodilucionom metodom, pri čemu su određene minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija. Lipofilni ekstrakti dobijeni superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom su detaljno analizirani po pitanju hemijskog sastava.

Primenom ultrazvučne ekstrakcije, mikrotalasne ekstrakcije i ekstrakcije subkritičnom vodom dobijeni su ekstrakti u tečnoj formi. Tečni proizvodi zahtevaju veće troškove u pogledu skladištenja i transporta, odlikuje ih manja stabilnost, dok je mogućnost inkorporacije u nove proizvode ograničena. Radi prevazilaženja pomenutih nedostataka tečnih formi proizvoda, cilj ove disertacije je i ispitivanje mogućnosti primene sušenja raspršivanjem (*spray drying*) za transformaciju tečnih ekstrakata *M. vulgare* u suve ekstrakte, odnosno prahove. Suvim ekstraktima su definisane najznačajnije fizičke i hemijske osobine, kao i biološka aktivnost. Antibakterijska aktivnost odabranih ekstrakata ispitana je na određenim bakterijskim sojevima mikrodilucionom metodom, pri čemu su određene minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija. Glavni cilj svih ispitivanja je bilo dobijanje kvalitetnih suvih ekstrakata koji se mogu direktno inkorporirati u funkcionalnu hranu, dijetetske suplemente ili dalje koristiti u formulaciji različitih gotovih proizvoda koji se primenjuju preventivno ili radi poboljšanja zdravlja ljudi.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. *Marrubium vulgare* L.

*Marrubium vulgare* L. (očajnica, macina trava, beli tetrljan) je višegodišnja biljka gorkog ukusa i neprijatnog mirisa. Najčešće je zastupljena u formi razgranatog grma visine od 0,3 do 0,6 m. Stabljika je uspravna, prekrivena belim dlakama, a listovi su okruglo-jajasti, liska naborana i tupo nazubljena. Mladi listovi su gusto obrasli dlakama. Cvasti su sakupljene u pazuhu listova u loptaste, razmaknute pršljenove. Čašica je sa 10 unazad savijenih zubaca. Cvetovi su sitni, krunica bela, pokrivena maljama (Slika 1). Vreme cvetanja je od juna do avgusta (Tasić, Šavikin, Menković, 2009).



Slika 1. Vrsta *Marrubium vulgare* L., izgled cvasti i grma

([http://vro.agriculture.vic.gov.au/dpi/vro/vrosite.nsf/pages/weeds\\_herbs\\_perennial\\_horehound](http://vro.agriculture.vic.gov.au/dpi/vro/vrosite.nsf/pages/weeds_herbs_perennial_horehound))

### 2.2. Taksonomija i rasprostranjenost

Genus *Marrubium* (*Lamiaceae*) obuhvata oko 49 vrsta (Ahvazi i sar., 2016), koje uključuju jednogodišnje i višegodišnje biljke. Uprkos tome što su vrste genusa većinom rasprostranjene u iranoturanskim kao i u Mediteranskim fitogeografskim regijama, neke vrste su naturalizovane u Americi i Australiji (Akgül i sar., 2008). Prema *Flora Iranica* (Rechinger, 1982) i *Flora of Iran* (Jamzad, 2012), *Marrubium* obuhvata 11 vrsta u Iranu, od kojih je jedna endemična (*M. procerum* Bunge). Većina *Marrubium* vrsta je rasprostranjena po stepama i suvim oblastima Irana (Grassia i sar., 2006). Postoji mnogo diskusija o infrageneričkoj klasifikaciji roda. Bentham (1836) je detaljno pregledao ovaj genus i podelio *Marrubium* u dve sekcije, *Lagopsis* i *Marrubium*. Boissier (1867) i Briquet (1896) su podelili genus u dve i tri sekcije. Međutim, u nekim zemljama kao što su Iran i Turska, *Marrubium* vrste nisu klasifikovane u sekcije (Cullen, 1982; Rechinger i Hedge, 1982; Jamzad, 2012). Vaskularna flora

Srbije prepoznaje tri *Marrubium* vrste (*M. vulgare*, *M. peregrinum* i *M. incanum*), pri čemu je *M. vulgare* najrasprostranjenija (Tasić, Šavikin, Menković, 2009). Sistematski položaj vrste *M. vulgare*, odnosno očajnice, prikazan je u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Sistematski položaj vrste *M. vulgare*

Carstvo ( <i>regnum</i> )	<i>Plantae</i>
Klasa ( <i>classis</i> )	<i>Dicotyledonae</i>
Red ( <i>ordo</i> )	<i>Lamiales</i>
Familija ( <i>familia</i> )	<i>Lamiaceae</i>
Rod ( <i>genus</i> )	<i>Marrubium</i> L.
Vrsta ( <i>species</i> )	<i>Marrubium vulgare</i>

### 2.3. Biljna droga i biljni proizvodi/preparati

Za biljne proizvode i preparate na bazi *M. vulgare*, navedene indikacije su detaljno opisane u farmakopejama i drugoj stručnoj literaturi (Tabele 2 i 3):

**Tabela 2.** Respiratorni i torakalni poremećaji

Katar respiratornog trakta	Blaschek i sar., 2009
Akutni bronhitis, neproduktivni kašalj, katar respiratornog trakta	Bradley, 1992
Tradicionalna primena u slučaju simptomatskog tretmana kašlja i sklonosti ka akutnom benignom bronhitisu i u cilju poboljšanja sekretolitičke aktivnost u respiratornom traktu	Jänicke i sar., 2003; Barnes, 2007; Seitz i Zepernick, 2007
Katar gornjeg respiratornog trakta	Blumenthal i sar., 1998; Bradley 1992; Teuscher, 2004; Schilcher, 2007; Seitz, 2007; Blaschek, 2009
Akutni ili hronični bronhitis bronhitis sa neproduktivnim kašljem, veliki kašalj	BHP (1976, 1983)
Ekspektorans	BHP (1976, 1983, 1990, 1996)
Ekspektorans, preparati na bazi ove biljke se proizvode u formi infuza, oksimela ili sirupa, zastupljen je kao lek protiv kašlja, prehlade i u slučaju sklonosti ka plućnim infekcijama	British Pharmaceutical Codex (1934)
Kašalj/bronhitis, respiratorni katar	PDR for Herbal Medicines (1998)

**Tabela 3.** Poremećaji želuca

Nadutost i flatulencija	Blumenthal i sar. (1998)
Primena u cilju unapređenja funkcije gastrointestinalnog trakta	Indikations liste (2005)
Osećaj sitosti i flatulencija	Blaschek i sar. (2006)
Dispepsija	Bradley (1992)
Laksativ (u većim dozama)	British Pharmaceutical Codex (1934)
Dispeptičke smetnje	DAC (1995, 1997, 2003)
Vrste medicinskih agenasa koji utiču na pražnjenje žuči	Österreichisches Arzneibuch (1960, 1981, 1990)
Dispeptičke smetnje, nadimanje i flatulencija, smetnje u žučnoj kesi	PDR for Herbal Medicines (1998)

Za neke od ovih indikacija potvrđena je i terapijska efikasnost *M. vulgare* u zvaničnoj medicini, što je omogućilo da primena ove biljke bude odobrena od strane različitih komisija za registraciju biljnih preparata (EMA/HMPC/604271/2012; ESCOP, 2013). Prema pregledu proizvoda koji su plasirani na tržište, istaknute su sledeće indikacije:

- ✓ Sok isceden iz sveže *Marrubii* herbe: 2-6 supenih kašika dnevno, katar respiratornog trakta, osećaj sitosti i flatulencija (Jänicke, 2003; Schilcher i sar., 2007; Seitz i Zepernick, 2007; Blaschek, 2009),
- ✓ Tečni ekstrakt dobijen ekstrakcijom *Marrubii* herbe (odnos droga/rastvarač 1:1, 20% etanol): 1-4 mL tri puta dnevno, tradicionalna primena kako bi se poboljšala sekretolitička aktivnost u respiratornom traktu (Bradley, 1992; Jänicke i sar., 2003; Barnes, 2007; Seitz i Zepernick, 2007),
- ✓ 4,5 g droge dnevno ili 1-2 g infuza tri puta dnevno (Bradley, 1992; Jänicke i sar., 2003; Teuscher i sar., 2004; Barnes i sar., 2007; Schilcher i sar., 2007; Seitz i Zepernick, 2007; Blaschek i sar., 2009),
- ✓ Tinktura (1:5, 25% etanol): 3-6 mL dnevno (Bradley, 1992).

Prema literarnim podacima i indikacijama koji se odnose na proizvode koji se plasiraju na tržište, u monografiji su propisane sledeće indikacije:

- a) Tradicionalni medicinski preparat na bazi bilja, koji deluje kao ekspektorans u slučaju prehlade praćene kašljem;
- b) Tradicionalni medicinski preparat na bazi bilja, koji se koristi u toku simptomatskog tretmana, u slučaju blagih dispeptičkih smetnji (nadimanje i flatulencija);
- c) Tradicionalni medicinski preparat na bazi bilja, koji se koristi u slučaju privremenog nedostatka apetita.



Upotreba ekstrakata *M. vulgare* van medicinskog domena je u svrhu korigovanja ukusa različitih prehrambenih proizvoda, konditora i alkoholnih napitaka (gorka rakija i likeri), posebno piva gde se koristi kao supstitucija za hmelj (Pukalskas i sar., 2012).

## 2.4. Hemijski sastav

Od svih predstavnika roda *Marrubium*, detaljno su fitohemijski ispitane sledeće vrste: *M. vulgare* i *M. peregrinum*. Literaturni podaci o ostalim vrstama ovog roda su oskudni.

Karakteristični konstituenti roda *Marrubium* su diterpeni labdanskog tipa marubiin (0,12 – 1,0%) i marubenol, dobijeni metaboličkim reakcijama iz njihovih prekursora premarubiina i premarubenola tokom perioda rasta, zatim peregrinol i vulgarol, do 7% tanin, do 0,1% feniletanoidnih estara, uključujući verbaskozide, balotetrozid, forzitozid B, marubozid i arenariozid, etarsko ulje (0,05 – 0,06%) u čiji sastav spadaju uglavnom fenilpropanoidi, mono- i seskviterpeni, hidroksicimetne kiseline, hlorogenska, kafena, kafeoil-jabučna kiselina i kafeoil hininska kiselina, flavon- i flavonol glikozidi, laktoil flavoni, metoksilovani flavon ladanein, amini uključujući holin (0,2%) i betonicin (0,3%) (Nawwar i sar., 1989; Sahpaz i sar., 2002a; Sahpaz i sar., 2002b; Martin-Nizard i sar., 2003; Belhattab i sar., 2006; Knöss, 2006; Seitz i Zepernick, 2007; Morteza-Semnani i sar., 2008; Blaschek i sar., 2009; Ahmed i sar., 2010; Alkhatib i sar., 2010; Zawislak, 2011).

### 2.4.1. Etarsko ulje

Uprkos tome što *M. vulgare* spada u vrste koje nisu prepoznatljive po bogatom sadržaju etarskog ulja (0,05 – 0,06%) (EMA/HMPC/604271/2012; ESCOP, 2013), brojne studije su se bavile ispitivanjem upravo ovog aspekta ove biljne vrste. Neki autori su ispitivali i poredili sastav etarskog ulja dobijenog iz biljke u različitim fazama vegetacije, dok su drugi ispitivali sadržaj etarskog ulja dobijenog iz različitih delova biljke (list, cvet i stablo). Belhattab i sar. (2006) su analizirali etarsko ulje dobijeno hidroddestilacijom i simultanom destilacijom-ekstrakcijom iz nadzemnih delova *M. vulgare* prikupljenih tokom vegetativne (V) i reproduktivne (R) faze. Prinos etarskog ulja je iznosio  $\leq$  0,05% (v/m). Eugenol je detektovan kao dominantna komponenta (50%) u R-ulju, dok je u V-ulju prisutan tek 16%.  $\beta$ -Bisabolen je identifikovan kao dominantna komponenta (29%) V-ulja i druga po redu glavna komponenta (11%) R-ulja. Letchamo i sar. (1997) su ispitali etarsko ulje u listovima, cvetovima i stabljikama *M. vulgare* i dobili su prinose od 0,29%, 0,10% i 0,01%. U tabelama 4 i 5 dati su rezultati odabranih naučnih studija koja su se bavila ispitivanjem etarskog ulja i komponenta etarskog ulja izolovanog iz *M. vulgare*.

**Tabela 4.** Prinos etarskog ulja, ukupan prinos, broj identifikovanih jedinjenja, deo biljke i primenjeni postupak destilacije *M. vulgare*

Prinos (%)	Ukupan prinos (%)	Broj identifikovanih jedinjenja	Deo biljke	Ekstrakcija	Zemlja porekla	Literatura
0,05	-	23	Nadzemni deo, osušen u sušnici na 30°C (6 dana)	Destilacija vodenom parom (3 h), aparatura po Deryng-u	Poljska	Zawislak, 2012
0,05	-	48	Nadzemni deo, osušen u sušnici na 30°C (6 dana)	Destilacija vodenom parom (3 h), aparatura po Deryng-u	Poljska	Zawislak, 2015
0,07	-	31	Faza cvetanja, nadzemni deo, osušen u sušnici na 30°C (4 dana)	Hidrodestilacija (3 h), aparatura po Clevenger-u	Poljska	Hmamou i sar., 2013
0,06	98	26	Faza cvetanja, nadzemni deo, osušen u sušnici na 30°C (4 dana)	Hidrodestilacija (3 h), aparatura po Clevenger-u	Poljska	Nagy i Svajdlenka, 1998
0,07	96	21	Nadzemni deo osušen na vazduhu	Metod po Farmakopeji	Slovačka	Asadipour i sar., 2005
0,1	77,08	86,2	Nadzemni deo osušen na vazduhu	Hidrodestilacija (4 h), aparatura po Clevenger-u	Iran	Khanavi i sar., 2005
0,09	95,1	34	Faza cvetanja, nadzemni deo osušen na vazduhu	Hidrodestilacija (3 h), aparatura po Clevenger-u	Iran	Morteza-Semnani i sar., 2008
0,4	93,5	20	Faza cvetanja, osušen nadzemni deo	Hidrodestilacija (3 h), aparatura po Clevenger-u	Iran	Hamdaoui i sar., 2013
0,02	74,6	35	Nadzemni deo osušen na vazduhu	Hidrodestilacija (2 h), aparatura po Clevenger-u	Tunis	Bayir i sar., 2014
-	-	11	Listovi	Destilacija vodenom parom (3 h), aparatura po Clevenger-u	Turska	Golparvar i sar., 2015
-	99,89	44	Nadzemni deo	Hidrodestilacija (3 h), aparatura po Clevenger-u	Iran	Said-Al Ahl i sar., 2015
-	99,39	32	Faza cvetanja, sveža biljka	Hidrodestilacija (2 h), aparatura po Clevenger-u	Egipat	Rezazi i sar., 2017
0,05	97,72	28	Listovi osušeni u sušnici na 30°C (6 dana)	Hidrodestilacija (3 h), aparatura po Clevenger-u	Alžir	Weel i sar., 1999
-	-	47	Sveži usitnjeni listovi osušeni na vazduhu	Hidrodestilacija (3 h), aparatura po Clevenger-u	Litvanija	Letchamo i Mukhopadhyay, 1997
0,05	90	30	Faza cvetanja, nadzemni deo osušen na vazduhu	Hidrodestilacija (3 h), aparatura po Clevenger-u	Alžir	Belhattab i sar., 2006

0,05	90	30	Vegetativna faza, nadzemni deo osušen na vazduhu	Hidrodestilacija (3 h), aparatura po Clevenger-u	Alžir	Belhattab i sar., 2006
0,34	100	34	Nadzemni deo osušen na vazduhu	Hidrodestilacija (4 h), aparatura po Clevenger-u	Tunis	Kadri i sar., 2011
0,05	82,46	50	Nadzemni deo osušen na vazduhu	Hidrodestilacija (4 h), aparatura po Clevenger-u	Alžir	Abadi i Hassani, 2013
1	99,79	36	Nadzemni deo osušen na vazduhu	Hidrodestilacija do konstantne zapremine (minimum 1 h)	Libija	El-Hawary i sar., 2013
0,34	100	34	Listovi osušeni na vazduhu	Hidrodestilacija (4 h), aparatura po Clevenger-u	Iran	Bokaeian i sar., 2014
0,75	-	30	Listovi osušeni na vazduhu	Hidrodestilacija (2 h), aparatura po Clevenger-u	Iran	Dehbashi i sar., 2015
0,2	57,50	19	Sveža biljka, nadzemni deo	Hidrodestilacija, aparatura po Clevenger-u	Egipat	Salama i sar., 2012

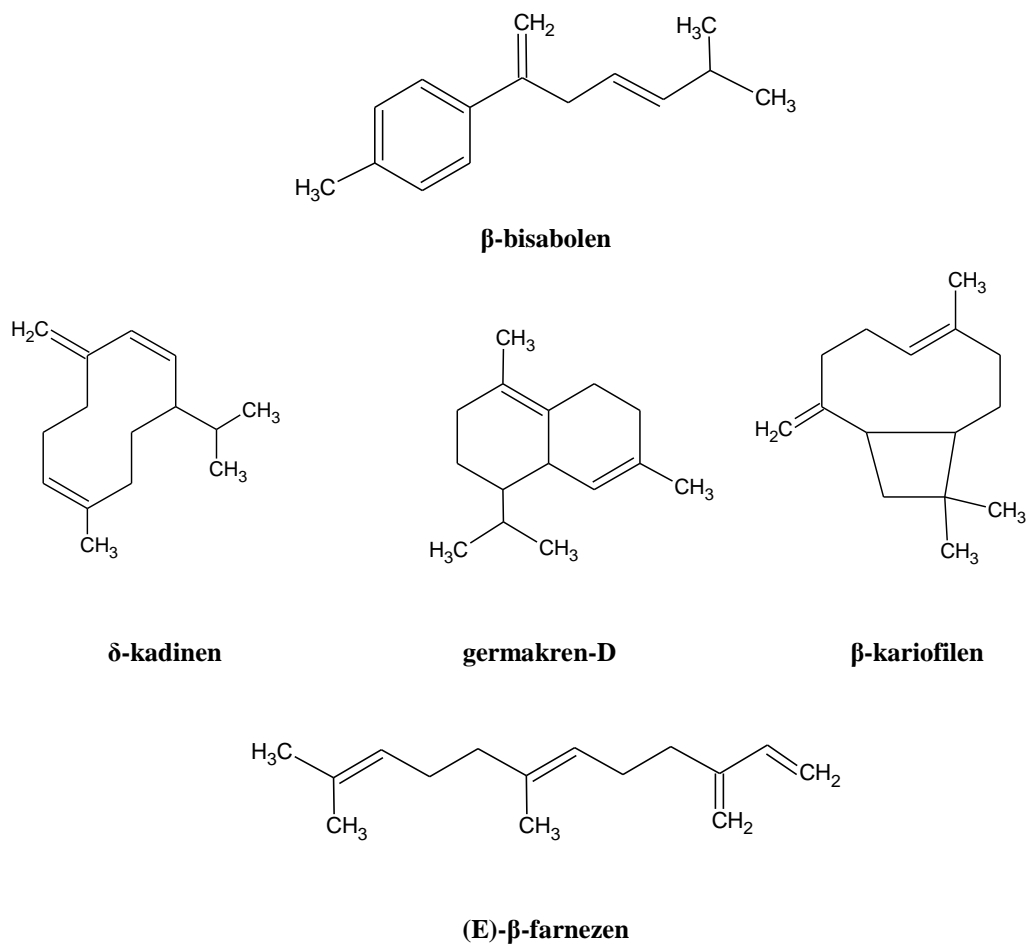
Elbali i sar. (2018) su ispitali varijabilnost etarskog ulja *M. vulgare*, sakupljene sa 10 različitih lokaliteta u Alžiru. Etarska ulja su klasifikovana u 5 hemotipova:  **$\beta$ -bisabolen-tip** (3,1–43,4%) karakterističan za peskovito zemljište na visokoj nadmorskoj visini,  **$\delta$ -kadinen-tip** (0,2–34,2%) karakterističan za peskovito zemljište i visoke temperature, **E- $\beta$ -farnezen-tip** (1,4–34,8%) karakterističan za alkalno zemljište na visokoj nadmorskoj visini,  **$\beta$ -kariofilen-tip** (3,4–43,1%) karakterističan za glinovito zemljište sa organskom materijom, i **germakren-D-tip** (2,1–37,9%) karakterističan za vlažna i slana zemljišta. Rezultati ispitivanja ovih autora ukazuju i na visoku varijabilnost antioksidativne i antimikrobne aktivnosti, što samo dodatno potvrđuje uticaj geografskog staništa i faktora životne sredine na biološke aktivnosti.

**Tabela 5.** Sadržaj dominantnih komponenti etarskog ulja *M. vulgare*

Jedinjenje	Sadržaj (%)	Literatura
<b><math>\beta</math>-bisabolen</b>	3,1- 43,4	Elbali i sar., 2018
	28,3	Hamdaoui i sar., 2013
	0,81	Golparvar i sar., 2015
	0,86	Kadri i sar., 2011
	25,4	Khanavi i sar., 2005
<b><math>\delta</math>-kadinen</b>	1,05	El-Hawary i sar., 2013
	3,30	Kadri i sar., 2011
	0,36	Golparvar i sar., 2015
	0,2- 34,2	Elbali i sar., 2018
	3,13	Abadi i Hassani, 2013
	2,1	Khanavi i sar., 2005

<b>germakren-D</b>	9,61	Abadi i Hassani, 2013
	9,37	Kadri i sar. 2011
	14,4	Nagy i Svajdlenka, 1998
	0,41	Golparvar i sar., 2015
	1,69	El-Hawary i sar., 2013
	4,71	Weel i sar., 1999
	2,1- 37,9	Elbali i sar., 2018
	9,7	Khanavi i sar., 2005
	20,23-31,14	Zawislak, 2012
<b>(E)-<math>\beta</math>-farnezen</b>	15,66	El-Hawary i sar., 2013
	7,4	Hamdaoui i sar., 2013
	11,39	Golparvar i sar., 2015
	8,3	Khanavi i sar., 2005
	9,61	Weel i sar., 1999
	1,4-34,8	Elbali i sar., 2018
<b><math>\beta</math>-kariofilen</b>	7,8	Hamdaoui i sar., 2013
	32,19	Golparvar i sar., 2015
	11,6	Khanavi i sar., 2005
	45,8	Nagy i Svajdlenka, 1998
	2,22	El-Hawary i sar., 2013
	2,15	Kadri i sar., 2011
	8,50	Weel i sar., 1999
	3,4-43,1	Elbali i sar., 2018

Poređenjem hemijskog sastava etarskog ulja *M. vulgare* sa različitog geografskog porekla zapažena je značajna varijabilnost kako sadržaja etarskog ulja, tako i njegovog hemijskog sastava. U Litvaniji, hidrodestilacijom isparljivih komponenti koje su analizirane pomoću GC–MS, utvrđeno je da su glavni konstituenti etarskog ulja  $\beta$ -bisabolen,  $\delta$ -kadinen i izokariofilen (Weel i sar., 1999). U Egiptu, timol i  $\gamma$ -kadinen su navedeni kao dominantni konstituenti etarskog ulja *M. vulgare* (Salama i sar., 2012). U Libiji, El-Hawary i sar. (2013) su ispitali glavne komponente etarskog ulja i zaključeno je da su to karvakrol, (E)- $\beta$ -farnezen i timol. U Tunisu, Hamdaoui i sar. (2013) su naveli  $\beta$ -bisabolen (28,3%),  $\beta$ -kariofilen (7,8%), (E)- $\beta$ -farnezen (7,4%) i 1,8-cineol (4,8%) kao dominantne konstituente etarskog ulja. U Alžiru, Abadi i Hassani (2013) su utvrdili da su glavne komponente ovog etarskog ulja 4,8,12,16-tetrametil heptadekan-4-olid (16,97%), germakren D-4-ol (9,61%),  $\alpha$ -pinen (9,37%), fitol (4,87%), sabina-ke-ton (4,12%), piperiton (3,27%),  $\delta$ -kadinen (3,31%), 1-okten-3-ol (2,35%) i benzaldehid (2,31%). U Iranu, Golparvar i sar. (2015) su identifikovali 44 jedinjenja u etarskom ulju, dobijenom iz nadzemnih delova *M. vulgare*, pomoću GC–MS. Prema ovoj studiji dominantna jedinjenja ovog etarskog ulja su  $\beta$ -kariofilen (32,19%), (E)- $\beta$ -farnezen (11,39%), 1,8-cineol (8,17%) i  $\alpha$ -pinen (6,64%). U drugoj studiji identifikovano je 34 jedinjenja u etarskom ulju ulju *M. vulgare*, a kao glavni konstituenti navedeni su oksidovani monoterpeni (40,02%) i seskviterpeni (42,7%), zastupljeni u gotovo jednakom procentu. Na slici 2 su prikazane hemijske strukture najzastupljenijih komponenti etarskog ulja *M. vulgare*.



**Slika 2.** Hemijske strukture najzastupljenijih komponenti etarskog ulja *M. vulgare*

Proizvodnja sekundarnih metabolita, uključujući i etarsko ulje, u velikoj mjeri zavisi od uslova sredine i pratećih faktora kao što su geografsko stanište, vreme i način branja, temperatura, tip zemljišta, dostupnost vode i nutritijenata i atmosferski uslovi (Mahmoud i sar., 2018; Elbali i sar., 2018; Zawislak i sar., 2015; Zawislak i sar., 2012; Hamdaoui i sar., 2013; Ahvazi i sar., 2016; Amri i sar., 2017), što je najverovatnije i uzrok pomenute varijabilnosti. U prilog ovoj konstataciji ide i činjenica da su Kadri i sar. (2011) i Bokaeian i sar. (2014) detektovali  $\gamma$ -eudezmol kao dominantnu komponentu, dok u drugim studijama ovo jedinjenje uopšte nije detektovano.

### 2.4.2. Fenolna jedinjenja

Sekundarni metaboliti poreklom iz biljaka poseduju značajne biološke i farmakološke aktivnosti. Mnogi poremećaji u ljudskom organizmu, poput koronarnih srčanih oboljenja, inflamacije, dijabetesa, karcinogeneze i neurodegenerativnih bolesti, mogu biti rezultat povećane koncentracije slobodnih radikala u organizmu. Oksidativni stres usled proizvodnje slobodnih radikala je glavni okidač za pojavu različitih bolesti. Oksidaciono oštećenje postiže se "napadom" slobodnih radikala na različite biomolekule, posebno proteine, lipide i DNK, što rezultira degradacijom ćelije i apoptozom. Štetni efekti narušene ravnoteže antioksidans-prooksidans mogu se u velikoj meri sprečiti unosom antioksidanasa preko suplemenata ili hrane koja sadrži antioksidanse (Halliwell i Gutteridge, 2015). Zbog svog prirodnog porekla, antioksidansi dobijeni iz biljaka imaju veći benefit u poređenju sa sintetskim za koje je otkriveno da imaju neželjene sekundarne efekte (Rohman i sar., 2010; Zheng i Wang, 2001). Stoga ispitivanja hemijskog sastava i biološke aktivnosti lekovitog bilja kao potencijalnog izvora prirodnih antioksidanasa imaju rastući trend. Fenolne kiseline i flavonoidi su detaljno proučavani zbog njihovih antioksidativnih svojstava jer su u stanju da spreče ili odlože reakcije oksidacije, slobodno radikalske lančane reakcije koje se dešavaju u auto-oksidativnim sistemima (Tarnavski i sar., 2004). Fenolne kiseline i flavonoidi su uključeni u antioksidativnu aktivnost jer mogu da heliraju jone metala koji učestvuju u stvaranju interaktivnih vrsta kiseonika (ROS) ili "hvataju" slobodne radikale i formiraju stabilne intermedijarne strukture, ograničavajući na taj način slobodne radikalske reakcije inicijacije ili propagacije (Moon i Shibamoto, 2009; Zheng i Wang, 2001). Njihova proizvodnja pokazuje široku kvalitativnu i kvantitativnu varijaciju između biljnih organa i zavisi od rasta biljaka, faktora životne sredine i stresnih stimulansa poput UV zračenja, suše i visokih temperatura (Sosa i Tonn, 2008).

Fenolna jedinjenja predstavljaju najbrojniju klasu sekundarnih biomolekula biljaka gde dominiraju flavonoidi, fenil propanoidi i fenolne kiseline. Flavonoidi sadrže više fenolnih hidroksilnih grupa vezanih za difenilpropanski (C6-C3-C6) skelet. Prema stepenu oksidacije centralnog piranskog prstena flavonoidi su podeljeni u 12 klasa, od kojih su u biljkama najčešće zastupljeni flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, antocijanidini i izoflavoni (Rice-Evans i sar., 1997). Flavonoidi su povezani sa širokim spektrom zdravstvenih benefita i nezaobilazna su komponenta u različitim prehranbenim, farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim aplikacijama. Takođe, biljni flavonoidi poseduju bogatu paletu farmakoloških aktivnosti koja obuhvata antioksidativno, antiinflamatorno, antimutageno i antikancerogeno delovanje, zajedno sa njihovom sposobnošću da modulišu ključne ćelijske funkcije enzima. Takođe je poznato da su potentni inhibitori nekoliko enzima, kao što su ksantin oksidaza, ciklooksigenaza, lipooksigenaza i fosfoinozimid 3-kinaza (Metodiewa i sar., 1997; Hayashi i sar., 1988, Walker i sar., 2000).

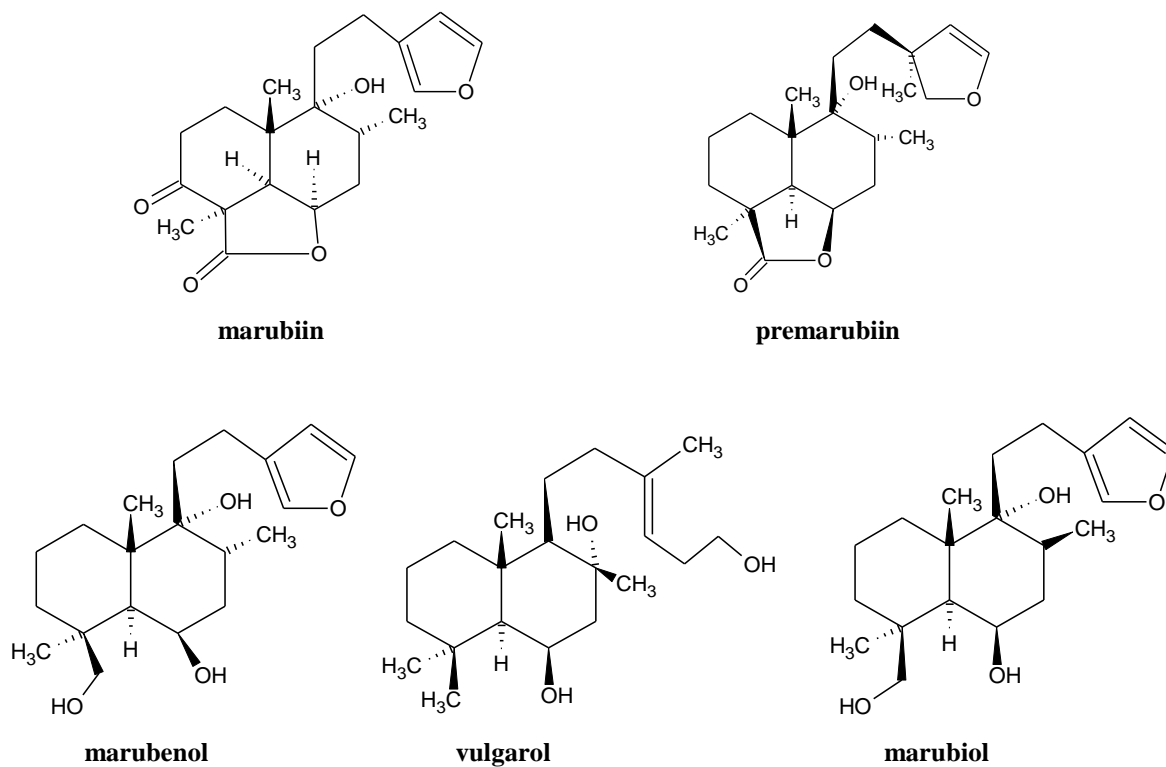
Više od 10 flavonoida, uključujući aglikone i glikozide, su identifikovani u različitim delovima biljke *M. vulgare*. Ukupno 11 flavonoida, uključujući i njihove glikozide, izolovano je iz listova *M. vulgare*: viteksin, hrizoeriol, kvercetin-3-O- $\alpha$ -1-ramnozil glukozid, izokvercetin, luteolin, apigenin, apigenin-7-O-glukozid, apigenin-7-laktat, apigenin-7-(6-*p*-kumaroil)-glukozid, luteolin-7-O- $\beta$ -D-glukozid i luteolin-7-laktat (Nawwar i sar., 1989, Kowalewski i Matlawska 1978, Rahman, 2007). Derivat flavona, 3-hidroksi apigenin-4'-O-(6''-O-*p*-kumaroil)- $\beta$ -D-glukopiranozid, izolovan je iz metanolnog ekstrakta cele biljke *M. vulgare* (Shaheen i sar., 2014). Ladanein je izolovan po prvi put iz dihlormetanskog ekstrakta nadzemnog dela *M. vulgare* (Alkhatib i sar., 2010). U drugoj studiji, nadzemni delovi *M. vulgare* ekstrahovani su smešom metanol-voda-sirćetna kiselina, pri čemu je po prvi put iz *M. vulgare* izolovan 7-O- $\beta$ -glukuronil luteolin zajedno sa drugim jedinjenjima kao što su ladanein i 7-O- $\beta$ -glukopiranozil luteolin (Pukalskas i sar., 2012). Osam fenolnih kiselina i pet flavonoida su identifikovani u etil acetatnoj frakciji *M. vulgare* i kvantifikovani pomoću HPLC-DAD, pri čemu je sadržaj kvercetin-3-D-O-galaktozida dominantan (Boulila i sar., 2015).

### 2.4.3. Fenipropanoidni i feniletanoidni glikozidi

Pojedini fenilpropanoidi, u koje spadaju (E)-kafeoil-L-jabučna kiselina, forzitozid B, akteozid, balotetrozid i arenariozid izolovani su iz nadzemnih delova *M. vulgare* u fazi cvetanja (Saphaz i sar., 2002a; Popa i Pasechnik, 1975). Verbaskozid i forzitozid B su izolovani iz nadzemnih delova *M. vulgare* (Pukalskas i sar., 2012) smešom rastvarača metanol-voda-sirćetna kiselina (79:20:1, v/v/v). Vulgarkozid A, diglikozid diterpena peregrinola, izolovan je iz metanolnog ekstrakta cele biljke *M. vulgare* (Shaheen i sar., 2014). Takođe, feniletanoidni glikozidi marubozid i acetyl-marubozid izolovani su iz nadzemnih delova *M. vulgare* (Saphaz i sar., 2002b).

### 2.4.4. Diterpen marubiin

Više od 54 sekundarna metabolita je izolovano i identifikovano iz različitih delova *M. vulgare*. Među njima, diterpeni, seskviterpeni i flavonoidi se smatraju za dominantne klase jedinjenja, od kojih neke pokazuju potencijalne biološke aktivnosti *in vitro* i *in vivo*. Diterpeni predstavljaju značajnu klasu jedinjenja prisutnih u nadzemnim delovima *M. vulgare*. Do danas je iz *M. vulgare* izolovano i identifikovano devet različitih vrsta diterpena (Slika 3) uključujući i njihove alkoholne derivate (Lodhi i sar., 2017). Najznačajniji sekundarni metabolit ove biljne vrste je marubiin (0,3-1%), furanski labdanski diterpen koji je izolovan po prvi put iz listova *M. vulgare* i smatra se hemotaksonomskim markerom za rod *Marrubium*. Marubiin je poznat kao gorki princip ove biljke i mnogih drugih u okviru porodice *Lamiaceae* (Popoola i sar., 2013).



**Slika 3.** Hemijske strukture najznačajnijih diterpena izolovanih iz *M. vulgare*

Marubiin nastaje kao nusprodukt iz premarubiina tokom procesa ekstrakcije posebno pri višim temperaturama (Yousefi i sar., 2016). Premarubiin, premarubenol i vulgarol su takođe prisutni u herbi *M. vulgare* (Knoss i sar., 1997; Henderson i McCrindle, 1969; Popa i Pasechnik, 1975). Labdanski skelet služi kao prekursor za mnoge diterpene, kao i u biosintezi marubiina koji se sintetiše preko mevalonat-nezavisnog puta. Akumulacija furanskih labdanskih diterpena je ispitana u različitim delovima herbe *M. vulgare* (Knoss i sar., 1997). Dokazano je da se furanski labdanski diterpeni proizvode i akumuliraju isključivo u nadzemnim delovima biljke i to većinom u listovima i cvetovima, dok maksimalno nakupljanje nastaje u zrelih listovima neposredno pre cvetanja (Piccoli i Bottini, 2008).



## 2.5. Biološka aktivnost

### 2.5.1. Antioksidativna aktivnost

*M. vulgare* je bogat izvor fenolnih sekundarnih metabolita u kvalitativnom smislu, dok je sadržaj ovih jedinjenja manji od 1% u ukupnom ulju (Weel i sar., 1999). Brojna *in vitro* ispitivanja različitih ekstrakata *M. vulgare* potvrdila su njihov izuzetan antioksidativni potencijal, koji se ogleda u sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, uključujući ABTS i DPPH radikale, sposobnosti redukcije Fe<sup>3+</sup> jona i inhibicije lipidne peroksidacije. U većini studija ovi efekti se pripisuju polifenolnom sastavu *M. vulgare* (VanderJagt i sar., 2002; Berrougui i sar., 2006; Katalinic i sar., 2006; Matkowski i Piotrowska, 2006; Wojdylo i sar., 2007; Dall'Acqua i sar., 2008; Kadri i sar., 2011; Pukalskas i sar., 2012).

Različiti autori su ispitali antioksidativni kapacitet etarskog ulja (Abadi i Abdellatif, 2013; Kadri i sar., 2011) i ekstrakata *M. vulgare* dobijenih konvencionalnim metodama ekstrakcije sa različitim rastvaračima kao što su voda (Weel i sar., 1999; Berrougui i sar., 2006; VanderJagt i sar., 2002), metanol (Pukalskas i sar., 2012; Berrougui i sar., 2006), aceton (Weel i sar., 1999) i sirćetna kiselina (Pukalskas i sar., 2012). Utvrđen je protektivni efekat 40% metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *M. vulgare* na kardiovaskularne bolesti. Protektivni efekat se ogleda u sposobnosti ekstrakta da štiti lipoproteine niske gustine (LDL) od lipidne peroksidacije, i na taj način smanjuje rizik od pojave kardiovaskularnih bolesti, kao i da stimuliše povratni transport holesterola, posredstvom lipoproteina visoke gustine (HDL), u humanim THP-1 makrofagima (eng. *Tamm-Horsfall Protein-1*; humana monocitna ćelijska linija uzeta od pacijenta sa akutnom monocitnom leukemijom) (Berrougui i sar., 2006).

Metanolni ekstrakt listova *M. vulgare* je pokazao značajan antioksidativni potencijal prema DPPH (IC<sub>50</sub> = 35 µg/mL) i ABTS (IC<sub>50</sub> = 25 µg/mL) radikalima. Antioksidativna aktivnost acetatnih i vodenih ekstrakata dobijenih iz listova *M. vulgare* je testirana u ulju uljane repice (*Brassica napus* L.) na temperaturi od 80 °C (Weel i sar., 1999). Acetatni ekstrakt se pokazao kao potentniji u odnosu na vodeni ekstrakt *M. vulgare*. U drugoj studiji, antioksidativna aktivnost vodenih ekstrakata *M. vulgare* je određivana pomoću dvostepenog Trolox testa koji je pokazao značajan antioksidativni potencijal (VanderJagt i sar., 2002).

Antioksidativni potencijal etarskog ulja *M. vulgare* je ispitan *in vitro* pomoću nekoliko testova među kojima su sposobnost hvatanja slobodnih radikala (DPPH test), test izbeljivanja β-karotena i ukupni redukcionni kapacitet (FRAP test) (Kadri i sar., 2011). Ova ispitivanja su takođe ukazala na značajnu razliku u hemijskom sastavu etarskog ulja *M. vulgare* u zavisnosti od geografskog porekla. Autori studije su zaključili da antioksidativni potencijal etarskog ulja *M. vulgare* potiče od

jedinjenja sa hidroksilnim grupama i mogućeg sinergističkog delovanja sa jedinjenjima koja sadrže kiseonik. DPPH test je pokazao da etarsko ulje *M. vulgare* ispoljava značajnu antioksidativnu aktivnost *in vitro*, koja je dvostruko veća od sintetskog antioksidansa (butil-hidroksitoluen; BHT). Rezultati testa izbeljivanja  $\beta$ -karotena su potvrdili da je antioksidativni kapacitet etarskog ulja *M. vulgare* uporediv sa BHT. Ukupni redukcionni kapacitet etarskog ulja *M. vulgare* je znatno niži u odnosu na BHT pri istoj koncentraciji. Abadi i sar. (2013) su takođe ispitali antioksidativni status etarskog ulja *M. vulgare* određivanjem sposobnosti heliranja jona prelaznih metala i sposobnosti hvatanja DPPH radikala. Rezultati su pokazali da je antioksidativni potencijal etarskog ulja niži od sintetskog antioksidansa butil-hidroksianizola (BHA).

Pukalskas i sar. (2012) su ispitali antioksidativnu aktivnost izolovanih jedinjenja (5,6-dihidroksi-7,4-O-dimetoksiflavon, 7-O- $\beta$ -glukopiranozil luteolin, 7-O- $\beta$ -glukuronil luteolin, verbaskozid i forzitozid B) u odnosu na rozmarinsku kiselinu pomoću sledećih testova: sposobnost neutralizacije stabilnih DPPH i ABTS radikala. Delovanje verbaskozida i fortizida B se pokazalo slično delovanju rozmarinske kiseline prilikom ispitivanja sposobnosti hvatanja ABTS, moguće usled prisustva sličnog aglikonskog dela molekula. Sličnu antioksidativnu aktivnost prema ABTS pokazali su luteolin glikozidi, dok je 7-O- $\beta$ -glukuronil luteolin ispoljio veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na svoj glukopiranozil analog. Ova činjenica ukazuje na to da i šećerna komponenta može uticati na biološku aktivnost jedinjenja. Martin-Nizard i sar. (2003) su ispitali protektivni efekat četiri fenilpropanoidna glikozida (verbaskozid, forzitozid B, arenariozid i balotetrozid) i neglikozidnog derivata (kafeoil-jabučna kiselina), izolovanih iz nadzemnih delova *M. vulgare*, prema citotoksičnosti izazvanoj oksidovanim LDL proteinima. Ova jedinjenja inhibiraju Cu-indukovanu LDL oksidaciju i štite morfološke apekte ćelija tokom njihove inkubacije sa oksidovanim LDL.

### 2.5.2. Antimikrobna aktivnost

Uprkos dostupnosti antibiotika širokog spektra delovanja, njihova neracionalna primena dovela je do pojave rezistentnosti pojedinih bakterijskih sojeva. Upravo zato ispitivanje antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata predstavlja nezamenjiv korak njihove karakterizacije. Posebno je neophodno ispitati prirodne proizvode, jer postoje podaci da su bogat izvor antimikrobnih agenasa niske toksičnosti, širokog spektra delovanja i zadovoljavajuće farmakokinetike (Cushnie i sar., 2003).

Keles i sar. (2001) su ispitali antibakterijsku aktivnost etanolnog ekstrakta *M. vulgare* na sledeće bakterijske sojeve: *Salmonella enteritis*, *Salmonella gallinarum*, *Streptococcus dysgalatae*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* i *Escherchia coli*. Dokazana je antimikrobna aktivnost na rast *K. pneumoniae* i *S. aureus*. Al-Bakri i Afifi, (2007) su takođe ispitali antimikrobno delovanje etanolnog ekstrakta *M. vulgare*, uz pomoć brze XTT kolorimetrije i metode brojanja bakterija. Ekstrakt je ispoljio antimikrobno dejstvo na bakterije *B. subtilis* i *S. aureus*. Drugi

autori su ispitali antimikrobnu aktivnost metanolnog ekstrakta *M. vulgare* disk-difuzionom metodom. Rezultati *in vitro* ispitivanja antimikrobne aktivnosti su pokazali da ekstrakt *M. vulgare* ispoljava dozno-zavisnu aktivnost na bakterije *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* i gljivice *Candida albicans*, kao i umereno antimikrobno delovanje na *Proteus vulgaris* i *E. coli* (Kanyonga i sar., 2011). Rezultati druge studije su demonstrirali da metanolni ekstrakt *M. vulgare* pokazuje umerenu antimikrobnu aktivnost prema pet patogenih mikroorganizama: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* i *S. aureus*, *Pseudomonas vulgaris* i *Escherichia coli* (Masoodi i sar., 2008).

Zarai i sar. (2011) su evaluirali antibakterijsku aktivnost etarskih ulja *M. vulgare* prema osam Gram (+) bakterijskih sojeva: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* 25923, *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*, i prema četiri Gram (-) bakterijska soja: *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Klebsiella pneumoniae* WHO24, *Escherichia coli* 25922 i *Salmonella*. Dobijeni rezultati su pokazali značajnu aktivnost prema Gram (+) bakterijama, a u slučaju Gram (-) bakterija slabije delovanje. Etarsko ulje *M. vulgare* je inhibiralo rast bakterijskih sojeva stvarajući zonu inhibicije prečnika od 6,6 do 25,2 mm, sa  $IC_{50}$  vrednostima 560 - 1100  $\mu\text{g/mL}$  i vrednostima minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) 1120 - 2600  $\mu\text{g/mL}$ . Najsnažnije antibakterijsko delovanje je ispoljeno prema *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* 25923, dok je najslabije delovanje primećeno kod *Bacillus cereus* i *Enterococcus faecalis*. Autori ove studije aktivnosti etarskog ulja *M. vulgare* pripisuju njegovom sastavu, posebno visokom sadržaju jedinjenja sa kiseonikom (46,21%), a najveću osetljivost sojeva *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* njihovoj strukturi ćelijskog zida i spoljne membrane.

Buzayan i sar. (2012) su ispitali antimikrobno delovanje vodenih ekstrakata *M. vulgare* (droga sakupljena sa dva lokaliteta, Sirija i Libija) prema *Mycobacterium tuberculosis*. Vodeni ekstrakt *M. vulgare* iz Sirije je pokazao značajnu, koncentracijski zavisnu antimikrobnu aktivnost koja se manifestovala smanjenjem stepena bakterijskog rasta. Sa povećanjem koncentracije ekstrakta od 400 do 3200  $\mu\text{L}$  povećavala se i njihova antimikrobna aktivnost. Ekstrakt *M. vulgare* iz Libije je takođe pokazao antimikrobnu aktivnost pri većim koncentracijama.

*Klebsiella pneumoniae* su oportunističke patogene bakterije povezane sa nosokomialnim infekcijama, pri čemu su mnogi sojevi razvili otpornost na trenutno dostupne antibiotike. Zbog toga su pojedini autori ispitali potencijalni antibakterijski efekat etarskih ulja *M. vulgare* prema 30 sojeva *K. pneumoniae* izolovanih iz kulture urina hospitalizovanih pacijenata. Rezultati su pokazali da je *K. pneumoniae* rezistentna na tri testirana antibiotika, a da etarsko ulje ima preventivan efekat na većinu izolata. MIC vrednosti variraju u intervalu od 1,25 do 5  $\text{mg/mL}$ , i pripisuju se hemijskom sastavu etarskog ulja u kojem dominiraju  $\gamma$ -eudezmol (11%), germakren (10%) i  $\beta$ -citronelol (8%). Prema ovoj studiji, ne postoji korelacija između koncentracije etarskog ulja i MIC vrednosti, dok minimalna

baktericidna koncentracija (MBC) pokazuje direktnu zavisnost od upotrebljene koncentracije etarskog ulja (Dehbashi i sar., 2015). Bokaeian i sar. (2014) su ispitali *in vitro* antibakterijsko delovanje etarskog ulja *M. vulgare* prema 17 sojeva *Staphylococcus aureus*. MIC i MBC za etarsko ulje *M. vulgare* su određene mikrodilucionom metodom. Rezultati su pokazali da etarsko ulje i etanolni ekstrakti *M. vulgare* imaju inhibitoran efekat na većinu prirodnih izolata. U slučaju etanolnog ekstrakta *M. vulgare*, najmanja MIC vrednost je 2,5 mg/mL, a najveća MBC vrednost 5 mg/mL. U slučaju etarskog ulja *M. vulgare*, najmanja MIC vrednost je 0,3 mg/mL, a najveća MBC je 5 mg/mL. Ramos-Guerra i sar. (2007) su ispitali *in vitro* antimikrobnu aktivnost acetatnog i metanolnog ekstrakta *M. vulgare* na bakterije *Entamoeba histolytica* i *Giardia lamblia* (uzročnike amebiaza i giardiazia). Ekstrakti su ispoljili izrazito toksično delovanje na *E. histolytica* i blago toksično delovanje na *G. lamblia*. Robles-Zepeda i sar. (2011) su ispitali antibakterijsko delovanje metanolnog ekstrakta *M. vulgare* na dva soja *Helicobacter pylori* (uzročnika čira na želucu), uz pomoć mikrodilucione metode. Utvrdili su da je koncentracija 200-400 µg/mL metanolnog ekstrakta *M. vulgare* dovoljna za inhibiciju najmanje 50% bakterijskog rasta.

Antifungalno delovanje etarskog ulja *M. vulgare* je ispitano prema četiri soja gljivica: *Botrytis cinerea*, *Fusarium solan*, *Penicillium digitatum* i *Aspergillus niger* disk difuzionom i mikrodilucionom metodom. U ovoj studiji, zone inhibicije se nalaze u intervalu 6,4-12,6 mm, sa IC<sub>50</sub> i MIC vrednostima koje variraju u opsegu od 2190 do 3220 µg/mL i 1100-1190 µg/mL. Maksimalne zone inhibicije su dobijene za *Botrytis cinerea*, dok su minimalne ostvarene za *Penicillium digitatum* i *Aspergillus niger*. Germakren D, dominantni konstituent etarskog ulja *M. vulgare*, poseduje značajne antibakterijske i antifungalne aktivnosti (Zarai i sar., 2011).

### 2.5.3. Antihiperlikemijska aktivnost

α-Glukozidaze su enzimi koji katališu apsorpciju digestirane glukoze iz dijetetskih polisaharida u tankom crevu (Wang i sar., 2012). Inhibicija α-glukozidaze se smatra efikasnom merom za regulisanje dijabetesa tipa II preko kontrole unosa glukoze. Inhibitori α-glukozidaze su danas predmet mnogih naučnih istraživanja usled njihovog obećavajućeg terapijskog potencijala i protiv bolesti kao što su HIV infekcije, kancer i bolesti lizozomalnog skladištenja (Jabeen i sar., 2013). Uprkos ustanovljenoj efikasnosti sintetskih α-glukozidnih inhibitora, neizostavni pridruženi neželjeni efekti nameću potrebu za pronalaskom prirodnih i bezbednijih alternativa. Mnoge studije su već pokazale da unos biljnog materijala bogatog polifenolima uzrokuje antihiperlikemijske efekte kod ljudi i životinja, pretpostavlja se putem inhibicije α-glukozidaze i/ili α-amilaze (Hogan i sar., 2010).

Alarcon-Aguilara i sar. (1998) su ispitali hipoglikemijski efekat vodenog ekstrakta *M. vulgare* na modelu zdravih zečeva sa želudačnom administracijom ekstrakta i tolbutamida (oralni hipoglikemijski lek korišćen kao pozitivna kontrola). Ustanovljeno je da ekstrakt i tolbutamid

značajno smanjuju hiperglikemiju (30,4%). Delovanje ekstrakta se statistički ne razlikuje od delovanja tolbutamida. Slične rezultate su objavili i autori drugih studija. Boudjelal i sar. (2012) su sproveli seriju *in vivo* eksperimenata na pacovima, ispitujući antidijabetički efekat vodenih ekstrakata *M. vulgare*. Dijabetes je indukovao kod pacova intraperitonealnom injekcijom aloksana. Dokazano je da kod pacova tretiranih vodenim ekstraktima *M. vulgare* dolazi do najvećeg smanjenja nivoa glukoze u krvi, što je uporedivo sa efektom glibenklamida. Pacovi sa aloksan-indukovanim dijabetesom su tretirani sa vodenim ekstraktom *M. vulgare*. Oralne doze od 100, 200 i 300 mg/kg telesne mase su administrirane dva puta dnevno tokom 15 dana. Od petog dana, zabeleženo je značajno smanjenje glukoze u krvi za sve oralne doze u poređenju sa dijabetičkom kontrolom ( $p < 0,001$ ). Dozno-zavisno smanjenje glikemije bilo je 50,75%, 61,06% i 62,55%. Povećani nivoi glukoze u krvi, zatim ukupnih lipida, triglicerida i ukupnog holesterola kod dijabetičkih pacova su značajno smanjeni dodatkom ekstrakta i rezultati su uporedivi sa glibenklamidom.

Novaes i sar. (2001) su ispitali *in vivo* hipoglikemijski efekat etanolnog ekstrakta *M. vulgare*. Dijabetes je indukovao kod pacova intraperitonealnom injekcijom aloksana. Autori ukazuju na vezu između sekundarnih metabolita *M. vulgare* (dominantni identifikovani metaboliti su fitosterol,  $\beta$ -sitosterol i marubiin) i hipoglikemijskog delovanja. Sledeća *in vivo* studija, sprovedena na pacovima obolelim od dijabetesa, je pokazala značajno smanjenje nivoa glukoze u krvi nakon 28 dana od apliciranja ekstrakta *M. vulgare*. Etanolni ekstrakt je administriran kroz dnevnu dozu od 500 mg/kg telesne mase u trajanju od 28 dana kod muških pacova. Tretman je započet 11 dana nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom. Nivoi glukoze u krvi su značajno redukovani nakon 14, 21 i 28 dana u poređenju sa dijabetičkom kontrolom, čak za nijansu bolje od grupe pacova tretiranih glibenklamidom. Plazma insulin, kao i glikogen u mišićima i jetri su značajno povećani nakon 28 dana tretmana u poređenju sa dijabetičkom kontrolom. Zabeleženi su pozitivni efekti na plazma lipidni profil nakon tretmana ekstraktom *M. vulgare*: za 24% smanjen ukupni holesterol, za 27% smanjen LDL holesterol i za 27% povećan HDL holesterol. Tretman je poboljšao aktivnost enzima jetre i gotovo normalizovao glutation peroksidazu, glutation reduktazu, glutation-S-transferazu, takođe redukovao nivo glutationa i malondialdehida ( $p < 0,05$ ) (Elberry i sar., 2015). Herrera-Arellano i sar. (2004) su sproveli kliničko ispitivanje u koje je uključen 21 pacijent. Rezultati su pokazali da ekstrakt listova *M. vulgare* smanjuje nivo glukoze (0,64%), holesterola (4,16%) i triglicerida (5,78%). Manje značajan hipoglikemijski efekat primećen je kod pacova na koje je primenjen predtretman etanolnim suvim ekstraktom listova *M. vulgare* u pojedinačnoj oralnoj dozi od 100 mg/kg telesne mase primljenoj 30 min nakon opterećenja glukozom od 2 g/kg (Vergara-Galicia, 2012).

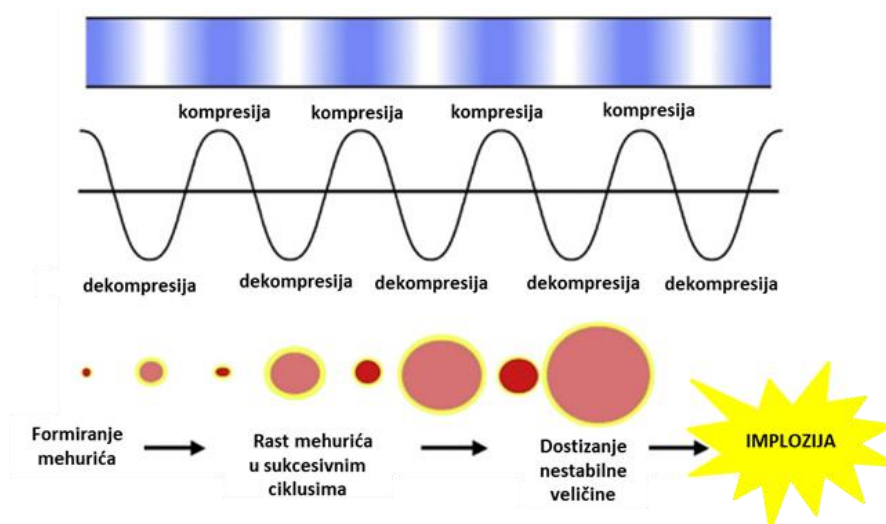
## 2.6. Savremene metode ekstrakcije

Danas je za ekstrakciju i izolaciju funkcionalnih jedinjenja dostupan širok spektar čvrsto-tečno ekstrakcionih postupaka (Galanakis, 2012), tako da je gotovo nemoguće pronaći proizvodnu liniju u prehrambenoj, farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji koja ne upotrebljava neki od klasičnih postupaka ekstrakcije (maceracija, digestija, Soxhlet ekstrakcija, itd.). Međutim, konvencionalni postupci ekstrakcije podrazumevaju nedostatke kao što su niska efikasnost procesa, veliki utrošak energije i vremena, upotreba toksičnih rastvarača, termička degradacija jedinjenja, negativan uticaj na životnu sredinu i proizvodnja ekstrakata neodgovarajućeg kvaliteta (Alonso-Salces i sar., 2001; Dai i Mumper, 2010; Ince i sar., 2013). Uz sve veće troškove energije i težnju ka redukciji emisije gasova sa efektom staklene bašte, hemijskim industrijama je postavljen zadatak da pronađu inovativne tehnologije kako bi se smanjila potrošnja energije i zadovoljile zakonske regulative za emisije, bezbednost/kontrolu proizvoda i tehnološkog postupka, i generalno smanjili troškovi, a povećao kvalitet i ekonomska dobit (Chemat i sar., 2017).

Glavni ciljevi savremenih metoda ekstrakcije su maksimizacija prinosa željenih jedinjenja bez ili sa minimalnim uticajem na njihove karakteristike i istovremena minimalizacija ekstrakcije nepoželjnih jedinjenja. Upotreba toksičnih hlorovanih (hloroform, ugljen tetrahlorid, tetrahlor etilen) i ne-hlorovanih (acetone, metanol, acetonitril) rastvarača je uobičajena za konvencionalne postupke ekstrakcije, pri čemu oni zaostaju u ekstraktu (Tiwari, 2015). Implementacija procesa bez rastvarača se nameće kao idealno rešenje. Međutim, rastvarači su neizbežni usled svoje ključne uloge u rastvaranju čvrste faze, prenosu mase i toplote, kao i kod operacija separacije i prečišćavanja. Zbog toga se teži upotrebi zelenih rastvarača, pre svega vode, koji nisu štetni po okolinu. Voda se već koristi u industrijskim postrojenjima, uglavnom kod procesa polimerizacije u emulzijama i kod hidrodestilacije. Uprkos tome, mala selektivnost vode i visoki energetska zahtevi za njeno uklanjanje limitiraju njenu širu upotrebu i usmeravaju ka razmatranju alternativnih "zelenih" rastvarača (Sheldon, 2005). U cilju prevazilaženja ovih nedostataka i unapređenja postojećih tehnika ekstrakcije razvijene su savremene metode ekstrakcije koje obuhvataju ultrazvučnu ekstrakciju, mikrotalasnu ekstrakciju, ekstrakciju fluidima u superkritičnom stanju i ekstrakciju subkritičnom vodom. Ove nove tehnike nude ogroman potencijal da se smanji ili eliminiše upotreba toksičnih organskih rastvarača, istovremeno povećavajući prinos ekstrakcije i kvalitet ekstrakta. One su takođe poznate kao "hladne" ekstrakcione tehnike, jer je temperatura tokom procesa ekstrakcije relativno niska i ne utiče na stabilnost ekstrahovanih jedinjenja.

### 2.6.1. Ultrazvučna ekstrakcija (UAE)

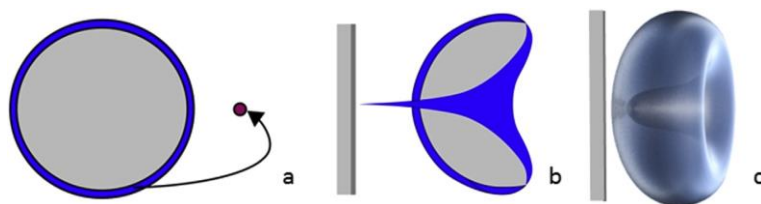
U poslednje dve decenije dolazi do ekspanzije upotrebe ultrazvučnih talasa, frekvencije od 20 kHz do 10 MHz, u hemijskoj i prehrambenoj industriji. Ultrazvučna ekstrakcija (eng. *ultrasound assisted extraction*; UAE) je ključna tehnologija za postizanje principa održive zelene ekstrakcije. Za ultrazvuk je poznato da ima značajan efekat na brzinu različitih procesa u hemijskoj i prehrambenoj industriji. Korišćenjem ultrazvuka, ekstrakcije su reproduktibilne, traju svega nekoliko minuta i rezultiraju redukovanom potrošnjom rastvarača obezbeđujući veće prinose ekstrakta većeg stepena čistoće, eliminišući post-tretman efluenta i pritom trošeći samo deo energije potrebne za neki od konvencionalnih postupaka ekstrakcije uz jednostavnu manipulaciju (Chemat i sar., 2017). Ultrazvuk se može koristiti kao predtretman ili tokom same ekstrakcije različitih molekula i biomaterijala, uključujući polisaharide, etarska ulja, proteine, peptide i pigmente, i bioaktivne molekule od komercijalnog interesa (Tiwari, 2015).



**Slika 4.** Mehanizam formiranja i implozije mehurića vazduha prilikom ultrazvučne kavitacije (Vinatoru i sar., 2017)

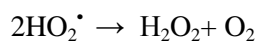
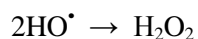
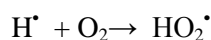
Akustična kavitacija predstavlja glavnu pogonsku silu u ultrazvučnoj ekstrakciji. Ultrazvuk nastaje usled serije visoko-pritisnih (kompresija) i nisko-pritisnih (dekompresija) ciklusa talasa indukovanih u molekulima medijuma kroz koji on prolazi. Pri dovoljno velikoj snazi, ciklus dekompresije može nadjačati privlačne sile molekula tečnosti i tada dolazi do formiranja, rasta i implozije mehurića vazduha (Slika 4). Mehurići nastali u homogenoj tečnosti su simetrični i podležu simetričnoj imploziji (Slika 5a) koja vodi ka naglom lokalnom porastu temperature i pritiska (Mason i Peters, 2002). Nagli skok temperature i pritiska na površini biljnog materijala dovodi do oštećenja ćelijskog zida. Razaranjem ćelijskog zida usled mehaničkih efekata ultrazvučne kavitacije formiraju se mikro pukotine i pore na površini zida i na taj način povećava permeabilnost zida. Intraćelijski sadržaj

postaje dostupan rastvaraču olakšavajući oslobađanje i difuziju ciljanih jedinjenja iz čvrste u tečnu fazu. Kada kavitacioni mehurići podležu imploziji u blizini čvrste faze (zid suda ili suspendovan biljni materijal u tečnosti), oni se deformišu usled asimetrične implozije i formira se mlaz velike brzine (> 400 km/h) koji udara u površinu čvrste faze i uklanja čestice sa nje ili uzrokuje njeno razaranje (Slika 5b,c) (Newman i sar., 1996; Lauterborn i Ohl, 1997). Ovo je ujedno i glavni efekat kavitacije koji je neophodno uzeti u obzir prilikom definisanja UAE mehanizama, jer čini ovaj proces izrazito efikasnim.



**Slika 5.** Ilustracija simetrične (a) i asimetrične (b, c) implozije mehurića vazduha (Vinatoru i sar., 2017)

Kavitacioni mehurić ne sadrži vakuum, jer se podvrgava "ispravljenoj" difuziji (ovaj proces uključuje spor rast pulsirajućeg mehurića gasa zbog prosečnog protoka mase u mehurić u zavisnosti od vremena) i može neometano da raste (Crum i Fowlkes, 1986). Pare rastvarača i gasovi (rastvoreni u rastvaraču) koji se nalaze u mehuriću izloženi su ekstremnim uslovima nastalim implozijom. Ako se u mehuriću nalaze pare vode, njegova implozija će dovesti do homolitičkog cepanja molekula vode pri čemu nastaju reaktivni radikali  $\text{HO}^\bullet$  i  $\text{H}^\bullet$  (Schmitt i sar., 1929). Novonastali radikali podležu reakcijama koje vode ka formiranju  $\text{H}_2\text{O}_2$  i drugih aktivnih agenasa (Anbar i Pecht, 1964; Mason i sar., 1999; Makino i sar., 1983; Riesz i sar., 1985):



Iako je količina ovako nastalih oksidacionih agenasa mala, moguće je da izazovu degradaciju ekstrakta ukoliko sonifikacija traje duži vremenski period. Kada se smeše vode i etanola koriste kao ekstragens u ekstrakciji, smanjuje se generisanje reaktivnih oksidacionih agenasa nastalih raspadom molekula vode (Vinatoru i sar., 2017). Razlog tome je što tokom rasta kavitacionih mehurića u voda-etanol smeši, usled "ispravljene difuzije", ne ulazi samo voda u mehurić već i etanol koji je stabilniji u pogledu homolitičkog raspada.



## 2.6.2. Parametri koji utiču na UAE

Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitaciju zavisi od osobina samog zračenja (frekvencija i snaga), osobina rastvarača (viskoznost i površinski napon) i ambijentalnih uslova (temperatura i pritisak) (Henglein i Kormann, 1985). S obzirom na to da je ultrazvuk mehanički talas, njegove karakteristike mogu uticati na akustičnu kavitaciju, a samim tim i na proces ekstrakcije. Fizički parametri kao što su dizajn (oblik i veličina) ultrazvučnih reaktora i oblik ultrazvučne sonde takođe utiču na proces (Pingret i sar., 2013). Izbor rastvarača, odnos droga/rastvarač, temperatura i vreme ekstrakcije su parametri čiji je uticaj na prinos ekstrakcije, kao i na prinos određenih bioaktivnih jedinjenja, temeljno ispitano kroz brojne studije (Wang i sar., 2007; Hosseini i sar., 2016; Ramić i sar., 2015; Tomšik i sar., 2016).

### (1) Snaga i frekvencija

Iako su dostupne fizičke metode koje omogućavaju direktno ili indirektno merenje realne vrednosti snage ultrazvuka, ovaj podatak je često izostavljen iz naučnih publikacija. Uticaj snage i frekvencije ultrazvučnih talasa na prinos ekstrakcije i fenomene prenosa nije jednostavno izmeriti. Većina metoda se zasniva na aproksimaciji transfera energije mereći fizičke ili hemijske promene u medijumu kroz koji ultrazvuk prolazi. Najčešće, fizičke metode su zapravo merenje akustičnog pritiska pomoću hidrofona ili optičkih mikroskopa, metode sa Al folijom i kalorimetrijske metode (Chivate i Pandit, 1995; Margulis i Margulis, 2004; Martin i Law, 1983). Među hemijskim metodama, najčešće se koriste indirektno merenje  $\text{OH}^{\bullet}$  radikala formiranih sonoluminiscencijom i merenje hemijskim dozimetrima (Makino i sar., 1983; Suslick i sar., 2011).

Nekoliko studija opisuje da visoka ultrazvučna snaga uzrokuje drastične promene u ispitivanim materijalima (Bermudez-Aguirre i sar., 2011), dok druge insistiraju na tome da varijacija snage rezultira povećanjem selektivnosti prema ciljanim molekulima (Chemat i sar., 2004; Wei i sar., 2010). Najčešće korišćene frekvencije u UAE procesima se kreću u opsegu od 20 do 100 kHz. Upotreba viših frekvencija u UAE je ispitana u tek nekoliko studija. Toma i sar. (2001) su zabeležili redukovani fizički uticaj na strukturu biljne sirovine kada su aplicirali visoke frekvencije (500 kHz) u poređenju sa niskim (20 kHz), dok su Chukwumah i sar. (2009) detektovali različiti hemijski sastav ekstrakata dobijenih na različitim frekvencijama (25 i 80 kHz). Na nižim frekvencijama (20-40 kHz) mehanički efekti su dominantni uključujući pojačano mešanje, smanjenje veličine čestica i penetraciju rastvarača. Smatra se da ovi mehanički efekti utiču na teksturu biljnog materijala i predstavljaju procese koji stoje iza poboljšanih ekstrakcionih sposobnosti ultrazvuka kroz formiranje mikromlazova usled neravnomernog kavitacijskog kolapsa u blizini čvrste površine. Na višim frekvencijama (> 200 kHz) kraći vek kavitacionog mehurića rezultira oslobađanjem radikala, koji se nalaze unutar mehurića,

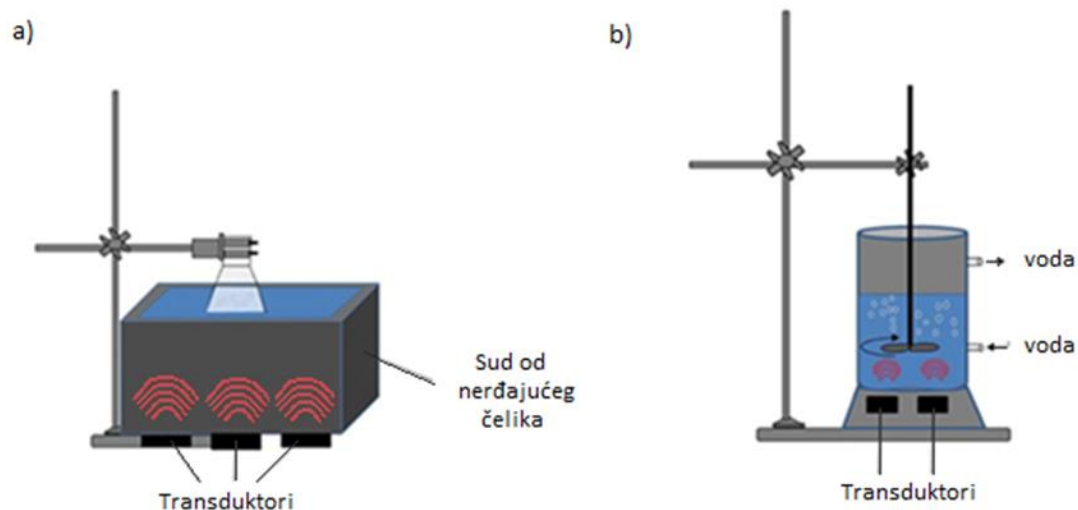
u okolnu sredinu pri čemu dominiraju hemijski efekti, naročito na frekvencijama bliskim 850 kHz. Ovde radikali utiču na biljni materijal tako što pojačavaju oksidativne procese, koji mogu biti korisni ili štetni za antioksidativna svojstva (Paniwnyk, 2017).

## (2) Intenzitet

Ultrazvučni intenzitet (UI) se izražava kao transmitovana energija u sekundi po metru kvadratnom emitujuće površine. Prema UI, ultrazvuk se može klasifikovati u dve vrste sonifikacije: sonifikacija niskog intenziteta ( $< 1 \text{ W/cm}^2$ ) i visokog intenziteta ( $10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$ ) (Tiwari, 2015). Ovaj parametar je u direktnoj korelaciji sa amplitudom emitera ultrazvuka i posledično sa amplitudom pritiska zvučnog talasa (Santos i Capelo, 2007). Sa povećanjem pritiska amplitude, implozija mehurića je intenzivnija. Da bi se dostigao prag kavitacije neophodan je minimalan ultrazvučni intenzitet. Sa aspekta ekstrakcije, UI predstavlja relevantnu ulaznu vrednost koja značajno utiče na njenu efikasnost (Tiwari, 2015). Povećanje UI ima za posledicu povećanje sonochemijskih efekata (Mason i Lorimer, 2002). Kako je povećanje amplitude direktno proporcionalno sa UI, potrebno je naglasiti da visoke amplitude vode ka brzom propadanju emitera ultrazvuka, što za posledicu ima agitaciju umesto kavitacije tečnosti i slabu transmisiju ultrazvuka kroz tečni medijum. Međutim, amplituda treba da je povećana kada se koriste izrazito viskozne tečnosti kao što su ulja (Santos i Capelo, 2007).

## (3) Dizajn (oblik i veličina) ultrazvučnih reaktora

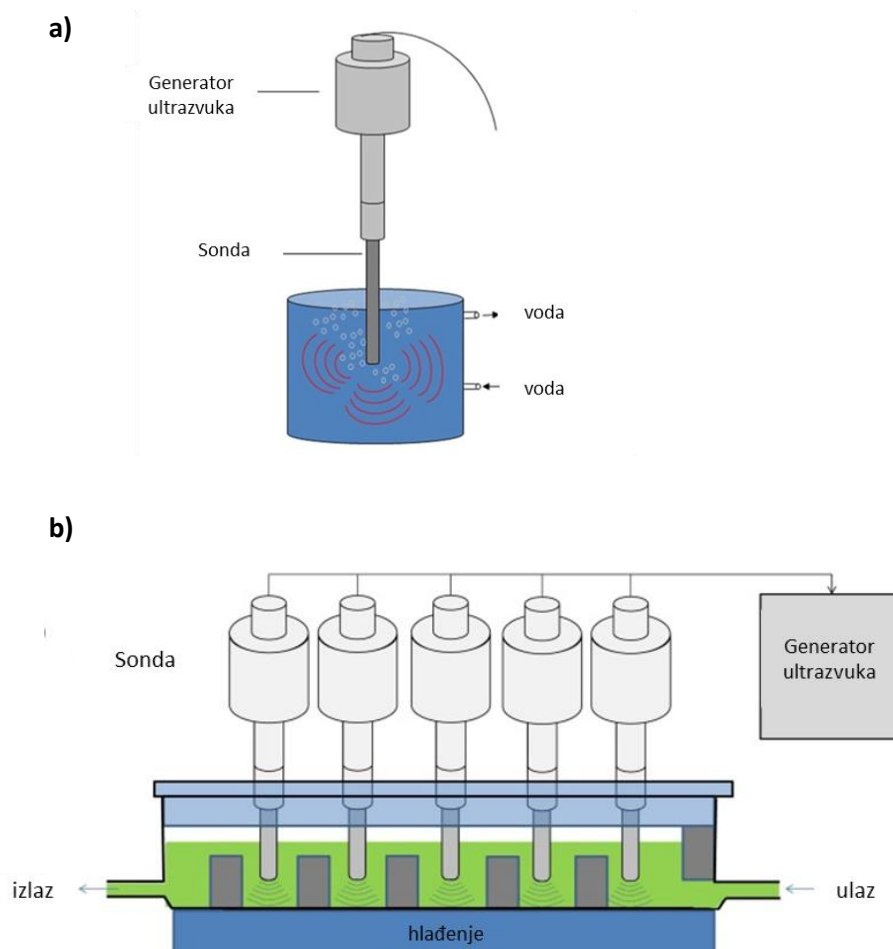
Postoje relevantni naučni dokazi koji potkrepljuju pogodnost ultrazvučnog sistema za intenzifikaciju ekstrakcije za kraće vreme, u poređenju sa trajanjem konvencionalne čvrsto-tečne ekstrakcije, koristeći čiste "zelene" rastvarače. Kako bi se u potpunosti iskoristio potencijal ultrazvučne tehnologije, neophodno je optimizovati procesne parametre. Primarni parametri na koje treba obratiti pažnju prilikom upotrebe ultrazvučnog sistema su ultrazvučna snaga, ultrazvučni intenzitet i gustina akustične energije jer se odnose na ulaznu vrednost energije u sistem. Danas su u upotrebi dva tipa uređaja, ultrazvučno kupatilo (Slika 6a) i ekstraktor sa ultrazvučnom sondom (Slika 6b), komercijalno dostupna za ekstrakcione procese na različitim frekvencijama. Oba uređaja se zasnivaju na upotrebi transduktora za generisanje ultrazvuka (Vinatoru i sar., 1997).



**Slika 6.** Šematski prikaz a) ultrazvučnog kupatila i b) ultrazvučnog ekstraktora sa mešalicom (Strieder i sar., 2019; Vinatoru i sar., 1997)

Postoje dve vrste transduktora koje se najčešće koriste u ultrazvučnoj tehnologiji, piezoelektrični i magnetostruktivni. Pozicioniranje transduktora ima vitalnu ulogu u određivanju efikasnosti ekstrakcije, intenzifikacije procesa i gubitaka energije. Transduktori mogu biti postavljeni sa obe strane ekstrakcione posude, tako da se ultrazvučni talasi prenose kroz spoljašnji zid posude. Glavna prednost ovakvog pozicioniranja transduktora je što nisu u direktnom kontaktu sa uzorkom, mada se javljaju gubici akustične energije na zidove posude i okruženje. Višestruki transduktori se koriste kod protočnih ekstrakcionih sistema većih razmera i kod kontinualnih ekstrakcionih sistema. Kada su transduktori u direktnom kontaktu sa uzorkom u odgovarajućem rastvaraču, ekstrakciona efikasnost je povećana, dok su gubici akustične energije minimizirani (Vinatoru i sar., 1997). U poslednje vreme upotreba ultrazvučnih kupatila je potisnuta frekventnijom upotrebom ekstraktora sa ultrazvučnom sondom (Slika 7a) koji obezbeđuju efikasniju ekstrakciju u kontekstu većih prinosa za kraće vreme. Vrsta i zapremina ispitivanog materijala su dva ključna faktora koja determinišu izbor oblika ultrazvučne sonde. Postoji nekoliko različitih oblika sonde, gde spadaju uniformni i eksponencijalni cilindar, i konus, koji može biti linearan ili stepenast. Prilikom odabira sonde visokog intenziteta, koje mogu zagrejati medijum do 85 °C, neophodno je povesti računa o temperaturnoj osetljivosti ciljanih jedinjenja, kao i o zapaljivosti rastvarača (Chemat i sar., 2017).

U zavisnosti od vrste ekstraktora razlikuju se diskontinualni i kontinualni sistemi (7a i 7b). Kontinualni sonoreaktor sa više redno vezanih sondi može da radi u neprekidnom i pulsnom režimu. Autori su ispitivali uticaj ova dva režima rada na prinos ekstrakcije i antioksidativnu aktivnost osušene kore nara. Konstatovali su da je UAE proces u pulsnom režimu rada superiorniji usled manjeg energetskog utroška, značajne redukcije vremena ekstrakcije i povećanja prinosa ekstrakcije i antioksidativne aktivnosti (Pan i sar., 2012).



**Slika 7.** Šematski prikaz a) ultrazvučne sonde i b) kontinualne sonifikacije sa ultrazvučnom sondom (Tiwari, 2015)

#### (4) Rastvarač

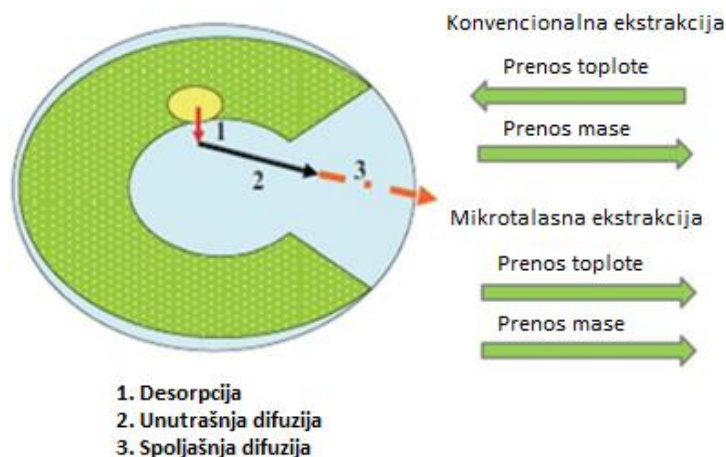
Selekcija rastvarača u UAE procesu je determinisana rastvorljivošću ciljanih metabolita, ali isto tako i fizičkim parametrima poput viskoziteta, površinskog napona i napona pare rastvarača. Navedeni fizički parametri utiču na fenomen akustične kavitacije, a posebno na prag kavitacije (Mason i Lorimer, 2002). Iniciranje kavitacije u tečnosti zahteva da negativan pritisak tokom ciklusa dekompresije nadjača privlačne sile između molekula tečnosti. Porast viskoziteta ili površinskog napona indukuje povećanje ovih molekularnih interakcija, stoga se značajno povećava prag kavitacije. Na ovaj način, kada su predmet ispitivanja viskoziji uzorci treba povećati amplitudu kako bi se obezbedile neophodne mehaničke vibracije koje uzrokuju kavitaciju. Za UAE procese, preporučuje se rastvarač sa manjim vrednostima napona pare, jer je implozija mehurića intenzivnija u poređenju sa rastvaračima većih vrednosti napona pare (Flannigan i Suslick, 2010).

## (5) Temperatura

Temperatura direktno utiče na karakteristike rastvarača. Porast temperature uzrokuje smanjenje viskoziteta i površinskog napona, a istovremeno povećanje napona pare, pri čemu pare rastvarača u većoj meri ulaze u unutrašnjost mehurića koji će implodirati manje burno i tako smanjiti efekte sonifikacije (Santos i Capelo, 2007). Stoga su sonohemijski efekti favorizovani na nižim temperaturama, čija kontrola se sprovodi sa ciljem da se limitira njen porast (Sališová i sar., 1997). Sa aspekta ekstrakcije, temperatura uglavnom doprinosi njenoj efikasnosti utičući na porast prinosa. U slučaju UAE, neki autori ističu pozitivan efekat temperaturnog rasta od 20 do 70 °C u poređenju sa konvencionalnim ekstrakcijama (Shirsath i sar., 2012). Ovaj efekat se objašnjava porastom broja kavitacionih mehurića, većom čvrsto-tečno kontaktnom površinom, poboljšanom difuzijom rastvarača sa porastom desorpcije i rastvorljivosti jedinjenja. Međutim, ovaj efekat je umanjen kada je temperatura bliska temperaturi ključanja rastvarača, te stoga postoje autori koji sugerišu pozitivan uticaj niske temperature (ispod 30 °C) na UAE proces (Esclapez i sar., 2011; Palma i Barroso, 2002; Zhang i sar., 2008).

### 2.6.3. Mikrotalasna ekstrakcija (MAE)

Mikrotalasi su nejonizujući elektromagnetni talasi frekvencije od 300 MHz do 300 GHz, pozicionirani između rendgenskih i infracrvenih talasa u elektromagnetnom spektru (Letellier i Budzinski, 1999). Mikrotalasna ekstrakcija (eng. *microwave assisted extraction*; MAE) se zasniva na lokalizovanom, dielektričnom zagrevanju vode prisutne u svim prirodnim materijalima, a posebno u biljnom. Nasuprot prenosu toplote kod konvencionalnih postupaka ekstrakcije, koji zavise od fenomena kondukcije/konvekcije, kod MAE procesa maseni i toplotni gradijenti su jednako usmereni (iznutra prema spolja), obezbeđujući brzo zagrevanje unutar čvrste faze gde se odvija rastvaranje konstituenata (Slika 8) (Ciriminna i sar, 2016). Princip zagrevanja mikrotalasima se zasniva na dva fenomena: jonskoj kondukciji i rotaciji dipola. Jonska kondukcija predstavlja elektroforetsku migraciju jona pod uticajem promena električnog polja. Do jonske kondukcije dolazi jer migracijom jona u rastvoru usled delovanja elektromagnetnog polja dolazi do otpora i trenja, što dalje dovodi do zagrevanja (Chemat i Cravotto, 2012). Prilikom rotacije dipola, toplota se generiše usled trenja između molekula koji rotiraju. Ova dva mehanizma ukazuju na to da se samo dielektrični rastvarači sa permanentnim dipolima mogu zagrevati mikrotalasima. Efikasnost zagrevanja rastvarača mikrotalasima zavisi od faktora disipacije, koji je mera sposobnosti rastvarača da apsorbuje mikrotalasnu energiju i prenese je u vidu toplote na molekule u okruženju (Zuloaga i sar., 1999).



**Slika 8.** Mehanizam prenosa mase i toplote pri konvencionalnoj i mikrotalasnoj ekstrakciji (Kusuma i Mahfud, 2016)

#### 2.6.4. Parametri koji utiču na MAE

##### (1) Rastvarač

Pravilan izbor rastvarača je od suštinske važnosti za optimizaciju procesa mikrotalasne ekstrakcije. Izbor rastvarača je diktiran rastvorljivošću ciljanog analita, interakcijom između rastvarača i biljnog matriksa, i naposljetku apsorbujućim svojstvima rastvarača (Letellier i Budzinski, 1999). Poželjno je da rastvarač ima visoku selektivnost prema analitu, isključujući izdvajanje neželjenih komponenti biljnog matriksa. Svojstva rastvarača se mogu modifikovati kombinovanjem različitih rastvarača, što takođe dovodi do različitih selektivnosti rastvarača za različita jedinjenja. Za ekstrakciju termolabilnih jedinjenja može se koristiti kombinacija rastvarača sa relativno nižim dielektričnim svojstvima da se obezbedi da temperatura rastvarača ostane niža da bi ohladila analite oslobođene u rastvarač. U ovom slučaju, mikrotalasna energija deluje povoljno na biljni matriks (Kaufmann i Christen, 2002) što dovodi do efikasnog oslobađanja jedinjenja u rastvarač. U mikrotalasnoj ekstrakciji se mogu koristiti i polarni (Li i sar. 2009; Casazza i sar. 2010) i nepolarni rastvarači (Barnabas i sar., 1995). Benzen, hloroform, etar i etil acetat su uobičajeni rastvarači za ekstrakciju manje polarnih komponenti, dok su aceton, etanol, metanol i voda uobičajeni rastvarači za mikrotalasnu ekstrakciju polarnih jedinjenja (Harborne i sar. 1975; Terigar i sar. 2010; Tsukayama i sar. 2010). Varijacije koncentracije rastvarača takođe utiču na ekstrakciju flavonoida kao što je primećeno u slučaju MAE kvercetina i rutina koristeći različite koncentracije etanola. Ustanovljeno je da se prinos ekstrakcije povećava kada se koncentracija etanola poveća sa 30% na 50% i smanjuje sa daljim razblaživanjem etanola (Zhang i sar., 2008). Postoji mnogo drugih primera koji potvrđuju činjenicu da na efikasnost ekstrakcije utiče vrsta rastvarača koji se koristi za ekstrakciju (Kiss i sar., 2000; Escribano-Bailon i Santos-Buelga, 2003; Song i sar., 2007) zajedno sa različitim nivoima razblaženja dobijenim upotrebom vode (Chan i sar., 2007; Song i sar., 2007). Primećeno je da ne samo

sastav rastvarača, već i pH vrednost rastvarača mogu značajno uticati na različitu efikasnost ekstrakcije (Stalikas, 2007).

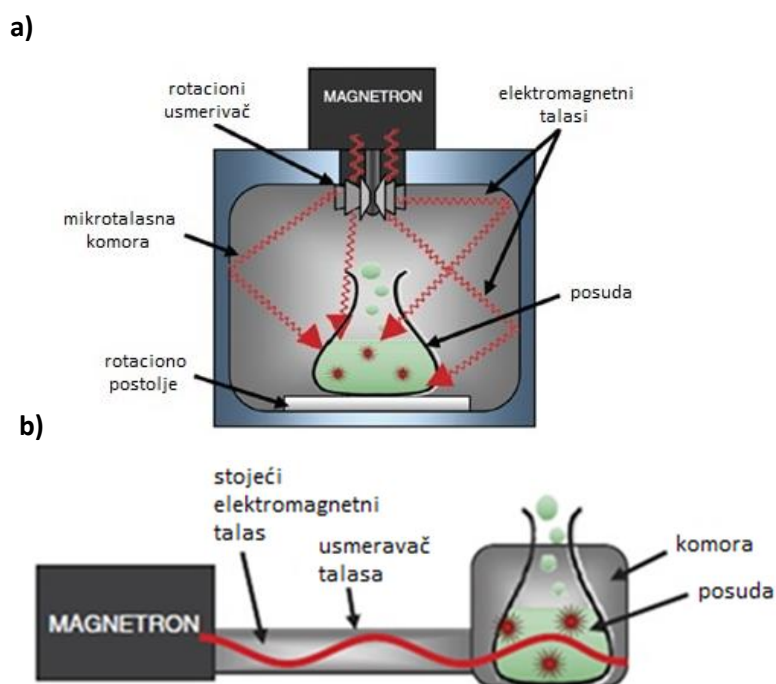
MAE se može izvesti sa istim rastvaračem upotrebljenim za konvencionalnu ekstrakciju, mada izbor rastvarača za MAE ne treba da se vrši po ugledu na rastvarač korišćen u konvencionalnoj proceduri. Mikrotalasna ekstrakcija đumbira uz heksan kao rastvarač dala je manji prinos u odnosu na *Soxhlet* ekstrakciju (Alfaro i sar., 2003). Sa druge strane, upotreba etanola kao ekstragensa u MAE procesu obezbedila je značajno veći prinos u odnosu na *Soxhlet* ekstrakciju etanolom. Ovo se može pripisati razlici u dielektričnim svojstvima rastvarača. Etanol ima dobar apsorbujući kapacitet za mikrotalase i samim tim se brže zagreva i može poboljšati proces ekstrakcije, dok je heksan transparentan za mikrotalase i samim tim se ne zagreva mikrotalasima. Dakle, ustanovljeno je da efikasnost i selektivnost MAE procesa u velikoj meri zavise od dielektrične konstante ( $\epsilon_r$ ) rastvarača. U većini slučajeva upotrebljavaju se smeše rastvarača sa dobrom efikasnošću zagrevanja mikrotalasima, a u tu svrhu služe različite koncentracije etanola i metanola (Talebi i sar., 2004). Među raznim ispitivanim koncentracijama etanola, upotreba 95% etanola pokazala je najbolje rezultate u mikrotalanoj ekstrakciji *Salvia miltiorrhiza* (Pan i sar., 2001). Mala količina vode u ekstragensu može lako da proдре u ćelije biljnog matriksa i time omogućiti bolje zagrevanje matriksa. Ovo zauzvrat povećava prenos mase aktivnih principa u ekstragens. Kao optimalan ekstragens za mikrotalasnu ekstrakciju hlorogenske i genipozidinske kiseline pokazao se 80% metanol (Li i sar., 2004). Takođe, autori drugih studija navode ove rastvarače kao podesne za mikrotalasnu ekstrakciju kumarina, antrahinona i fenolnih jedinjenja (Martino i sar., 2006; Hemwimon i sar., 2007; Chan i sar., 2006; Sterbova i sar., 2004). Ponekad binarne smeše visoko i nisko apsorbujućih rastvarača daju optimalne rezultate. Etanol je relativno dobar apsorber ( $\epsilon_r = 25,7$ ) mikrotalase energije, ali nije adekvatan rastvarač za ekstrakciju solanesola. Međutim, heksan je dobar ekstragens za solanesol, ali nije dobar apsorber mikrotalase energije ( $\epsilon_r = 2,0$ ). Zbog toga smeša heksana i etanola u odnosu 1:3 (v/v) daje najveći prinos solanesola mikrotalasnou ekstrakcijom (Zhou i Liu, 2006). Odnos droga/rastvarač je takođe kritičan faktor. Poznato je da zapremina rastvarača mora biti dovoljna da se obezbedi potpuno uranjanje biljnog materijala tokom celog MAE procesa. Postoji mnogo različitih studija u vezi sa upotrebljenim odnosom droga/rastvarač. Generalno, dok je veći odnos droga/rastvarač efikasan u konvencionalnim metodama ekstrakcije, u MAE procesima može biti uzrok manjih prinosa kao posledica neadekvatnog mešanja rastvarača od strane mikrotalasa (Wang i Weller, 2006). Prilikom ispitivanja uticaja različitih odnosa droga/rastvarač na prinos pektina u MAE procesu (Wang i sar., 2007), utvrđeno je da manji odnos daje veći prinos pektina. Postoje studije koje zastupaju oprečni stav, kao u slučaju mikrotalase ekstrakcije *Aretimisia annua* gde se veći prinos postiže većom zapreminom rastvarača (Hao i sar., 2002).

## (2) Vreme ekstrakcije

Kao i kod drugih tehnika ekstrakcije, vreme je ključni parametar čiji uticaj treba uzeti u obzir. Obično se sa povećanjem vremena ekstrakcije količina izdvojenog analita povećava, mada postoji rizik od degradacije. Najčešće je maksimalno vreme ekstrakcije 15–20 min, jer se pokazalo da čak izlaganje mikrotalasima od svega 40 s obezbeđuje zadovoljavajuće prinose (Chen i sar., 2007; Wang i sar., 2007). Kinetika mikrotalasne ekstrakcije polifenola i kofeina je pokazala da se prinos povećava do 4 min, a kasnije smanjuje sa porastom vremena (Pan i sar., 2001). U ekstrakciji artemisinina ukupni prinos od 92% postignut je nakon svega 12 min nakon čega se prinos ekstrakcije drastično smanjuje (Hao i sar., 2002), verovatno usled prekomernog izlaganja koje dovodi do termičke degradacije aktivnih principa. Nasuprot tome, postoje i studije koje pokazuju da variranje vremena ekstrakcije ne utiče značajno na prinos. Barbero i sar. (2008) su ispitivali vreme mikrotalasne ekstrakcije potrebno za potpuno iscrpljivanje kapsaicina iz paprike. Rezultati su pokazali da ne postoji korelacija između povećanja prinosa ciljanog jedinjenja i povećanja vremena ekstrakcije. Zbog kontradiktornih uticaja vremena ekstrakcije na prinos neophodno je izvršiti optimizaciju ovog parametra.

## (3) Dizajn mikrotalasnih reaktora

Postoje MAE sistemi sa usmerenim i neusmerenim zračenjem (Slika 9a i 9b). Sistemi sa neusmerenim zračenjem se primenjuju za ekstrakcije pod pritiskom, odnosno u zatvorenim sistemima, dok se u otvorenim sistemima koristi usmereno zračenje za ekstrakciju pod atmosferskim pritiskom (Mandal i sar., 2007).



**Slika 9.** Šematski prikaz a) zatvorenog i b) otvorenog MAE sistema (Stefanidis i sar., 2014)



Zatvoreni MAE sistemi su najrasprostranjeniji, sa primenama od modifikovanih mikrotalasnih peći do velikih industrijskih sušara. Obično imaju oblik pravougaone zatvorene metalne kutije, odnosno komore. Unutar komore postoji veliki broj rezonantnih modusa koji nastaju usled odbijanja mikrotalasa od zida komore. Zahvaljujući tim refleksijama dolazi do interferencije. Stoga je mikrotalasno polje, kome je podvrgnut biljni materijal, izrazito neuniformno uprkos upotrebi mešalice ili rotirajućeg diska. Prednost ovih sistema je u tome što se mogu relativno lako prevesti na industrijski nivo predviđen za obradu velike količine materijala (Jacob, 2012).

Sa aspekta potrošnje rastvarača, upotreba zatvorenog sistema je ekonomična, mada potreba da takav sistem izdrži visoke pritiske poskupljuje proces. Obično se može koristiti samo za ekstrakciju malih količina uzorka u svakom ekstrakcionom ciklusu. Suprotno tome, otvoreni MAE sistem se može koristiti u manje zahtevnim radnim uslovima (npr. pri atmosferskom pritisku), što poboljšava pitanje bezbednosti (Zhang i sar., 2011). Unutar komore se stvara relativno stabilniji stojeći talas. Zračeni materijal se obično postavlja u jedan od maksimuma elektromagnetnog polja (Slika 9b). Ova karakteristika otvorenog MAE sistema podrazumeva da su zapremina i masa biljnog materijala strogo ograničeni. Zbog toga se sistemi sa usmerenim zračenjem obično primenjuju za obradu zapremine do 200 ml, što se može smatrati njihovim glavnim ograničenjem (Jacob, 2012). Međutim, prednost usmerenih sistema u poređenju sa neusmerenim jeste ta što se unutar komore može postići veća gustina elektromagnetnog polja i na taj način veća brzina zagrevanja i što se može koristiti dvojako za ekstrakcije bez i sa dodatkom rastvarača (Luque-García i Luque de Castro, 2001).



**Slika 10.** Polu-industrijski mikrotalasni ekstraktor sa 4 magnetrona ( $4 \times 1500$  W, 2450 MHz)  
(Ciriminna i sar., 2016)

#### (4) Temperatura

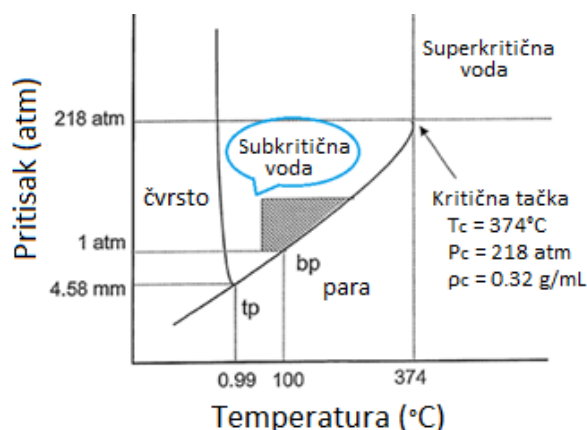
Snaga i temperatura mikrotalasa su međusobno usko povezane i treba im posvetiti posebnu pažnju, posebno kada se radi sa zatvorenim MAE sistemom. U zatvorenom sistemu, temperatura može biti veća od tačke ključanja rastvarača (Letellier i Budzinski, 1999). Ovako povišena temperatura dovodi do poboljšanja efikasnosti ekstrakcije, jer se povećava desorpcija analita iz unutrašnjosti matriksa. Pored toga, rastvarači na višoj temperaturi imaju veći kapacitet da rastvaraju analite, jer površinski napon i viskozitet rastvarača opadaju sa porastom temperature, što će poboljšati kvašenje uzorka i penetraciju u matriks. Xiao i sar. (2008) su zaključili da se prinos flavonoida smanjuje kada je temperatura veća od 110 °C, dok su Tsubaki i sar. (2010) zaključili da se maksimalan sadržaj fenolnih jedinjenja ostvaruje na temperaturi od 170 °C. Povećanje temperature je takođe povezano sa povećanjem pritiska u zatvorenim sistemima. Temperatura se može efikasno kontrolisati u otvorenom sistemu kombinacijom ekstragenasa koji imaju različite dielektrične konstante (Talebi i sar., 2004).

#### (5) Snaga

Pri mikrotalasnju ekstrakciji biljnog materijala, veća snaga mikrotalasa može uzrokovati mali prinos ekstrakcije usled degradacije termički osetljivih jedinjenja. Takođe, kada je snaga mala, razaranje ćelijskog zida se odvija postepeno, što omogućava selektivnost MAE. Snaga mora biti izabrana pravilno da bi se izbegla previsoka temperatura, koja bi mogla dovesti do degradacije analita i nadpritiska unutar mikrotalasne komore. Generalno, prinos ekstrakcije raste proporcionalno sa povećanjem snage mikrotalasa do određene granice kada povećanje postaje neznatano ili prinos opada (Mandal i Mandal, 2010; Xiao i sar., 2008; Chemat i sar., 2004; Kwon i sar., 2003). Snaga mikrotalasa obezbeđuje lokalizovano zagrevanje u uzorku i deluje kao pokretačka sila MAE procesa da se razori biljni matriks i omogući nesmetano difundovanje analita u rastvarač. Povećanje snage u većini slučajeva poboljšava prinos ekstrakcije i rezultira kraćim vremenom ekstrakcije (Chan i sar., 2011; Hu i sar., 2008). Ma i sar. (2009) su ustanovili povećanje prinosa flavonoida iz *Radix astragali* sa povećanjem snage sa 200 na 1000 W. Međutim, velika snaga uz produženo izlaganje uključuje rizik od termičke degradacije. Sa druge strane postoje studije koje pokazuju da variranje snage od 400 do 1200 W nema značajan uticaj na prinos flavonoida ali utiče na redukovanje vremena ekstrakcije za 45 min (Gao i sar., 2006).

### 2.6.5. Ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE)

Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju (eng. *subcritical water extraction*; SWE), poznata i pod nazivom ekstrakcija pregrejanom vodom ili ekstrakcija vrelom vodom pod pritiskom, je ekološki prihvatljiva alternativna tehnologija koja se sve više koristi kao zamena za konvencionalne postupke ekstrakcije (Herrero i sar, 2006). Prednosti koje pruža SWE proces u odnosu na tradicionalne ekstrakcione tehnike su kraće vreme ekstrakcije, veći prinos i upotreba vode kao rastvarača sa zanemarljivim uticajem na životnu sredinu (Huie, 2002). SWE proces koristi vodu na temperaturi iznad tačke ključanja (100 - 374 °C) i odgovarajućem pritisku (od 10 do 60 bar) kako bi se voda zadržala u tečnom stanju na radnoj temperaturi (Turner i Ibanez, 2011).



**Slika 11.** pT dijagram faznih stanja vode

(Asl i Khajenoori, 2013)

Ono što vodu čini atraktivnim i fleksibilnim rastvaračem u procesima ekstrakcije je činjenica da se njena fizička i hemijska svojstva mogu menjati variranjem temperature. Na sobnoj temperaturi, voda je izrazito polarna tečnost sa visokom dielektričnom konstantom ( $\epsilon_r = 80$  na 20 °C) i dipolnim momentom (1,85 D), dok sa porastom temperature dolazi do značajnog smanjenja njene dielektrične konstante, viskoziteta i površinskog napona, a povećanja brzine difuzije. Posledično, polarnija jedinjenja sa većom rastvorljivošću u vodi se efikasno ekstrahuju na nižim temperaturama, dok se umereno polarna i nepolarna jedinjenja ekstrahuju na povišenim temperaturama (Smith, 2006). Sa porastom temperature sa 20 na 350 °C, dielektrična konstanta vode se drastično smanjuje sa 80 na 14 (Uematsu i Franck, 1980), a voda u subkritičnim uslovima (Slika 11, p i T su ispod kritične tačke) rastvara hidrofobna jedinjenja (Yang i sar., 1995). Ono što se događa je da povećanje temperature smanjuje elektrostatičke interakcije između molekula vode, i takođe između molekula vode i okolnih jona i molekula. Stoga upotreba vode na višim temperaturama omogućava rastvaranje manje polarnih jedinjenja, jer intermolekularne interakcije koje uključuju vezivanje vodonika postaju manje izražene,

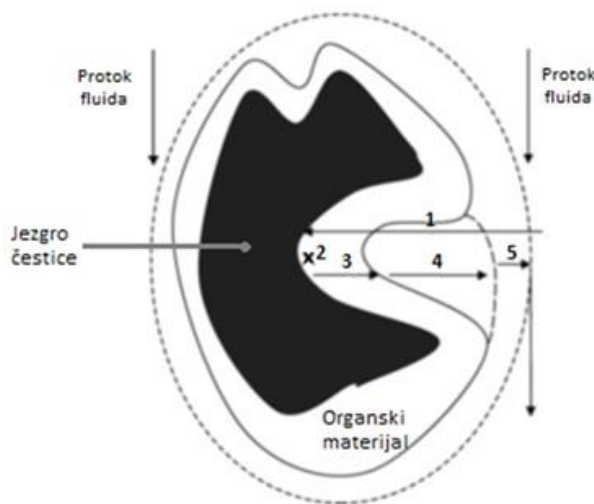
a samim tim favorizuju se slabije disperzione sile. Drugim rečima, povišena temperatura čini vodu manje polarnim rastvaračem, te voda na temperaturama od 200 - 275 °C ima dielektričnu konstantu sličnu metanolu i etanolu na sobnoj temperaturi (Uematsu i Franck, 1980; Carr i sar., 2011).

### 2.6.6. Parametri koji utiču na SWE

Mehanizam ekstrakcije subkritičnom vodom može se opisati pomoću pet faza (Vladić, 2017) koje su predstavljene na slici 12:

- (1) kvašenje matriksa ekstragensom,
- (2) desorpcija rastvorka iz matriksa,
- (3) difuzija rastvorka unutar pora matriksa,
- (4) difuzija rastvorka kroz statički fluid u poroznom materijalu,
- (5) difuzija rastvorka kroz film fluida van čestica.

U okviru ovih faza, različita molekularna svojstva i intermolekularne sile upravljaju brzinom kojom se ciljane jedinjenja ekstrahuju iz matriksa, pri čemu je uticaj prve faze zanemarljiv (Kubatova i sar., 2002). Na ekstrakciju subkritičnom vodom utiču prvenstveno fizičko-hemijska svojstva ciljanih jedinjenja, matriksa i vode, kao i interakcija između ova tri faktora (Carr i sar., 2011).



**Slika 12.** Mehanizam prenosa mase ekstrakcijom subkritičnom vodom (Khajenoori i sar., 2009)

Kinetičkim fazama (2) i (3) dominiraju intermolekularne adhezivne i kohezivne sile između analita, matriksa i vode. Na povišenim temperaturama napon pare mnogih analita raste, što uzrokuje oslobađanje većeg udela analita iz organskog matriksa (Ong i sar., 2006). Što je manje analita vezano za aktivna mesta u matriksu (vodoničnim vezama, van der Waals-ovim silama ili dipolskim privlačenjem), to se analit lakše rastvara u subkritičnoj vodi. Pri povišenim temperaturama

voda ima niži viskozitet i međupovršinski napon nego na sobnoj temperaturi (Coym i Dorsey, 2004). Smanjivanje viskoziteta i međupovršinskog napona uzrokuje da subkritična voda bude više difuzivan rastvarač nego voda na sobnoj temperaturi (Teo i sar., 2010).

Kinetički mehanizam odgovoran za fazu (4) je koncentracijski gradijent između analita u matriksu i analita u vodi. Termodinamička raspodela analita predstavlja fazu koja ograničava brzinu SWE procesa (Kubatova i sar., 2002). Rastvorljivost jedinjenja u vodi zavisiće od polariteta analita koji se izdvaja subkritičnom vodom. U nekim slučajevima veće temperature mogu smanjiti rastvorljivost polarnih i umereno polarnih jedinjenja u vodi (Ibanez i sar., 2003). Stoga se mora razmotriti polaritet jedinjenja koja će se ekstrahovati. Poslednja faza uključuje eluiranje rastvora zasićenog analitom, koje će zavisiti od transportnih svojstava rastvora i hidroskopičnosti ekstrakcionog matriksa (Carr i sar., 2011).

### **(1) Temperatura**

Temperatura tokom ekstrakcije je dominantan faktor koji utiče na efikasnost i selektivnost SWE procesa. Temperaturu treba podesiti tako da se u potpunosti iskoriste njene prednosti, u smislu poboljšane rastvorljivosti i prenosa mase, a istovremeno minimiziraju reakcije degradacije (Kubatova i sar., 2002). Upotreba visokih temperatura poboljšava efikasnost ekstrakcije tako što pomaže prekidu interakcije biljnog matriksa i analita uzrokovanih van der Waals-ovim silama, vodoničnim vezama i dipolskim privlačenjem (Richter i sar., 1996). Upotreba toplotne energije pomaže u prevazilaženju kohezivnih (molekul-molekul) i adhezivnih interakcija između različitih molekula, u ovom slučaju analita i biljnog matriksa, smanjujući energiju aktivacije koja je potrebna za proces desorpcije. Povišena temperatura smanjuje površinski napon rastvarača, analita i matriksa, i na taj način intenzivira kvašenje uzorka (Mockel i sar., 1987). Povišena temperatura smanjuje viskozitet i površinski napon rastvarača i na taj način pojačava njegovu penetraciju unutar čestica matriksa, što rezultira poboljšanim procesom ekstrakcije. Poslednja značajna prednost upotrebe veće temperature rastvarača je poboljšana brzina difuzije, odnosno maseni prenos molekula u rastvaraču, što omogućava bržu ekstrakciju (Fernandez-Gonzalez i sar., 2008, Moreno i sar., 2006).

### **(2) Pritisak**

Pritisak ima zanemarljiv uticaj na karakteristike vode kao rastvarača sve dok omogućava zadržavanje vode u tečnom stanju na radnoj temperaturi (Hawthorne i sar., 1994). Pored toga, povišen pritisak može olakšati kvašenje matriksa što rezultira poboljšanom efikasnošću ekstrakcije (Kronholm i sar., 2007). Najčešće se SWE proces odvija na pritiscima u opsegu 20-100 bar, gde su razlike u rastvorljivosti usled promena pritiska neznatne (Miller i Hawthorne, 1998).

### (3) Protok i vreme ekstrakcije

Protok može da utiče na brzinu kojom se jedinjenje ekstrahuje. Većina studija navodi da veći protok na konstantnoj temperaturi dovodi do smanjenja vremena ekstrakcije (Anekpankul i sar., 2007, Ozel i sar., 2003). U pogledu efikasne upotrebe vode, veći protok možda nije optimalan ako je koncentracija analita u subkritičnoj vodi veoma mala. Guclu-Ustundag i sar. (2007) su zaključili da mali protoci obezbeđuju koncentrovaniji ekstrakt u poređenju sa velikim protocima, dok su Anekpankul i sar. (2007) pokazali da protok nema nikakav uticaj na koncentraciju analita u subkritičnoj vodi. Obe grupe autora su koristile slične protoke i temperature što implicira da je optimalan protok specifičan za ciljano jedinjenje.

Vreme ekstrakcije potrebno za potpuno iscrpljenje određenog matriksa zavisi od vrste analita, matriksa i načina ekstrakcije, jer se SWE proces može izvesti u statičkom ili u režimu kontinualnog protoka. U statičkom režimu, zasićeni ekstragens nije potrebno neprestano menjati sa svežim, ali ako se koristi više od jednog ciklusa ekstrakcije, rastvarač je potrebno delimično ili potpuno zameniti nakon nekog vremena (Gilbert-Lopez i sar., 2017). Ravnoteža između analita u matriksu i onih u vodenoj fazi se može postići statičkom ekstrakcijom, ali se efikasnost postupka ekstrakcije neće povećati nakon postizanja ravnoteže. Dodatno, degradacija pojedinih analita kao i nepoželjne hemijske reakcije se mogu lakše odvijati. Zato je neophodna pažljiva optimizacija vremena ekstrakcije u statičkom režimu. U kontinualnom režimu SWE procesa postoji konstantan protok ekstragensa kroz ekstrakcionu ćeliju. Ovaj režim je povoljniji za potpunu ekstrakciju matriksa jer se izbegava postizanje ravnoteže. Još jedan parametar za ispitivanje u kontinualnom režimu je brzina protoka. Proces ekstrakcije u ovom režimu može biti kontrolisan rastvorljivošću ili desorpcijom, u zavisnosti od toga gde se nalaze analiti u matriksu i kako interaguju sa matriksom (Hawthorne i sar., 1994). Ako je ekstrakcija kontrolisana rastvorljivošću, veći protok će poboljšati prinos ekstrakcije u jedinici vremena, dok ako je to desorpcija, prinos ekstrakcije u jedinici vremena se neće menjati sa protokom. Brzina protoka direktno utiče na vreme ekstrakcije potrebno za potpuno iscrpljenje sirovine. Jedan od načina da se minimiziraju nepoželjne hemijske reakcije i degradacija analita je da se koristi režim kontinualnog protoka sa dovoljno velikim protokom vode. Glavni nedostaci korišćenja većih količina vode u SWE su što dobijeni ekstrakt može postati previše razblažen za analitičko određivanje i što uklanjanje većih količina vode može značiti i skuplju proceduru (Gilbert-Lopez i sar., 2017).

### (4) Modifikatori

Podešavanje pH vrednosti, dodatkom pojedinih organskih i neorganskih modifikatora, površinski aktivnih materija (PAM) i aditiva može povećati rastvorljivost analita u ekstragensu i uticati na fizička svojstva biljnog matriksa i desorpciju analita iz uzorka. Prema nekim autorima upotreba aditiva poput PAM-a može se koristiti kao alternativa organskim rastvaračima u SWE (Ong i

Len, 2003; Machado i sar., 2015). Nedavno je pokazano da se nejonske PAM mogu koristiti kao alternativni rastvarač u SWE (Choi i sar., 2003), pomoću koga se može kontrolisati degradacija jedinjenja (Kiathevest i sar., 2009). Ostali aditivi od interesa za SWE su antioksidansi, kao što su askorbinska kiselina ili BHT, od posebnog značaja za analite podložne oksidaciji. U praksi se najčešće dodaju etanol i mravlja kiselina (Arapitsas i Turner, 2008; Tomsik i sar., 2017; King i sar., 2003), kao i HCl (Naffati i sar., 2017; Wang i sar., 2014; Asghari i Yoshida, 2007).

### **(5) Ostali parametri**

Veličina čestica, odnosno srednji prečnik čestica, uzorka utiče na kinetiku ekstrakcije, jer manja veličina čestica dovodi do povećanja kontaktne površine između uzorka i ekstragensa. Veličina čestica mora biti odgovarajuća kako bi se maksimizirala kontaktna površina uz izbegavanje aglomeracije čestica. U nekim slučajevima, disperzatori (npr. staklene kuglice) se uvode u uzorak u ekstrakcionu posudu da bi se favorizovala uniformna distribucija uzorka i ekstragensa u cilju povećanja prinosa ekstrakcije. Agitacija se takođe može koristiti da se izbegne formiranje aglomerata (Plaza i Turner, 2015).

Odnos droga/rastvarač je takođe važan parametar SWE procesa. Povećanje odnosa uzorka i ekstragensa rezultira većim udelima analita koji se ekstrahuje bez zamene zasićenog svežim rastvaračem (Rezaei i sar., 2013). Međutim, veći odnos droga/rastvarač zahteva zagrevanje veće zapremine vode. Dodatno, analit će biti manje koncentrovan u ekstraktu, pa se javlja potreba za koncentrovanjem i povećava rizik od degradacije analita. Stoga je važno da odnos droga/rastvarač bude što manji, ali istovremeno dovoljno velik da obezbedi najveći mogući prinos ekstrakcije (Ravber i sar., 2015). Sadržaj vlage u uzorku je još jedan parametar koji potencijalno utiče na prinos ekstrakcije. Neke studije pokazuju da uzorci sa većim sadržajem vlage daju bolje prinose ekstrakcije polifenola od osušenih uzoraka (Monrad i sar., 2010; Monrad i sar., 2014; Rajha i sar., 2014).

### **(6) Degradacija**

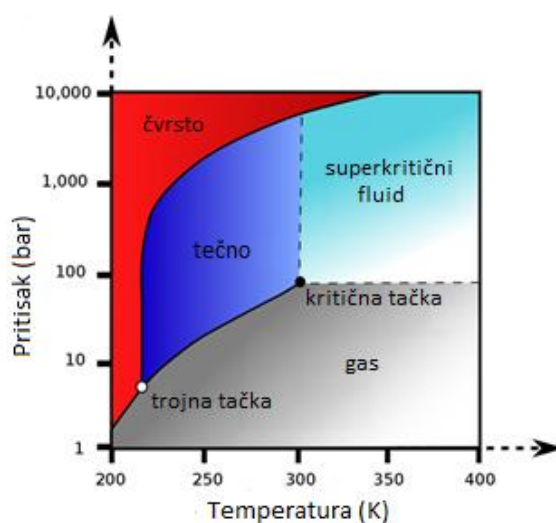
Postoje tri glavna nedostatka pri korišćenju povišene temperature: smanjena selektivnost ekstrakcije, degradacija ciljnih jedinjenja i nepoželjne hemijske reakcije (Maillard-ove reakcije, reakcije karamelizacije i termooksidacije) (Richter i sar., 1996; Bjorklund i sar., 2000). Veća temperatura uzrokuje ekstrakciju većeg broja nepoželjnih jedinjenja, tj. kontaminanata, rezultirajući nižom selektivnošću i većom potrebom za naknadnim prečišćavanjem subkritičnog ekstrakta. Takođe, degradacija analita, koja se može javiti na povišenim temperaturama, je često praćena formiranjem novih jedinjenja, tako da je otežana krajnja determinacija i klasifikacija jedinjenja na nativna i ona koja su nastala kao nusproizvod termičke degradacije. Do pojave degradacije jedinjenja dolazi jer je voda na povišenim temperaturama izvor hidronijum ( $H_3O^+$ ) i hidroksilnih ( $OH^-$ ) jona, koji katališu

različite reakcije uključujući hidrolizu polisaharida i proteina na manje molekule. Ovi mali molekuli su podložniji međusobnim reakcijama (Teo i sar., 2010).

Khuwijitjaru i sar. (2014) su ispitali kinetiku degradacije devet fenolnih kiselina i jednog flavanola nakon ekstrakcije subkritičnom vodom u trajanju od 30 - 120 min. Na temperaturama od 100 i 150 °C, degradacioni procesi svih fenolnih jedinjenja se mogu opisati kinetičkim modelom prvog reda, dok se na temperaturama od 200 i 250 °C razgradnja odvija daleko brže. Hlorogenska, *p*-hidroksibenzoeva, protokatehinska i siringinska kiselina su prisutne nakon SWE na 200 °C u trajanju od 1 h, dok se i one u potpunosti raspadaju na 250 °C nakon 30 min SWE.

### 2.6.7. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom (SC-CO<sub>2</sub>)

Za ekstrakciju komponenti iz različitih biljnih sirovina danas se primenjuje veliki broj metoda. Većina ovih metoda koristi organske rastvarače u procesu ekstrakcije pri čemu na kraju ostaju velike količine tečnog otpada. Pored generisanja velike količine ovakvog tipa otpada, nedostaci konvencionalnih postupaka poput *Soxhlet* ekstrakcije su i nedovoljna selektivnost, vremenski zahtevna procedura i potencijalna emisija toksičnih para tokom ekstrakcije (Naudé i sar., 1998). U cilju prevazilaženja pomenutih nedostataka razvijene su čiste zelene tehnologije, poput ekstrakcije superkritičnim fluidima (eng. *supercritical fluid extraction*; SFE), za izolovanje komponenti iz složenih matriksa. SFE je privukla značajnu pažnju poslednjih decenija kao obećavajuća alternativa konvencionalnoj čvrsto/tečnoj (Č/T) ekstrakciji i mehaničkom presovanju za dobijanje ekstrakata biljnog porekla jer nudi brojne prednosti, uključujući potpuno uklanjanje ekstragensa (prevođenje fluida u gasovito stanje) i efikasnije izolovanje aromatičnih jedinjenja (Norulaini i sar., 2008; Zaidul i sar., 2007; Herrero i sar., 2006).



Slika 13. pT dijagram faznih stanja ugljendioksida

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carbon\\_dioxide\\_pressure-temperature\\_phase\\_diagram.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carbon_dioxide_pressure-temperature_phase_diagram.svg))



Proces ekstrakcije superkritičnim fluidima može se sumirati u pet uzastopnih faza (Sovová, 2012):

- (1) Difuzija superkritičnog fluida do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje,
- (2) Prodiranje i difuzija superkritičnog fluida kroz spoljašnji sloj sfernog omotača čvrstog inertnog materijala,
- (3) Kontakt superkritičnog fluida sa rastvorenim supstancama na površini neizreagovanog jezgra i ekstrakcija rastvorene komponente,
- (4) Difuzija rastvorene komponente u superkritičnom fluidu kroz sloj spoljašnjeg sfernog omotača čvrstog inertnog materijala na spoljašnju površinu čestice,
- (5) Difuzija rastvorene komponente u superkritičnom fluidu kroz film fluida koji okružuje česticu.

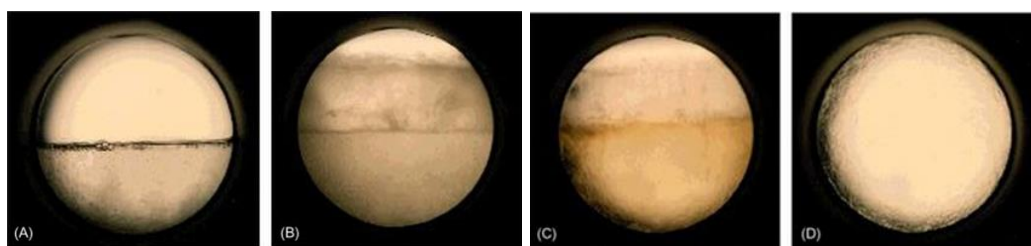
Najznačajnije fizičko-hemijske karakteristike superkritičnog fluida su njegova gustina, difuzivnost, viskozitet i dielektrična konstanta. Usled niskog viskoziteta ( $10^{-3}$  u odnosu na  $10^{-4}$  Ns/m<sup>2</sup> za tečnosti) i relativno visoke difuzivnosti ( $10^{-5}$  u odnosu na  $10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/s za tečnosti), superkritični fluidi imaju poboljšane osobine prenosa toplote i mase u odnosu na tečnosti, te mogu lako difundovati kroz čvrste materijale gde se analit nalazi unutar poroznog matriksa (Phelps i sar., 1996). Jedna od glavnih karakteristika superkritičnog fluida je mogućnost promene gustine fluida, variranjem pritiska i/ili temperature (Herrero i sar., 2006), čime se omogućava da moć rastvaranja fluida oponaša širok spektar različitih rastvarača (Tabela 6).

**Tabela 6.** Kritični parametri najčešće korišćenih rastvarača u SFE

Rastvarač	Kritična temperatura (°C)	Kritični pritisak (bar)	Gustina (kg/m <sup>3</sup> )
Ugljendioksid	31,1	73,8	468
Etilen	9,3	50,4	218
Azot oksid	36,7	72,7	470
Propan	96,7	42,5	217
Amonijak	132,5	112,8	235
Dietil-etar	194	36,4	265
Voda	374,3	220,5	322

Na izbor fluida koji će se koristiti kao superkritični rastvarač utiče prvenstveno polarnost ciljanog analita. Relativno niska kritična temperatura (31,1 °C) i pritisak (73,8 bar) favorizuju upotrebu ugljendioksida, koji se isključivo koristi za nepolarna jedinjenja i umereno polarna poput alkana, terpena, aldehida, estara, alkohola i lipida (Phelps i sar., 1996). Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom (eng. *supercritical carbon dioxide extraction*; SC-CO<sub>2</sub>) je separaciona tehnologija

koja koristi ugljendioksid kao rastvarač. Ugljendioksid je najčešće korišćen rastvarač u SFE, jer pored toga što je dostupan u visokom stepenu čistoće, jeftin, bezbedan za rukovanje i fiziološki bezopasan, lako se uklanja iz ekstrakta ekspanzijom na atmosferskom pritisku i ekološki je prihvatljiv (eng. *Generally Recognized as Safe*; GRAS) (Brunner, 2005; Reverchon i De Marco, 2006). Ugljendioksid prelazi u superkrično stanje na temperaturi iznad 31,1 °C i pritisku iznad 73,8 bar, što ga čini idealnim rastvaračem za ekstrakciju termički osetljivih jedinjenja. Prelaz ugljendioksida u superkrično stanje prikazan je na slici 14, gde se jasno vidi da ispod kritičnih vrednosti pritiska i temperature, ugljendioksid postoji u dve faze, tečnoj i gasovitoj (Slika 14A). Povećanjem temperature vidljivost granice između faza se smanjuje (Slike 14B i 14C) jer gustina tečne i gasovite faze postaje sve sličnija. Kada su postignuti kritična temperatura i pritisak, razlika između dve faze prestaje biti uočljiva (Slika 14D), te one formiraju novu homogenu fazu – superkrični fluid (Cunico i Turner, 2017).

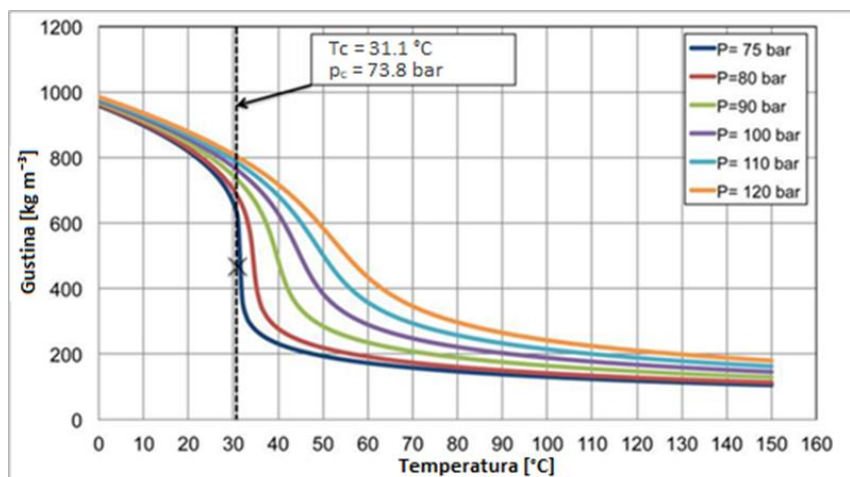


**Slika 14.** Prelaz ugljendioksida kroz različite faze sa porastom pritiska i temperature (A, B, C – gas i tečnost, D – superkričan fluid) (Cunico i Turner, 2017)

## 2.6.8. Parametri koji utiču na SC-CO<sub>2</sub>

### (1) Pritisak i temperatura

SC-CO<sub>2</sub> se definiše kao visoko-pritiska tehnologija što ukazuje na to da je ova varijabla od izuzetnog značaja za mnoge tehničke i ekonomske aspekte ovog procesa. Gustina predstavlja fizičko-hemijsku karakteristiku na koju direktno utiču promene pritiska. Kada se ispituje uticaj gustine na ponašanje superkričnih fluida, pritisak je mnogo poželjnija varijabla za podešavanje njegovih vrednosti, jer nudi znatno veće opsege manipulacije nego temperatura. Pritisak se može povećavati i do 10 puta u odnosu na vrednost pritiska neophodnu za prelaz fluida u superkrično stanje, dok je temperatura ograničena na uži opseg, odnosno može se povećavati do 3 puta u odnosu na najčešće korišćenu temperaturu od 40 °C. Većina studija koje se bave SC-CO<sub>2</sub> procesima se fokusiraju na pritiske od 100 do 400 bar, pri čemu unutar ovog intervala gustine variraju od 200 do 900 kg/m<sup>3</sup>. Međusobna zavisnost pritiska i gustine je posebno vidljiva pri niskim pritisacima (npr. 100 bar) (Slika 15), pri čemu gustine osciluju do 70% na temperaturama od 40 do 100 °C, dok je pri većim pritisacima (npr. 400 bar) moguća oscilacija najviše 20% (de Melo i sar., 2014).



Slika 15. Gustina superkričnog ugljendioksida u zavisnosti od pritiska i temperature

Sa aspekta temperature, većina studija koja se bavi SC-CO<sub>2</sub> procesima se fokusira na opseg 40-60 °C favorizujući temperaturu od 40 °C. Jedan od glavnih razloga za ispitivanje uticaja pritiska na posmatrane parametre na nižim temperaturama je verovatno zbog većeg stepena varijacije gustine u ovom regionu, ali takođe i zbog predostrožnosti u vezi sa termičkom degradacijom jedinjenja koja se ekstrahuju, ograničenja opreme i smanjenja troškova (de Melo i sar., 2014). Drugi razlog za ređu selekciju temperature kao nezavisno promenljive je to što može da izazove nedosledno "ponašanje" superkričnog ekstragensa usled fenomena poznatog kao "crossover" efekat. Kada temperatura raste, gustina superkričnog fluida opada, ali rastvorljivost analita se i dalje može povećati kao rezultat povećanog napona pare analita. Grafici zavisnosti rastvorljivosti od pritiska pri konstantnim, ali različitim temperaturama dva puta se ukrštaju i te presečne tačke se nazivaju donjim i gornjim *crossover* tačkama (de Melo i sar., 2009). Pri pritiscima između ove dve tačke, rastvorljivost opada sa porastom temperature, jer efekat gustine rastvarača prevazilazi efekat napona pare. Dok je iznad gornje ili ispod donje tačke ukrštanja, efekat pritiska pare izraženiji od efekta gustine, pa rastvorljivost raste sa porastom temperature (de Melo i sar., 2009; Özkal i sar., 2005; Anitescu i Tavlarides, 1999).

## (2) Protok

Protok ugljendioksida je relevantan parametar ukoliko se proces kontroliše spoljnim otporom prenosu mase ili ravnotežom, u tom slučaju količina dotoka superkričnog rastvarača u posudu za ekstrakciju određuje brzinu ekstrakcije (Reverchon i De Marco, 2006). Iako protok, za razliku od pritiska i temperature, ne utiče na osobine superkričnog fluida ima direktan uticaj na fenomene prenosa mase, kao što su aksijalna disperzija, koeficijent konvektivnog prenosa mase i akumulacija jedinjenja koja se ekstrahuju u superkričnom ugljendioksidu (de Melo i sar., 2014). Da Porto i sar. (2015) su ispitali uticaj protoka ugljendioksida na SC-CO<sub>2</sub> ukupnih fenola iz pogače grožđa (zaostale nakon presovanja) i ustanovili da se sa smanjenjem protoka povećava prenos mase. Ova pojava se

pripisuje tome da se vreme kontakta između ekstragensa i jedinjenja koja se ekstrahuju povećava, a samim tim i vreme potrebno za unutrašnju difuziju što pozitivno utiče na efikasnost ekstrakcije. Nasuprot tome, povećanje protoka u određenoj meri može uticati na povećanje prenosa mase usled pomeranja koncentracionog gradijenta dotokom svežeg ekstragensa, ali preveliko povećanje protoka bez izrazitog povećanja prinosa jedinjenja od interesa narušava ekonomsku održivost procesa (de Melo i sar., 2014). Takođe, protok ugljendioksida je povezan sa vremenom ekstrakcije i može uticati na redukciju vremena ekstrakcije sa udvostručavanjem protoka (Vasapollo i sar., 2004).

### (3) Modifikatori

Rastvorljivost polarnih i nepolarnih jedinjenja u superkritičnom fluidu može biti poboljšana uz dodatak modifikatora, koji mogu biti polarni (etanol, metanol, aceton i dr.) i nepolarni (propan, oktan i dr.). Modifikatori se obično dodaju u maloj koncentraciji kako bi povećali rastvorljivost analita u superkritičnom fluidu (Sinha i sar., 1992). Etanol je najčešće korišćen modifikator sa koncentracijom u opsegu 5-30% (Da Silva i sar., 2016; Saldana i sar., 2010; Shi i sar., 2009; Kassama i sar., 2008), dok se organski rastvarači poput hloroforma (Cadoni i sar., 1999), tetrahidrofurana (Ciurlia i sar., 2009) i acetona (Ollanketo i sar., 2001), kao i biljna ulja poput maslinovog ulja (Shi i sar., 2009), ulja kanole (Saldana i sar., 2010) i ulja lešnika (Vasapollo i sar., 2004) takođe koriste u tu svrhu.

## 2.7. Sušenje tečnih ekstrakata *spray drying* tehnikom

Primenom prethodno opisanih savremenih metoda ekstrakcije skraćuje se vreme ekstrakcije, ubrzava prenos mase i toplote, kontroliše nastanak Maillard-ovih reakcija, poboljšava kvalitet i funkcionalnost proizvoda (Galanakis, 2013). Krajnji rezultat primene ovakvih metoda ekstrakcije su vodeni i vodeno etanolni ekstrakti visokog kvaliteta, ali ograničenog roka trajanja zbog prisustva vode koja je medijum podložan mikrobiološkim kontaminacijama. U cilju prevođenja tečnih ekstrakata u suve ekstrakte u najvećem broju slučajeva koristi se *spray drying* tehnika, odnosno sušenje raspršivanjem (Đorđević i sar., 2015). Prednosti suvih ekstrakata, odnosno prahova, u odnosu na tečne forme ekstrakata, su smanjena aktivnost vode koja obezbeđuje mikrobiološku stabilnost, amortizuje degradacione procese, smanjuje troškove transporta i skladištenja i naposljetku unapređuje instant rastvorljivost krajnjeg proizvoda (Gharsallaoui i sar., 2007).

*Spray drying* je jednostepeni tehnološki postupak za uklanjanje tečnosti (rastvarača) koji se sastoji iz atomizacije (raspršivanja) tečne napojne smeše u struji toplog gasovitog medijuma i nastanka suvog praškastog proizvoda (Gharsallaoui i sar., 2007). Kao gasoviti medijum za sušenje najčešće se koristi vazduh ili ređe azot. Tečna napojna smeša može biti rastvor, emulzija ili suspenzija. Finalni proizvod može biti u formi granula, praha ili aglomerata u zavisnosti od fizičko-hemijskih osobina

napojne smeše i procesnih parametara (Filikova i Mujumdar, 1995; Masters, 1985). Najčešći oblik čestica osušenih raspršivanjem je sferičan, sa srednjim prečnikom opsega 10-100  $\mu\text{m}$ . *Spray drying* je rasprostranjena tehnologija za mikrokapsulaciju u industrijskim uslovima jer je ekonomična, fleksibilna, jednostavna za manipulaciju i predstavlja kontinualan proces. *Spray drying* je ekonomičniji 4-5 puta u poređenju sa liofilizacijom, zbog manje potrošnje električne energije i kraćeg vremena sušenja (Hammami i Rene, 1997), takođe 4 puta ekonomičniji od vakuum sušenja (Santivarangkna i sar., 2007). Dodatno, prednost *spray drying* procesa u odnosu na liofilizaciju i vakuum sušenje je i relativno kratko vreme kontakta napojne smeše i medijuma za sušenje, usled čega ova tehnika sušenja ima tendenciju očuvanja osetljivih komponenti kao što su vitamini i minerali, boje, arome, lipidi i enzimi (Rodríguez-Hernandez i sar., 2005; Yousefi i sar., 2011).

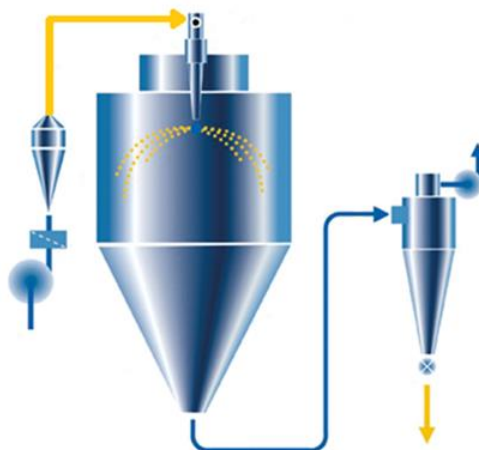
### 2.7.1. Princip *spray drying* procesa

*Spray drying* je konvektivni proces sušenja i sastoji se iz četiri osnovne faze:

#### (1) Atomizacija tečne napojne smeše u kapi

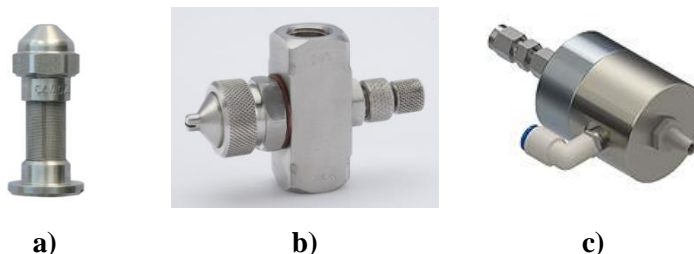
Proces atomizacije je ključna faza sušenja, koja se odnosi na formiranje praha ili tečne suspenzije u gasu i naknadno smanjenje veličine čestica. Efikasan proces atomizacije podrazumeva konvertovanje tečne napojne smeše u sitne kapljice jednakih veličina čime se obezbeđuje uniforman prenos mase i toplote tokom *spray drying* procesa. Usled smanjenja veličine čestica i disperzije čestica u medijumu za sušenje, površina čestica se drastično povećava. Ovaj priraštaj u površini čestica omogućava gotovo trenutno sušenje napojne smeše. Sa malim prečnikom kapljica i ujednačenom distribucijom napojne smeše, uklanjanje vlage se odvija bez narušavanja integriteta materijala koji se suši (Cal i Sollohub, 2010). Atomizacija se vrši pomoću atomizera koji se klasifikuju na osnovu vrste energije koja deluje na napojnu smešu prilikom atomizacije. Dva osnovna tipa atomizera su rotacioni i atomizeri sa diznama (Cal i Sollohub 2010; Murugesan i Orsat, 2012). Izbor atomizera se vrši na osnovu karakteristika napojne smeše koja treba da se suši i željenih karakteristika krajnjeg proizvoda (Masters, 1997).

Rotacioni atomizeri (Slika 16) koriste centrifugalnu energiju kako bi raspršili napojnu smešu (Filikova i Mujumdar, 1995; Masters, 1985). Ukratko, napojna smeša se propušta kroz cilindar koji dovodi tečnost do rotacionog diska koji rotira velikom brzinom (Murali i sar., 2015). Relativno jednostavna manipulacija i dobijanje čestica uniformne veličine koja može da se varira promenom brzine rotacije diska su samo neke od prednosti ovog tipa atomizera. Nedostaci su otežan rad sa tečnostima povišenog viskoziteta usled čega se otvori kroz koje se tečnost raspršuje blokiraju. Pored toga, kao posledica neadekvatnog razdvajanja finih čestica od gasovitog medijuma u ciklonu dolazi do povećanih gubitaka praha, odnosno smanjenja efikasnosti sušenja (Anandharamakrishnan, 2015).



**Slika 16.** Šema uređaja za sušenje raspršivanjem pomoću rotacionog atomizera  
(<https://www.labrotovap.com/how-does-spray-dryer-work/>)

Atomizeri kod kojih se raspršivanje napojne smeše ostvaruje kroz dizne se dele na hidraulične dizne, dizne sa dva fluida i ultrazvučne dizne (Slika 17). Kod hidrauličnih dizni (Slika 17a), mlaznica za raspršivanje pretvara energiju tečnosti u kinetičku energiju. Ovaj tip dizni nije pogodan za viskozne fluide jer se dobijaju prahovi neuniformne raspodele veličina čestica i postoji realan rizik od blokiranja otvora dizne. Jedini parametar koji se može podešavati kod ovog tipa mlaznica je brzina protoka napojne smeše (Cal i Sollohub, 2010).



**Slika 17.** Dizne za raspršivanje: a) hidraulična, b) dizna sa dva fluida i c) ultrazvučna

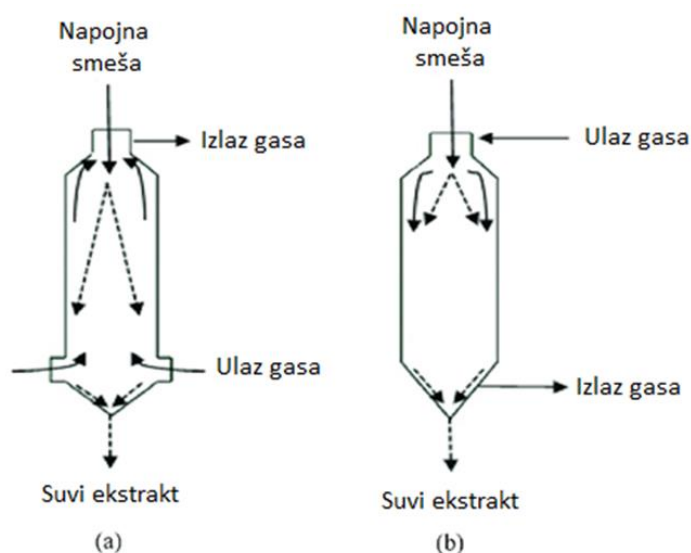
Kod dizni sa dva fluida (Slika 17b), atomizacija napojne smeša se postiže mešanjem iste sa vazduhom ili drugim gasom pod pritiskom, te tako zajedno prolaze kroz diznu. Napojna smeša trpi velike sile trenja koje dovode do dezintegracije rastvora u kapljice. Oblik i veličina formiranih kapljica su zavisni od karakteristika napojne smeše (površinski napon, gustina i viskozitet) i pritiska komprimovanog gasa (Cal i Sollohub, 2010). Ovakav tip dizni pogodan je za viskozne tečnosti. Nedostatak koji ograničava upotrebu ovog tipa dizni je nastanak čestica male gustine i loših protočnih karakteristika usled zadržavanja velike količine vazduha unutar čestica (Anandharamakrishnan, 2015).

Ultrazvučne dizne (Slika 17c) predstavljaju noviju tehnologiju u atomizaciji napojne smeše. Ultrazvučni talasi stvaraju vibracije visoke frekvencije kojima se raspršuje napojna smeša. Prednost ovih dizni je dobijanje finih čestica uniformne raspodele i sposobnost samočišćenja, što olakšava rad

sa viskoznim fluidima. Dodatno, formirane kapljice se kreću malim brzinama što utiče na povećanje prinosa sušenja (Cal i Sollohub, 2010). Tokom atomizacije, napojna smeša se izlaže medijumu za sušenje koji je u najvećem broju slučajeva atmosferski vazduh. Vazduh se uvodi kroz filtracioni sistem i naknadno zagreva na zadatu temperaturu. Ponekad se koriste azot ili drugi inertni gasovi ukoliko je napojna smeša izrazito nestabilna ili su njene komponente osetljive na prisustvo kiseonika (Cal i Sollohub, 2010).

## (2) Kontakt kapi i medijuma za sušenje

Druga faza procesa sušenja, kontakt raspršenih kapi i medijuma za sušenje, determiniše brzinu i intenzitet sušenja. Vreme zadržavanja kapljica unutar komore za sušenje je određeno brzinom protoka napojne smeše i veličinom komore za sušenje. Kontakt između raspršenih kapljica i vreloug gasovitog medijuma može se ostvariti na više načina, pa se u zavisnosti od smera kretanja grejnoug medijuma i kapljica može razlikovati istostrujan i protivstrujan (Slika 18) (Oakley, 2004).



**Slika 18.** Kontakt napojne smeše i grejnoug medijuma (a) protivstrujni, (b) istostrujni (Oakley, 2004)

Kod istostrujnog smera kretanja, napojna smeša se raspršuje u istom smeru kao i strujanje grejnoug medijuma kroz uređaj, pri čemu ulazna temperatura toplog vazduha (obično 150–220 °C) obezbeđuje gotovo trenutno isparavanje, te je suvi prah izložen umerenim temperaturama (obično 50–80 °C) što ograničava termičku degradaciju. Kod protivstrujnog smera kretanja, napojna smeša se raspršuje u suprotnom smeru od strujanja toplog vazduha, pri čemu je suvi prah izložen visokim temperaturama što ograničava primenu ovog tipa sušenja kod termo-osetljivih jedinjenja. Glavna prednost protivstrujnog procesa je što se smatra za ekonomičniji u pogledu energetske potrošnje (Fleming, 1921).

### (3) Isparavanje rastvarača iz kapi

Sušenje kapljica napojne smeše u *spray drying* procesu nastaje kao rezultat istovremenog prenosa mase i toplote (Filkova i Mujumdar, 1995; Masters, 1985). Prilikom kontakta kapljica - vruć vazduh, između tečne i gasne faze uspostavlja se ravnoteža temperature i parcijalnog pritiska pare. Stoga se konvektivni prenos toplote vrši iz vazduha kao grejnog medijuma na kapljice kao rezultat razlike u temperaturi, dok se prenos vode vrši u suprotnom smeru zbog razlike pritiska pare. Na osnovu teorije sušenja mogu se razlikovati tri uzastopna koraka. Neposredno nakon kontakta vrućeg vazduha i napojne tečnosti, prenos toplote uglavnom izaziva porast temperature kapljica do konstantne vrednosti. Nakon toga se vrši isparavanje vode iz kapljica pri konstantnoj temperaturi i parcijalnom pritisku vodene pare. Brzina difuzije vode iz jezgra ka površini kapljica obično se smatra konstantnom i jednakom brzini isparavanja vode sa površine. Konačno, kada sadržaj vode u kapljicama dostigne kritičnu vrednost, na površini kapljice se formira suva kora, a brzina sušenja drastično opada sa napredovanjem sušenja i postaje zavisna od brzine difuzije vode kroz koru. Sušenje je teoretski završeno kada temperatura čestica postane jednaka temperaturi vazduha. Opisana tri koraka imaju različite dužine trajanja u zavisnosti od prirode proizvoda i ulazne temperature vazduha. Ako je temperatura ulaznog vazduha visoka, suva kora se brzo formira zbog velike brzine isparavanja vode. Usled velikog odnosa površina/zapremina raspršene kapljice, sušenje formirane kapljice u atmosferi vrelag vazduha je izuzetno kratkotrajan proces (Gharsallaoui i sar., 2007).

### (4) Separacija čvrstih čestica od gasa

Poslednja faza u sušenju je separacija čvrstih čestica od gasa i skupljanje praha u prihvatnom sudu. Samo razdvajanje se odvija u ciklonu koji je pozicioniran van komore za sušenje čime se redukuju gubici praha. Upotrebom ciklona obezbeđuje se inertna separacija faza, odnosno razdvajanje na osnovu razlike u gustini između faza. Ovaj koncept koristi prednost manje brzine čestica veće gustine u odnosu na vazduh kao medijuma manje gustine, kada su obe faze izložene vrtložnom rotacionom kretanju (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008). Najteže čestice se skupljaju u dnu komore za sušenje dok najlakše prolaze kroz ciklon gde se vrši separacija od vazduha (Gharsallaoui i sar., 2007). Pored ciklona, uređaj za *spray drying* je obično opremljen vrećastim filterima koji se koriste za uklanjanje najfinijih čestica praha (Bonazzi i Dumoulin, 2011).



### 2.7.2. Nosači

Dominantni procesni parametri koji utiču na sušenje su priroda i ulazna/izlazna temperatura napojne smeše, njen protok, tip atomizera, i priroda i koncentracija nosača primenjenog u sušenju (Finney i sar., 2002; Reineccius, 1988). Dobijanje visoko kvalitetnog praha tokom sušenja raspršivanjem je često izazov zbog njegove niske temperature ostakljavanja (eng. *glass transition temperature*; Tg) i higroskopne prirode, pa može dovesti do nastanka gumenastog i lepljivog krajnjeg proizvoda (Jaya i Das, 2009). Tg se može definisati kao temperatura na kojoj dolazi do prelaska amorfne strukture iz staklastog u gumenasto stanje termičkim procesima ili plastifikacijom vodom (Mani i sar., 2002). Temperatura ostakljavanja je značajno svojstvo za proizvode u formi prahu, jer je indikator kvaliteta proizvoda. Niska Tg može prouzrokovati fizičke promene tokom sušenja, prvenstveno lepljenje i zgrudvavanje tokom kojih se mogu javiti promene boje i arome, i smanjiti prinos procesa. Tri faktora koja direktno utiču na Tg proizvoda su: temperatura sušenja, vlaga i sastav proizvoda (Intipunia i Bhandari, 2010). Za optimalnu stabilnost, temperatura sušenja treba da bude ispod temperature ostakljavanja (Bhandari i sar., 1997, Fazaeli i sar., 2012). Sadržaj vlage takođe igra važnu ulogu u smanjenju Tg, jer je voda rastvarač sa najmanjom molekulskom masom i Tg od  $-135^{\circ}\text{C}$ . Iako većina praškastih proizvoda ima do 5% vlage, mali porast vlage (npr. 1%) može drastično smanjiti Tg (Fang i Bhandari, 2012). Problem lepljivosti praha je uglavnom uzrokovan prisustvom komponenti male molekulske mase, kao što su ugljeni hidrati (Tabela 7) i organske kiseline, koje poseduju nisku Tg.

**Tabela 7.** Temperatura ostakljavanja (Tg) različitih ugljenih hidrata

Ugljeni hidrat	Tg (°C)
Fruktoza	5
Glukoza	31
Galaktoza	32
Saharoza	62
Maltoza	87
Laktoza	101
Skrob	243

Efikasna proizvodnja suvog ekstrakta primenom *spray drying* tehnike ostvaruje se primenom nosača koji podižu Tg napojne smeše i na taj način onemogućavaju pojavu lepljivosti tokom sušenja i pojavu lepljivosti u krajnjem proizvodu – prahu. Odabirom odgovarajućeg nosača i njegove koncentracije utiče se na proces sušenja i karakteristike praha. Pored toga, selekcija adekvatnog nosača (mehanička čvrstoća, kompatibilnost sa prehrambenim proizvodom, odgovarajuća veličina čestica,

itd.) (Brazel, 1999) prilikom *spray drying* procesa je izuzetno bitna kako bi se izbegle nepoželjne promene praha usled oksidacije, hemijskih interakcija ili isparavanja (Alvarenga Botrel i sar., 2012).

Nosač ima ulogu i da zaštiti materijal jezgra čestica praha od faktora koji mogu prouzrokovati njegovu degradaciju, da spreči preranu interakciju između materijala jezgra i drugih sastojaka, da ograniči isparljive gubitke, i naposljetku da omogući kontrolisano oslobađanje pod željenim uslovima (Shahidi i Han, 1993). U zavisnosti od materijala jezgra i željenih karakteristika krajnjeg proizvoda, nosači se mogu izabrati iz širokog spektra prirodnih i sintetskih polimera. S obzirom da se većina *spray drying* sušenja u prehrambenoj industriji izvodi iz vodene formulacije napojne smeše, nosač mora biti rastvorljiv u vodi u prihvatljivoj meri (Gouin, 2004). Pored visoke rastvorljivosti, nosač treba da poseduje dobre osobine emulgovanja i formiranja filma, kao i da pokazuje nisku viskoznost čak i pri većim koncentracijama (Anker i Reineccius, 1988). Mnogi dostupni nosači poseduju ove karakteristike, ali je broj materijala odobrenih za prehrambenu upotrebu ograničen (Dziezak, 1988). Kao nosači koriste se biopolimeri iz različitih izvora, kao što su prirodne gume (arapska guma, alginati, karagenani, itd.), proteini (proteini iz mleka ili surutke, želatin, itd.), maltodekstrini sa različitim stepenom dekstroznog ekvivalenta, voskovi i njihove mešavine. Međutim, najčešće se koriste ugljeni hidrati velike molekulske mase, kao što su skrob i modifikovani skrob, maltodekstrini, arapska guma i ciklodekstrini. Glavna funkcija nosača je povećanje temperature ostakljavanja napojne smeše, što posledično smanjuje lepljivost praha, njegovo zaostajanje na zidovima (eng. *wall deposition*) i tendenciju ka aglomeraciji tokom sušenja i skladištenja, i sve zajedno dovodi do stabilnijeg proizvoda (Roos i Karel, 1991; Bhandari i sar., 1993; Oliveira i sar., 2010).

### 2.7.3. Maltodekstrini

Maltodekstrini su polimeri koji se dobijaju kiselim ili enzimskom hidrolizom skroba i sastoje se od jedinica D-glukoze koje su primarno povezane  $\alpha$ -1,4 vezama. Ovi proizvodi se klasifikuju po svom dekstroznom ekvivalentu (DE), koji predstavlja meru stepena hidrolize skroba i obrnuto je proporcionalan molekulskoj masi (Tabela 8) (De Oliveira i sar., 2009).

**Tabela 8.** Molekulske mase i Tg maltodekstrina različitih dekstroznih ekvivalenata

Nosač	DE	Molekulska masa (g/mol)	Tg (°C)
<b>Maltodekstrin</b>	36	500	100
	25	720	121
	20	900	141
	10	1800	160
	5	3600	188

Maltodekstrini su široko rasprostranjeni zahvaljujući relativno niskoj ceni, neutralnom mirisu i ukusu, niskom viskozitetu pri većim koncentracijama i odličnoj zaštiti enkapsuliranog materijala od oksidacije. Ograničavajući faktor u korišćenju ovog nosača je njegov nizak emulgujući kapacitet i granično zadržavanje isparljivih komponenata, te se često kombinuje sa drugim nosačima (Buffo i Reineccius, 2000; Krishnan i sar., 2005).

Uprkos tome, utvrđeno je da maltodekstrin ima sposobnost modifikovanja površinske lepljivosti niskomolekularnih šećera i organskih kiselina, pa je pogodan za proizvodnju prahova različitih vrsta materijala: riblje ulje, ulje mandarine, biljni ekstrakti, voćna pulpa, itd. (Martinelli i sar., 2007; Goula i Adamopoulos, 2008a; Goula i Adamopoulos, 2008b; Sansone i sar., 2011; Nadeem i sar., 2011; Caliskan i Dirim, 2016). Temperatura ostakljavanja i viskozitet su dva fizičko-hemijska parametra koji karakterišu ponašanje biopolimera u različitim prehrambenim i farmaceutskim aplikacijama (Avaltroni i sar., 2004; Roos i Karel, 1991). Među biopolimerima koji su od interesa za sušenje raspršivanjem, maltodekstrini su posebno korisni zbog svoje rastvorljivosti u vodi, male viskoznosti i visoke Tg nakon sušenja (Kenyon, 1995). Među širokim izborom komercijalno dostupnih maltodekstrina, izbor odgovarajućeg predstavlja kompromis između njegovih svojstava u rastvoru (pre sušenja) i njegovih svojstava u staklastom stanju (posle sušenja) (Marchal i sar., 1999).

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo, Tehnološki fakultet Novi Sad; u laboratoriji Katedre za mikrobiologiju, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad; u laboratoriji Instituta za farmaceutsku tehnologiju i regulatorne poslove, Segedin (Mađarska); u laboratoriji Katedre za projektovanje tehnoloških procesa i konstrukcijskih materijala, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek (Hrvatska) i laboratoriji Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd.

#### 3.1. Biljni materijal

*Marrubium vulgare* L. je plantažno gajen 2015. godine, na oglednom polju od strane lokalnog dobavljača gajenih biljaka "Chamomilla" (Banatski Karlovac, Srbija). Nadzemni deo biljke *M. vulgare* je osušen u tankom sloju na vazduhu. Nakon toga je skladišten u papirnim vrećama, na sobnoj temperaturi na tamnom i suvom mestu.

#### 3.2. Hemikalije

Sledeće hemikalije i reagensi su korišćeni za izradu doktorske disertacije: Folin-Ciocalteu reagens, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH<sup>\*</sup>), galna kiselina, katehin, ferulna kiselina, hlorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kafena kiselina, rutin, hiperozid, kvercetin, 5-hidroksi-2-metilfurfural, maltodekstrin (Sigma Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka); etanol (Sani-hem, Novi Bečej, Srbija); metanol (J. T. Baker, Deventer, Holandija); tehnički ugljendioksid ( $\geq 99,0$  %) i tehnički azot ( $\geq 99,0$  %) (Messer Tehnogas, Novi Sad, Srbija).  $\alpha$ -Amilaza iz svinjskog pankreasa,  $\alpha$ -glukozidaza iz *Saccharomyces cerevisiae*, 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid i akarboza su nabavljene od proizvođača Sigma (St. Louis, MO, USA). Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu su stepena analitičke čistoće.

#### 3.3. Uređaji

Za izradu ove doktorske disertacije korišćeni su sledeći uređaji:

- ✓ Uređaj za ekstrakciju ugljendioksidom u superkritičnom stanju (HPEP - High Pressure Extraction Plant) - NOVA Swiss, Effretikon, Švajcarska;
- ✓ Sistem za ekstrakciju subkritičnom vodom, sa regulatorom temperature - PARR Instrument Company, SAD;
- ✓ Ultrazvučno kupatilo EUP540A, Euinstruments, Francuska;

- ✓ Modifikovana kuhinjska mikrotalasna peć (NN-E201W, Panasonic, Japan);
- ✓ *Spray dryer* komora za sušenje - Anhydro, Danska;
- ✓ Peristaltička pumpa, magnetna mešalica - IKA Werke GmbH & Co. KG, Nemačka;
- ✓ Analitička vaga - Sartorius 2474, Nemačka;
- ✓ Vortex mikser - EV 100, Tehnica, Železniki, Slovenija;
- ✓ Mlin za kafu - Bosch, Nemačka;
- ✓ Vibracioni set sita - CISA, Cedaceria, Španija;
- ✓ Šejker sa termostatom - KS 4000, IKA, Staufen, Nemačka;
- ✓ Rotavapor - Devarot, Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija;
- ✓ Spektrofotometar - Jenway 6300 VIS, Velika Britanija;
- ✓ Uređaj za gasnu gromatografiju Agilent 7890B sa masenim spektrometrom (Agilent, Series 5977A, SAD);
- ✓ Uređaj za tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom (HPLC) - Agilent, SAD.

### 3.4. Ispitivanje biljnog materijala

#### 3.4.1. Određivanje veličine čestica usitnjenog biljnog materijala

Osušeni biljni materijal je usitnjen u mlinu za kafu. Usitnjena droga (100 g) je radi utvrđivanja veličine čestica prosejana kroz vibracioni set sita. Izmerena je masa droge koja je zaostala na svakom situ nakon prosejavanja, a srednji prečnik čestica je izračunat prema jednačini (Lepojević, 2000):

$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i} \quad (1)$$

gde je:

$m_i$  - maseni procenat  $i$ -te frakcije,

$d_i$  - srednji prečnik  $i$ -te frakcije.

#### 3.4.2. Određivanje sadržaja etarskog ulja

Sadržaj etarskog ulja u biljnom materijalu određen je po oficinalnoj metodi hidrodestilacije propisanoj po *Ph. Jug. V*, koristeći aparaturu po Clevenger-u.

#### 3.4.3. Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage (%) u biljnom materijalu je određen gravimetrijskim postupkom, na osnovu gubitka sušenjem (105 °C) do konstantne mase, koji propisuje *Ph. Jug. V*.

## 3.5. Ekstrakcija biljnog materijala

### 3.5.1. Konvencionalna ekstrakcija

Konvencionalna Č/T ekstrakcija je izvršena u cilju određivanja eksperimentalnog opsega za koncentraciju etanola koja je korišćena za optimizaciju ultrazvučne i mikrotalasne ekstrakcije. U svim eksperimentima 10 g *M. vulgare* je ekstrahovano sa 100 mL različitog ekstragensa. Ekstrakcije su rađene na temperaturi od 25 °C tokom 24 h na laboratorijskom šejkeru sa termostatom uz konstantno mešanje (150 rpm) (KS 4000, IKA, Staufen, Nemačka). Kao ekstragens je korišćena voda i smeša etanol-voda (30, 50, 70 i 96%; m/m). Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom (V-700, Büchi, Switzerland), zatim prebačeni u staklene bočice i čuvani na 4 °C do analize. Poznata zapremina tečnog ekstrakta (5 mL) je prenesena u prethodno izmereni balon i sadržaj balona je uparavan do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Dobijeni ekstrakt je osušen u sušnici na temperaturi od 105 °C do konstantne mase. Prinos ekstrakcije je izražen kao % (g/100 g droge).

### 3.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija

U svim eksperimentima, 10 g *M. vulgare* je odmereno u erlenmajer (250 mL) i zatim dodato 100 mL 50% etanola. Ekstrakcije su rađene u ultrazvučnom kupatilu (EUP540A, Euinstruments, Francuska), prikazanom na slici 19, sa konstantnom frekvencijom od 40 kHz.



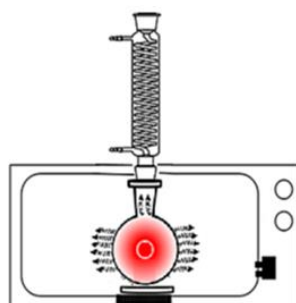
Slika 19. Uređaj korišćen za UAE

(<https://www.topdiesel.com/yo/dual-frequency-series-28khz40khz-digital-timerheater.html>)

Temperatura (40, 60 i 80 °C), vreme ekstrakcije (40, 60 i 80 min) i snaga ultrazvuka (24, 42 i 60 W/L) su kontrolisani preko kontrolne table uređaja. Na erlenmajer je postavljen povratni kondenzator kako bi se sprečilo eventualno isparavanje ekstragensa. Erlenmajeri su uvek postavljeni na istom rastojanju u odnosu na emiter ultrazvuka, dok dodatno mešanje tokom ekstrakcije nije primenjivano. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom, sakupljeni u staklene bočice i čuvani na 4 °C do analize.

### 3.5.3. Mikrotalasna ekstrakcija

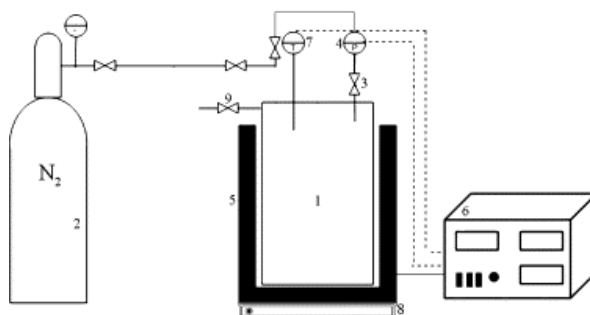
Za mikrotalasnu ekstrakciju je korišćena modifikovana kuhinjska mikrotalasna peć (NN-E201W, Panasonic, Japan) u koju je postavljen stakleni balon sa povratnim kondenzatorom (Slika 20). U svim eksperimentima, 10 g *M. vulgare* pomešano je sa zapreminom ekstragensa od 100 mL. Sve ekstrakcije su rađene na konstantnoj frekvenciji. Baloni su uvek postavljeni na istom rastojanju od magnetrona, dok dodatno mešanje tokom ekstrakcije nije primenjivano. Nezavisne promenljive u ovom procesu bile su koncentracija etanola (40, 60 i 80%), vreme ekstrakcije (10, 20 i 30 min) i snaga mikrotalasa (400, 600 i 800 W). Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom, preneti u staklene bočice i čuvani na 4 °C do analize.



**Slika 20.** Šema modifikovane mikrotalasne peći korišćene za MAE (Quintero Quiroz i sar., 2019)

### 3.5.4. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE) je rađena u šaržnom visoko-pritisnom ekstraktoru (Parr Instrument Company, SAD) unutrašnje zapremine 450 mL i maksimalnim radnim pritiskom i temperaturom 200 bar i 350 °C. Ekstraktor je povezan sa temperaturnim kontrolerom (4838, Parr Instrument Company, SAD). Šematski prikaz sa glavnim delovima uređaja je dat na slici 21 (Zeković i sar., 2014).

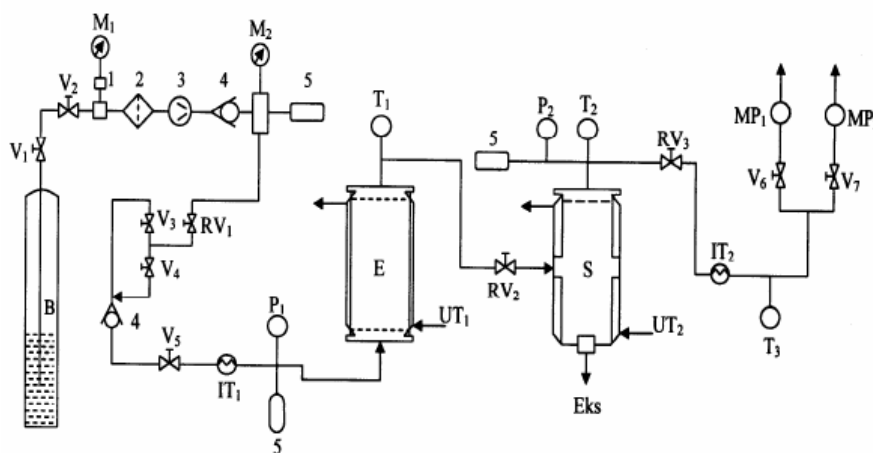


**Slika 21.** Šematski prikaz šaržnog SWE ekstraktora: 1. ekstraktor; 2. boca sa azotom; 3. ulazni ventil za gas; 4. manometar; 5. električna grejna obloga; 6. temperaturni kontroler; 7. temperaturna sonda; 8. magnetna mešalica; 9. izlazni ventil za gas.

U svim eksperimentima, 10 g *M. vulgare* je pomešano sa 100 mL rastvarača (destilovana voda ili odgovarajući rastvor HCl) u ekstraktoru (1). Radni pritisak je postignut uvođenjem azota iz boce (2) kroz ventil (3) i meren je manometrom (4). Azot je primenjen za postizanje radnog pritiska kako bi se sprečila potencijalna oksidacija do koje može doći na povišenoj temperaturi u prisustvu kiseonika iz vazduha. Ekstraktor je zagrevan grejnom oblogom (5), a temperatura je merena i kontrolisana preko kontrolne table (6), povezane sa temperaturnom sondom (7). Magnetna mešalica (8) (1000 rpm) je korišćena za ubrzavanje prenosa mase i toplote, kao i za sprečavanje lokalnog pregrevanja na zidovima ekstraktora (Zeković i sar., 2014). Temperatura (120, 160 i 200 °C), vreme ekstrakcije (10, 20 i 30 min) i koncentracija HCl u ekstragenu (0, 0,75 i 1,5%) su bile nezavisne promenljive, dok su svi ostali parametri procesa bili konstantni. Nakon ekstrakcije, ekstraktor je ohlađen u ledenom kupatilu do 30 °C i azot je ispušten kroz ventil (9). Zatim su ekstrakti profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom, sakupljeni u staklene bočice i čuvani na 4 °C do analize.

### 3.5.5. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom

Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom je vršena na laboratorijskom postrojenju za visoko-pritisnu ekstrakciju (HPEP, NOVA – Swiss), čija je šema prikazana na slici 22.



**Slika 22.** Šematski prikaz uređaja za ekstrakciju superkritičnim ugljendioksidom: 1. Merni konektor; 2. Filter; 3. Kompresor sa dijafragmom; 4. Kontrolni ventil; 5. Sigurnosni ventil; B - Boca sa ugljendioksidom; V - Ventil; M - Manometar; RV - Regulatorni ventil; IT - Izmenjivač toplote; P - Manometar; E - Ekstraktor; T - Termometar; UT - Ultratermostat; S - Separator; Eks - Ekstrakt; MP - Rotametar (Zeković, 1998)

Ekstraktor (E) je prvo napunjen odmerenom masom *M. vulgare* (40 g). Biljni materijal u ekstraktoru se najpre oslobađa prisutnog vazduha produvavanjem ugljendioksida iz boce (B) u gasovitom stanju, nakon čega se zatvore ventil (V<sub>5</sub>) i regulatorni ventil (RV<sub>2</sub>). Ultratermostatima



(UT<sub>1</sub>) i (UT<sub>2</sub>) se održavaju radne temperature u ekstraktoru (E) i separatoru (S) pri zatvorenom ventilu (V<sub>1</sub>) boce sa ugljendioksidom. Zatim se, nakon otvaranja ventila od V<sub>1</sub> do V<sub>5</sub> (V<sub>4</sub> je zatvoren), kompresor na kome je grubo podešen radni pritisak pusti u pogon i regulacionim ventilom (RV<sub>1</sub>) se podese radni pritisak na tačnu vrednost. Ugljendioksid se nakon prolaska kroz izmenjivač toplote (HE) otvaranjem ventila (V<sub>5</sub>) uvodi u ekstraktor, pri čemu je regulacioni ventil (RV<sub>2</sub>) zatvoren. Otvaranjem i podešavanjem regulacionih ventila (RV<sub>2</sub>) i (RV<sub>3</sub>) se ostvaruje željeni pritisak u separatoru, kao i održavanje radnog protoka ekstragensa (Zeković, 1998). Ekstrakcije su vršene 4 h tokom kojih je praćena kinetika tako što je određivan prinos ekstrakcije nakon 30, 60, 90, 120, 180 i 240 min izražen kao % (m/m). Ekstrakcije su izvedene pri različitim kombinacijama pritiska (100, 200 i 300 bar) i temperature (40, 50 i 60 °C), a pri konstantnom protoku ugljendioksida (0,3 kg/h). Dobijeni ekstrakti su preneti u staklene bočice koje su čuvane na temperaturi od 4 °C do hemijske analize.

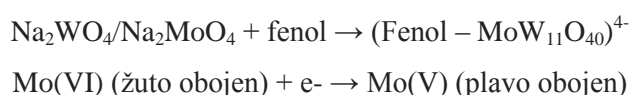
### 3.5.6. Soxhlet ekstrakcija

Usitnjena droga (8 g) je prenesena u ekstrakcionu čauru koja je postavljena u Soxhlet ekstraktor na koji je povezan povratni kondenzator. U balon je zatim dodat metilen hlorid (150 mL) koji je korišćen kao ekstragens. Cirkulaciona ekstrakcija sa povremenim ispuštanjem ekstrakta, odnosno Soxhlet ekstrakcija, se odvija tako što se sadržaj balona zagreva pri čemu pare rastvarača prolaze kroz cev ekstraktora, kondenzuju se u povratnom kondenzatoru i vraćaju u telo ekstraktora gde se odvija ekstrakcija. Kada se telo ekstraktora napuni ekstragensom, sadržaj se preliva preko sifona u balon i postupak sifoniranja se ponavlja između 15 i 18 puta do iscrpljenja uzorka (Lepojević, 2000). Nakon završene ekstrakcije rastvarač je uklonjen iz ekstrakta uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču do suva i određen je prinos ekstrakcije (% m/m).

### 3.6. Hemijska karakterizacija tečnih ekstrakata

#### 3.6.1. Sadržaj ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (TP) u tečnim ekstraktima *M. vulgare* određen je spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rosi, 1965). Ova metoda se zasniva na merenju redukcionog kapaciteta polifenolnih jedinjenja. Disocijacijom polifenola nastaju proton i fenoksidni anjon koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona:



Odgovarajuće razblaženje tečnog ekstrakta *M. vulgare* (0,1 mL) je pomešano sa 7,9 mL destilovane vode, 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 mL 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . U pripremi slepe probe je umesto 0,1 mL uzorka dodato 0,1 mL destilovane vode, ili odgovarajuće smeše etanol-voda koja je korišćena kao ekstragens u Č/T ekstrakciji. Reakciona smeša je inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi i apsorbanca uzorka je izmerena na 750 nm. Prinos TP u postupcima Č/T ekstrakcije je izražen u mg ekvivalenta galne kiseline po g suvog ostatka (mg EGK/g S.O.). Sva merenja su izvršena u tri ponavljanja.

#### 3.6.2. Sadržaj ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida (TF) u tečnim ekstraktima *M. vulgare* određen je spektrofotometrijskom metodom po Markham-u (Harborne, 1989). Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida zasnovano je na njihovoj sposobnosti da sa metalima grade odgovarajuće metalo-organske komplekse. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 1 mL uzorka (odgovarajuće razblaženje tečnog ekstrakta) sa 4 mL destilovane vode i 0,3 mL 5%  $\text{NaNO}_2$ . Smeša se zatim inkubira na sobnoj temperaturi 6 min i u nju se dodaje 0,3 mL 10%  $\text{AlCl}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ , zatim se nakon 5 min dodaje 2 mL 1 M NaOH. Dobijena smeša se dopuni destilovanom vodom (3,4 mL) do ukupne zapremine 10 mL. Kao slepa proba koristi se smeša u koju je umesto 1 mL uzorka dodato 1 mL rastvarača (destilovana voda ili odgovarajuća smeša etanol-voda). Apsorbanca uzorka je očitana na talasnoj dužini od 510 nm i sva merenja su izvršena u tri ponavljanja. Prinos TF u postupcima Č/T ekstrakcije je izražen u mg ekvivalenta katehina po g suvog ostatka (mg EK/g S.O.).

### 3.6.3. HPLC analiza fenolnih kiselina i hidroksimetil furfurala (HMF)

Sadržaj fenolnih kiselina u tečnim ekstraktima (UAE, MAE, MAC i SWE) i 5-hidroksi-2-metilfurfurala (HMF) u subkritičnim ekstraktima *M. vulgare* je analiziran pomoću Agilent 1200 Series HPLC sa DAD detektorom (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) opremljenog sa LiChrospher® 100 RP-18 kolonom (250 × 4 mm, 5 µm). Binarna mobilna faza se sastojala od 0,17% vodenog rastvora mravlje kiseline (A) i acetonitrila (B). Injekciona zapremina uzorka je 10 µL i brzina protoka 0,8 mL/min, a eluiranje je vršeno gradijentom po sledećoj šemi: 0–53 min, 0–100% B. Detekciona talasna dužina podešena je na 280 nm za HMF, odnosno na opseg 200–400 nm za fenolne kiseline. Ispitivani uzorci su analizirani u tri nezavisna ponavljanja. Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu poređenja retencionih vremena i apsorpcionih spektara nepoznatih pikova sa referentnim standardima (ferulna kiselina, hlorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kafena kiselina, rutin, hiperozid, kvercetin, HMF). Prahovi, odnosno suvi ekstrakti su rastvoreni u metanolu (1:10, m/v) i filtrirani neposredno pre analize, dok su tečni uzorci analizirani bez dodatne pripreme.

## 3.7. Hemijska karakterizacija lipofilnih ekstrakata

### 3.7.1. GC–MS analiza isparljivih komponenti

Za analize je korišćen gasni hromatograf Agilent 7890B zajedno sa masenim spektrometrom (Agilent, Series 5977A, SAD). Komponente lipofilnih ekstrakata *M. vulgare* razdvojene su na kapilarnoj koloni HP-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) (19091 S - 433 UI-INT, Agilent Technologies, USA). Temperatura injektora podešena je na 250 °C i za 3 µL svakog injektiranog uzorka rađeno je u *split* modu od 1:50. Kao gas nosač korišćen je helijum čistoće 99,99%, u režimu konstantnog protoka od 1 mL/min. Postavljen je sledeći temperaturni program: temperatura na 70 °C (2 min), zatim je povećana na brzinu od 3 °C/min do postizanja 200 °C i održavana konstantnom 18 min. Razdvojene komponente su analizirane na masenom spektrometru pri energiji elektrona 70eV sa rasponom skeniranja u m/z opsegu 30–450. Temperatura jonskog izvora iznosila je 230 °C, a temperatura kvadrupola 150 °C. Analiza svakog uzorka je izvedena u tri ponavljanja i izračunate su srednje vrednosti.

### 3.8. Biološka aktivnost tečnih ekstrakata

#### 3.8.1. Antioksidativna aktivnost

##### (1) Sposobnost neutralizacije DPPH radikala (DPPH test)

Sposobnost neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH<sup>\*</sup>) ekstraktima *M. vulgare* određena je spektrofotometrijskom metodom po Espinu (Espin i sar., 2000). Metoda se zasniva na praćenju promene boje rastvora DPPH<sup>\*</sup> radikala (ljubičasto obojen) u njegov redukovan oblik (DPPH-H) koji je žuto obojen. Različite zapremine prethodno pripremljenih ekstrakata *M. vulgare* su pomešane sa 95% metanolom tako da zajedno čine 3 mL i dodat je 1 mL rastvora 90 μM 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala. Prilikom pripremanja slepe probe umesto uzorka dodat je rastvarač. Nakon 1 h inkubacije na sobnoj temperaturi izmerena je apsorbanca na 515 nm. Sva merenja su izvršena u tri ponavljanja i rezultat je izražen kao srednja vrednost. Rezultati antioksidativne aktivnosti za tečne ekstrakte su izraženi kao IC<sub>50</sub> (mg/mL), što predstavlja koncentraciju koja dovodi do neutralizacije 50% DPPH radikala u reakcionoj smeši. RSC (eng. *Radical Scavenging Capacity*) vrednost je izražena u procentima (%RSC) i zračunata prema sledećoj jednačini:

$$\% \text{ RSC} = 100 - \frac{A_{uz} 100}{A_{sp}} \quad (2)$$

gde su *A<sub>uz</sub>* - apsorbanca uzorka, *A<sub>sp</sub>* - apsorbanca slepe probe.

##### (2) Redukcioni kapacitet (FRAP test)

Redukciona moć (eng. *reducing power*) tečnih ekstrakata *M. vulgare*, dobijenih ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom, određena je spektrofotometrijskom metodom po Oyaizu (Oyaizu, 1986). Odgovarajuće razblaženje tečnog ekstrakta *M. vulgare* (1 mL) je pomešano sa fosfatnim puferom (1 mL; 0,2 M i pH 6,6) i 1% rastvorom kalijum fericijanida (1 mL). Tako dobijen rastvor je inkubiran na 50 °C tokom 20 min. Nakon inkubacije, u reakcionu smešu je dodat 1 mL 10% rastvora trihlorsirćetne kiseline. Kivete sa uzorcima su zatim centrifugirane 10 min na 3000 o/min. Nakon toga, supernatant (2 mL) je pomešan sa 2 mL bidestilovane vode i 0,4 mL 0,1% rastvora FeCl<sub>3</sub>. Apsorbanca je izmerena na 700 nm i sva merenja su izvršena u tri ponavljanja. Slepa proba je pripremljena na isti način osim što je umesto ekstrakta dodata ista zapremina destilovane vode. Kao mera redukcionne moći koristi se EC<sub>50</sub> vrednost (mg/mL) koja predstavlja koncentraciju ispitivanog uzorka pri kojoj se postiže apsorbanca od 0,5 pri navedenim uslovima analize.

### 3.8.2. Antimikrobna aktivnost

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti tečnih ekstrakata *M. vulgare* (dobijenih primenom UAE, MAE i MAC tehnike) korišćeno je 9 bakterijskih sojeva, od čega je 5 pripadalo Gr+ bakterijama, a 4 Gr- bakterijama, kao i 2 soja kvasaca, a primenjena je mikrodiluciona metoda prema protokolu (CLSI, 2007).

#### Bakterijski sojevi:

1. *Bacillus cereus* ATCC 11778 (Gr+)
2. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gr+)
3. *Bacillus subtilis* PY79 (Gr+)
4. *Staphylococcus epidermidis* JR-07 (Gr+)
5. *Micrococcus luteus* JR-10 (Gr+)
6. *Escherichia coli* ATCC 11775 (Gr-)
7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Gr-)
8. *Proteus mirabilis* ATCC 12453 (Gr-)
9. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 31488 (Gr-)

#### Sojevi kvasaca:

1. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763
2. *Candida albicans* ATCC 10231

Suvi ekstrakti su rastvoreni u dimetilsulfoksidu u koncentraciji od 100 mg/mL, kako bi početna koncentracija u ćeliji mikrotitar ploče (12 × 8) bila 50 mg/mL (tako što se 50 µL ekstrakta koncentracije 100 mg/ml u prvoj ćeliji mikrotitar ploče pomeša sa 50 µL suspenzije mikroorganizama u hranljivom bujonu i na taj način duplo razblaži). Zatim je u sve ćelije mikrotitar ploča pipetirano po 50 µL destilovane vode, osim u prvi red. U prvi red mikrotitar ploča dodato je po 100 µL ekstrakta. Zatim je iz prvog reda prebačeno 50 µL ekstrakta i pomešano sa vodom u drugom redu, i na taj način dobijena duplo manja koncentracija ekstrakta u drugom redu. Iz drugog reda je na isti način prebačeno 50 µL ekstrakta u treći red i pomešano sa vodom. Postupak je ponavljan do 11. reda ćelija, te je u svakom narednom dobijena duplo manja koncentracija od prethodne (koncentracije su iznosile 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39; 0,195; 0,098 i 0,049 mg/mL, redom). Poslednji 12. red ćelija je rezervisan za kontrolu hranljive podloge – 50 µL destilovane vode je pomešano sa 50 µL podloge. Zatim su u ćelije mikrotitar ploča dodati mikroorganizmi. Kulture su gajene preko noći na 37 °C (30 °C za *Bacillus* i *Saccharomyces*) na hranljivom agaru za bakterije i Sabouroud maltoznom agaru za kvasce. Od kolonija ispitivanih bakterija napravljene su suspenzije u epruvetama sa sterilnim fiziološkim rastvorom, tako da je gustina svake pojedinačne bakterijske suspenzije odgovarala McFarland standardu 0,5. Suspenzija bakterija koja po gustini odgovara McFarland standardu 0,5 sadrži približno 10<sup>8</sup> CFU/mL (eng. *colony-forming unit*; CFU). Primenjeni metod predstavlja modifikaciju klasičnog antibiogram testa (Prabuseenivasan i sar., 2006). Kako bi početna brojnost mikroorganizama bila 10<sup>6</sup> CFU/mL, napravljene suspenzije su razblažene mešanjem sa podlogom.

Tako napravljena smeša suspenzije i podloge pipetirana je u sve ćelije koje su predviđene za dati mikroorganizam (aliquot od 50  $\mu\text{L}$ ). Postavljena je negativna kontrola – niz koncentracija ekstrakta – po 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta (isto kao što je već opisano, mešanje ekstrakta sa vodom) i 50  $\mu\text{L}$  čistog hranljivog bujona, bez mikroorganizama. Postavljena je i kontrola rasta mikroorganizama – 50  $\mu\text{L}$  vode i 50  $\mu\text{L}$  suspenzije mikroorganizama u hranljivom bujonu (za svaku vrstu u po dva ponavljanja, tj. u dve ćelije). Inkubacija je vršena na 37 °C tokom 24 h. Nakon inkubacije očitane su vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za svaki soj (prva ćelija u kojoj nema vidljivog rasta).

Dalje je za svaki soj iz ćelije u kojoj je zabeležena MIC koncentracija i svih ćelija sa većom koncentracijom od te, pipetiran aliquot od 5  $\mu\text{L}$  spot metodom na ploče sa hranljivim agarom. Inkubacija je vršena na 37 °C tokom 24 h. Nakon inkubacije, za svaki soj je određena minimalna baktericidna koncentracija (MBC), odnosno najniža koncentracija na kojoj nema rasta na hranljivom agaru. Antimikrobna aktivnost svakog ekstrakta je za svaki soj ispitana u dva ponavljanja.

### 3.8.3. Antihyperglikemijska aktivnost

#### (1) Inhibitorni potencijal $\alpha$ -amilaze ( $\alpha$ -AIP)

Ispitivanje inhibicije  $\alpha$ -amilaze urađeno je po postupku opisanom od strane Johnson i sar. (2011), uz manje modifikacije. Akarboza (generički antidijabetički lek) je korišćena kao pozitivna kontrola koja je inhibirala  $\alpha$ -amilazu na dozno-zavisani način, obezbeđujući  $\text{IC}_{50}^{\alpha\text{-AIP}}$  vrednost od 80  $\mu\text{g/mL}$ . Ukratko, 100  $\mu\text{L}$  uzorka, pozitivne kontrole (2 mM akarboze) ili negativne kontrole (destilovana voda) je dodato u 200  $\mu\text{L}$  rastvora  $\alpha$ -amilaze u 0,02 M natrijum fosfatnom puferu (pH 6,9). Epruvete su inkubirane na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min. Nakon toga, 200  $\mu\text{L}$  1% rastvora skroba (pripremljenog u istom puferu) je dodato u svaku epruvetu i inkubirano 6 min. Konačno, 100  $\mu\text{L}$  dinitrosalicilne kiseline (bojeni reagens) je dodato, i epruvete su postavljene u vodeno kupatilo na 100 °C i inkubirane 5 min. Zapremina od 1600  $\mu\text{L}$  destilovane vode je dodata u smešu, i absorbanca je izmerena na talasnoj dužini od 540 nm (T80 UV-Vis Spectrophotometer PG instruments LTD, UK) u tri ponavljanja. Procenat inhibicije je izračunat prema sledećoj jednačini:

$$\% \text{ Inhibicija} = \frac{\Delta Ak - \Delta Auz}{\Delta Ak} \times 100 \quad (3)$$

gde su  $\Delta Ak$  i  $\Delta Auz$  razlike u absorbcama kontrole i uzorka.

## (2) Inhibitorni potencijal $\alpha$ -glukozidaze ( $\alpha$ -GIP)

Test za ovu metodu je opisan od strane Chan i sar. (2010). Akarboza (pozitivna kontrola) je inhibirala  $\alpha$ -glukozidazu na dozno-zavisnan način, obezbeđujući  $IC_{50}^{\alpha-GIP}$  vrednost od 27  $\mu\text{g/mL}$ . U ćelije mikrotitar ploče ( $12 \times 8$ ) je odmereno po 100  $\mu\text{L}$  2 mmol/L 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozida u 10 mmol/L puferu kalijum fosfata (pH 7,0) i 20  $\mu\text{L}$  uzorka. Reakcija je inicirana nakon dodatka 100  $\mu\text{L}$  rastvora enzima. Paralelno sa uzorcima pripremljene su i analizirane kontrolna i slepa proba. Mikrotitar ploče sa uzorcima su inkubirane 10 min na temperaturi 37 °C, nakon čega je izmerena apsorbanca na 405 nm (T80 UV-Vis Spectrophotometer PG instruments LTD, UK) u tri ponavljanja, a rezultat izražen kao srednjaj vrednost. Procenat inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze je izračunat prema sledećoj jednačini:

$$\% \text{ Inhibicija} = \frac{\Delta Ak - \Delta Auz}{\Delta Ak} \times 100 \quad (4)$$

gde su  $\Delta Ak$  i  $\Delta Auz$  razlike u absorbancama kontrole i uzorka, pre reakcije i nakon 10 min inkubacije.

### 3.9. Eksperimentalni dizajn i optimizacija ekstrakcije

Za analizu uticaja parametara savremenih ekstrakcionih tehnika (UAE, MAE i SWE) na ispitivane odzive i optimizaciju ekstrakcije *M. vulgare* korišćena je metoda odzivne površine (eng. *response surface methodology*; RSM). RSM predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika koje se zasnivaju na fitovanju eksperimentalnih vrednosti polinomnim jednačinama, koje opisuju ponašanje skupa podataka sa ciljem izrade statističkih predviđanja (Baş i Boyacı, 2007). Ova metoda se često primenjuje kada se ispituje uticaj više procesnih parametara na jedan ili više odziva, u cilju njihove istovremene optimizacije i dobijanja željenih vrednosti odziva (Bezerra i sar., 2008). Budući da potpuni faktorijalni dizajn na tri nivoa za više od dve promenljive ( $N = 3^k$ , gde je N broj eksperimenata a k je broj promenljivih) zahteva više eksperimentalnih ciklusa nego što se obično može izvesti u praksi usled ograničenih resursa, dizajni koji predstavljaju manji broj eksperimentalnih tačaka, kao što su Box-Behnken i centralni kompozitni, se daleko češće koriste (Morris, 2000). Glavne karakteristike Box-Behnken eksperimentalnog dizajna (BBD) su (Bezerra i sar., 2008):

- ✓ Jednačina  $N = 2k(k - 1) + C_p$ , gde je  $C_p$  broj ponavljanja u centralnoj tački, se koristi za određivanje broja eksperimenata i
- ✓ Nezavisne promenljive su raspoređene na tri nivoa (-1, 0, 1) sa jednakim rastojanjem između njih.

Svaka primenjena tehnika je posebno optimizovana pri čemu je ispitan uticaj najvažnijih parametara procesa na različite odzive. U svim slučajevima je korišćen BBD sa tri numerička faktora

na tri nivoa. Dizajn se sastojao od 17 eksperimenata sa pet ponavljanja u centralnoj tački kod UAE i MAE tehnika, odnosno od 15 eksperimenata sa tri ponavljanja u centralnoj tački kod SWE. U daljem tekstu ekstrakti dobijeni na optimalnim uslovima ultrazvučne ekstrakcije označavaće se skraćenicom UAEopt, na optimalnim uslovima mikrotalasne ekstrakcije MAEopt i SWEopt na optimalnim uslovima subkritične ekstrakcije vodom. U Tabeli 9 je dat eksperimentalni dizajn sa realnim i kodiranim parametrima ekstrakcije za ispitivane tehnike.

**Tabela 9.** Box-Behnken eksperimentalni dizajn sa realnim i kodiranim vrednostima parametara ispitivanih ekstrakcionih tehnika

Ekstrakciona tehnika	Nezavisno promenljiva	Kodirana vrednost		
		-1	0	1
		Realna vrednost		
<b>Ultrazvučna ekstrakcija (UAE)</b>	Temperatura (°C)	40	60	80
	Vreme ekstrakcije (min)	40	60	80
	Snaga ultrazvuka (W/L)	24	42	60
<b>Mikrotalasna ekstrakcija (MAE)</b>	Koncentracija etanola (%)	30	50	70
	Vreme ekstrakcije (min)	15	25	35
	Snaga mikrotalasa (W)	400	600	800
<b>Ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE)</b>	Temperatura (°C)	120	160	200
	Vreme ekstrakcije (min)	10	20	30
	Koncentracija HCl (%)	0	0,75	1,5

Sve nezavisne promenljive su kodirane tako da budu u opsegu od -1 do 1, u cilju normalizacije parametara kako bi njihove jedinice bile zanemarljive (Baş and Boyacı, 2007):

$$X = \frac{Xi - Xo}{\Delta X} \quad (5)$$

gde  $X$  predstavlja kodiranu vrednost,  $Xi$  realnu vrednost,  $Xo$  realnu vrednost u centralnoj tački i  $\Delta X$  razliku maksimalne i centralne vrednosti nezavisne promenljive. Ispitivani odzivi su fitovani kvadratnim polinomom prema jednačini (Ferreira i sar., 2007):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (6)$$

gde je  $Y$  odziv,  $X_i$  i  $X_j$  su stvarne ili kodirane nezavisno promenljive, a  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  i  $\beta_{ij}$  su regresioni koeficijenti za srednju vrednost, linearne, kvadratne i članove interakcije. Optimalni uslovi ekstrakcije su određeni primenom poželjne funkcije,  $D$  (eng. *desirability function*;  $D$ ) (Derringer, 1980) i analize linearne regresije, a u tu svrhu je korišćen Design-Expert v.7 Trial (Stat-Ease,



Minneapolis, Minnesota, USA) softver. Rezultati su statistički tretirani analizom varijanse (ANOVA), dok je adekvatnost modela određena koeficijentom determinacije ( $R^2$ ), koeficijentom varijacije (CV) i  $p$ -vrednostima za model i nedostatak prilagođavanja (eng. *lack of fit*). U cilju provere predviđenih vrednosti odziva na optimalnim uslovima ekstrakcije, izvršena je validacija i eksperimentalno dobijene vrednosti odziva su poredene sa 95% intervalom poverenja za predviđene vrednosti.

### 3.10. Dobijanje suvih ekstrakata *spray drying* tehnikom

Dobijeni tečni ekstrakti *M. vulgare* (primenom UAE i MAE tehnike), na optimizovanim uslovima procesnih parametara, i tečni macerat sa 50% etanolom kao ekstragensom su korišćeni kao napojna smeša za sušenje *spray drying* tehnikom na poluindustrijskom uređaju (APV Anhydro AS, Danska). Tečni ekstrakti su u *spray dryer* transportovani peristaltičkom pumpom (FH100 Series, Thermo Scientific, USA). Za sušenje MAC i MAE uzoraka uzeta je zapremina od 1000 mL po uzorku, dok je za sušenje UAE uzorka uzeta zapremina od 1490 mL po uzorku. Pre sušenja, napojna smeša je zagrejana na 40 °C i održavana na toj temperaturi tokom trajanja procesa sušenja. Za atomizaciju tečnih ekstrakata korišćena je dizna pod pritiskom ( $p = 3$  bar), odnosno dizna sa dva fluida. Nakon sušenja, tj. ispravljanja rastvarača, suvi ekstrakt je odvojen od toplog vazduha u ciklonu i sakupljen u prihvatnom sudu. Maltodekstrin (DE 16,5) je korišćen kao nosač kod sušenja svih ekstrakata. Dodate koncentracije maltodekstrina od 10 i 50% su izračunate u odnosu na suvi ostatak tečnih ekstrakata. Neposredno pred sušenje rastvor maltodekstrina je pomešan sa ekstraktom, homogenizovan uz mešanje napojne smeše magnetnom mešalicom, koje je nastavljeno tokom celog *spray drying* procesa. Vrednosti ulazne i izlazne temperature su kontrolisane tokom celog procesa sušenja (Tabela 10).

**Tabela 10.** Vrednosti ulazne ( $T_u$ ) i izlazne temperature ( $T_i$ ) tokom sušenja tečnih ekstrakata

Uzorak	MD (%)	$T_u$ (°C)	$T_i$ (°C)
<b>P UAE-10</b>	10	130	78-80
<b>P UAE-50</b>	50	130	78-80
<b>P MAE-10</b>	10	130-135	78-80
<b>P MAE-50</b>	50	130	78-80
<b>P MAC-10</b>	10	130-135	78-80
<b>P MAC-50</b>	50	130-135	78-80

Dobijeni suvi ekstrakti gde je ultrazvučni ekstrakt na optimalnim uslovima korišćen kao napojna smeša uz dodatak 10 i 50% maltodekstrina su u daljem tekstu obeležavani sa P UAE-10 i P UAE-50, gde je mikrotalasni ekstrakt na optimalnim uslovima korišćen sa P MAE-10 i P MAE-50, i gde je macerat sa 50% etanolom kao ekstragensom korišćen sa P MAC-10 i P MAC-50. Svi suvi

ekstrakti su preneti u staklene posude, zatvorene poklopcem i parafilmom, i tako čuvani u eksikatoru na sobnoj temperaturi.

### **3.10.1. Priprema napojne smeše**

#### **(1) Maceracija**

Konvencionalna Č/T ekstrakcija, odnosno maceracija, je izvršena primenom etanola (50%) kao ekstragensa na temperaturi od 25 °C tokom 24 h na laboratorijskom šejkeru sa termostatom uz konstantno mešanje (150 rpm) (KS 4000, IKA, Staufen, Nemačka). Nakon isteka 24 h, ekstrakt (MAC) je profiltriran kroz filter papir pod vakuumom i u plastičnoj boci čuvan na 4 °C do dalje upotrebe. Zapremina dobijenog ekstrakta je iznosila 2000 mL.

#### **(2) Ultrazvučna ekstrakcija**

Ekstrakcija je izvršena primenom etanola (50%) na optimalnim uslovima koji predviđaju maksimalan prinos polifenola: temperatura od 73,6 °C, vreme ekstrakcije od 40 min i snaga ultrazvuka od 30,3 W/L. Nakon isteka 40 min, ekstrakt je profiltriran kroz filter papir pod vakuumom i u plastičnoj boci čuvan na 4 °C do dalje upotrebe. Zapremina dobijenog ekstrakta je iznosila 2980 mL.

#### **(3) Mikrotalasna ekstrakcija**

Ekstrakcija je izvršena na optimalnim uslovima koji predviđaju maksimalan prinos polifenola: koncentracija etanola od 63,8%, vreme ekstrakcije od 15 min i snaga mikrotalasa od 422 W. Podešavanje snage mikrotalasa na mikrotalasnoj peći korišćenoj za MAE je izvršeno na 420 W kao najbližoj vrednosti snage onoj koja predviđa maksimalan prinos (422 W). Nakon isteka 15 min, ekstrakt je profiltriran kroz filter papir pod vakuumom i zapremina dobijenog ekstrakta je iznosila 2000 mL. Ekstrakt je u plastičnoj boci čuvan na 4 °C do dalje upotrebe.

### **3.10.2. Efikasnost *spray drying* procesa**

Efikasnost sušenja predstavlja odnos mase dobijenog suvog ekstrakta i očekivane teorijske mase izražene u procentima (%). U laboratorijskim uslovima, proces sušenja se smatra uspešnim ukoliko je efikasnost veća od 50% (Vidović i sar., 2014).

### 3.10.3. Fizičke osobine suvih ekstrakata

#### (1) Sadržaj vlage

Sadržaj vlage (%) u dobijenim suvim ekstraktima određen je standardnom metodom, sušenjem uzorka na temperaturi od 105 °C do konstantne mase (*Ph. Jug. V*).

#### (2) Higroskopnost

Higroskopnost je određena merenjem porasta mase suvog ekstrakta, koji se nalazio u Petri ploči, u eksikatoru u koji je prethodno stavljen zasićen rastvor natrijum hlorida (Sablani i sar., 2008; Vidović i sar., 2014). Zasićen rastvor natrijum hlorida služi da bi povećao relativnu vlažnost vazduha u eksikatoru. Higroskopnost je izmerena nakon 48 h i rezultat je izražen u procentima (%) prema jednačini:

$$X = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100 \quad (7)$$

gde su  $m_1$  i  $m_2$  mase suvog ekstrakta pre i posle apsorbovanja vlage.

## 3.11. Hemijska karakterizacija suvih ekstrakata

### 3.11.1. HPLC analiza fenolnih kiselina

Sadržaj fenolnih kiselina u suvim ekstraktima *M. vulgare* (P UAE-10, P UAE-50, P MAE-10, P MAE-50, P MAC-10 i P MAC-50) je analiziran pomoću Agilent 1200 Series HPLC sa DAD detektorom. Postupak je detaljno opisan u poglavlju 3.6.3.

## 3.12. Biološka aktivnost suvih ekstrakata

### 3.12.1. Antimikrobna aktivnost

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti suvih ekstrakata *M. vulgare* (P UAE-10, P UAE-50, P MAE-10, P MAE-50, P MAC-10 i P MAC-50) korišćeno je 9 bakterijskih sojeva, od čega je 5 pripadalo Gr+ bakterijama, a 4 Gr- bakterijama, kao i 2 soja kvasaca, a primenjena je mikrodiluciona metoda prema protokolu (CLSI, 2007). Postupak je detaljno opisan u poglavlju 3.8.2.

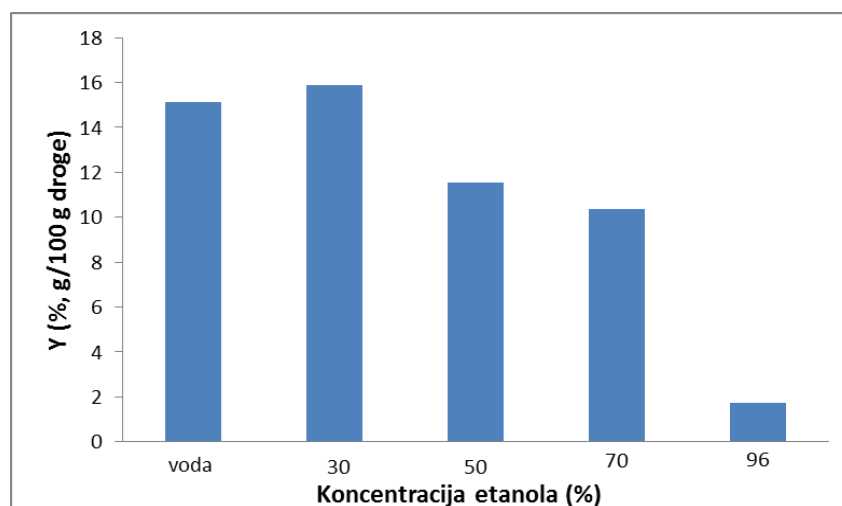
### 3.12.2. Antihiperглиkemijska aktivnost

Ispitivanje inhibicije  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze suvih ekstrakata *M. vulgare* (P UAE-10, P UAE-50, P MAE-10, P MAE-50, P MAC-10 i P MAC-50) je urađeno po istom postupku kao za tečne ekstrakte. Postupak je detaljno opisan u poglavlju 3.8.3.

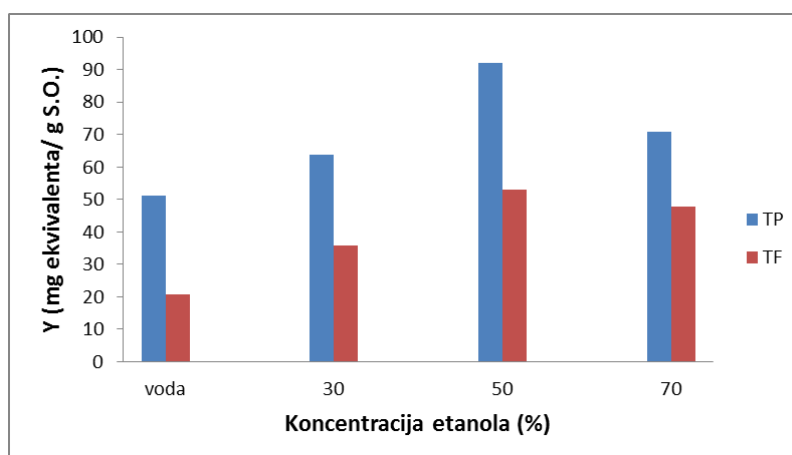
## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Karakterizacija biljnog materijala *M. vulgare* i određivanje koncentracije etanola za dalju primenu u procesu ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja

U ovom doktoratu, ispitivani nadzemni materijal *M. vulgare* je usitnjen do srednjeg prečnika čestica od 0,28 mm i kao takav korišćen u svim eksperimentima. U ispitivanom biljnom materijalu sadržaj vlage je iznosio 6,51%, što je u granicama propisanim Farmakopejom (*Ph. Jug. V*). Sadržaj etarskog ulja određenog hidrodestilacijom iznosio je 0,05% (v/m), što je u skladu sa literaturnim podacima (EMA/HMPC/604271/2012; ESCOP, 2013; Belhatab i sar., 2006). U cilju odabira adekvatnog ekstragensa za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja, poput fenola, iz *M. vulgare* primenjena je konvencionalna metode Č/T ekstrakcije, odnosno maceracija, uz upotrebu vode i etanola različite koncentracije (30, 50, 70 i 96%) kao ekstragenasa. Ukupni prinos ekstrakcije (Slika 23) u na ovaj način dobijenim i ispitivanim uzorcima je varirao u opsegu 1,75 – 15,90%. Najveći prinos ekstrakcije (15,90%) dobijen je upotrebom 30% etanola kao ekstragenasa, a najmanji (1,75%) primenom 96% etanola, što je bio i glavni razlog za njegovu eliminaciju iz narednih eksperimenata i primene.



Slika 23. Ukupni prinos ekstrakcije *M. vulgare* dobijen maceracijom korišćenjem vode i etanola različite koncentracije kao ekstragenasa



**Slika 24.** Prinos ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u ekstraktima *M. vulgare* dobijenih maceracijom korišćenjem vode i etanola različite koncentracije kao ekstragensa

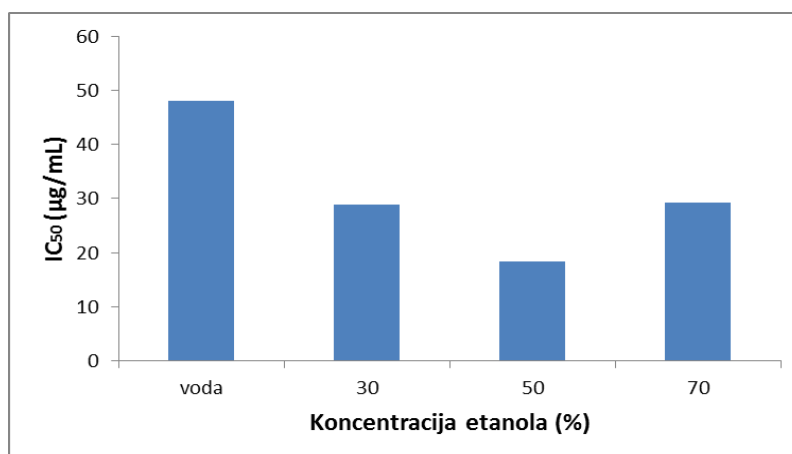
Nekoliko studija je potvrdilo da *M. vulgare* poseduje značajna fenolna jedinjenja (Matkowski i Piotrowska, 2006; Sahpaz i sar., 2002a; Weel i sar., 1999). Polifenoli čine jednu od najbrojnijih i najzastupljenijih grupa sekundarnih biljnih metabolita i sastavni su deo ishrane ljudi i životinja koja poseduje širok spektar bioloških aktivnosti, uključujući antioksidativnu, antiinflamatornu, antibakterijsku i antivirusnu aktivnost (Bennick, 2002; Haslam, 1996; Quideau i Feldman, 1996). U slučaju TP, ekstraktima dobijenim maceracijom, prinos je varirao u opsegu 51,06 – 92,11 mg EGK/g S.O., pri čemu je najveći prinos ostvaren kada je kao ekstragens primenjen 50% etanol. U slučaju TF, prinos je varirao u opsegu od 20,70 do 53,14 mg EK/g S.O., pri čemu je najveći prinos ostvaren kao i kod TP kada je kao ekstragens primenjen 50% etanol (Tabela 9). Amessis-Ouchemoukh i sar. (2014) su ispitali sadržaj polifenola u ekstraktima *M. vulgare* dobijenim maceracijom sa metanolom, pri čemu su dobili TP od 40,57 mg EGK/g S.O. i TF od 10,25 mg QE/g S.O. (ekvivalent kvercetina; QE). Bouterfas i sar. (2014) su ispitali uticaj različitih rastvarača (etanol, metanol i aceton) različite koncentracije (20, 40, 60 i 80%; v/v), temperature (20, 25, 30, 40, 50 i 60 °C) i vremena ekstrakcije (30, 90, 180, 270, 360 i 450 min) na ekstrakciju TP i TF. Metanol je obezbedio najveći TP (137,79 mg EGK/g S.O.) i TF (35,64 mg EK/g S.O.) iz listova *M. vulgare*. Dalje, utvrđena je značajna razlika ( $p < 0,001$ ) između korišćenih organskih rastvarača. Pokazalo se da su smeše alkohola i vode efikasnije u ekstrakciji fenolnih jedinjenja u poređenju sa monokomponentnim sistemom rastvarača. Povećavanje udela vode u organskom rastvaraču obično stvara polarniji medijum koji olakšava ekstrakciju polifenola sa umerenom polarnošću (Spigno i sar., 2007; Uma i sar., 2010).

Bouterfas i sar. (2016) su takođe ispitali uticaj lokaliteta *M. vulgare* na sadržaj fenola i antioksidativni potencijal. Vrednosti TP su varirale u opsegu 40,7 – 160 mg EGK/g S.O., dok su vrednosti TF varirale u opsegu 27,4 – 66,3 mg EK/g S.O. Ekstrakcija TP i TF je bila optimalna kada je korišćen metanol kao ekstragens na temperaturi od 25 °C. U tom slučaju dobijeni su sledeći prinosi: TP od 194,16 mg EGK/g S.O. i TF od 53,31 mg EK/g S.O. sa značajnom razlikom ( $p < 0,001$ ) kada su

primenjene različite temperature. Slične rezultate u pogledu optimalne temperature za ekstrakciju polifenola su publikovali i drugi autori (Uma i sar., 2010; Hismath i sar., 2011). Povećanje temperature preko 25 °C dovelo je do značajnog smanjenja prinosa TP, najverovatnije usled degradacije fenolnih jedinjenja koja su već desorbovana iz biljnog matriksa na nižim temperaturama. Dalje, povećanje temperature može dovesti i do raspadanja polifenola u biljnom matriksu. Iz ovih razloga je u ovom radu korišćena temperatura od 25 °C za sve konvencionalne ekstrakcije. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom su dati u Tabeli 11, a grafički predstavljeni na slici 25.

**Tabela 11.** TP, TF i IC<sub>50</sub> vrednosti za ekstrakte *M. vulgare* dobijene upotrebom različitih rastvarača: vode (MAC-H<sub>2</sub>O), 30, 50 i 70% etanola (EtOH)

Uzorak	Y (%)	TP (mg EGK/g S.O.)	TF (mg EK/g S.O.)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
MAC-H <sub>2</sub> O	15,15	51,06	20,70	48,03
30% EtOH	15,90	63,77	35,71	28,87
50% EtOH	11,55	92,11	53,14	18,43
70% EtOH	10,35	70,90	47,86	29,18



**Slika 25.** Antioksidativna aktivnost (IC<sub>50</sub>) ekstrakata *M. vulgare* dobijenih maceracijom primenom vode i etanola različite koncentracije kao ekstragenasa

Antioksidativna aktivnost ekstrakata je varirala u opsegu 18,43 – 48,03 µg/mL, pri čemu se 50% etanol izdvojio kao najadekvatniji ekstragens za dobijanje ekstrakta sa visokom antioksidativnom aktivnošću. Amessis-Ouchemoukh i sar. (2014) su ispitali antioksidativni kapacitet metanolnog ekstrakta *M. vulgare* i dobili IC<sub>50</sub> vrednost od 82 µg/mL, što ukazuje na značajno slabiju sposobnost ekstrakta da neutralizuje slobodne radikale u odnosu na etanolne ekstrakte dobijene u ovom radu. U studiji koju su sproveli Bouterfas i sar. (2016) sposobnost ekstrakata da neutralizuju slobodne radikale je značajno varirala ( $p < 0,001$ ) u zavisnosti od vrste korišćenog organskog rastvarača i lokaliteta

uzorka, i kretala se u opsegu 33,7 – 774  $\mu\text{g/mL}$ . Uzimajući u obzir najveće prinose TP i TF, kao i najveću antioksidativnu aktivnost, za dalju primenu u procesu ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz *M. vulgare* odabrana je koncentracija etanola od 50%, i ona je dalje primenjena u ispitivanjima UAE. U analizi MAE, koncentracija etanola predstavljala je nezavisno promenljivu u opsegu 30 – 70%.

## 4.2. Ultrazvučna (UAE) i mikrotalasna (MAE) ekstrakcija

### 4.2.1. Provera adekvatnosti modela UAE i MAE

Eksperimentalni rezultati pet ispitivanih odziva, gde spadaju ukupni prinos ekstrakcije (Y), prinos ukupnih fenola (TP) i ukupnih flavonoida (TF), kao i indikatori redukcione moći ( $\text{IC}_{50}$  i  $\text{EC}_{50}$  vrednosti), dobijenih pod različitim UAE uslovima (temperatura, vreme ekstrakcije, snaga ultrazvuka) i MAE uslovima (vreme ekstrakcije, koncentracija etanola, snaga ultrazvuka) procesnih parametara, koristeći BBD, su dati u Tabeli 12 i 13.

**Tabela 12.** BBD sa realnim parametrima UAE i eksperimentalno dobijene vrednosti prinosa ekstrakcije, sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i antioksidativne aktivnosti

Redni br.	Nezavisno promenljive			Ispitivani odzivi				
	Temperatura (°C)	Vreme ekstrakcije (min)	Snaga ultrazvuka (W/L)	Y (%)	TP (mg EGK/g S.O.)	TF (mg EK/g S.O.)	$\text{IC}_{50}$ (mg/mL)	$\text{EC}_{50}$ (mg/mL)
1	60	60	42	15,92	85,10	50,42	0,0172	0,0593
2	60	40	60	16,02	87,66	52,40	0,0180	0,0566
3	80	40	42	18,48	99,30	53,19	0,0218	0,0575
4	60	60	42	15,76	76,36	49,84	0,0178	0,0591
5	60	80	60	17,42	80,10	48,58	0,0177	0,0576
6	40	80	42	15,16	78,94	44,97	0,0215	0,0561
7	80	60	60	20,08	92,39	50,93	0,0256	0,0636
8	40	40	42	12,91	76,00	49,03	0,0199	0,0480
9	60	60	42	16,90	82,45	44,67	0,0178	0,0557
10	40	60	60	15,35	73,66	49,08	0,0207	0,0505
11	60	60	42	15,95	82,15	51,10	0,0164	0,0562
12	60	40	24	15,19	79,85	50,51	0,0170	0,0524
13	80	60	24	17,95	94,57	44,59	0,0193	0,0566
14	60	80	24	17,15	77,58	49,15	0,0222	0,0569
15	40	60	24	13,61	83,89	50,35	0,0197	0,0427
16	80	80	42	19,11	90,00	48,25	0,0217	0,0568
17	60	60	42	16,22	86,99	52,97	0,0218	0,0606

**Tabela 13.** BBD sa realnim parametrima MAE i eksperimentalno dobijene vrednosti prinosa ekstrakcije, sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i antioksidativne aktivnosti

Redni br.	Nezavisno promenljive			Ispitivani odzivi				
	Koncentracija etanola (%)	Vreme ekstrakcije (min)	Snaga mikrotalasa (W)	Y (%)	TP (mg EGK/g S.O.)	TF (mg EK/g S.O.)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	EC <sub>50</sub> (mg/mL)
1	50	35	400	18,29	107,08	56,05	0,0216	0,0671
2	50	15	400	18,20	106,85	57,97	0,0197	0,0635
3	70	15	600	13,74	102,58	65,54	0,0192	0,0475
4	30	25	400	18,26	93,33	59,58	0,0188	0,0630
5	50	15	800	18,70	86,05	54,70	0,0171	0,0636
6	50	25	600	17,26	92,89	57,92	0,0198	0,0659
7	50	35	800	20,36	81,94	52,10	0,0275	0,0651
8	50	25	600	19,07	109,13	52,42	0,0159	0,0726
9	50	25	600	19,65	82,28	49,98	0,0212	0,0677
10	70	25	800	16,36	94,00	57,30	0,0240	0,0590
11	30	25	800	22,30	94,36	49,76	0,0164	0,0776
12	30	35	600	22,61	86,69	53,46	0,0129	0,0790
13	50	25	600	18,95	89,36	52,96	0,0186	0,0657
14	70	25	400	14,64	96,04	62,78	0,0195	0,0528
15	30	15	600	20,69	82,29	50,93	0,0178	0,0735
16	70	35	600	14,33	116,94	65,80	0,0259	0,0445
17	50	25	600	18,16	117,58	54,58	0,0175	0,0633

Rezultati su fitovani kvadratnim polinomom (jednačina (6)) i metoda najmanjih kvadrata je korišćena za određivanje regresionih koeficijenata za linearne, kvadratne i interakcijske članove. Analiza varijanse (ANOVA) i deskriptivna statistika (koeficijent determinacije i koeficijent varijacije) su korišćene za proveru slaganja modela sa eksperimentalnim podacima, a rezultati su dati u Tabeli 14. Prema izrazito visokim vrednostima koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) za odzive Y, TP, TF, IC<sub>50</sub> i EC<sub>50</sub> (0,9668, 0,8349, 0,8717, 0,9567 i 0,8304) dobijene za UAE, svi primenjeni polinomni modeli su saglasni sa eksperimentalnim rezultatima. Drugi parametar deskriptivne statistike koji je uzet u obzir je koeficijent varijacije (CV), koji se često koristi kao relativna mera rasipanja slučajne promenljive oko njene srednje vrednosti i predstavlja odnos standardnog odstupanja i srednje vrednosti. Relativno nizak koeficijent varijacije (CV < 12%) za sve odzive, sugerise zadovoljavajuću reproduktibilnost ispitivanih sistema. Adekvatnost polinomnog modela za UAE izražena preko deskriptivne statistike je potvrđena značajnim  $p$ -vrednostima (< 0,001) za Y i IC<sub>50</sub>, dok je za odzive TP, TF i EC<sub>50</sub> potvrđena umereno značajna adekvatnost preko  $p$ -vrednosti (< 0,05).

Slična situacija je i sa odzivima Y, TP, TF, IC<sub>50</sub> i EC<sub>50</sub> dobijenim za MAE, gde je koeficijent  $R^2$  imao vrednosti 0,9141, 0,9334, 0,8386, 0,8337 i 0,8302. Adekvatnost polinomnih modela za MAE



je potvrđena primenom deskriptivne statističke analize preko izrazito značajne  $p$ -vrednosti ( $< 0,01$ ) za  $Y$  i  $TP$ , dok je za odzive  $TF$ ,  $IC_{50}$  i  $EC_{50}$  potvrđena umereno značajna adekvatnost ( $p < 0,05$ ). Adekvatnost polinomnog modela je takođe potvrđena neznatnim *lack of fit* ( $p > 0,05$ ) za sve modele, što znači da disperzija eksperimentalnih rezultata ne zavisi od modela i u domenu je greške merenja (Myers i sar., 2009). Testiranje na nedostatak adekvatnosti, odnosno *lack of fit* test, se vrši na osnovu ponavljanja eksperimenata u centralnoj tački kako bi se utvrdilo da li neslaganje sa modelom potiče usled neadekvatnosti samog modela ili usled greške merenja. ANOVA i deskriptivna statistika, kao i primenjen kvadratni model (jednačina (6)) predstavljaju zadovoljavajuću aproksimaciju eksperimentalnih rezultata za obe tehnike ekstrakcije, UAE i MAE. Metod najmanjih kvadrata je upotrebljen za dobijanje regresionih koeficijenata u jednačini (6), koji su obezbedili modele deskriptivnih jednačina (8)-(17) za svih pet odziva, za UAE i MAE:

### UAE

$$Y = 16,15 + 2,32X_1 + 0,78X_2 + 0,62X_3 \quad (8)$$

$$TP = 0,083 + 7,97 \cdot 10^{-3} X_1 + 4,14 \cdot 10^{-3} X_1^2 \quad (9)$$

$$TF = 0,051 - 1,40 \cdot 10^{-3} X_2 + 2,40 \cdot 10^{-3} X_1 X_3 - 1,86 \cdot 10^{-3} X_1^2 \quad (10)$$

$$IC_{50} = 0,017 + 5,84 \cdot 10^{-4} X_3 + 1,58 \cdot 10^{-3} X_1 X_3 - 1,40 \cdot 10^{-3} X_1 X_3 + 3,33 \cdot 10^{-3} X_1^2 + 8,51 \cdot 10^{-4} X_3^2 \quad (11)$$

$$EC_{50} = 0,058 + 4,64 \cdot 10^{-3} X_1 + 2,49 \cdot 10^{-3} X_3 - 3,07 \cdot 10^{-3} X_1^2 \quad (12)$$

### MAE

$$Y = 18,62 - 3,1X_2 + 1,04X_3 \quad (13)$$

$$TP = 0,083 + 8,36 \cdot 10^{-3} X_2 - 8,87 \cdot 10^{-3} X_3 + 5,91 \cdot 10^{-3} X_1^2 + 5,87 \cdot 10^{-3} X_2^2 + 6,72 \cdot 10^{-3} X_3^2 \quad (14)$$

$$TF = 0,054 + 4,71 \cdot 10^{-3} X_2 - 2,82 \cdot 10^{-3} X_3 + 3,36 \cdot 10^{-3} X_2^2 \quad (15)$$

$$IC_{50} = 0,019 + 1,77 \cdot 10^{-3} X_1 + 2,83 \cdot 10^{-3} X_2 + 2,89 \cdot 10^{-3} X_1 X_2 \quad (16)$$

$$EC_{50} = 0,067 - 0,011X_2 \quad (17)$$

gde su:  $X_1$ ,  $X_2$  i  $X_3$  temperatura, vreme ekstrakcije i snaga ultrazvuka u slučaju UAE, dok u slučaju MAE predstavljaju vreme ekstrakcije, koncentraciju etanola i snagu mikrotalasa. Prethodne jednačine predviđene modelom su interpretirane u redukovanom obliku (jednačina (6)), jer se koeficijenti promenljivih sa malim uticajem mogu zanemariti.

**Tabela 14.** Analiza varijanse (ANOVA) fitovanja rezultata polinomnim modelom drugog reda

UAE		MAE	
<b>Prinos ekstrakcije</b>			
Član	<i>p</i> -vrednost	Član	<i>p</i> -vrednost
Model	0,0002	Model	0,0054
$X_1$ – Temperatura	< 0,0001*	$X_1$ – Temperatura	0,2208
$X_2$ – Vreme ekstrakcije	0,0034	$X_2$ – Vreme ekstrakcije	0,0001
$X_3$ – Snaga ultrazvuka	0,0105	$X_3$ – Snaga ultrazvuka	0,0339
$X_1 \cdot X_2$	0,1566	$X_1 \cdot X_2$	0,5696
$X_1 \cdot X_3$	0,7143	$X_1 \cdot X_3$	0,5051
$X_2 \cdot X_3$	0,5972	$X_2 \cdot X_3$	0,3367
$X_{12}$	0,2930	$X_{12}$	0,8479
$X_{22}$	0,9427	$X_{22}$	0,1481
$X_{32}$	0,2470	$X_{32}$	0,7798
Lack of fit	0,3136	Lack of fit	0,2446
<b>Ukupni fenoli</b>			
Član	<i>p</i> -vrednost	Član	<i>p</i> -vrednost
Model	0,0423	Model	0,0024
$X_1$ – Temperatura	0,0013	$X_1$ – Temperatura	0,6941
$X_2$ – Vreme ekstrakcije	0,2320	$X_2$ – Vreme ekstrakcije	0,0008
$X_3$ – Snaga ultrazvuka	0,8710	$X_3$ – Snaga ultrazvuka	0,0006
$X_1 \cdot X_2$	0,2040	$X_1 \cdot X_2$	0,9955
$X_1 \cdot X_3$	0,3880	$X_1 \cdot X_3$	0,6239
$X_2 \cdot X_3$	0,5638	$X_2 \cdot X_3$	0,4306
$X_{12}$	0,0931	$X_{12}$	0,0238
$X_{22}$	0,7544	$X_{22}$	0,0246
$X_{32}$	0,7782	$X_{32}$	0,0137
Lack of fit	0,3594	Lack of fit	0,0692
<b>Ukupni flavonoidi</b>			
Član	<i>p</i> -vrednost	Član	<i>p</i> -vrednost
Model	0,0195	Model	0,0396
$X_1$ – Temperatura	0,6171	$X_1$ – Temperatura	0,8377
$X_2$ – Vreme ekstrakcije	0,0123	$X_2$ – Vreme ekstrakcije	0,0024
$X_3$ – Snaga ultrazvuka	0,1637	$X_3$ – Snaga ultrazvuka	0,0281
$X_1 \cdot X_2$	0,2324	$X_1 \cdot X_2$	0,7070
$X_1 \cdot X_3$	0,0047	$X_1 \cdot X_3$	0,9099
$X_2 \cdot X_3$	0,2107	$X_2 \cdot X_3$	0,4765
$X_{12}$	0,0145	$X_{12}$	0,4200
$X_{22}$	0,6597	$X_{22}$	0,0485
$X_{32}$	0,1588	$X_{32}$	0,7988

<i>Lack of fit</i>	0,4961	<i>Lack of fit</i>	0,0590
<b>IC<sub>50</sub> vrednost</b>			
Član	<i>p</i> -vrednost	Član	<i>p</i> -vrednost
Model	0,0006	Model	0,0432
$X_1$ – Temperatura	0,1235	$X_1$ – Temperatura	0,0605
$X_2$ – Vreme ekstrakcije	0,2852	$X_2$ – Vreme ekstrakcije	0,0091
$X_3$ – Snaga ultrazvuka	0,0512	$X_3$ – Snaga ultrazvuka	0,4196
$X_1 \cdot X_2$	0,2903	$X_1 \cdot X_2$	0,0367
$X_1 \cdot X_3$	0,0029	$X_1 \cdot X_3$	0,1003
$X_2 \cdot X_3$	0,0054	$X_2 \cdot X_3$	0,1696
$X_{12}$	<0,0001	$X_{12}$	0,3658
$X_{22}$	0,1935	$X_{22}$	0,5369
$X_{32}$	0,0421	$X_{32}$	0,1437
<i>Lack of fit</i>	0,2875	<i>Lack of fit</i>	0,3580
<b>EC<sub>50</sub> vrednost</b>			
Član	<i>p</i> -vrednost	Član	<i>p</i> -vrednost
Model	0,0458	Model	0,0460
$X_1$ – Temperatura	0,0037	$X_1$ – Temperatura	0,6595
$X_2$ – Vreme ekstrakcije	0,1828	$X_2$ – Vreme ekstrakcije	0,0010
$X_3$ – Snaga ultrazvuka	0,0559	$X_3$ – Snaga ultrazvuka	0,2885
$X_1 \cdot X_2$	0,1967	$X_1 \cdot X_2$	0,4941
$X_1 \cdot X_3$	0,8936	$X_1 \cdot X_3$	0,8581
$X_2 \cdot X_3$	0,5826	$X_2 \cdot X_3$	0,4932
$X_{12}$	0,0792	$X_{12}$	0,4893
$X_{22}$	0,7284	$X_{22}$	0,2220
$X_{32}$	0,2764	$X_{32}$	0,9648
<i>Lack of fit</i>	0,1248	<i>Lack of fit</i>	0,0708

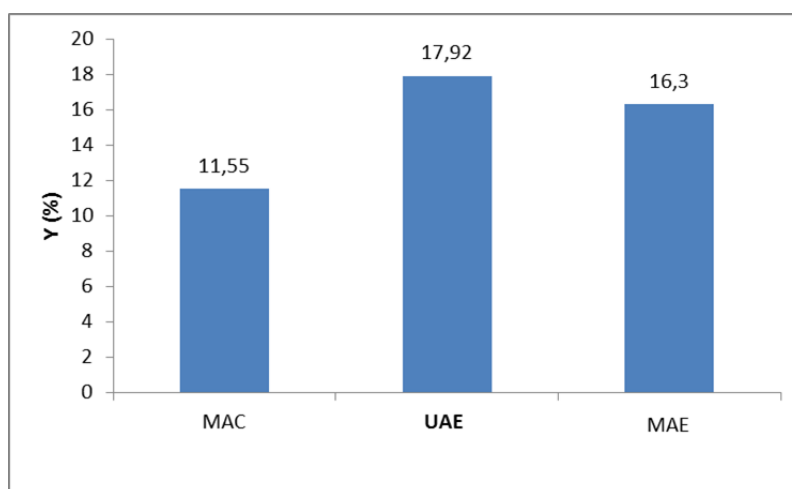
\* izrazito značajan ( $p < 0,01$ ) ; \*\* značajan ( $0,01 < p < 0,05$ ); \*\*\* umereno značajan ( $0,05 < p < 0,10$ )

#### 4.2.2. Uticaj parametara UAE i MAE

Kod UAE, linearni član temperature ( $p < 0,0001$ ) je dominantan u odnosu na druge parametre u kontekstu uticaja na prinos ekstrakcije. Prema stepenu uticaja nakon temperature izdvaja se linearni član vremena ekstrakcije koji je pokazao izrazito značajan ( $p < 0,01$ ) uticaj na prinos ekstrakcije (Prilog: Slika P1). Kod MAE, samo linearni član koncentracije etanola ( $p < 0,001$ ) je pokazao izrazito značajan uticaj na prinos ekstrakcije (Prilog: Slika P2). Prema ANOVA rezultatima iz Tabele 12, može se uočiti da kod UAE linearni član temperature ( $p < 0,01$ ) pokazuje značajan uticaj, dok kvadratni član temperature ( $p < 0,1$ ) pokazuje umereno značajan uticaj na TP. U slučaju MAE, najuticajniji parametri su linearni članovi koncentracije etanola i snage mikrotalasa ( $p < 0,001$ ), dok su njihovi kvadratni članovi ispoljili značajan uticaj ( $0,01 < p < 0,05$ ) na TP. U slučaju UAE, linearni član vremena ekstrakcije ( $p < 0,1$ ) je pokazao umereno značajan uticaj na TF, dok je linearni član interakcije između temperature i snage ultrazvuka pokazao izrazito značajan uticaj ( $p < 0,005$ ). Kod MAE, i linearni i kvadratni član koncentracije etanola ( $p < 0,1$ ) su pokazali umereno značajan uticaj na TF.

##### (1) Prinos ekstrakcije

Među postojećim naučnim radovima koji se bave tematikom valorizacije mikrotalasnog ekstrakta *M. vulgare*, većina se fokusira na izolovanje marubiina (Mittal i Nanda, 2017; Amri i sar., 2017; Martino i sar., 2019). U ovom radu, prinos ekstrakcije kod MAE procesa je varirao u opsegu 13,74 – 22,61%, i bio neznatno veći od prinosa kod UAE procesa koji je varirao od 12,91 do 20,08%. U poređenju sa prinosom ekstrakcije kod maceracije sa 50% etanolom, tj. MAC (11,55%), oba prinosa UAE (17,92%) i MAE (16,30%) ekstrakcije na optimizovanim uslovima, su bila veća (Slika 26).



**Slika 26.** Ukupan prinos ekstrakcije *M. vulgare* dobijen maceracijom (MAC), MAE i UAE tehnikama na optimizovanim uslovima

Mittal i Nanda (2017) su primenili *Soxhlet* ekstrakciju (18 h) etanolom nadzemnog dela *M. vulgare* i dobili prinos od 11,27%, dok je prinos od 20,48% ostvaren MAE procesom u trajanju od 6,22 min. Pored značajno većeg prinosa i odnos droga/rastvarač je optimizovan na 1:32 (m/v) u MAE procesu, što sugerise manju potrošnju rastvarača u poređenju sa *Soxhlet* ekstrakcijom (1:50, m/v). Martino i sar. (2018) su zaključili da su najpovoljniji uslovi MAE u pogledu ukupnog prinosa ekstrakcije temperatura od 40 °C, 20% etanol kao ekstragens i vreme ekstrakcije 15 min. Nasuprot tome, UAE još uvek nije primenjena za ekstrakciju *M. vulgare*.

## (2) Sadržaj ukupnih fenola

Eksperimentalno dobijene vrednosti za TP u UAE ekstraktima *M. vulgare* su varirale u opsegu od 73,66 do 99,30 mg EGK/g S.O. (Tabela 10), u zavisnosti od primenjenih uslova procesnih parametara. Sličan opseg za TP (62,2 – 99,0 mg EGK/g S.O.) je određen kod ekstrakata žalfije koji su dobijeni primenom UAE (Zeković i sar., 2017). Najveća vrednost prinosa TP (99,30 mg EGK/g S.O.) određena je u ultrazvučnom ekstraktu *M. vulgare* dobijenom na 80 °C nakon 40 min ekstrakcije i ultrazvučnoj snazi od 42 W/L, dok je najmanji prinos (73,66 mg EGK/g S.O.) dobijen nakon 60 min ekstrakcije na 40 °C pri ultrazvučnoj snazi od 60 W/L. Generalno, manji prinosi TP (73,66 – 83,89 mg EGK/g S.O.) dobijeni su na temperaturi od 40 °C, dok su veći (90,0 – 99,30 mg EGK/g S.O.) ostvareni na temperaturi od 80 °C. Ovi rezultati su u saglasnosti sa radom Zeković i sar. (2017), koji su zaključili da su najveći prinosi TP u ekstraktima žalfije dobijenim primenom UAE na temperaturi od 80 °C, dok su svi UAE ekstrakti dobijeni na 40 °C imali značajno manje prinose TP. Tomšik i sar. (2017) su takođe odredili najveće prinose TP u ekstraktima sremuša dobijenim na temperaturi od 80 °C, koristeći isti rastvarač (50% etanol). Ovo sugerise da bi temperatura mogla biti jedan od uticajnijih parametara u UAE procesima.

U slučaju MAE, vrednosti TP su varirale u opsegu od 81,94 do 117,58 mg EGK/g S.O. Može se potvrditi da su i UAE i MAE procesi obezbedili značajno povećanje prinosa TP u poređenju sa konvencionalnim ekstrakcijama sa 30, 50 i 70% etanolom (63,77; 92,11 i 70,90 mg EGK/g S.O.). Najveći prinos TP (117,58 mg EGK/g S.O.) je dobijen primenom 50% etanola za 25 min ekstrakcije mikrotalasnom snagom od 600 W. Upoređujući maksimalne prinose TP dobijene UAE i MAE procesima, može se uočiti da MAE obezbeđuje za 15% veći prinos TP. Ova razlika se može pripisati intenzivnijem razaranju ćelija biljnog matriksa mikrotalasima (Kaderides i sar., 2019). Amri i sar. (2017) su primenili 80% metanol za MAE listova *M. vulgare*, na sledećim uslovima procesnih parametara: temperatura od 60 °C, vreme ekstrakcije od 10 min i mikrotalasna snaga od 800 W. TP određena spektrofotometrijski iznosi 6,02 mg EGK/g S.O. što je značajno manje od prinosa TP (86,05 mg EGK/g S.O.) dobijenog u ovom radu za 15 min ekstrakcije sa 50% etanolom kao ekstragensom na 800 W. Različito geografsko stanište i stepen usitnjenosti biljnog materijala su najverovatnije uzrok za

značajnu razliku u prinosu TP. Takođe, u ovom radu je korišćen nadzemni deo *M. vulgare* dok su Amri i sar. (2017) koristili samo listove ove biljke.

### (3) Sadržaj ukupnih flavonoida

Upotreba ultrazvuka se pokazala kao obećavajuća tehnologija za ekstrakciju antocijana, podgrupe flavonoida, iz sporednih proizvoda *Aronia melanocarpa* (Ramić i sar., 2015). Uslovi procesnih parametara UAE koji su obezbedili najveći prinos antocijana u tom istraživanju su temperatura od 70 °C, vreme ekstrakcije od 60 min i ultrazvučna snaga od 144 W. U ovom radu, eksperimentalno dobijene vrednosti TF u UAE ekstraktima *M. vulgare* su varirale u opsegu 44,59 – 53,19 mg EK/g S.O., što je veće od prinosa TF (42,51 mg EK/g S.O.) dobijenog konvencionalnom ekstrakcijom u trajanju od 24 h uz značajnu uštedu vremena, jer su ultrazvučne ekstrakcije trajale 40 – 80 min. Najveći prinos TF (53,19 mg EK/g S.O.) je dobijen na temperaturi od 80 °C, nakon 40 min ekstrakcije pri ultrazvučnoj snazi od 42 W/L, kao što je bio slučaj sa TP, što sugerise čvrstu korelaciju između uticaja parametara UAE i prinosa polifenola.

Vrednosti TF dobijene eksperimentalnim putem u MAE procesima su varirale u opsegu od 49,76 do 65,80 mg EK/g S.O. Prinos TF u MAE ekstraktima je bio neznatno veći od TF u UAE ekstraktima, ponavljajući obrazac primećen kod TP. Maksimalna vrednost TF (65,80 mg EK/g S.O.) u MAE procesu dobijena je primenom 70% etanola tokom 35 min ekstrakcije pri mikrotalasnoj snazi od 600 W. Amri i sar. (2017) su u svojoj studiji ostvarili prinos TF od 45,21 mg EK/g S.O. na sledećim uslovima: temperatura od 60 °C, trajanje MAE procesa od 10 min i mikrotalasna snaga od 800 W, koji je manji od prinosa TF (54,70 mg EK/g S.O.) ostvarenog u ovom radu za 15 min MAE na 800 W.

### (4) Antioksidativna aktivnost

U literaturi se navodi da *M. vulgare* sadrži diterpene (marubiin i marubenol) (Knoss i Zapp, 1998), fenilpropanoidne estre (marubozid) (Sahpaz i sar., 2002a; Sahpaz i sar., 2002b) i derivate flavonoida (Nawwar i sar., 1989) koji mogu značajno doprineti antioksidativnom potencijalu. VanderJagt i sar. (2002) su sprovedi studiju za procenu antioksidativne aktivnosti 30 lekovitih biljaka iz Meksika i zaključili da je vodeni ekstrakt listova *M. vulgare* jedan od najpotentnijih na osnovu rezultata Trolox testa. U drugoj studiji, metanolni ekstrakt *M. vulgare* pokazuje značajnu antioksidativnu aktivnost u neutralizaciji DPPH radikala (Matkowski i Piotrowska, 2006). Amri i sar. (2017) su spektrofotometrijski određivali antioksidativni potencijal *M. vulgare*, pri čemu je IC<sub>50</sub> vrednost iznosila 0,0386 mg/mL. U ovom radu, uzorak dobijen za 15 min MAE je pokazao duplo snažniji antioksidativni potencijal (0,0170 mg/mL). Mittal i Nanda (2017) su takođe izvršili optimizaciju procesnih parametara kod MAE, koristeći centralno kompozitni dizajn, u cilju postizanja maksimalne antioksidativne aktivnosti. Optimalni uslovi za MAE su mikrotalasna snaga od 539 W,

vreme ekstrakcije od 6,22 min i odnos droga/rastvarač 1:32 (m/v), pri čemu je antioksidativna aktivnost, izražena preko  $IC_{50}$  od 0,066 mg/mL bila slabija od  $IC_{50}$  vrednosti (0,027-0,013 mg/mL) MAE uzoraka određenih u ovom radu. Stanković (2011) je ispitao antioksidativni potencijal *Marrubium peregrinum*, druge najzastupljenije vrste roda *Marrubium*. Metanolni ekstrakt sa najvećim antioksidativnim kapacitetom je pokazao  $IC_{50}$  vrednost od 0,1874 mg/mL, što je čak deset puta manji potencijal u odnosu na etanolne ekstrakte u ovom radu. Boulila i sar. (2015) su ispitali antioksidativni potencijal tri frakcije (etanolne, etil acetatne i vodene) *M. vulgare*. Rezultati su pokazali da je sposobnost neutralizacije DPPH radikala veća kod etil acetatnog ekstrakta ( $IC_{50} = 92,41 \mu\text{g/mL}$ ) u poređenju sa etanolnim ( $IC_{50} = 118,20 \mu\text{g/mL}$ ) i vodenim ( $IC_{50} = 105,78 \mu\text{g/mL}$ ) ekstraktima. Takođe, rezultati su pokazali značajnu varijabilnost antioksidativnog potencijala uzoraka u zavisnosti od lokaliteta.  $IC_{50}$  vrednosti su najviše varirale u vodenim ekstraktima (83,92 – 117,94  $\mu\text{g/mL}$ ), zatim u etil acetatnim ekstraktima (68,98 – 118,15  $\mu\text{g/mL}$ ), i etanolnim ekstraktima (95,36 – 131,31  $\mu\text{g/mL}$ ). Ako se uporede  $IC_{50}$  vrednosti dobijene u etanolnim UAE (0,026 – 0,016 mg/mL) i MAE (0,027 – 0,013 mg/mL) ekstraktima, može se zaključiti da obe savremene tehnike, UAE i MAE, daju ekstrakte sa izraženijom antioksidativnom aktivnosti u odnosu na macerate.

#### 4.2.3. Optimizacija UAE i MAE procesa

U cilju istovremenog povećanja prinosa ekstrakcije, TP i TF, kao i antioksidativnog potencijala, za optimizaciju je upotrebljena *desirability function*. U tabeli 13 su prikazani predviđeni optimalni uslovi za postizanje maksimalnog Y, TP, TF i antioksidativnog potencijala, izraženog preko  $IC_{50}$  i  $EC_{50}$  vrednosti. U slučaju UAE, najveći prinos ekstrakcije, sadržaj polifenola (TP i TF) i antioksidativni potencijal biće postignut na temperaturi od 73,6 °C, vremenu ekstrakcije od 40 min i primenom ultrazvuka snage od 30,3 W/L. U slučaju MAE, optimizovani uslovi procesnih parametara su koncentracija etanola od 63,8%, vreme ekstrakcije od 15 min i snaga mikrotalasa od 422 W. Optimizovani uslovi su u skladu sa analizom metode odzivne površine i analizom varijanse ANOVA (Tabela 15).

Može se zaključiti da se primenom obe tehnike, UAE i MAE, obezbeđuje značajno povećanje prinosa polifenola u poređenju sa konvencionalnom ekstrakcijom. U cilju provere predviđenih optimalnih uslova eksperimentalnim putem, izvršena je ekstrakcija *M. vulgare* na datim uslovima i zapaženo je dobro slaganje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti. To dalje znači da su dobijeni polinomni modeli (jedničine (8) - (17)) verifikovani i da se mogu adekvatno koristiti za opisivanje procesa UAE i MAE u okviru ispitivanog eksperimentalnog domena.

**Tabela 15.** Optimizovani uslovi UAE i MAE u cilju dobijanja maksimalnog prinosa, sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, i antioksidativne aktivnosti

Ekstrakciona tehnika	Optimalni uslovi	Predviđena vrednost Odziva	Ekperimentalna vrednost odziva
UAE	Temperatura: 73,6 °C Vreme ekstrakcije: 40 min Snaga ultrazvuka: 30,3 W/L	Y = 16,93% TP = 91,48 mg EGK/g S.O. TF = 50,07 mg EK/g S.O. IC <sub>50</sub> = 0,0181 mg/mL EC <sub>50</sub> = 0,0564 mg/mL	Y = 16,90% TP = 109,62 mg EGK/g S.O. TF = 53,36 mg EK/g S.O. IC <sub>50</sub> = 0,0189 mg/mL EC <sub>50</sub> = 0,0623 mg/mL
MAE	Koncentracija etanola: 63,8% Vreme ekstrakcije: 15 min Snaga mikrotalasa: 422 W	Y = 15,76% TP = 110,04 mg EGK/g S.O. TF = 62,45 mg EK/g S.O. IC <sub>50</sub> = 0,0191 mg/mL EC <sub>50</sub> = 0,0545 mg/mL	Y = 16,66% TP = 110,26 mg EGK/g S.O. TF = 54,86 mg EK/g S.O. IC <sub>50</sub> = 0,0180 mg/mL EC <sub>50</sub> = 0,0555 mg/mL

Jedna od uobičajenih prednosti upotrebe UAE i MAE procesa je drastično smanjenje vremena ekstrakcije. To podrazumeva da jedinjenja od interesa nisu izložena invazivnim uslovima, te mogu da zadrže veću aktivnost u poređenju sa drugim metodama (Pan i sar., 2012; Navarrete i sar., 2011). Komercijalizacija savremenih metoda ekstrakcije na industrijski nivo često predstavlja izazov zbog visokih početnih troškova ulaganja, relativno visokih troškova energije i nedostatka jedinstvene metodologije za dizajn i *scale up*. Glavni faktori koje treba uzeti u obzir prilikom *scale up* MAE su debljina sloja uzorka i učestalost elektromagnetnog zračenja. Da bi se prevazišli ovi problemi, rotacija mikrotalase komore u pilot ekstraktoru može osigurati uniformnu distribuciju mikrotalasa kroz biljni matriks (Ciriminna i sar., 2017). Električna energija je najskuplji oblik energije, ali s obzirom na drastično smanjenje vremena prilikom upotrebe mikrotalasa postoji potencijal za jeftiniji i efikasniji proces. Filly i sar. (2014) su poredili potrošnju energije pri izdvajanju etarskih ulja iz aromatičnih biljaka upotrebom MAE procesa i hidrodistilacije, pri čemu se MAE pokazao kao izrazito ekonomičniji proces. Ipak, kako bi se napravila relevantna ekonomska evaluacija procesa, potrebno je najpre generisati bazu podataka kinetike ekstrakcije i mikrotalasnih uslova, utvrđenih numeričkim modelima, gde bi dielektrična svojstva materijala trebalo da figurišu kao ključni parametar (Takhistov, 2007).

Mnoge studije su predstavile različite koncepte za *scale up* UAE procesa (Sutkar i Gogate, 2009; Horst i sar., 1996). Međutim, *scale up* kod ultrazvučne sonde je i dalje ograničen na određenu zapreminu i procesne uslove. Smatra se da su UAE sistemi tipa sonde uglavnom pogodni za laboratorijska ispitivanja zbog njihove slabe sposobnosti prenosa akustične energije u veće zapremine, erozije i taloženja čestica na površini vrha sonde, i na taj način blokiranja kavitacije. Dodatno, postoji verovatnoća kvara opreme zbog velikog pomeranja transduktora što se odražava na propadanje konstrukcionog materijala. Iz svega navedenog proizilazi da je reaktor zasnovan na upotrebi više



transduktora koji emituju identične ili različite frekvencije logičan izbor za *scale up*. Upotreba više transduktora takođe rezultira nižim ultrazvučnim intenzitetom sa sličnim nivoima rasipanja snage, pa se smanjuju problemi blokade kavitacije, erozije i taloženja čestica na sondi. Položaj transduktora se takođe može lako menjati kako bi se mehanički talasi koje stvaraju transduktori preklapali, što rezultira akustičnim obrascem koji je prostorno ujednačen i nekoherentan iznad kavitacijskog praga kroz celu radnu zapreminu reaktora (Gogate i Kabadi, 2009).

### 4.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE)

#### 4.3.1. Provera adekvatnosti modela SWE

Eksperimentalni rezultati ispitivanih odziva (TP, TF i IC<sub>50</sub>) dobijenih pod različitim SWE uslovima (temperatura, vreme ekstrakcije, koncentracija HCl) procesnih parametara koristeći BBD su dati u Tabeli 16.

**Tabela 16.** BBD sa realnim parametrima SWE i eksperimentalno dobijene vrednosti prinosa ekstrakcije, ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidativne aktivnosti

Red. br.	Uzorak	Nezavisno promenljive			Y (%)	Ispitivani odzivi		
		Temperatura (°C)	Vreme ekstrakcije (min)	Koncentracija HCl (%)		TP (mg EGK/g S.O.)	TF (mg EK/g S.O.)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
1	<b>SWE-1</b>	160	10	1,50	38,78	87,43	17,38	0,0667
2	<b>SWE-2</b>	120	20	0	19,46	27,47	25,57	0,1129
3	<b>SWE-3</b>	120	10	0,75	37,52	33,14	12,83	0,1889
4	<b>SWE-4</b>	160	20	0,75	38,20	87,44	15,98	0,0790
5	<b>SWE-5</b>	160	20	0,75	37,42	79,35	18,56	0,0783
6	<b>SWE-6</b>	200	10	0,75	30,74	103,54	23,35	0,0659
7	<b>SWE-7</b>	200	30	0,75	30,62	93,49	21,92	0,0717
8	<b>SWE-8</b>	160	20	0,75	38,78	83,67	18,70	0,0700
9	<b>SWE-9</b>	200	20	0	21,86	126,59	40,34	0,0475
10	<b>SWE-10</b>	200	20	1,50	29,90	94,05	24,52	0,0792
11	<b>SWE-11</b>	160	30	0	27,68	64,39	23,90	0,0642
12	<b>SWE-12</b>	160	10	0	25,80	56,57	19,18	0,0692
13	<b>SWE-13</b>	120	20	1,50	41,90	38,25	12,82	0,0986
14	<b>SWE-14</b>	160	30	1,50	37,54	82,39	17,24	0,0704
15	<b>SWE-15</b>	120	30	0,75	39,60	38,27	13,29	0,1205

Rezultati dobijeni eksperimentalnim putem su fitovani u polinomni model drugog reda (jednačina (6)) i dobijeni su regresioni koeficijenti za sva tri odziva (TP, TF i IC<sub>50</sub>) metodom najmanjih kvadrata. Rezultati analize varijanse ANOVA dati su u Tabeli 17. Prema vrednostima

koeficijenta determinacije  $R^2$  za TP, TF i  $IC_{50}$  (0,9344, 0,9027 i 0,9098), svi primenjeni polinomni modeli su u saglasnosti sa eksperimentalnim rezultatima. Matematički modeli, za sva tri odziva, su statistički prihvatljivi usled značajne regresije za model ( $p < 0,05$ ). *Lack of fit* testiranje je potvrdilo adekvatnost poklapanja eksperimentalnih rezultata sa polinomnim modelom drugog reda. Dobijeni eksperimentalni rezultati su upotrebljeni za dobijanje regresionih jednačina koje predviđaju vrednosti odziva u ispitivanom eksperimentalnom domenu.

**Tabela 17.** Analiza varijanse (ANOVA) fitovanja rezultata polinomnim modelom drugog reda

	Suma kvadrata	df	Srednji kvadrat	F-vrednost	p-vrednost
<b>Ukupni fenoli</b>					
Model	10975,54	9	1219,50	7,91	0,0174
Rezidual	770,90	5	154,18		
<i>Lack of fit</i>	738,20	3	246,07	15,05	0,0629
Greška	32,70	2	16,35		
Ukupno	11746,43	14			
<b>Ukupni flavonoidi</b>					
Model	610,47	9	67,83	5,16	0,0428
Rezidual	65,79	5	13,16		
<i>Lack of fit</i>	61,10	3	20,37	8,69	0,1050
Greška	4,69	2	2,34		
Ukupno	676,26	14			
<b><math>IC_{50}</math> vrednost</b>					
Model	1,50	9	0,17	5,60	0,0361
Rezidual	0,15	5	0,030		
<i>Lack of fit</i>	0,14	3	0,048	19,10	0,0502
Greška	0,005032	2	0,002516		
Ukupno	1,65	14			

Uticaj uslova ekstrakcije na ispitivane odzive je kvantifikovan određivanjem značajnosti regresionih koeficijenta polinomne jednačine drugog reda. U slučaju TP, jedino linearni član temperature je pokazao značajan uticaj ( $p < 0,05$ ), dok su svi ostali članovi bili zanemarljivog uticaja. S obzirom na to da ekstrakcija fenolnih jedinjenja posebno zavisi od polarnosti rastvarača, ekstrakciona sposobnost vode bi mogla biti ograničena usled relativno visoke dielektrične konstante na sobnoj temperaturi. Temperatura ima dvojak uticaj, kako na rastvarač tako i na biljni matriks. Povećanjem temperature vode, modifikuju se njene fizičke osobine (viskozitet, površinski napon, dielektrična konstanta, itd.) u smislu povećanja difuzivnosti i moći rastvaranja. Takođe, povišene temperature izazivaju razaranje biljnog matriksa i na taj način utiču na intenzifikaciju prenosa mase difuzijom (Prasad i sar., 2011). Upravo zbog svega navedenog, pozitivan uticaj linarnog člana temperature je očekivan. U slučaju TF, linearni članovi temperature i koncentracije HCl su imali značajan uticaj ( $p < 0,05$ ), dok je kvadratni član koncentracije HCl imao umereno značajan uticaj ( $p < 0,10$ ). Linearni član temperature je pokazao pozitivan, dok je linearan član koncentracije HCl pokazao

negativan uticaj na TF. Pozitivni efekti linearnog člana temperature se mogu uočiti na 3D grafiku (Prilog: Slika P3). Uticaj ostalih parametara je zanemarljiv. U slučaju  $IC_{50}$  vrednosti, jedino linearni i kvadratni članovi temperature su imali značajne uticaje ( $p < 0,05$ ), dok je interakcija temperatura – vreme ekstrakcije imala umereno značajan uticaj ( $p < 0,10$ ). Uticaj ispitivanih SWE parametara na ciljane odzive (TP, TF i  $IC_{50}$ ) je predstavljen polinomnim jednačinama drugog reda u redukovanom obliku:

$$TP = 83,4848 + 35,0684 X_1 \quad (18)$$

$$TF = 17,7461 + 5,7040X_1 - 4,6288 X_3 \quad (19)$$

$$IC_{50} = 0,7578 - 0,32064X_1 + 0,2644 X_1^2 \quad (20)$$

### 4.3.2. Uticaj parametara SWE

#### (1) Sadržaj ukupnih fenola

Prinos ekstrakcije kod ekstrakata koji su dobijeni primenom SWE varira u opsegu od 19,46 – 41,9%. Eksperimentalno dobijene vrednosti za TP u subkritičnim ekstraktima su varirale od 27,47 mg EGK/g S.O. na najmanjoj ispitivanoj temperaturi (120 °C, vreme ekstrakcije od 20 min, voda bez dodatka HCl kao ekstragens) do 126,59 mg EGK/g S.O. na najvećoj temperaturi (200 °C, 20 min, voda bez dodatka HCl kao ekstragens) (Tabela 16). Generalno, mali prinosi TP (27,47 – 38,27 mg EGK/g S.O.) su ostvareni na temperaturi od 120 °C, dok su veći prinosi TP (93,49 – 126,59 mg EGK/g S.O.) ostvareni na temperaturi od 200 °C. Ovo sugerise da je temperatura najznačajniji parametar koji izuzetno utiče na ispitivani odziv jer se prinos TP udvostručio na 200 °C bez obzira na vreme ekstrakcije i prisustvo/odsustvo HCl. Dalje, velike TP vrednosti dobijene na 200 °C su za 27 – 45% veće od TP vrednosti dobijenih u maceratima *M. vulgare* (Tabela 11), i za 7 – 20% veće u odnosu na TP vrednosti dobijene primenom UAE i MAE. Bouterfas i sar. (2014) su napomenuli da vrsta i koncentracija rastvarača, vreme ekstrakcije i temperatura utiču značajno na vrednosti TP i TF određene u ekstraktima *M. vulgare*. Optimalan prinos TP, dobijen upotrebom 60% metanola kao ekstragensa na 25 °C tokom 180 min ekstrakcije, iznosio je 293 mg EGK/g S.O. Uzimajući u obzir činjenicu da temperatura u SWE pokazuje posebno značajan pozitivan uticaj na ekstrakciju fenola, niži sadržaj TP detektovan u prethodno dobijenim maceratima (Tabela 11) pripremljenim na sobnoj temperaturi je opravdan.

## (2) Sadržaj ukupnih flavonoida

Prisustvo flavonoida i derivata verbaskozida u vodenim ekstraktima *M. vulgare* je objavljeno u ranijoj literaturi (Nawwar i sar., 1989). Eksperimentalno dobijene vrednosti za TF u subkritičnim ekstraktima su varirale u opsegu od 12,82 mg EK/g S.O. na najmanjoj ispitivanoj temperaturi (120 °C, vreme ekstrakcije od 20 min, uz dodatak 1,5% HCl) do 40,34 mg EK/g S.O. na najvećoj temperaturi (200 °C, vreme ekstrakcije od 20 min, čista voda kao rastvarač) (Tabela 16). TF vrednost (20,04 mg EK/g S.O.) određena u vodenom maceratu *M. vulgare* je duplo manja od vrednosti dobijene nakon 20 min ekstrakcije na temperaturi od 200 °C (40,34 mg EK/g S.O.). Mali prinosi TF (12,82 – 13,29 mg EK/g S.O.) su dobijeni na 120 °C, osim u slučaju prinosa TF (25,57 mg EK/g S.O.) u SWE-2 dobijenom nakon 20 min ekstrakcije bez dodatka modifikatora. Bouterfas i sar. (2014) su upotrebom 80% metanola kao ekstragensa, temperature od 20 °C i vremena ekstrakcije od 450 min dobili optimalan prinos TF od 79,52 mg EK/g S.O. Prinosi TP i TF dobijeni maceracijom listova *M. vulgare* uz upotrebu metanola kao ekstragensa, su značajno veći u poređenju sa prinosima polifenola u subkritičnim ekstraktima, gde je voda korišćena kao ekstragens. Međutim, odabirom odgovarajućih temperatura u SWE, voda se može ponašati kao "organski rastvarač" koji se može efikasno koristiti u ekstrakciji. Na 200 °C, voda ima slična svojstva kao metanol. Voda kao nezapaljiv, netoksičan, dostupan i jeftin "zeleni" rastvarač sa neznatnim uticajem na životnu sredinu je svakako adekvatniji ekstragens u poređenju sa metanolom (Smith, 2006). Dodatno, vreme ekstrakcije je kod SWE procesa značajno redukovano (od 6-15 puta) u poređenju sa trajanjem maceracije od 180 i 450 min.

## (3) Antioksidativna aktivnost

Eksperimentalno dobijene vrednosti za antioksidativnu aktivnost subkritičnih ekstrakata su varirale u opsegu 0,0475 – 0,1889 mg/mL (Tabela 16). Kadri i sar. (2013) su ispitali antioksidativni potencijal etarskog ulja *M. vulgare* nakon čega su zaključili da je usko povezan sa prisustvom oksidovanih monoterpena i seskviterpena, gde spadaju  $\beta$ -citronelol, tujon, 1,8-cineol i kamfor. Amessis-Ouchemoukh i sar. (2014) su ispitali antioksidativni potencijal ( $IC_{50} = 0,087$  mg/mL) ekstrakta *M. vulgare*, dobijenog maceracijom sa metanolom kao ekstragensom. Ako se uporede  $IC_{50}$  vrednosti dobijene u etanolnim UAE (0,026 – 0,016 mg/mL) i MAE (0,027 – 0,013 mg/mL) ekstraktima sa vrednostima u subkritičnoj vodi (0,1889 – 0,0475 mg/mL), može se zaključiti da su UAE i MAE ekstrakti potentniji od subkritičnih. Najniža  $IC_{50}$  vrednost (0,0475 mg/mL), odnosno najveća antioksidativna aktivnost, određena je u SWE-9 dobijenom nakon 20 min ekstrakcije na 200 °C bez dodatka modifikatora. Plaza i sar. (2010) su takođe primetili da do povećanja antioksidativne aktivnosti kod listova ruzmarina i timijana dolazi nakon SWE na 200 °C. Oni su ukazali da poboljšana antioksidativna aktivnost može biti povezana sa stvaranjem novih jedinjenja, odnosno neoantioksidanasa, sa antioksidativnom aktivnošću koja potiče od nekoliko reakcija uključujući

Maillard-ove reakcije i reakcije karamelizacije. Plaza i sar. (2013) su takođe ispitali antioksidativni kapacitet, pomoću tri spektrofotometrijska testa, i zaključili da se on naglo povećava kada se temperatura nalazi u opsegu od 175 do 200 °C.

Antioksidativni kapacitet subkritičnih ekstrakata *M. vulgare* dobijenih na 200 °C je oko 11-19 puta veći u poređenju sa onim dobijenim na 112 °C. Antioksidativni kapacitet vodenog macerata *M. vulgare* (0,0480 mg/mL) je isti kao onaj dobijen u SWE-9 (0,0475 mg/mL) nakon 20 min ekstrakcije na 200 °C. Generalno, najniže vrednosti antioksidativne aktivnosti (0,0986 – 0,1889 mg/mL) u subkritičnim ekstraktima su dobijene na 120 °C, dok su IC<sub>50</sub> vrednosti slične na temperaturama od 160 i 200 °C (0,0642 – 0,0792 mg/mL). Postoji korelacija između sadržaja TP i TF i antioksidativne aktivnosti jer su najveće vrednosti TP (126,59 mg EGK/g S.O.), TF (40,34 mg EK/g S.O.) i najmanja IC<sub>50</sub> vrednost (0,0475 mg/mL) dobijene na istim uslovima (200 °C, 20 min, bez dodatka HCl).

#### 4.3.4. Optimizacija SWE procesa

Proces optimizacije dobija na značaju u industrijskim uslovima jer omogućava efikasnije korišćenje raspoloživih resursa. Prema Scopus bazi podataka, istovremena optimizacija ispitivanih odziva SWE procesa poslednjih godina privlači sve veću pažnju. Pregled literature je pokazao da su različiti prirodni matriksi (sremuš, semenke korijandera, mesnati deo jabuke i dr.) podvrgnuti SWE procesu, a dobijeni rezultati optimizovani Box-Behnken ili centralno kompozitnim eksperimentalnim dizajnom (Tomšik i sar., 2017; Zeković i sar., 2016; Wijngaard i Brunton, 2009; Wang i sar., 2014; Turner i sar., 2006). SWE ima određene prednosti u poređenju sa konvencionalnim procesima ekstrakcije, kao što su skraćeno vreme ekstrakcije koje obezbeđuje veće prinose dobijene za samo 10 – 30 min u poređenju sa onima dobijenim konvencionalnom ekstrakcijom. Smanjenje vremena ekstrakcije može značajno da smanji operativne troškove. U SWE procesu, uticaji pritiska su prilično irelevantni što podrazumeva izvođenje na nižim pritiscima, dok temperatura kao najvažniji parametar mora biti izuzetno visoka da bi se obezbedio zadovoljavajući prinos. Posebno je važno optimizovati temperaturu, kako bi se iskoristile pogodnosti poboljšane rastvorljivosti i prenosa mase, a minimizirala degradacija analita. U ovom delu ispitivanja *M. vulgare* dobijeni su sledeći optimizovani uslovi SWE procesa: temperatura od 200 °C, vreme ekstrakcije 20,29 min i upotreba vode bez dodatka HCl kao rastvarača. Modelom predviđene optimalne vrednosti za TP, TF i IC<sub>50</sub> iznosile su 114,07 mg EGK/g S.O., 36,94 mg EK/g S.O. i 0,0386 mg/mL. Optimalne vrednosti su i eksperimentalno potvrđene izvođenjem eksperimenta na određenim optimalnim uslovima i daljom analizom dobijenog ekstrakta (Tabela 18).

**Tabela 18.** TP, TF i IC<sub>50</sub> vrednosti na optimizovanim uslovima SWE

Ekstrakciona tehnika	Optimalni uslovi	Predviđena vrednost Odziva	Eksperimentalna vrednost odziva
SWE	Temperatura: 200 °C Vreme ekstrakcije: 20,29 min Koncentracija HCl: 0	TP = 114,07 mg EGK/g S.O. TF = 36,94 mg EK/g S.O. IC <sub>50</sub> = 0,0386 mg/mL	TP = 110,02 mg EGK/g S.O. TF = 34,36 mg EK/g S.O. IC <sub>50</sub> = 0,0375 mg/mL

## 4.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom

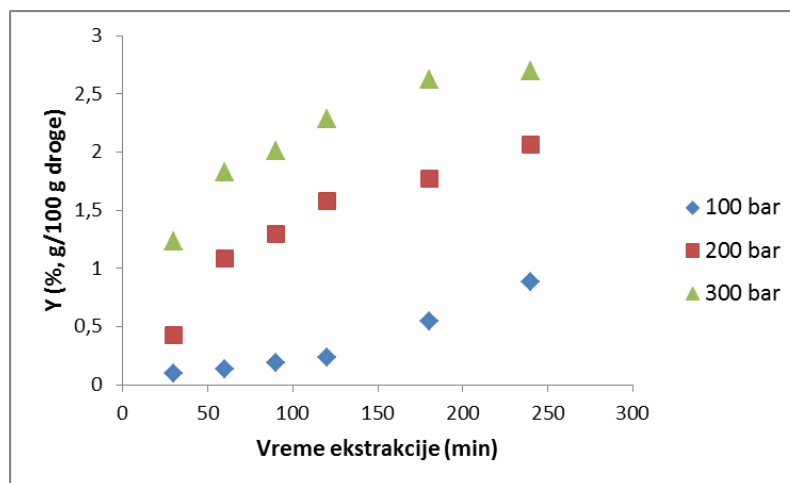
### 4.4.1. Prinos i hemijski sastav lipofilnih ekstrakata

U cilju izolovanja lipofilnih komponenti *M. vulgare* pored konvencionalne *Soxhlet* ekstrakcije primenjena je i ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom. Uticaj parametara (pritiska i temperature) SC-CO<sub>2</sub> na prinos i hemijski sastav *M. vulgare* ekstrakata ispitan je na tri pritiska (100, 200 i 300 bar) i tri temperature (40, 50 i 60 °C). U Tabeli 19 su dati prinosi ekstrakcija. Prinos *Soxhlet* ekstrakcije *M. vulgare* (3,23%) je uporediv sa prinosom SC-CO<sub>2</sub> (3,51%) ostvarenim pri maksimalnim vrednostima pritiska (300 bar) i temperature (60 °C), dok se hemijski sastav u potpunosti razlikuje.

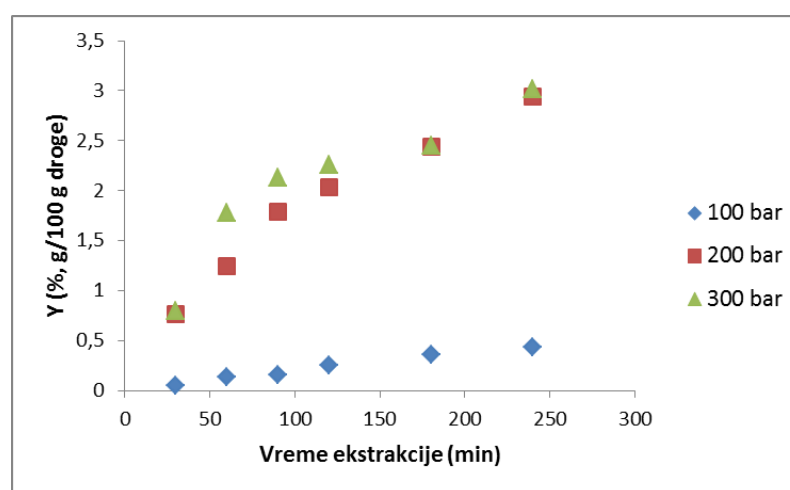
**Tabela 19.** Prinos ekstrakcije *M. vulgare* superkritičnim ugljendioksidom

Redni br.	Pritisak (bar)	Temperatura (°C)	Gustina CO <sub>2</sub> (kg/m <sup>3</sup> )	Prinos ekstrakcije (% , g/100 g droge)
1	100	40	628,70	0,88
2	200	40	839,90	2,06
3	300	40	910,00	2,70
4	100	50	384,40	0,44
5	200	50	784,40	2,94
6	300	50	870,60	3,01
7	100	60	290,00	0,43
8	200	60	723,80	3,00
9	300	60	830,00	3,51

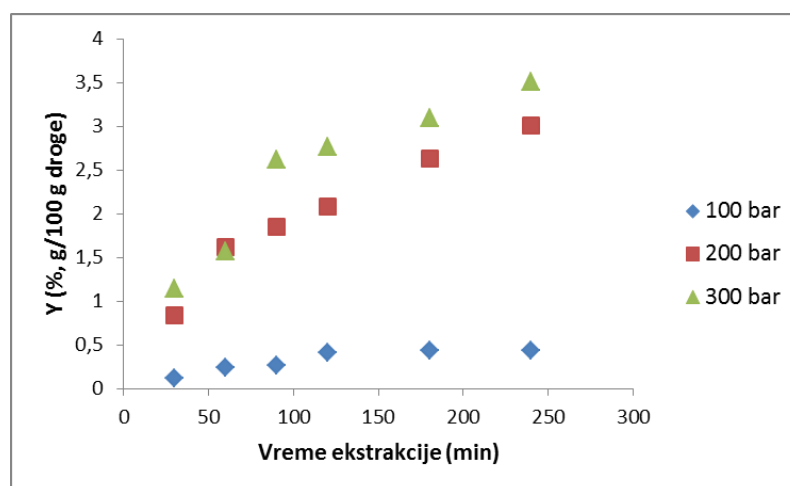
Na slikama 27, 28 i 29 može se uočiti da sa porastom pritiska raste i prinos ekstrakcije i to na svim ispitivanim temperaturama, što je u skladu sa konstatacijom da sa povećanjem gustine ugljendioksida raste i njegova moć rastvaranja. Takođe, na pritiscima od 200 i 300 bar moguće je zapaziti dva perioda ekstrakcije. Period brze ekstrakcije tokom koga su ekstrahovane komponente koje su lako rastvorljive u superkritičnom ugljendioksidu, i period spore ekstrakcije tokom koga se ekstrahuju komponente više tačke ključanja i veće molekulske mase, kao što su masna ulja, pigmenti, voskovi i dr. (Lepojević, 2000).



Slika 27. Kinetika ekstrakcije pri različitim pritiscima (100, 200 i 300 bar) na temperaturi od 40 °C



Slika 28. Kinetika ekstrakcije pri različitim pritiscima (100, 200 i 300 bar) na temperaturi od 50 °C



Slika 29. Kinetika ekstrakcije pri različitim pritiscima (100, 200 i 300 bar) na temperaturi od 60 °C

U cilju utvrđivanja hemijskog profila ekstrakata *M. vulgare* dobijenih ekstrakcijom superkritičnim ugljendioksidom i *Soxhlet* ekstrakcijom, primenjena je GC–MS metoda analize (Tabele 20 – 23; Prilog: Slike P4 – P12), a površina pika je korišćena za određivanje relativnog udela jedinjenja u uzorcima. U superkritičnim ekstraktima je utvrđeno prisustvo 10 – 20 komponenti u zavisnosti od uslova ispitivanih parametara, dok je u *Soxhlet* ekstraktu identifikovano 11 komponenti bez prisustva diterpena (Tabela 20, Prilog: Slika P6). Dominantan je relativni udeo pet seskviterpenskih ugljovodonika koji čine 34,31%, zatim sledi udeo zasićene masne kiseline, odnosno palmitinske kiseline sa 31,18%, dok su oksidovani monoterpeni, gde spadaju limonen oksid i karvon, zastupljeni sa 7,84%. Od seskviterpena najveći je udeo *trans*-kariofilena (8,37%) koji je uporediv sa udelom ovog jedinjenja u superkritičnom ekstraktu dobijenom na 100 bar i 40 °C (9,16%).

**Tabela 20.** Rezultati GC–MS analize *Soxhlet* ekstrakta *M. vulgare* (relativni udeo; % i retenciono vreme;  $T_R$ )

Jedinjenje	$T_R$ (min)	Relativni udeo (%)
<b>Oksidovani monoterpeni</b>		
Limonen oksid	50,63	4,88
Karvon	34,08	2,96
<b>Seskviterpenski ugljovodonici</b>		
<i>trans</i> -Kariofilen	28,12	8,37
Kariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol	30,18	4,42
Leden oksid	32,02	7,22
Salvialan	56,29	7,34
Longipinen-12,15-diol	27,95	6,96
<b>Masne kiseline</b>		
Palmitinska kiselina	41,63	31,18
<b>Alifatični ugljovodonici</b>		
Triciklo[6.3.0.0(3,7)]undek-1(8)-an-3-ol, 2,2,5,5-tetrametil	48,59	18,08
2-Tridekanon	37,67	2,92
<b>Ukupno</b>		<b>94,33</b>

U Tabeli 21 prikazan je relativni udeo jedinjenja identifikovanih u superkritičnim ekstraktima *M. vulgare* dobijenim na 100 bar i temperaturama 40 i 50 °C, dok nedostaje hemijski profil ekstrakta na 60 °C usled izuzetno niskog prinosa ekstrakcije ostvarenog na ovim uslovima, nedovoljnog za hemijsku analizu. Vasić (2020) je takođe dobila najmanji prinos (0,285%) na istim uslovima (100 bar i 60 °C) ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom biljne smeše sastavljene od 80% šipka i 20% hajdučke trave, dok je na 100 bar i 40 °C dobila prinos od 2,11%. Pavlić (2017) je takođe dobio najmanji prinos SC-CO<sub>2</sub> žalfije od 1,81% na 100 bar i 60 °C, dok je na 40 °C dobio 2,75%. Razlog za tako veliku razliku u prinosu ekstrakcije ostvarenom na 100 bar i temperaturama 40 i 60 °C je usled

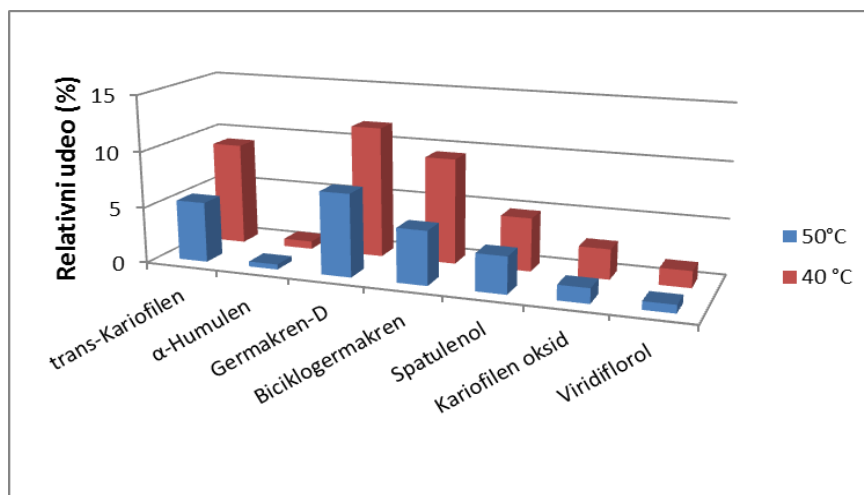


najveće razlike u gustini ugljendioksida, u poređenju sa gustinama na 200 i 300 bar, koja na 40 °C iznosi 628,7 kg/m<sup>3</sup> a na 60 °C je 290 kg/m<sup>3</sup>.

**Tabela 21.** Rezultati GC–MS analize superkritičnih ekstrakata *M. vulgare* dobijenim na pritisku od 100 bar (relativni udeo; %)

Jedinjenje	Temperatura (°C)	
	40	50
<b>Oksidovani monoterpeni</b>		
Karvakrol	1,04	0,46
<b>Seskviterpenski ugljovodonic</b>		
<i>trans</i> -Kariofilen	9,16	5,39
$\alpha$ -Humulen	0,69	0,45
Germakren-D	11,71	7,38
Biciklogermakren	9,43	4,81
$\alpha$ -Cedrol	0,34	-
Spatulenol	4,77	3,30
Kariofilen oksid	2,69	1,34
Viridiflorol	1,50	0,73
<b>Alifatični ugljovodonic</b>		
(E,Z)-3,8-Dimetildeka-4,6-dien	0,54	-
6,10,14-trimetil-2-pentadekanon	1,36	1,22
Nonadekan	1,87	-
Trikozan	-	1,62
<b>Masne kiseline</b>		
Palmitinska kiselina	15,81	11,24
Linolna kiselina	2,09	2,01
Linoleinska kiselina, metil estar	3,48	3,90
<b>Diterpeni</b>		
Fitol	2,05	2,20
Labda-8(17), 13E-dien-15-al	2,20	1,77
Marubiin	4,32	30,18
7,8-Epoksi- $\alpha$ -dihidrojonon	-	11,41
<b>Ukupno</b>	<b>65,66</b>	<b>89,41</b>

- nije detektovano



**Slika 30.** Relativni udeo (%) seskviterpena u superkričnim ekstraktima *M. vulgare* dobijenim na pritisku od 100 bar

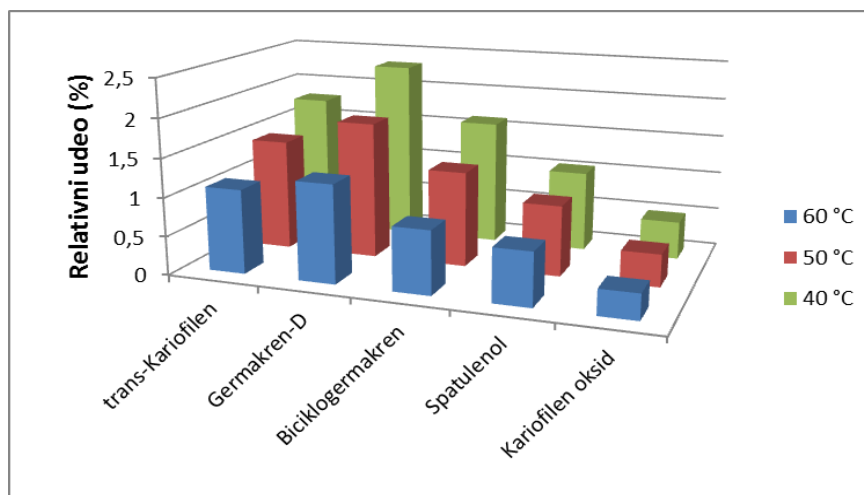
Procenat ukupnih identifikovanih komponenti u superkričnim ekstraktima je varirao u zavisnosti od primenjenog pritiska i temperature i kretao se u opsegu od 65,66 – 89,41% za 100 bar; 76,39 – 80,66% za 200 bar i 61,98 – 92,26% za 300 bar. Komponente identifikovane u ekstraktima mogu se klasifikovati u sledeće grupe: oksidovani monoterpeni, seskviterpenski ugljovodonici, alifatični ugljovodonici, masne kiseline i diterpeni. Na osnovu dobijenih rezultata, ekstrakti *M. vulgare* 100/40 i 100/50 su imali najviše seskviterpenskih ugljovodonika (40,29 i 23,4%) gde spadaju *trans*-kariofilen,  $\alpha$ -humulen, germakren D, biciklogermakren,  $\alpha$ -cedrol, spatulenol, kariofilen oksid i viridiflorol, pri čemu je ekstrakt 100/40 izrazito bogatiji seskviterpenima (Slika 30). Drugi autori su takođe detektovali *trans*-kariofilen,  $\alpha$ -humulen, germakren D, kariofilen oksid i viridiflorol u etarskom ulju *M. vulgare* (Golparvar i sar., 2015; Elbali i sar., 2018).

**Tabela 22.** Rezultati GC–MS analize superkričnih ekstrakata *M. vulgare* dobijenim na pritisku od 200 bar (relativni udeo; %)

Jedinjenje	Temperatura (°C)		
	40	50	60
<b>Seskviterpenski ugljovodonici</b>			
<i>trans</i> -Kariofilen	1,79	1,44	1,09
Germakren-D	2,32	1,77	1,27
Biciklogermakren	1,62	1,23	0,82
Spatulenol	1,04	0,91	0,69
Kariofilen oksid	0,49	0,42	0,33
<b>Alifatični ugljovodonici</b>			
Heksadekan	-	-	1,20
<b>Masne kiseline</b>			
Palmitinska kiselina	5,02	3,77	2,18

Linolna kiselina	0,79	0,56	0,74
<b>Diterpeni</b>			
Fitol	0,72	0,60	0,38
Marubiin	62,60	68,41	71,96
<b>Ukupno</b>	<b>76,39</b>	<b>79,11</b>	<b>80,66</b>

- nije detektovano



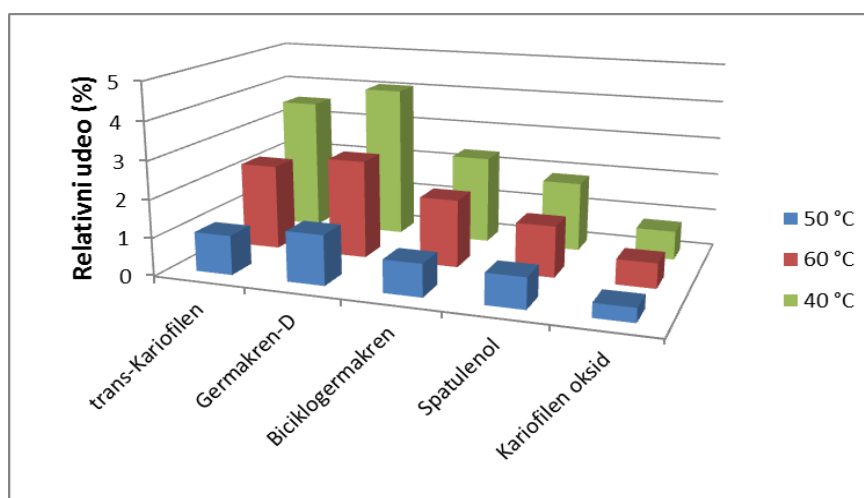
**Slika 31.** Relativni udeo (%) seskviterpena u superkričnim ekstraktima *M. vulgare* dobijenim na pritisku od 200 bar

Na osnovu dobijenih rezultata (Tabela 22) može se zaključiti da su ekstrakti *M. vulgare* 200/40, 200/50 i 200/60 imali najviše labdanskog diterpena marubiina (62,60; 68,41 i 71,96%), zatim seskviterpenskih ugljovodonika (7,26; 5,77 i 4,2%) gde spadaju *trans*-kariofilen, germakren D, biciklogermakren, spatulenol i kariofilen oksid, dok oksidovani monoterpeni nisu identifikovani. Sa porastom temperature relativni udeo svih seskviterpena se smanjuje (Slika 31) jer se smanjuje i gustina superkričnog ugljendioksida sa 839,90 na 723,80 kg/m<sup>3</sup> a samim tim i njegova moć rastvaranja. Zasićena masna kiselina, palmitinska kiselina, je prisutna u sastavu sva tri ekstrakta i njen relativni udeo takođe opada sa porastom temperature (5,02; 3,77 i 2,18%). Nezasićena ω-6 masna kiselina, linolna kiselina, je prisutna u sva tri ekstrakta, ali u značajno manjem udelu u odnosu na palmitinsku kiselinu (0,79; 0,56 i 0,74%).

**Tabela 23.** Rezultati GC–MS analize superkričnih ekstrakata *M. vulgare* dobijenim na pritisku od 300 bar (relativni udeo; %)

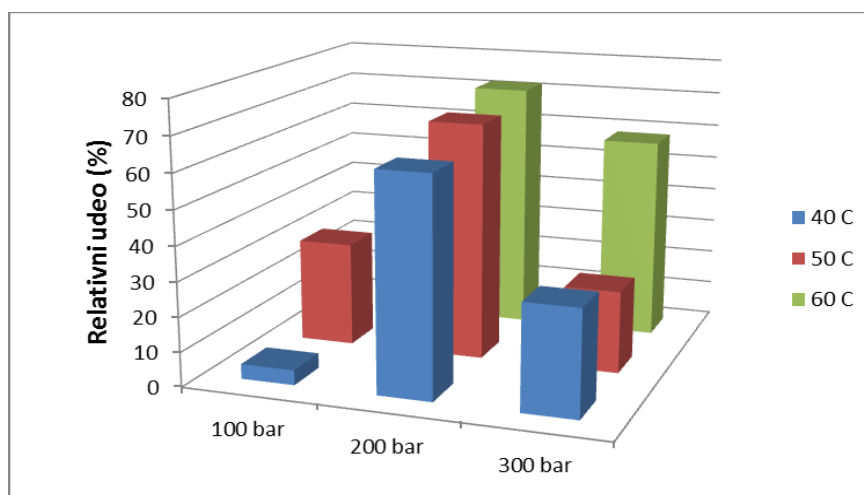
Jedinjenje	Temperatura (°C)		
	40	50	60
<b>Oksidovani monoterpeni</b>			
Karvakrol	0,30	0,29	0,32
<b>Seskviterpenski ugljovodonic</b>			
<i>trans</i> -Kariofilen	3,55	1,04	2,27
Germakren-D	4,07	1,32	2,61
Biciklogermakren	2,34	0,86	1,79
Spatulenol	1,85	0,81	1,35
Kariofilen oksid	0,77	0,37	0,66
<b>Alifatični ugljovodonic</b>			
Oktadekan	13,54	-	4,23
Trikozan	-	-	1,22
Nonakoza	-	-	3,90
Dokoza	9,64	22,03	1,33
Nonadekan	4,10	5,58	2,96
Tetrakoza	14,98	-	-
<b>Masne kiseline</b>			
Palmitinska kiselina	5,24	4,61	6,56
<b>Diterpeni</b>			
Fitol	1,06	0,99	0,79
Labda-8(17),13E-dien-15-al	0,32	-	0,37
Marubiin	30,50	23,74	58,39
7,8-Epoksi- $\alpha$ -dihidrojonon	-	0,34	1,85
<b>Ukupno</b>	<b>92,26</b>	<b>61,98</b>	<b>90,60</b>

- nije detektovano

**Slika 32.** Relativni udeo (%) seskviterpena u superkričnim ekstraktima *M. vulgare* dobijenim na pritisku od 300 bar

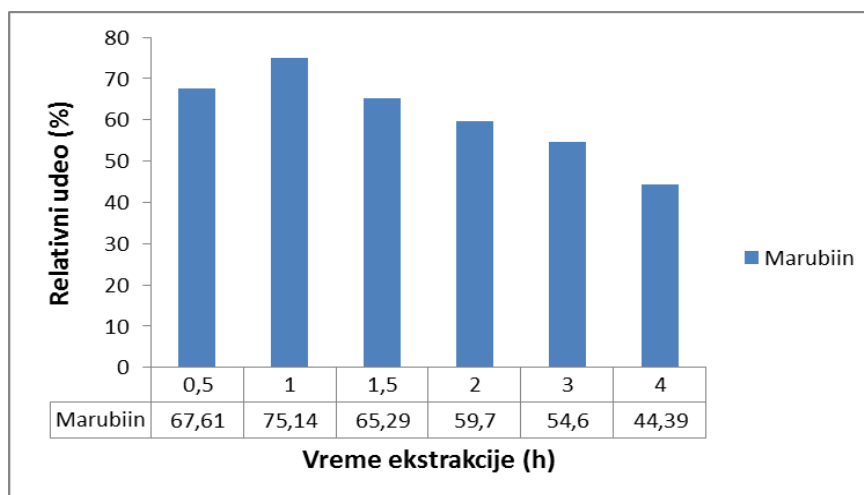
Na osnovu dobijenih rezultata (Tabela 23) može se zaključiti da su ekstrakti *M. vulgare* 300/40, 300/50 i 300/60 takođe imali najviše marubiina (30,50; 23,74 i 58,39%) i seskviterpenskih ugljovodonika (12,85; 4,40 i 8,68%) gde spadaju *trans*-kariofilen, germakren D, biciklogermakren, spatulenol i kariofilen oksid (Slika 32). Najveći udeli ovih seskviterpena su ostvareni na temperaturi od 40 °C, dok su najmanji dobijeni na 50 °C pri izobarnim uslovima ekstrakcije. Prema Pourmortazavi i Hajimirsadeghi (2007), superkritična ekstrakcija na višim temperaturama utiče na smanjenje prinosa neisparljivih jedinjenja, kao i na kompeticiju između rastvorljivosti i isparljivosti jedinjenja. Prema tome, relativno visok prinos ekstrakcije ostvaren na 40 °C (92,26%), opada na 50 °C (61,98%) i ponovo raste pri porastu radne temperature na 60 °C (90,60%). Palmitinska kiselina je prisutna kod sva tri ekstrakta (5,24; 4,61 i 6,56%). Od oksidovanih monoterpena potvrđeno je prisustvo karvakrola kod sva tri ekstrakta sa sličnim relativnim udelima (0,30; 0,29 i 0,32%). Ebrahimzadeh i sar. (2003) su takođe detektovali karvakrol u superkritičnim ekstraktima *Zataria multiflora* dobijenim na 300 bar i temperaturama od 35, 45 i 55 °C (3,71; 3,38 i 4,30%). Relativni udeo karvakrola u superkritičnim ekstraktima žalfije je varirao u opsegu 0,13 – 0,20% na pritiscima 100, 200 i 300 bar i temperaturama 40, 50 i 60 °C (Pavlić, 2017).

Najdominantnija komponenta u svim dobijenim superkritičnim ekstraktima je hemotaksonomski marker marubiin, osim kod ekstrakta 100/40 gde je relativni udeo marubiina mali, 4,32%. Međutim, temperatura od 50 °C je povoljnija za izolovanje marubiina na pritisku od 100 bar, jer je njegov relativni udeo veći sedam puta u odnosu na udeo dobijen na 40 °C. Relativni sadržaj ovog diterpena u ekstraktima dobijenim na pritisku od 200 bar iznosio je 62,60 – 71,96% i u ekstraktima dobijenim na 300 bar iznosio je 23,74 – 58,39%. Najveći udeo marubiina (71,96%) je dobijen na pritisku od 200 bar i temperaturi od 60 °C (Slika 33).



**Slika 33.** Relativni udeo (%) marubiina u superkritičnim ekstraktima *M. vulgare* dobijenim na različitim pritiscima i temperaturama

Za razliku od superkritičnih ekstrakata, u *Soxhlet* ekstraktu nije identifikovan marubiin najverovatnije usled upotrebe metilen hlorida kao ekstragensa jer je u *Soxhlet* ekstraktu sa etanolom kao ekstragensom detektovan marubiin (0,69%) (Mittal i Nanda, 2017). Sukcesivnom ekstrakcijom (frakcionisanjem) ispitana je kinetika ekstrakcije na odabranom pritisku i temperaturi (300 bar, 60 °C), na kojima je ostvaren najveći prinos ekstrakcije, u odnosu na relativni udeo marubiina (Slika 34).



**Slika 34.** Kinetika ekstrakcije na 300 bar i 60 °C u odnosu na relativni udeo marubiina

U cilju utvrđivanja relativnog udela marubiina u šest frakcija *M. vulgare*, dobijenih prekidanjem ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom nakon 0,5; 1; 1,5; 2; 3 i 4 h, primenjena je GC–MS metoda analize (Prilog: Slike P13 – P18). Najveći relativni udeo marubiina (75,14%) se dobija nakon 1 h ekstrakcije nakon čega udeo postepeno opada do 44,39% nakon 4 h.

## 4.5. Hemijska karakterizacija tečnih ekstrakata

### 4.5.1. HPLC analiza fenolnih kiselina

HPLC analiza tečnih ekstrakata dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom, primenom vode i etanola različite koncentracije (30, 50, 70 i 96%) kao ekstragenasa, i tečnih ekstrakata (UAEopt i MAEopt) dobijenih savremenim ekstrakcionim tehnikama UAE i MAE na optimalnim uslovima, je izvršena u cilju određivanja prinosa dominantnih fenolnih kiselina kako bi se međusobno uporedile ispitivane tehnike. U ekstraktima koji su dobijeni primenom maceracije detektovane su tri fenolne kiseline: ferulna, *p*-kumarinska i kafena kiselina. Sadržaj ferulne kiseline varira u opsegu 5,05 – 35,86 µg/mL, *p*- kumarinske kiseline u opsegu 6,67 – 30,60 µg/mL, a kafene kiseline u intervalu 6,43 – 35,26 µg/mL. Dominantna flavonoidna jedinjenja su glikozidi kvercetina, rutin i hiperozid. Sadržaj rutina varira u intervalu 20,41 – 236,93 µg/mL, a hiperozida u intervalu 2,71 – 25,58 µg/mL. Najdominantnije jedinjenje u svim ekstraktima dobijenim maceracijom je rutin. Ovaj flavonoidni

glikozid je sastavljen iz flavonola kvercetina i disaharida rutinoze i široko je rasprostranjen u višim biljkama (Seyoum i sar., 2006), ali i u semenu heljde, voću i kori od voća, a posebno u agrumima. Određene studije povezuju antioksidativnu aktivnost flavonoida sa prisustvom/odsustvom OH grupe u položaju 3 C- prstena, u kombinaciji sa kateholnom strukturom B-prstena (Middleton i Teramura, 1993). Rutin poseduje značajnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala i nekoliko različitih farmakoloških aktivnosti uključujući antialergijsku, antiinflamatornu, antitumorsku, antibakterijsku i antivirusnu. Dodatno, rutin je takođe odgovoran za hipolipidemijsku, citoprotektivnu i antispazmodijsku aktivnost. Rutin ima prednost u odnosu na miricetin, kvercetagenin i druge flavonoide, koji se u nekim slučajevima ponašaju kao prooksidujući agensi i katalizuju proizvodnju radikala sa kiseonikom. Nedostatak ovog polifenolnog jedinjenja je slaba rastvorljivost u vodenoj sredini što je ujedno i uzrok njegove slabije bioraspoloživosti posebno kod oralne administracije (Mauludin i sar., 2009). Relativno mali sadržaj ferulne kiseline (8,39 µg/mL), rutina (30,63 µg/mL) i hiperozida (5,78 µg/mL) u MAC-H<sub>2</sub>O ekstraktu može se objasniti upotrebom vode kao rastvarača, koja poseduje nisku selektivnost prema polifenolnim jedinjenjima u poređenju sa smešama etanola i vode korišćenim u savremenim ekstrakcionim tehnikama UAE i MAE. Macerat dobijen primenom 50% etanola (MAC) kao ekstragensa je pokazao najveći sadržaj ferulne i *p*-kumarinske kiseline, kao i rutina i hiperozida u odnosu na ostale macerate (Tabela 24). Hlorogenska kiselina i kvercetin nisu detektovani ni u jednom od ispitivanih macerata.

**Tabela 24.** Sadržaj dominantnih fenolnih kiseline i flavonoida u ekstraktima dobijenim maceracijom korišćenjem vode i etanola različite koncentracije kao ekstragensa

Uzorak	Jedinjenje				
	Ferulna kiselina	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	Kafena kiselina	Rutin	Hiperozid
	(µg/mL)				
<b>96% EtOH</b>	5,05	6,67	6,43	20,41	2,71
<b>70% EtOH</b>	21,38	23,89	13,86	190,43	13,05
<b>50% EtOH (MAC)</b>	35,86	30,60	18,10	236,93	25,58
<b>30% EtOH</b>	25,02	29,49	35,26	87,51	11,39
<b>MAC-H<sub>2</sub>O</b>	8,39	tr	tr	30,63	5,78

tr – u tragovima

Boulila i sar. (2015) su analizirali fenolne kiseline i flavonoide iz tri frakcije (etanolne, etil acetatne i vodene) nadzemnih delova šest populacija *M. vulgare*. Osam fenolnih kiseline i pet flavonoida je identifikovano u etil acetatnoj frakciji i kvantifikovano pomoću HPLC–DAD. Od flavonoidnih aglikona prisutnih u etil acetatnoj frakciji to su derivati flavona, apigenin, luteolin, kemferol i kvercetin, pri čemu je hiperozid (5,84 – 14,46 mg/g S.O.) dominantan. Među detektovanim dominantnim fenolnim kiselinama nalaze se kafena, ferulna i *p*-kumarinska kiselina. Sadržaji kafene

kiseline (0,12 mg/g S.O.), ferulne kiseline (0,52 mg/g S.O.) i *p*-kumarinske kiseline (0,06 mg/g S.O.) su značajno manji od sadržaja ove tri kiseline u MAC ekstraktu (kafena kiselina (1,10 mg/g S.O.), ferulna kiselina (2,17 mg/g S.O.) i *p*-kumarinska kiselina (1,85 mg/g S.O.)) dobijenom u ovom radu. Nasuprot tome, rezultati autora Boulila i sar. (2015) su u saglasnosti sa rezultatima Wojdyło i sar. (2007) koji su identifikovali ferulnu kiselinu (0,36 mg/g S.O.), luteolin (6,16 mg/g S.O.) i apigenin (0,44 mg/g S.O.) kao dominantna fenolna jedinjenja.

Prema rezultatima HPLC analize UAEopt i MAEopt ekstrakata (Tabela 25), UAEopt se pokazao bogatiji fenolnim kiselinama u poređenju sa MAEopt, pri čemu se ističe veći sadržaj hlorogenske kiseline, kao i flavonoida rutina. Ako se uporede hemijski profili ekstrakata dobijenih primenom UAE i MAE tehnika sa profilima ekstrakata dobijenih maceracijom može se zaključiti da UAEopt i MAEopt sadrže značajno manje derivata cimetne kiseline (ferulna, *p*-kumarinska i kafena kiselina), a bogatije su u pogledu hlorogenske kiseline (UAEopt: 33,11 µg/mL i MAEopt: 23,23 µg/mL) i kvercetin (UAEopt: 34,88 µg/mL i MAEopt: 30,05 µg/mL), koji nisu identifikovani kod macerata. Sadržaj rutina u UAEopt (49,59 µg/mL) i MAEopt (34,01 µg/mL) je značajno manji u poređenju sa onim u MAC (236,93 µg/mL) najverovatnije usled hidrolize rutina u njegov aglikon kvercetin upotrebom ovih ekstrakcionih tehnika. Setyaningsih i sar. (2016) su ispitali stabilnost 40 fenolnih jedinjenja u UAE procesu na temperaturi od 70 °C i zaključili da dolazi do degradacije rutina od 22,3% i *p*-kumarinske kiseline od 10,2%. Najmanja degradacija, usled primene UAE i MAE tehnika, je prisutna kod hiperozida čiji sadržaj u UAEopt (19,06 µg/mL) i MAEopt (14,71 µg/mL) ekstraktima je međusobno sličan i neznatno manji od MAC.

**Tabela 25.** Sadržaj dominantnih fenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktima dobijenim optimizovanim postupcima UAE i MAE ekstrakcije

Jedinjenje	UAEopt	MAEopt
	(µg/mL)	
Hlorogenska kiselina	33,11	23,23
Ferulna kiselina	1,34	1,07
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	4,75	4,26
Kafena kiselina	0,26	Tr
Rutin	49,59	34,01
Hiperozid	19,06	14,71
Kvercetin	34,88	30,05

tr – u tragovima

Qiao i sar. (2013) su ispitali degradaciju 7 fenolnih kiselina pod uticajem ultrazvuka u različitim ekstragensima (metanol, etanol, aceton, 80% metanol, 80% etanol, 80% aceton i voda) koji se najčešće koriste za ekstrakciju fenolnih kiselina klasičnim ekstrakcionim tehnikama. Protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, *p*-kumarinska i ferulna kiselina su se pokazale



stabilnim u svim ekstragensima, dok su kafena i sinapinska kiselina podlegle značajnoj degradaciji, a stepen degradacije se razlikuje u zavisnosti od primenjenog ekstragensa. Koncentracija kafene kiseline u 80% etanolu nakon UAE procesa je smanjena za 8,9% dok je u vodenom ekstraktu koncentracija redukovana za samo 1%. Iz ovih rezultata proizilazi da na stabilnost fenolnih kiselina u UAE procesu pored broja i položaja OH grupa utiče i vrsta primenjenog ekstragensa. Pingret i sar. (2013) su zaključili da dominantni polifenoli, uključujući hlorogensku kiselinu, nisu degradirali tokom UAE procesa tropa jabuke sa vodom kao ekstragensom i da su sadržaj ukupnih fenola i antioksidativna aktivnost datog ultrazvučnog ekstrakta veći u poređenju sa konvencionalnim ekstraktom. Boudjelal i sar. (2012) su takođe identifikovali hlorogensku kiselinu (6,7 µg/mg S.O.) u vodenim ekstraktima *M. vulgare*. Sadržaj hlorogenske kiseline u ovom radu u UAEopt (1,84 µg/mg S.O.) i MAEopt (1,43 µg/mg S.O.) ekstraktima je manji od sadržaja ove kiseline određenog u vodenom ekstraktu *M. vulgare*. Achat i sar. (2012) su konstatovali da je UAE proces listova masline u velikoj meri omogućio obogaćenje ekstrakta fenolnim jedinjenjima i poboljšao antioksidativnu aktivnost u poređenju sa maceratom. Iako se UAE tehnika frekventno koristi za ekstrakciju fenolnih kiselina usled većih prinosa ekstrakcije i kraćeg vremena ekstrakcije, efekat kavitacije može biti odgovoran za degradaciju flavonoida i karotenoida.

Biesaga (2011) je ispitala uticaj UAE i MAE ekstrakcionih tehnika na stabilnost 11 flavonoida prisutnih u 60% metanolnom ekstraktu kukuruza i zaključila da stepen degradacije flavonoida zavisi od uslova ekstrakcije i hemijske strukture flavonoida. Veći broj hidroksilnih grupa podstiče degradaciju flavonoida, dok šećerna grupa i metoksil grupe štite flavonoide od degradacije tokom ekstrakcije. Kod UAE je primećena neznatna degradacija rutina, iako ovo jedinjenje poseduje šećerni deo koji potencijalno može zaštititi molekul od razgradnje. Degradaciju rutina primenom UAE su prethodno takođe opisali Paniwnyk i sar. (2001), koji su objasnili ovu pojavu reakcijom rutina sa visoko reaktivnim hidroksilnim radikalima koji su nastali tokom UAE u rastvaraču koji sadrži vodu, dok su glikozidi pod datim uslovima bili stabilni.

Kod MAE je ispitan uticaj različite snage mikrotalasa (160 – 500 W) i vremena ekstrakcije (1 – 10 min) na degradaciju flavonoida. Povećanje mikrotalasnog snage i vremena uzrokovalo je veću degradaciju ovih jedinjenja. Najmanja degradacija je primećena za rutin i naringin, dok je značajna degradacija primećena za miricetin, kemferol, ramnetin i kvercetin. U ovom radu, vreme ekstrakcije od 15 min i snaga mikrotalasa od 422 W u zatvorenom MAE sistemu su uzrokovali intenzifikaciju postupka ekstrakcije usled većeg pritiska i temperature. Povišena temperatura istovremeno rezultira poboljšanjem efikasnosti ekstrakcije, ali i degradacijom termolabilnih jedinjenja na šta ukazuje slabiji profil fenolnih jedinjenja u odnosu na UAEopt. Liazid i sar. (2007) su ispitali stabilnost 22 fenolna jedinjenja tokom MAE procesa sa metanolom kao ekstragensom u temperaturnom opsegu 50 – 175 °C i zaključili da su gentizinska, galna, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, kafena, *p*-kumarinska, ferulna i sinapinska kiselina stabilne na temperaturama do 100 °C, dok na 125 °C podležu značajnoj

degradaciji. Od derivata cimetine kiseline (kafena, *p*-kumarinska i ferulna kiselina) najstabilnije jedinjenje od ispitivanih je ono sa najvećim brojem metoksil grupa odnosno ferulna kiselina, koja podleže degradaciji od 10,9% na 150 °C, dok je kafena kiselina (sa dva hidroksilna supstituenta) pretrpela degradaciju od 16,3% na istoj temperaturi. Ustanovljeno je da je najstabilnije jedinjenje sa najmanjim brojem supstituenata, *p*-kumarinska kiselina, koja nije podlegla degradaciji pri temperaturi od 175 °C. Takođe, u ovom radu *p*-kumarinska kiselina je podlegla manjem stepenu degradacije u poređenju sa ferulnom i kafenom kiselinom.

#### 4.5.2. HPLC analiza HMF

Postoji nekoliko publikacija o degradaciji fenolnih jedinjenja tokom ekstrakcije subkritičnom vodom (Wang i sar., 2011; Khuwijitjaru i sar., 2014) usled primene agresivnih temperatura. Gonzalez i sar. (2014) su ispitali degradaciju vanilinske kiseline tokom ekstrakcije pod sub- i superkritičnim uslovima vode, pri čemu su uspeli da opišu reakcije pomoću kinetičkog modela prvog reda. Lindquist i Yang (2011) su potvrdili da siringinska kiselina podleže dekarboksilaciji tokom SWE na temperaturama većim od 150 °C, a da se u potpunosti raspada nakon tretmana na 250 °C. Nasuprot autorima koji ukazuju na ove nedostatke SWE, postoje i autori koji tvrde da veći antioksidativni potencijal subkritičnih ekstrakata, dobijenih na visokim temperaturama, potiče od fenolnih jedinjenja koja su ekstrahovana, kao i od proizvoda reakcija neenzimskog tamnjenja kao što su Maillard-ove reakcije, reakcije karamelizacije i termičke oksidacije (Plaza i sar., 2010). 5-Hidroksimetil furfural (HMF) se spontano formira usled Maillard-ove reakcije ili usled dehidratacije redukujućih šećera (fruktoze i glukoze) u kiseloj sredini (Polovková i Šimko, 2017). Sadržaj HMF u ekstraktima sa rutinom (MAC-H<sub>2</sub>O: 30,63 µg/mL, Tabela 22) nakon hidrotermičkog tretmana je potvrđen u ranijoj literaturi (Ravber i sar., 2015) usled prisustva šećerne komponente rutina, rutinoze. Uprkos činjenici da se HMF koncentracija koristila godinama kao indikator kvaliteta termički obrađene hrane, prisustvo ovog jedinjenja je nepoželjno jer poseduje citotoksične, mutagene, kancerogene i genotoksične efekte (Teixidó i sar., 2006; Capuano i Fogliano, 2011).

Sadržaj HMF, određen HPLC–DAD analizom, u svim subkritičnim ekstraktima uključujući i ekstrakt dobijen na optimizovanim uslovima (SWE<sub>opt</sub>) je dat u Tabeli 26. HMF sadržaj se značajno razlikuje među uzorcima dobijenim na različitim temperaturama (120 – 200 °C), tokom trajanja ekstrakcije od 10 – 30 min i uz upotrebu vode sa ili bez dodate HCl kao ekstragensa. Koncentracija HMF varira od 3,53 µg/mL u uzorku SWE-3 (dobijenom na 120 °C) do 246,19 µg/mL u uzorku SWE-14 (dobijenom na 160 °C), što je značajno manje od HMF koncentracija (10,63 – 11135,50 µg/mL) detektovanih u subkritičnim ekstraktima sremuša (Tomšik i sar., 2017). Sadržaj HMF (187,27 µg/mL) u ekstraktu dobijenom na optimizovanim uslovima (SWE<sub>opt</sub>) je sličan sadržaju HMF u SWE-9 (186,81 µg/mL) što je očekivano jer su uslovi procesnih parametara isti. Postoji samo jedan subkritični ekstrakt, SWE-2 (dobijen na 120 °C nakon 20 min ekstrakcije subkritičnom vodom bez dodatka HCl),

bez HMF. Na temperaturi od 120 °C, HMF je prisutan u uzorcima u iznosu koji je za 30% manji od maksimalne vrednosti HMF (246,19 µg/mL) postignute na 160 °C. Nakon postizanja maksimuma, sadržaj HMF se smanjuje u subkritičnim uzorcima dobijenim na temperaturi od 200 °C. Najverovatniji razlog za ovu pojavu je degradacija HMF na najvišoj ispitivanoj temperaturi, što je takođe zabeleženo od strane Narita i Inouye, (2012) kada je temperatura veća od 210 °C.

**Tabela 26.** Sadržaj HMF u subkritičnim ekstraktima

Uzorak	HMF µg/mL (mg/100 g droge)
SWE-1	139,00
SWE-2	tr
SWE-3	3,53
SWE-4	173,78
SWE-5	173,78
SWE-6	123,86
SWE-7	21,78
SWE-8	173,78
SWE-9	186,81
SWE-10	5,19
SWE-11	31,98
SWE-12	28,90
SWE-13	68,22
SWE-14	246,19
SWE-15	58,50
SWEopt	187,27

tr – u tragovima

Herrero i sar. (2012) su ispitali SWE listova masline pri širem temperaturnom opsegu (50, 75, 100, 125, 150, 175 i 200 °C) uz monitoring sadržaja HMF. Zaključili su da se sadržaj HMF izrazito povećava iznad temperature od 175 °C, dostižući maksimum na 200 °C. Takođe, zaključili su da HMF nema nikakav uticaj na *in vitro* antioksidativne i antiproliferativne analize izvedene na subkritičnim ekstraktima. U ovom radu, sadržaj HMF takođe nije imao značajan uticaj na IC<sub>50</sub> vrednosti (0,0475 – 0,0792 mg/mL) određene u subkritičnim ekstraktima, na temperaturama od 160 i 200 °C, koje su slične IC<sub>50</sub> vrednosti u MAC-H<sub>2</sub>O (0,0480 mg/mL).

Iako HMF nije prisutan u svežoj i neobrađenoj hrani, njegova koncentracija ima tendenciju porasta kao posledica procesa zagrevanja. Koncentracija HMF je takođe korisno sredstvo za procenu uticaja reakcije neenzimskog tamnjenja (Fallico i sar., 2003). Dodatno, to je prepoznatljiv parametar povezan sa svežinom i kvalitetom pojedinih prehrambenih proizvoda, i zbog toga se monitoring sadržaja HMF koristi u kontroli kvaliteta hrane kako bi se ocenili kvalitet postupka prerade i

organoleptičke karakteristike krajnjeg proizvoda. U tom kontekstu, prisustvo HMF je korišćeno u različitim namirnicama (džem, hrana za bebe, itd.) kao indikator neadekvatnog vremena ili temperature skladištenja (Rada-Mendoza i sar., 2004). Dodatno, *Codex Alimentarius* Svetske zdravstvene organizacije i Evropske unije (Directive 2001/110/EC of 20 December 2001. Off. J. Eur. Commun.) preporučuje maksimalni dozvoljeni sadržaj HMF u medu (40 mg/kg) i u soku od jabuka (50 mg/kg).

Većina metoda koje se trenutno primenjuju za analizu HMF u proizvodima zasnivaju se na klasičnim spektrofotometrijskim tehnikama (Porretta i Sandei, 1991; White, 1979) i HPLC analizi sa UV detekcijom (Castellari i sar., 2001; Nozal i sar., 2001; Coco i sar., 1995; Ramirez-Jimenez i sar., 2003; Rufian-Henares i De la Cueva, 2008; Zappala i sar., 2005), koja se trenutno koristi kao referentna metoda (AOAC 980.23). Objavljena je i metoda koja koristi LC–MS za analizu HMF u hrani za bebe (Gokmen i Senyuva, 2006). GC–MS takođe može biti dobra opcija da se osigura nedvosmislena identifikacija i kvantifikacija ovog jedinjenja u složenim matriksima (Horvath i Molnar-Perl, 1998; Molnar-Perl i sar., 1998).

## **4.6. Biološka aktivnost tečnih *M. vulgare* ekstrakata**

### **4.6.1. Antimikrobna aktivnost**

S obzirom na to da su biološka dejstva klasifikovana kao sekundarni farmakodinamski efekti ekstrakata i/ili izolovanih jedinjenja *M. vulgare*, oduvek bila u fokusu naučnog interesovanja a literaturni podaci su često kontradiktorni nameće se potreba za njihovim ispitivanjem. Prema literaturnim podacima za antimikrobnu aktivnost *M. vulgare*, većina autora je ispitala etanolne i metanolne ekstrakte *M. vulgare* (Al-Bakri i Afifi, 2007; Keles i sar., 2001; Kanyonga i sar., 2011; Masoodi i sar., 2008; Quave i Smeltzer, 2008) dobijene konvencionalnom ekstrakcijom, kao i etarsko ulje ove biljke (Zarai i sar., 2011; Bokaeian i sar., 2014). Kako bi se stekao uvid u antimikrobni potencijal UAEopt, MAEopt i MAC određene su minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) (Tabela 27) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) za devet bakterijskih sojeva i dva soja kvasaca.

Tabela 27. MIC vrednosti tečnih ekstrakata

Soj	MIC (mg/mL)		
	MAEopt	MAC	UAEopt
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	25,00	25,00	25,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	25,00	25,00	12,50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12,50	12,50	12,50
<i>Staphylococcus epidermis</i> JR-07	6,25	12,50	12,50
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	12,50	25,00	25,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	25,00	25,00	25,00
<i>Micrococcus luteus</i> JR-10	12,50	12,50	12,50
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	3,13	6,25	3,13
<i>Bacillus subtilis</i> PY79	12,50	12,50	12,50
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12,50	6,25	12,50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	≤0,05	0,20	≤0,05

Iz Tabele 27 se može uočiti razlika u vrednostima MIC dobijenim za Gram-pozitivne (Gr<sup>+</sup>) i za Gram-negativne (Gr<sup>-</sup>) bakterijske sojeve. Pokazalo se da su Gr<sup>+</sup> bakterije osjetljivije na delovanje sva tri ekstrakta u poređenju sa Gr<sup>-</sup> bakterijama, jer MIC vrednosti za Gr<sup>+</sup> variraju u opsegu 3,13 – 12,50 mg/mL, a za Gr<sup>-</sup> variraju u opsegu 12,50 – 25,00 mg/mL. Različita susceptibilnost Gr<sup>+</sup> i Gr<sup>-</sup> bakterija je posledica različite strukture ćelijske membrane. Gr<sup>-</sup> bakterije su obavijene tankim zidom peptidoglikana koji je okružen spoljašnjom membranom koju čine lipopolisaharidi, dok kod Gr<sup>+</sup> bakterija nedostaje spoljašnja membrana (Silhavy i sar., 2010). Prema tome, spoljašnja membrana predstavlja barijeru koja ograničava difuziju aktivnih principa (Pierozan i sar., 2009). Najosetljiviji bakterijski soj na UAEopt i MAEopt ekstrakate je *Bacillus cereus*, što potvrđuje i MIC vrednost (3,13 mg/mL) koja je oko 2-puta manja od MIC vrednosti za MAC ekstrakt.

U slučaju antifungalnog delovanja, ispitano je etarsko ulje *M. vulgare* i to na četiri soja gljivica (*Botrytis cinerea*, *Fusarium solan*, *Penicillium digitatum* i *Aspergillus niger*) (Zarai i sar., 2011) i metanolni ekstrakt *M. vulgare* na *Candida albicans* (Kanyonga i sar., 2011). U istraživanju koje su sproveli Kanyonga i sar. (2011), metanolni ekstrakt *M. vulgare* (50, 100, 200, 400 i 600 mg/mL) je pokazao umerenu do značajnu antibakterijsku aktivnost u odnosu na pet od šest testiranih bakterijskih organizama, u poređenju sa standardnim ciprofloksacinom. Studija je pokazala da je metanolni ekstrakt *M. vulgare* veoma efikasan protiv *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* (Gr<sup>+</sup>) i *C. albicans* i umereno efikasan protiv *P. vulgaris* i *E. coli*, dok je u slučaju *P. aeruginosa* (Gr<sup>-</sup>) neefikasan. Najniža MIC vrednost od 100 mg/mL je ostvarena kod većine ispitivanih bakterija (*B. subtilis*, *S. aureus* i *S. epidermis*) i kod gljivice *Candida albicans*, dok je najveća MIC od 400 mg/mL ostvarena kod *E. coli* i *P. vulgaris* koje su pokazale umerenu osjetljivost (Kanyonga i sar., 2011). U ovom radu, MIC vrednosti (12,50 mg/mL) UAEopt i MAEopt ekstrakata za sojeve *B. subtilis*, *S.*

*aureus* i *S. epidermis* su oko 8-puta manje u odnosu na MIC vrednosti metanolnog ekstrakta *M. vulgare*, što ukazuje na to da su UAEopt i MAEopt značajno potentniji za ove sojeve.

Povećanje mikrobne otpornosti na antibiotike ugrozilo je javno zdravlje na globalnom nivou, jer smanjuje efikasnost tretmana i povećava morbiditet, smrtnost i troškove zdravstvene zaštite (Coast i sar., 1996). Evolucija visoko rezistentnih bakterijskih sojeva dovela je do kompromitovanja upotrebe novijih generacija antibiotika (Levi i Eusterman, 2011). Iako se aktivni konstituenti lekova mogu javiti u nižim koncentracijama, biljni ekstrakti mogu biti bolji izvor antimikrobnih jedinjenja od sintetskih lekova. Fenomen aditivnih ili sinergističkih efekata često je presudan za bioaktivnost (Aqil i sar., 2006; Kamatou i sar., 2006) u biljnim ekstraktima, a u nekim slučajevima aktivnost se gubi u prečišćenim frakcijama (Cos i sar., 2006). Razvoj bakterijske rezistencije na sinergističke efekte kombinacije lekova, poput onih koji se nalaze u biljkama, može biti sporiji nego kod terapija sa pojedinačnim lekovima.

*Staphylococcus aureus* je patogen kod koga je više od 70% sojeva rezistentno na trimetoprim, ampicilin, eritromicin i penicilin. Sve veći broj sojeva ove bakterije razvio je rezistenciju na antibiotike poput meticilina i poznat je kao *S. aureus* rezistentan na meticilin (Bokaeian i sar., 2014). Upravo zato, jedan od odabranih sojeva za ispitivanje antimikrobnog delovanja UAEopt i MAEopt ekstrakata je i *S. aureus*. Rezultati su pokazali da je ovaj soj podjednako osetljiv na UAEopt, MAEopt i MAC ekstrakte (MIC = 12,5 mg/mL). U slučaju kvasaca, *Saccharomyces* je višestruko osetljiviji (MIC ≤ 0,05 mg/mL) na delovanje UAEopt i MAEopt u odnosu na *Candida albicans*, dok je za inhibiciju rasta *S. cerevisiae* potrebna oko 4-puta veća koncentracija MAC (MIC = 0,20 mg/mL).

Minimalna baktericidna koncentracija, odnosno najniža koncentracija na kojoj nema rasta na Petri ploči je određena za devet bakterijskih sojeva i dva soja kvasaca (Tabela 28).

**Tabela 28.** MBC vrednosti tečnih ekstrakata

Soj	MBC (mg/mL)		
	MAEopt	MAC	UAEopt
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	25,00	50,00	25,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	25,00	25,00	25,00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25,00	25,00	25,00
<i>Staphylococcus epidermis</i> JR-07	25,00	50,00	25,00
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	25,00	50,00	25,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	25,00	50,00	50,00
<i>Micrococcus luteus</i> JR-10	50,00	50,00	50,00
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	6,25	6,25	6,25
<i>Bacillus subtilis</i> PY79	>50,00	>50,00	>50,00
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	25,00	25,00	25,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	≤0,05	1,56	≤0,05

MBC vrednost je u slučaju MAC najmanje duplo veća u poređenju sa MIC za dati bakterijski ili gljivični soj. U slučaju UAEopt, MIC i MBC imaju iste vrednosti za sledeće Gr– sojeve: *E. coli* (25 mg/mL), *Proteus mirabilis* (25 mg/mL) i za kvasac *Saccharomyces* ( $\leq 0,05$  mg/mL). U slučaju MAEopt, MIC i MBC imaju iste vrednosti za Gr– sojeve: *E. coli* (25 mg/mL), *Klebsiella pneumoniae* (25 mg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (25 mg/mL) i za kvasac *Saccharomyces* ( $\leq 0,05$  mg/mL). Iz prethodno navedenih rezultata može se zaključiti da je *B. cereus* najosetljiviji bakterijski soj na UAEopt i MAEopt (MIC = 3,13 mg/mL). *B. cereus* je Gram-pozitivna aerobna ili fakultativno anaerobna, pokretna, sporogena bakterija u obliku štapića koja se široko distribuira u okruženju. Iako je ovaj soj povezan uglavnom sa trovanjem hranom, za njega se sve češće navodi da je uzrok ozbiljnih i potencijalno fatalnih infekcija van gastrointestinalnog trakta (Bottone, 2010). U slučaju kvasaca, *S. cerevisiae* je posebno osetljiv na UAEopt i MAEopt ekstrakte (MIC  $\leq 0,05$  mg/mL). Iako *Saccharomyces* važi za nepatogen koji se široko koristi u pekarstvu, pivarstvu i vinarstvu usled pojedinih virulentnih karakteristika poput sposobnosti da raste na suboptimalnim temperaturama, da formira pseudohife, da učestalo modifikuje morfologiju i da izaziva povećanu patogenost na *in vivo* modelu, može se svrstati u red kvasaca čija susceptibilnost na antifungalne lekove nije u potpunosti ispitana (Barchiesi i sar., 1998). Upravo zato bi se UAEopt i MAEopt ekstrakti potencijalno mogli koristiti kao antibakterijska sredstva za soj *B. cereus*, i kao antifungalna sredstva za soj *S. cerevisiae*.

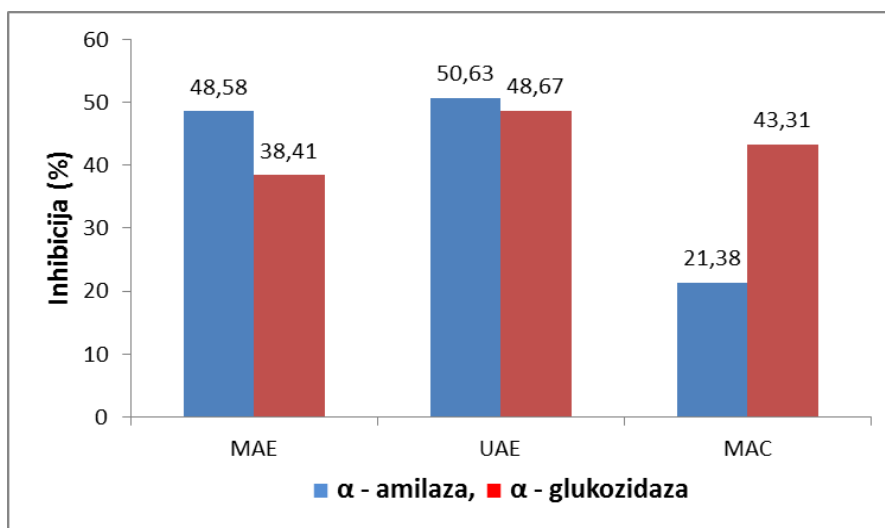
#### 4.6.2. Antihiperglikemijska aktivnost

Patogeneza dijabetesa upravljaju insulin i oralna primena hipoglikemijskih lekova kao što su sulfonilurea i biguanid (Vengurlekar i sar., 2008). Inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze su jedinstvena klasa lekova protiv dijabetesa koji se dobijaju iz bakterija, i predstavljaju enzimske inhibitore koji nemaju mehanizam delovanja usmeren na pankreas. Mehanizam delovanja se bazira na odlaganju apsorpcije ugljenih hidrata u gastrointestinalnom traktu i na taj način uspostavljanju kontrole nad postprandijalnom hiperglikemijom (Kalra i sar., 2013). Nažalost, osim što ima niz neželjenih efekata, nijedan oralni sintetički hipoglikemijski lek nije uspešan u lečenju dijabetesa i kontrolisanju dugoročnih mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija (Vengurlekar i sar., 2008; Stenman i sar., 1990). Dalje, toksičnost oralnih antidijabetičkih lekova veoma se razlikuje u kliničkim manifestacijama, težini i lečenju (Spiller i Sawyer, 2006). U tom kontekstu, za lečenje dijabetesa dostupni su i alternativni lekovi, posebno oni na biljnoj bazi, jer imaju prednosti poput efikasnosti, bezbednosti, pristupačnosti i prihvatljivosti od strane korisnika (Valiathan, 1998).

Uprkos činjenici da se *M. vulgare* koristi još od davnina u tretiranju dijabetesa, naučnici su tek u poslednje dve decenije uspeli da postave temelj potencijalnih antihiperglikemijskih delovanja iz rezultata posmatranih kroz prizmu etnofarmakološke upotrebe ove biljne vrste. Međutim, postoje kontradiktorni literaturni podaci o hipoglikemijskom delovanju *M. vulgare*. Prema jednom izvoru,

vodeni ekstrakt *M. vulgare* ne smanjuje značajno nivo glukoze u krvi (Herrera-Arellano i sar., 2004), dok prema drugim izvorima administracija vodenog ekstrakta cele biljke i listova *M. vulgare* indukuje značajno smanjenje nivoa glukoze kod pacova obolelih od dijabetesa (Ahmed i sar., 2011; Boudjelal i sar., 2012). Varijacija u rezultatima je najverovatnije posledica sakupljanja biljnog materijala sa različitih lokaliteta, što u velikoj meri utiče na kvalitet i kvantitet sekundarnih metabolita, zajedno sa korišćenjem različitih delova biljke i metoda ekstrakcija (Deluc i sar., 2009). Mnoge studije su pokazale da ekstrakti bogati polifenolima mogu biti glavni uzročnici antihiperглиkemijskog delovanja kod životinja i ljudi, najverovatnije preko inhibicije  $\alpha$ -amilaze i/ili  $\alpha$ -glukozidaze (Apostolidis i sar., 2007; Cheplik i sar., 2010; Sousa i Correia, 2012). Vodeni, etanolni i metanolni ekstrakti *M. vulgare* dobijeni konvencionalnim ekstrakcijama su ispitani u kontekstu hipoglikemijske aktivnosti na dijabetes (Boudjelal i sar., 2012; Herrera-Arellano i sar., 2004; Elberry, 2015; Novaes i sar., 2001).

U ovom radu, ispitani su *in vitro* inhibitorni potencijal tečnih etanolnih ekstrakata *M. vulgare* (UAEopt, MAEopt i MAC) za enzime  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu. Inhibitorni potencijal ekstrakata *M. vulgare* za  $\alpha$ -amilazu ima sledeći redosled: UAEopt > MAEopt > MAC (Slika 35). Prema rezultatima, UAEopt i MAEopt ekstrakti pokazuju sličnu inhibitornu aktivnost prema  $\alpha$ -amilazi (50,63% i 48,58%), koja je značajno veća u odnosu na MAC ekstrakt (21,38%). Potpuna inhibicija  $\alpha$ -amilaze izražena preko ekvivalenta akarboze za UAEopt, MAEopt i MAC iznosi 81,37; 75,69 i 0,33  $\mu\text{g/mL}$ . Može se zaključiti da UAEopt inhibira  $\alpha$ -amilazu obezbeđujući  $\text{IC}_{50}^{\alpha\text{-AIP}}$  vrednost blisku vrednosti koju obezbeđuje pozitivna kontrola akarboza (80  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Slika 35.** Inhibitorni potencijal tečnih ekstrakata za  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu

Ekstrakti UAEopt, MAEopt i MAC se značajno razlikuju po svom hemijskom sastavu, pri čemu su UAEopt i MAEopt bogatiji za hlorogensku kiselinu i kvercetin. Karthikesan i sar. (2010) su pokazali da hlorogenska kiselina poseduje antihiperглиkemijski potencijal kod pacova kod kojih je



indukovan dijabetes. Hlorogenska kiselina je prirodno fenolno jedinjenje koje se formira esterifikacijom kafene i hininske kiseline i nalazi se u raznim namirnicama, od kojih je kafa jedan od glavnih izvora (Clifford, 2000; Olthof i sar., 2000). Poznato je da ova kiselina snižava koncentraciju glukoze u krvi i inhibira glukozu-6-fosfatazu, ključni enzim koji katalizuje završni korak glikogenolize i glukoneogeneze, dva glavna metabolička puta odgovorna za oslobađanje glukoze iz jetre (Hemmerle i sar., 1997; Parker i sar., 1998; Herling i sar., 1998). Prethodni eksperimentalni podaci pokazuju da hlorogenska kiselina stimuliše unos glukoze u ćelije jetre i reguliše prekomernu proizvodnju glukoze inhibirajući ovaj enzim, i na taj način kontroliše glikemijski status kod dijabetesa tipa 2. Kvercetin je takođe prepoznat kao flavonol koji poboljšava kontrolu glikemije i umanjuje dijabetesnu nefropatiju kod pacova obolelih od dijabetesa (Anjaneyulu i Chopra, 2004). Ovaj aglikon rutina smanjuje koncentraciju glukoze u krvi i povećava oslobađanje insulina kod pacova sa indukovanim dijabetesom (Vessal i sar., 2003). Coskun i sar. (2005) su takođe zaključili da kvercetin ima protektivni efekat na  $\beta$ -ćelije pankreasa smanjenjem oksidativnog stresa i očuvanjem integriteta  $\beta$ -ćelije pankreasa.

Inhibitorski potencijal za  $\alpha$ -glukozidazu je slabiji u poređenju sa  $\alpha$ -amilazom, i ima sledeći redosled: UAEopt > MAC > MAEopt (Slika 35). Kao u slučaju  $\alpha$ -amilaze, UAEopt ekstrakt pokazuje najveću antihiperglikemijsku aktivnost (48,67%) što se potencijalno može objasniti prisustvom hlorogenske kiseline (33,11  $\mu\text{g/mL}$ ) i kvercetina (34,88  $\mu\text{g/mL}$ ). Potpuna inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze izražena preko ekvivalenta akarboze za UAEopt, MAEopt i MAC ekstrakte iznosi 26,10; 18,60 i 22,18  $\mu\text{g/mL}$ . Može se zaključiti da UAEopt inhibira  $\alpha$ -glukozidazu obezbeđujući  $\text{IC}_{50}^{\alpha\text{-GIP}}$  vrednost blisku vrednosti koju obezbeđuje akarboza (27  $\mu\text{g/mL}$ ). Oralni hipoglikemijski lekovi koji se koriste za lečenje dijabetesa imaju ozbiljne neželjene efekte kao što su povećanje telesne mase i gastrointestinalni poremećaji (Marre, 2002; Duckworth, 2003). Stoga su neophodna ispitivanja potencijalnih insulinskih senzibilizatora, poput hlorogenske kiseline, koji stimuliše delovanje insulina slično terapijskom delovanju metformina (McCarty, 2005). Takođe, pokazalo se da fenolna jedinjenja sa hidroksilnim grupama, poput hlorogenske kiseline sa šest hidroksilnih grupa, pokazuju antioksidativnu aktivnost neutralizacijom slobodnih radikala. Hlorogenska kiselina pored hidroksilnih grupa poseduje i karboksilnu grupu koja čini da se ponaša kao antidijabetičko sredstvo (Saremi i sar., 2003). U tom kontekstu, kliničke studije su pokazale da kombinovane terapije dovode do značajno većeg smanjenja glukoze u plazmi i glikoziliranog hemoglobina u odnosu na monoterapiju kod dijabetesa tipa 2 (Karthikesan i sar., 2010; Marre et al. 2002; Duckworth i sar. 2003). Dodatno, sinergističko delovanje hlorogenske kiseline i rutina (Kamalakkannan i Prince, 2006) prisutnih u UAEopt ekstraktu bi moglo značajno doprineti ukupnom antidijabetičkom delovanju ekstrakta. Rutin poseduje pogodna farmakokinetička svojstva jer se pri oralnoj administraciji može hidrolizovati u intestinalnoj mikroflori u izokvercitrin (kvercetin-3-glukozid) i kvercetin (Bokkenheuser i sar., 1987). Zatim se kvercetin apsorbira i izlučuje u žuč i urin u obliku glukuronidnih i sulfatnih konjugata u roku

od 48 h (Ueno i sar., 1984). Dalje se kvercetin razgrađuje na fenolne kiseline poput 3-hidroksifenil- i 3,4-dihidroksifenil sirćetne kiseline od strane crevnih bakterija (Hollman i Katan, 1998). Takođe, suplementacija rutinom tokom šest nedelja rezultirala je povećanim koncentracijama kvercetina, kemferola i izoramnetina (Boyle i sar., 2000). U studiji koju su sproveli Erlund i sar. (2000), nakon 32 h suplementacije kvercetina i rutina, ova jedinjenja su pronađena u plazmi kao glukuronidi i/ili sulfati kvercetina i kao nekonjugovani aglikon kvercetin, pri čemu rutin nije detektovan.

## 4.7. *Spray drying* odabranih tečnih ekstrakata

### 4.7.1. Efikasnost *spray drying* procesa

Prinos sušenja u *spray drying* procesu je definisan kao odnos mase suvog ekstrakta dobijenog nakon sušenja i mase ukupnog suvog ostatka u napojnoj smeši (MAC = 11,55; MAEopt = 16,30 i UAEopt = 17,92%, g/100 g droge). Bitan je parametar jer predstavlja efikasnost sušenja (Tontul i Topuz, 2017). Efikasnost sušenja tečnih ekstrakata *M. vulgare* je predstavljena u Tabeli 29. Prema rezultatima, može se zaključiti da se sušenje ekstrakata *M. vulgare*, koji su dobijeni primenom UAEopt i MAEopt, smatra efikasnim tek nakon dodatka 50% maltodekstrina. U slučaju sušenja ekstrakta MAC koji je dobijen primenom konvencionalne tehnike ekstrakcije, bez obzira na koncentraciju dodatog maltodekstrina proces sušenja je efikasan i rezultati su u skladu sa Bhandari i sar. (1997). Do gubitaka u *spray drying* procesu najčešće dolazi zbog zaostajanja suvog ekstrakta na zidovima komore i ciklona, kao i zbog dužeg trajanja procesa pri čemu izloženost suvog ekstrakta povišenoj temperaturi utiče na njegovu degradaciju i kasnije smanjenje kvaliteta krajnjeg proizvoda ukoliko se on sakuplja sa zidova komore i ciklona (Santana i sar., 2013). U ovom radu, u toku sušenja nije uočeno lepljenje suvog ekstrakta po zidovima komore za sušenje i nije došlo do formiranja naslaga osušenog ekstrakta ni na jednom delu uređaja.

**Tabela 29.** Efikasnost procesa sušenja

Uzorak	MD (%)	Efikasnost (%)
<b>P UAE-10</b>	10	34,66
<b>P UAE-50</b>	50	67,97
<b>P MAE-10</b>	10	33,46
<b>P MAE-50</b>	50	54,11
<b>P MAC-10</b>	10	55,97
<b>P MAC-50</b>	50	52,82

MD – maltodekstrin

Efikasnost sušenja se u najvećem broju slučajeva povećava sa povećanjem sadržaja nosača. Povećanje prinosa sušenja sa povećanjem koncentracije nosača je potkrepljeno brojnim primerima iz literature, za sok od grožđica (Papadakis i sar, 2006), sok od pomorandže (Goula i Adamopoulos,

2010), sok od nara (Vardin i Yasar, 2012), sok od crne maline (Fazaeli i sar., 2012), sok od šećerne trske (Largo Avila i sar., 2015) i rastvor saharoze (Jayasundera i sar., 2011). Glavni razlog za ovu pojavu je taj što veća koncentracija nosača doprinosi povećanju Tg smeše. Dodatno, Masters (1985) je objasnio niži prinos pri malom sadržaju nosača preko gustine napojne smeše. Pri niskim koncentracijama nosača, smanjuje se i viskozitet napojne smeše pri čemu se vlažne kapljice nakon atomizacije sudaraju velikom brzinom i intenzitetom sa zidom komore za sušenje. To uzrokuje stvaranje više taloga na zidovima komore i samim tim redukovan prinos sušenja.

#### 4.7.2. Fizičke osobine suvih ekstrakata

##### (1) Sadržaj vlage

Stabilnost, veličina čestica, morfologija i reološko ponašanje prahova su glavni parametri na koje utiče sadržaj vlage (Bhandari i Hartel, 2005). Mali sadržaj vlage je poželjan u pogledu adekvatnog skladištenja i manipulacije (Sinija i Mishra, 2008) jer osigurava produženo vreme trajanja stabilnosti ekstrakata sa smanjenom mogućnošću mikrobiološke kontaminacije (Vidović i sar., 2014). Pošto voda ima nisku Tg (-135 °C), ona je ujedno i glavna komponenta odgovorna za značajnu depresiju Tg u prahovima. Shodno tome, voda se smatra snažnim plastifikatorom (Mani i sar., 2002) i zato, ako je prisutna u velikim količinama u proizvedenom suvom prahu, može ugroziti njegov kvalitet smanjenjem svojstava slobodne protočnosti i povećanjem zgrudvavanja. Fizičke karakteristike, sadržaj vlage i higroskopnost suvih ekstrakata *M. vulgare* su prikazane u Tabeli 30.

**Tabela 30.** Fizičke karakteristike suvih ekstrakata

Uzorak	Sadržaj vlage (%)	Higroskopnost nakon 48 h (%)
<b>P UAE-10</b>	6,61	20,26
<b>P UAE-50</b>	5,33	16,35
<b>P MAE-10</b>	7,27	17,21
<b>P MAE-50</b>	6,42	14,4
<b>P MAC-10</b>	5,63	14,8
<b>P MAC-50</b>	4,23	13,02

Sadržaj vlage u suvim ekstraktima *M. vulgare* varira od 4,23 do 7,27%. Blago smanjenje sadržaja vlage u svim uzorcima uz dodatak maltodekstrina je očekivano. Najmanji sadržaj vlage (4,23%) određen je kod P MAC-50. Ovako nizak sadržaj vlage može da obezbedi zadovoljavajući rok trajanja suvih ekstrakata usled retke pojave mikrobiološke kontaminacije. U naučnoj literaturi do sada nije ispitano sušenje tečnih ekstrakata *M. vulgare* primenom *spray drying* procesa, pa su dobijeni rezultati za fizičke osobine suvih ekstrakata upoređeni sa rezultatima sušenja drugih biljnih vrsta.

Rezultati istog reda veličine (3 – 5%) dobijeni su kada je sadržaj vlage određen u prahu zelenog čaja (Sinija i Mishra, 2008). Sadržaj vlage *A. millefolium* prahova (6,10 – 7,68%) pokazao se većim nego u *M. vulgare* prahovima dobijenim u ovom radu (Vidović i sar., 2014). Takođe, pri poređenju sa sadržajem vlage u prahovima *S. officinalis* dobijenim sušenjem macerata (MAC = 7,18%; MAC-20 = 15,35%), ultrazvučnog ekstrakta (UAE = 8,94%; UAE-20 = 10,04%) i mikrotalasnog ekstrakta (MAE = 5,92%; MAE-20 = 9,40%) bez i sa dodatkom 20% maltodekstrina, može se konstatovati da suprotno rezultatima u ovom radu sa dodatkom nosača sadržaj vlage raste, kao i da je veći od sadržaja vlage u *M. vulgare* prahovima (Pavlić, 2017).

## (2) Higroskopnost

Higroskopnost je definisana kao sposobnost praha da apsorbuje vlagu iz okolne sredine (Rodríguez-Hernández i sar., 2005). Obično se izračunava na osnovu priraštaja mase nakon skladištenja praha (određeni period vremena, 48 h ili 7 dana) u eksikatoru u uslovima relativne vlažnosti veće od 60%. Poželjno je da se proizvede prah sa niskom higroskopnošću, jer visoka higroskopnost znači veću tendenciju ka apsorpciji vode i pojavu lepljivosti (Tonon i sar., 2008). Prema Nurhadi i sar. (2012) prah koji ima higroskopnost manju od 20% se smatra za nehigroskopan i zadovoljavajućeg kvaliteta. Svi prahovi osim P UAE-10 se mogu okarakterisati kao nehigroskopni (Tabela 30). Za sve prahove je zajedničko da se sa dodatkom veće koncentracije maltodekstrina smanjuje higroskopnost. Najveća higroskopnost je zapažena kod P UAE-10 (20,26%), a najmanja kod P MAC-50 (13,02%) nakon 48 h.

Higroskopnost praha je uglavnom u korelaciji sa njegovim sastavom (Mishra i sar., 2014), vrstom i koncentracijom nosača i veličinom čestica (Du i sar., 2014). Neki autori ukazuju na povezanost između sadržaja vlage i higroskopnosti praha (Caparino i sar., 2012; Santana i sar., 2013, Tonon i sar., 2008). Međutim, ova korelacija je relativna i nije potvrđena od strane drugih autora (Ahmed i sar., 2010; Bicudo i sar., 2015). Analizom rezultata sadržaja vlage i higroskopnosti u suvim ekstraktima *M. vulgare* može se zaključiti da je najbolje karakteristike u pogledu ove dve osobine suvih ekstrakata pokazao suvi ekstrakt P MAC-50 u kome su određeni najmanji sadržaj vlage (4,23%) i najmanja higroskopnost (13,02%).

## 4.8. Hemijska karakterizacija suvih ekstrakata

### 4.8.1. HPLC analiza fenolnih kiselina

HPLC analiza suvih ekstrakata *M. vulgare*, proizvedenih sušenjem odabranih tečnih ekstrakata UAEopt, MAEopt i MAC, u kom je detektovan najveći sadržaj fenolnih kiselina i flavonoida, je izvršena u cilju određivanja sadržaja dominantnih fenolnih kiselina, kao i poređenja hemijskog sastava pre (Tabela 31) i nakon *spray drying* procesa (Tabela 32). Rezultati HPLC analize iz Tabele 24 za MAC (50% EtOH) ekstrakt i iz Tabele 25 za UAEopt i MAEopt ekstrakte su preračunati na 1 g suvog ostatka radi lakšeg poređenja i predstavljeni su u Tabeli 31. Može se konstatovati da su tečni ekstrakti, UAEopt, MAEopt i MAC, značajno bogatiji u pogledu sadržaja fenolnih kiselina i flavonoida u odnosu na svoje suve analoge (P MAC-10, P MAC-50, P UAE-10, P UAE-50, P MAE-10 i P MAE-50). Zbog kratkog vremena kontakta (< 1 s) u struji toplog vazduha ( $T_u = 130 - 135$  °C) očekivan je minimalan termički stres *spray drying* procesa na polifenole. Međutim, ako se uporede MAC i P MAC-10 po hemijskom sastavu može se uočiti da su najveću degradaciju tokom *spray drying* procesa pretrpele *p*-kumarinska kiselina sa degradacijom od 88,3% i rutin sa degradacijom od 95,6%. U slučaju P UAE-10 i P MAE-10, sadržaj hlorogenske kiseline je prepolovljen nakon sušenja. Lindquist i Yang (2011) su zaključili da veći udeo hidroksilnih i drugih fenolnih grupa u molekularnoj strukturi polifenola utiče na njihovu podložnost procesima termičke degradacije, iz čega proizilazi da je hlorogenska kiselina sa šest hidroksilnih grupa posebno podložna termičkoj degradaciji. Takođe, sadržaj kvercetina je smanjen za 42,6% kod P UAE-10 odnosno za 36,9% kod P MAE-10 u odnosu na napojnu smešu, a sadržaj rutina je redukovano za 60% kod P UAE-10 odnosno za 30% kod P MAE-10. Za razliku u stepenu degradacije kvercetina i rutina je odgovorna OH grupa u položaju 3 C-prstena jer je u slučaju rutina ona blokirana šećernom komponentom. Degradacija kvercetina u prisustvu kiseonika se može značajno smanjiti ako se kvercetin veže na odgovarajući polimerni nosač (Sun-Waterhouse i sar., 2013), što objašnjava zašto suvi ekstrakti proizvedeni u ovom radu još uvek imaju umeren sadržaj kvercetina. Za razliku od P MAC-10, sadržaj *p*-kumarinske kiseline u P UAE-10 i P MAE-10 je ostao gotovo nepromenjen nakon sušenja, a ova kiselina se već pokazala kao najotpornija od detektovanih na degradaciju usled ultrazvuka i mikrotalasa. Wilkowska i sar. (2016) su ispitali sadržaj hidroksicimetnih kiselina u suvom ekstraktu borovnice i dobili slične rezultate za *p*-kumarinsku kiselinu (0,22 mg/g) i ferulnu kiselinu (0,63 mg/g) dok je sadržaj hlorogenske kiseline (0,52 mg/g) duplo manji nego kod P UAE-10. Smanjenje sadržaja hiperozida je 85% kod P-UAE-10 odnosno 91% kod P MAE-10.

**Tabela 31.** Sadržaj dominantnih fenolnih kiselina i flavonoida u tečnim ekstraktima

Jedinjenje	MAC	UAEopt	MAEopt
	(mg/g S.O.)		
Hlorogenska kiselina	-	1,85	1,43
Ferulna kiselina	3,10	0,07	0,07
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	2,65	0,27	0,26
Kafena kiselina	1,57	0,01	tr
Rutin	20,51	2,77	2,09
Hiperozid	2,21	1,06	0,90
Kvercetin	-	1,95	1,84

- nije detektovano; tr – u tragovima

**Tabela 32.** Sadržaj dominantnih fenolnih kiselina i flavonoida u suvim ekstraktima

Jedinjenje	P MAC-10	P MAC-50	P UAE-10	P UAE-50	P MAE-10	P MAE-50
	(mg/g suvog ekstrakta)					
Hlorogenska kiselina	-	-	1,01	0,51	0,71	0,52
Ferulna kiselina	0,62	0,51	-	-	-	-
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,31	0,20	0,21	0,14	0,26	0,23
Kafena kiselina	0,63	0,40	-	-	-	-
Rutin	0,91	0,48	1,10	0,76	1,48	1,34
Hiperozid	0,11	0,16	0,16	0,01	0,08	0,03
Kvercetin	-	-	1,12	0,92	1,18	1,04

- nije detektovano

Sadržaj fenolnih kiselina i flavonoida se značajno smanjuje kada se koncentracija maltodekstrina u suvim ekstraktima poveća sa 10 na 50% (Tabela 32). Sličan trend je primećen kod smanjenja sadržaja ukupnih fenola sa povećanjem koncentracije nosača (Nunes i sar., 2015, Mishra i sar., 2014, Cam i sar., 2014) koji ima efekat razblaživanja krajnjeg proizvoda. Tuyen i sar. (2010) su zaključili da dodatak maltodekstrina u koncentraciji od 10 do 20% ne utiče značajno na antioksidativnu aktivnost dobijenog suvog ekstrakta. Nunes i sar. (2015) su sušili *spray drying* tehnikom napojnu smešu bez i sa dodatkom 20, 30 i 40% maltodekstrina. Utvrdili su značajno smanjenje sadržaja polifenola, posebno kafene kiseline (77%), nakon sušenja napojne smeše bez dodatog nosača. U ovom radu, kafena i ferulna kiselina koje su detektovane u tragovima u UAEopt i MAEopt ekstraktima očekivano nisu detektovane u suvim ekstraktima. Drugi autori su takođe naveli da procesi sušenja *E. purpurea* u velikoj meri utiču na sadržaj derivata kafene kiseline (Kim i sar., 2000) koji su termolabilni.

## 4.9. Biološka aktivnost suvih ekstrakata *M. vulgare*

### 4.9.1. Antimikrobna aktivnost

Određen je antimikrobni potencijal svih šest suvih ekstrakata (Tabele 33 i 34) iako će se akcenat staviti na suve ekstrakte dobijene sa manjim sadržajem maltodekstrina (P MAC-10, P UAE-10 i P MAE-10) kako bi mogli da se porede sa drugim suvim ekstraktima i kako bi se eliminisao uticaj nosača. U slučaju P MAE-10, antimikrobno delovanje suvog ekstrakta je oko 2-puta intenzivnije prema Gr<sup>-</sup> bakterijama u odnosu na tečni MAE<sub>opt</sub> ekstrakt, osim u slučaju *Proteus mirabilis* gde su aktivnosti tečnog i suvog ekstrakta jednake. Što se tiče Gr<sup>+</sup> bakterija, P MAE-10 je oko 2-puta potentniji prema *S.aureus* i oko 4-puta prema *B. subtilis*, a za ostale sojeve je pokazao jednaku aktivnost kao tečni MAE<sub>opt</sub>. Može se izdvojiti antimikrobno delovanje P MAE-10 prema kvascu *C.albicans* koje je oko 2-puta jače od tečnog ekstrakta, dok je uočena jednaka aktivnost oba ekstrakta prema *S. cerevisiae*.

**Tabela 33.** MIC vrednosti suvih ekstrakata određene mikrodilucionom metodom

Soj	MIC (mg/mL)					
	P MAE-10	P MAE-50	P MAC-10	P MAC-50	P UAE-10	P UAE-50
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
<i>Staphylococcus epidermis</i> JR-07	6,25	3,125	6,25	3,125	1,56	1,56
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Micrococcus luteus</i> JR-10	12,5	6,25	6,25	6,25	3,125	6,25
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	3,125	0,78	0,39	3,125	0,78	0,78
<i>Bacillus subtilis</i> PY79	3,125	6,25	3,125	3,125	3,125	6,25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6,25	6,25	6,25	6,25	3,125	6,25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	≤0,049	≤0,049	≤0,049	0,098	≤0,049	≤0,049

U slučaju P UAE-10, antimikrobno delovanje suvog ekstrakta je, kao i kod P MAE-10, oko 2-puta jače prema Gr<sup>-</sup> bakterijama, osim u slučaju *K. pneumoniae* gde je uočena jednaka aktivnost. Što se tiče Gr<sup>+</sup> sojeva, P UAE-10 je oko 8-puta potentniji za *S. epidermis*, oko 4-puta potentniji za *M. luteus*, *B. cereus* i *B. subtilis* i oko 2-puta potentniji za *S.aureus* u odnosu na tečni UAE<sub>opt</sub> ekstrakt. Može se izdvojiti antimikrobno delovanje P UAE-10 prema kvascu *C.albicans* koje je oko 4 puta jače od tečnog ekstrakta dok je, kao i kod P MAE-10, uočena jednaka aktivnost oba ekstrakta prema *S. cerevisiae*. U slučaju P MAC-10, antimikrobno delovanje suvog ekstrakta je oko 2-puta intenzivnije prema svim Gr<sup>-</sup> sojevima u poređenju sa tečnim maceratom. Što se tiče Gr<sup>+</sup> sojeva, P MAC-10 je oko

2-puta potentniji za sve ispitivane sojeve osim za *B. cereus* gde je oko 16-puta potentniji i *B. subtilis* gde je oko 4-puta potentniji u odnosu na tečni macerat. Prema *C. albicans* oba ekstrakta, tečni i suvi, ispoljavaju jednaku aktivnost dok prema *S. cerevisiae* suvi ekstrakt ispoljava oko 4-puta jaču aktivnost.

**Tabela 34.** MBC vrednosti suvih ekstrakata određene mikrodilucionom metodom

Soj	MBC (mg/mL)					
	P MAE-10	P MAE-50	P MAC-10	P MAC-50	P UAE-10	P UAE-50
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	12,50	25,00	12,50	50,00	12,50	25,00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,25	12,50	6,25	12,50	6,25	6,25
<i>Staphylococcus epidermis</i> JR-07	6,25	6,25	6,25	12,50	6,25	6,25
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
<i>Micrococcus luteus</i> JR-10	6,25	12,50	12,50	12,50	12,50	25,00
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,78	6,25	0,78	6,25	12,50	12,50
<i>Bacillus subtilis</i> PY79	12,50	25,00	6,25	12,50	12,50	25,00
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	≤0,05	≤0,05	0,10	0,10	≤0,05	≤0,05

Minimalna baktericidna koncentracija, odnosno najniža koncentracija na kojoj nema rasta na Petri ploči, je za sve suve ekstrakte prema Gr<sup>-</sup> sojevima jednaka (12,5 mg/mL), osim za *K. pneumoniae* gde je za P MAE-50 i P UAE-50 oko 2-puta veća, a za P MAC-50 oko 4 puta veća. U slučaju Gr<sup>+</sup> sojeva, MBC vrednosti variraju u opsegu od 0,78 do 25 mg/mL. Najmanje MBC vrednosti (0,78 mg/mL) su uočene kod suvih ekstrakata P MAE-10 i P MAC-10 za soj *B. cereus*, dok su najveće vrednosti (25 mg/mL) određene kod P MAE-50 i P UAE-50 za soj *B. subtilis*. U slučaju kvasaca, svi suvi ekstrakti su pokazali jednaku MBC vrednost (12,5 mg/mL) prema *C. albicans*, dok je *S. cerevisiae* izuzetno osetljiv na dejstvo suvih ekstrakata jer je MBC ≤ 0,05 za P MAE-10, P MAE-50, P UAE-10 i P UAE-50, a za P MAC-10 i P MAC-50 MBC iznosi 0,10 mg/mL.

#### 4.9.2. Antihiperглиkemijska aktivnost

Suvi ekstrakti (P MAC-10, P MAC-50, P UAE-10, P UAE-50, P MAE-10, P MAE-50) nisu pokazali antihiperглиkemijsko delovanje najverovatnije usled degradacije hlorogenske kiseline i kvercetina (Tabela 32), koji su nosioci inhibicije enzima α-amilaze i α-glukozidaze, prilikom sušenja *spray drying* tehnikom. Sadržaj hlorogenske kiseline u P UAE-10 i P MAE-10 se prepolovio nakon sušenja, dok se sadržaj kvercetina smanjio za 42,6% kod P UAE-10 i za 36,9% kod P MAE-10.



## 5. ZAKLJUČCI

U okviru ove disertacije izvršena su ispitivanja primene savremenih metoda ekstrakcije (UAE, MAE, SWE i SC-CO<sub>2</sub>) za proizvodnju tečnih i lipofilnih ekstrakata iz nadzemnog dela *Marrubium vulgare* L. Odabrani tečni ekstrakti su optimizovani i podvrgnuti *spray drying* tehnici sušenja. Tečni i suvi ekstrakti su detaljno ispitani po pitanju hemijskog sastava, antimikrobnog i antihiperглиkemijskog delovanja. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ✓ Poređenjem ukupnog prinosa ekstrakcije i prinosa polifenola u tečnim ekstraktima *M. vulgare* dobijenim primenom konvencionalne (maceracija) i savremenih (UAE, MAE i SWE) metoda ekstrakcije, zaključeno je da savremene tehnike obezbeđuju veći prinos TP i TF, kao i veću antioksidativnu aktivnost (IC<sub>50</sub>).
- ✓ U cilju selekcije adekvatnog ekstragensa za UAE i MAE izvedeni su preliminarni eksperimenti maceracije *M. vulgare* sa različitim koncentracijama etanola (30, 50, 70 i 96%), pri čemu su u svakom maceratu spektrofotometrijski određene vrednosti TP, TF i IC<sub>50</sub>. Na osnovu dobijene maksimalne vrednosti Y, TP i TF, i minimalne vrednosti IC<sub>50</sub>, u maceratu sa 50% etanolom (MAC) kao ekstragensom, ova koncentracija etanola je odabrana za UAE. HPLC analiza macerata je potvrdila najveći sadržaj fenolnih kiselina i flavonoida u MAC ekstraktu. Koncentracija etanola u MAE procesu je predstavljala nezavisno promenljivu u opsegu 30 – 70%.
- ✓ SWE, UAE i MAE su optimizovane korišćenjem Box-Behnken eksperimentalnog dizajna i metode odzivne površine. Analiza varijanse (ANOVA) i deskriptivna statistika (koeficijent determinacije,  $R^2$  i koeficijent varijacije, CV) su korišćene za proveru slaganja modela sa eksperimentalnim podacima, pri čemu se može zaključiti da su primenjeni kvadratni polinomi u svim slučajevima predstavljali adekvatnu aproksimaciju eksperimentalnih rezultata.
- ✓ Optimalni uslovi UAE su temperatura od 73,6 °C, vreme ekstrakcije 40 min i snaga ultrazvuka od 30,3 W/L, dok su predviđene vrednosti za ispitivane odzive Y = 16,90%; TP = 91,48 mg EGK/g S.O.; TF = 50,07 mg EK/g S.O.; IC<sub>50</sub> = 0,0181 mg/mL i EC<sub>50</sub> = 0,0564 mg/mL.
- ✓ Optimalni uslovi MAE su koncentracija etanola od 63,8%, vreme ekstrakcije 15 min i snaga mikrotalasa 422 W, dok su predviđene vrednosti za ispitivane odzive Y = 15,76%; TP = 110,04 mg EGK/g S.O.; TF = 62,45 mg EK/g S.O.; IC<sub>50</sub> = 0,0191 mg/mL i EC<sub>50</sub> = 0,0545 mg/mL.

- ✓ Optimalni uslovi SWE su temperatura od 200 °C, vreme ekstrakcije 20,29 min i upotreba vode bez dodatka HCl kao ekstragensa. Modelom predviđene optimalne vrednosti za TP, TF i IC<sub>50</sub> su 114,07 mg EGK/g S.O., 36,94 mg EK/g S.O. i 0,0386 mg/mL.
- ✓ Analizom uticaja parametara na proces ekstrakcije može se zaključiti da temperatura predstavlja dominantni parametar kod UAE i SWE procesa, dok su koncentracija etanola i snaga mikrotalasa dominantni parametri kod MAE procesa.
- ✓ Tečni ekstrakti (UAEopt, MAEopt i SWEopt) dobijeni na optimalnim uslovima i MAC, sa najvećim sadržajem fenolnih jedinjenja i flavonoida, su podvrgnuti HPLC analizi, pri čemu su u UAEopt i MAEopt detektovane dominantne fenolne kiseline i flavonoidi (kafena kiselina, hlorogenska kiselina, ferulna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kvercetin, rutin i hiperozid). U MAC ekstraktu su identifikovane kao dominantne sledeće fenolne kiseline i flavonoidi: ferulna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kafena kiselina, rutin i hiperozid. Rezultati HPLC analize SWEopt su pokazali samo HMF sadržaj bez prisustva fenolnih jedinjenja zbog čega suvi ekstrakt dobijen sušenjem SWEopt, nije podvrgnut analizama određivanja inhibitornog potencijala enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze, i antimikrobne aktivnosti.
- ✓ U cilju ispitivanja antimikrobnog potencijala UAEopt, MAEopt i MAC određene su MIC i MBC vrednosti za devet bakterijskih sojeva i dva soja kvasaca. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je najosetljiviji bakterijski soj na ekstrakte *Bacillus cereus*, jer MIC za oba ekstrakta iznosi 3,13 mg/mL. U slučaju kvasaca, *S. cerevisiae* je posebno osetljiv na UAEopt i MAEopt ekstrakta (MIC  $\leq$  0,05). Upravo zato bi se UAEopt i MAEopt ekstrakti potencijalno mogli koristiti kao antibakterijska sredstva za soj *B. cereus*, i kao antifungalna sredstva za soj *S. cerevisiae*.
- ✓ Ispitan je *in vitro* inhibitorni potencijal tečnih ekstrakata (UAEopt, MAEopt i MAC) za enzime  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu. Inhibitorni potencijal tečnih ekstrakata *M. vulgare* za  $\alpha$ -amilazu ima sledeći redosled: UAEopt > MAEopt > MAC. Prema rezultatima, UAEopt i MAEopt ekstrakti pokazuju sličnu inhibitornu aktivnost prema  $\alpha$ -amilazi (50,63% i 48,58%, redom), koja je značajno veća u odnosu na MAC (21,38%). Potpuna inhibicija  $\alpha$ -amilaze izražena preko ekvivalenta akarboze za UAEopt, MAEopt i MAC iznosi 81,37; 75,69 i 0,33  $\mu$ g/mL. Može se zaključiti da UAEopt inhibira  $\alpha$ -amilazu obezbeđujući IC<sub>50</sub> vrednost blisku vrednosti koju obezbeđuje akarboza (80  $\mu$ g/mL). Inhibitorni potencijal za  $\alpha$ -glukozidazu je slabiji u poređenju sa  $\alpha$ -amilazom, i ima sledeći redosled: UAEopt > MAC > MAEopt. Kao u slučaju  $\alpha$ -amilaze, UAEopt pokazuje najveću antihyperglikemijsku aktivnost (48,67%) što se potencijalno može objasniti prisustvom hlorogenske kiseline (33,11  $\mu$ g/mL) i kvercetina (34,88  $\mu$ g/mL). Potpuna inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze izražena preko ekvivalenta akarboze za UAEopt, MAEopt i MAC iznosi 26,10; 18,60 i 22,18  $\mu$ g/mL. Može se zaključiti da UAEopt inhibira  $\alpha$ -glukozidazu obezbeđujući IC<sub>50</sub> vrednost blisku vrednosti koju obezbeđuje akarboza (27  $\mu$ g/mL).

- ✓ Ekstrakcija lipofilnih jedinjenja je izvršena konvencionalnom (*Soxhlet* ekstrakcija) i savremenom (SC-CO<sub>2</sub>) ekstrakcionom tehnikom, i upoređen je ukupan prinos ekstrakcije i hemijski sastav ekstrakata. U superkritičnim ekstraktima je utvrđeno prisustvo 10 – 20 komponenti u zavisnosti od uslova ispitivanih parametara, dok je u *Soxhlet* ekstraktu identifikovano 11 komponenti bez prisustva marubiina. Procenat ukupnih identifikovanih komponenti u superkritičnim ekstraktima je varirao u zavisnosti od primenjenog pritiska i temperature i kretao se u opsegu od 65,66 – 89,41% za 100 bar; 76,39 – 80,66% za 200 bar i 61,98 – 92,26% za 300 bar. Komponente identifikovane u ekstraktima mogu se klasifikovati u sledeće grupe: oksidovani monoterpeni, seskviterpenski ugljovodonici, alifatični ugljovodonici, masne kiseline i diterpeni. Na osnovu dobijenih rezultata, ekstrakti *M. vulgare* 100/40 i 100/50 su imali najviše seskviterpenskih ugljovodonika (40,29 i 23,40%), pri čemu je ekstrakt 100/40 izrazito bogatiji seskviterpenima. Međutim, temperatura od 50 °C je povoljnija za izolovanje marubiina na pritisku od 100 bar, jer je njegov relativni udeo veći sedam puta u odnosu na udeo dobijen na 40 °C. Superkritični ekstrakti *M. vulgare* 200/40, 200/50 i 200/60 imali su najviše marubiina (62,60; 68,41 i 71,96%). Najdominantnija komponenta u svim dobijenim superkritičnim ekstraktima je hemotaksonomski marker marubiin, osim kod ekstrakta 100/40 gde je relativni udeo marubiina 4,32%. Relativni sadržaj ovog diterpena u ekstraktima dobijenim na različitim temperaturama i pritisku od 100 bar varira u opsegu 4,32- 30,18%, u ekstraktima dobijenim na pritisku od 200 bar varira u opsegu 62,60 – 71,96% i u ekstraktima dobijenim na 300 bar varira u opsegu 23,74 – 58,39%. Najveći sadržaj marubiina (71,96%) je dobijen na pritisku od 200 bar i temperaturi od 60 °C.
- ✓ U cilju prevazilaženja nedostataka tečnih formi proizvoda, sprovedeno je ispitivanje mogućnosti primene sušenja *spray drying* tehnikom za transformaciju tečnih ekstrakata *M. vulgare* (UAEopt, MAEopt i MAC) u suve ekstrakte, odnosno prahove. Suvim ekstraktima su definisane najznačajnije fizičke i hemijske osobine, kao i biološka aktivnost. Može se zaključiti da se kod UAEopt i MAEopt kao napojne smeše *spray drying* proces smatra efikasnim tek nakon dodatka 50% MD, dok je kod macerata bez obzira na koncentraciju dodatog MD proces sušenja efikasan. Sadržaj vlage u suvim ekstraktima *M. vulgare* varira u opsegu 4,23 – 7,27%. Svi suvi ekstrakti osim P UAE-10 se mogu okarakterisati kao nehigroskopni, i svima je zajedničko da se sa dodatkom veće koncentracije MD smanjuje higroskopnost.
- ✓ HPLC analiza suvih ekstrakata *M. vulgare* (P MAC-10, P MAC-50, P UAE-10, P UAE-50, P MAE-10, P MAE-50) je izvršena u cilju određivanja sadržaja dominantnih fenolnih kiselina, kao i poređenja hemijskog sastava pre i nakon *spray drying* procesa. Može se zaključiti da su tečni ekstrakti bogatiji u pogledu fenolnih kiselina i flavonoida u odnosu na svoje suve analoge.

- ✓ Iako je određen antimikrobni potencijal za svih šest suvih ekstrakata, detaljno su analizirani suvi ekstrakti dobijeni sa manjim sadržajem maltodekstrina (P MAC-10, P UAE-10 i P MAE-10). Za većinu ispitivanih Gr<sup>+</sup> i Gr<sup>-</sup> bakterijskih sojeva P MAC-10 se ističe sa oko 2 – 16 puta većim antimikrobnim potencijalom u odnosu na svoj tečni analog i P UAE-10 sa oko 2 – 8 puta većim potencijalom u odnosu na tečni analog. U slučaju antifungalnog delovanja, P UAE-10 i P MAE-10 su slični, jednako su aktivni prema *S. cerevisiae* u poređenju sa svojim tečnim analogima. Prema *C.albicans* P MAE-10 ispoljava oko 2-puta jaču aktivnost, odnosno P UAE-10 oko 4-puta jaču aktivnost u odnosu na svoje tečne analoge.
- ✓ Suvi ekstrakti (P MAC-10, P MAC-50, P UAE-10, P UAE-50, P MAE-10, P MAE-50) nisu pokazali antihyperglikemijsko delovanje najverovatnije usled degradacije hlorogenske kiseline i kvercetina, koji su nosioci inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze, prilikom sušenja *spray drying* tehnikom.

## 6. LITERATURA

1. Stevanović, V., Jovanović, S., & Janković, M. M. (1995). Prilog rasprostranjenju i ekologiji visokoplaninskih borova na Šar planini.
2. Tasić, S., Šavikin, K., & Menković, N. (2009). Vodič kroz lekovito bilje. Samostalno izdanje, Beograd.
3. Chemat, F., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Allaf, T., & Vorobiev, E. (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 157-168.
4. Ahvazi, M. A. R. Y. A. M., Jamzad, Z. I. B. A., Balali, G. R., & Saeidi, H. O. J. J. A. T. O. L. L. A. H. (2016). Trichome micro-morphology in *Marrubium* L.(Lamiaceae) in Iran and the role of environmental factors on their variation. *Iranian Journal of Botany*, 22(1), 39-58.
5. Akgül, G., Ketenöglu, O., Pinar, N. M., & Kurt, L. (2008). Pollen and seed morphology of the genus *Marrubium* (Lamiaceae) in Turkey. In *Annales Botanici Fennici* (pp. 1-10). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
6. Rechinger, K. H., & Hedge, I. C. (1982). *Flora Iranica*, Vol. 150. Akademische Druck Verlagsanstalt, Graz Austria.
7. Jamzad, Z. (2012). *Flora of Iran*, no. 76, Lamiaceae. Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran, Iran.
8. Grassia, A., Senatore, F., Arnold, N. A., Bruno, M., Piozzi, F., Rigano, D., & Formisano, C. (2006). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from aerial parts of two *Marrubium* sp.(Lamiaceae) growing wild in Lebanon. *Polish Journal of Chemistry*, 80(4), 623-628.
9. Bentham, G. (1836). *Labiatarum genera et species: Or, A description of the genera and species of plants of the order Labiatae; with their general history, characters, affinities, and geographical distribution*. Ridgway and Sons.
10. Boissier, E. (1867). *Flora Orientalis: Thalamiflorae* (Vol. 1). apud H. Georg.
11. Briquet J. (1896) Labiatae. In: Engler A, Prantl K. (Eds) *Die Natürlichen Pflanzenfamilien – 4 W*. Engelmann, Leipzig, 183–375.
12. Cullen, J. (1982). *Marrubium* L. *Flora of Turkey and the Aegean Islands*, 7, 165-178.
13. EMA/HMPC/604271/2012, Assessment report on *Marrubium vulgare* L., herba, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)
14. ESCOP monographs (2013), The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, MARRUBII HERBA, White horehound

15. Hmamou, D. B., Salghi, R., Zarrouk, A., Zarrok, H., Benali, O., Errami, M., & Hammouti, B. (2013). Inhibition effect of horehound (*Marrubium vulgare* L.) extract towards C38 steel corrosion in HCl solution. *Research on Chemical Intermediates*, 39(7), 3291-3302.
16. Nagy, M., & Svajdlenka, E. (1998). Comparison of Essential Oils from *Marrubium vulgare* L. and *M. peregrinum* L. *Journal of Essential Oil Research*, 10(5), 585-587.
17. Asadipour, A., Mehrabani, M., Nazeri, V. A. H. I. D. E. H., & Tabarraii, M. (2005). Composition of the essential oil of *Marrubium vulgare* L. *Pharmaceutical Sciences*, 2, 75-82.
18. Khanavi, M., Ghasemian, L., Motlagh, E. H., Hadjiakhoondi, A., & Shafiee, A. (2005). Chemical composition of the essential oils of *Marrubium parviflorum* Fisch. & CA Mey. and *Marrubium vulgare* L. from Iran. *Flavour and fragrance journal*, 20(3), 324-326.
19. Bayir, B., Gündüz, H., Usta, T., Şahin, E., Özdemir, Z., Kayır, Ö., ... & Erenler, R. (2014). Chemical composition of essential oil from *Marrubium vulgare* L. leaves. *J. New Results Sci*, 6, 44-50.
20. Said-Al Ahl, H. A., Gendy, A. S., Mahmoud, A. A., & Mohamed, H. F. (2015). Essential Oil Composition of *Marrubiumvulgare* L. Cultivated in Egypt. *International Journal of Plant Research*, 1(4), 138-141.
21. Rezazi, S., Hanini, S., SI, M. C., & Abdelmalek, S. (2017). Kinetic modeling and parameters identification based on metaheuristic optimization techniques for extraction process of *marrubium vulgare* l. essential oil.
22. Jänicke, C., Grünwald, J., & Brendler, T. (2003). *Handbuch Phytotherapie: Indikationen, Anwendungen, Wirksamkeit, Präparate*. WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
23. Schilcher, H., Kammerer, S., & Wegener, T. (2007). *Leitfaden phytotherapie*. Munchen.
24. Seitz, R., Zepernick, B. (2007). In: Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller R, Reichling J, Schulz V, editors. *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, 6th ed. Volume 10: *Lyt-Mos*. Stuttgart: Springer-Verlag, 290-6.
25. Blaschek, W., Frohne, D., Loew, D. (2009). *Marrubii herba*. In: Wichtl M, editor. *Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage*. 5th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 415-6.
26. Blumenthal, M., Busse, W. R., Goldberg, A., Gruenwald, J., Hall, T. R. C. W., & Rister, R. S. (1998). *The complete German commission E. Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicine*. Austin, TX: American Botanical Council.
27. Bradley, PR. (1992). editor. *British Herbal Compendium: Volume 1: A Handbook of Scientific Information on Widely Used Plant Drugs*. Bournemouth: British Herbal Medicine Association, 218-9.
28. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. (2007). editors. *Herbal Medicines*. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press. 361-2.
29. Teuscher E, Melzig MF, Lindequist U. (2004). editors. *Biogene Arzneimittel*. 6th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 378.

30. Pukalskas, A., Venskutonis, P. R., Salido, S., de Waard, P., & van Beek, T. A. (2012). Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food chemistry*, 130(3), 695-701.
31. Nawwar, M. A., El-Mousallamy, A. M., Barakat, H. H., Buddrus, J., & Linscheid, M. (1989). Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, 28(11), 3201-3206.
32. Martin-Nizard, F., Sahpaz, S., Furman, C., Fruchart, J. C., Duriez, P., & Bailleul, F. (2003). Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity. *Planta medica*, 69(03), 207-211.
33. Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M., & Bailleul, F. (2002a). Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *Journal of ethnopharmacology*, 79(3), 389-392.
34. Sahpaz, S., Hennebelle, T., & Bailleul, F. (2002b). Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Natural product letters*, 16(3), 195-199.
35. Belhattab, R., Larous, L., Figueiredo, A. C., Santos, P. A., Costa, M. M., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2006). Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 18(4), 369-373.
36. Knöss, W. (2006). *Marrubium vulgare* - Andorn. *Z Phytotherapie*. 27:255-8.
37. Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Babanezhad, E. (2008). The essential oil composition of *Marrubium vulgare* L. from Iran. *J Essent Oil Res.*, 20:488-9.
38. Ahmed, B., Masoodi, M. H., Siddique, A. H., & Khan, S. (2010). A new monoterpene acid from *Marrubium vulgare* with potential antihepatotoxic activity. *Natural product research*, 24(18), 1671-1680.
39. Alkhatib, R., Joha, S., Cheok, M., Roumy, V., Idziorek, T., Preudhomme, C., ... & Hennebelle, T. (2010). Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*. *Planta medica*, 76(01), 86-87.
40. Zawislak, G. (2011). Composition of essential oils from horehound grown in south-eastern Poland. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Sectio DDD:Pharmacia*, 24:115-24.
41. Letchamo, W., & Mukhopadhyay, S. (1997). Variability in chromosomes, herb yield, essential oil content and potentials of horehound for North American commercial production. *Journal of Horticultural Science*, 72(5), 741-748.
42. Elbali, W., Djouahri, A., Djerrad, Z., Saka, B., Aberrane, S., Sabaou, N., ... & Boudarene, L. (2018). Chemical variability and biological activities of *Marrubium vulgare* L. essential oil, depending on geographic variation and environmental factors. *Journal of Essential Oil Research*, 30(6), 470-487.
43. Weel, K. G., Venskutonis, P. R., Pukalskas, A., Gruzdiene, D., & Linssen, J. P. (1999). Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare* L.) grown in Lithuania. *Lipid/Fett*, 101(10), 395-400.
44. Salama, M. M., Taher, E. E., & El-Bahy, M. M. (2012). Molluscicidal and Mosquitocidal Activities of the Essential oils of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. and *Marrubium vulgare* L. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54(5), 281-286.

45. El-Hawary, S., El-Shabrawy, A., Ezzat, S., & El-Shibany, F. (2013). Gas chromatography-mass spectrometry analysis, hepatoprotective and antioxidant activities of the essential oils of four Libyan herbs.
46. Hamdaoui, B., Wannes, W. A., Marrakchi, M., Brahim, N. B., & Marzouk, B. (2013). Essential oil composition of two tunisian horehound species: *Marrubium vulgare* L. And *marrubium aschersonii* magnus. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(5), 608-612.
47. Abadi, A., & Hassani, A. (2013). Essential oil composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Eastern Algeria. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 9, 17-24.
48. Golparvar, A. R., Hadipanah, A., Mehrabi, A. M., & Armin, A. (2015). Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Marrubium vulgare* L. from Iran. *Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs)*, 6(1), 1-5.
49. Mahmoud, A. A., Gendy, A. S. H., Said-Al Ahl, H. A. H., Grulova, D., Astatkie, T., & Abdelrazik, T. M. (2018). Impacts of harvest time and water stress on the growth and essential oil components of horehound (*Marrubium vulgare*). *Scientia Horticulturae*, 232, 139-144.
50. Zawislak, G. (2015). Comparison of chemical composition of the essential oil from *Marrubium vulgare* L. and *M. incanum* Desr. during the second year of cultivation. *Acta Agrobotanica*, 68(1).
51. Zawiślak, G. (2012). Chemical composition of essential oils of *Marrubium vulgare* L. and *Marrubium incanum* Desr. grown in Poland. *Chemija*, 23(2), 136-140.
52. Amri, B., Martino, E., Vitulo, F., Corana, F., Kaâb, L. B. B., Rui, M., ... & Collina, S. (2017). *Marrubium vulgare* L. Leave extract: Phytochemical composition, antioxidant and wound healing properties. *Molecules*, 22(11), 1851.
53. Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African journal of biotechnology*, 10(19), 3908-3914.
54. Bokaeian, M., Saboori, E., Saeidi, S., Niazi, A. A., Amini-Borojeni, N., Khaje, H., & Bazi, S. (2014). Phytochemical Analysis, Antibacterial Activity of *Marrubium vulgare* L against *Staphylococcus aureus* in vitro. *Zahedan J Res Med Sci*, 16(10), 60-64.
55. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
56. Rohman, A., RIYANTO, S., YUNIARTI, N., SAPUTRA, W.R., UTAMI, R. (2010): Antioxidant activity, total phenolic, and total flavaonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam). *Int. Food Res. J.* 17, 97-106.
57. Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidants in selected medicinal and culinary herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.
58. Tarnavski, O., McMullen, J. R., Schinke, M., Nie, Q., Kong, S., & Izumo, S. (2004). Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiological genomics*, 16(3), 349-360.



59. Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1655-1666.
60. Sosa, M. E., & Tonn, C. E. (2008). Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 3-24.
61. Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
62. Metodiewa D, Kochman A & Karolczak S (1997) Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N, diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. *BiochemMol Biol Int* 41, 1067–1075.
63. Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, et al. (1988) Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Nat Prod* 51, 345–348.
64. Walker E, Pacold M, Perisic O, et al. (2000) Structural determinations of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* 6, 909–919.
65. Kowalewski, Z., & Matlawska, I. (1978). Flavonoid compounds in the herb of *Marrubium-vulgare* L. *Herba Polonica*, 24(4), 183-186.
66. Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219.
67. Shaheen, F., Rasool, S., Shah, Z. A., Soomro, S., Jabeen, A., Mesaik, M. A., & Choudhary, M. I. (2014). Chemical constituents of *Marrubium vulgare* as potential inhibitors of nitric oxide and respiratory burst. *Natural product communications*, 9(7), 1934578X1400900705.
68. Boulila, A., Sanaa, A., Salem, I. B., Rokbeni, N., M'rabet, Y., Hosni, K., & Fernandez, X. (2015). Antioxidant properties and phenolic variation in wild populations of *Marrubium vulgare* L.(Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 76, 616-622.
69. Popa, D. P., & Pasechnik, G. S. (1975). The structure of vulgarol—A new diterpenoid from *Marrubium vulgare*. *Chemistry of Natural Compounds*, 11(6), 752-756.
70. Lodhi, S., Vadnere, G. P., Sharma, V. K., & Usman, M. R. (2017). *Marrubium vulgare* L.: A review on phytochemical and pharmacological aspects. *Journal of Complementary Medicine Research*, 6(4), 429-452.
71. Popoola, O. K., Elbagory, A. M., Ameer, F., & Hussein, A. A. (2013). Marrubiin. *Molecules*, 18(8), 9049-9060.
72. Yousefi, K., Hamedeyazdan, S., Torbati, M., & Fathiazad, F. (2016). Chromatographic fingerprint analysis of marrubiin in *marrubium vulgare* L. via HPTLC technique. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 6(1), 131.
73. Knoss, W., Reuter, B., & Josef, Z. A. P. P. (1997). Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway. *Biochemical Journal*, 326(2), 449-454.

74. Henderson, M. S., & McCrindle, R. (1969). Premarrubiin. A diterpenoid from *Marrubium vulgare* L. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, (15), 2014-2015.
75. Piccoli, P. N., & Bottini, R. (2008). Accumulation of the labdane diterpene Marrubiin in glandular trichome cells along the ontogeny of *Marrubium vulgare* plants. *Plant Growth Regulation*, 56(1), 71.
76. VanderJagt, T. J., Ghattas, R., VanderJagt, D. J., Crossey, M., & Glew, R. H. (2002). Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sciences*, 70(9), 1035-1040.
77. Berrougui, H., Isabelle, M., Cherki, M., & Khalil, A. (2006). *Marrubium vulgare* extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage. *Life sciences*, 80(2), 105-112.
78. Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, 94(4), 550-557.
79. Matkowski, A., & Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77(5), 346-353.
80. Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.
81. Dall'Acqua, S., Cervellati, R., Loi, M. C., & Innocenti, G. (2008). Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chemistry*, 106(2), 745-749.
82. Abadi, A., & Abdellatif, F. (2013). The antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Marrubium vulgare* growing wild in Eastern Algeria. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 10, 159-166.
83. Cushnie, T. T., Hamilton, V. E., & Lamb, A. J. (2003). Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiological research*, 158(4), 281-289.
84. KELEŞ, O., AK, S., BAKIREL, T., & ALPINAR, K. (2001). Screening of some Turkish plants for antibacterial activity. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25(4), 559-565.
85. Al-Bakri, A. G., & Afifi, F. U. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, 68(1), 19-25.
86. Kanyonga, P. M., Faouzi, M. A., Meddah, B., Mpona, M., Essassi, E. M., & Cherrah, Y. (2011). Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and antimicrobiologic activities. *J Chem Pharm Res*, 3(1), 199-204.
87. Masoodi, M. H., Ahmed, B., Zargar, I. M., Khan, S. A., Khan, S., & Singh, P. (2008). Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *African journal of Biotechnology*, 7(2).

88. Zarai, Z., Kadri, A., Chobba, I. B., Mansour, R. B., Bekir, A., Mejdoub, H., & Gharsallah, N. (2011). The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in health and disease*, 10(1), 161.
89. Buzayan, M. M., & El-Garbuli, F. R. (2012). Antibacterial activity of medicinal aqueous plant extracts against *Mycobacterium tuberculosis*. *Malaysian J Microbiol*, 8(3), 203-206.
90. Dehbashi, Z., Mazaheri, M., Saeedi, S., & Sabbagh, S. K. (2015). Antibacterial activity of *Marrubium vulgare* L. against antibiotic resistance *Klebsiella pneumoniae* strains. *Advanced Herbal Medicine*, 1(3), 9-14.
91. Ramos-Guerra, M. C., Mata-Cárdenas, B. D., Vargas-Villarreal, J., Sampayo-Reyes, A., González-Salazar, F., Morales-Vallarta, M., & Said-Fernández, S. (2007). In vitro activity of organic leaf/stem extracts from *Marrubium vulgare* and *Mentha spicata* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Pharmacology online*, 1, 108-112.
92. Robles-Zepeda, R. E., Velázquez-Contreras, C. A., Garibay-Escobar, A., Gálvez-Ruiz, J. C., & Ruiz-Bustos, E. (2011). Antimicrobial activity of Northwestern Mexican plants against *Helicobacter pylori*. *Journal of Medicinal Food*, 14(10), 1280-1283.
93. Wang, S. Y., Camp, M. J., & Ehlenfeldt, M. K. (2012). Antioxidant capacity and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(4), 1759-1768.
94. Jabeen, B., Riaz, N., Saleem, M., Naveed, M. A., Ashraf, M., Alam, U., ... & Jabbar, A. (2013). Isolation of natural compounds from *Phlomis stewartii* showing  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Phytochemistry*, 96, 443-448.
95. Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Sun, S., Canning, C., & Zhou, K. (2010). Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting  $\alpha$ -glucosidase. *Nutrition & metabolism*, 7(1), 71.
96. Alarcon-Aguilara, F. J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C. C., & Flores-Saenz, J. L. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of ethnopharmacology*, 61(2), 101-110.
97. Boudjelal, A., Henchiri, C., Siracusa, L., Sari, M., & Ruberto, G. (2012). Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia*, 83(2), 286-292.
98. Novaes, A. P., Rossi, C., Poffo, C., Junior, E. P., Oliveira, A. E., Schlemper, V., ... & Burger, C. (2001). Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. *THERAPIE-PARIS*-, 56(4), 427-430.
99. Elberry, A. A., Harraz, F. M., Ghareib, S. A., Gabr, S. A., Nagy, A. A., & Abdel-Sattar, E. (2015). Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of diabetes mellitus*, 3(1), 37-44.
100. Herrera-Arellano, A., Aguilar-Santamaria, L., Garcia-Hernandez, B., Nicasio-Torres, P., & Tortoriello, J. (2004). Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*, 11(7-8), 561-566.

101. Vergara-Galicia, J., Aguirre-Crespo, F., Tun-Suarez, A., Aguirre-Crespo, A., Estrada-Carrillo, M., Jaimes-Huerta, I., ... & Ortiz-Andrade, R. (2012). Acute hypoglycemic effect of ethanolic extracts from *Marrubium vulgare*. *Phytopharmacology*, 3(1), 54-60.
102. Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68-87.
103. Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2001). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of chromatography A*, 933(1-2), 37-43.
104. Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
105. Ince, A. E., ŞAHİN, S., & ŞÜMNÜ, S. G. (2013). Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(1), 69-75.
106. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 540-560.
107. Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.
108. Mason, T. J., & Peters, D. (2002). *Practical sonochemistry: Power ultrasound uses and applications*. Woodhead Publishing.
109. Sheldon, R. A. (2005). Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chemistry*, 7(5), 267-278.
110. Newman, J. S., Laing, T. J., McCarthy, C. J., & Adler, R. S. (1996). Power Doppler sonography of synovitis: assessment of therapeutic response--preliminary observations. *Radiology*, 198(2), 582-584.
111. Lauterborn, W., & Ohl, C. D. (1997). Cavitation bubble dynamics. *Ultrasonics sonochemistry*, 4(2), 65-75.
112. Crum, L. A., & Fowlkes, J. B. (1986). Acoustic cavitation generated by microsecond pulses of ultrasound. *Nature*, 319(6048), 52.
113. Schmitt, F. O., Johnson, C. H., & Olson, A. R. (1929). Oxidations promoted by ultrasonic radiation. *Journal of the American Chemical Society*, 51(2), 370-375.
114. Anbar, M., & Pecht, I. (1964). The sonolytic decomposition of organic solutes in dilute aqueous solutions. I. Ultrasound.
115. Mason, T. J., Lorimer, J. P., Paniwnyk, L., & Pollet, B. (1999). Ultrasound starts quiet revolution in materials science. *Materials world*, 7(2).

116. Makino, K., Mossoba, M. M., & Riesz, P. (1983). Chemical effects of ultrasound on aqueous solutions. Formation of hydroxyl radicals and hydrogen atoms. *The Journal of physical chemistry*, 87(8), 1369-1377.
117. Riesz, P., Berdahl, D., & Christman, C. L. (1985). Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. *Environmental Health Perspectives*, 64, 233-252.
118. Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159-178.
119. Henglein, A., & Kormann, C. (1985). Scavenging of OH radicals produced in the sonolysis of water. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 48(2), 251-258.
120. Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food control*, 31(2), 593-606.
121. Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., & Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of food engineering*, 78(2), 693-700.
122. Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., & Yarmand, M. S. (2016). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 140, 59-65.
123. Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejin, A., & Pavlić, B. (2015). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics sonochemistry*, 23, 360-368.
124. Tomšik, A., Pavlić, B., Vladić, J., Ramić, M., Brindza, J., & Vidović, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 502-511.
125. Suslick, K. S., Eddingsaas, N. C., Flannigan, D. J., Hopkins, S. D., & Xu, H. (2011). Extreme conditions during multibubble cavitation: Sonoluminescence as a spectroscopic probe. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 842-846
126. Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Ultrasound applications in food processing. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 65-105). Springer, New York, NY.
127. Chemat, S., Lagha, A., AitAmar, H., Bartels, P. V., & Chemat, F. (2004). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(3), 188-195.
128. Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(2), 137-142.
129. Chukwumah, Y. C., Walker, L. T., Verghese, M., & Ogutu, S. (2009). Effect of frequency and duration of ultrasonication on the extraction efficiency of selected isoflavones and trans-resveratrol from peanuts (*Arachis hypoEGKa*). *Ultrasonics sonochemistry*, 16(2), 293-299.

130. Paniwnyk, L. (2017). Applications of ultrasound in processing of liquid foods: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 794-806.
131. Santos, H. M., & Capelo, J. L. (2007). Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, 73(5), 795-802.
132. Mason, T. J., & Lorimer, J. P. (2002). Applied sonochemistry: the uses of power ultrasound in chemistry and processing. *Synthesis*, 61(3).
133. Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P. I., Lazurca, D., & Mason, T. J. (1997). The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics sonochemistry*, 4(2), 135-139.
134. Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., & McHugh, T. H. (2012). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(2), 365-372.
135. Flannigan, D. J., & Suslick, K. S. (2010). Inertially confined plasma in an imploding bubble. *Nature Physics*, 6(8), 598.
136. Sališová, M., Toma, Š., & Mason, T. J. (1997). Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasonics sonochemistry*, 4(2), 131-134.
137. Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10-23.
138. Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108.
139. Palma, M., & Barroso, C. G. (2002). Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 119-130.
140. Zhang, Z. S., Wang, L. J., Li, D., Jiao, S. S., Chen, X. D., & Mao, Z. H. (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 62(1), 192-198.
141. Letellier, M., & Budzinski, H. (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27(3), 259-270.
142. Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(2), 105-113.
143. Li, H., Chen, B., Nie, L., & Yao, S. (2004). Solvent effects on focused microwave assisted extraction of polyphenolic acids from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 15(5), 306-312.
144. Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., & Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 50-55.

145. Barnabas, I. J., Dean, J. R., Fowles, I. A., & Owen, S. P. (1995). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soils using microwave energy. *Analyst*, 120(7), 1897-1904.
146. Harborne, J. B., Mabry, T. J., & Mabry, H. (1975). *The Flavonoids*. London, UK: Chapman & Hall.
147. Terigar, B. G., Balasubramanian, S., Boldor, D., Xu, Z., Lima, M., & Sabliov, C. M. (2010). Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: design and performance evaluation. *Bioresource technology*, 101(7), 2466-2471.
148. Tsukayama, M., Sasaki, T., Yamamoto, K., Kawamura, Y., & Ichikawa, R. (2010). Microwave-assisted extraction and methylation of useful flavones from waste peels of *Citrus sudachi*. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi= Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 57(10), 427-433.
149. Kiss, G. A. C., Forgács, E., Cserhádi, T., Mota, T., Morais, H., & Ramos, A. (2000). Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum L.*) powders. *Journal of Chromatography A*, 889(1-2), 41-49.
150. Escribano-Bailon, M. T., & Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenol extraction from foods. In C. Santos-Buelga & G. Williamson (Eds.), *Methods in Polyphenol Analysis* (pp. 1–16). London: RSC Publishing.
151. Song, J. Z., Mo, S. F., Yip, Y. K., Qiao, C. F., Han, Q. B., & Xu, H. X. (2007). Development of microwave assisted extraction for the simultaneous determination of isoflavonoids and saponins in *Radix Astragali* by high performance liquid chromatography. *Journal of separation science*, 30(6), 819-824.
152. Chan, W. I., Wong, W. T., Liao, P. H., & Lo, K. V. (2007). Sewage sludge nutrient solubilization using a single-stage microwave treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 42(1), 59-63.
153. Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295.
154. Alfaro, M. J., Bélanger, J. M., Padilla, F. C., & Paré, J. J. (2003). Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAP™) extraction of ginger (*Zingiber officinale*). *Food Research International*, 36(5), 499-504.
155. Talebi, M., Ghassempour, A., Talebpour, Z., Rassouli, A., & Dolatyari, L. (2004). Optimization of the extraction of paclitaxel from *Taxus baccata L.* by the use of microwave energy. *Journal of separation science*, 27(13), 1130-1136.
156. Pan, X., Liu, H., An, Z., Wang, J., & Niu, G. (2001). Microwave-enhanced dehydration and solvent washing purification of penicillin G sulfoxide. *International journal of pharmaceuticals*, 220(1-2), 33-41.

157. Ebrahimzadeh, H., Yamini, Y., Sefidkon, F., Chalooosi, M., & Pourmortazavi, S. M. (2003). Chemical composition of the essential oil and supercritical CO<sub>2</sub> extracts of *Zataria multiflora* Boiss. *Food chemistry*, 83(3), 357-361.
158. Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F., & Collina, S. (2006). Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1125(2), 147-151.
159. Hemwimon, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54(1), 44-50.
160. Sterbova, D., Matejcek, D., Vlcek, J., & Kuban, V. (2004). Combined microwave assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials. *Analytica Chimica Acta*, 513, 435-44.
161. Zhou, H. Y., & Liu, C. Z. (2006). Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *Journal of Chromatography A*, 1129(1), 135-139.
162. Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
163. Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., & Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of food engineering*, 78(2), 693-700.
164. Hao, J. Y., Han, W., Xue, B. Y., & Deng, X. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology*, 28(3), 191-196.
165. Chen, Y., Xie, M. Y., & Gong, X. F. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 162-170.
166. Barbero, G. F., Liqid, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75(5), 1332-1337.
167. Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 7-18.
168. Jacob, J. (2012). Microwave assisted reactions in organic chemistry: A review of recent advances.
169. Zhang, H. F., Yang, X. H., & Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(12), 672-688.
170. Luque-García, J. L., & Luque de Castro, M. D. (2001). Water Soxhlet extraction assisted by focused microwaves: a clean approach. *Analytical chemistry*, 73(24), 5903-5908.
171. Xiao, W., Han, L., & Shi, B. (2008). Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoid from *Radix Astragali* using response surface methodology. *Separation Science and Technology*, 43(3), 671-681.



172. Tsubaki, S., Sakamoto, M., & Azuma, J. I. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from tea residues under autohydrolytic conditions. *Food chemistry*, 123(4), 1255-1258.
173. Mandal, V., & Mandal, S. C. (2010). Design and performance evaluation of a microwave based low carbon yielding extraction technique for naturally occurring bioactive triterpenoid: Oleanolic acid. *Biochemical Engineering Journal*, 50(1-2), 63-70.
174. Kwon, J. H., Lee, G. D., Bélanger, J. M., & Jocelyn Paré, J. R. (2003). Effect of ethanol concentration on the efficiency of extraction of ginseng saponins when using a microwave-assisted process (MAP™). *International journal of food science & technology*, 38(5), 615-622.
175. Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C., & Kung, F. W. L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213-6225.
176. Hu, Z., Cai, M., & Liang, H. H. (2008). Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*. *Separation and Purification Technology*, 61(3), 266-275.
177. Ma, W., Lu, Y., Dai, X., Liu, R., Hu, R., & Pan, Y. (2009). Determination of anti-tumor constitute mollugin from traditional Chinese medicine *rubia cordifolia*: Comparative study of classical and microwave extraction techniques. *Separation Science and Technology*, 44(4), 995-1006.
178. Gao, M., Song, B. Z., & Liu, C. Z. (2006). Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Saussurea medusa* Maxim cultured cells. *Biochemical Engineering Journal*, 32(2), 79-83.
179. Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, aLEGK and microaLEGK: A review. *Food chemistry*, 98(1), 136-148.
180. Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373(1-2), 23-30.
181. Turner, C., & Ibañez, E. (2011). Pressurized hot water extraction and processing. *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry*; Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat, F., Eds, 223-254.
182. Smith, R. M. (2006). Superheated water: the ultimate green solvent for separation science. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385(3), 419-421.
183. Uematsu, M., & Frank, E. U. (1980). Static dielectric constant of water and steam. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 9(4), 1291-1306.
184. Yang, Y., Bowadt, S., Hawthorne, S. B., & Miller, D. J. (1995). Subcritical water extraction of polychlorinated biphenyls from soil and sediment. *Analytical Chemistry*, 67(24), 4571-4576.
185. Carr, A. G., Mammucari, R., & Foster, N. R. (2011). A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 172(1), 1-17.

186. Kubátová, A., Jansen, B., Vaudoisot, J. F., & Hawthorne, S. B. (2002). Thermodynamic and kinetic models for the extraction of essential oil from savory and polycyclic aromatic hydrocarbons from soil with hot (subcritical) water and supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 175-188.
187. Ong, E. S., Cheong, J. S. H., & Goh, D. (2006). Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 92-102.
188. Coym, J. W., & Dorsey, J. G. (2004). Superheated water chromatography: a brief review of an emerging technique. *Analytical letters*, 37(5), 1013-1023.
189. Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S., & Ong, E. S. (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2484-2494.
190. Ibanez, E., Kubátová, A., Señoráns, F. J., Cavero, S., Reglero, G., & Hawthorne, S. B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(2), 375-382.
191. Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., & Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.
192. Möckel, H. J., Welter, G., & Melzer, H. (1987). Correlation between reversed-phase retention and solute molecular surface type and area: I. Theoretical outlines and retention of various hydrocarbon classes. *Journal of Chromatography A*, 388, 255-266.
193. Fernández-González, V., Concha-Graña, E., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., & Prada-Rodríguez, D. (2008). Pressurized hot water extraction coupled to solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography A*, 1196, 65-72.
194. Moreno, F. J., Corzo-Martí, M., Del Castillo, M. D., & Villamiel, M. (2006). Changes in antioxidant activity of dehydrated onion and garlic during storage. *Food Research International*, 39(8), 891-897.
195. Hawthorne, S. B., Yang, Y., & Miller, D. J. (1994). Extraction of organic pollutants from environmental solids with sub- and supercritical water. *Analytical Chemistry*, 66(18), 2912-2920.
196. Kronholm, J., Hartonen, K., & Riekkola, M. L. (2007). Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 396-412.
197. Miller, D. J., & Hawthorne, S. B. (1998). Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water. *Analytical Chemistry*, 70(8), 1618-1621.
198. Anekpankul, T., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2007). Extraction of anti-cancer damnacanthol from roots of *Morinda citrifolia* by subcritical water. *Separation and Purification Technology*, 55(3), 343-349.

199. Ozel, M. Z., Gogus, F., & Lewis, A. C. (2003). Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry*, 82(3), 381-386.
200. Güçlü-Üstündağ, Ö., Balsevich, J., & Mazza, G. (2007). Pressurized low polarity water extraction of saponins from cow cockle seed. *Journal of food engineering*, 80(2), 619-630.
201. Gilbert-López, B., Plaza, M., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2017). Subcritical water extraction and neof ormation of antioxidants. In *Water Extraction of Bioactive Compounds* (pp. 109-130). Elsevier.
202. Ong, E. S., & Len, S. M. (2003). Pressurized hot water extraction of berberine, baicalein and glycyrrhizin in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta*, 482(1), 81-89.
203. Machado, A. P. D. F., Pasquel-Reátegui, J. L., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675-683.
204. Choi, M. P., Chan, K. K., Leung, H. W., & Huie, C. W. (2003). Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. *Journal of Chromatography A*, 983(1-2), 153-162.
205. Kiathevest, K., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2009). Extraction and concentration of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by non-ionic surfactant solution. *Separation and purification technology*, 66(1), 111-117.
206. Arapitsas, P., & Turner, C. (2008). Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. *Talanta*, 74(5), 1218-1223.
207. Tomsik, A.; Pavlić, B.; Vladić, J.; Cindrić, M.; Jovanov, P.; Sakač, M.; ... & Vidović, S. (2017). Subcritical water extraction of wild garlic (*Allium ursinum* L.) and process optimization by response surface methodology. *J. Supercrit. Fluid*, 128, 79-88
208. King, J. W., Grabiell, R. D., & Wightman, J. D. (2003). Subcritical water extraction of anthocyanins from fruit berry substrates. In *Proceedings of the 6th International symposium on supercritical Fluids* (Vol. 1, pp. 28-30).
209. Naffati, A., Vladić, J., Pavlić, B., Radosavljević, R., Gavarić, A., & Vidović, S. (2017). Recycling of filter tea industry by-products: application of subcritical water extraction for recovery of bioactive compounds from *A. uva-ursi* herbal dust. *The Journal of Supercritical Fluids*, 121, 1-9.
210. Wang, X., Chen, Q., & Lü, X. (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*, 38, 129-137.
211. Asghari, F. S., & Yoshida, H. (2007). Kinetics of the decomposition of fructose catalyzed by hydrochloric acid in subcritical water: formation of 5-hydroxymethylfurfural, levulinic, and formic acids. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(23), 7703-7710.

212. Plaza, M., & Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 39-54.
213. Rezaei, S., Rezaei, K., Haghghi, M., & Labbafi, M. (2013). Solvent and solvent to sample ratio as main parameters in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from apple pomace. *Food science and biotechnology*, 22(5), 1-6.
214. Ravber, M., Knez, Ž., & Škerget, M. (2015). Simultaneous extraction of oil-and water-soluble phase from sunflower seeds with subcritical water. *Food chemistry*, 166, 316-323.
215. Monrad, J. K., Howard, L. R., King, J. W., Srinivas, K., & Mauromoustakos, A. (2010). Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(5), 2862-2868.
216. Monrad, J. K., Suárez, M., Motilva, M. J., King, J. W., Srinivas, K., & Howard, L. R. (2014). Extraction of anthocyanins and flavan-3-ols from red grape pomace continuously by coupling hot water extraction with a modified expeller. *Food Research International*, 65, 77-87.
217. Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2014). A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, 65, 462-468.
218. Björklund, E., Nilsson, T., & Bøwadt, S. (2000). Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(7), 434-445.
219. Khuwijitjaru, P., Plernjit, J., Suaylam, B., Samuhaseneetoo, S., Pongsawatmanit, R., & Adachi, S. (2014). Degradation kinetics of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 92(5), 810-815.
220. Naude, Y., De Beer, W. H. J., Jooste, S., Van der Merwe, L., & Van Rensburg, S. J. (1998). Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the determination of DDT, DDD and DDE in sediment. *WATER SA-PRETORIA*, 24, 205-214.
221. Norulaini, N. N., Ahmad, A., Omar, F. M., Banana, A. A. S., Zaidul, I. M., & Kadir, M. O. A. (2008). Sterilization and extraction of palm oil from screw pressed palm fruit fiber using supercritical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*, 60(3), 272-277.
222. Zaidul, I. S. M., Norulaini, N. N., Omar, A. M., & Smith Jr, R. L. (2007). Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extraction of palm kernel oil from palm kernel. *Journal of Food Engineering*, 79(3), 1007-1014.
223. Sovová, H. (2012). Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. *The Journal of Supercritical Fluids*, 66, 73-79.
224. Phelps, C. L., Smart, N. G., & Wai, C. M. (1996). Past, present, and possible future applications of supercritical fluid extraction technology. *Journal of chemical education*, 73(12), 1163.

225. Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of food engineering*, 67(1-2), 21-33.
226. Reverchon, E., & De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146-166.
227. Cunico, L. P., & Turner, C. (2017). Supercritical fluids and gas-expanded liquids. In *The application of green solvents in separation processes* (pp. 155-214). Elsevier.
228. De Melo, M. M. R., Silvestre, A. J. D., & Silva, C. M. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115-176.
229. de Melo, S. A. V., Costa, G. M., Viana, A. C., & Pessoa, F. L. (2009). Computation of Crossover Pressure for Synthesis of Supercritical Fluid Separation Systems. In *Computer Aided Chemical Engineering* (Vol. 27, pp. 399-404). Elsevier.
230. Özkal, S. G., Salgın, U., & Yener, M. E. (2005). Supercritical carbon dioxide extraction of hazelnut oil. *Journal of food engineering*, 69(2), 217-223.
231. Anitescu, G., & Tavlarides, L. L. (1999). Solubility of individual polychlorinated biphenyl (PCB) congeners in supercritical fluids: CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>/MeOH and CO<sub>2</sub>/n-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>. *The Journal of supercritical fluids*, 14(3), 197-211.
232. Da Porto, C., Natolino, A., & Decorti, D. (2015). The combined extraction of polyphenols from grape marc: Ultrasound assisted extraction followed by supercritical CO<sub>2</sub> extraction of ultrasound-caffinate. *LWT-Food science and Technology*, 61(1), 98-104.
233. Vasapollo, G., Longo, L., Rescio, L., & Ciurlia, L. (2004). Innovative supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 29(1-2), 87-96.
234. Sinha, N. K., Guyer, D. E., Gage, D. A., & Lira, C. T. (1992). Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavors and their analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(5), 842-845.
235. Da Silva, R. P., Rocha-Santos, T. A., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.
236. Saldaña, M. D., Temelli, F., Guigard, S. E., Tomberli, B., & Gray, C. G. (2010). Apparent solubility of lycopene and  $\beta$ -carotene in supercritical CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>+ ethanol and CO<sub>2</sub>+ canola oil using dynamic extraction of tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 1-8.
237. Shi, J., Yi, C., Xue, S. J., Jiang, Y., Ma, Y., & Li, D. (2009). Effects of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of food engineering*, 93(4), 431-436.

238. Kassama, L. S., Shi, J., & Mittal, G. S. (2008). Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. *Separation and Purification Technology*, 60(3), 278-284.
239. Cadoni, E., De Giorgi, M. R., Medda, E., & Poma, G. (1999). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lycopene and  $\beta$ -carotene from ripe tomatoes. *Dyes and pigments*, 44(1), 27-32.
240. Ciurlia, L., Bleve, M., & Rescio, L. (2009). Supercritical carbon dioxide co-extraction of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.) and hazelnuts (*Corylus avellana* L.): A new procedure in obtaining a source of natural lycopene. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49(3), 338-344.
241. Ollanketo, M., Hartonen, K., Riekkola, M. L., Holm, Y., & Hiltunen, R. (2001). Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene in tomato skins. *European Food Research and Technology*, 212(5), 561-565.
242. Shyur, L. F. (2012). *Recent trends in medicinal plants research* (Vol. 62). Academic Press.
243. Pandey, M. M., Rastogi, S., & Rawat, A. K. (2008). Indian herbal drug for general healthcare: an overview. *The internet journal of alternative medicine*, 6(1), 3.
244. Banker, G. S., Siepmann, J., & Rhodes, C. (Eds.). (2002). *Modern pharmaceuticals*. CRC Press.
245. T Nguyen, A., A Gentry, C., & Z Furrh, R. (2013). A comparison of adverse drug reactions between high-and standard-dose trimethoprim-sulfamethoxazole in the ambulatory setting. *Current drug safety*, 8(2), 114-119.
246. Gad, H. A., El-Nabarawi, M. A., & Abd El-Hady, S. S. (2008). Formulation and evaluation of secnidazole or doxycycline dento-oral gels. *Drug development and industrial pharmacy*, 34(12), 1356-1367.
247. Galanakis, C. M. (2013). Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: a viewpoint of opportunities and challenges. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 575-579.
248. Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452-490.
249. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food research international*, 40(9), 1107-1121.
250. Filkova, I., & Mujumdar, A. S. (1995). Industrial spray drying systems. *Handbook of industrial drying*, 1, 263-308.
251. Masters, K. (1985). *Spray drying handbook*. Spray drying handbook

252. Hammami, C., & René, F. (1997). Determination of freeze-drying process variables for strawberries. *Journal of food Engineering*, 32(2), 133-154.
253. Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2007). Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology progress*, 23(2), 302-315.
254. Rodríguez-Hernández, G. R., Gonzalez-Garcia, R., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera\*, M. A., & Abud-Archila, M. (2005). Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technology*, 23(4), 955-973.
255. Yousefi, S., Emam-Djomeh, Z., & Mousavi, S. M. (2011). Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum L.*). *Journal of food science and technology*, 48(6), 677-684.
256. Cal, K., & Sollohub, K. (2010). Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(2), 575-586.
257. Murugesan, R., & Orsat, V. (2012). Spray drying for the production of nutraceutical ingredients—a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 3-14.
258. Masters, K. (1997). Spray dryers. *Industrial drying of foods*, 90-114.
259. Murali, S., Kar, A., Mohapatra, D., & Kalia, P. (2015). Encapsulation of black carrot juice using spray and freeze drying. *Food Science and Technology International*, 21(8), 604-612.
260. Anandharamakrishnan, C. (2015). *Spray drying techniques for food ingredient encapsulation*. John Wiley & Sons.
261. Oakley, D. E. (2004). Spray dryer modeling in theory and practice. *Drying Technology*, 22(6), 1371-1402.
262. Fleming, R. S. (1921). The Spray Process of Drying. *Industrial & Engineering Chemistry*, 13(5), 447-449.
263. Snyder, H. E., & Lechuga-Ballesteros, D. (2008). Spray drying: theory and pharmaceutical applications. In *Pharmaceutical Dosage Forms-Tablets* (pp. 243-276). CRC Press.
264. Bonazzi, C., & Dumoulin, E. (2011). Quality changes in food materials as influenced by drying processes. *Modern drying technology*, 3, 1-20.
265. Finney, J., Buffo, R., & Reineccius, G. A. (2002). Effects of type of atomization and processing temperatures on the physical properties and stability of spray-dried flavors. *Journal of food science*, 67(3), 1108-1114.
266. Anker, M. H., & Reineccius, G. A. (1988). Encapsulated orange oil: Influence of spray-dryer air temperatures on retention and shelf life.
267. Jaya, S., & Das, H. (2009). Glass transition and sticky point temperatures and stability/mobility diagram of fruit powders. *Food and Bioprocess Technology*, 2(1), 89-95.

268. Mani, S., Jaya, S., & Das, H. (2002, September). Sticky issues on spray drying of fruit juices. In ASAE/CSAE North-Central Intersectional Meeting.
269. Fang, Z., & Bhandari, B. (2012). Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation. In *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals* (pp. 73-109). Woodhead Publishing.
270. Bhandari, B. R., Datta, N., & Howes, T. (1997). Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying technology*, 15(2), 671-684.
271. Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Ashtari, A. K., & Omid, M. (2012). Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and bioproducts processing*, 90(4), 667-675.
272. Brazel, C. S. (1999). Microencapsulation: offering solutions for the food industry. *Cereal foods world*, 44(6), 388-393.
273. Alvarenga Botrel, D., Vilela Borges, S., Victória de Barros Fernandes, R., Dantas Viana, A., Maria Gomes da Costa, J., & Reginaldo Marques, G. (2012). Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(11), 2289-2296.
274. Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(6), 501-547.
275. Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*, 15(7-8), 330-347.
276. Dziezak, J. D. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food technology* (Chicago), 42(4), 136-153.
277. Roos, Y., & Karel, M. (1991). Water and molecular weight effects on glass transitions in amorphous carbohydrates and carbohydrate solutions. *Journal of Food Science*, 56(6), 1676-1681.
278. Bhandari, B. R., Senoussi, A., Dumoulin, E. D., & Lebert, A. (1993). Spray drying of concentrated fruit juices. *Drying Technology*, 11(5), 1081-1092.
279. De Oliveira, M. A., Maia, G. A., De Figueiredo, R. W., De Souza, A. C. R., De Brito, E. S., & De Azeredo, H. M. C. (2009). Addition of cashew tree gum to maltodextrin-based carriers for spray drying of cashew apple juice. *International journal of food science & technology*, 44(3), 641-645.
280. Buffo, R., & Reineccius, G. (2000). Optimization of gum acacia/modified starch/maltodextrin blends for the spray drying of flavors. *Perfumer & Flavorist*, 25(4), 45-54.
281. Krishnan, S., Kshirsagar, A. C., & Singhal, R. S. (2005). The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate polymers*, 62(4), 309-315.



282. Martinelli, L., Gabas, A. L., & Telis-Romero, J. (2007). Thermodynamic and quality properties of lemon juice powder as affected by maltodextrin and arabic gum. *Drying Technology*, 25(12), 2035-2045.
283. Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2008a). Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: I. Drying kinetics and product recovery. *Drying technology*, 26(6), 714-725.
284. Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2008b). Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. Powder properties. *Drying Technology*, 26(6), 726-737.
285. Sansone, F., Mencherini, T., Picerno, P., d'Amore, M., Aquino, R. P., & Lauro, M. R. (2011). Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *Journal of Food Engineering*, 105(3), 468-476.
286. Nadeem, H. Ş., Torun, M., & Özdemir, F. (2011). Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT-Food Science and Technology*, 44(7), 1626-1635.
287. Caliskan, G., & Dirim, S. N. (2016). The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder technology*, 287, 308-314.
288. Avaltroni, F., Bouquerand, P. E., & Normand, V. (2004). Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 58(3), 323-334.
289. Roos, Y., & Karel, M. (1991). Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnology progress*, 7(1), 49-53.
290. Kenyon, M. M. (1995). Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation.
291. Marchal, L. M., Beftink, H. H., & Tramper, J. (1999). Towards a rational design of commercial maltodextrins. *Trends in Food Science & Technology*, 10(11), 345-355.
292. Lepojević, Ž. (2000). *Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda*. Zmaj.
293. Zeković, Z., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cvejic, A., Elgndi, M. A., & Pavlić, B. (2014). Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 560-566.
294. Zekovic, Z. (1998). Extraction of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical carbon dioxide.
295. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolic substances. In *US: American Chemical Society Symposium series (Vol. 26, pp. 47-70)*.

296. Harborne, J. B. (1989). *Methods in plant biochemistry*. Volume 1. Plant phenolics. Academic Press Ltd.
297. Espín, J. C., Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 648-656.
298. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction - antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
299. CLSI (2007): *Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Seventh Informational Supplement CLSI document M100-S17, Wayne, Pennsylvania, USA.
300. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine*, 6(1), 39.
301. Johnson, M. H., Lucius, A., Meyer, T., & Gonzalez de Mejia, E. (2011). Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and in vitro inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(16), 8923-8930.
302. Chan, H. H., Sun, H. D., Reddy, M. V. B., & Wu, T. S. (2010). Potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* CA Meyer var. major. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1360-1364.
303. Baş, D., & Boyacı, I. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of food engineering*, 78(3), 836-845.
304. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
305. Morris, M. D. (2000). A class of three-level experimental designs for response surface modeling. *Technometrics*, 42(2), 111-121.
306. Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandao, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. C., Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186.
307. Derringer, G. C., & GC, D. (1980). The role of statistical experimental design in testing and problem solving.
308. Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P., & Popović, L. M. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder technology*, 258, 209-215.

309. Sablani, S. S., Shrestha, A. K., & Bhandari, B. R. (2008). A new method of producing date powder granules: Physicochemical characteristics of powder. *Journal of Food Engineering*, 87(3), 416-421.
310. Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 184-196.
311. Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 59(2), 205-215.
312. Quideau, S., & Feldman, K. S. (1996). Ellagitannin chemistry. *Chemical Reviews*, 96(1), 475-504.
313. Matkowski, A., & Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77(5), 346-353.
314. Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2009. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, third ed., John Wiley and Sons, New Jersey.
315. Amessis-Ouchemoukh, N., Abu-Reidah, I. M., Quirantes-Piné, R., Madani, K., & Segura-Carretero, A. (2014). Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 61, 120-129.
316. Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Benmansour, D., Khaled, M. B., Bouterfas, M., & Latreche, A. (2014). Optimization of extraction conditions of some phenolic compounds from white horehound (*Marrubium vulgare* L.) leaves. *International Journal of Organic Chemistry*, 4(05), 292.
317. Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1), 200-208.
318. Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Elaoufi, M. M., Latreche, A., & Benchiha, W. (2016). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. In *Annales pharmaceutiques francaises* (Vol. 74, No. 6, pp. 453-462).
319. Uma, D. B., Ho, C. W., & Wan Aida, W. M. (2010). Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana*, 39(1), 119-128.
320. Hismath, I., Wan Aida, W. M., & Ho, C. W. (2011). Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. *International Food Research Journal*, 18(3).
321. Mittal, V., & Nanda, A. (2017). Intensification of marrubiin concentration by optimization of microwave-assisted (low CO<sub>2</sub> yielding) extraction process for *Marrubium vulgare* using central composite design and antioxidant evaluation. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1337-1347.
322. Zeković, Z., Pintač, D., Majkić, T., Vidović, S., Mimica-Dukić, N., Teslić, N., ... & Pavlić, B. (2017). Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery—Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Industrial crops and products*, 99, 49-59.

323. Kaderides, K., Papaoikonomou, L., Serafim, M., & Goula, A. M. (2019). Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 137, 1-11.
324. Knöss, W., & Zapp, J. (1998). Accumulation of furanic labdane diterpenes in *Marrubium vulgare* and *Leonurus cardiaca*. *Planta medica*, 64(04), 357-361.
325. Stankovic, M. S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J Sci*, 33(2011), 63-72.
326. Navarrete, A., Herrero, M., Martín, A., Cocero, M. J., & Ibáñez, E. (2011). Valorization of solid wastes from essential oil industry. *Journal of food engineering*, 104(2), 196-201.
327. Ciriminna, R., Fidalgo, A., Delisi, R., Carnaroglio, D., Grillo, G., Cravotto, G., ... & Pagliaro, M. (2017). High-quality essential oils extracted by an eco-friendly process from different citrus fruits and fruit regions. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(6), 5578-5587.
328. Filly, A., Fernandez, X., Minuti, M., Visinoni, F., Cravotto, G., & Chemat, F. (2014). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: from laboratory to pilot and industrial scale. *Food chemistry*, 150, 193-198.
329. Takhistov, P. (2007). Dimensionless analysis of the electric field-based food processes for scale-up and validation. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 746-754.
330. Sutkar, V. S., & Gogate, P. R. (2009). Design aspects of sonochemical reactors: techniques for understanding cavitation activity distribution and effect of operating parameters. *Chemical Engineering Journal*, 155(1-2), 26-36.
331. Horst, C., Chen, Y. S., Kunz, U., & Hoffmann, U. (1996). Design, modeling and performance of a novel sonochemical reactor for heterogeneous reactions. *Chemical engineering science*, 51(10), 1837-1846.
332. Gogate, P. R., & Kabadi, A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 60-72.
333. Prasad, K. N., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A., & Ismail, A. (2011). Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry*, 128(4), 1121-1127.
334. Plaza, M., Amigo-Benavent, M., Del Castillo, M. D., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010). Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, 43(10), 2341-2348.
335. Plaza, M., Abrahamsson, V., & Turner, C. (2013). Extraction and neof ormation of antioxidant compounds by pressurized hot water extraction from apple byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(23), 5500-5510.
336. Zeković, Z., Pavlić, B., Cvetanović, A., & Đurović, S. (2016). Supercritical fluid extraction of coriander seeds: Process optimization, chemical profile and antioxidant activity of lipid extracts. *Industrial crops and products*, 94, 353-362.

337. Wijngaard, H., & Brunton, N. (2009). The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22), 10625-10631.
338. Turner, C., Turner, P., Jacobson, G., Almgren, K., Waldebäck, M., Sjöberg, P., ... & Markides, K. E. (2006). Subcritical water extraction and  $\beta$ -glucosidase-catalyzed hydrolysis of quercetin glycosides in onion waste. *Green Chemistry*, 8(11), 949-959.
339. Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67(18), 2058-2070.
340. Middleton, E. M., & Teramura, A. H. (1993). The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant physiology*, 103(3), 741-752.
341. Mauludin, R., Müller, R. H., & Keck, C. M. (2009). Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *International journal of pharmaceuticals*, 370(1-2), 202-209.
342. Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18), 2505-2512.
343. Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J. P., & Mason, T. J. (2001). The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(3), 299-301.
344. MM, A. E. M., Rabeh, M. A., Abou-Setta, L., El-Rashedy, A. A., & Hussein, A. A. (2008). Original Research Marrubiin: a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from *Marrubium alysson*.
345. Wang, R., Kobayashi, T., & Adachi, S. (2011). Degradation of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine in subcritical water and properties of the degradation products. *Food science and technology research*, 17(4), 273-278.
346. González, L. M. L., Reyes, I. P., Dewulf, J., Budde, J., Heiermann, M., & Vervaeren, H. (2014). Effect of liquid hot water pre-treatment on sugarcane press mud methane yield. *Bioresource Technology*, 169, 284-290.
347. Lindquist, E., & Yang, Y. (2011). Degradation of benzoic acid and its derivatives in subcritical water. *Journal of Chromatography A*, 1218(15), 2146-2152.
348. Polovková, M., & Šimko, P. (2017). Determination and occurrence of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in white and brown sugar by high performance liquid chromatography. *Food Control*, 78, 183-186.
349. Teixidó, E., Santos, F., Puignou, L., & Galceran, M. T. (2006). Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1135(1), 85-90.
350. Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-food science and technology*, 44(4), 793-810.
351. Narita, Y., & Inouye, K. (2012). High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chemistry*, 135(3), 943-949.

352. Herrero, M., Castro-Puyana, M., Rocamora-Reverte, L., Ferragut, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2012). Formation and relevance of 5-hydroxymethylfurfural in bioactive subcritical water extracts from olive leaves. *Food research international*, 47(1), 31-37.
353. Fallico, B., Arena, E., & Zappala, M. (2003). Roasting of hazelnuts. Role of oil in colour development and hydroxymethylfurfural formation. *Food Chemistry*, 81(4), 569-573.
354. Rada-Mendoza, M., Sanz, M. L., Olano, A., & Villamiel, M. (2004). Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. *Food Chemistry*, 85(4), 605-609.
355. Porretta, S., & Sandei, L. (1991). Determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (HMF) in tomato products: proposal of a rapid HPLC method and its comparison with the colorimetric method. *Food Chemistry*, 39(1), 51-57.
356. White Jr, J. W. (1979). Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62(3), 509-514.
357. Castellari, M., Sartini, E., Spinabelli, U., Riponi, C., & Galassi, S. (2001). Determination of carboxylic acids, carbohydrates, glycerol, ethanol, and 5-HMF in beer by high-performance liquid chromatography and UV-refractive index double detection. *Journal of chromatographic science*, 39(6), 235-238.
358. Nozal, M. J., Bernal, J. L., Toribio, L., Jiménez, J. J., & Martín, M. T. (2001). High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *Journal of Chromatography A*, 917(1-2), 95-103.
359. Coco, F. L., Valentini, C., Novelli, V., & Ceccon, L. (1995). Liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. *Analytica chimica acta*, 306(1), 57-64.
360. Ramírez-Jiménez, A., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2003). Evolution of non-enzymatic browning during storage of infant rice cereal. *Food chemistry*, 83(2), 219-225.
361. Rufian-Henares, J. A., & De la Cueva, S. P. (2008). Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Additives and Contaminants*, 25(11), 1306-1312.
362. Zappala, M., Fallico, B., Arena, E., & Verzera, A. (2005). Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food control*, 16(3), 273-277.
363. Gökmen, V., & Şenyuva, H. Z. (2006). Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using Liquid Chromatography– Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2845-2849.
364. Horváth, K., & Molnár-Perl, I. (1998). Simultaneous GC-MS quantitation of o-phosphoric, aliphatic and aromatic carboxylic acids, proline, hydroxymethylfurfural and sugars as their TMS derivatives: In honeys. *Chromatographia*, 48(1-2), 120-126.
365. Molnár-Perl, I., Vasanits, A., & Horváth, K. (1998). Simultaneous GC-MS quantitation of phosphoric, aliphatic and aromatic carboxylic acids, proline and hydroxymethylfurfural as their trimethylsilyl derivatives: In model solutions II. *Chromatographia*, 48(1-2), 111-119.

366. Quave, C. L., & Smeltzer, M. (2009). Anti-biofilm activity of *Marrubium vulgare* L.(Lamiaceae) extract on MRSA. *Planta Medica*, 75(04), P-96.
367. Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010). *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.
368. Pierozan, M. K., Pauletti, G. F., Rota, L., Santos, A. C. A. D., Lerin, L. A., Di Luccio, M., ... & Oliveira, J. V. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. *Food Science and Technology*, 29(4), 764-770.
369. Coast, J., Smith, R. D., & Millar, M. R. (1996). Superbugs: should antimicrobial resistance be included as a cost in economic evaluation?. *Health economics*, 5(3), 217-226.
370. Levi, M. E., & Eusterman, V. D. (2011). Oral infections and antibiotic therapy. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 44(1), 57-78.
371. Aqil, F., Ahmad, I., & Owais, M. (2006). Evaluation of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity and synergy of some bioactive plant extracts. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1(10), 1093-1102.
372. Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Van Vuuren, S. F., & Van Zyl, R. L. (2006). In vitro evidence of antimicrobial synergy between *Salvia chamelaeagnea* and *Leonotis leonurus*. *South African Journal of Botany*, 72(4), 634-636.
373. Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
374. Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 382-398.
375. Barchiesi, F., Arzeni, D., Compagnucci, P., di Francesco, L. F., Giacometti, A., & Scalise, G. (1998). In vitro activity of five antifungal agents against clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Medical mycology*, 36(6), 437-440.
376. Vengurlekar, S., Shukla, P., Patidar, P., Bafna, R., & Jain, S. (2008). Prescribing pattern of antidiabetic drugs in Indore city hospital. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 70(5), 637.
377. Kalra, S., Mukherjee, J. J., Venkataraman, S., Bantwal, G., Shaikh, S., Saboo, B., ... & Ramachandran, A. (2013). Hypoglycemia: The neglected complication. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 17(5), 819.
378. Stenman, S., Groop, P. H., Laakkonen, K., Wahlin-Boll, E., & Melander, A. (1990). Relationship between sulfonylurea dose and metabolic effect. *Diabetes*, 39(Suppl 1), 108A.
379. Spiller, H. A., & Sawyer, T. S. (2006). Toxicology of oral antidiabetic medications. *American journal of health-system pharmacy*, 63(10), 929-938.
380. Valiathan, M. S. (1998). Healing plants. *Current science*, 75(11), 1122-1127.

381. Ahmed, E. T., Abo-Salem, O. M., & Osman, A. (2011). The influence of egyptian propolis on induced burn wound healing in diabetic rats; Antibacterial Mechanism. *Science Journal of Medicine and Clinical Trials*, 2012.
382. Deluc, L. G., Quilici, D. R., Decendit, A., Grimplet, J., Wheatley, M. D., Schlauch, K. A., ... & Cramer, G. R. (2009). Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC genomics*, 10(1), 212.
383. Apostolidis, E., Kwon, Y. I., & Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 46-54.
384. Cheplick, S., Kwon, Y. I., Bhowmik, P., & Shetty, K. (2010). Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. *Bioresource Technology*, 101(1), 404-413.
385. Sousa, B. A., & Correia, R. T. P. (2012). Phenolic content, antioxidant activity and anti-amylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(1), 25-30.
386. Karthikesan, K., Pari, L., & Menon, V. P. (2010). Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Gen Physiol Biophys*, 29(1), 23-30.
387. Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1033-1043.
388. Olthof, M. R., Hollman, P. C., Zock, P. L., & Katan, M. B. (2001). Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 73(3), 532-538.
389. Hemmerle, H., Burger, H. J., Below, P., Schubert, G., Rippel, R., Schindler, P. W., ... & Herling, A. W. (1997). Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *Journal of medicinal chemistry*, 40(2), 137-145.
390. Parker, J. C., VanVolkenburg, M. A., Levy, C. B., Martin, W. H., Burk, S. H., Kwon, Y., ... & Vestergaard, P. (1998). Plasma glucose levels are reduced in rats and mice treated with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase. *Diabetes*, 47(10), 1630-1636.
391. Herling, A. W., Burger, H. J., Schwab, D., Hemmerle, H., Below, P., & Schubert, G. (1998). Pharmacodynamic profile of a novel inhibitor of the hepatic glucose-6-phosphatase system. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 274(6), G1087-G1093.
392. Anjaneyulu, M., & Chopra, K. (2004). Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Clinical and Experimental pharmacology and physiology*, 31(4), 244-248.
393. Vessal, M., Hemmati, M., & Vasei, M. (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(3), 357-364.



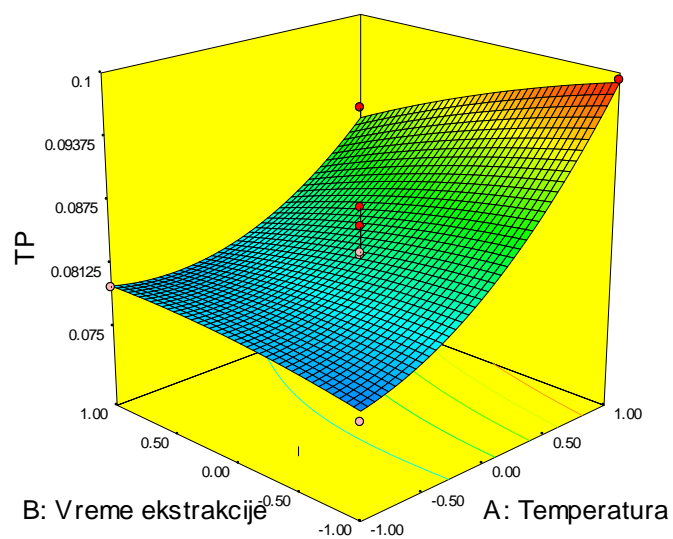
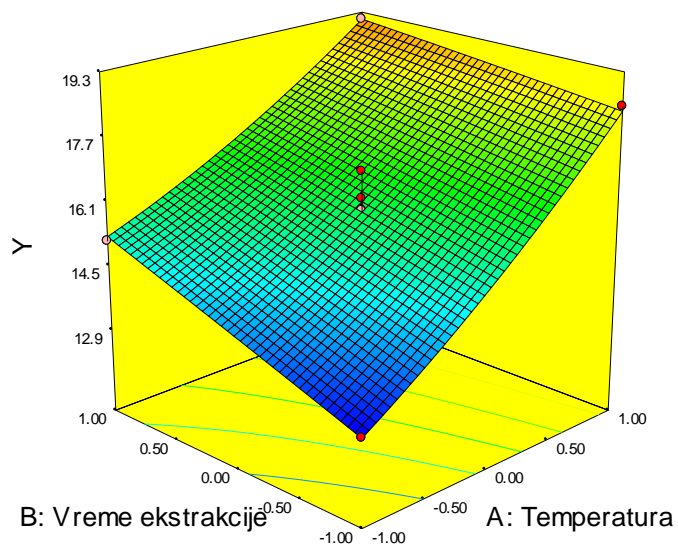
394. Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., & Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological research*, 51(2), 117-123.
395. Marre, M. (2002). Before oral agents fail: the case for starting insulin early. *International journal of obesity*, 26(3), S25-S30.
396. Duckworth, W. (2003). Improvements in glycemic control in type 2 diabetes patients switched from sulfonylurea coadministered with metformin to glyburide-metformin tablets. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 9(3), 256-262.
397. McCarty, M. F. (2005). AMPK activation as a strategy for reversing the endothelial lipotoxicity underlying the increased vascular risk associated with insulin resistance syndrome. *Medical hypotheses*, 64(6), 1211-1215.
398. Saremi, A., Tulloch-Reid, M., & Knowler, W. C. (2003). Coffee consumption and the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26(7), 2211-2212.
399. Kamalakkannan, N., & Prince, P. S. M. (2006). Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 98(1), 97-103.
400. Bokkenheuser, V. D., Shackleton, C. H., & Winter, J. (1987). Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochemical Journal*, 248(3), 953-956.
401. UENO, I., KOHNO, M., HARAIKAWA, K., & HIRONO, I. (1984). Interaction between quercetin and superoxide radicals. Reduction of the quercetin mutagenicity. *Journal of pharmacobio-dynamics*, 7(11), 798-803.
402. Hollman, P. C., & Katan, M. B. (1998). Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. In *Diversification in Toxicology—Man and Environment* (pp. 237-248). Springer, Berlin, Heidelberg.
403. Boyle, S. P., Dobson, V. L., Duthie, S. J., Hinselwood, D. C., Kyle, J. A. M., & Collins, A. R. (2000). Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(10), 774-782.
404. Erlund, I., Kosonen, T., Alfthan, G., Mäenpää, J., Perttunen, K., Kenraali, J., ... & Aro, A. (2000). Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European journal of clinical pharmacology*, 56(8), 545-553.
405. Santana, A. A., Kurozawa, L. E., de Oliveira, R. A., & Park, K. J. (2013). Influence of process conditions on the physicochemical properties of pequi powder produced by spray drying. *Drying Technology*, 31(7), 825-836.
406. Papadakis, S. E., Gardeli, C., & Tzia, C. (2006). Spray drying of raisin juice concentrate. *Drying Technology*, 24(2), 173-180.
407. Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2010). A new technique for spray drying orange juice concentrate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 342-351.

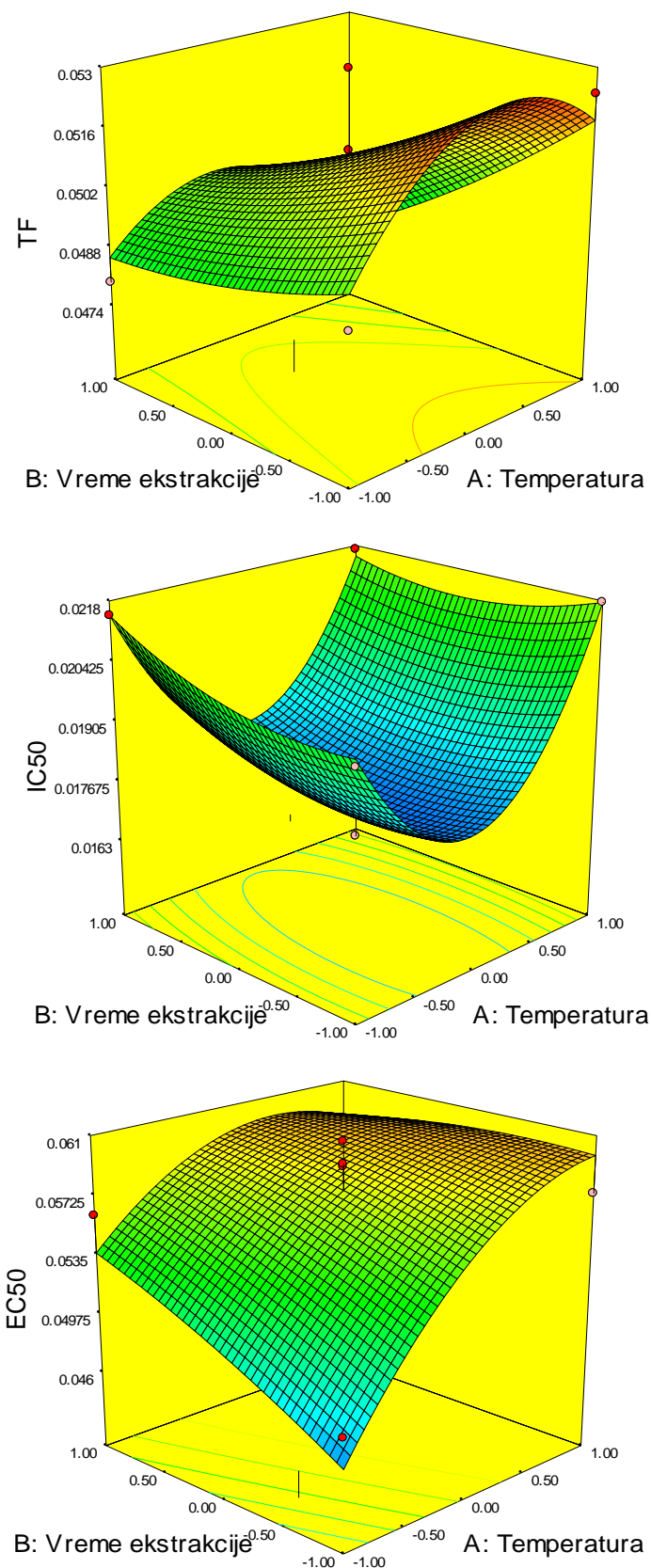
408. Vardin, H., & Yasar, M. (2012). Optimisation of pomegranate (*Punica Granatum L.*) juice spray-drying as affected by temperature and maltodextrin content. *International journal of food science & technology*, 47(1), 167-176.
409. Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Ashtari, A. K., & Omid, M. (2012). Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and bioproducts processing*, 90(4), 667-675.
410. Largo Avila, E., Cortes Rodríguez, M., & Ciro Velásquez, H. J. (2015). Influence of maltodextrin and spray drying process conditions on sugarcane juice powder quality. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7509-7520.
411. Jayasundera, M., Adhikari, B., Howes, T., & Aldred, P. (2011). Surface protein coverage and its implications on spray-drying of model sugar-rich foods: solubility, powder production and characterisation. *Food Chemistry*, 128(4), 1003-1016.
412. Bhandari, B. R., & Hartel, R. W. (2005). Phase transitions during food powder production and powder stability. In *Encapsulated and powdered foods* (pp. 273-304). CRC Press.
413. Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P., & Popović, L. M. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder technology*, 258, 209-215.
414. Sinija, V. R., & Mishra, H. N. (2008). Moisture sorption isotherms and heat of sorption of instant (soluble) green tea powder and green tea granules. *Journal of food engineering*, 86(4), 494-500.
415. Pavlić, B. (2017) Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Salvia officinalis L.*) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
416. Rodríguez-Hernández, G. R., Gonzalez-Garcia, R., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera\*, M. A., & Abud-Archila, M. (2005). Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technology*, 23(4), 955-973.
417. Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae Mart.*) powder produced by spray drying. *Journal of food engineering*, 88(3), 411-418.
418. Nurhadi, B., Andoyo, R., & Indiarto, R. (2012). Study the properties of honey powder produced from spray drying and vacuum drying method.
419. Mishra, P., Mishra, S., & Mahanta, C. L. (2014). Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, 92(3), 252-258.
420. Du, J., Ge, Z. Z., Xu, Z., Zou, B., Zhang, Y., & Li, C. M. (2014). Comparison of the efficiency of five different drying carriers on the spray drying of persimmon pulp powders. *Drying Technology*, 32(10), 1157-1166.
421. Caparino, O. A., Tang, J., Nindo, C. I., Sablani, S. S., Powers, J. R., & Fellman, J. K. (2012). Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine 'Carabao' var.) powder. *Journal of food engineering*, 111(1), 135-148.

422. Santana, A. A., Kurozawa, L. E., de Oliveira, R. A., & Park, K. J. (2013). Influence of process conditions on the physicochemical properties of pequi powder produced by spray drying. *Drying Technology*, 31(7), 825-836.
423. Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of food engineering*, 88(3), 411-418.
424. Ahmed, M., Akter, M. S., Lee, J. C., & Eun, J. B. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1307-1312.
425. Bicudo, M. O. P., Jó, J., Oliveira, G. A. D., Chaimsohn, F. P., Sierakowski, M. R., Freitas, R. A. D., & Ribani, R. H. (2015). Microencapsulation of juçara (*Euterpe edulis* M.) pulp by spray drying using different carriers and drying temperatures. *Drying Technology*, 33(2), 153-161.
426. Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 215S-217S.
427. Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
428. Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
429. Nunes, G. L., Boaventura, B. C. B., Pinto, S. S., Verruck, S., Murakami, F. S., Prudêncio, E. S., & Amboni, R. D. D. M. C. (2015). Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 151, 60-68.
430. Mishra, P., Mishra, S., & Mahanta, C. L. (2014). Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Embllica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, 92(3), 252-258.
431. Çam, M., İçyer, N. C., & Erdoğan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 117-123.
432. Tuyen, C. K., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of food engineering*, 98(3), 385-392.
433. Kim, H. O., Durance, T. D., Scaman, C. H., & Kitts, D. D. (2000). Retention of caffeic acid derivatives in dried *Echinacea purpurea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4182-4186.
434. Sun-Waterhouse, D., Wadhwa, S. S., & Waterhouse, G. I. (2013). Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: a comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2376-2388.
435. Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., & Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140(1-2), 29-34.

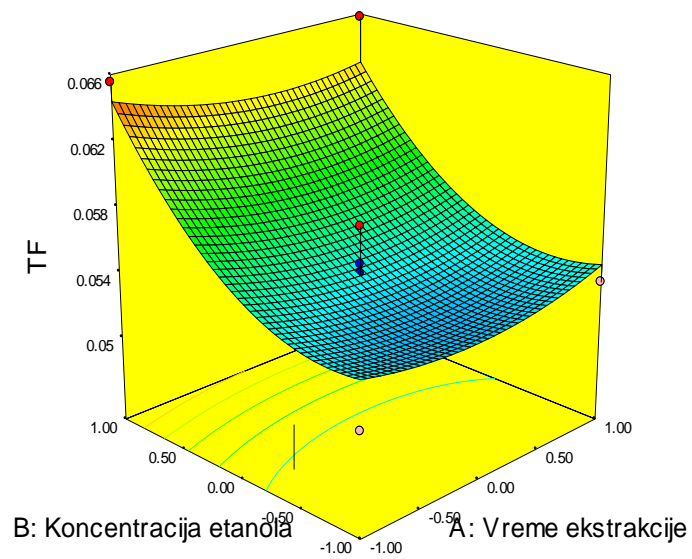
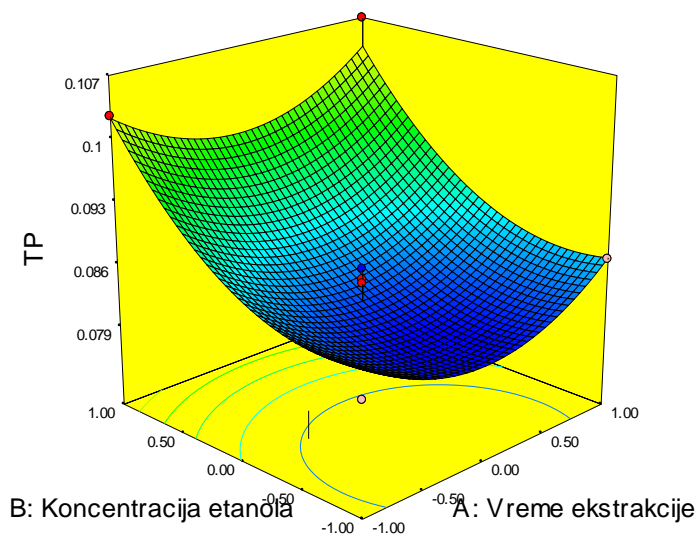
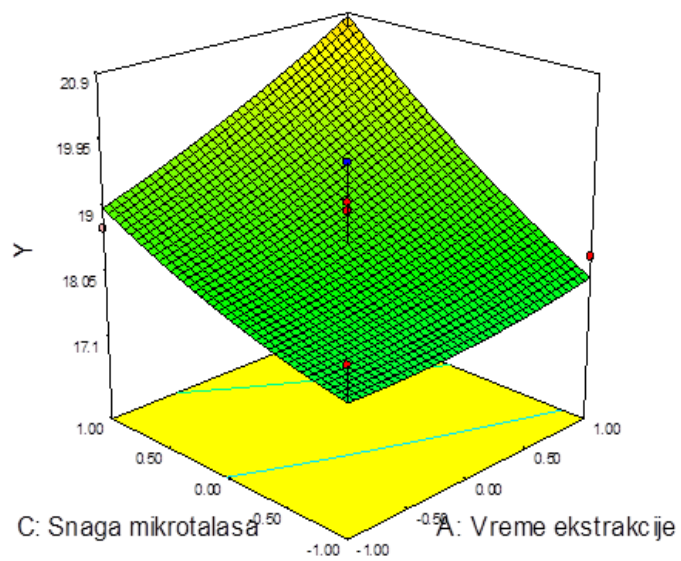
436. Qiao, L., Ye, X., Sun, Y., Ying, J., Shen, Y., & Chen, J. (2013). Sonochemical effects on free phenolic acids under ultrasound treatment in a model system. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(4), 1017-1025.
437. Achat, S., Tomao, V., Madani, K., Chibane, M., Elmaataoui, M., Dangles, O., & Chemat, F. (2012). Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(4), 777-786.
438. Wilkowska, A., Ambroziak, W., Czyżowska, A., & Adamiec, J. (2016). Effect of microencapsulation by spray-drying and freeze-drying technique on the antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium myrtillus*) juice polyphenolic compounds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(1), 11-16.
439. Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Palma, M., & Barroso, C. G. (2016, July). Stability of 40 phenolic compounds during ultrasound-assisted extractions (UAE). In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1755, No. 1, p. 080009). AIP Publishing LLC.
440. Vasić, A. (2020) Ekstrakcija i potencijalna primena sporednog proizvoda hajdučke trave i ploda šipka iz fabrike filter čaja. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
441. Kusuma, H. S., & Mahfud, M. (2016). Response surface methodology for optimization studies of microwaveassisted extraction of sandalwood oil. *J. Mater. Environ. Sci*, 7(6), 1958-1971.
442. Quintero Quiroz, J., Celis Torres, A., Muñoz Ramirez, L., Silva Garcia, M., Ciro Gomez, G., & Rojas Camargo, J. (2019). Optimization of the microwave-assisted extraction process of bioactive compounds from annatto seeds (*Bixa orellana* L.). *Antioxidants*, 8(2), 37.
443. Stefanidis, G. D., Munoz, A. N., Sturm, G. S., & Stankiewicz, A. (2014). A helicopter view of microwave application to chemical processes: reactions, separations, and equipment concepts. *Reviews in Chemical Engineering*, 30(3), 233-259.
444. Khajenoori, M., Asl, A. H., & Hormozi, F. (2009). Proposed models for subcritical water extraction of essential oils. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17(3), 359-365.
445. Strieder, M. M., Silva, E. K., & Meireles, M. A. A. (2019). Specific Energy: A New Approach to Ultrasound-assisted Extraction of Natural Colorants. *probe*, 23, 30.
446. Vladić, J. (2017) Savremene metode ekstrakcije rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.), hemijski sastav i biološka aktivnost odabranih ekstrakata. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
447. Tontul, I., & Topuz, A. (2017). Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in food science & technology*, 63, 91-102.

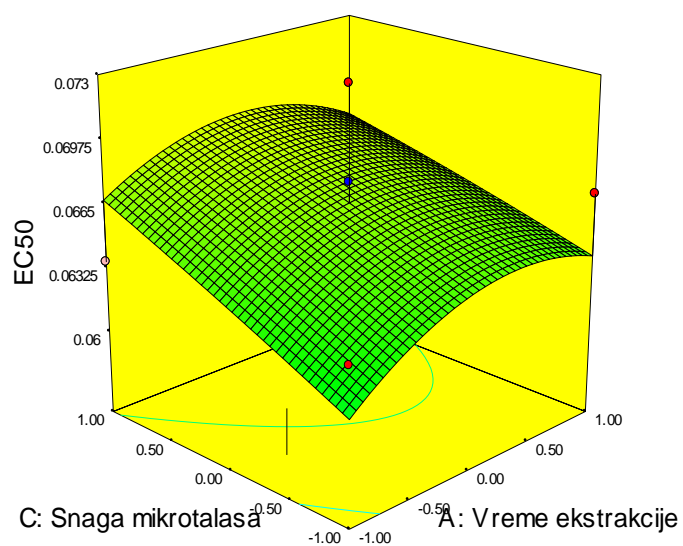
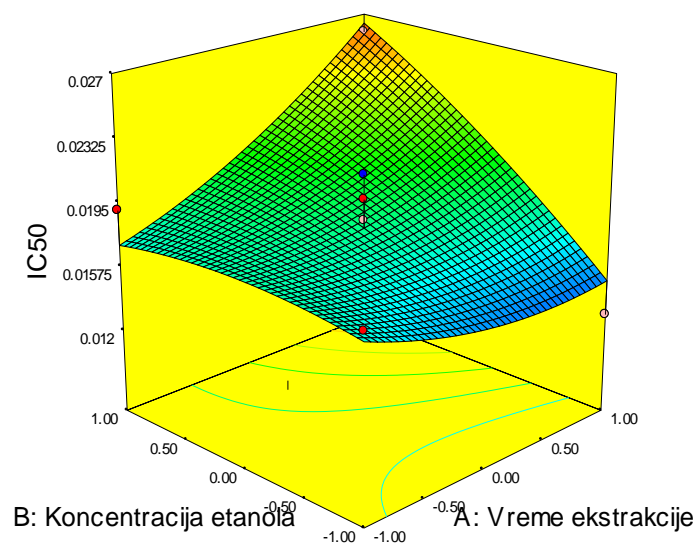
## 7. PRILOG





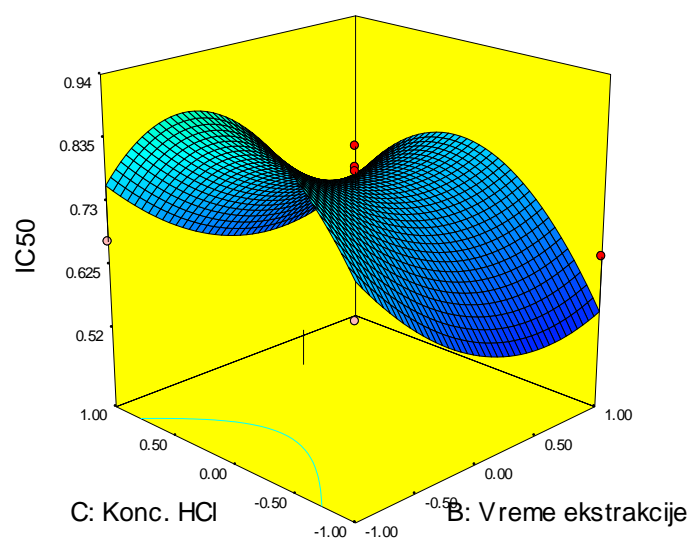
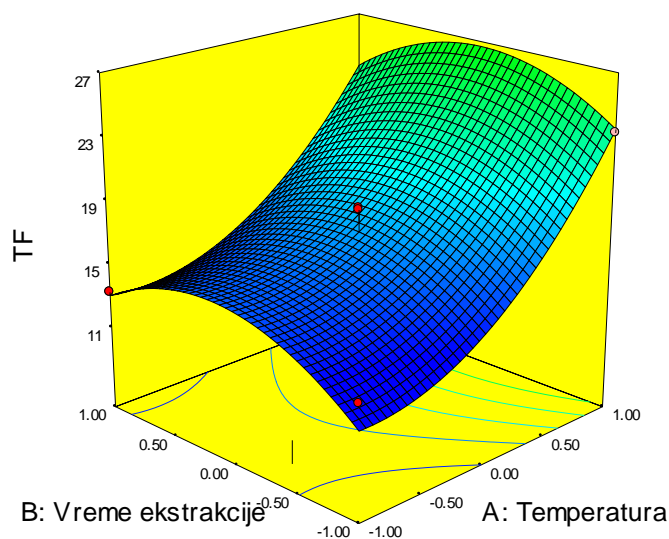
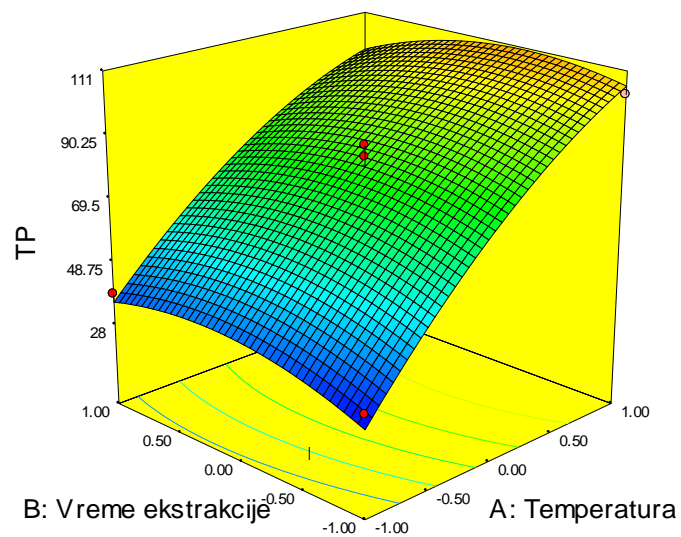
**Slika P1.** Uticaj parametara ultrazvučne ekstrakcije (temperatura, vreme ekstrakcije i snaga ultrazvuka) na ispitivane odzive Y, TP, TF, IC<sub>50</sub> i EC<sub>50</sub>



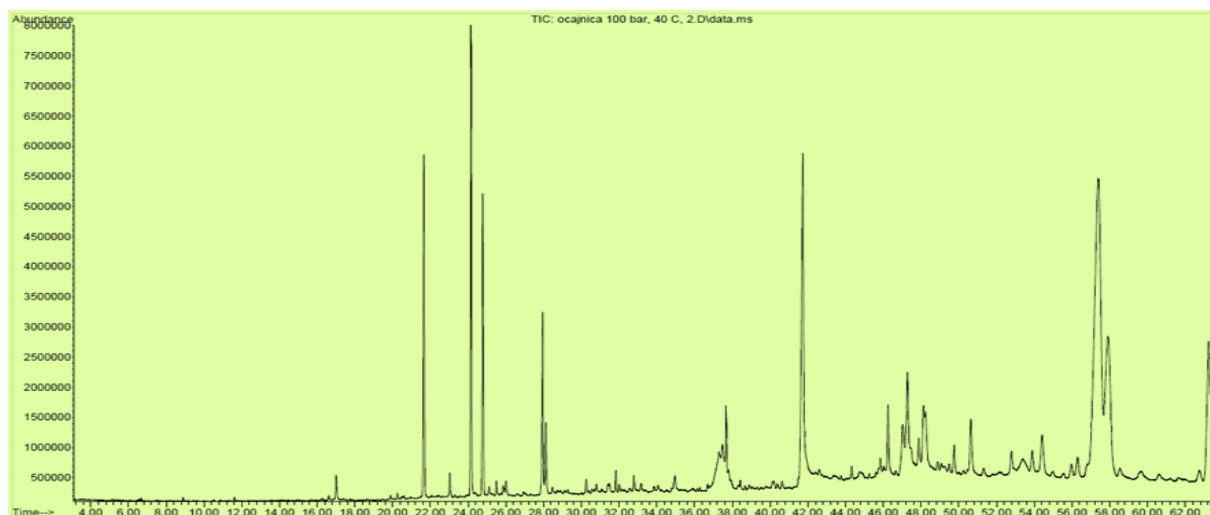


**Slika P2.** Uticaj parametara mikrotalasnne ekstrakcije (koncentracija etanola, vreme ekstrakcije i snaga mikrotalasa) na ispitivane odzive Y, TP, TF, IC<sub>50</sub> i EC<sub>50</sub>

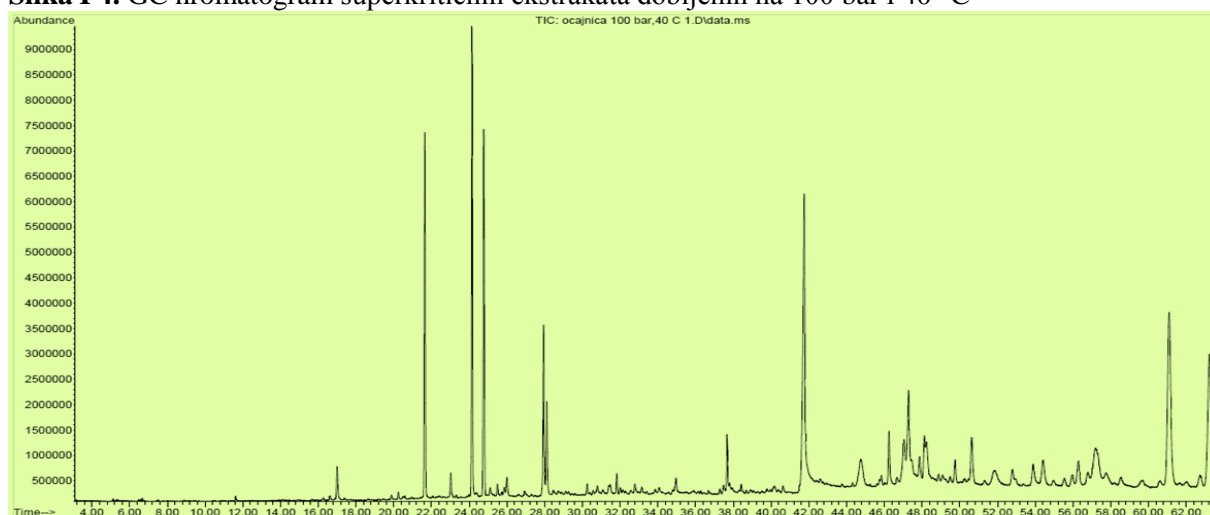




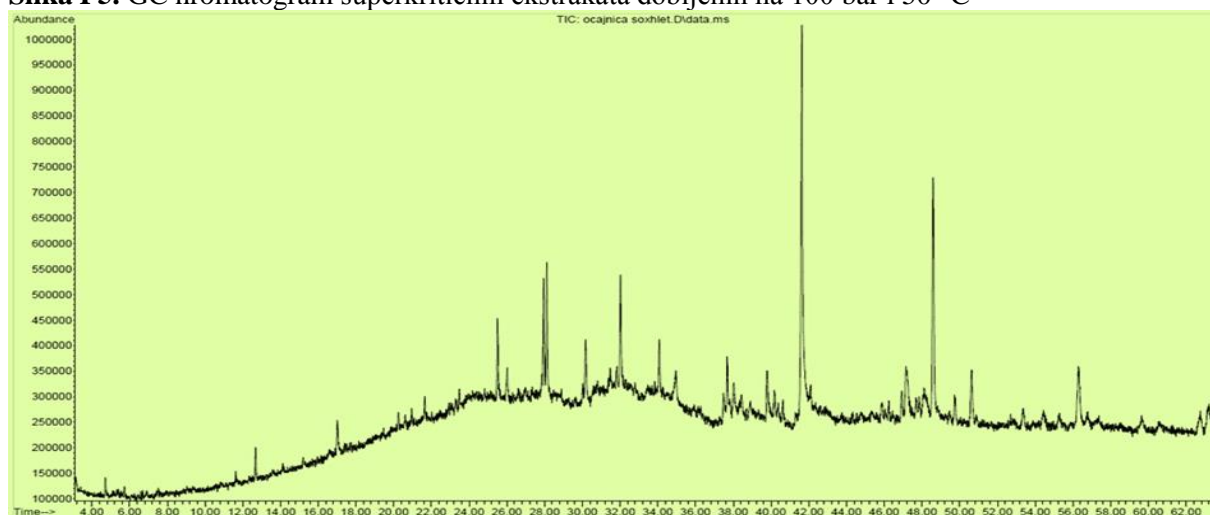
**Slika P3.** Uticaj parametara ekstrakcije subkritičnom vodom (temperatura, vreme ekstrakcije i koncentracija HCl) na ispitivane odzive TP, TF i IC<sub>50</sub>



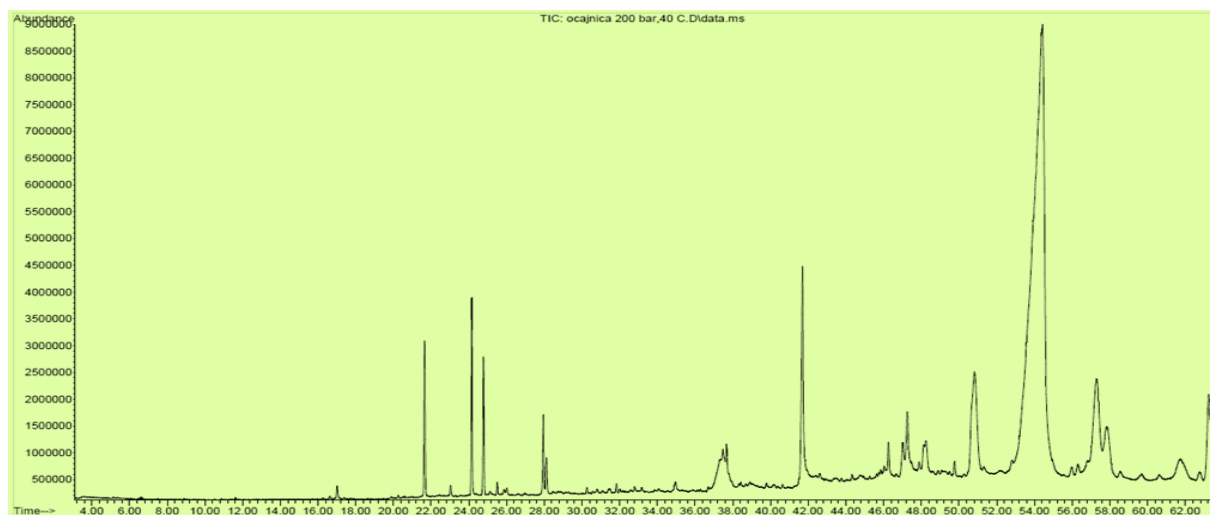
**Slika P4.** GC hromatogram superkričnih ekstrakata dobijenih na 100 bar i 40 °C



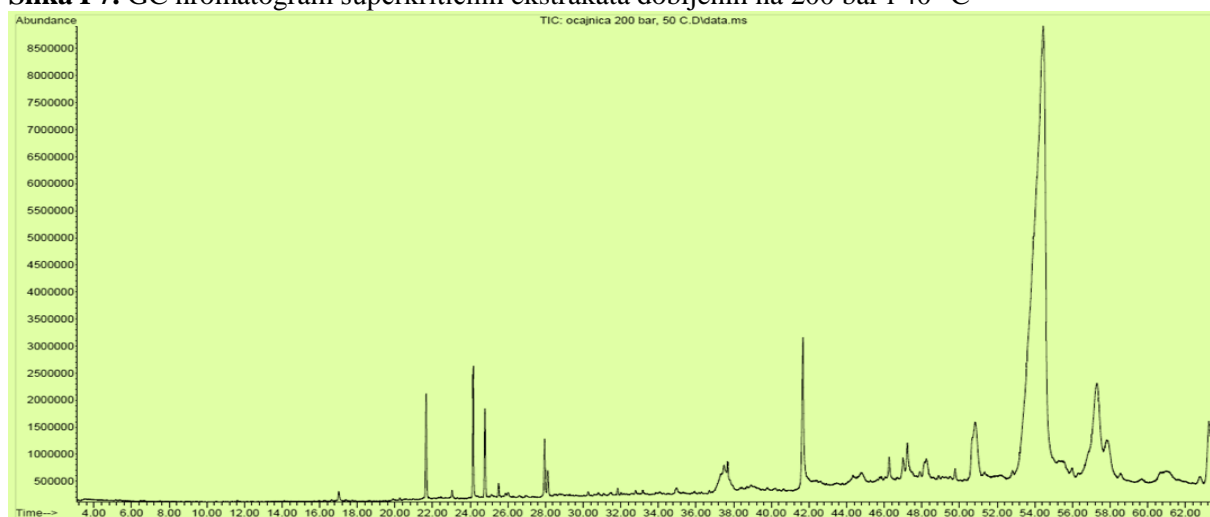
**Slika P5.** GC hromatogram superkričnih ekstrakata dobijenih na 100 bar i 50 °C



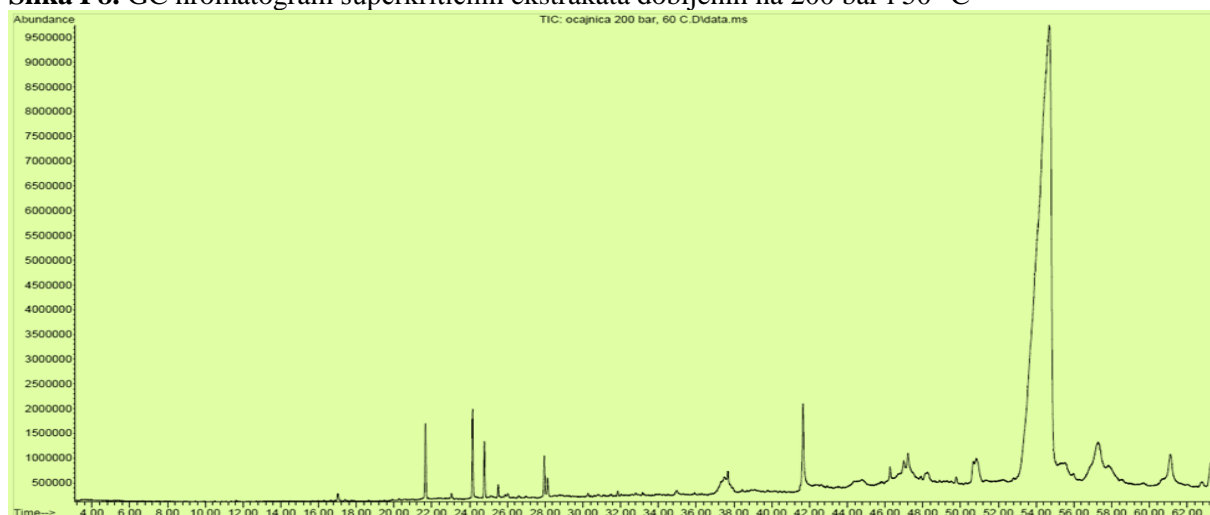
**Slika P6.** GC hromatogram Soxhlet ekstrakta



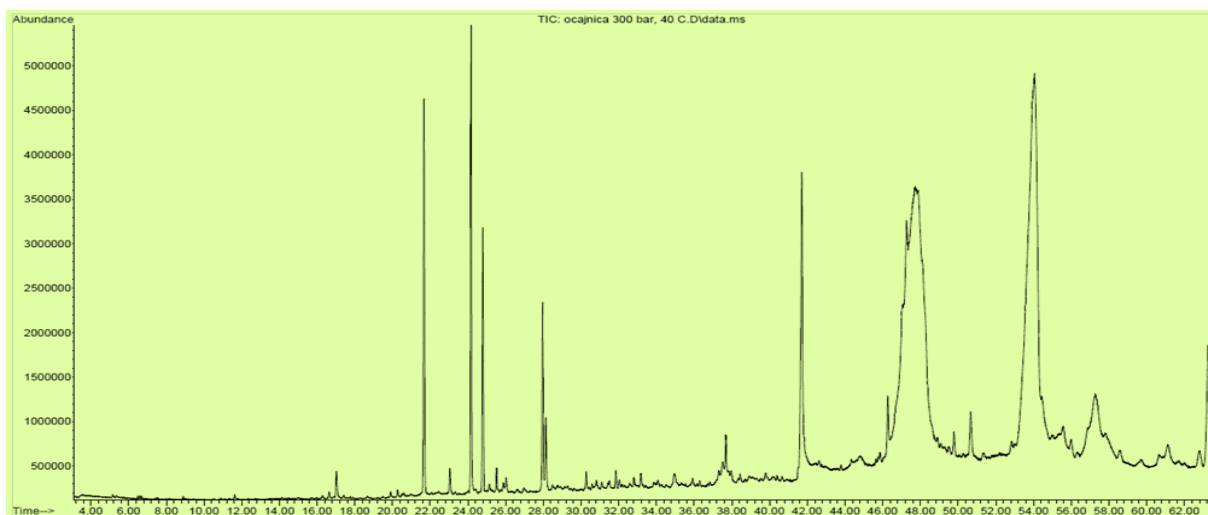
**Slika P7.** GC hromatogram superkričnih ekstrakata dobijenih na 200 bar i 40 °C



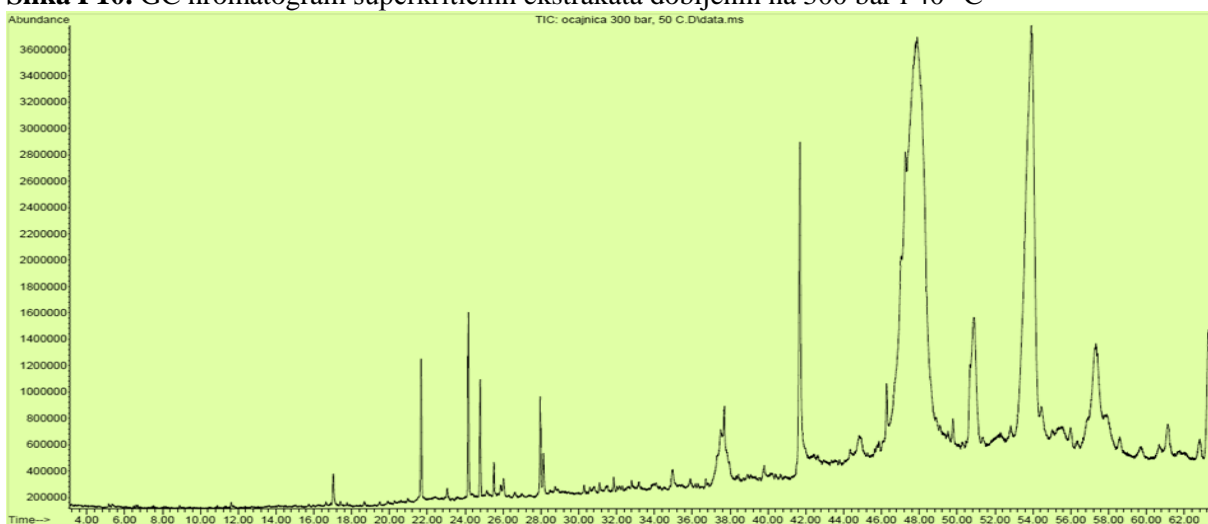
**Slika P8.** GC hromatogram superkričnih ekstrakata dobijenih na 200 bar i 50 °C



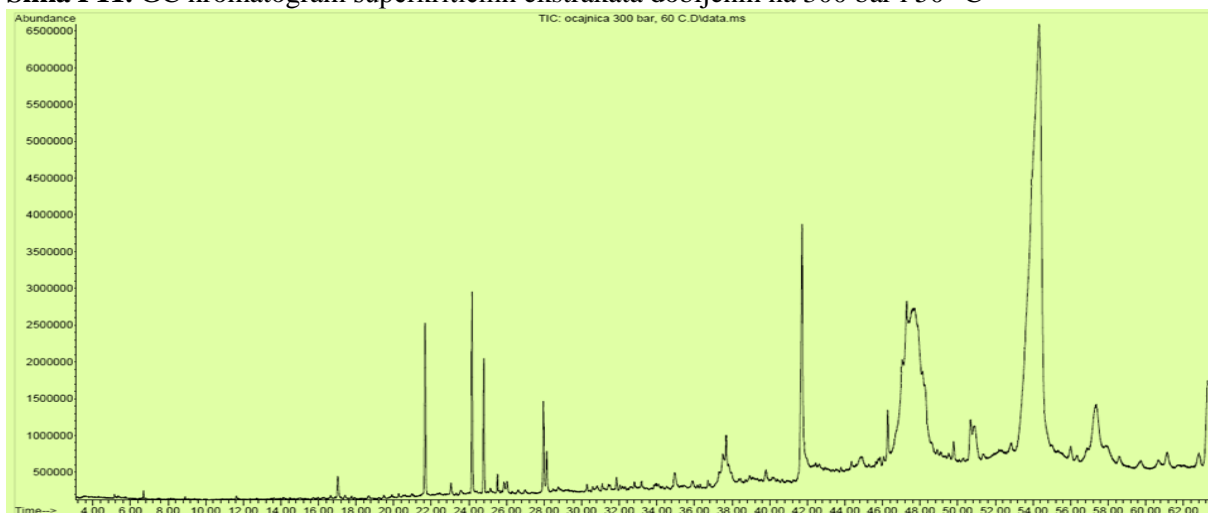
**Slika P9.** GC hromatogram superkričnih ekstrakata dobijenih na 200 bar i 60 °C



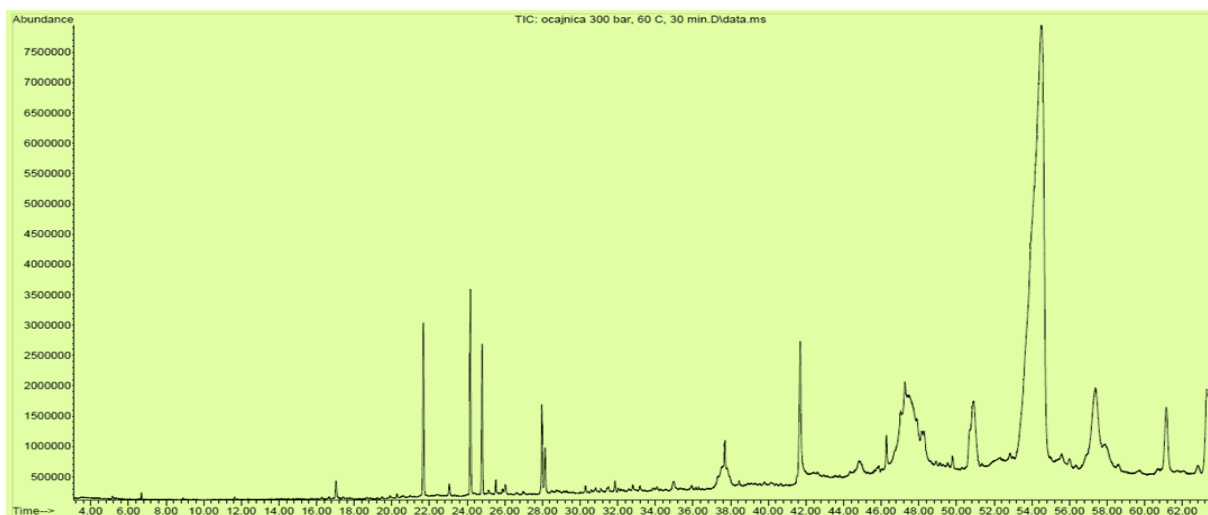
**Slika P10.** GC hromatogram superkritičnih ekstrakata dobijenih na 300 bar i 40 °C



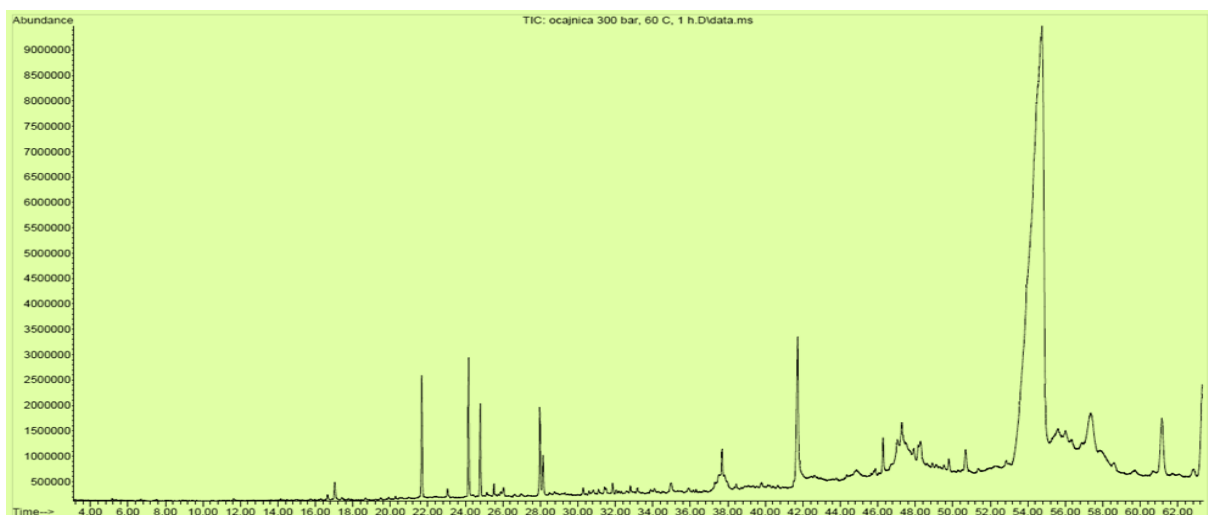
**Slika P11.** GC hromatogram superkritičnih ekstrakata dobijenih na 300 bar i 50 °C



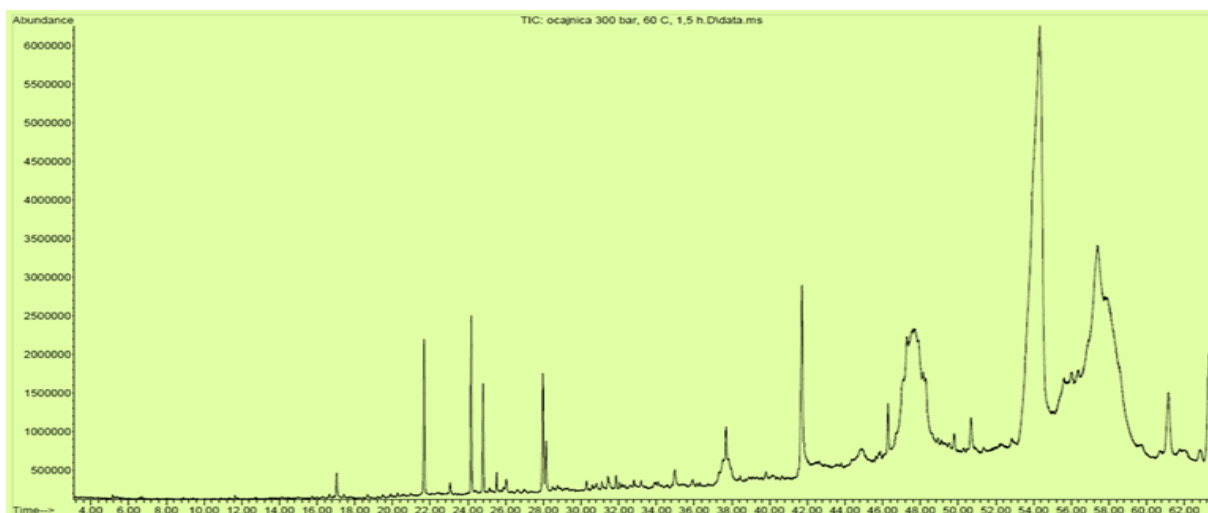
**Slika P12.** GC hromatogram superkritičnih ekstrakata dobijenih na 300 bar i 60 °C



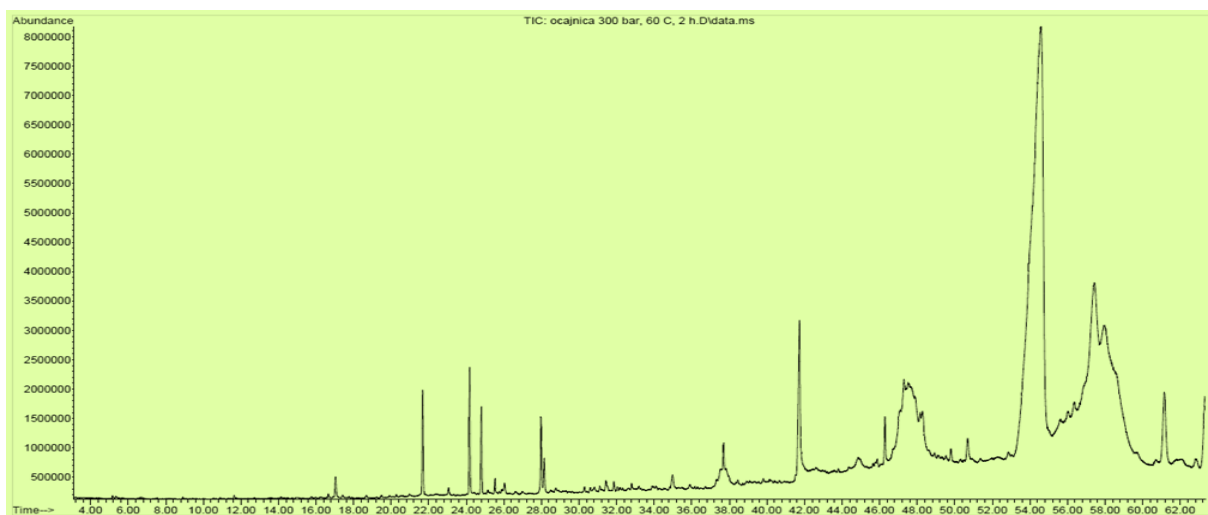
**Slika P13.** GC hromatogram superkritičnog ekstrakta dobijenog na 300 bar i 60 °C frakcionisanjem nakon 0,5 h



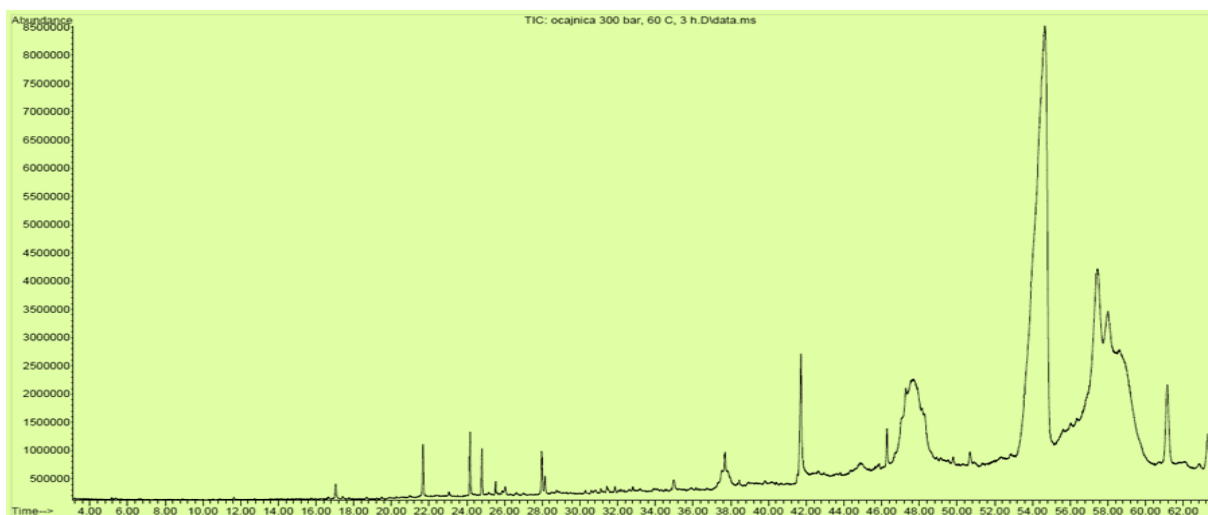
**Slika P14.** GC hromatogram superkritičnog ekstrakta dobijenog na 300 bar i 60 °C frakcionisanjem nakon 1 h



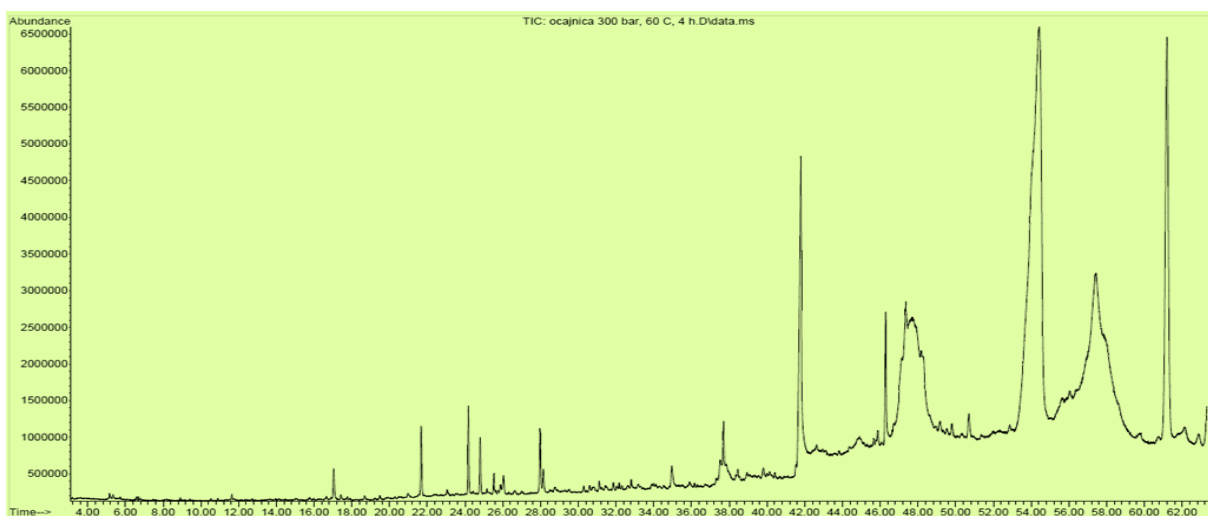
**Slika P15.** GC hromatogram superkritičnog ekstrakta dobijenog na 300 bar i 60 °C frakcionisanjem nakon 1,5



**Slika P16.** GC hromatogram superkritičnog ekstrakta dobijenog na 300 bar i 60 °C frakcionisanjem nakon 2 h



**Slika P17.** GC hromatogram superkritičnog ekstrakta dobijenog na 300 bar i 60 °C frakcionisanjem nakon 3 h



**Slika P18.** GC hromatogram superkritičnog ekstrakta dobijenog na 300 bar i 60 °C frakcionisanjem nakon 4 h

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

### План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
Савремене методе екстракције очајнице ( <i>Marrubium vulgare</i> L.) и сушење одабраних екстраката, хемијски састав и биолошке активности
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
а) Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду (Србија) б) Природно-математички факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду (Србија) в) Институт за фармацеутску технологију и регулаторне послове, Универзитет у Сегедину (Мађарска) г) Прехрамбено-технолошки факултет, Универзитет Јосип Јурај Штросмајер у Осиеку (Хрватска) д) Институт за проучавање лековитог биља "Др Јосиф Панчић", Београд (Србија)
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
Пројекат који се реализује у оквиру програма Министарства просвете, науке и технолошког развоја (пројектни циклус 2011 - 2019): "Фармаколошки активне супстанце и производи на бази лековитог/ароматичног биља за примену у фармацији" (ТР 31013)
<b>1. Опис података</b>
<p>1.1 Врста студије</p> <p>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају  Докторска дисертација _____</p> <p>1.2 Врсте података</p> <p><input type="checkbox"/> а) квантитативни  <input checked="" type="checkbox"/> б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови  б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи  в) генотипови,. навести врсту _____  г) административни подаци, навести врсту _____  <input checked="" type="checkbox"/> д) узорци ткива, навести врсту: <u>надземни део <i>M. vulgare</i></u>  <input checked="" type="checkbox"/> ђ) снимци, фотографије, навести врсту _____  <input checked="" type="checkbox"/> е) текст, навести врсту: <u>литература</u> _____  ж) мапа, навести врсту _____  <input checked="" type="checkbox"/> з) остало, описати: <u>web садржај</u> _____</p> <p>1.3 Формат података, употребљене скале, количина података</p> <p>1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> а) Excel фајл, датотека _____</p>

- b) SPSS fajl, datoteka \_\_\_\_\_  
 c) PDF fajl, datoteka \_\_\_\_\_  
 d) Текст fajl, datoteka \_\_\_\_\_  
 e) JPG fajl, datoteka \_\_\_\_\_  
 f) Остало, датотека Design-Expert v.7 Trial софтвер

### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли: велики број  
 б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): велики број

### 1.3.3. Поновљена мерења

- a) да  
 б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) временски размак између поновљених мерења је 1 h  
 б) варијабле које се више пута мере односе се на садржај влаге у испитиваном биљном материјалу, укупан садржај фенолних једињења, садржај етарског уља, итд.  
 в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као \_\_\_\_\_

Напомене: \_\_\_\_\_

*Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?*

- a) Да  
 б) Не

*Ако је одговор не, образложити* \_\_\_\_\_

## 2. Прикупљање података

### 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

#### 2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- a) експеримент, навести тип: хемијска анализа  
 б) корелационо истраживање, навести тип Вох-Веhken експериментални дизајн  
 ц) анализа текста, навести тип \_\_\_\_\_  
 д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

*2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).*

HPLC-DAD, GC – MS

### 2.2 Квалитет података и стандарди

#### 2.2.1. Третман недостајућих података

- a) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) Колики је број недостајућих података?  
 б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не  
 в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података



2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан применом статистичких тестова и одбацивањем екстрема.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је изведена поређењем добијених података са литературним подацима.

### 3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму Универзитета Нови Сад.

3.1.2. URL адреса: накнадно

3.1.3. DOI \_\_\_\_\_

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење \_\_\_\_\_

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? \_\_\_\_\_

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд. \_\_\_\_\_

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? \_\_\_\_\_

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром?  Да  Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача?  Да  Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да  Не

Образложити \_\_\_\_\_

### 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

## 4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

---

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
  - б) Подаци су анонимизирани
  - ц) Остало, навести шта
- 

## 5. Доступност података

### 5.1. Подаци ће бити

- а) јавно доступни
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

---

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

---

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

---

## 6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Александра Гаварић, svejina@uns.ac.rs

---

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Александра Гаварић, svejina@uns.ac.rs

---

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Александра Гаварић, svejina@uns.ac.rs

---