

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

Ahmed Mohamed Elgndi

Farmakološko delovanje ekstrakata odabranih aromatičnih/lekovitih biljaka

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

Mentor: Prof. dr Zoran Zeković

Novi Sad, 2017.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Ahmed Mohamed Elgndi
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Zoran Zeković, redovni profesor
Naslov rada: NR	Farmakološko delovanje ekstrakata odabranih aromatičnih/lekovitih biljaka
Jezik publikacije:	Srpski, latinica

JP	
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada: FO	7 poglavlja, 126 stranica, 45 slika, 23 tabele, 115 referenci, 12 priloga
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Farmaceutsko inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Satureja montana</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Coriandrum sativum</i> , etarsko ulje, superkritična ekstrakcija, biološka aktivnost
UDK	

<p>Čuva se:</p> <p>ČU</p>	<p>Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad</p>
<p>Važna napomena:</p> <p>VN</p>	<p>Nema</p>
<p>Izvod:</p> <p>IZ</p>	<p>Glavni cilj ove disertacije koji obuhvata dobijanje i hemijsku karakterizaciju ekstrakata i etarskih ulja rtanjskog čaja (<i>Satureja montana</i> L.), bosiljka (<i>Ocimum basilicum</i> L.) i korijandera (<i>Coriandrum sativum</i> L.), kao i njihove smeše, je određivanje biološke aktivnosti dobijenih ekstrakata u <i>in vitro</i> uslovima praćenjem sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala i antiproliferativne aktivnosti.</p> <p>Prvo je izvršena karakterizacija biljnih sirovina (rtanjski čaj, bosiljak i korijander), kao i njihove smeše jednakih masenih udela (CBS) u pogledu sadržaja vlage, srednjeg prečnika čestica i sadržaja etarskog ulja. U cilju dobijanja etarskih ulja i ekstrakata iz ispitivanih sirovina su primenjeni hidrodestilacija (konvencionalni postupak) i superkritična ekstrakcija (savremena tehnika). GC-MS analizom je određen kvalitativni sastav i relativni udeo pojedinačnih monoterpenskih ugljovodonika, oksidovanih monoterpena, seskviterpena i ostalih jedinjenja. Dalje je GC-FID analizom kvantitativno određen sadržaj i prinos pojedinačnih terpena (α-pinen, β-pinen, d-limonen, γ-terpinen, eukaliptol, linalool, kamfor, α-terpineol, geraniol, metil-havikol, karvakrol i eugenol) i izvršeno je poređenje uzoraka dobijenih tradicionalnim i savremenim postupcima.</p> <p>Etarskim uljima i lipofilnim ekstraktima je određena biološka aktivnost ispitivanjem antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti. <i>In vitro</i> anti-oksidativna aktivnost superkritičnih ekstrakata i etarskih ulja je određena DPPH testom, dok je antiproliferativna aktivnost određena u <i>in vitro</i> uslovima na tri linije tumorskih ćelija (HeLa, MDA-MB-453, K562) i na normalne humane fibroblaste (MRC-5).</p> <p>U cilju boljeg određivanja sličnosti između etarskih ulja i lipofilnih ekstrakata rtanjskog čaja, bosiljka, korijandera i njihove smeše (CBS) su primenjene hemometrijska</p>

	tehnike: analiza glavnih komponenata (Principal component analysis) i hijerarhijska klaster analiza (Hierarchical cluster analysis).
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	23.02.2012.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	predsednik: dr Marija Radojković, docent, Tehnološki fakulteta u Novom Sadu član: dr Zoran Zeković, redovni profesor, Tehnološki fakulteta u Novom Sadu član: dr Anamarija Mandić, naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu

University of Novi Sad

Faculty of Technology

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Ahmed Mohamed Elgndi
Mentor: MN	Dr Zoran Zeković
Title: TI	Pharmacological activity of extracts obtained from selected aromatic/medicinal plants
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract:	Serbian / English

LA	
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2017.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Physical description: PD	7 chapters, 126 pages, 45 figures, 23 tables, 115 references, 12 appendices
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Pharmaceutical engineering
Subject, Key words SKW	<i>Satureja montana</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Coriandrum sativum</i> , essential oil, supercritical fluid extraction, biological activity
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	None

<p>Abstract:</p> <p>AB</p>	<p>The main aim of this dissertation was recovery and chemical characterization of extracts and essential oils of winter savory (<i>Satureja montana</i> L.), basil (<i>Ocimum basilicum</i> L.) and coriander (<i>Coriandrum sativum</i> L.), as well as their mixture, and determination biological activity of extracts in <i>in vitro</i> conditions by capacity towards neutralization of free radicals and antiproliferative activity.</p> <p>Plant materials (winter savory, basil and coriander) and their mixture (CBS) were characterized in terms of moisture content, mean particle size and essential oil content. In order to obtain essential oil and extracts from investigated plants, hydrodistillation (conventional procedure) and supercritical fluid extraction (novel technique) were applied. GC-MS analysis was used for determination of qualitative content and relative abundance of monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, sesquiterpenes and other volatile compounds. Furthermore, GC-FID analysis was used for quantitative determination of content and yield of terpene compounds (α-pinene, β-pinene, d-limonene, γ-terpinene, eucalyptol, linalool, camphor, α-terpineol, geraniol, methyl-chavicol, carvacrol i eugenol) and samples obtained by traditional and novel techniques were compared. Biological potential of essential oil and lipophilic extracts was determined by antioxidant and antiproliferative activity. <i>In vitro</i> antioxidant activity of supercritical extracts and essential oils was determined by DPPH assay, while antiproliferative activity was determined in <i>in vitro</i> conditions on three cancer cell lines (HeLa, MDA-MB-453, K562) and on normal human fibroblasts (MRC-5).</p> <p>Chemometric techniques such as principal component analysis (PCA) i hierarchical cluster analysis (HCA) were applied for better understanding of similarities between essential oils and lipid extracts.</p>
<p>Accepted on Senate on:</p> <p>AS</p>	<p>23. February, 2012.</p>
<p>Defended:</p>	

DE	
Thesis Defend Board: DB	president: dr Marija Radojković, assistant professor, Faculty of Technology, Novi sad member: dr Zoran Zeković, full professor, Faculty of Technology, Novi sad member: dr Anamarija Mandić, principal research fellow, Institute for Food Technology, Novi Sad

1. UVOD

Danas, gotovo da nema područja u kojem se lekovite i aromatične biljke ne primenjuju. Povećano interesovanje ogleda se u brojnim fitopreparatima za primenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj i hemijskoj industriji, zbog čega je istraživanje lekovitih i aromatičnih biljaka u stalnom porastu. Aromatične biljke su veoma cenjene i rasprostranjene u prirodi, a veliki broj se plantažno gaji, kao što su kamilica, pitoma nana, matičnjak, timijan, korijander, angelika, ruzmarin, selen i mnoge druge biljne vrste. One predstavljaju sirovine za dobijanje etarskih ulja, smeše mirisnih, lako isparljivih jedinjenja u kojima prevladavaju terpeni. Etarska ulja imaju široku primenu u prehrambenoj industriji i industriji alkoholnih i bezalkoholnih pića, parfimerijskoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, humanoj i veterinarskoj medicini, u zaštiti bilja kao insekticidi i antiparazitici.

Aromatične biljke porodice usnatice (*Lamiaceae*) kao što su rtanjski čaj (*Satureja montana* L.) i bosiljak (*Ocimum basilicum* L.), kao i iz porodice štitatara (*Apiaceae*) kojoj pripada korijander (*Coriandrum sativum* L.), imaju dugu tradiciju primene. Iako se najčešće koriste kao začini, u tradicionalnoj medicini zauzimaju značajno mesto u lečenju digestivnih, urinarnih i respiratornih tegoba. Sve tri navedene aromatične biljke sadrže biološki vredne aktivne principe, etarska ulja, tanine, triterpene i polifenolne komponente. Etarsko ulje rtanjskog čaja ispoljava antimikrobnu, antiinflamatornu, antifungalnu i antioksidativnu aktivnost. Etarsko ulje i ekstrakti su u novijim istraživanjima pokazali značajnu antiproliferativnu aktivnost na rast tumora i inhibitornu aktivnost prema HIV-1 virusu. Etarsko ulje korijandera, sa visokim sadržajem linalool (preko 60%), predstavlja odličnu sirovinu za izolovanje ove komponente, i/ili proizvodnju linalil-acetata. Različiti ekstrakti i etarsko ulje pokazuju značajnu antimikrobnu, antioksidativnu aktivnost, dobar potencijal u lečenju dijabetesa i različitih malignih oboljenja. Etarsko ulje i ekstrakti bosiljka (sa visokim sadržajem fenolnih komponenti i flavonoida) ispoljili su protivupalno, antibakterijsko, antivirusno, antioksidativno i antidijabetično dejstvo.

Imajući u vidu različita pozitivna biološka i farmakološka delovanja etarskih ulja i ekstrakata ovih aromatičnih biljaka, u istraživanju u okviru ove disertacije krenulo se od pretpostavke da se sinergistički efekat rtanjskog čaja, bosiljka i korijandera u višekomponentnoj biljnoj smeši može iskoristiti za dobijanje etarskog ulja/ekstrakta sa potentnijim biološkim delovanjem. Biljna smeša pripremljena je od herbe rtanjskog čaja i bosiljka, kao i semena korijandera u istom masenom odnosu biljnih droga. Etarska ulja rtanjskog čaja, bosiljka i korijandera, kao i biljne smeše, izdvojena su postupkom hidrodestilacije. U cilju dobijanja ekstrakta, bez tragova organskih rastvarača i izolovanja nativnih biološki aktivnih principa, primenjena je savremena tehnika ekstrakcije superkritičnim ugljen-dioksidom. Prednost ove tehnologije nad konvencionalnim postupcima ekstrakcije je izolovanje termolabilnih i lako isparljivih supstanci, a primenjeni ekstragens (CO₂) nosi oznaku GRAS

(eng. *Generally recognized as safe*), pa se smatra potpuno sigurnim za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Etarska ulja i ekstrakti ispitanih biljka, kao i biljne smeše, su hemijski analizirani.

Biološko dejstvo i sinergistički efekat etarskih ulja/ekstrakata ove tri aromatične biljke u biljnoj smeši, ispitan je u *in vitro* uslovima, praćenjem sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala i antiproliferativne aktivnosti. Biljni polifenoli se ubrajaju u potentne antioksidanse koji se od velike važnosti u prevenciji starenja i mnogih bolesti koje se dovode u vezu sa slobodnim radikalima. Iz literature je poznato da fenolna jedinjenja inhibiraju enzime, pokazuju antiinflamatorno, antialergijsko, antimikrobno, hipoglikemijsko, hipolipidemijsko, kardioprotektivno i antikancerogeno delovanje. Osim toga, velika pažnja je usmerena na proučavanje antioksidativne aktivnosti prirodnih supstanci i supstituciji sintetičkih antioksidanata, kao potencijalnih promotera karcinogeneze.

Novija istraživanja u savremenoj onkologiji u centar pažnje stavljaju bioaktivne komponente biljaka zbog svoje moguće uloge u hemioprevenciji, odnosno inhibiciji različitih koraka u malignoj transformaciji. Citotoksični potencijal biljnih konstituenata zasniva se na mogućnosti redukcije slobodnih radikala, kao i mogućnosti inhibicije inflamatornih citokina, zatim na mogućnost da dovedu do promena u regulaciji faktora rasta i ciljanih molekula signalnih puteva koji kontrolišu ćelijski rast, proliferaciju, apoptozu, kao i angiogenezu, invaziju i metastazu malignih ćelija (Amin i sar., 2009; Mehta i sar., 2010; Neergheen i sar., 2010; Surh, 2003). Pronalaženje novih antikancer agenasa koji bi ispoljili izraženo selektivno antitumorsko dejstvo prema malignim ćelijama, a minimalan toksičan efekat prema zdravim ćelijama, od izuzetnog je značaja u prevenciji i lečenju malignih oboljenja. Ovo istraživanje, kao i radovi sličnog koncepta se kreću u tom pravcu.

2. OPŠTI DEO

2.1 Etarska ulja i njihov hemijski sastav

2.1.1 Nastajanje etarskih ulja u prirodi

Etarska ulja se mogu nalaziti u svim delovima biljaka ili mogu biti skoncentrisana u jednom ili više delova biljaka. Na osnovu toga mogu se razlikovati etarska ulja iz cveta, lista, semena, korena, kore, stabla i smole. Iako potiču od jedne iste biljne vrste mogu se međusobno značajno razlikovati. U većini slučajeva etarska ulja se nalaze u slobodnom stanju u obliku kapljica u žlezdanim dlačicama i kanalčićima ili u sekretornim organima (intramuskularni rezervoari). U malom broju slučajeva etarska ulja nisu slobodna, već se nalaze u obliku glikozida koji su bez mirisa. Primeri su ulja slačice i gorkog badema. Ova ulja se tek pod uticajem specifičnih enzima u prisustvu vode oslobađaju u vidu isparljivih mirisnih sastojaka (aglikona) (Baser i Buchbauer, 2009).

Novijim istraživanjima je utvrđeno da etarska ulja nastaju u protoplazmi sekretornih ćelija koje se javljaju kao egzogene ili endogene žlezde. Egzogene žlezde su sekretorne ćelije bogate plazmom iz kojih ulje izlazi kroz zidove ćelija zbog čega lišće često bude lepljivo. Endogene žlezde se sastoje iz pojedinih ćelija (uljne ćelije) sa sekretornim otvorima ili sa cevastim sekretornim kanalima iz kojih se izlučuje etarsko ulje u međućelijski prostor. Treba napomenuti da je ovo izlučivanje etarskih ulja ireverzibilan proces. Kada su u pitanju razlozi nastanka etarskih ulja i njihov značaj u fiziološkim procesima u toku rasta biljke, nauka još nije u potpunosti našla objašnjenja koja će sa sigurnošću dati odgovore na pitanja vezana za ove procese. Skoro je opšte prihvaćeno da nastajanje etarskih ulja predstavlja prateću pojavu u toku intenzivne razmene materija tokom rasta, kako u metabolizmu azota, tako i u metabolizmu ugljenih hidrata. Fiziološka uloga terpena i aromata, koji predstavljaju glavne komponente etarskih ulja, jeste obezbeđivanje energije za biohemijske procese. Pored ove primarne uloge postoje i sekundarne uloge etarskih ulja. Tako kod cvetanja služe kao pomoćna sredstva za oprašivanje, pri čemu miris predstavlja mamac za insekte, kao i sredstvo za raspoznavanje (od strane pčela). Etarska ulja takođe služe i kao zaštita biljaka od životinja i od infekcija gljivicama i bakterijama. Otkriveno je da mnoga etarska ulja imaju fungicidno i baktericidno dejstvo (Pekić, 1983).

Kao što je već pomenuto, etarska ulja su široko rasprostranjena u biljnom svetu i mogu se naći u svakoj biljci koja ima mirisne delove. Praktičan značaj imaju etarska ulja dobijena iz sledećih familija: *Myrtaceae*, *Compositae*, *Labiatae*, *Pinaceae*, *Leguminosae*, *Umbelliferae* i *Gramineae*. Poznato je preko 3000 različitih etarskih ulja, međutim, samo oko 150 ima praktičnu primenu. Da bi etarsko ulje bilo primenjivo u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj i hemijsko-prerađivačkoj

industriji mora posedovati prijatan miris i/ili lekovito dejstvo, kao i veliku stabilnost. Takođe, mora postojati mogućnost njegove industrijske proizvodnje u dovoljnim količinama i zadovoljavajućim prinosom proizvoda. Aromatične biljke su rasprostranjene u prirodu i veliki broj ovih biljnih vrsta se gaji radi proizvodnje droga i etarskih ulja. Droge u kojima su glavni sastojci isparljivi mirisni proizvodi nazivaju se aromatičnim drogama. Količine etarskih ulja u ovim drogama variraju u širokim granicama, pa je tako sadržaj etarskih ulja u nekim drogama veoma mali (oko 0,05-0,1%), dok se u nekim sadržaj etarskih ulja kreće i do 20% (Pekić, 1983).

2.1.2 Hemijski sastav etarskih ulja

Etarska ulja predstavljaju kompleksne smeše ugljovodonika, alkohola, aldehida, ketona, kiselina, estara i drugih alifatičnih, alicikličnih i heterocikličnih jedinjenja. Ne postoje dve biljne vrste sa identičnim sastavom etarskih ulja. Čak i unutar jedne biljne vrste postoje razlike u etarskim uljima između biljnih sorti. Pored sastava etarskih ulja, udeo komponenata varira u zavisnosti od porekla biljne sirovine, godine i godišnjeg doba je sakupljeno, načina čuvanja i postupka dobijanja. Primer za raznolikost sastava etarskih ulja jeste sastav etarskog ulja kore mandarine gde je identifikovano 48 različitih jedinjenja koja čine 99,2% sastava etarskog ulja, dok preostalih 0,8% čine najmanje 100 neidentifikovanih jedinjenja. Sastav pomenutog etarskog ulja dat je u tabeli 1 (Pekić, 1983).

Tabela 1. Sastav etarskog ulja kore mandarine

Klasa jedinjenja	Supstanca	Sadržaj (%)
Ugljovodonici	(+)- α -tujen	0,456
	(-)- α -pinen	2,467
	Mircen	1,189
	(-)-kamfen	0,366
	(+)- β -pinen	1,278

	<i>p</i> -cimol	8,156
	(+)-limonen	67,724
	γ -terpinen	9,139
	Terpinolen	0,573
	(+)-ilangen	0,008
	(+)-kariofilen	0,022
	(+)-longifolen	0,012
	(+)- γ -selinen	0,008
	(-)- α -selinen	0,017
	Najmanje 11 neidentifikovanih ugljovodonika	0,219
Alkoholi	Heptanol-i	0,016
	Oktanol-i	0,089
	Dekanol-i	0,038
	(-)-sabinen-hidrat (A)	0,056
	(-)-linalool	0,245
	(-)-sabinen-hidrat (B)	0,110
	(+)-citronelol	0,025
	Nerol	0,052
	α,α,p -trimetilbenzil alkohol	0,031
	Geraniol	0,012
	(-)-terpinen-4-ol	0,110
	(+)- α -terpineol	1,110

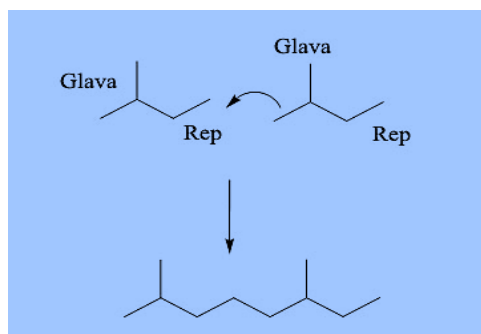
	(+)- <i>trans</i> -karveol	0,041
	<i>cis</i> -karveol	0,022
	Benzil-alkohol	0,009
	Najmanje 43 neidentifikovana alkohola	0,229
Acetati	Decilacetat	0,002
	Geranilacetat	0,003
	1,8-cineol	0,002
Aldehidi	Oktanal	0,035
	Dekanal	0,038
	Undekanal	0,003
	Dodekanal	0,006
	Neidentifikovani aldehidi	0,137
Ketoni	(+)-karvon	0,026
	Najmanje 26 neidentifikovanih ketona i drugih jedinjenja sa kiseonikom	0,659
Kiseline	Heptilna kiselina	0,004
	Kaprilna kiselina	0,044
	Pelargonska kiselina	0,013
	Limunska kiselina	0,006
	Kaprinska kiselina	0,029
	Undekanska kiselina	0,003
	Laurinska kiselina	0,006

	Najmanje 7 neidentifikovanih kiselina	0,012
Fenoli	Timol	0,084
Baze	Metil-estar- <i>N</i> -metil-antranilne kiseline	0,850
	Najmanje 3 neidentifikovane baze	0,003

Analiza etarskih ulja primenom klasičnih metoda, frakcione destilacije i derivatizacije daje ograničene rezultate pošto dolazi do razlaganja i izomerizacije konstituenata etarskih ulja. Pored pojave razlaganja, ove metode pokazuju slabe rezultate u oblasti razdvajanja i dobijanja čistih jedinjenja kao krajnjih proizvoda. Veliki napredak u oblasti analitike etarskih ulja ostvaren je primenom hromatografskih metoda, tj. tankoslojne hromatografije (TLC), gasne hromatografije (GC) i tečne hromatografije (LC). Primenom ovih metoda omogućena je identifikacija jedinjenja koja ulaze u sastav etarskih ulja, kao i broj, vrste i količine pojedinih sastojaka. Hromatografija na koloni (GC i LC) se u današnje vreme koristi u svrhe preparativnog izdvajanja čistih komponenti etarskih ulja kojima se zatim određuje struktura. Za određivanje strukture se koriste sofisticirane metode kao što su nuklearna magnetna rezonanca (NMR), infracrvena spektroskopija (IR), ultraljubičasta (UV) spektroskopija i masena spektrometrija (MS) koja može biti spregnuta sa tečnim hromatografom, gasnim hromatografom ili IR spektroskopom.

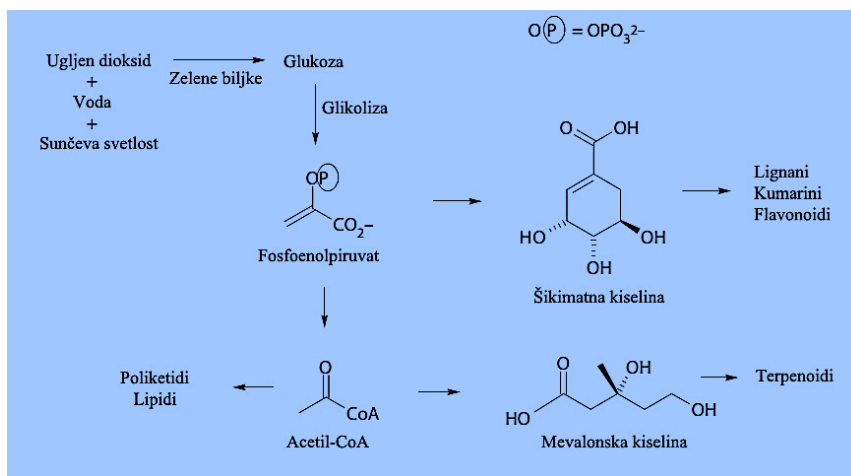
Za rutinsko ispitivanje etarskih ulja najčešće se primenjuju metode zasnovane na određivanju fizičkih i hemijskih konstanti. Od fizičkih konstanti najčešće se određuju specifična masa, specifična rotacija, indeks prelamanja, tačka mržnjenja i tačka ključanja, dok se od hemijskih konstanti najčešće određuju kiselinski broj, saponifikacioni broj, estarski broj, acetilni broj i metilni broj.

Najčešći sastojci etarskih ulja su terpeni. Otkriveni su u XIX veku kada je utvrđeno da najisparljivije komponente etarskih ulja čini smeša ugljovodonika čija je bruto formula $C_{10}H_{16}$. Terpeni koji su u svojoj strukturi sadržali kiseonik nazvani su kamfori. Sa razvojem hemijskih metoda razdvajanja pokazalo se da su terpenima veoma srodna jedinjenja koja sadrže 15, 20, 30 ili 40 ugljenikovih atoma. Zajedničko za ova jedinjenja jeste da se njihovi ugljovodonični skeleti sastoje iz *izo*- C_5 jedinica koje se nazivaju izoprenske jedinice ili izopentenske jedinice. Prema opštoj definiciji terpen podrazumeva sva ova jedinjenja bili oni ugljovodonici ili njihovi derivati. Većina poznatih terpena sastoji se iz izoprenskih jedinica koje su međusobno povezane po tipu vezivanja „glava za rep“, odnosno prema izoprenskom pravilu Ružičke. Opisano kuplovanje izoprenskih jedinica prikazano je na slici 1 (Baser i Buchbauer, 2009).



Slika 1. Kuplovanje dve izoprenske jedinice po modelu „glava za rep“

Pored terpena od značaja za etarska ulja su i šikimati, kao i poliketidi koji su takođe sekundarni metaboliti. Na slici 2 prikazana je opšta šema biosinteze terpena, šikimata i poliketida (Baser i Buchbauer, 2009).



Slika 2. Opšta šema biosinteze sekundarnih metabolita

Prema broju ugljenikovih atoma, odnosno prema broju izoprenskih jedinica, terpeni se dele na sledeće grupe:

- **Monoterpeni:** sadrže u svojoj strukturi deset ugljenikovih atoma, odnosno sačinjeni su iz dve izoprenske jedinice,

- **Seskviterpeni:** sadrže u svojoj strukturi petnaest ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem tri izoprenske jedinice,
- **Diterpeni:** sadrže u svojoj strukturi dvadeset ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem četiri izoprenske jedinice,
- **Sesterpeni:** sadrže u svojoj strukturi dvadeset pet ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem pet izoprenskih jedinica,
- **Triterpeni:** sadrže u svojoj strukturi trideset ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem šest izoprenskih jedinica,
- **Tetraterpeni:** sadrže u svojoj strukturi četrdeset ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem osam izoprenskih jedinica,
- **Politerpeni:** sadrže u svojoj strukturi više od četrdeset ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem najmanje devet izoprenskih jedinica.

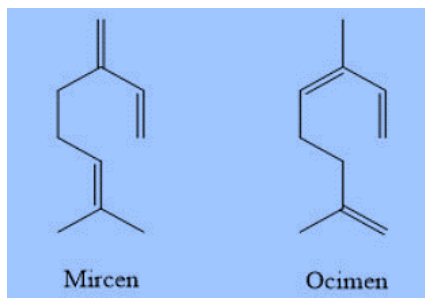
U lako isparljivim frakcijama etarskih ulja nalaze se monoterpeni, odnosno terpeni sa deset ugljenikovih atoma, dok se u teže isparljivim frakcijama nalaze terpeni koji imaju 15 i više ugljenikovih atoma. Pored terpena, u etarskim uljima su prisutna i aromatična jedinjenja od kojih su značajniji fenoli i njihovi derivati, kao i aldehidi.

2.1.2.1 Terpeni

Kao što je već navedeno u monoterpeni spadaju jedinjenja sa 10 ugljenikovih atoma, odnosno koji su nastali kuplovanjem dve izoprenske jedinice. Izvesna jedinjenja iz ove grupe značajna su za prehrambenu i farmaceutsku industriju i proizvode se sintezom. Prema strukturi monoterpeni se dele u tri grupe:

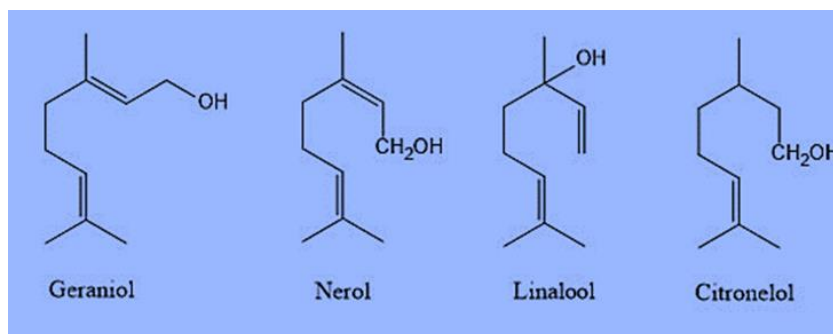
- ✓ Aciklični monoterpeni,
- ✓ Monociklični monoterpeni,
- ✓ Biciklični monoterpeni.

Skoro svi aciklični monoterpeni kao strukturnu osnovu imaju 2,6-dimetiloktan. Od ove grupe ugljovodonika u prirodi se često javljaju mircen i njegov izomer, ocimen, čije su strukture prikazane na slici 3.



Slika 3. Strukture mircena i ocimena

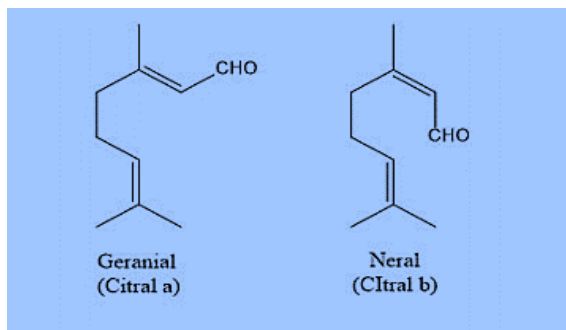
Alkoholni derivati acikličnih monoterpena imaju veoma prijatan miris i često su prisutni u etarskim uljima. Važniji alkoholni derivati prikazani su na slici 4.



Slika 4. Strukture alkoholnih derivata acikličnih monoterpena

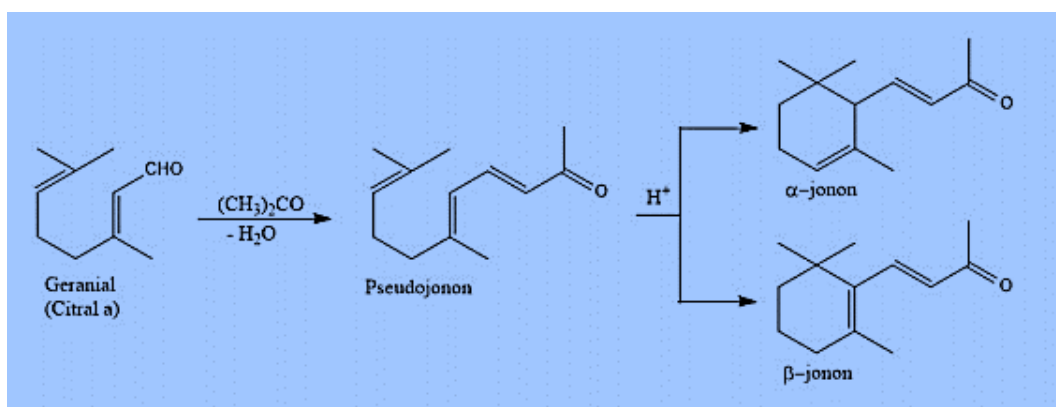
Sa slike se može zapaziti da su geraniol i nerol izomeri, dok je linalool tercijarni alkohol koji ima prijatan miris koji podseća na đurđevak. Citronelol se nalazi u mnogim biljkama i to skoro uvek zajedno sa geraniolom. U ružinom ulju se nalazi kao desnogiri izomer, dok se u geranijumovom ulju nalaze oba izomera. Pored hidroksilnih funkcionalnih grupa, aciklični monoterpeni mogu sadržati i aldehidnu funkcionalnu grupu. Samim tim, geraniolu i nerolu odgovaraju geranial i neral. Njihova

smeša predstavlja citral. Citral se nalazi u mnogim etarskim uljima, međutim dominantan je u etarskim uljima citrus-biljaka. Strukture geraniala i nerala prikazane su na slici 5.



Slika 5. Strukture geraniala i nerala

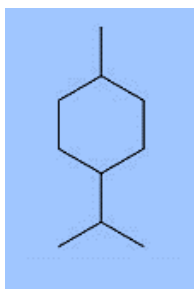
Pored navedenih acikličnih monoterpena koji nastaju prema pomenutom izoprenskom pravilu, postoje i oni čiji biosintetski putevi odstupaju od tog pravila. Tako, iz geraniala i acetona nastaje pseudojonon reakcijom aldolne kondenzacije. Nastali pseudojonon zatim, u kiseloj sredini, daje smešu α - i β -jonona reakcijom ciklizacije. Pomenute reakcije prikazane su na slici 6.



Slika 6. Sintetski putevi nastanka α - i β -jonona

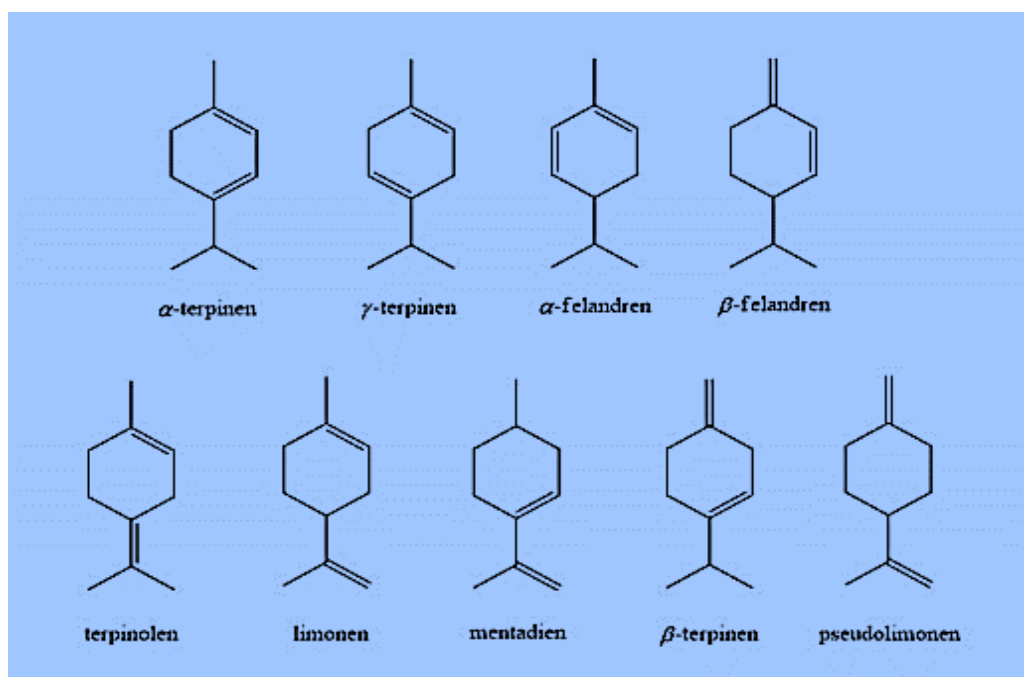
Za razliku od citrala koji poseduje miris limuna, jononi imaju prijatan miris ljubičice i koriste se u proizvodnji sintetičkih mirisa.

Osnovno jedinjenje iz kojeg se mogu izvesti strukture monocikličnih monoterpena jeste *p*-metil-izopropil-cikloheksan, koji je poznat i pod nazivom *p*-mentan. Struktura ovog jedinjenja prikazana je na slici 7.



Slika 7. Struktura *p*-metil-izopropil-cikloheksana

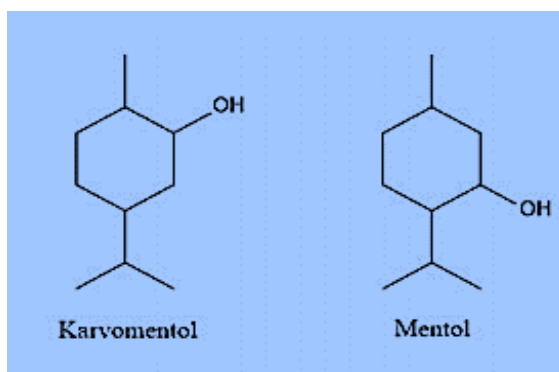
Od *p*-mentana izvodi se šest nezasićenih ugljovodonika koji se nazivaju menteni. Najvažniji predstavnik ove grupe jedinjenja jeste Δ^3 -menten. Nađen je u timijanovom ulju. Pored mentena, iz *p*-mentana izvode se i ugljovodonici sa dve dvostruke veze u strukturi koji se zajedničkim imenom nazivaju mentadieni. Strukture mentadiena prikazane su na slici 8.



Slika 8. Strukture mentadiena

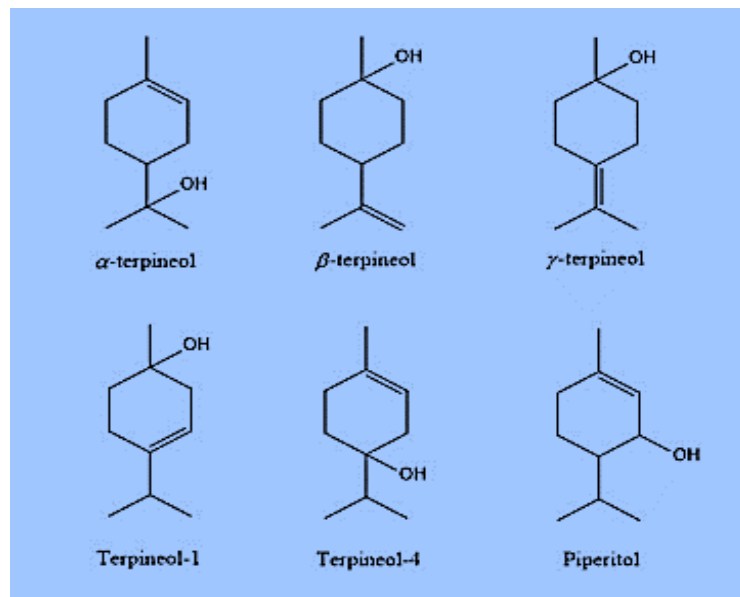
Mnogi mentadieni se nalaze u etarskim uljima u značajnijim količinama. Sva tri izomerna oblika (α -, β - i γ -oblici) nalaze se skoro uvek zajedno u mnogim etarskim uljima, npr. u uljima korijandera, majorana i kardamona. Felandren se nalazi u dva izomerna oblika (slika 8) i svi njegovi enantiomeri su nađeni u prirodi. Limonen je široko rasprostranjen u etarskim uljima kao levogiri, desnogiri i kao racemat. Desnogiri limonen se nalazi u ulju limuna, narandže i kima. Levogiri oblik se nalazi u ulju od omorikinih iglica, dok se racemat nalazi u terpentinskom ulju. Može se dobiti sintezom na više načina, kao i suvom destilacijom kaučuka.

Od zasićenih hidrosilnih derivata *p*-mentena najinteresantniji su karvomentol i mentol. Strukture ovih molekula prikazane su na slici 9.

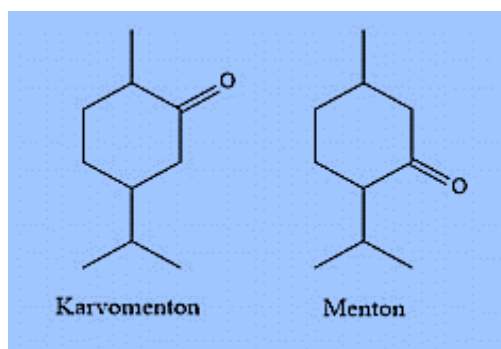


Slika 9. Strukture karvomentola i mentola

Karvomentol se nalazi u prirodi, a može se dobiti i redukcijom karvona. Ima karakterističan miris kima. Mentol se nalazi u ulju nane u slobodnom stanju i u obliku estera. Sintetički se dobija redukcijom timola. U prirodi je uglavnom prisutan (-)-mentol. Od nezasićenih alkohola *p*-mentanove serije značajniji su α -, β - i γ -terpineol, terpineol-1, terpineol-4 i piperitol. Strukture ovih jedinjenja prikazane su na slici 10. Svi navedeni alkoholi imaju prijatan miris koji podseća na miris jorgovana. U prirodi se sreće α -terpineol u slobodnom i u vezanom obliku. Nalazi se u etarskom ulju majorana i u kamforovim uljima.

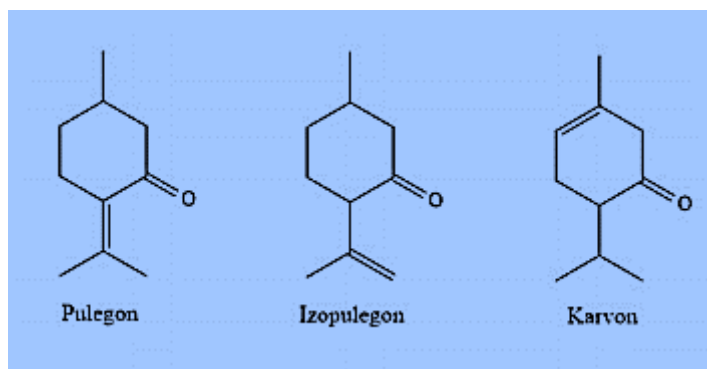
Slika 10. Strukturne formule nezasićenih alkohola *p*-mentanove serije

Zasićeni ketoni, karvomenton i menton, su derivati *p*-mentana. Strukture ova dva ketona prikazane su na slici 11.



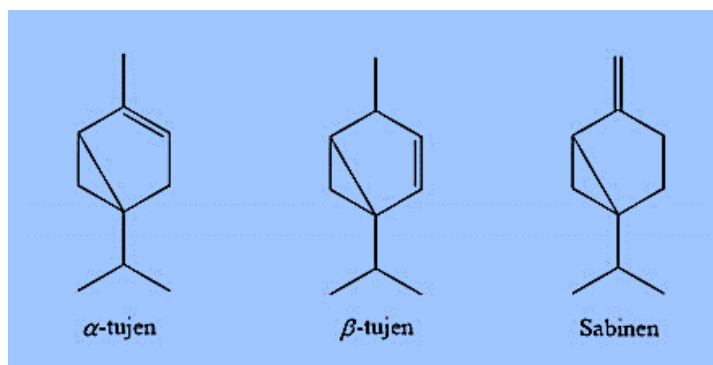
Slika 11. Strukture karvomentona i mentona

Iz grupe nezasićenih monocikličnih ketona značajniji su pulegon, izopulegon i karvon. Strukture ova tri jedinjenja prikazane su na slici 12. Pulegon ima sličan miris kao mentol. Karvon je veoma rasprostranjen u etarskim uljima, a naročito ga ima u kimovom ulju.



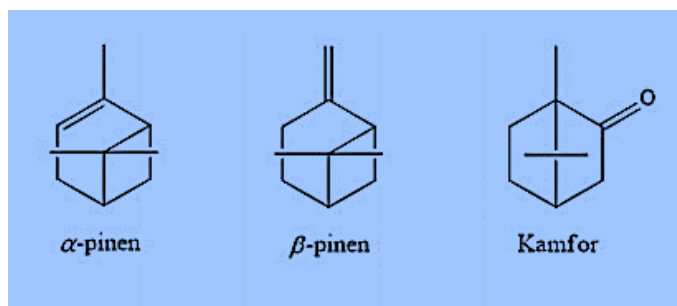
Slika 12. Strukture pulegona, izopulegona i karvona

Gotovo svi biciklični monoterpeni koji se nalaze u prirodi izvode se iz *p*-mentana i smatraju se derivatima tujana, karana, pinana i kamfana. Najvažniji predstavnici bicikličnih monoterpena tujanske strukture su nezasićeni derivati tujana, α - i β -tujen, kao i sabinen. Strukture ova tri molekula prikazane su na slici 13.



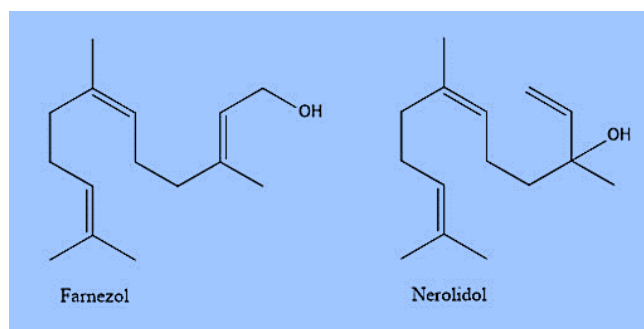
Slika 13. Strukture najvažnijih predstavnika bicikličnih monoterpena tujanske strukture

Od predstavnika monoterpena sa karanskom strukturom najjačajniji je keton karon koji je optički aktivan i miriše na nanu, ali nije pronađen u prirodi. Najvažniji predstavnici monoterpena pinanske strukture su α - i β -pinen. Strukture ova dva molekula prikazane su na slici 14. Najvažniji predstavnik bicikličnih monoterpena sa kamfanskom strukturom jeste kamfor (Slika 14).



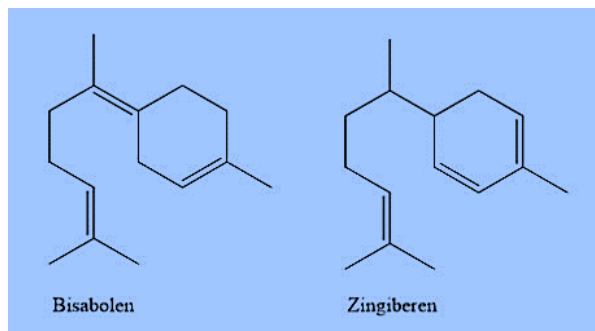
Slika 14. Strukture najvažnijih predstavnika monoterpena pinanske i kamfanske strukture

Seskviterpeni nastaju kuplovanjem tri izoprenske jedinice i mogu se podeliti na aciklične, biciklične i triciklične seskviterpene. Pošto ovi molekuli imaju veće molekulske mase od monoterpena oni će samim tim imati više tačke ključanja od monoterpena i predstavljaju teže frakcije etarskih ulja. Od velikog broja terpena iz ove grupe značajniji su farnezol i nerolidol koji se upotrebljavaju kao mirisne komponente u farmaceutskoj industriji. Strukture ova dva terpena prikazane su na slici 15.



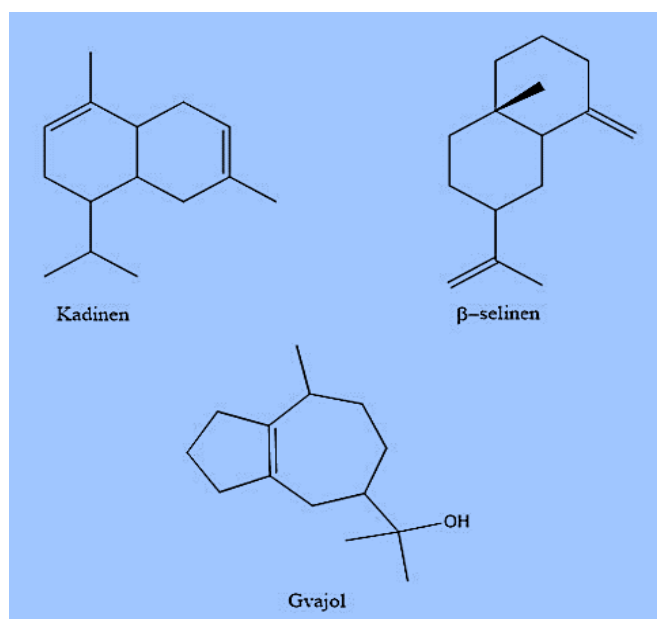
Slika 15. Strukture važnijih acikličnih seskviterpena farnezola i nerolidola

Farnezol se nalazi u mnogim etarskim uljima u manjim količinama. Takođe se javlja kao međuproizvod sinteze seskviterpena. Nerolidol se nalazi u peruanskom balzamu. Najvažniji predstavnici monocikličnih seskviterpena su bisabolen i zingiberen. Bisabolen se može naći u etarskim uljima omorike, kamilice i limuna, dok se zingiberen nalazi u etarskom ulju đumbira. Strukture ova dva monociklična seskviterpena date su na slici 16.



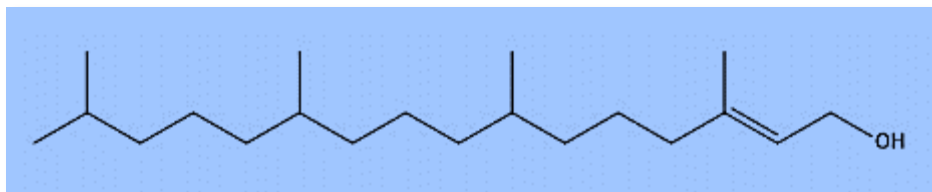
Slika 16. Strukture važnijih monocikličnih seskviterpena bisabolena i zingiberena

Najvažniji predstavnici bicikličnih seskviterpena su kadinen, β -selinen i gvajol. Oni se nalaze u mnogim etarskim uljima. Tako se kadinen može naći u etarskom ulju kleke, a β -selinen u celerovom ulju. Strukture ova tri biciklična seskviterpena prikazane su na slici 17.



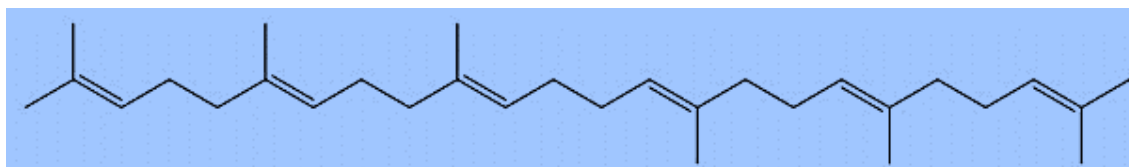
Slika 17. Strukture najvažnijih bicikličnih seskviterpena kadinena, β -selinena i gvajola

Najvažnije jedinjenje koje pripada grupi diterpena je fitol. Ovaj alkohol u svojoj strukturi sadrži jednu dvostruku vezu, a sastoji se iz četiri izoprenske jedinice. Prvi put je dobijen hidrolizom hlorofila, a ulazi u sastav vitamina E i K. Struktura ovog diterpena prikazana je na slici 18.



Slika 18. Struktura fitola

Najvažniji predstavnik triterpena je skvalen koji je aciklični ugljovodonik koji je prvi put izolovan iz jetrenog ulja ajkule. Sastoji se iz šest izoprenskih jedinica i međuproizvod je u procesu biosinteze steroida, a takođe je povezan i sa karotenoidima. Struktura ovog terpena prikazana je na slici 19.



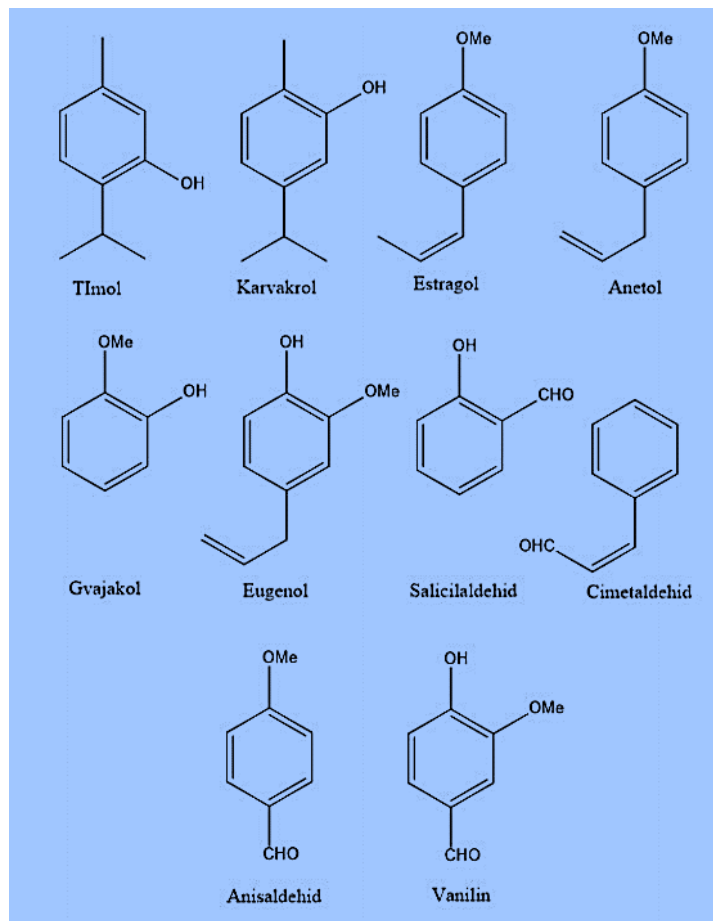
Slika 19. Struktura skvalena

Najvažniji predstavnik politerpena je kaučuk. Dobija se iz lateksa, mlečnog soka kaučukovog drveta. Po sastavu ovaj politerpen je polimer izoprena opšte formule $(C_5H_8)_n$, a molekulska masa mu je oko 300.000. Najvažnija primena ovog polimera je u proizvodnji različitih vrsta guma.

2.1.2.2 Aromatična jedinjenja

Pored terpena, u etarskim uljima su veoma zastupljena i aromatična jedinjenja. Najčešće vrste aromatičnih jedinjenja koje se nalaze u uljima su fenoli, aromatični aldehidi i njihovi derivati. Od fenola najvažniji predstavnici su timol i karvakrol. Oba ova fenola su derivati *p*-cimola. Razlikuju se međusobno po položaju hidroksilne grupe u molekulu. Od etarskih derivata fenola treba spomenuti anetol, koji je glavna komponenta ulja anisa, i estragol koji je izomer anetola. Značajni su i gvajakol, koji se nalazi u smoli gvajaka i eugenol koji se nalazi u ulju karanfilića. Od aldehida značajniji su

salicilaldehid, cimetaldehid, kao i anisaldehid i vanilin. Strukture ovih aromata prikazane su na slici 20.



Slika 20. Strukture aromatičnih jedinjenja i njihovih derivata koji se nalaze u etarskim uljima

2.2 Biljne vrste

2.2.1 Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.)

Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) je biljna vrsta koja pripada porodici *Lamiaceae*. Ovo je jedna od najrasprostranjenijih i najčešće gajenih biljaka širom sveta. Smatra se da je sama biljka poreklom iz Indije, a da su je monasi u XII veku preneli u Evropu. Reč bosiljak je grčkog porekla, a potiče od reči

basilikon, što znači kraljevski. Sa druge strane, latinski naziv biljke potiče od dve reči: **ozein**-mirisati i **basileus**-vladar. Taksonomija bosiljka data je u tabeli 3.

Tabela 2. Taksonomija biljke *Ocimum basilicum* L.

Taksonomija	
<i>Regnum</i> (carstvo)	<i>Plantae</i>
<i>Division</i> (razdeo)	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Classis</i> (klasa)	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Ordo</i> (red)	<i>Lamiales</i>
<i>Familia</i> (porodica)	<i>Lamiaceae</i>
<i>Genus</i> (rod)	<i>Ocimum</i>
<i>Species</i> (vrsta)	<i>Ocimum basilicum</i>

Postoje velike razlike u morfologiji i hemotipu unutar roda *Ocimum*. Ovom rodu pripada više od pedeset biljnih vrsta i žbunova u tropskom i suptropskom regionu Azije, Afrike, Severne i Centralne Amerike, dok se kao glavno mesto raznovrsnosti navodi Afrika (Paton, 1992). Morfološka raznolikost se ogleda u obliku i veličini lista i biljke, kao i u pigmentaciji. Na samu morfologiju, kao i na aromu biljke utiču geografsko područje, klima i način uzgajanja. Taksonomiju biljke dodatno komplikuje postojanje brojnih biljnih vrsta i hemotipova u okviru iste vrste među kojima nema značajne razlike u morfologiji. Prema hemotaksonomskoj klasifikaciji, sorte bosiljka su podeljene u sedam grupa (Darrah, 1980):

- visoki i sitnolisni bosiljak sa slatkom aromom,
- širokolisni, robusni bosiljak (nalik na zelenu salatu) koji se još naziva i „italijanski“ bosiljak,
- patuljasti tip sa malim i kratkim listovima, odnosno „žbunasti“ bosiljak,

- kompaktni tip, opisan kao *Ocimum basilicum* var. *thyrsoflora*, koji se vrlo često naziva „tajlandski“ bosiljak,
- purpurni bosiljak sa tradicionalno slatkastom aromom,
- ljubičasti bosiljak, poznat kao „Dark opal“, mogući hibrid *Ocimum basilicum* i *Ocimum forskolei*, koji miriše na karanfilić, i
- *Citriodorum* tip sa aromom limuna.

Bosiljak je jednogodišnja zeljasta biljka koja cveta od juna do oktobra. Stabljike su visine od 20 do 45 cm, gole i razgranate. Listovi su rombični, jajoliki, na dugim drškama, ravnog ili nazubljenog oboda i zašiljeni na vrhu. Priperci su mnogo manji od listova, zeljasti su i često crvenkasti (slika 21). Cvetovi imaju kratku cvetnu dršku, sitni su, po šest složeni u pršljenove koji su približeni na vrhu stabljika čime obrazuju cvast (slika 21). Čašica je jajastog oblika, dvousnata i zeljasta, dok je krunica crvenkasta ili bela pri čemu je gornja usna široka, tupa i podeljena u četiri režnja, dok je donja uža i ispupčena. Plodovi su jajaste i mrke orašice. Koren se razvija iz primarnog klicinog korenka, dok sa njega dalje nastaju slabiji bočni korenovi. Biljka ima aromatičan i prijatan miris (Jančić, 2004).



Slika 21. Stablo sa listovima (levo) i cvast na vrhu stabljike (desno)

Ima više sinonima za bosiljak, a najčešći su: bažilek, bažulek, baselak, basiljak, basilje, bašelak, bosilak, bosilek, krupan bosiljak, bosilje, bazilek, sarmaš, mirtela, veslođen, mislođen, fosilđen, itd (Tucakov, 1990).

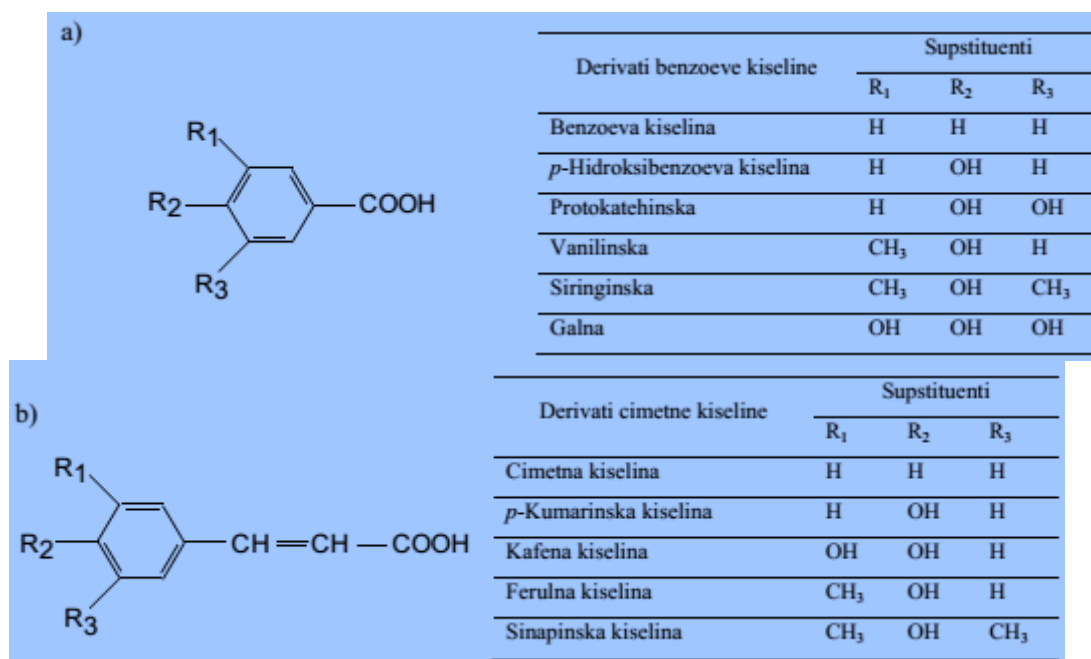
2.2.1.1 Hemijski sastav

Prema hemijskom sastavu bosiljak pripada aromatičnim biljkama čiji se kvalitet ceni prema sadržaju etarskog ulja kojeg ima u opsegu od 0,5 do 0,8% (Tucakov, 1990). Etarsko ulje bosiljka sadrži oko trideset karakterističnih komponenata među kojima su terpeni (monoterpeni, seskviterpeni i njihovi oksidovani oblici) i fenolna jedinjenja. Dominantna jedinjenja etarskog ulja su metil-kavikol (estragol), linalool, eugenol, metil-eugenol, kao i metil-cinamat. Sadržaj navedenih jedinjenja, kao i kompletan hemijski profil etarskog ulja zavisi od podneblja na kojem je uzgajana biljka. Na osnovu analiza etarskih ulja bosiljka, utvrđeno je da postoje četiri hemotipa etarskih ulja: metil-kavikolski, linaloolski, metil-eugenolski i metil-cinamatni, kao i brojni podtipovi.

Ovi hemotipovi su poznati i kao egipatski, francuski, evropski ili reunion prema svom geografskom poreklu (Lawrence, 1988). Utvrđeno je da evropski hemotip poseduje najkvalitetniju aromu, dok su glavne komponente ulja linalool i metil-kavikol. Manje zastupljena jedinjenja su sledeća: 1,8-cineol, α -pinen, β -pinen, mircen, terpinolen, kamfor, terpinen-4-ol, α -terpineol, eugenol, kao i različiti sekviterpeni (Guenther, 1949; Simon i sar., 1990). Egipatski bosiljak ima sastav sličan evropskom, sa tim što sadrži više metil-kavikola (Fleisher, 1981). Sa druge strane, bosiljak sa Komoro ostrva sadrži veliku količinu metil-kavikola, dok su sadržaji 1,8-cineola, borneola, kamfora i eugenola znatno manji. Linalool je prisutan u izuzetno maloj količini ili ga nema uopšte, dok sam bosiljak krasi oštrij začinski miris (Lawrence i sar., 1972; Simon i sar., 1984). Bosiljak iz Pakistana, Gvatemale, Bugarske i Indije sadrži metil-cinamat u velikim količinama, dok bosiljak iz Rusije, Jave i Severne Afrike sadrži eugenol kao glavnu komponentu (Marotti i sar., 1996).

Pored terpena, u bosiljku se nalaze i fenolna jedinjenja koja predstavljaju široko rasprostranjenu grupu heterogenih jedinjenja. Strukturno posmatrano, ova jedinjenja sadrže jedan ili više aromatičnih prstenova, sa ili bez hetero atomom, i sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Mogu se podeliti u nekoliko grupa: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, kumarini i tanini (Liu, 2004). Većina ovih jedinjenja se nalazi u vezanim oblicima, najčešće su kondenzovani sa šećernim grupama, što im povećava rastvorljivost u vodi. Slobodni oblici (aglikoni) su nosioci biološke aktivnosti.

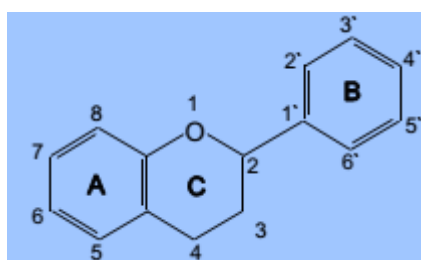
U grupu fenolnih kiselina spadaju hidroksi-derivati (slika 22), kao i drugi derivati benzoeve (C6-C1) i cimetine (C6-C3) kiseline (Rice-Evans i Packer, 2003). Ova jedinjenja su poznata kao antioksidansi, odnosno reaguju sa radikalskim vrstama pri čemu ih neutrališu. Antioksidativna aktivnost raste sa brojem hidroksilnih grupa u molekulu, a na aktivnost takođe utiče i položaj hidroksilne grupe u benzenovom prstenu. Tako dihidroksilni derivati imaju veću aktivnost od monohidroksilnih derivata, dok monohidroksilni derivati sa OH-grupom u *orto* položaju imaju manju aktivnost od onih sa OH-grupom u *meta* položaju.



Slika 22. Fenolne kiseline: a) derivati benzoeve kiseline i b) derivati cimetine kiseline

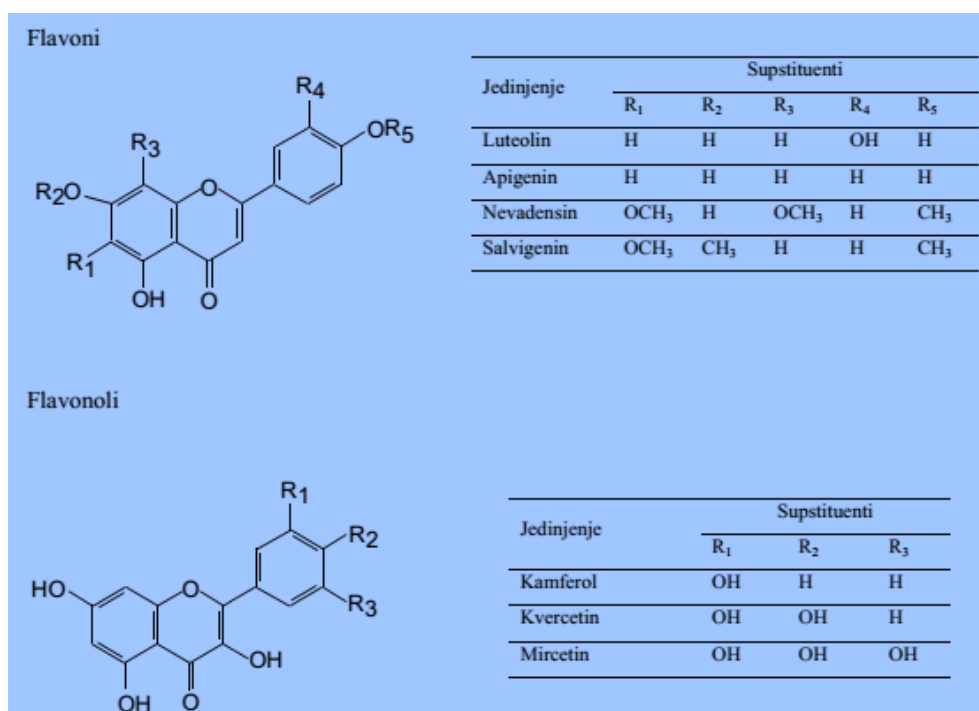
Istraživanja su pokazala da su najčešće prisutne fenolne kiseline u bosiljku cimetna, kafena, vanilinska, hidroksi-benzoeva, ferulna, sinapinska, kaftarinska, cikori i ruzmarinska kiselina, dok je najzastupljenija bila ruzmarinska kiselina (Jayasinghe i sar., 2003; Lee i Scagel, 2009).

Flavonoidi predstavljaju najveću grupu fenolnih jedinjenja (Harborne i sar., 1999). Osnovni strukturni skelet jeste C₆-C₃-C₆, odnosno kondenzovani benzopiranski sistem (prstenovi A i C) koji je kuplovan sa fenil-grupom (B-prsten). Ovaj sistem prikazan je na slici 23.



Slika 23. Osnovni skelet flavonoida

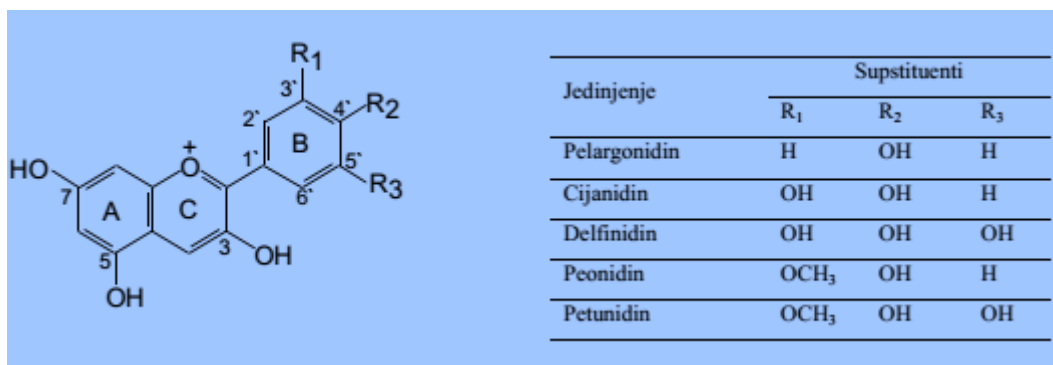
Dalja podela flavonoida se zasniva na položaju supstituenata u samom skeletu, kao i položaju fenil-grupe (B-prstena) u molekulu flavonoida. Tako postoje flavoni, flavonoli, dihidroflavoni, katehini, flavani, antocijanidini, izoflavonoidi i neoflavonoidi. Pored ovih slučajeva, javljaju se i strukture sa otvorenom formom (halkoni i dihidrohalkoni) ili je šestočlani prsten zamenjen petočlanim (auroni). Treba naglasiti da se u prirodi najčešće javljaju jedinjenja sa hidroksilnim grupama u B-3' i B-4' položajima, kao i ona sa jednom hidroksilnom grupom u B-4' položaju. Većina flavonoida se u prirodi nalazi u vezanom obliku (glikozidi), dok su najbrojniji flavonoidi flavoni i flavonoli (slika 24).



Slika 24. Strukturni prikazi flavona i flavonola

Flavoni i flavonoli koji su izolovani iz bosiljka prikazani su na slici 24. Istraživanja su pokazala da su najdominantniji flavonoli kvercetin-3-*O*-rutinozid i kvercetin-3-*O*-glukozid, dok su flavoni vicenin-2, luteolin-5-*O*-glukozid, luteolin-7-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukozid i kamferol-3-*O*-malonilglukozid (Grayer i sar., 2002).

Antocijani su glikozidi antocijanidina koji su odgovorni za boju povrća. Osnovna strukturna jedinica antocijanidina je 2-fenil-penzopirijum katjon (slika 25).



Slika 25. Osnovna struktura antocijanidina

Zajedničko za sve antocijanidine jeste da imaju hidroksilnu grupu u C-3 položaju, dok su ostali supstituenti nalaze u A-5, A-7, B-3', B-4' i B-5' položajima. Varijeteti bosiljka („Dark Opal“ i *Ocimum basilicum* var. *purpurescens*) sa svojim purpurnim pigmentima predstavljaju značajan izvor antocijana (Simon i sar., 1990).

Pored navedenih klasa jedinjenja, bosiljak sadrži i vitamine B serije, vitamin A, vitamin C, mineralne materije, itd. Sadržaj ovih materija dat je u tabeli 3.

Tabela 3. Sadržaj nutritivnih materija u 100 g svežeg bosiljka

Nutritivni elementi	Sadržaj
Masti	0,64 g
Proteini	3,15 g
Voda	92,06 g
Vitamin A	264,00 µg
β-karoten	3,14 mg
Vitamin B1	34,00 µg
Vitamin B2	76,00 µg
Vitamin B3	902,00 µg

Vitamin B5	209,00 µg
Vitamin B6	155,00 µg
Vitamin B9	68,00 µg
Vitamin C	18,00 mg
Vitamin E	800,00 µg
Vitamin K	414,80 µg
Ca	177,00 mg
Fe	3,17 mg
Mg	64,00 mg
P	56,00 mg
K	295,00 mg
Na	4,00 mg
Zn	0,81 mg

2.2.1.2 Upotreba i delovanje

Lekovitost bosiljka i njegova primena u te svrhe poznata je ljudskom rodu nekoliko hiljada godina. Najčešća upotreba ove biljke jeste kao začin koji jelima daje karakterističan miris i ukus. Pokazao se kao odlična zamena za so, pa samom tim utiče i na snižavanje krvnog pritiska (Filip, 2014).

Pored primene u ishrani bosiljak se koristi i u narodnoj medicini. U obliku čajeva se koristi za tretman upala želuca i creva, kod kašlja, početnih stanja tuberkuloze i kod bolesti mokraćnih organa, gde pojačava mokrenje čime pokazuje svoje uroantiseptično dejstvo. Primena čaja od bosiljka pokazala je pozitivan uticaj na pojavu tromba, odnosno ispoljava antitrombocitno dejstvo. Iz tog razloga se čaj primenjuje u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja (Filip, 2014).

Etarsko ulje ove biljke se koristi u aromaterapiji, gde svojim aromatičnim mirisom pozitivno deluje na nervni sistem, smiruje nervnu napetost, migrene, poboljšava pamćenje, otklanja mentalni umor i nesanicu. Etarsko ulje takođe ima i antiseptično, uroantiseptično, antimikrobno, antivirusno i antiinflamatorno dejstvo. Takođe se koristi za aromatizaciju farmaceutskih proizvoda, a u parfimeriji za izradu parfema i kozmetičkih proizvoda. Pokazalo se i kao odlično sredstvo protiv akni (Nguefack i sar., 2004; Nebedum i sar., 2009; Sánchez i sar., 2010). Pored navedenih delovanja, etarsko ulje i sama biljka ispoljavaju insekticidno (Keita i sar., 2000; Umerie i sar., 1998) i fungicidno delovanje (Rai i sar., 1999), a pokazali su se kao dobar repelent od komaraca (Erlor i sar., 2006).

Etarsko ulje i ekstrakti bosiljka pokazuju i antioksidativno delovanje. Jedan od antioksidanata jeste β -karoten koji se u organizmu pretvara u vitamin A, sprečava oksidaciju holesterola i na taj način štiti srce i krvne sudove (Kelm i sar., 2000; Leal i sar., 2008; Leal i sar., 2006; Pripdeevch i sar., 2010; Yun i sar., 2003). Neki varijeteti bosiljka pokazuju snažno protivupalno delovanje kod artritisa. Unošenje koncentrovanog ekstrakta bosiljka smanjuje oticanje zglobova. Pokazalo se da se hipoglikemijsko i hipolipidemijsko delovanje bosiljka odvija putem inhibicije β -glukozidaze. Etarsko ulje bosiljka sa visokim sadržajem eugenola inhibira agregaciju krvnih pločica, odnosno ispoljava antikoagulativno dejstvo (Tognolini i sar., 2006; Volpato i sar., 2002; Wongsu i sar., 2012; Zeggwagh i sar., 2007).

2.2.2 Rtanjski čaj (*Satureja montana* L.)

Satureja montana pripada porodici *Lamiaceae* koja broji oko 3000 vrsta grupisanih u 200 rodova. Najveći broj biljnih vrsta ove porodice naseljava Mediteransku oblast i Centralnu Aziju (Jančić, 2013), od čega je 30 rodova sa oko 147 vrsta zastupljeno u flori Srbije. Pripadnici porodice *Lamiaceae* su jednogodišnje ili višegodišnje biljke koje su uglavnom zeljaste ili polužbunaste. Poprečni presek stabla je četvorougao, listovi su naspramni i dekusirani i u najvećem broju slučajeva pokriveni žlezdanim dlakama u kojima su smeštena etarska ulja. Lisna drška je dobro razvijena, dok je obod liski ceo, testerast, grub ili samo delimično nazubljen. Čašica i krunica se sastoje od 5 listova koji su međusobno srasli, dok je krunica dvousnata pri čemu se gornja usna sastoji iz dve, a donja iz tri laticice. Plod je merikarpijum koji se prilikom sazrevanja raspada na četiri plodića orašice (Igić i Vukov, 2000). Predstavnici porodice *Lamiaceae* naseljavaju uglavnom svetla, sunčana i otvorena staništa (livade, pašnjaci, kamenjari), a javljaju se i u šumskim ekosistemima. Najznačajniji su aromatični predstavnici koji imaju primenu u industriji parfema, medicini, farmaciji i ishrani. Tako biljke poput

nane, žalfije, origana, majčine dušice, rtanjskog čaja i mnogih drugih spadaju u grupu najpoznatijih i najefikasnije gajenih lekovitih biljaka, dok većina spada i u kategoriju medonosnih biljaka (Igić i Vukov, 2000; Jančić, 2013).

Rod *Satureja* obuhvata preko 30 vrsta koje su rasprostranjene u regionu južne i jugoistočne Evrope, Male Azije i severne Afrike. U Evropi je zabeleženo 12 vrsta pripadnika ovog roda koje pretežno naseljavaju kamenite sunčane regione (Šilić, 1979). Samo ime roda potiče od „saturare“, što znali nahraniti, zasititi, pri čemu je sam naziv povezan sa upotrebom ovih biljaka u ishrani. Biljke ovog roda poznate su po svojim aromatičnim i lekovitim svojstvima. Ranija istraživanja su pokazala da su biljke, odnosno njihova etarska ulja bogata jedinjenjima kao što su karvakrol, timol, γ -terpinen i *p*-cimen. Ovim jedinjenjima se pripisuje aktivnost samih biljaka protiv humanih i biljnih patogena u namirnicama. Poznato je da se etarska ulja, odnosno sekundarni metaboliti sa antimikrobnim delovanjem proizvode kao deo procesa normalnog rasta i razvoja biljaka ili kao odgovor na prisustvo patogena i/ili stresa. Na sam hemijski sastav etarskog ulja utiču egzogeni faktori kao što su geografski položaj, nadmorska visina, klina, sastav zemljišta i mnogi drugi. Pored egzogenih, tu su i endogeni faktori koji takođe imaju uticaj.

Kao što je već napomenuto, rtanjski čaj (*Satureja montana* L.) pripada *Lamiaceae* familiji, i rodu *Satureja*. Biljka je prikazana na slici 26, dok je taksonomija same biljke data je u tabeli 4.



Slika 26. Rtanjski čaj (*Satureja montana* L.)

Rtanjski čaj je razgranata biljka (polužbun) sa snažnim vretenastim korenom. Grane su visine do 50 cm, izuzetno odrvenele u donjem delu, a na preseku skoro okrugle. Listovi su uzani do linearno lancetasti, naspramni, kožasti i sjajni bez jasno izdvojene drške i prijatnog mirisa.

Tabela 4. Taksonomija biljke *Satureja montana* L.

Taksonomija	
<i>Regnum</i> (carstvo)	<i>Plantae</i>
<i>Division</i> (razdeo)	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Classis</i> (klasa)	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Ordo</i> (red)	<i>Lamiales</i>
<i>Familia</i> (porodica)	<i>Lamiaceae</i>
<i>Genus</i> (rod)	<i>Satureja</i>
<i>Species</i> (vrsta)	<i>Satureja montana</i>

Sami cvetovi su dugi 7-11 mm sa drškom. U cvasti je složeno 3-5 cvetova, sakupljene u dihazijume koji se nalaze u pazuhu listova i zajedno čine dugačke metlice. Čašica je uzdužno levkasta ili zvonasta, skoro gola i dlakava. Krunica je bela, ružičasta ili ljubičasta i vidno nadvisuje čašicu. Gornja usna krunice je zaobljena, ravna, dok je donja nešto duža, trorežnjevita, purpurno istačkana. Plod je orašica svetlo mrke boje. Biljka je pokrivena veoma kratkim dlakama i žlezdama koje su ispunjene etarskim uljem, što je čini jako aromatičnom. Cvetanje se odvija u periodu od jula do oktobra (Jančić, 2013; Stanić i sar., 2004).

Rtanjski čaj potiče iz Evrope i severne Afrike, a raste na krečnjačkim kamenjarima i pašnjacima Mediteranskog i submediteranskog tipa. Nastanjuje suva, osunčana staništa, dobro podnosi sušu i siromašno zemljište. Sama biljka zahteva malu do umerenu količinu vode. Gaji se i u baštama kao kulinarska biljka. U našoj zemlji je rasprostranjena u Koprivniku (Peć), okolini Niša i Pirota, na Ozrenu, Rtnju, Jelačnici, u okolini Belog Rzava, a ima je i u Hercegovini, Crnoj Gori, kao i na Jadranskom primorju. Kao droga se koriste list i vršni deo biljke u cvetu.

2.2.2.1 Hemijski sastav

Rtanjski čaj sadrži mnoga biološki aktivna jedinjenja koja pripadaju različitim klasama jedinjenja među kojima su terpeni, flavonoidi, fenolne kiseline, minerali, i druga. Najviše su istraživana etarska ulja gde je utvrđeno da postoji izuzetna varijabilnost u pogledu sastava. Kao razlog ove varijabilnosti navode se faza razvoja (faza ontogenetskog razvoja), geografsko stanište, način branja, temperatura, dostupnost vode i nutrijenata, atmosferski uslovi, napadi patogeni i herbivora (Andrade i sar., 2013; Bakkali i sar., 2008; Bežić i sar., 2005; Kustrak i sar., 1996).

Kada je u pitanju sadržaj etarskih ulja roda *Satureja*, utvrđeno je da postoje dva hemotipa gde u jednom dominiraju fenoli, a u drugom terpeni alkoholi. Ova dva hemotipa se dalje mogu podeliti na podtipove: karvakrol- i timol-tip (fenolni tip), monoterpen-ugljovodonični, monoterpen-alkoholni i monoterpen-ketonski tipovi (Serrano i sar., 2011). Etarsko ulje rtanjskog čaja pripada grupi fenolnog tipa gde dominiraju karvakrol i timol. Pored ova dva terpena prisutni su i *p*-cimen i γ -terpinen, a osim ovih komponenti detektovani su i borneol, linalool, β -kariofilen i kariofilen-oksid, α -tujen, α -terpinen, γ - i α -pinen, mircen i timokinon (Grosso i sar., 2009; Mastelić i Jerković, 2003; Mihajilov-Krstev, 2009; Radonic i Milos, 2003; Skočibušić i Bežić, 2004). Ukupan sadržaj etarskih ulja u ovoj biljnoj vrsti kreće se u opsegu od 0,9 do 2,2% (Bežić i sar., 2005; Mihajilov-Krstev, 2009; Skočibušić i Bežić, 2004).

Pored navedenih hidrofobnih komponenti, istraživanja su pokazala i prisustvo različitih hidrofilnih komponenti. Tako je u vodeno-alkoholnim ekstraktima otkriveno prisustvo kafene, siringinske, ruzmarinske, galne, ferulne, cinaminske i vanilinske kiseline, kao i kvercetina, luteolina i rutina (Abd El Tawab i sar., 2014). U ekstraktima neisparljivih frakcija nakon hidrodestilacije i ekstrakcije superkritičnim ugljen-dioksidom detektovano je prisustvo galne, kafene, siringinske, gentizinske, ferulne, hlorogenske, kumarinske i vanilinske kiseline, kao i epikatehina i katehina (Silva i sar., 2009). Takođe, istraživanja su pokazala i prisustvo glikozida luteolina i apigenina, urosolne kiseline (Stanić i sar., 2004), kao i kalcijuma i magnezijuma (Dunkić i sar., 2012). Sadržaj ukupnih fenola se kreće od 4,43 do 12,41%, tanina 0,08-4,90%, a ukupnih flavonoida 0,06-0,40%, pri čemu stabljika sadrži najmanje, a listovi i cvetovi više ovih komponenti (Dunkić i sar., 2012).

2.2.2.2 Upotreba i delovanje

Poznato je da se rtanjski čaj od davnina koristi u narodnoj medicini za tretman čitavog niza bolesti. Koristi se kao sredstvo za čišćenje krvi, za izlučivanje mokraćne, za lečenje bubrežnih i mokraćnih kamenaca, za tretman reume i gihta, za dijabetes, ublažava bolove u gastro-intestinalnom sistemu, kao i za tretman upala kože i sluzokože (Vitas i sar., 2011). Listovi i herba biljke se koriste u

svežem ili osušenom obliku kao začin u jelima sa mesom, kobasicama i povrćem. Pored navedenih načina upotrebe, ova biljka se koristi u narodnoj medicini i za lečenje nadutosti, grčeva, glista, nedostatka apetita, infekcija, bolesti pluća, crevnih parazita i za izlučivanje vode iz organizma. List, cvet i stabljika se koriste za pripremu čajeva koji se dalje upotrebljavaju u narodnoj medicini i homeopatiji (Ćetković i sar., 2007).

Pokazalo se da etarsko ulje ove biljke ima izraženo antibakterijsko i antivirusno dejstvo. Dokazano je antibakterijsko dejstvo prema različitim sojevima bakterija kao što su *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa*. Takođe, pokazalo se da Gram-pozitivne bakterije ispoljavaju veću osetljivost na etarsko ulje ove biljke (Bežić i sar., 2005; Ćavar i sar., 2008; Mihajilov-Krstev i sar., 2014; Oussalah i sar., 2007; Serrano i sar., 2011; Silva i sar., 2009; Skočibušić and Bezić, 2004). Istraživanja su utvrdila da ekstrakti ove biljke ispoljavaju inhibitornu aktivnost na acetilholinesterazu i butirilholinesterazu, enzime koji se smatraju odgovornim za nastanak Alchajmerove bolesti (Silva i sar., 2009).

In vivo studije su pokazale diuretsko dejstvo etarskog ulja i ekstrakata rtanjskog čaja. Takođe, dokazano je i antiproliferativno dejstvo na humane eritroleukemijske K562 ćelije (Lampronti i sar., 2006), kao i na HeLa (karcinom cerviksa), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke) ćelijske linije (Četojević-Simin i sar., 2004). Antifungalno dejstvo dokazano je na osam sojeva različitih gljiva i dva fitopatogena. Najveća antifungalna aktivnost etarskog ulja je ustanovljena prema *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Pyricularia oryzae* (zona inhibicije > 70%) (Entela Haloc i sar., 2014).

2.2.3 Korijander (*Coriandrum sativum* L.)

Korijander pripada familiji *Apiaceae* (tabela 5) i uglavnom se kultiviše iz semena tokom cele godine. Korijander je jednogodišnja biljka koja se u zavisnosti od klimatskih uslova uzgaja kao letnji ili zimski godišnji rod (Eikani i sar., 2007; Grosso i sar., 2008; Pavlić i sar., 2015).

Tabela 5. Taksonomija biljke *Coriandrum sativum*

Taksonomija

<i>Regnum</i> (carstvo)	<i>Plantae</i>
<i>Division</i> (razdeo)	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Classis</i> (klasa)	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Ordo</i> (red)	<i>Apiales</i>
<i>Familia</i> (porodica)	<i>Apiaceae</i>
<i>Genus</i> (rod)	<i>Coriandrum</i>
<i>Species</i> (vrsta)	<i>Coriandrum sativum</i>

Korijander liči na peršun zbog čega dolazi do zabune pri prepoznavanju. Međutim, za razliku od peršuna, korijander ima jak i prepoznatljiv miris. Najbolje uspeva u suvim klimama, a može rasti na različitim tipovima zemljišta (Jančić, 2013). Koren biljke je vretenast, stablo je uspravno, golo, fino, rebrasto sa šupljim internodijama, visoko 20-50 cm. Listovi su naizmenično raspoređeni i prosti. Donji listovi su jednostruko ili dvostruko perasto deljeni, a režnjevi su klinasti. Gornji listovi su takođe duboko deljeni, a režnjevi su gotovo končasti (Coşkuner i Karababa, 2007).

Cvetovi su dvopolni ili samo muški, sakupljeni u dvostruke štitove, sa 3-7 zrakova. Involukruma najčešće nema, a involuceum je izgrađen od 3 linearna lista. Čašica je petozuba, listići krunice specifičnog oblika bele ili crvene boje (slika 27).



Slika 27. Korijander (*Coriandrum sativum*)

Plodovi su globularni ili jajasti prečnika do 6 mm. Obično se šizokarpijum (cepajući plod) ne deli spontano na dva merikarpijuma (orašice). Dva merikarpijuma imaju očvršli perikarp (zid ploda) u konveksnoj spoljašnjosti, dok je perikarp u konkavnoj unutrašnjosti tankoslojan. U središtu šupljeg ploda vidljiv je mali karpofor. Svaki merikarpijum ima šest uzdužnih, uspravnih bočnih rebara na konveksnoj spoljašnjosti. Na konveksnoj unutrašnjosti postoje dve uzastopne cevčice sa etarskim uljem kod zrelih plodova (Coşkuner i Karababa, 2007).

Sama biljka je poreklom iz južne Evrope i Srednjeg Istoka, ali je odomaćena širom sveta. Kultivisana je pre više hiljada godina u Indiji, Egiptu i Kini. Jedna je od najstarijih začinskih biljaka koja se primenjuje u kulinarstvu. Ime biljke potiče od reči *korianon*, što znači stenica, i odnosi se na neprijatan miris listova i nezrelog semena. Tokom srednjeg veka i renesanse široko je korišćen u medicini, kulinarstvu i za spravljanje ljubavnih napitaka. Španski konkvistadori su ovu biljku preneli u Peru i Meksiko gde je postao obavezni pratilac čilija, a naseljenici su ga kasnije uneli i u Severnu Ameriku. Raste kao korov po njivama, ima ga i samoniklog. Radi dobijanja droge ili za proizvodnju začina korijander se seje u martu ili aprilu, a kosi se u leto pre izlaska sunca dok još ima rose. Korijander bolje uspeva na krečnoj, sitnoj, rastresitoj i toploj zemlji na sunčanoj strani.

Kao droga se koristi zreo i osušen plod gajenog korijandera (*Coriandri fructus*). Štitovi se odsecaju kada je plod skoro zreo, suše prirodno ili u termičkim sušarama na temperaturi od 40°C. Plod je loptast šizokarpijum koji se pod pritiskom razdvaja na dva merikarpa. Tvrd je i iznutra je šupalj, dok je po površini rebrast (deset vijugavih, slabo istaknutih glavnih i isto toliko jače istaknutih ravnih i sporednih rebara) i tamno-žute boje. Slatkog je ukusa i specifičnog aromatičnog mirisa. Zeleni ili loše osušeni plodovi korijandera imaju neprijatan miris na stenice (Coşkuner i Karababa, 2007).

Na osnovu veličine ploda razlikuju se dva varijeteta biljke, a shodno tome i dve vrste droge:

- Krupnozrni, indijski korijander (*Coriandrum sativum* var. *vulgare*) sa veličinom ploda 3-5 mm,
- Sitnozrni ruski korijander (*Coriandrum sativum* var. *microcarpum*) sa veličinom ploda 1,5-3,0 mm.

Sitnozrni korijander sadrži do 1,5% etarskog ulja i smatra se kvalitetnijom drogom. Etarsko ulje se nalazi u kanalima koji postoje unutar cele zelene biljke počevši od korena. Prilikom sazrevanja

aldehidne komponente nestaju, dok je linalool prisutan samo u cevčicama ploda. Pri potpunoj zrelosti biljke samo ove cevčice sadrže etarsko ulje, dok se dodatni kanali u mezokarpijumu spljoštavaju i nestaju tokom sazrevanja.

2.2.3.1 Hemijski sastav

Ispitivanje korijandera pokazalo je prisustvo 43 različita jedinjenja među kojima je 21 fenolno jedinjenje. Tu su uglavnom flavonoidi, kumarini i fenilkarbonske kiseline. Elementarna i analiza aminokiselina ukazale su na prisustvo kalijuma, natrijuma, kalcijuma i fosfora u velikim količinama, dok su dominantne aminokiseline glutamin, asparagin i arginin (Oganessian i sar., 2007). U tabeli 6 prikazan je sadržaj slobodnih aminokiselina.

Tabela 6. Sadržaj pojedinih aminokiselina

Aminokiselina	Sadržaj (%)
Asparagin	0,190
Treonin	0,027
Serin	0,080
Glutamin	0,400
Glicin	0,030
Alanin	0,041
Valin	0,070
Metionin	0,034
Izoleucin	0,060
Leucin	0,011

Tirozin	0,080
Fenilalanin	0081
Histidin	0,036
Lizin	0,030
Arginin	0,052
Ukupno	1,211

List korijandera je bogat vitaminima i gvoždem. Sadrži visok nivo vitamina A i C. Sa druge strane, sadržaj zasićenih masnih kiselina i holesterola je veoma mali. Takođe, korijander sadrži dijetalna vlakna i veliku količinu vode (84%). U tabeli 6 dat je nutritivni sastav lista i semena korijandera prema Ministarstvu poljoprivrede SAD (USDA).

Tabela 7. Nutritivni sastav lista i semena korijandera (na 100 g) prema USDA (National Nutrient Database for Standard Reference Release 28)

Nutrijent	List	Seme
Voda	7,3 g	8,86 g
Energija	279 kcal	298 kcal
Proteini	21,93 g	12,73 g
Ugljeni hidrati	52,1 g	54,99 g
Ukupni lipidi	4,78	17,77 g
Vlakna	10,40 g	41,90 g
Kalcijum	1246 mg	709 mg
Gvožđe	42,46 mg	16,32 mg

Magnezijum	694 mg	330 mg
Fosfor	481 mg	409 mg
Kalijum	466 mg	1267 mg
Natrijum	211 mg	35 mg
Cink	4,72 mg	4,70 mg
Vitamin C	566,7 mg	21,0 mg
Tiamin	1,252 mg	0,239 mg
Riboflavin	1,500 mg	0,290 mg
Niacin	10,707 mg	2,130 mg
Vitamin B12	ND	ND
Vitamin D	ND	ND
Zasićene masne kiseline	0,115 g	0,990 g
Mononezasićene masne kiseline	2,232 g	13,580 g
Polinezasićene masne kiseline	0,328 g	1,750 g
Holesterol	ND	ND

Sadržaj etarskog ulja u odnosu na masu zrelih i osušenih plodova korijandera varira između 0,03 i 2,6%, a sadržaj masnog ulja između 9,9 i 27,7%. U tabeli 8 prikazan je sastav etarskog ulja korijandera (Pavlič i sar., 2015).

Tabela 8. Hemijski profil etarskog ulja korijandera

Glavne	Relativni sadržaj	Manje zastupljene komponente (<
--------	-------------------	---------------------------------

komponente	(%)	2%)
Linalool	67,7	β -pinen
α -pinen	10,5	Kamfen
γ -terpinen	9,0	Mircen
Geranil acetat	4,0	Limonen
Kamfor	3,0	p -cimol
Geraniol	1,9	Dipenten
		α -terpinen
		n -decilaldehid
		Borneol
		Estri sirćetne kiseline

Masno ulje se dobija presovanjem ili ekstrakcijom nakon izdvajanja etarskog ulja. Glavna komponenta masnog ulja je petroselinska kiselina (68,8%) koja je izomer oleinske kiseline. U umerenoj klimatskoj zoni korijader je biljka sa najvećim potencijalom za proizvodnju petroselinske kiseline. Pored petroselinske kiseline prisutne su i linolna kiselina (16,6%), oleinska kiselina (7,5%) i palmitinska kiselina (3,8%). Manje zastupljene komponente masnog ulja korijandera (< 2%) su stearinska i miristinska kiselina.

2.2.3.2 Upotreba i delovanje

Korijander se, u zavisnosti od dela biljke, koristi na različite načine. Tradicionalna upotreba biljke, koja je zasnovana na primarnim proizvodima, npr. listovima i plodovima, je dvojaka (medicinska i kulinarska). Etarska i masna ulja plodova se koriste u industriji odvojeno ili kombinovano. Funkcionalne karakteristike korijandera su raznolike. Pored nutritivnih, poznat je i po svom medicinskom delovanju, ali i po dodatnim upotrebama (kao animikrobni agens).

U mnogim zemljama i kulturama korijander ima dugu istoriju upotrebe za lečenje organa za varenje, pa tako i u našoj narodnoj medicini. Uglavnom se preporučuje kod stomačnih tegoba i za stimulisanje lučenja digestivnih enzima. Istraživanja su potvrdila da ekstrakt plodova korijandera otklanja abdominalni spazam i dijareju, verovatno preko holinergičkih receptora, antagonista kalcijuma i kombinacijom oba mehanizma.

U iranskoj narodnoj medicini korijander se preporučuje kod insomnije. Navodi se i upotreba kao sedativnog sredstva. Naime, vodeni ekstrakti semena korijandera smanjuju lokomotornu aktivnost i neuromišićnu koordinaciju. U indijskoj i marokanskoj narodnoj medicini korijander se koristi u lečenju bolesti urinarnog sistema. To je verovatno povezano sa spazmolitičkim, diuretičkim i antibakterijskim delovanjima ove biljke. Vodeni ekstrakti korijandera povećavaju diurezu, ekskreciju elektrolita i glomerularnu filtraciju.

Svi delovi biljke su jestivi, ali se u kulinarstvu koriste sveži i zreli plodovi. Listovi i plodovi korijandera imaju u potpunosti drugačije arome i koriste se na različite načine u pripremi hrane. Nakon izolovanja etarskog ulja, ostaci se mogu koristiti za ishranu životinja jer sadrže masti i proteine. Međutim, zbog visokog sadržaja nesvarljivih vlakana mogu se koristiti samo za ishranu preživara.

Najvažniji funkcionalni aspekt korijandera uključuje njegovu antioksidativnu aktivnost. Korijander je dobar izvor polifenolnih jedinjenja i drugih fitojedinjenja koji mogu biti odgovorni za njegovo antioksidativno delovanje. Ova sposobnost korijandera se pripisuje visokom sadržaju pigmentata, pogotovo karotenoida. Od sekundarnih metabolita, fenolna jedinjenja se smatraju kao jedna od najvažnijih i najvećih grupa jedinjenja koja su direktno odgovorna za antioksidativnu aktivnost.

2.3 Ekstrakcija i ekstrakcione tehnike

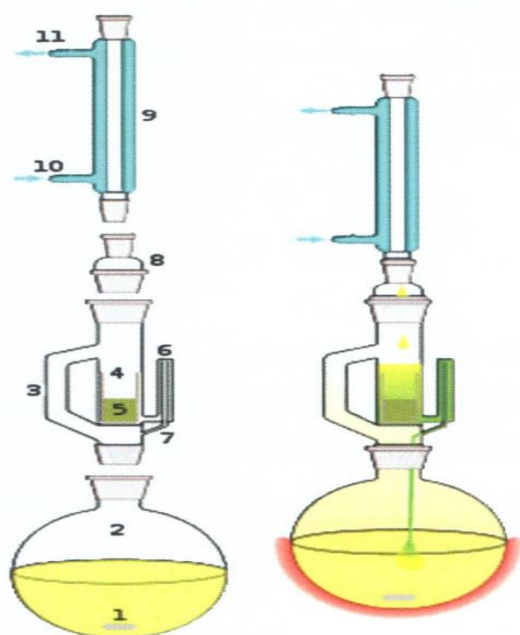
Ekstrakcija predstavlja jednu od najvažnijih tehnoloških operacija, posebno za farmaceutsku, kozmetičku i prehrambenu industriju. Osnovna svrha ekstrakcije jeste izdvajanje jedinjenja iz prirodnog materijala bilo da su to farmakološki aktivne supstance, mirisna ulja ili neke druge korisne materije koje imaju upotrebnu vrednost. Mnogi od prirodnih proizvoda su jedinstveni i/ili se teško dobijaju sintetskim putevima.

Ekstrakcija predstavlja separaciju aktivnih principa iz biljnog ili životinjskog tkiva upotrebom selektivnih rastvarača. Ovako dobijeni produkti su relativno onečišćeni, čvrsti ili praškasti proizvodi namenjeni samo za eksternu upotrebu. To uključuje klase preparata poznate kao dekokti, infuzi, tečni ekstrakti, tinkture, polučvrsti ekstrakti i suvi ekstrakti. Svrha standardizovanih ekstrakcionih procedura jeste da se dobiju terapijski željeni produkti i da se eliminiše interni materijal tretiranjem selektivnim rastvaračem. Tako dobijeni ekstrakti mogu biti spremni za upotrebu kao medicinski agensi u formi tinkture i tečnog ekstrakta. Takođe, mogu se dalje prerađivati i inkorporirati u određenu dozu gotovog leka, kao npr. tabletu ili kapsulu.

2.3.1 Soxhlet ekstrakcija

Ekstrakcija sa povremenim ispuštanjem ekstrakta predstavlja ekstrakciju iz sirovina u čvrstom stanju. Ostvaruje se uz male zapremine rastvarača pri čemu se mogu izdvojiti rastvorna jedinjenja

koja su najčešće uljasta na sobnoj temperaturi. Koristi se za izdvajanje etarskih/masnih ulja iz prirodnog materijala pomoću aparature po Soxhlet-u (slika 28) za kontinualnu ekstrakciju.



1. Rastvarač
2. Destilacioni sud
3. Bočna cev
4. Telo ekstraktora
5. Čaura

6. Sifon
7. Povratna cev
8. Nastavak sa šlifom
9. Kondenzator
10. Ulaz vode
11. Izlaz vode

Slika 28. Aparatura po Soxhlet-u

Usitnjeni materijal se postavlja u ekstrakcionu čauru, a čaura u telo ekstraktora. Iznad tela ekstraktora se postavlja hladnjak, a ispod balon u koji se sipa rastvarač do 2/3 zapremine balona. Balon se zatim zagreva, a pare se kreću naviše kroz bočnu cev i kondenzuju. Topao rastvarač u kontaktu sa ekstrakcionim materijalom rastvara supstance i kada se telo ekstraktora napuni, sadržaj se preliva preko sifonske cevi nazad u balon. Postupak se zatim ponavlja, a ekstrakcija teče kontinualno do potrebnog broja sifoniranja, odnosno do iscrpljenja uzorka.

Nakon završene ekstrakcije, tečni ekstrakt se podvrgava uparavanju, destilaciji ili tečno-tečnoj ekstrakciji radi daljeg izdvajanja željenih supstanci.

2.3.2 Hidrodestilacija

Etarska ulja se dobijaju iz raznih delova biljaka destilacijom pomoću vodene pare, ekstrakcijom lako isparljivim organskim rastvaračima, ekstrakcijom fluidima u superkritičnom stanju ili presovanjem.

Kod destilacije etarskih ulja radi se o binarnom sistemu koji se sastoji od dve tečnosti koje se međusobno ne mešaju i ne reaguju. Smeša proključa kada zbir napona para vode i etarskog ulja dostigne ukupan pritisak koji vlada u sudu iznad smeše. Prema Daltonovom zakonu, ukupni pritisak para iznad smeše (p) jednak je zbiru parcijalnih pritisaka komponenata, vode (p_v) i etarskog ulja (p_e):

$$p = p_v + p_e$$

(1)

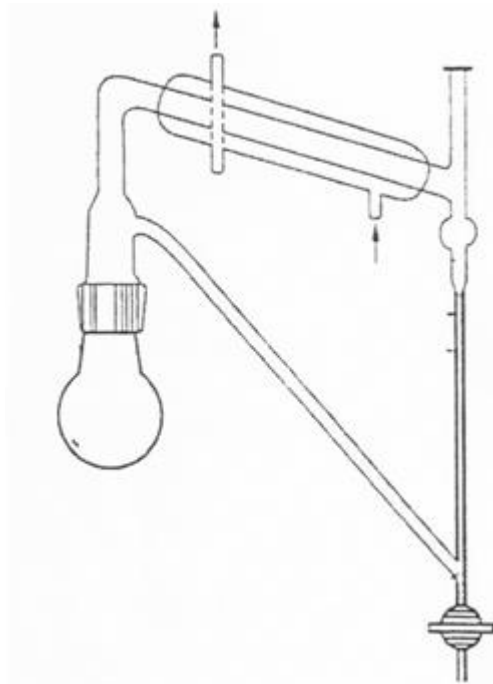
Na osnovu vrednosti parcijalnih pritisaka može se izračunati teorijska vrednost potrebne količine tehnološke pare za izdvajanje određene mase etarskog ulja. Primenom jednačine može se izračunati masa komponente A (m_A), odnosno masa etarskog ulja, uz poznavanje vrednosti napona pare komponente A (p_A):

$$\frac{p_A}{p_V} = \frac{m_A}{m_V} \quad (2)$$

Pri destilaciji etarskog ulja iz biljnog materijala više se troši tehnološka para nego pri destilaciji već izdvojenog ulja. Takođe, supstance visokih tački ključanja (masna ulja, voskovi, smole) utiču na potrošnju tehnološke pare, jer dolazi do rastvaranja etarskih ulja u njima i smanjuje se parcijalni pritisak para.

Za određivanje sadržaja etarskih ulja u laboratorijama se koriste aparature različite konstrukcije: po Clevenger-u (slika 29), po Unger-u, po Moritz-u, kao i aparature sa izvesnim modifikacijama. Aparatura je sastavljena iz balona za destilaciju sa okruglim dnom i nastavka za destilaciju (slika 29). Nastavak za destilaciju se sastoji iz staklene cevi koja je postavljena vertikalno i lučno savijena, silaznog hladnjaka na koji se nastavlja vertikalna merna cev koja prelazi u graduisanu cev. Iznad podeoka se nalazi proširenje oblika oilve, a na donjem delu je ispusni otvor sa slavinom. Merna cev je spojena preko cevi sa ulaznom granom nastavka za destilaciju.

Posle svake upotrebe aparatura se ispira acetonom, zatim vodom, pa hrom-sumpornom kiselinom i ponovo vodom.

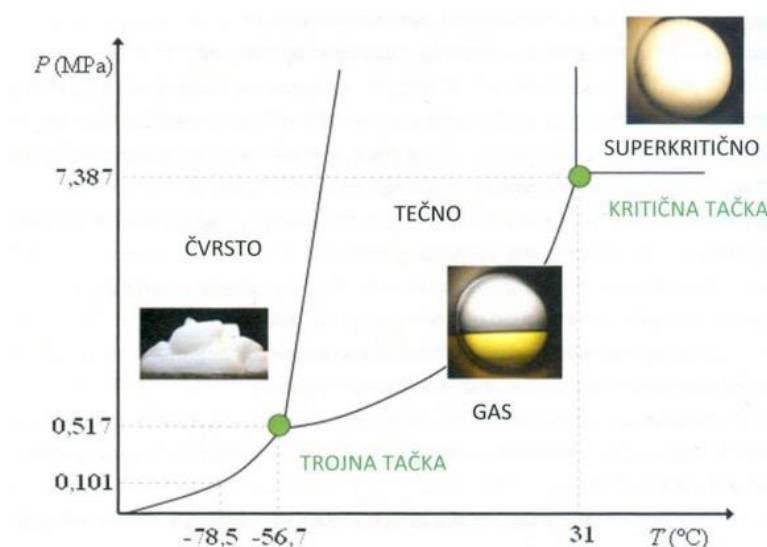


Slika 29. Aparatura za određivanje etarskog ulja po Clevenger-u

2.3.3 Ekstrakcija fluidima u superkričnom stanju

Ekstrakcija fluidima u superkričnom stanju (*engl. supercritical fluid extraction – SFE*) se najčešće upotrebljava kao preparativna metoda pomoću koje se dobijaju različite supstance iz njihovih prirodnih izvora (Bevan i Marshall, 1994). Sama tehnologija je počela da se razvija u Nemačkoj sedamdesetih godina XX veka nakon čega je doživela i industrijsku primenu u prehrambenoj industriji za dobijanje kofeina iz zrna kafe (dekofeinizacija kafe) i čaja i za ekstrakciju hmelja. Sama tehnologija se najčešće primenjuje za dobijanje prirodnih proizvoda kao što su arome, prirodne boje, masti i ulja. Dalji razvoj se odvija u smeru ekstrakcija biljnog materijala radi dobijanja proizvoda koji su od interesa za farmaceutsku i kozmetičku industriju.

Superkrična ekstrakcija jeste ekstrakcija fluidima koji se nalaze u superkričnom stanju, odnosno na temperaturi i pritisku iznad kritičnih. Fluid u ovakvom stanju nema definisano stanje, već se njegove fizičko-hemijske karakteristike nalaze između odgovarajućih karakteristika gasova i tečnosti (slika 30). Ovakav pristup je naročito efikasan za izolovanje supstanci srednjih molekulskih masa i male polarnosti. Rastvorljivost polarnih supstanci se može povećati dodatkom polarnih rastvarača (kosolventa, modifikatora ili entrejnera) fluidu u superkričnom stanju u malim udelima (5-20%). Etanol i voda su najčešće korišćeni kosolventi u prehrambenoj industriji za ekstrakciju polarnih komponenti (Skala i sar., 2002).



Slika 30. Fazni dijagram za ugljen-dioksid

Izbor odgovarajućeg ekstragensa zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika fluida koji se koriste za ekstrakciju u superkričnom stanju. Ovo ujedno određuje konstrukcione karakteristike same tehnologije, odnosno uređaja za ovu vrstu ekstrakcije (Sovová i Stateva, 2011). U tabeli 9 prikazane su fizičko-hemijske karakteristike fluida koji se mogu koristiti za ekstrakciju u superkričnom stanju.

Tabela 9. Kritične tačke fluida koji se koriste za ekstrakciju fluidima u superkričnom stanju

Fluid	Kritična temperatura (°C)	Kritični pritisak (bar)	Gustina (kg/m ³)
Etilen	9,3	50,4	218
Ugljen- dioksid	31,3	73,8	468
Etan	32,3	48,8	203
Azot-oksidi	36,7	72,7	470
Propilen	91,9	46,2	233
Propan	96,7	42,5	217
Amonijak	132,5	112,8	235
Dietil-etar	194	36,4	265
Metanol	239,6	80,9	272
Etanol	240,9	61,4	276
Voda	374,2	220,5	322

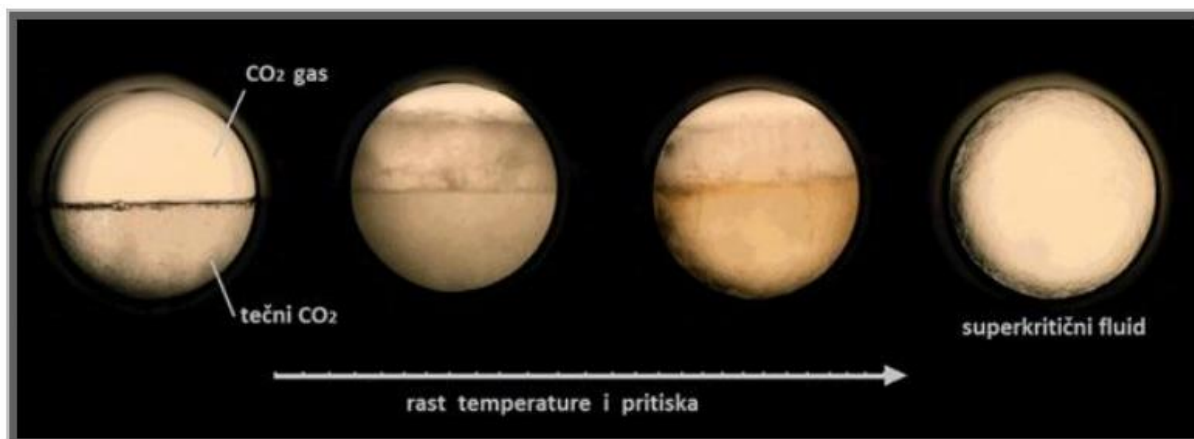
Najčešće korišćeni fluid za ovaj tip ekstrakcije jeste ugljen-dioksid. Razlozi za njegovu čestu upotrebu su sledeći:

- ✓ kritična temperatura ($31,1^{\circ}\text{C}$) koja je nešto iznad sobne temperature se veoma lako postiže, dok je kritični pritisak (73,8 bar) relativno nizak,
- ✓ lako je isparljiv na niskim temperaturama, što omogućava njegovo lako izdvajanje iz ekstrakta,
- ✓ ovim postupkom se dobijaju veoma čisti ekstrakti bez rastvarača,
- ✓ velika selektivnost ekstragensa se postiže variranjem pritiska i temperature procesa čime se postiže frakcionisanje na veoma jednostavan način,
- ✓ netoksičan je, hemijski inertan i bez mirisa je,
- ✓ lako je dostupan i relativno je jeftin.

Na slici 31 prikazan je prelaz ugljen-dioksida u superkrično stanje. Ispod kritičnih parametara (temperature i pritiska) ugljen-dioksid postoji u dve faze (tečno i gasovito). Povećanjem temperature smanjuje se vidljivost granice između dve faze, jer dolazi do povećanja sličnosti gustina ove dve faze. U momentu postizanja kritičnih uslova (tabela 9) razlika između dve faze više nije uočljiva, pri čemu one formiraju novu homogenu fazu, odnosno superkrični fluid (Filip, 2014).

2.3.3.1 Karakteristike superkričnih fluida

Fizičke osobine fluida u superkričnom stanju nalaze se između onih za gasove i tečnosti, što ih čini veoma pogodnim rastvaračima. Ovi fluidi se odlikuju velikim gustinama (gustina je bliska vrednostima za tečnosti) što im omogućava veliku moć rastvaranja. Difuzivnost je sa druge strane bliska vrednostima za gasove, a viskozitet je nizak i takođe blizak vrednostima za gasove. Ovo superkričnim fluidima omogućava olakšano prodiranje u materijal i efikasno rastvaranje. U tabeli 10 dat je prikaz fizičkih karakteristika fluida.



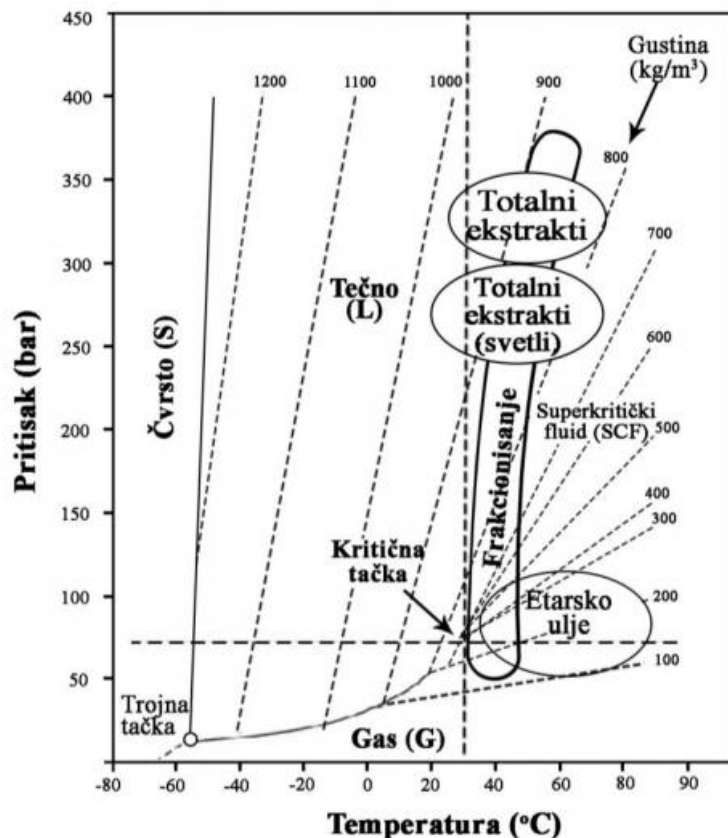
Slika 31. Shematski prikaz prelaska ugljen-dioksida u superkritično stanje

Sa slike 32 se može uočiti da se u oblasti neposredno iznad vrednosti kritičnih pritiska i temperature male promene vrednosti ova dva parametra dovode do velikih promena gustine ugljen-dioksida kao ekstragenta.

Tabela 10. Fizičke karakteristike fluida

Fluid	Gustina (kg/m ³)	Koeficijent difuzije (cm ² /s)	Viskozitet (Pa s)
Tečno	300-900	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Gasovito	1	0,1	10 ⁻⁵
Superkritični fluid	< 1000	10 ⁻⁵	10 ⁻³

Ovo variranje gustine predstavlja osnov superkritične ekstrakcije, jer sa promenom gustine dolazi do promene i u rastvorljivosti željenih komponenata. Fluidi u superkritičnom stanju imaju znatno veću moć rastvaranja i stepen selektivnosti, dok je koeficijent difuzije 10-100 puta veći od koeficijenata difuzije tečnih rastvarača koji se često upotrebljavaju u procesima ekstrakcije. Odnosno, superkritični fluidi imaju sposobnost rastvaranja kao organski rastvarači, ali sa mnogo boljom difuzijom, nižom viskoznošću i manjim površinskim naponom fluida.



Slika 32. Gustina ugljen-dioksida u funkciji pritiska i temperature u superkričnoj oblasti

Moć rastvaranja ugljen-dioksida kao ekstrakcionog sredstva zavisi uglavnom od primenjenog pritiska i temperature. Generalno posmatrano, za superkrične fluide se može reći da:

- moć rastvaranja superkričnog fluida raste sa porastom gustine na datoj temperaturi,
- moć rastvaranja superkričnog fluida raste sa temperaturom pri datoj gustini.

Pošto se ekstrakcija gasovima u superkričnom stanju zasniva na prelasku isparljivih komponenata iz polaznog materijala u nadkrični fluid, izdvajanje komponenata iz superkričnog fluida postiže se snižavanjem pritiska i/ili temperature fluida. Uopšteno, proces ekstrakcije superkričnim fluidima odvija se u pet sukcesivnih faza (Nikolovski, 2009; Wakao i Kaguei, 1983):

- ✓ difuzija superkričnog fluida do površine čestica kroz film fluida koji je okružuje,

- ✓ prodiranje i difuzija superkritičnog fluida kroz spoljašnji sloj sfernog omotača čvrstog i inertnog materijala,
- ✓ kontakt superkritičnog fluida sa rastvorljivom supstancom na površini neizreagovanog jezgra i ekstrakcija rastvorljive komponente,
- ✓ difuzija supstance u superkritičnom fluidu kroz sloj spoljašnjeg sfernog omotača na spoljašnju površinu čestice,
- ✓ difuzija komponente u superkritičnom fluidu kroz film superkritičnog fluida koji okružuje česticu.

U većini savremenih komercijalnih postupaka ekstrakcije prirodnih proizvoda superkritičnim fluidima, ekstrakt se dobija iz sloja nasutog čvrstog materijala u ekstraktoru. Raznovrsni i mnogobrojni faktoru utiču na proces ekstrakcije, a najznačajniji među njima su:

- pritisak, temperatura i protok rastvarača,
- gustina, viskozitet i difuzivnost rastvarača i materije koja se ekstrahuje,
- interakcije između molekula rastvarača, rastvorka i nerastvornog dela čvrstog materijala (matriksa) u kome se nalazi rastvorak, koji utiču na faznu ravnotežu i koeficijente difuzije,
- oblik, veličina i raspodela veličine čestica materijala u sloju, poroznost čestica i poroznost sloja.

Upotreba fluida u superkritičnom stanju za ekstrakciju neke supstance uslovljena je različitim faktorima kao što su rastvorljivost i fazna ravnoteža komponenata prisutnih u polaznom materijalu i komprimovanom gasu. Željena komponenta mora biti rastvorljiva u superkritičnom fluidu na umerenim pritiscima i temperaturama. Promenom pritiska i temperature mogu se menjati rastvorljivost i fazna ravnoteža u širokom opsegu.

2.3.3.2 Prednosti i nedostaci ekstrakcije fluidima u superkritičnom stanju

Superkrična ekstrakcija ima niz prednosti u odnosu na klasičnu ekstrakciju (King, 2002; Lang i Wai, 2001; Luque de Castro i Jimenéz-Carmona, 2000; Norhuda i Jusoff, 2009; Sahena i sar., 2009; Wang i Weller, 2006):

- ✓ kontrola moći rastvaranja superkričnog fluida postiže se promenom pritiska i/ili temperature,
- ✓ separacija ekstrakta od superkričnog fluida je laka, brza i jednostavna zbog mogućnosti regulisanja isparljivosti komponenata promenom pritiska i temperature,
- ✓ znatno bolje razdvajanje faza koje nije moguće postići klasičnom ekstrakcijom,
- ✓ dodavanjem kosolventa (etanol, metanol, voda, itd.) moguće je poboljšavanje rastvaranja i samim tim ekstrakcije polarnih komponenti čime se postiže veća selektivnost prilikom ekstrakcije,
- ✓ ekstrakcija termolabilnih komponenata se odvija uz minimalnu degradaciju istih jer se ekstrakcija vrši na nižim temperaturama,
- ✓ ne dolazi do zaostajanja rastvarača u dobijenom ekstraktu za razliku od slučaja kod upotrebe organskih rastvarača,
- ✓ ugljen-dioksid je kao ekstragens ekološki prihvatljiv (GRAS – eng. *generally recognized as safe*), fiziološki bezopasan, netoksičan, nezapaljiv i ne izaziva probleme u procesnom inženjerstvu,
- ✓ za ekstrakciju se mogu primeniti postrojenja različitih kapaciteta od analitičkih (manje od grama uzorka), preparativnih (nekoliko stotina grama uzorka), poluindustrijskih (kilogram uzorka) do velikih industrijskih postrojenja (tone materijala).

Pored gore navedenih prednosti, proces ekstrakcije superkričnim fluidima ima i nekoliko nedostataka, a to su:

- rad na velikim pritiscima,
- utrošak energije za komprimovanje gasova,

- znatni energetske troškovi za proces regeneracije rastvarača,
- veliki investicioni troškovi za procesnu opremu,
- kompleksnost samog procesa ekstrakcije.

Fluidima u superkričnom stanju do sada su ekstrahovane različite biljne sirovine. Primenom ovog postupka moguća je izolacija etarskih i masnih ulja, aromatičnih komponenata, farmakološki aktivnih supstanci, komponenata sa različitom biološkom aktivnošću, itd. (Filip, 2014). To je jedan od glavnih razloga što se ova ekstrakciona tehnika i dalje istražuje o čemu svedoči veliki broj radova.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je realizovan u laboratorijama Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo, Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, SP Laboratoriji iz Bečaja i Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu.

Biljni materijal

Rtanjski čaj (*Satureja montana* L.), korijander (*Coriandrum sativum* L.) i bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) su plantažno gajeni u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, Odeljenje za alternativne kulture u Bačkom Petrovcu, i sakupljeni tokom 2013. godine. Kao droga za ispitivanje, korišćeni su seme korijandera, herba rtanjskog čaja i bosiljka (list i cvet), koji su nakon sušenja čuvani u papirnim vrećama, na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svetlosti.

Osim pojedinačnih biljnih droga, za ispitivanje je pripremljena smeša sve tri droge (rtanjski čaj + korijander + bosiljak), uzorak CBS, u istom masenom odnosu (1:1:1), koji je dobro homogenizovan.

Hemikalije

Svi reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće.

- Komercijalni ugljendioksid (CO₂), ≥99 %, Messer Tehnogas, Novi Sad, Srbija,
- Metanol, Sigma (Deisenhofen, Nemačka),
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH*), Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Nemačka),
- Destilovana voda, TKA water purification system tip:05.30C 7-DEN,
- 3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT), Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Nemačka),
- Standardi za GC/FID: ((+)-limonen, eukaliptol, linalool, α-terpineol, metil-havikol, geraniol) proizvođača Ehrenstorfen (Nemačka) i Carl Roth GmbH (Nemačka).
- RPMI 1640 medijum sa i bez fenol reda, L-glutamin, penicilin/streptomycin, HEPES i MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid), nabavljeni su od Sigma Chemicals Co.,
- Serum fetalnog govečeta (FCS), dobijen je iz Veterinarskog zavoda (Novi Sad).

Aparati i uređaji

- Ekstrakcija ugljendioksidom u superkričnom stanju izvršena je u laboratorijskom uređaju (HPEP – High Pressure Extraction Plant, NOVA – Swiss, Effretikon, Switzerland),
- Vortex mikser, EV – 100, Tehnica, Železniki, Slovenija,
- Mlin za kafu, Bosch, Nemačka,
- Spektrofotometrijska merenja rađena su na spektrofotometru Jenway 6300 VIS, Velika Britanija,
- GC/MS i GC/FID, GC 6890N, Agilent i MS 5795, Agilent, USA.

3.1. Određivanje stepena usitnjenosti

Pre procesa ekstrakcije biljne droge su usitnjene u mlinu za kafu. Odmeri se 100 g droge u cilju određivanja srednjeg prečnika čestica i proseje kroz set sita proizvođača CISA (Cedaceria Industrial, Španija). Izmeri se masa droge koja je zaostala na svakom situ nakon prosejavanja, i izračuna srednji prečnik čestica na osnovu sledeće jednačine:

$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i} \quad (3)$$

gde je:

m_i - maseni procenat i-te frakcije (%),

d_i - srednji prečnik i-te frakcije (mm),

d – srednji prečnik čestica (mm).

Srednji prečnik čestica usitnjenog materijala određen analizom sejanja za svaku pojedinačnu drogu iznosio je za rtanjski čaj $d = 0,377$ mm, korijander $d = 0,561$ mm, bosiljak $d = 0,307$ mm i biljnu smešu (CBS uzorak) $d = 0,415$ mm.

3.2. Određivanje sadržaja vlage

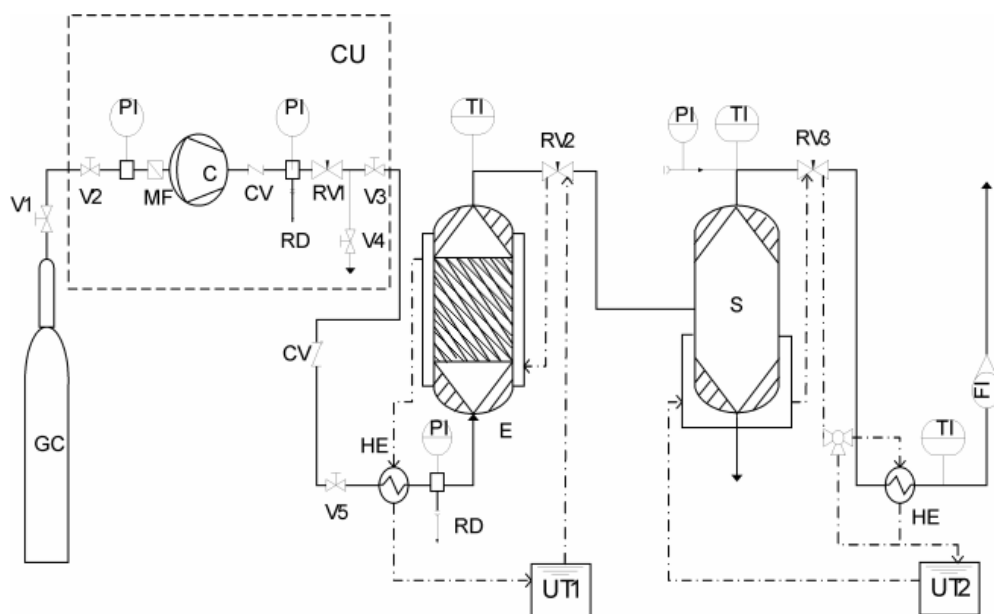
Sadržaj vlage u biljnom materijalu određen je gravimetrijskim postupkom na osnovu gubitka sušenjem koji propisuje *Ph. Jug. IV* (1984).

3.3. Određivanje sadržaja etarskog ulja

Sadržaj etarskog ulja hidrodestilacijom određen je po *Ph. Jug. IV* (1984).

3.4. Ekstrakcija biljnih droga i njihove smeše ugljendioksidom u superkričnom stanju

Ekstrakcija pojedinačnih biljnih droga (*S. Montana*, *C. sativum*, *O. basilicum*) i njihove smeše vršena je u laboratorijskom uređaju High Pressure Extraction Plant (HPEP, NOVA – Swiss), čija je šema prikazana na slici 33.



Slika 33. Šema laboratorijskog uređaja za ekstrakciju superkričnim ugljendioksidom.

GC-boca sa CO₂, CU-kompresorska jedinica, C-kompresor sa dijafragmom, E-ekstraktor, S-separator, HE-izmenjivač toplote, UT-ultratermostat, RV-regulacioni ventil, V-ventil, MF-mikrofilter, CV-nepovratni ventil, RD-rupturni disk, PI-merač pritiska, TI-merač temperature, FI-merač protoka.

Odmeri se 50,0 g uzorka i unese u ekstraktor (E) (slika 33). Biljni materijal u ekstraktoru se najpre oslobađa prisutnog vazduha prodivavanjem CO₂ iz boce (GC) u gasovitom stanju, nakon čega se zatvore ventil (V5) i regulacioni ventil (RV2). Ultratermostatima (UT1) i (UT2) se održavaju radne temperature u ekstraktoru (E) i separatoru (S) pri zatvorenom ventilu (V1) boce sa CO₂. Zatim se, nakon otvaranja ventila od V1 do V5 (V4 je zatvoren), kompresor na kome je podešen pritisak nešto iznad radnog pusti u pogon i regulacionim ventilom (RV1) se podesi radni pritisak. Ugljendioksid se nakon prolaska kroz izmenjivač toplote (HE) otvaranjem ventila (V5) uvodi u ekstraktor, pri čemu je regulacioni ventil (RV2) zatvoren. Otvaranjem i podešavanjem regulacionih ventila (RV2) i (RV3) se ostvaruje željeni pritisak u separatoru, kao i održavanje radnog protoka ekstragensa.

Ekstrakcioni uslovi su dati u tabeli 11, a separacioni uslovi su $p = 15 \text{ bar}$ i $t = 25^\circ\text{C}$.

Tabela 11. Ekstrakcioni uslovi pri superkritičnoj ekstrakciji pojedinačnih biljnih droga i njihove smeše

t (°C)	P (bar)	d (kg/m³)
40	100	0,568
	300	0,929

Prinos ekstrakcije praćen je nakon 30, 60, 90, 120, 180 i 240 minuta i protoku ugljendioksida od 0,2 kg CO₂/h. Dobijeni ekstrakti su preneti u staklene bočice, koje su zatvorene i čuvane u frižideru na temperaturi od 4°C.

3.5. Analiza etarskih ulja i CO₂ ekstrakata primenom GC/MS(FID)

Analiza svih dobijenih uzoraka izvršena je pomoću GC/MS i GC/FID hromatografije. Za razdvajanje komponenti korišćen je gasni hromatograf GC 9890N, Agilent, opremljen split/splitless injektorom, HP-5MS kapilarnom kolonom (dužine 30 m, unutrašnjeg prečnika 0,25 mm, debljine filma 0,25 µm). Kvantifikacija supstanci izvršena je na osnovu standarda (limonen, eukaliptol, linalool, α-terpineol, metil-havikol, geraniol). Uzorci i rastvori referentnih standardnih supstanci su injektovani u zapremini od 5 µl, pri split odnosu 1:30.

Kvantifikacija organskih komponenata je urađena pomoću plameno-jonizujućeg detektora (FID), korišćenjem kalibracionog dijagrama za svaku pojedinačnu komponentu. Standardne supstance su rastvorene u metilenhloridu pri čemu je dobijena serija rastvora koncentracije od 1 do 500 µg/mL. Minimalni koeficijent korelacije iznosio je 0,99.

- Uslovi rada GC/MS instrumenta su sledeći:

Temperatura injektora je 250°C, linearni temperaturni režim od 60°C do 150°C (4°C/min). Kao gas nosač korišćen je He (2 ml/min).

- Uslovi rada GC/FID instrumenta su sledeći:

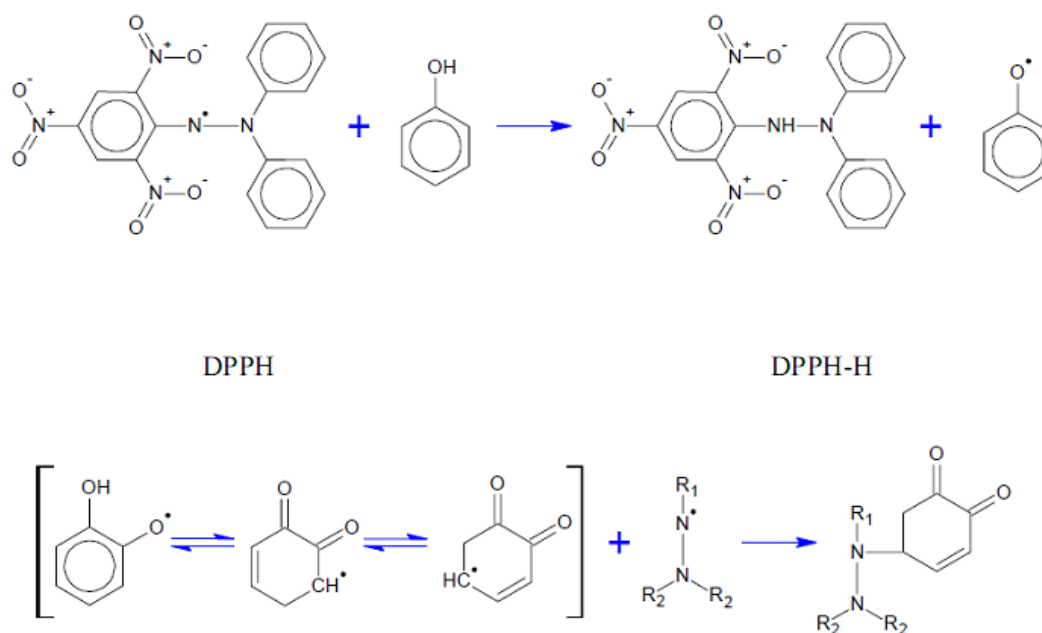
Temperatura injektora iznosila je 250°C. Linearni temperaturni režim od 60°C do 150°C (4°C/min), dok je temperatura detektora iznosila 300°C.

Identifikacija organskih komponenti rađena je pomoću masenog spektrometra MS 5795, Agilent, poređenjem masenog spektra jedinjenja dobijenog iz uzorka, na odgovarajućem retencionom vremenu i masenog spektra iz baze podataka masenih spektara. Korišćene su biblioteke sa podacima masenih spektara Wiley 7n i NIST 05.

3.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala urađeno je primenom spektrofotometrijske metode (Espin i sar., 2000) koja je zasnovana na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog DPPH[•] radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H. Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH[•] prelazi u redukovani neutralni DPPH-H. Neutralizacija DPPH[•]

fenolnim jedinjenjima odvija se prema dva simultana mehanizma. Najpre, fenolno jedinjenje deluje kao donor H-atoma pri čemu nastaje redukovani, neutralni DPPH-H oblik i ariloksi radikal koji je rezonantno stabilizovan, a zatim, nastali ariloksi radikal reaguje sa još jednim DPPH[•] radikalom pri čemu dolazi do njihove kondenzacije i prelaska u neutralan molekul (slika 34).



Slika 34. Mehanizam neutralizacije DPPH[•] radikala fenolnim jedinjenjima.

Za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata postupak ispitivanja je sledeći:

Ekstrakt se rastvori u etilacetatu do koncentracije od 1 mg/ml. U kiveti se pomešaju određene zapremine metanolnog rastvora ekstrakta (80 - 800 μ l) sa 1 ml 90 μ mol/dm³ rastvora DPPH[•] radikala i dopuni 95% metanolom do 4 ml. Na ovaj način se dobijaju pet različitih koncentracija ekstrakta (0,01; 0,02; 0,05; 0,1 i 0,2 mg/ml). Kontrolni uzorak predstavlja smešu u kojoj je umesto ekstrakta dodata destilovana voda. Kao slepa proba koristi se 95% metanol. Nakon inkubacije od 1 h na sobnoj temperaturi izmeri se apsorbancija reakcione smeše na talasnoj dužini od 515 nm. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

Antioksidativna aktivnost određena primenom ove metode izražava se preko RSC vrednosti (kapacitet „hvatanja“ radikala, ili eng. *Radical Scavenging Capacity*), koja se izračunava primenom jednačine:

$$\text{RSC (\%)} = 100 - \frac{A_{uz} \cdot 100}{A_{sp}} \quad (4)$$

gde su:

A_{uz} – apsorbancija uzorka,

A_{sp} – apsorbancija slepe probe.

IC_{50} vrednost (mg/ml), definisana kao koncentracija ekstrakta potrebna da reaguje sa 50% DPPH• radikala (RSC=50%) u uslovima koje definiše metoda, dobijena je računski iz jednačine linearne regresije.

3.7. Određivanje intenziteta citotoksičnog dejstva MTT testom

Citotoksično dejstvo ispitivanih etarskih ulja (rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i njihove smeše) i CO₂ ekstrakata određena je MTT testom (Mosman, 1983; Dighe i sar., 2011). MTT kolorimetrijski test razvio je Mosman (1983), a zatim su Ohno i Abe (1991) modifikovali proceduru. Test se zasniva na nastanku ljubičastih kristala formazana raspadom žute tetrazolijumove MTT soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromida) pod dejstvom dehidrogenaze živih ćelija. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih ćelija i očitava se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 570 nm. Kolorimetrijske *in vitro* metode, bazirane na redukciji tetrazolijumskih soli, koriste se sa ciljem da omoguće kvantifikaciju ćelijske proliferacije.

Citotoksično dejstvo može biti direktno kada se indukuje direktna smrt ćelije ili indirektno kada se indukuje reproduktivna ćelijska smrt, kada je ćelija živa, ali dolazi do inhibicije ćelijskog rasta i proliferacije (antiproliferativna aktivnost). Citotoksično dejstvo je procenjeno indirektnim putem preko određivanja preživljavanja ciljnih ćelija nakon njihovog rasta u prisustvu ekstrakata.

Pri određivanju antiproliferativne aktivnosti korišćene su sledeće tumorske ćelijske linije nabavljene od ATCC-a (American Type Culture Collection, Manassas, SAD), i to:

1. **HeLa** - humani adenokarcinom cerviksa (grlića materice),
2. **MDA-MB-453** - tumor dojke,
3. **K562** - humana mijeloidna leukemija i
4. **MRC-5** - normalni fibroblasti.

Ćelije su gajene u jednoslojnoj kulturi, izuzev K562 ćelija koje su gajene u suspenziji u potpunom hranljivom medijumu, na 37°C u vazduhu obogaćenom sa 5% CO₂ i zasićenom vodenom parom. Korišćena hranljiva podloga je RPMI 1640 medijum u koji je dodato 3 mmol/L l-glutamina, 100 mg/mL streptomicina, 100 IU/mL penicilina, 10% FCS-a i 25 mM Hepesa, podešenog na pH 7,2 bikarbonatnim rastvorom.

Tumorske HeLa (2000 ćelija po otvoru u 100 µl podloge) i MDA-MB-453 (3000 ć/o), kao i normalne MRC-5 (5000 ć/o) ćelije su sađene u mikrotitar ploče sa ravnim dnom sa 96 otvora i 20 h kasnije, posle ćelijske adherencije, pet različitih koncentracija ispitivanih ekstrakata dodate su u otvore ploča da bi finalne koncentracije bile u opsegu od 0,0625 do 1 mg/mL. Neadherentne K562 (5000 ć/o) ćelije sađene su 2 h pre dodavanja ispitivanih supstanci. Po dodavanju supstanci ćelije su inkubirane 72 h na 37°C u vazduhu zasićenom vodenom parom i 5% CO₂. Po isteku 72 h u otvore ploča dodato je po 20 µl rastvora MTT-a (5 mg/ml u PBS-u), potom su ćelije inkubirane 4 h i zatim je redukcija MTT-a u obojeni formazan prekinuta dodavanjem 100 µl 10% SDS-a (engl. *sodium dodecyl sulphate*). Apsorbanca produkovanog formazana se meri spektrofotometrijski na 570 nm 24 h kasnije. Obzirom da je apsorbanca novonastalog formazana direktno srazmerna broju živih ćelija, da bi se dobilo preživljavanje ćelija (S%; S - engl. *Survival*), apsorbanca uzorka sa ćelijama tretiranih različitim koncentracijama ispitivanih tetraoksana (A_E) podeljena je apsorbancom kontrolnih netretiranih ćelija (A_K), i potom je ta vrednost pomnožena sa 100. Apsorbanca slepe probe je uvek oduzeta od apsorbance odgovarajućeg uzorka.

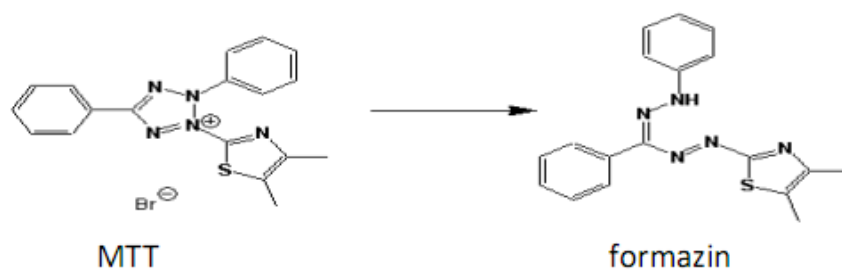
$$S(\%) = \frac{A_E}{A_K} 100 \quad (5)$$

pri čemu je:

A_E - Apsorbanca uzorka u kome su ćelije rasle u prisustvu tetraoksana,

A_K - Apsorbanca kontrolnih ćelija.

Intenzitet citotoksičnog dejstva nekog jedinjenja je izražena kao IC₅₀ vrednost, a definiše se kao koncentracija agensa koja inhibira ćelijski rast za 50%. IC₅₀ je obrnuto srazmerna intenzitetu citotoksičnog dejstva nekog jedinjenja. IC₅₀ dobijena na osnovu izmerenih preživljavanja ćelija je mera i direktne i indirektno - reproduktivne toksičnosti.



Slika 35. Redukcija MTT mitohondrijanom reduktazom do formazina.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U okviru doktorske disertacije, seme korijandera (*Coriandrum sativum* L.), herba rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.) i bosiljka (*Ocimum basilicum* L.), kao i smeša sve tri biljne droge u istom masenom odnosu, pripremljene su za ekstrakciju, izvršena je analiza kvaliteta biljnog materijala i svi uzorci su ispitani različitim ekstrakcionim postupcima. Hidrodestilacijom su izdvojena etarska ulja pojedinačnih biljnih droga i njihove smeše. Superkričnom ekstrakcijom na konstantnoj temperaturi (40°C) variranjem pritiska, tj. gustine ekstragensa, ispitana je kinetika ekstrakcije i prinos izdvojenih ekstrakata. Kvalitativnom i kvantitativnom analizom (GC/MS i GC/FID) etarskog ulja i ekstrakata pojedinačnih biljnih droga i njihove smeše, određen je hemijski sastav i sadržaj detektovanih komponenata. Antioksidativna aktivnost izolovanih etarskih ulja i ekstrakata ispitana je praćenjem sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, a antiproliferativna aktivnost istih određivana je u *in vitro* uslovima. Na kraju je, hemometrijskom analizom, izvršena korelacija između hemijske strukture i antioksidativne/antiproliferativne aktivnosti.

A. ISPITIVANJA OSOBINA POLAZNOG MATERIJALA

Osnovne karakteristike ispitivanog biljnog materijala (rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i njihove smeše) date su u tabeli 12.

Herba rtanjskog čaja i bosiljka su samlevene do gotovo istog srednjeg prečnika, dok je seme korijandera imalo nešto veći srednji prečnik čestica, rezultujući sa srednjim prečnikom ispitivane biljne smeše od 0,415 mm.

Sadržaj vlage u biljnom materijalu, prema zahtevima Farmakopeje, mora biti u granicama 7 – 16%, a kreće se najčešće u opsegu 8 - 12%. Rtanjski čaj sa sadržajem vlage od 9,68%, korijander sa 7,31%, bosiljak sa 8,45% i njihova smeša sa 8,48%, nalaze se u granicama koje propisuje Farmakopeja (*Ph. Jug. V*).

Sadržaj etarskog ulja (EU) pojedinačnih biljnih droga i njihove smeše određen je oficinalnom metodom destilacije pomoću vodene pare. Sadržaj EU u rtanjskom čaju iznosio je 1,15% , korijanderu 0,75% i bosiljku 0,67%, i u granicama je koje propisuje literatura za rtanjski čaj (0,5 – 2,2%) (Trifan i sar., 2015), korijander (1 – 2%) (Mandal i Mandal, 2015) i bosiljak (0,5 - 0,8%) (Tucakov, 1990).

Tabela 12. Rezultati ispitivanja polaznog biljnog materijala

Uzorak	Srednji prečnik čestica (mm)	Sadržaj vlage (%, m/m)	Sadržaj etarskog ulja (%, V/m)
<i>Satureja montana</i>	0,377	9,68	1,15
<i>Coriandrum sativum</i>	0,562	7,31	0,75
<i>Ocimum basilicum</i>	0,307	8,45	0,67
CBS*	0,415	8,48	0,78

*CBS – smeša biljnih droga (*C. sativum* + *O. basilicum* + *S. Montana*, 1:1:1, m/m/m)

B. GC/MS ANALIZA ETARSKIH ULJA

Etarsko ulje rtanjskog čaja (*S. montana*), korijandera (*C. sativum*), bosiljka (*O. basilicum*) i njihove smeše (uzorak CBS), dobijeno hidrodestilacijom ispitano je u odnosu na kvalitativni i kvantitativni sastav primenom GC/MS i GC/FID metoda. Dobijeni rezultati dati su u tabelama 13, 14 i 15, a hromatogrami izolovanih etarskih ulja prikazani u odeljku Prilog (slika P 1, 4, 7 i 10).

Tabela 13. Rezultati GC/MS analize etarskih ulja rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše

Komponenta	Relativni udeo (%)			
	S.	C.	O.	CBS

	<i>montana</i>	<i>sativum</i>	<i>basilicum</i>	
Monoterpenski ugljovodonici	11,808	2,775	0,041	1,9 15
Limonen	0,505	0,496	nd	nd
α -Terpinen	0,449	nd	nd	0,1 50
γ -Terpinen	2,811	1,614	nd	1,3 39
p-Cimen	8,043	0,665	0,041	0,4 26
Oksidovani monoterpeni	80,323	96,598	71,854	96, 527
Eukaliptol	nd	nd	3,260	1,5 73
Linalool	1,784	86,087	59,649	87, 593
<i>cis</i> -Linalool oksid	0,556	0,270	0,302	0,5 76
<i>trans</i> -Linalool oksid	0,077	0,155	0,131	nd
Kamfor	nd	3,278	0,477	1,2 88
Borneol	1,411	0,108	nd	nd
Bornilacetat	nd	nd	0,352	nd
Terpinen 4-ol	0,756	0,208	0,382	nd
α -Terpineol	0,325	0,108	0,501	nd

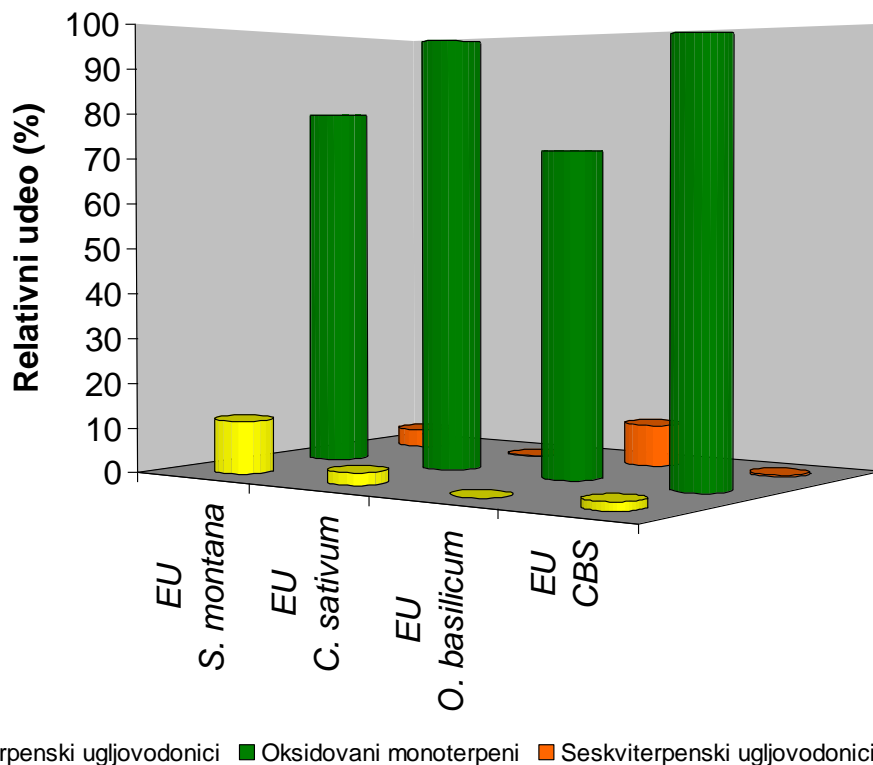
δ -Terpineol	nd	nd	0,200	0,2 96
Geraniol	nd	nd	0,799	nd
<i>trans</i> -Geraniol	nd	1,176	nd	nd
Geranil acetat	nd	5,208	0,337	0,0 27
Karvakrol	75,414	nd	nd	4,9 44
Metil-havikol	nd	nd	1,880	nd
Eugenol	nd	nd	3,584	0,2 30
Seskviterpeni	4,008	0,079	9,278	0,3 89
<i>trans</i> -Kariofilen	1,531	0,079	0,484	nd
β -Bisabolen	0,820	nd	nd	nd
δ -Kadinen	0,596	nd	nd	nd
α -Kariofilen	nd	nd	0,593	0,0 39
Kariofilen oksid	1,061	nd	nd	nd
Germakren D	nd	nd	3,526	nd
α -Farnesen	nd	nd	2,899	0,0 60
α -Gvajen	nd	nd	0,545	nd
Spatulenol	nd	nd	0,831	0,2 90

β -Eudesmol	nd	nd	0,400	nd
Ostali		0,092		
Metil linoleat	nd	0,092	nd	nd
Udeo identifikovanih komponenti	96,139	99,544	81,173	98,831

nd – nije detektovan

U etarskom ulju rtanjskog čaja (*S. montana*) identifikovano je 15 komponenata, sa ukupnim udelom od 96,14%. Detektovane komponente podeljene su u tri grupe: monoterpeni ugljovodonici, oksidovani monoterpeni i seskviterpeni ugljovodonici. U etarskom ulju rtanjskog čaja najzastupljenija je grupa oksidovanih monoterpena (80,32%), a zatim monoterpenih ugljovodonika (11,81%). U etarskom ulju korijandera (*C. sativum*) identifikovano je 15 komponenata, sa ukupnim udelom od 99,54%. Dominantne su komponente iz klase oksidovanih monoterpena sa udelom od 96,59%. U etarskom ulju bosiljka (*O. basilicum*) identifikovana je 21 komponenta, sa ukupnim udelom od 81,17%. I u ovom etarskom ulju, jedinjenja iz klase oksidovanih monoterpena su dominantna (71,85%), a nešto manje je zastupljena grupa seskviterpenih ugljovodonika (9,28%). U etarskom ulju biljne smeše (uzorak CBS) identifikovano je 14 komponenta, sa ukupnim udelom od 98,83%. Takođe, i u ovom ulju najzastupljenija je grupa oksidovanih monoterpena sa udelom od 96,53%, što je gotovo identično sa zastupljenošću ove grupe u etarskom ulju korijandera.

Upoređujući etarsko ulje biljne smeše i ostalih pojedinačno izolovanih etarskih ulja, može se zaključiti da je odnos klase detektovanih komponenata različit u odnosu na EU pojedinačnih biljnih droga (slika 36).

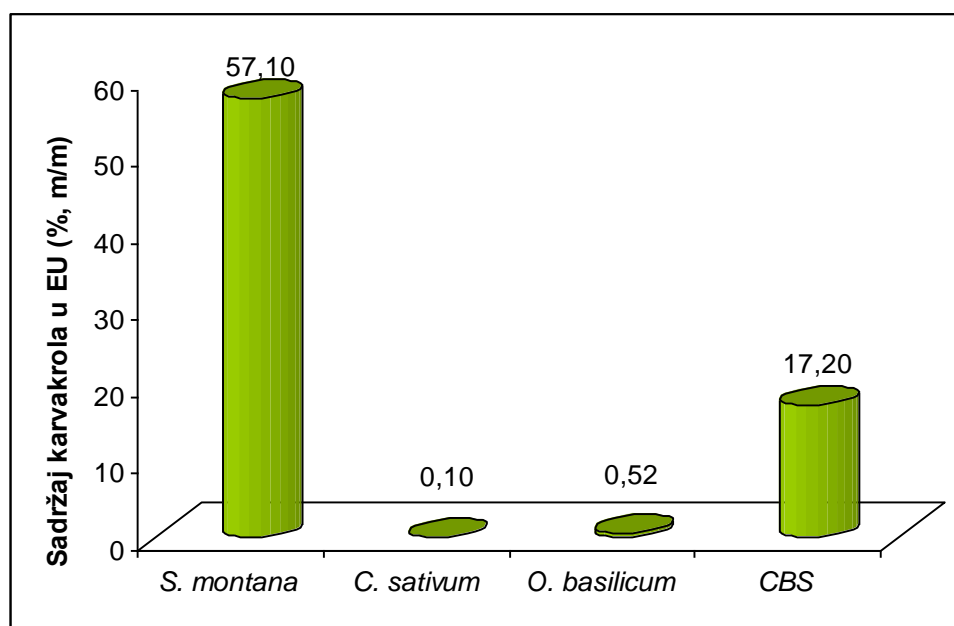


Slika 36. Osnovne klase jedinjenja u etarskim uljima rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i njihove smeše

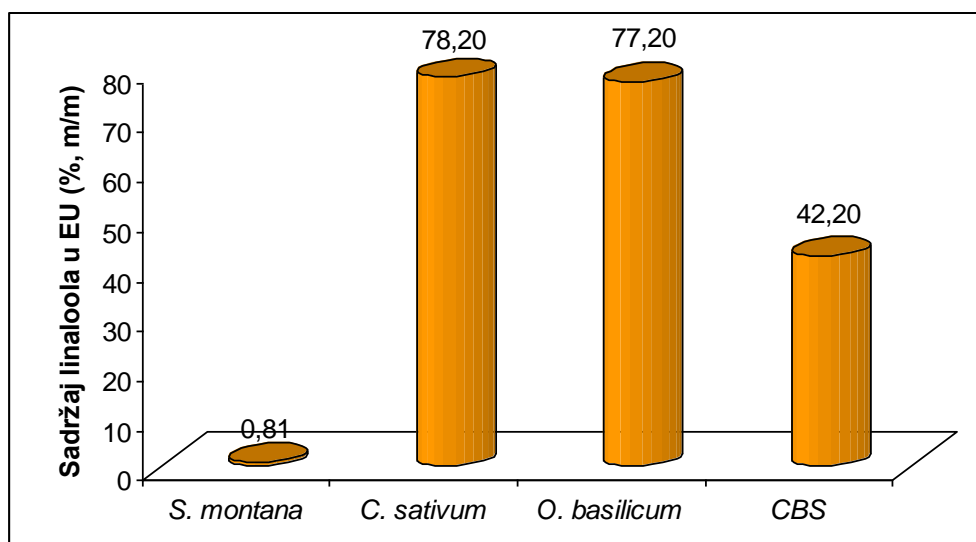
Kvalitativnom i kvantitativnom GC-MS analizom utvrđeno je da je dominantno jedinjenje u etarskom ulju rtanjskog čaja *karvakrol* sa relativnim udelom 75,41% (GC-MS), odnosno sa sadržajem u etarskom ulju od 57,10% (m/m), koji je određen metodom spoljašnjeg standarda primenom GC-FID, što je prinos od 656,65 mg/100 g droge. U grupi monoterpenih ugljovodonika najdominantnije komponente su biološki prekursori karvakrola: *p*-cimen 8,04% i γ -terpinen 2,81% (odnosno 5,22% (m/m)). Na osnovu hemijskog sastava dobijenog EU kultivisane *S. montana* može se zaključiti da ono pripada karvakrol hemotipu (hemotip A), kao i ostale vrste rtanjskog čaja sa mediteranskog prostora (Serrano i sar., 2011).

Dominantna komponenta u EU korijandera i bosiljka je *linalool* sa relativnim udelom od 86,09% i 59,65%, odnosno sa sadržajem u etarskom ulju korijandera od 78,20% (m/m) (što je prinos od 586,50 mg/100 g droge), i bosiljka od 77,20% (m/m) (što je prinos od 517,24 mg/100 g droge). Komponente koje se nalaze u većem procentu od 3% u EU korijandera su kamfor 3,28% i geranil acetat 5,21%, dok su u EU bosiljka to eugenol 3,58% (3,96% (m/m)), eukaliptol 3,26% (3,21% (m/m)), germakren D 3,53% i α -farnesen 2,90%.

U etarskom ulju biljne smeše (uzorak CBS) dominantne komponente su linalool sa relativnim udelom od 87,59% i karvakrol sa 4,94%. Primenom GC-FID metode sadržaj linaloola i karvakrola u etarskom ulju smeše je 42,20% (m/m) i 17,20% (m/m), što predstavlja prinos destilacije od 329,16 mg/100 g droge, odnosno 134,16 mg/100 g droge. Na slikama 37 i 38 data su poređenja sadržaja karvakrola i linaloola u izolovanim EU. Ostale komponente sa manjim kvantitativnim sadržajem su: geraniol (2,90% (m/m)), γ -terpinen (1,86% (m/m)) i eugenol (1,53% (m/m)). GC-MS analiza EU biljne smeše (ukupno identifikovano 98,83% komponenata) se u potpunosti razlikuje od EU rtanjskog čaja, korijandera i bosiljka. Pojedine komponente, kao što su α -pinen, β -pinen i d-limonen koji su konstituenti EU biljne smeše, pokazuju veći sadržaj u uzorku CBS nego u etarskim uljima dobijenim iz pojedinačnih biljaka. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se hemijski profil EU biljne smeše kvalitativno i kvantitativno razlikuje od hemijskog profila etarskih ulja pojedinačnih biljnih droga.



Slika 37. Sadržaj karvakrola u EU rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše



Slika 38. Sadržaj linaloola u EU rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše

Tabela 14. GC/FID analiza etarskog ulja rtanjskog čaja i korijandera

Komponente	<i>Satureja montana</i>		<i>Coriandrum sativum</i>	
	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos destilacije (mg/100 g droge)	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos destilacije (mg/100 g droge)
<i>Monoterpeni ugljovodnici</i>	5,22	60,00	0,10	0,75
α-Pinen	<0,01	<0,115	0,10	0,75
β-Pinen	<0,01	<0,115	<0,01	<0,075
d-Limonen	<0,01	<0,115	<0,01	<0,075
γ-Terpinen	5,22	60,03	<0,01	<0,075
<i>Oksidovani monoterpeni</i>	1,45	16,68	79,84	599,00
Eukaliptol	0,31	3,56	<0,01	<0,075
Linalool	0,81	9,32	78,20	586,50
Kamfor	<0,01	<0,115	1,10	8,25

α -Terpineol	0,12	1,38	0,42	3,15
Geraniol	0,21	2,42	0,12	0,90
<i>Aromatični oksidovani monoterpeni</i>	57,30	658,95	0,10	0,75
Metil-havikol	0,20	2,30	0,10	0,75
Karvakrol	57,10	656,65	<0,01	<0,075
Eugenol	<0,01	<0,115	<0,01	<0,075
Ukupno	63,97	735,63	80,04	600,5

Tabela 15. GC/FID analiza etarskog ulja bosiljka i smeše ispitivanih droga

Komponente	<i>Ocimum basilicum</i>		CBS	
	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos destilacije (mg/100 g droge)	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos destilacije (mg/100 g droge)
<i>Monoterpeni</i>	0,73	4,90	3,10	24,19
α-Pinen	0,44	2,95	0,51	3,98
β-Pinen	<0,01	<0,067	0,36	2,81
d-Limonen	0,29	1,94	0,37	2,89
γ-Terpinen	<0,01	<0,067	1,86	14,51
<i>Oksidovani monoterpeni</i>	84,23	564,34	47,77	372,61
Eukaliptol	3,21	21,51	1,16	9,05
Linalool	77,20	517,24	42,20	329,16
Kamfor	0,75	5,02	0,99	7,72

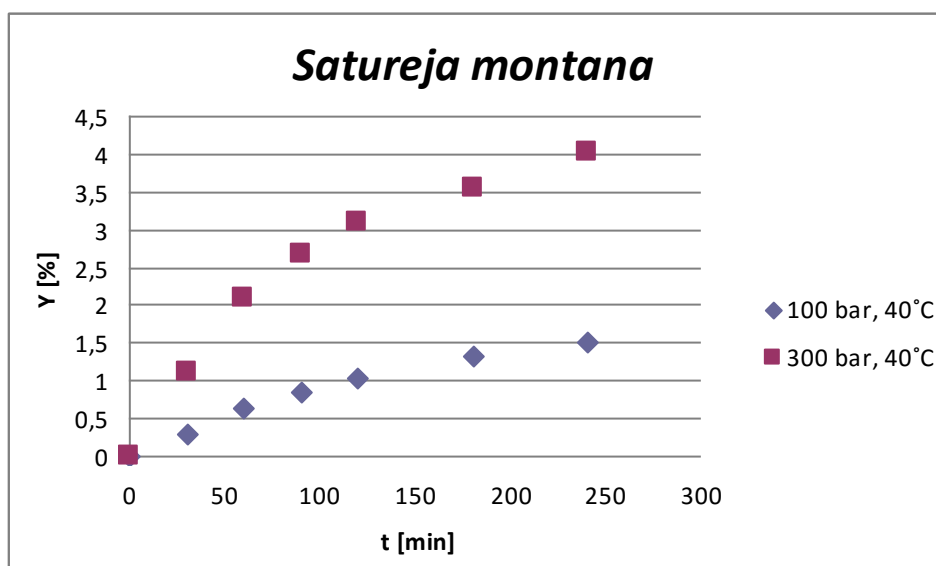
α -Terpineol	0,87	5,83	0,52	4,06
Geraniol	2,20	14,74	2,90	22,62
<i>Aromatični oksidovani monoterpeni</i>	6,58	44,08	19,49	152,02
Metil-havikol	2,10	14,07	0,76	5,93
Karvakrol	0,52	3,48	17,20	134,16
Eugenol	3,96	26,53	1,53	11,93
Ukupno	91,54	613,32	70,36	548,82

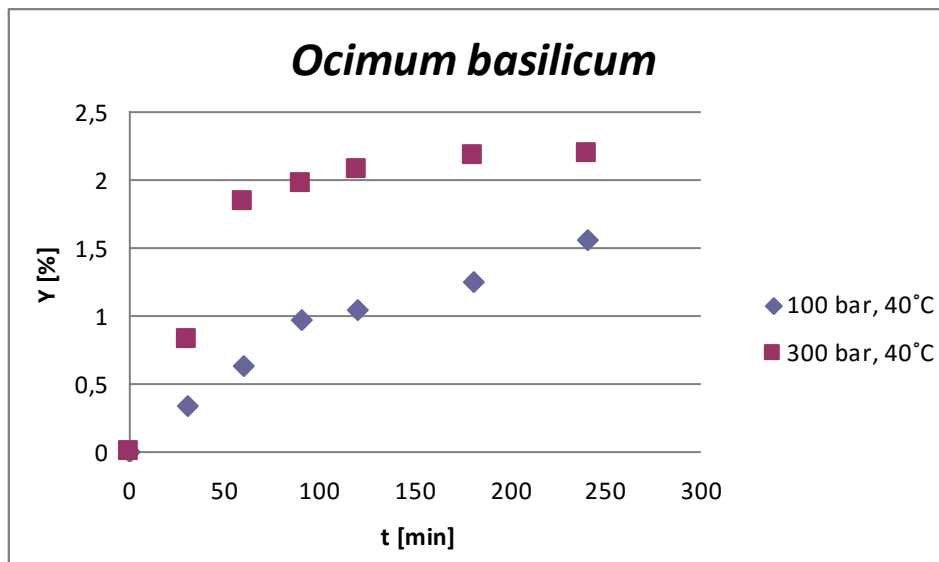
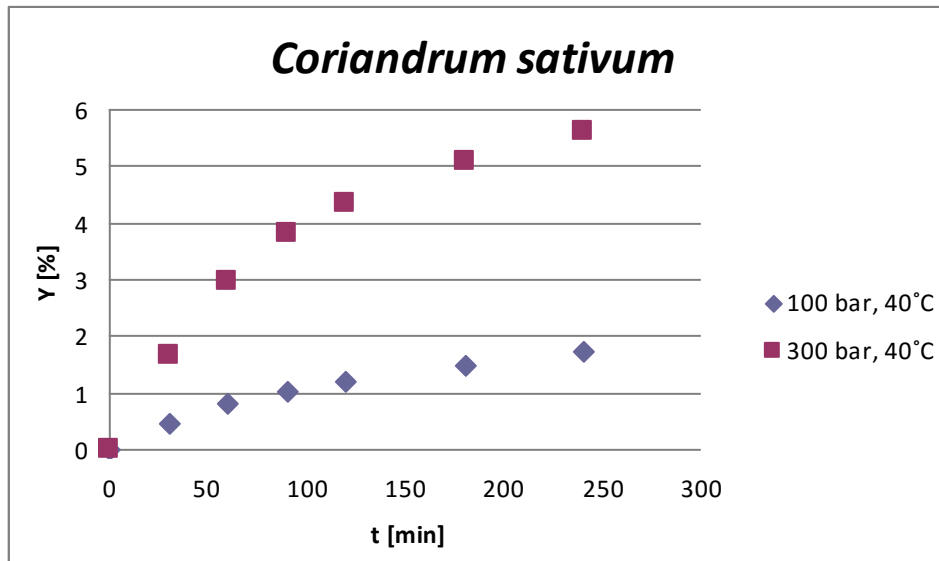
C. SUPERKRITIČNA EKSTRAKCIJA

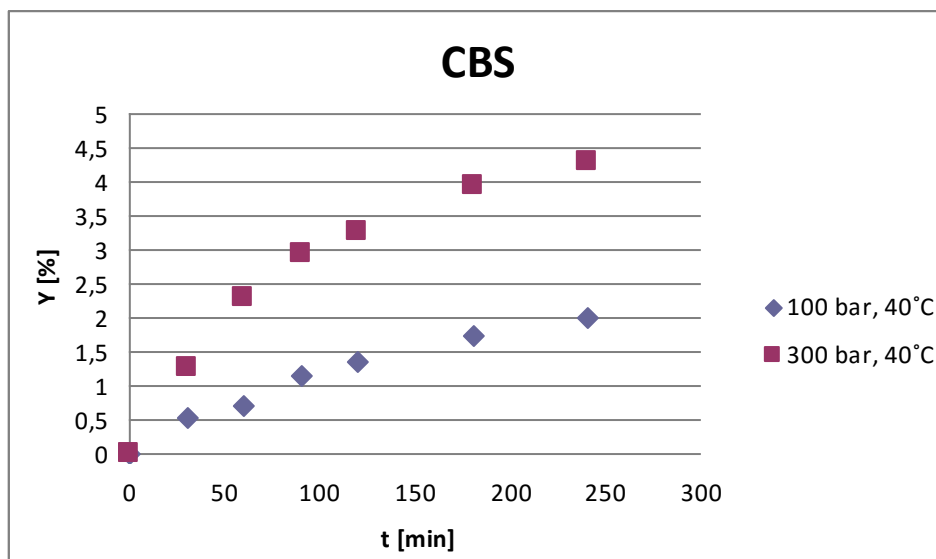
4.3.1. Prinos ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom

Superkritičnom ekstrakcijom pomoću CO₂ iz biljnih materijala izoluju se lipofilne komponente, dok se pretežno hidrofilne ne ekstrahuju i ostaju u biljnom materijalu. Ovim postupkom izoluju se terpeni, slobodne masne kiseline, gliceroli, pigmenti i voskovi, dok su proteini i polisaharidi jedinjenja koje ostaju u biljnom materijalu nakon ekstrakcije. Moć rastvaranja ugljendioksida je velika prema molekulima male i srednje molekulske mase, i smanjuje se sa povećanjem molekulske mase. Generalno, ovom savremenom ekstrakcionom tehnologijom moguće je ekstrahovati isparljive i manje isparljive komponente, čak i veće molekulske mase čija rastvorljivost zavisi od gustine rastvarača, tj. ugljendioksida, tokom ekstrakcionog procesa (Brunner, 2005).

Superkritična ekstrakcija rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i njihove smeše izvršena je pomoću CO₂ na temperaturi od 40°C i pritiscima od 100 i 300 bar i pri protoku CO₂ od 0,2 kg CO₂/h. U izdvojenim ekstraktima nakon 4 h ekstrakcije, merenjem mase ekstrakta izračunat je prinos ekstrakcije (g/100 g droge). Kinetika izotermske ekstrakcije ispitivanih biljnih droga i njihove smeše ugljendioksidom u superkritičnom stanju praćena je kao što je opisano u poglavlju 3.4. Grafički prikaz kinetike superkritične ekstrakcije za svaku pojedinačnu drogu i njihovu smešu dat je na slici 37, a kumulativni prinos ekstrakcije u tabeli 16.







Slika 37. Kinetika superkritične ekstrakcije ispitivanih biljnih droga i njihove smeše

(*S. montana* + *C. sativum* + *O. Basilicum*, 1:1:1, m/m/m)

Iz rezultata prikazanih na slici 37 vidi se da se ekstrakcija odvija kroz dva perioda. Period brze ekstrakcije, koji se postiže za vreme do 2 h, gde su ekstrahovane lako rastvorne komponente u superkritičnom ugljendioksidu, nakon čega sledi period spore ekstrakcije pri kojem se ekstrahuje manja količina ekstrakta, jer je brzina procesa kontrolisana molekulskom difuzijom. Za svaku pojedinačnu biljnu drogu, kao i njihovu smešu, može se uočiti slično ponašanje, da se pri izotermskoj ekstrakciji sa povećanjem pritiska povećava prinos ekstrakcije, jer se povećava gustina CO₂, a samim tim i moć rastvaranja CO₂ kao ekstragensa.

Iz rezultata prikazanih u tabeli 16, na temperaturi od 40°C i pritisku 100 bar, prinos ekstrakcije za sve uzorke se kreće u rasponu od 1,50 do 2,00%, dok na istoj temperaturi i većem pritisku od 300 bar, prinos ekstrakcije je od 2,07 do 5,60%. Porast pritiska od 100 do 300 bara pri konstantnoj temperaturi (40°C), odnosno porast gustine CO₂ od 0,628 do 0,909 kg/m³, dovodi do povećanja prinosa ekstrakcije za 2 do 3 puta. Sa povećanjem pritiska raste rastvorna moć CO₂ kao ekstragensa, što dovodi do boljeg rastvaranja komponenata veće molekulske mase (masne kiseline, masna ulja, kutikularni voskovi, pigmenti, fitosteroli i dr.) koje se ko-ekstrahuju sa lako isparljivim komponentama konstituentima etarskih ulja.

Tabela 16. Prinos superkritične ekstrakcije rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i njihove smeše (uzorak CBS)

Uzorak	100 bar, 40°C		300 bar, 40°C	
	masa (g)	Prinos ekstrakcije (% m/m)	masa (g)	Prinos ekstrakcije (% m/m)
<i>Satureja montana</i>	0,749 4	1,50	2,009 4	4,02
<i>Coriandrum sativum</i>	0,869 8	1,74	2,802 4	5,60
<i>Ocimum basilicum</i>	0,779 9	1,56	1,036 2	2,07
CBS*	1,001 8	2,00	2,144 3	4,29

*CBS – smeša biljnih droga (*C. sativum* + *O. basilicum* + *S. montana*)

Prinos ekstrakcije rtanjskog čaja (*S. montana*) na pritisku 100 bar i 40°C iznosio je 1,50%, dok je na 300 bar 2,5 veći i iznosio je 4,02%. Do sličnih rezultata u došli su Grosso i saradnici (2009) gde je na 100 bar i 40°C ostvaren prinos ekstrakcije od 1,8%. Vladić i saradnici (2016) su ekstrakcijom na pritisku od 100 i 300 bar i temperaturi od 40°C (veličina čestica 0,301 mm, protok CO₂ 0,194 kg/h i vreme ekstrakcije od 4,5 h) ostvarili prinose od 1,88 i 2,95%. Razlika u ostvarenim prinosisima može se objasniti na osnovu razlike u biljnom materijalu koji je kultivisan u različitim godinama.

Ekstrakcija korijandera (*C. sativum*) ugljendioksidom na pritisku od 100 bar i 40°C dala je prinos od 1,74%, dok je na istoj temperaturi i pritisku od 300 bar prinos od 5,60% bio oko 3 puta veći. Do sličnih rezultata došli su Pavlić i saradnici (2015), koji su u toku superkritične ekstrakcije korijandera na 100 bar i 40°C ostvarili prinos od 1,52%, dok je na 300 bar i 40°C taj prinos bio znatno veći, i iznosio 8,88%. Yepez i saradnici (2002), dobili su 1,43% ekstrakta pri ekstrakciji korijandera na pritisku od 115,5 bar i 311 K.

Superkritičnom ekstrakcijom bosiljka (*O. basilicum*) na 100 bara i 40°C ostvaren je prinos od 1,56%, a na 300 bar i istoj temperaturi on je iznosio 2,07%. Lachowicz i saradnici (1996) su u toku dvočasovne superkritične ekstrakcije bosiljka, koji je uzgajan u Australiji, dobili 0,51% ekstrakta na 103,3 bar i 40°C, a pri pritisku od 310 bar i temperaturi od 40°C ostvaren je prinos od 0,97%. Zeković i saradnici (2014) na temperaturi od 40°C i pritiscima od 100 do 300 bar, ostvarili su prinos ekstrakcije u rasponu od 0,72 to 1,29%, manje nego u ovom radu, gde je proces ekstrakcije vršen sa bosiljkom većeg srednjeg prečnika čestica ($d_p = 0.65$ mm).

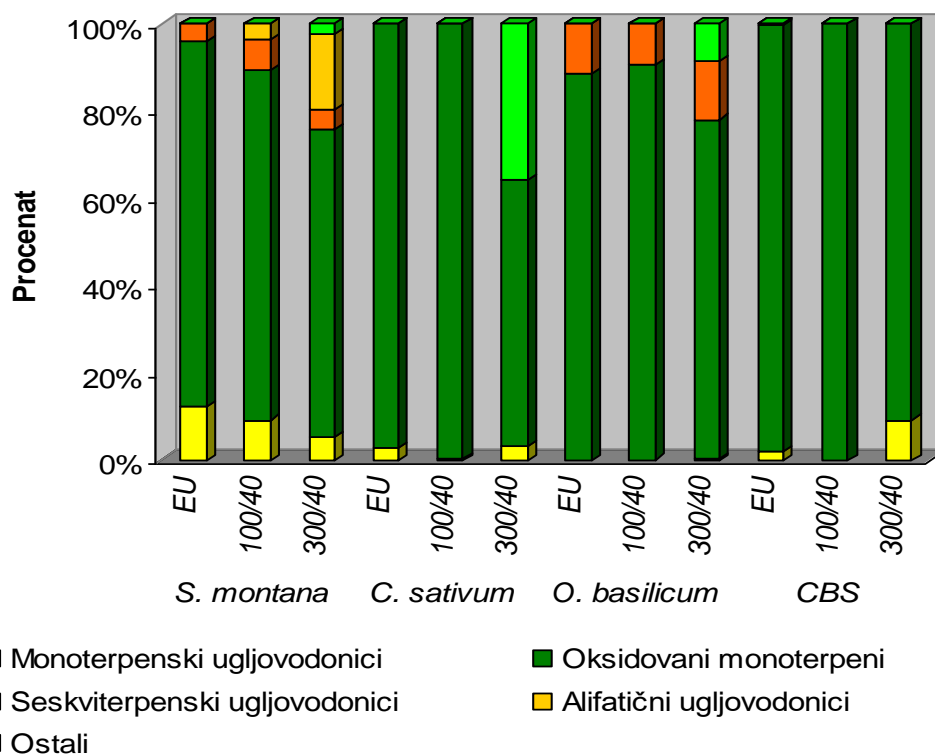
Superkritičnom ekstrakcijom biljne smeše (uzorak CBS) na 100 bara i 40°C dobijen je prinos od 2%, što ujedno predstavlja najveći, i za oko 25% veći prinos, ostvaren pri ovim uslovima od svih ispitivanih pojedinačnih biljnih droga. Prinos ekstrakcije smeše na 300 bar i 40°C je veći u poređenju sa prinosom rtanjskog čaja i bosiljka, a manji od prinosa korijandera. Dobijen prinos od 4,29% je dvostruko veći u odnosu na prinos ostvaren pri 100 bar i 40°C. Razlika u ostvarenim prinosima ekstrakcije biljne smeše i pojedinačnih biljaka je verovatno posledica razlike u biljnom matriksu, pri čemu je evidentan uticaj jedne od biljaka u biljnoj smeši na kinetiku i količinu ekstrahovanih komponenata.

4.3.2. Hemijska analiza ekstrakata

U cilju određivanja hemijskog profila dobijenih ekstrakata pomoću superkritičnog CO₂, primenjena je GC-MS metoda analize. Rezultati kvalitativnog i kvantitativnog sastava izolovanih ekstrakata rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i smeše navedene tri biljne droge dati su u tabelama 17-21 (hromatogrami su dati u Prilogu, slike P 2,3,5,6,8,9,11 i 12).

U ispitivanim ekstraktima identifikovan je različit broj komponenata. U ekstraktima rtanjskog čaja od 14 do 24, korijandera 8 – 10, bosiljka 14 – 27 i biljne smeše 4 – 12. Procenat ukupnih identifikovanih komponenta iznosio je za rtanjski čaj 87,03 - 81,06%, korijander 74,85 - 40,93%, bosiljak 63,33 – 55,40% i biljnu smešu 32,80 – 15,90%. Komponente prisutne u ekstraktima grupisane su u četiri osnovne grupe: monoterpenski ugljovodonici, oksidovani monoterpeni, seskviterpenski i alifatični ugljovodonici. U svim analiziranim ekstraktima dominantni su oksidovani monoterpeni sa relativnim udelima koji su se kretali za rtanjski čaj 69,84 – 57,08%, korijander 74,58 – 24,97%, bosiljak

57,20 – 42,96% i biljnu smešu 32,80 – 14,42%. U znatno nižim udelima prisutne su ostale grupe jedinjenja. Upoređujući hemijski profil ekstrakata pojedinačnih biljka i biljne smeše, dobijenih pri istim pritiscima (istim ekstrakcionim uslovima), može se zaključiti da se oni bitno razlikuju (slika 38). U ekstraktu biljne smeše na 100 bar, 40°C, relativni udeo oksidovanih monoterpena je najniži (32,80%) u odnosu na ekstrakte „čistih biljaka“ izolovanih pri istim ekstrakcionim uslovima. I u ekstraktu biljne smeše dobijenom na 300 bar, 40°C, takođe, je ostvaren najniži udeo oksidovanih monoterpena (14,42%) u odnosu na ekstrakte rtanjskog čaja, korijandera i bosiljka.



Slika 38. Odnos osnovnih klasa jedinjenja u ekstraktima i etarskim uljima rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i njihove smeše

Najdominantnija komponenta u ekstraktima rtanjskog čaja je bila karvakrol. Relativni udeo ove komponente u ekstraktima dobijenim na različitim pritiscima je 67,58 - 52,53%, što predstavlja kvantitativni sadržaj od 52,97% (m/m), odnosno 60,17 g/100 g ekstrakta. Prinos karvakrola pri različitim ekstrakcionim pritiscima je iznosio 794,55, odnosno 2.418,83 mg/100 g droge. Na osnovu

dobijenih rezultata može se uočiti da se primenom „blagih“ uslova ekstrakcije (100 bar, 40°C) ekstrahuje manja količina karvakrola, dok se korišćenjem CO₂ veće gustine ostvaruje veći prinos ekstrakcije i do 3 puta, usled veće rastvorljivosti karvakrola.

Imajući u vidu važnost karvakrola u pogledu njegovih mnogobrojnih bioloških efekata, u studijama koje su za cilj imale ispitivanje sastava superkritičnih ekstrakata rtanjskog čaja, autori navode sadržaj karvakrola kao najzastupljenije komponente: 41,70 – 64,50% (Grosso i sar., 2009), 52,70% (Silva i sar., 2009) i 53,00% (Coelho i sar., 2012). Rezultati ostvareni u ovom radu su u korelaciji sa prethodno navedenim.

Ostale komponente koje su u CO₂ ekstraktima sa udelom iznad 2% su *p*-cimen (7,13 -3,76%) i geraniol (2,40%). U ekstraktu rtanjskog čaja (300 bar, 40°C) evidentno je prisustvo alifatičnih ugljovodonika (eikozan, dokozan, oktakozan i nonakozan), među kojima je najveći udeo dokozana (9,04%) i oktakozana (2,98%). U ovom ekstraktu, detektovano je i prisustvo palmitinske kiseline (2,04%).

Komponenta koja je prisutna u manjem procentu (ali većim od 1%) je *trans*-kariofilen (2,80 – 1,18%).

U ekstraktima korijandera najzastupljenija komponenta je linalool sa relativnim udelom 20,41 – 66,47%. Kvantitativni sadržaj linaloola u ekstraktima iznosi 45,60 g/100 g ekstrakta (100 bar, 40°C), što predstavlja prinos ekstrakcije od 793,44 mg/100 g droge, i 29,12 g/100 g ekstrakta (300 bar, 40°C) sa prinosom ekstrakcije od 1.630,72 mg/100 g droge (tabela 19). Veći kvantitativni sadržaj linaloola u ekstraktu korijandera na nižem pritisku (100 bar) se može objasniti boljom rastvorljivošću monoterpena u superkritičnom ugljen-dioksidu pri „blažim“ ekstrakcionim uslovima.

Ostale komponente koje su u CO₂ ekstraktu (100 bar, 40°C) sa udelom iznad 2% su geraniol acetat (3,96%) i kamfor (2,00%). U ekstraktu korijandera dobijenom na većem pritisku (300 bar) detektovano je značajno prisustvo vitamina E u iznosu od 14,59%. U istom ekstraktu, detektovane su i komponente u manjem procentu, kao što su metil-havikol (1,44%), kamfor (1,10%) i geraniol acetat (1,05%).

Grosso i saradnici (2008) su primenom superkritične ekstrakcije (100 bar, 40°C, d=0,6 mm, 1,10 kg/h CO₂) u ekstraktima korijandera kao dominantne komponente detektovali linalool (75,3%), γ -terpinen (5,4%) i geranil acetat (2,5%). U prethodnim istraživanjima, Zeković i saradnici (2015) su u ekstraktima korijandera detektovali malo veći kvantitativni sadržaj linaloola od 53,20, 59,61 i 50,21 g/100 g ekstrakta, pri uslovima ekstrakcije 100 bar, 40°C i 0,2 kg/h CO₂, ispitujući uticaj veličine čestica (1,368; 0,775 i 0,631 mm) na prinos linaloola i ukupni prinos ekstrakcije. Pavlič i saradnici

(2015) su pri istim superkritičnim ekstrakcionim uslovima ostvarili značajno manji kvantitativni sadržaj linaloola od 9,00 g/100 g ekstrakta, što je prinos ekstrakcije od 136,80 mg/100 g droge. Kao prateće komponente u ovom ekstraktu izdvajaju se kamfor, geraniol i γ -terpinen.

U dobijenim ekstraktima bosiljka dominantna komponenta je linalool sa relativnim udelom 42,96-57,20%. Sadržaj linaloola pri nižem pritisku je 30,10 g/100 g ekstrakta, što predstavlja prinos od 469,56 mg/100 g droge, a na većem pritisku 37,90 g/100 g ekstrakta, što je prinos od 784,53 mg/100 g droge (tabela 20). Veći kvantitativni sadržaj linaloola pri većim pritiscima je posledica bolje rastvorljivosti linaloola u superkritičnom CO₂ veće gustine.

U ekstraktu bosiljka na 100 bar, 40°C prateće komponente su eugenol (7,14%), α -farnesen (3,23%), germakren D (1,65%) i spatulenol (1,15%). Ekstrakt bosiljka dobijen na većem pritisku sadržavao je α -bergamoten (2,62%), eukaliptol (2,08%), metil-havikol (1,15%), germakren D (1,09%) i spatulenol (1,08%). U istom ekstraktu detektovano je i prisustvo palmitinske kiseline (4,53%).

Diaz–Maroto i saradnici (2002) su primenom superkritične ekstrakcije (120 bar, 40°C) u ekstraktima bosiljka kao dominantne komponente detektovali linalool (30,73%) i eugenol (21,80%). Superkritičnom ekstrakcijom *O. basilicum* L. Mazutti i saradnici (2006) su u dobijenim ekstraktima odredili dominantne komponente: linalool (47,3%), estragol (25,4%) i eukaliptol (4,2%), čiji se sadržaj u ekstraktima menjao sa variranjem uslova ekstrakcije, odnosno variranjem gustine CO₂. Filip i saradnici (2014) su u ekstraktima bosiljka na 100 bar, 40°C ostvarili znatno niži sadržaj linaloola (16,6 g/100 g ekstrakta, tj. prinos od 119,35 mg/100 g droge).

U ekstraktima biljne smeše (uzorak CBS), najzastupljenija komponenta je linalool sa relativnim udelom 11,85 – 12,69% i karvakrol (12,36%), koji je ekstrahovan pri nižem pritisku. Kvantitativni sadržaj linaloola u ekstraktima iznosi 10,10 g/100 g ekstrakta (100 bar, 40°C), što predstavlja prinos ekstrakcije od 202,00 mg/100 g droge, i 10,20 g/100 g ekstrakta (300 bar, 40°C) sa prinosom ekstrakcije od 437,58 mg/100 g droge (tabela 21). Kvantitativni sadržaj karvakrola u ekstraktima iznosi 28,10 g/100 g ekstrakta (100 bar, 40°C), što predstavlja prinos ekstrakcije od 562,00 mg/100 g droge i 1,20 g/100 g ekstrakta (300 bar, 40°C) sa prinosom ekstrakcije od 51,48 mg/100 g droge. Za razliku od linaloola, čiji se sadržaj u ekstraktima gotovo nije promenio, sadržaj karvakrola opada sa porastom pritiska, tj. povećanjem gustine rastvarača.

Komponente koje su u ekstraktu biljne smeše zastupljene u većem relativnom udelu od 1% su *cis*- i *trans*-linalool oksid (3,58% i 4,99%). Takođe, kvantitativni sadržaj geraniola (6,10 g/100 g ekstrakta), γ -terpinena (4,20 g/100 g ekstrakta) i d-limonena (1,04 g/100 g ekstrakta) u ekstraktu na nižem pritisku nije zanemarljiv i on značajno opada sa porastom pritiska.

Upoređujući sastav ekstrakata biljne smeše sa ekstraktima dobijenim iz pojedinačnih biljaka, indikativno je da se oni bitno kvalitativno i kvantitativno razlikuju. Ovako različiti sastav ekstrakata biljne smeše upućuje na moguću različitu biološku aktivnost u odnosu na ekstrakt dobijen iz pojedinačne biljke, što su novija istraživanja i potvrdila (Ghosh i sar., 2016; Lubsandorzhieva i sar., 2013).

Tabela 17. Rezultati GC/MS analize CO₂ ekstrakata rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše (uzorak CBS)

Komponenta	Relativni udeo (%)							
	<i>S. montana</i>		<i>C. sativum</i>		<i>O. basilicum</i>		CBS	
	100 bar, 40°C	300 bar, 40°C	100 bar, 40°C	300 bar, 40°C	100 bar, 40°C	300 bar, 40°C	100 bar, 40°C	300 bar, 40°C
Monoterpenski ugljovodonici	8,013	4,203	0,268	1,378	0,096	0,257		1,474
α-Terpinen	0,401	0,049				0,040		
γ-Terpinen	0,480	0,395		0,923		0,064		0,545
p-Cimen	7,132	3,759	0,268	0,455	0,096	0,153		0,929
Oksidovani monoterpeni	69,842	57,084	74,581	24,966	57,204	42,96	32,796	14,425
Eukaliptol	0,704	0,168		0,327	0,821	2,083		0,47
Linalool	0,511	0,805	66,472	20,411	45,843	36,38	11,852	12,685
<i>cis</i> -Linalool oksid			0,722	0,382	0,666	0,436	3,584	0,088
<i>trans</i> -Linalool oksid			0,61	0,259	0,791	0,355	4,998	0,089
Kamfor			1,997	1,099	0,38	0,346		0,336
Bornilacetat					0,276	0,252		0
Terpinen 4-ol	0,702	0,577	0,428		0,381	0,520		0,257

α -Terpineol			0,391		0,411	0,567		0,133
δ -Terpineol	0,340	0,611				0,182		0,141
Geraniol		2,397				0,685		
Geraniol acetat			3,961	1,053				
Karvakrol	67,585	52,526					12,362	
Metil-havikol				1,435	0,499	1,154		0,226
Eugenol					7,136			
Seskviterpeni	5,849	3,853			6,031	7,483		
<i>Trans</i> -kariofilen	2,802	1,175						
β -Bisabolen	0,891	0,781						
δ -Kadinen	1,023	0,603						
α -Kariofilen		0,067				0,300		
α -Bergamoten		0,081				2,624		
Germakren D		0,062			1,653	1,088		
α -Farnesen					3,226	0,194		
α -Amorfen	0,550	0,286						
α -Murolen		0,046						

Spatulenol	0,583	0,694			1,152	1,082		
α -Selinen		0				0,090		
β -Selinen		0,058				0,672		
β -Eudesmol		0				0,468		
β -Elemen		0				0,965		
Alifatični ugljovodonici	3,331	13,88						
Eikozan	0,591	0,203						
Nonakozan	2,740	1,666						
Oktakozan		2,977						
Dokozan		9,034						
Ostali		2,041		14,588		4,702		
Palmitinska kiselina		2,041				4,531		
Vitamin E				14,588		0		
Metil linoleat						0,171		
Ukupno	87,035	81,061	74,849	40,932	63,331	55,402	32,796	15,899

Tabela 18. GC/FID analiza CO₂ ekstrakata rtanjskog čaja

Komponente	<i>Satureja montana</i>			
	100 bar, 40°C		300 bar, 40°C	
	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos ekstrakcije (mg/100 g droge)	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos ekstrakcije (mg/100 g droge)
<i>Monoterpeni ugljovodonici</i>	<0,01	<0,60	0,43	18,49
α-Pinen	<0,01	<0,15	<0,01	<0,40
β-Pinen	<0,01	<0,15	<0,01	<0,40
d-Limonen	<0,01	<0,15	<0,01	<0,40
γ-Terpinen	<0,01	<0,15	0,43	17,29
<i>Oksidovani monoterpeni</i>	3,29	49,80	0,36	15,68
Eukaliptol	0,09	1,35	<0,01	<0,40
Linalool	3,20	48,00	0,28	11,26
Kamfor	<0,01	<0,15	<0,01	<0,40
α-Terpineol	<0,01	<0,15	0,08	3,22
Geraniol	<0,01	<0,15	<0,01	<0,40
<i>Aromatični oksidovani monoterpeni</i>	52,97	794,85	60,17	2419,63
Metil-havikol	<0,01	<0,15	<0,01	<0,40
Karvakrol	52,97	794,55	60,17	2418,83
Eugenol	<0,01	<0,15	<0,01	<0,40
Ukupno	56,26	845,25	60,96	2453,80

Tabela 19. GC/FID analiza CO₂ ekstrakata korijandera

Komponente	<i>Coriandrum sativum</i>			
	100 bar, 40°C		300 bar, 40°C	
	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos ekstrakcije (mg/100 g droge)	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos ekstrakcije (mg/100 g droge)
<i>Monoterpeni ugljovodonici</i>	<0,04	<0,68	0,12	6,72
α-Pinen	<0,01	<0,17	<0,01	<0,56
β-Pinen	<0,01	<0,17	<0,01	<0,56
d-Limonen	<0,01	<0,17	<0,01	<0,56
γ-Terpinen	<0,01	<0,17	0,12	6,72
<i>Oksidovani monoterpeni</i>	45,93	799,18	29,94	1676,64
Eukaliptol	<0,01	<0,17	<0,01	<0,56
Linalool	45,60	793,44	29,12	1630,72
Kamfor	0,33	5,74	0,82	45,92
α-Terpineol	<0,01	<0,17	<0,01	<0,56
Geraniol	<0,01	<0,17	<0,01	<0,56
<i>Aromatični oksidovani monoterpeni</i>	<0,03	<0,51	1,32	74,48
Metil-havikol	<0,01	<0,17	1,12	62,72
Karvakrol	<0,01	<0,17	0,21	11,76
Eugenol	<0,01	<0,17	<0,01	<0,56
Ukupno	45,93	799,18	30,56	1757,84

Tabela 20. GC/FID analiza CO₂ ekstrakata bosiljka

Komponente	<i>Ocimum basilicum</i>			
	100 bar, 40°C		300 bar, 40°C	
	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos ekstrakcije (mg/100 g droge)	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos ekstrakcije (mg/100 g droge)
<i>Monoterpeni ugljovodonici</i>	0,10	1,56	2,74	56,72
α-Pinen	<0,01	<0,16	0,65	13,45
β-Pinen	<0,01	<0,16	0,48	9,94
d-Limonen	0,10	1,56	0,41	8,49
γ-Terpinen	<0,01	<0,16	1,20	24,84
<i>Oksidovani monoterpeni</i>	31,78	965,33	43,43	899,01
Eukaliptol	<0,01	<0,16	1,21	25,05
Linalool	30,10	469,56	37,90	784,53
Kamfor	0,56	8,74	1,71	35,40
α-Terpineol	0,41	6,40	1,70	35,19
Geraniol	0,71	11,07	0,91	18,84
<i>Aromatični oksidovani monoterpeni</i>	1,44	22,46	2,21	45,75
Metil-havikol	0,82	12,79	0,61	12,63
Karvakrol	0,62	9,67	1,20	24,84
Eugenol	<0,01	<0,16	0,40	8,28
Ukupno	31,64	493,58	48,38	1001,48

Tabela 21. GC/FID analiza CO₂ ekstrakata biljne smeše CBS

Komponente	CBS (<i>C. sativum</i> + <i>O. basilicum</i> + <i>S. montana</i>)			
	100 bar, 40°C		3000 bar, 40°C	
	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos ekstrakcije (mg/100g droge)	Sadržaj (g/100 g ekstrakta)	Prinos ekstrakcije (mg/100g droge)
<i>Monoterpenski ugljovodonici</i>	6,13	122,60	0,68	29,17
α-Pinen	0,53	10,60	0,18	7,72
β-Pinen	0,36	7,20	0,10	4,29
d-Limonen	1,04	20,80	0,20	8,58
γ-Terpinen	4,20	84,00	0,20	8,58
<i>Oksidovani monoterpeni</i>	17,45	349,00	10,94	469,31
Eukaliptol	0,32	6,40	0,21	9,00
Linalool	10,10	202,00	10,20	437,58
Kamfor	0,42	8,40	0,21	9,00
α-Terpineol	0,51	10,20	0,10	4,29
Geraniol	6,10	122,00	0,22	9,44
<i>Aromatični oksidovani monoterpeni</i>	28,62	572,40	1,43	61,35
Metil-havikol	0,52	10,40	0,12	5,15
Karvakrol	28,1	562,00	1,20	51,48
Eugenol	<0,01	<0,20	0,11	4,72
Ukupno	52,20	1044,00	13,05	559,83

4.3.3. Komparacija sastava etarskih ulja i ekstrakata

Upoređujući etarska ulja dobijena postupkom hidrodestilacije i ekstrakte izdvojene pri ekstrakcionim uslovima 100 bar i 40°C, može se uočiti da se oni razlikuju u kvalitativnim i kvantitativnom sastavu, iako se ovi ekstrakti mogu smatrati sličnim nativnim etarskim uljima. Broj identifikovanih jedinjenja u ekstraktima je manji u odnosu na EU. U slučaju biljne smeše u EU je identifikovano 14 komponenata, dok je u ekstraktu detektovano svega 4. Na osnovu dobijenih rezultata, takođe, se može zaključiti da je udeo monoterpenskih ugljovodonika, oksidovanih monoterpena i seskviterpenskih ugljovodonika kvantitativno manji u ekstraktu dobijenom superkritičnom ekstrakcijom u odnosu na udeo ovih grupa jedinjenja u nativnom etarskom ulju. U ekstraktu rtanjskog čaja dobijenom superkritičnom ekstrakcijom zastupljena su alifatična jedinjenja koja nisu prisutna u EU dobijenom destilacijom vodenom parom.

Udeo dominantnih komponenata u EU je veći u odnosu na ekstrakte. Udeo karvakrola u EU rtanjskog čaja je 75,41% a u ekstraktu 67,58%, linaloola u EU korijandera 86,09%, a u ekstraktu 66,47%, odnosno u EU bosiljka 59,65%, a u ekstraktu 45,84%. Njihov sadržaj je takođe veći u EU nego u ekstraktu. Sadržaj linaloola je manji u ekstraktima korijandera, bosiljka i biljne smeše (čak 4 puta manji), u odnosu na EU. S druge strane, u ekstraktu biljne smeše u odnosu na EU, dobijen je 2 puta veći prinos karvakrola (28,10 g/100 g ekstrakta u odnosu na 17,20 g/100 g EU), geraniola (6,10 g/100 g ekstrakta u odnosu na 2,90 g/100 g EU) i γ -terpinena (4,20 g/100 g ekstrakta u odnosu na 1,86 g/100 g EU).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se etarska ulja mogu dobiti i superkritičnom ekstrakcijom pri umerenim uslovima ekstrakcije (pritisak 90 do 100 bar i temperatura od 40 do 50°C) (Reverchon i de Marco, 2006). Prednost ovog postupka nad hidrodestilacijom je što nema termalne degradacije, oksidacije ili hidrolize lako isparljivih jedinjenja, konstituenata etarskog ulja. Stoga je ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom prepoznata kao odlična alternativa klasičnim postupcima ekstrakcije zbog svoje selektivnosti, efikasnosti i netoksičnosti. Danas postaje sve više aktuelna u oblastima dobijanja proizvoda u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

4.4. ISPITIVANJE DELOVANJA ETARSKIH ULJA I EKSTRAKATA

4.4.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost etarskog ulja i ekstrakata rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše (uzorak CBS) određena je neutralizacijom DPPH[•] radikala. Slobodni DPPH[•] radikali se najčešće upotrebljavaju u antioksidativnim testovima za određivanje sposobnosti prirodnih sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktima da predaju vodonikov atom slobodnim radikalima. Ova metoda je opšte prihvaćena i primenjiva zbog dostupnosti DPPH[•] radikala, tačnosti, osetljivosti i brzine.

Antioksidativni potencijal uzorka se izražava vrednošću IC₅₀ koji predstavlja koncentraciju (mg suvog ekstrakta po 1 mL) za neutralisanje 50% DPPH radikala. IC₅₀ vrednosti se dobijaju određivanjem RSC vrednosti na osnovu izmerenih vrednosti apsorbance prema prethodno datoj jednačini (vidi Eksperimentalni deo 3.6.), a zatim izračunavanjem iz jednačine linearne regresije. Manja IC₅₀ vrednost ukazuje na veću antioksidativnu aktivnost.

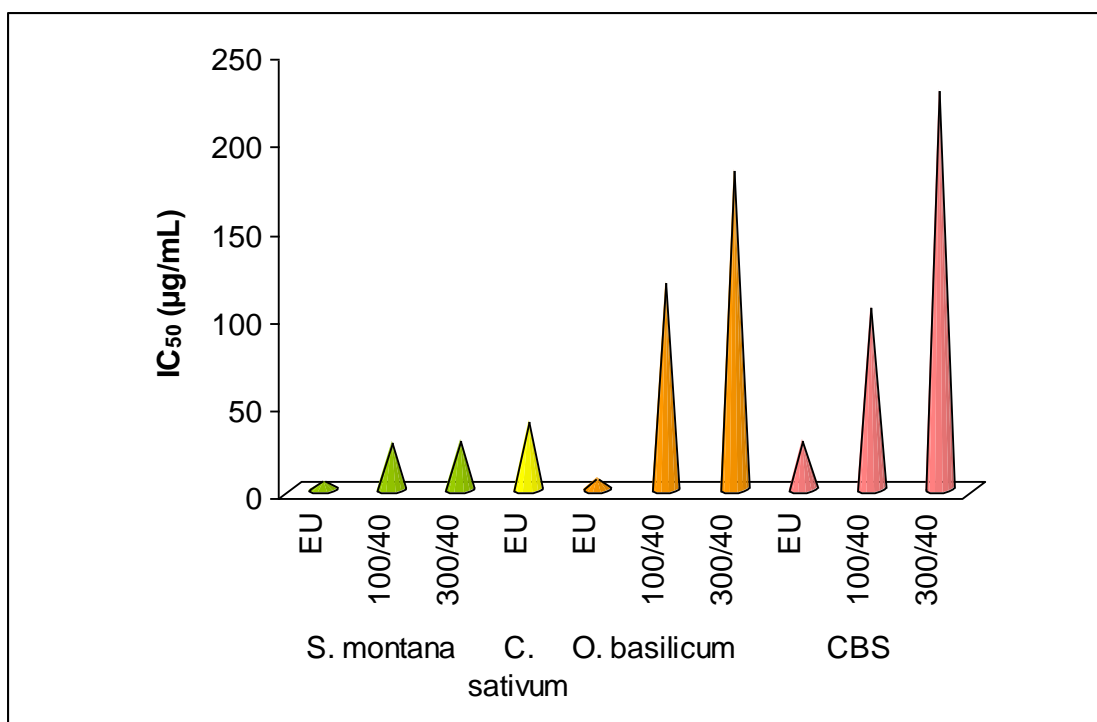
U tabeli 22 je dat prikaz antioksidativnog potencijala etarskog ulja i ekstrakata rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše (uzorak CBS) dobijenih pri različitim pritiscima superkritičnog CO₂ i konstantnoj temperaturi ekstrakcije.

Tabela 22. Antioksidativna aktivnost etarskog ulja i ekstrakata rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše (uzorak CBS)

Uzorak	Ekstrakt	IC ₅₀ [µg/mL]
<i>S. montana</i>	EU	5,05 ± 1,52
	SE (100 bar, 40°)	27,43 ± 3,48
	SE (300 bar, 40°)	28,71 ± 2,41
<i>C. sativum</i>	EU	39,12 ± 3,39
	SE (100 bar, 40°)	5,27 10 ³ ± 0,25
	SE (300 bar, 40°)	6,78 10 ³ ± 0,31
<i>O. basilicum</i>	EU	6,94 ± 1,27
	SE (100 bar, 40°)	118,52 ± 4,74
	SE (300 bar, 40°)	182,03 ± 6,98

CBS	EU	28,24 ± 2,17
	SE (100 bar, 40°)	104,90 ± 3,91
	SE (300 bar, 40°)	228,35 ± 6,72

IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata se kreće u rasponu od 5,05 do 6.780 µg/mL. Najveću antioksidativnu aktivnost su pokazali etarsko ulje rtanjskog čaja i bosiljka sa vrednošću IC₅₀ od 5,05 µg/mL i 6,94 µg/mL. Antioksidativna aktivnost etarskog ulja biljne smeše je 6 puta manja u odnosu na etarsko ulje rtanjskog čaja, ali veoma slična sa aktivnošću koju ima CO₂ ekstrakt dobijen na pritisku od 100 bara i 40°C (Slika 39). Sličnu aktivnost (približno iste vrednosti IC₅₀) pokazuju ekstrakti bosiljka i biljne smeše dobijeni pri istim ekstrakcionim uslovima 100 bar i 40°C, odnosno 300 bar i 40°C. Redosled antiradikalske aktivnosti ispitivanih uzoraka na DPPH* je sledeći: EU rtanjski čaj > EU bosiljka > ekstrakt (100/40) rtanjski čaj > EU CBS i ekstrakt (300/40) rtanjski čaj > EU korijandera > CBS ekstrakt (100/40).



Slika 39. Antioksidativni potencijal dobijenih ekstrakata i etarskih ulja

Poređenjem dobijenih rezultata sa literaturnim podacima utvrđeno je da EU rtanjskog čaja pokazuje veću aktivnost u odnosu na EU rtanjskog čaja sa područja Hrvatske (Ćavar i sar., 2008),

Portugalije (Serrano i sar., 2011), Francuske (Miladi i sar., 2013) i Rumunije (Trifan i sar., 2015). Grosso i saradnici (2009) su ispitivanjem ekstrakta rtanjskog čaja dobijenog pomoću CO₂ na 90 bar i 40°C, dobili IC₅₀ vrednost koja je 2 puta veća u odnosu na rezultate ovog rada. Visoka antioksidativna aktivnost EU rtanjskog čaja može se pripisati visokom sadržaju karvakrola i jedinjenjima koji pripadaju grupi aromatičnih oksidovanih monoterpena, koji deluju kao potentni „hvatači“ slobodnih radikala. Iako je karvakrol potvrđeni prirodni antioksidant, prisustvo ostalih komponenata, konstituenata EU, kao što su α- i γ-terpinen, limonen, *p*-cimen, linalool, odnosno njihovo sinergističko i/ili antagonističko delovanje treba uzeti u obzir (Vardar-Unlu i sar., 2003).

Etarsko ulje bosiljka pokazalo je sličnu antioksidativnu aktivnost sa rezultatima do kojih su došli Hussain i sar. (2008) i veću u odnosu na rezultate istraživanja sprovedene od strane Pripdeevch i sar. (2010), odnosno Filip i sar. (2016). Filip i sar. (2016) su ispitivanjem ekstrakta bosiljka dobijenog pomoću CO₂ na 100 bar i 60°C dobili IC₅₀ vrednost koja je 6 puta veća u odnosu na vrednosti dobijene u ovom radu. Razlika u aktivnostima dobijenih EU i ekstrakata, može se objasniti pre svega različitim kvalitativnim i kvantitativnim sastavom ekstrakata, odnosno različitim sadržajem linaloola i eugenola, komponenata visokog antioksidativnog kapaciteta.

Etarsko ulje korijandera pokazalo je najmanju antioksidativnost od svih ispitivanih biljaka. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima do kojih su došli Singh i saradnici (2015), odnosno Zeković i saradnici (2016). Poređenjem antioksidativne aktivnosti EU i ekstrakata može se zaključiti da ekstrakti korijandera ispoljavaju najmanju aktivnost prema DPPH[•] radikalu. Razlog tome je visok sadržaj neisparljivih i nepolarnih komponenata koje su ekstrahovane pomoću CO₂, kao što su masne kiseline, trigliceridi, tokoferoli i ostale lipidne komponente.

Na osnovu literaturnih podataka o IC₅₀ vrednostima dobro poznatih prirodnih i sintetičkih antioksidanata, može se zaključiti da je antioksidativna aktivnost EU rtanjskog čaja i bosiljka veća u odnosu na Vitamin C (16 µg/mL), BHT (24 µg/mL) (Khitam i sar., 2013) i kvercetin (10,6 µg/mL) (Perez-Rozes i sar., 2008). S druge strane, ekstrakt rtanjskog čaja pokazao je istu aktivnost kao i BHT, i time svrstao ovaj ekstrakt u jake prirodne antioksidante. Osim toga, ekstrakti bosiljka i biljne smeše (uzorak CBS) mogu biti razmotreni kao antioksidanti značajni za prehrambenu i farmaceutsku industriju.

4.4.2. Citotoksično dejstvo - MTT test

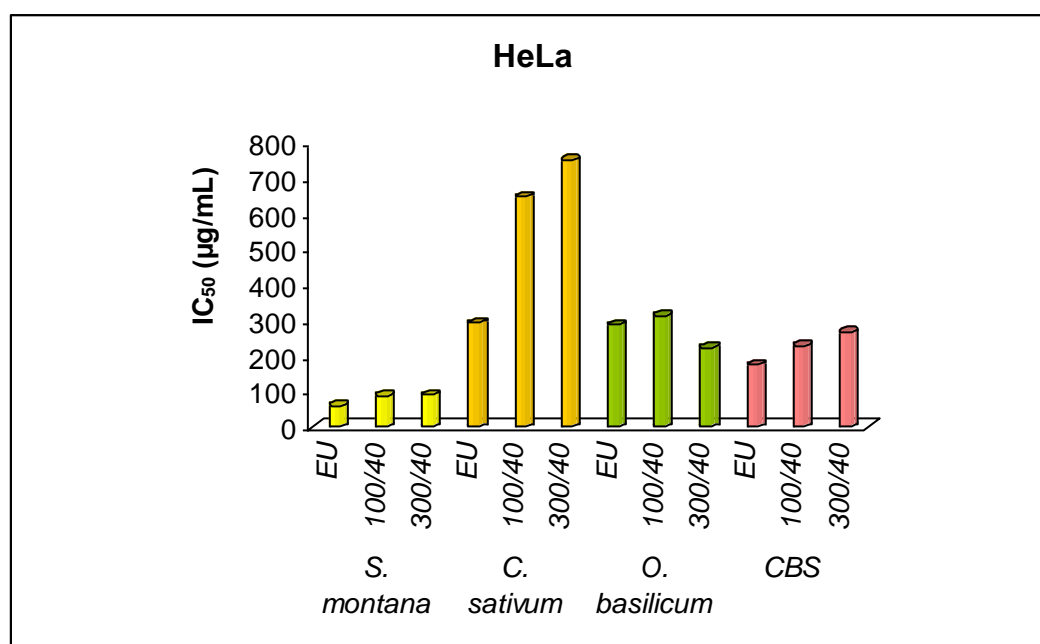
Antiproliferativna aktivnost etarskih ulja i CO₂ ekstrakta rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše ispitana je u *in vitro* uslovima na tri tumorske ćelije: HeLa (adenokarcinom cerviksa), MDA-MB-453 (adenokarcinom dojke), K562 (mijeloidna leukemija) i normalnih fibroblasta (MRC-5), u opsegu koncentracija od 62 do 1000 µg/mL. Rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti su dati u tabeli 23.

Tabela 23. Rezultati IC₅₀ vrednosti ispitivanih uzoraka rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše (uzorak CBS)

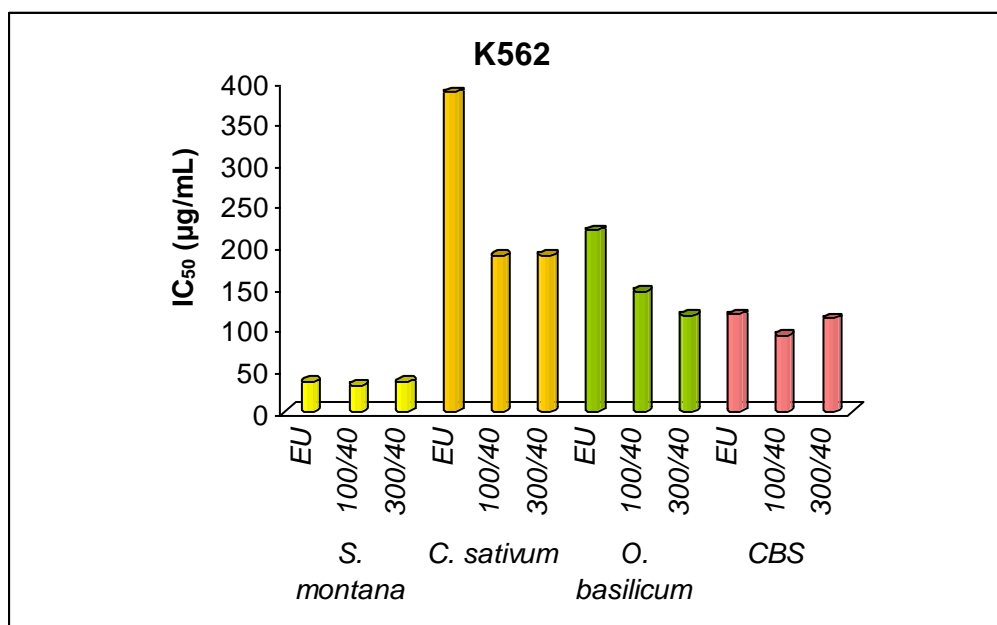
Uzorak	Ekstrakt	IC ₅₀ [µg/mL]*			
		HeLa	K562	MDA-MB-453	MRC-5
<i>S. montana</i>	EU	59,85 ± 8,55	35,70 ± 1,40	94,40 ± 6,70	81,25 ± 0,85
	SE (100 bar, 40°)	88,25 ± 10,85	31,70 ± 2,50	154,60 ± 13,90	109,90 ± 11,20
	SE (300 bar, 40°)	91,05 ± 3,85	35,80 ± 1,80	113,30 ± 7,60	152,30 ± 10,50
<i>C. sativum</i>	EU	292,85 ± 7,25	387,20 ± 57,20	697,40 ± 20,20	751,00 ± 6,00
	SE (100 bar, 40°)	647,50 ± 85,00	188,85 ± 2,15	777,70 ± 23,60	752,00 ± 58,60
	SE (300 bar, 40°)	751,60 ± 70,90	189,25 ± 7,35	925,20 ± 55,60	972,00 ± 26,00
<i>O. basilicum</i>	EU	285,70 ± 13,20	220,00 ± 2,50	536,50 ± 13,80	719,70 ± 9,10
	SE (100 bar, 40°)	312,85 ± 18,85	145,50 ± 10,70	610,60 ± 28,50	744,85 ± 35,25
	SE (300 bar, 40°)	223,45 ± 18,75	116,50 ± 3,70	386,95 ± 39,65	409,30 ± 40,40
CBS	EU	173,80 ± 8,90	117,55 ± 2,85	254,05 ± 30,25	351,40 ± 13,60
	SE (100 bar, 40°)	228,60 ± 1,40	92,10 ± 0,50	386,35 ± 29,55	383,20 ± 1,00
	SE (300 bar, 40°)	267,00 ± 13,90	112,65 ± 2,05	440,10 ± 40,10	484,05 ± 4,65

* IC₅₀ vrednost je izražena kao srednja vrednost ± SD za tri ponavljanja.

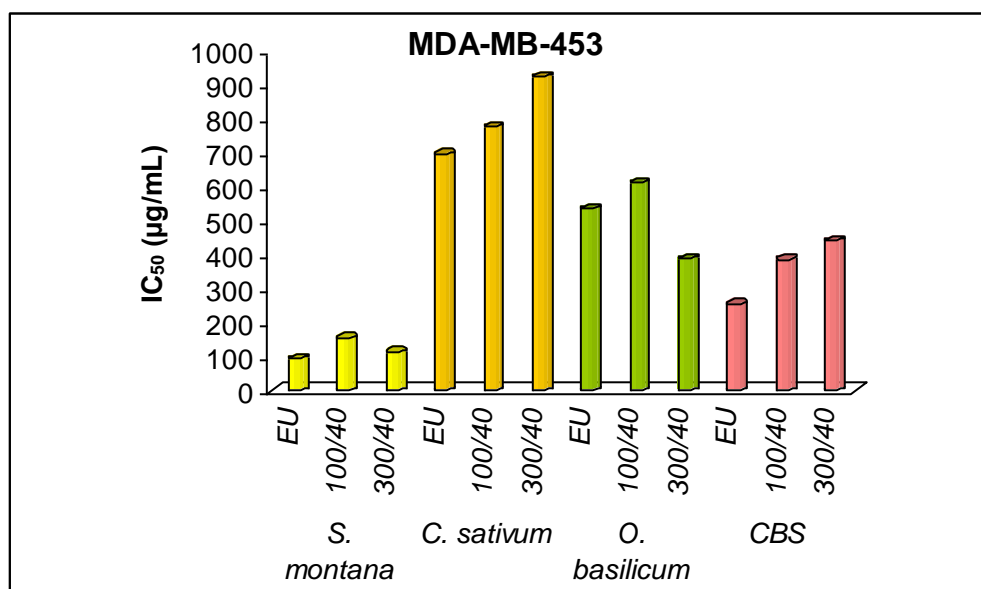
Iz prikazanih rezultat vidi se da je većina ispitivanih ekstrakta i etarskih ulja ispoljila antiproliferativnu aktivnost, ali je stepen zavisio od vrste ćelijske linije i koncentracije ekstrakta/EU. Najizraženiji inhibitorni efekat na rast sve tri linije tumorskih ćelija ispoljili su EU i ekstrakti rtanjskog čaja. Kod ispitivane ćelijske linija HeLa, aktivnost EU i ekstrakata je značajna u koncentraciji od 59,85 do 91,05 $\mu\text{g/mL}$, pri čemu je EU rtanjskog čaja za 1,5 put efikasnije od izolovanih ekstrakata. Zadovoljavajuću osetljivost prema istoj ćelijskoj liniji je pokazalo EU i ekstrakt bosiljka i biljne smeše (uzorak CBS) sa vrednošću IC_{50} koja se kreće u rasponu od 173 do 312 $\mu\text{g/mL}$. Redosled antiproliferativna aktivnosti ispitivanih uzoraka prema HeLa ćelijama je sledeća: EU *S. montana* > ekstrakti *S. montana* > EU CBS > ekstrakti CBS > EU *O. basilicum* > ekstrakti *O. basilicum*. Visoku i značajnu antiproliferativnu aktivnost na ćelije mijeloidne leukemije (K 562) ispoljili su EU i ekstrakti rtanjskog čaja ($\text{IC}_{50} = 31,70 - 35,80 \mu\text{g/mL}$), kao i EU i ekstrakti biljne smeše ($\text{IC}_{50} = 92,10 - 117,55 \mu\text{g/mL}$). Prema *American National Cancer Intitute* (NCI), kriterijum za citotoksičnu aktivnost ekstrakta je $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ (Itharat i sar., 2004), što zadovoljavaju EU i ekstrakti *S. montane*, te se mogu smatrati značajnim prirodnim antitumorskim agensima. Ekstrakti biljne smeše su pokazali za nijansu bolji inhibitorni efekat od EU na rast/preživljavanje K562 ćelija, iako je ona za 3 puta manja od aktivnosti koju je ispoljilo EU/ekstrakti rtanjskog čaja. U slučaju ćelija adenokarcinoma dojke (MDA-MB-453) i normalnih fibroblasta (MRC-5), EU i ekstrakti rtanjskog čaja su takođe pokazali najznačajniju aktivnost, dok su ostala EU i ekstrakti pokazali slabiji inhibitorni efekat. Sumirajući dobijene rezultate, može se zaključiti da se EU i ekstrakti rtanjskog čaja mogu smatrati najpotentnijim inhibitorima ćelijskog rasta ispitivanih tumorskih ćelija.



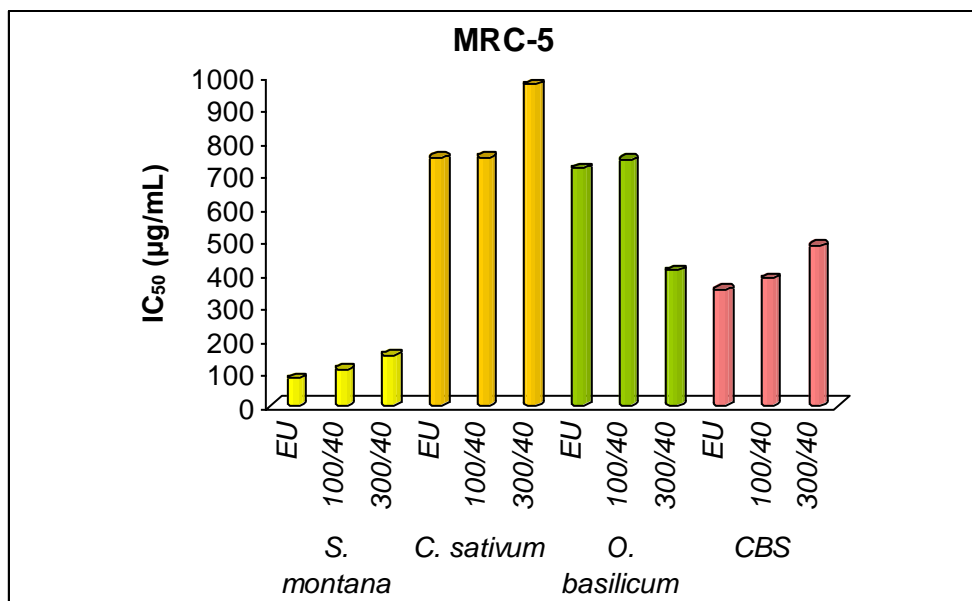
Slika 40. Uporedni prikaz uticaja etarskih ulja i ekstrakata na rast HeLa ćelija



Slika 41. Uporedni prikaz uticaja etarskih ulja i ekstrakata na rast K562 ćelija



Slika 42. Uporedni prikaz uticaja etarskih ulja i ekstrakata na rast MDA-MB-453 ćelija



Slika 43. Usporedni prikaz uticaja etarskih ulja i ekstrakata na rast MRC-5 ćelija

Poređenjem rezultata superkritičnih ekstrakata i EU rtanjskog čaja, bosiljka i biljne smeše (uzorak CBS), u slučaju 50% inhibicije ćelijskog rasta K562 ćelija, može se uočiti mala razlika u inhibitornom efektu na rast/preživljavanje testiranih ćelija. Ova činjenica je bitna, jer dokazuje da su osim lako isparljivih komponenata etarskog ulja, i druge nepolarne komponente prisutne u ispitivanom materijalu odgovorne za izrazitu citotoksičnu aktivnost ekstrakata. Ipak, teško je odrediti i utvrditi doprinos pojedinačnih komponenata na ukupan antikancerogeni efekat. Aktivnost ekstrakta je najčešće rezultat sinergističkog dejstva različitih jedinjenja.

Antiproliferativna aktivnost EU i ekstrakta rtanjskog čaja je poznata na osnovu ranijih istraživanja. Četojević-Simin i sar. (2004) su pokazali da različiti ekstrakti rtanjskog čaja ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost prema različitim tumorskim ćelijama i to: HeLa (adenokarcinom cerviksa), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom pluća). Citotoksični efekat EU rtanjskog čaja je potvrđen u istraživanju koje su sproveli Miladi i saradnici (2013) na ćelijama humanog adenokarcinoma pluća A549. Koparal i Zeytinoglu (2003) su pokazali da karvakrol, dominantno monoterpensko jedinjenje u rtanjskom čaju, predstavlja potentni inhibitor ćelijskog rasta A549 tumorskih ćelija. Do sličnog zaključka došli su Fitsiou i sar. (2016), pokazujući da je karvakrol inhibirao rast A549 tumorskih ćelija, dok su ćelije HEP3B (hepatocelularni karcinom) bile senzitivne prema timolu.

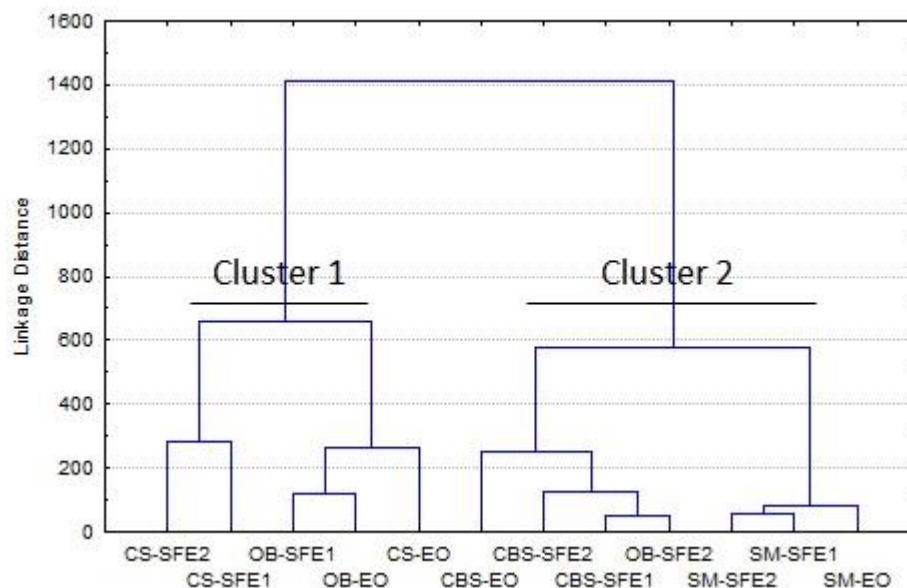
Pregledom literaturnih podataka, antiproliferativna aktivnost EU i etanolnog ekstrakta bosiljka ispitivana je *in vitro* od strane Zarlaha i saradnika (2014) na četiri linije humanih ćelija (HeLa – adenokarcinom cerviksa, FemX – melanom, K562 - mijeloidna leukemija i SKOV3 – karcinom ovarijuma). Pojedinačne komponente (eugenol, izoeugenol, linalool, rozmarinska i kafena kiselina) konstituenti etarskog ulja i ekstrakta bosiljka, prema tumorskim ćelijama ovariuma (SKOV3) pokazala su izrazitu citotoksičnu aktivnost. Rezultati *in vitro* antiproliferativne aktivnosti istih autora pokazala su da najjaču citotoksičnu aktivnost imaju eugenol, izoeugenol, linalool i kafeinska kiselina (Bhardwaj i sar., 2013).

Na osnovu prethodnih istraživanja koje su sproveli Gajula i saradnici (2009 i 2010) utvrđeno je hemoprotektivno dejstvo bosiljka na tumorske ćelije debelog creva. Istraživanja koja su sproveli Kathirvel i Ravi (2012) pokazali su da etarsko ulje bosiljka pokazuje citotoksično dejstvo na HeLa i HEP-2 tumorske ćelije.

Na osnovu prethodnih i rezultata dobijenih u okviru ovog rada može se zaključiti da se EU i ekstrakti rtanjskog čaja se mogu smatrati značajnim prirodnim preparatima u terapijskom lečenju određenih vrsta tumora.

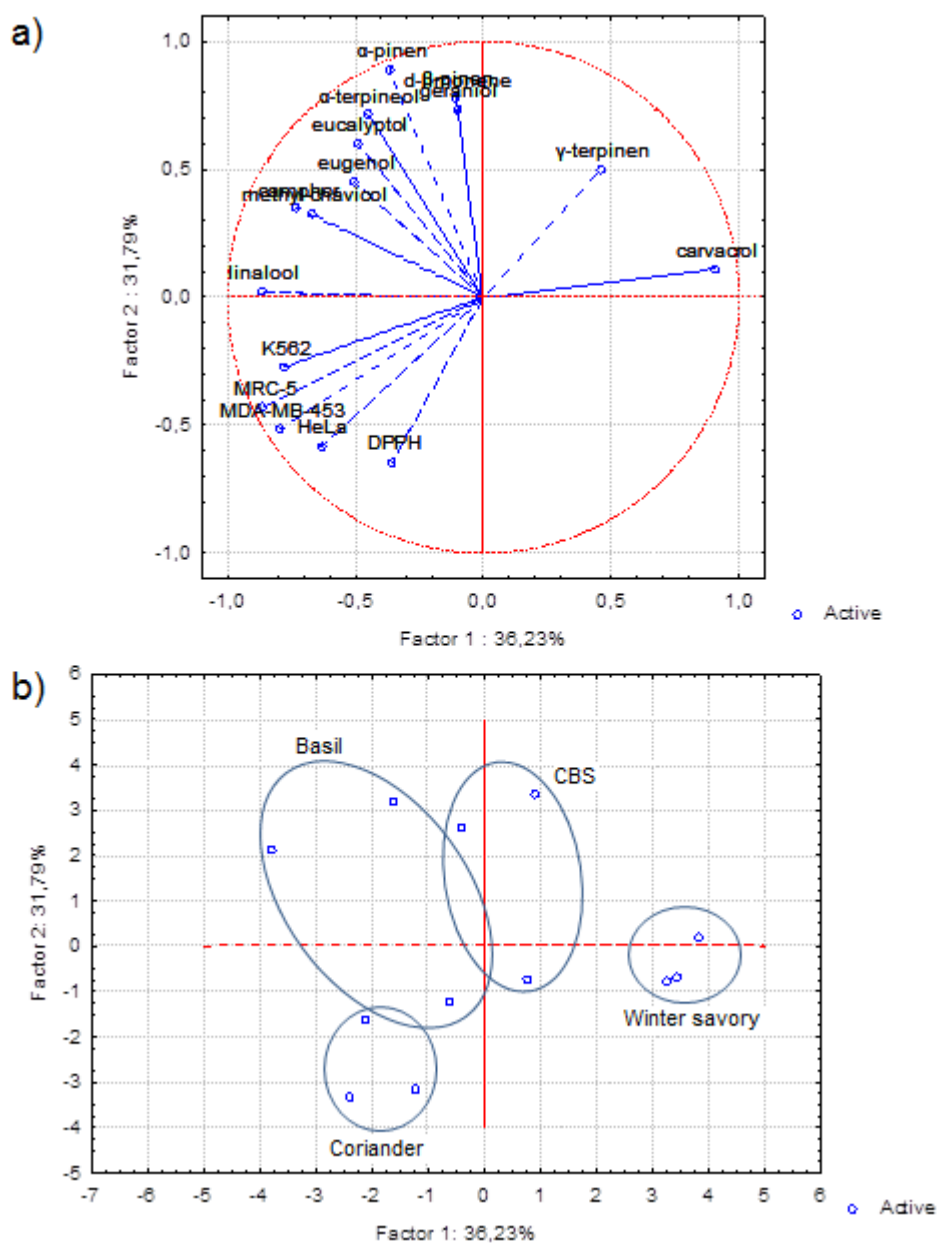
4.5. HEMOMETRIJSKA ANALIZA

U cilju boljeg određivanja sličnosti između etarskih ulja i lipofilnih ekstrakata korijandera, bosiljka, rtanjskog čaja i njihove smeše (uzorak CBS) na osnovu hemijskog profila terpenodinih jedinjenja, antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti su primenjene analiza glavnih komponenti (eng. Principal component analysis; PCA) i hijerarhijska klaster analiza (eng. Hierarchical cluster analysis; HCA). HCA je dala podelu etarskih ulja i lipofilnih ekstrakata na dve glavne grupe kao što je prikazano na slici 44. Uzorci u prvoj grupi (Cluster 1) se mogu podeliti na dve podgrupe: prvu čine ekstrakti korijandera dobijeni superkričnom ekstrakcijom, a drugu supekritični ekstrakt bosiljka dobijen na 100 bar i 40°C, kao i etarska ulja bosiljka i korijandera. Uzorci su u drugoj grupi (Cluster 2) takođe podeljeni u dve podgrupe (Slika 44). Etarsko ulje i superkrični ekstrakti rtanjskog čaja su jasno izdvojeni od ostalih uzoraka. U drugoj podgrupi se pored etarskih ulja i superkričnih ekstrakata smeše CBS nalazi i supekritični ekstrakt bosiljka dobijen na 300 bar i 40°C usled sličnosti u hemijskom sastavu, što je i očekivano s obzirom da uzorak CBS predstavlja smešu ispitivanih biljnih vrsta.



Slika 44. Dendrogram dobijen hijerarhijskom klaster analizom

Analiza glavnih komponenti je primenjena kao multivarijantna statistička tehnika u cilju razdvajanja etarskih ulja i lipofilnih ekstrakata i potencijalnog određivanja veze između terpenoidnih jedinjenja i biološke aktivnosti (antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti). Prema tome, parametri korišćeni za PCA su bili sadržaj terpenoidnih jedinjenja (α -pinen, β -pinen, d-limonen, eukaliptol, γ -terpinen, linalool, kamfor, α -terpineol, metil-havikol, geraniol, karvakrol i eugenol) u etarskim uljima i lipofilnim ekstraktima, antioksidativna aktivnost (IC_{50} vrednost prema DPPH radikalima) i antiproliferativna aktivnost (IC_{50} vrednost prema HeLa, MDA-MB-453, K562 i MRC-5 ćelijskim linijama). PCA je primenjena kako bi se smanjio broj dimenzija u kompleksnom sistemu sa 17 varijabli. Prve tri glavne komponente su obuhvatile 80% ukupne varijanse modela. Može se uočiti da su PC1 i PC2 obuhvatile 68% od ukupne varijanse modela (Slika 45), dok je PC3 obuhvatila svega 23,2% varijanse. PC1 je bila u negativnoj korelaciji sa svim parametrima izuzev sadržaja γ -terpinena i karvakrola (Slika 45a). Sa druge strane, PC2 je bila u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem svih pojedinačnih terpena, a u negativnoj korelaciji sa parametrima antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti (Slika 45a).



Slika 45. a) Grafik raspodele parametara i b) uzoraka etarskih ulja i ekstrakata u zavisnosti od

PC1 i PC2

Značajan uticaj na raspodelu uzoraka (etarskih ulja i superkritičnih ekstrakata) imala je vrsta biljnog materijala s obzirom da su etarska ulja i ekstrakti svake biljne vrste bili podeljeni u četiri podgrupe (korijander, bosiljak, rtanjski čaj i CBS) (Slika 45b). Podgrupe korijander i rtanjski čaj su bile jasno odvojene od ostalih, dok su grupe bosiljak i CBS pokazale umereno odstupanje od grupisanja i međusobno preklapanje (Slika 45b). Podgrupa rtanjski čaj je okarakterisana visokim sadržajem karvakrola (Slika 45), što je u skladu sa rezultatima dobijenim GC-FID analizom. Sa druge strane, podgrupa korijander je okarakterisana izuzetno visokim IC_{50} vrednostima parametara antioksidativne

i antiproliferativne aktivnosti, što ukazuje na slab bioaktivni potencijal etarskog ulja i superkričnih ekstrakata korijandera. S obzirom da je IC_{50} vrednost recipročni indikator antioksidativne aktivnosti, može se očekivati da će veliku aktivnost pokazati uzorci koji se nalaze u suprotnom (gornjem desnom) kvadrantu (Slika 15). U ovom kvadrantu se nalaze upravo podgrupe rtanjski čaj i CBS koje se odlikuju visokim sadržajem karvakrola, koji se može okarakterisati kao glavno jedinjenje odgovorno za antioksidativnu i antiproliferativnu aktivnost.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ove doktorske teze sprovedena su ispitivanja etarskih ulja i ekstrakata rtanjskog čaja (*S. montana*), korijandera (*C. sativum*), bosiljka (*O. basilicum*) i njihove smeše, hemijskog sastava, antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti u *in vitro* uslovima. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Postupkom hidrodestilacije je izdvojeno etarsko ulje rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i smeše sve tri aromatične biljne droge. Sadržaj EU u rtanjskom čaju iznosio je 1,15%, korijanderu 0,75%, bosiljku 0,67%, a u njihovoj smeši 0,78%. Kvalitativni i kvantitativni sastav etarskih ulja određen je GC/MS i GC/FID metodama. Identifikovano je od 14 do 21 komponente, među kojima su najzastupljeniji oksidovani monoterpeni u svim izolovanim EU. Dominantno jedinjenje u etarskom ulju rtanjskog čaja je karvakrol sa relativnim udelom 75,41% (GC-MS), odnosno sa sadržajem u etarskom ulju od 57,10% (m/m) (GC-FID) i prinosom destilacije od 656,65 mg/100 g droge. Dominantno jedinjenje u etarskim uljima korijandera i bosiljka je linalool sa relativnim udelom od 86,09% i 59,65%, odnosno sa sadržajem u etarskom ulju korijandera od 78,20% (m/m) (što je prinos od 586,50 mg/100 g droge) i bosiljka od 77,20% (m/m) (što je prinos od 517,24 mg/100 g droge). U etarskom ulju biljne smeše (uzorak CBS) dominantne komponente su linalool sa relativnim udelom od 87,59%, što je sadržaj od 42,20% (m/m) (prinos destilacije od 329,16 mg/100 g droge) i karvakrol sa 4,94%, što je sadržaj od 17,20% (m/m) (prinos destilacije od 134,16 mg/100 g droge). Ostale komponente sa manjim kvantitativnim sadržajem su: geraniol (2,90% (m/m)), γ -terpinen (1,86% (m/m)) i eugenol (1,53% (m/m)).

2. GC-MS analiza EU biljne smeše se u potpunosti razlikuje od EU rtanjskog čaja, korijandera i bosiljka. Pojedine komponente, kao što su α -pinen, β -pinen i d-limonen konstituenti EU biljne smeše, pokazuju veći sadržaj u uzorku CBS nego u etarskim uljima dobijenih iz pojedinačnih biljaka. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se hemijski profil EU biljne smeše kvalitativno i kvantitativno razlikuje od hemijskog profila etarskih ulja pojedinačnih biljnih droga.

3. Ekstrakcijom superkritičnim ugljendioksidom na temperaturi od 40°C i pritiscima od 100 i 300 bar, pri protoku CO₂ od 0,2 kg/h, vremenskom trajanju od 4 h, ostvareni su prinosi: 1,50 – 2% odnosno 2,07-5,60% za ekstrakte ispitivanih uzoraka pri različitim pritiscima od 100 i 300 bar i konstantnoj temperaturi. Zapaženo je da se sa povećanjem gustine CO₂ (porast pritiska pri izotermnom postupku) povećava prinos ekstrakcije, usled povećanja rastvorne moći ekstragensa. Superkritičnom ekstrakcijom biljne smeše na 100 bara dobijen je najveći prinos (i za 25% veći) od svih ispitivanih biljnih droga. Prinos ekstrakcije na 300 bar i 40°C je

veći u poređenju sa prinosom rtanjskog čaja i bosiljka, a niži od prinosa korijandera. Razlika u ostvarenim prinosima ekstrakcije biljne smeše i pojedinačnih biljaka je moguća posledica razlike u biljnom matriksu, pri čemu je evidentan uticaj jedne od biljaka u biljnoj smeši na kinetiku i prinos ekstrahovanih komponenata.

4. Superkritični ekstrakti su ispitani u pogledu hemijskog sastava primenom GC/MS analize. Identifikovane komponente prisutne u ekstraktima grupisane su u četiri osnovne grupe: monoterpeni ugljovodonici, oksidovani monoterpeni, seskviterpeni i alifatični ugljovodonici. U svim analiziranim ekstraktima dominantni su oksidovani monoterpeni (14,42-74,57%). Upoređujući hemijski profil ekstrakata pojedinačnih biljaka i biljne smeše, dobijenih pri istim pritiscima, može se zaključiti da se oni bitno razlikuju. U ekstraktima biljne smeše relativni udeo oksidovanih monoterpena je niži u odnosu na ekstrakte „čistih biljaka“ izolovanih pri istim ekstrakcionim uslovima.

5. Najdominantnija komponenta u ekstraktima rtanjskog čaja je karvakrol čiji je relativni udeo u opsegu 67,58-52,53%, dok je u ekstraktu korijandera i bosiljka najzastupljeniji linalool sa relativnim udelom od 20,41-66,47%, odnosno 36,38-45,84%. U ekstraktima biljne smeše najzastupljenija komponenta je linalool sa relativnim udelom od 11,85 do 12,69% i karvakrol (12,36%), koji je jedino ekstrahovan pri nižem pritisku. Komponente koje su u ekstraktu biljne smeše zastupljene u većem relativnom udelu od 1% su *cis*- i *trans*-linalool oksid (3,58% i 4,99%).

6. Primenom GC/FID metode analize utvrđen je kvantitativni sadržaj dominantnih konstituenata u ekstraktima. Ekstrakt rtanjskog čaja sa najvećim sadržajem karvakrola (60,17 g/100 g ekstrakta), što je ujedno i najveći prinos ekstrakcije (2418,83 mg/100g droge), dobijen je pri ekstrakcionim uslovima 300 bar, 40°C. Najveći kvantitativni sadržaj linaloola u ekstraktima korijandera (45,60 g/100 g ekstrakta) ostvaren je pri 100 bar, 40°C, što predstavlja prinos ekstrakcije od 793,44 mg/100 g droge. U ekstraktu bosiljka najveći sadržaj linaloola (37,90 g/100 g ekstrakta) ostvaren je na većem pritisku, što je prinos od 784,53 mg/100 g droge. U ekstraktu biljne smeše najveći sadržaj karvakrola (28,10 g/100 g ekstrakta) je dobijen na nižem pritisku i predstavlja prinos ekstrakcije od 562,00 mg/100 g droge, dok je sadržaj linaloola (10,20 g/100 g ekstrakta) ostvaren pri 300 bar i 40°C, sa prinosom ekstrakcije od 437,58 mg/100 g droge.

7. Antioksidativni potencijal etarskog ulja i ekstrakata rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše određena je neutralizacijom DPPH^{*} radikala. Najveću antioksidativnost su pokazali etarsko ulje rtanjskog čaja i bosiljka (IC₅₀ je 5,05 µg/mL i 6,94 µg/mL). Antioksidativna aktivnost EU biljne smeše je 6 puta manja u odnosu na EU rtanjskog čaja, ali veoma slična sa aktivnošću koju ima CO₂ ekstrakt rtanjskog čaja dobijen na pritisku od 100 bara i 40°C. Etarsko

ulje korijandera pokazalo je najmanje antioksidativno delovanje od svih ispitivanih biljaka. Poređenjem sa IC_{50} vrednostima poznatih antioksidanasa, može se konstatovati da EU rtanjskog čaja i bosiljka imaju potencijal primene kao prirodni antioksidansi. Ekstrakti bosiljka i biljne smeše, za koju je očekivani veći antioksidativni potencijal izostao, mogu se razmotriti kao antioksidansi značajni za prehrambenu i farmaceutsku industriju.

8. Antiproliferativna aktivnost etarskih ulja i ekstrakta rtanjskog čaja, korijandera, bosiljka i biljne smeše ispitana je u *in vitro* uslovima na tri tumorske ćelije: HeLa, MDA-MB-453, K562 i normalne fibroblaste (MRC-5). Najizraženiji inhibitorni efekat na rast sve tri linije tumorskih ćelija ispoljili su EU i ekstrakti rtanjskog čaja. Visoku i značajnu antiproliferativnu aktivnost na ćelije mijeloidne leukemije (K562) ispoljili su EU i ekstrakti rtanjskog čaja ($IC_{50} = 31,70 - 35,80 \mu\text{g/mL}$), kao i EU i ekstrakti biljne smeše ($IC_{50} = 92,10 - 117,55 \mu\text{g/mL}$). U slučaju ćelija adenokarcinoma dojke (MDA-MB-453) i normalnih fibroblasta (MRC-5), EU i ekstrakti rtanjskog čaja su takođe pokazali najznačajniju aktivnost, dok su ostala EU i ekstrakti pokazali slabiji inhibitorni efekat. Sumirajući dobijene rezultate, može se zaključiti da se EU i ekstrakti rtanjskog čaja mogu smatrati najpotentnijim inhibitorima ćelijskog rasta ispitivanih tumorskih ćelija, a time značajnim prirodnim preparatima u terapijskom lečenju određenih vrsta tumora.

9. U cilju boljeg određivanja sličnosti između etarskih ulja i lipofilnih ekstrakata na osnovu hemijskog profila terpenodinih jedinjenja, antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti su primenjene analiza glavnih komponenti i hijerarhijska klaster analiza. HCA je dala podelu etarskih ulja i lipofilnih ekstrakata na dve glavne grupe. Uzorci u prvoj grupi su ekstrakti korijandera, ekstrakt bosiljka dobijen na 100 bar i 40°C, kao i etarska ulja bosiljka i korijandera. Uzorci su u drugoj grupi su etarsko ulja i superkritični ekstrakti rtanjskog čaja i smeše CBS, kao i supekritični ekstrakt bosiljka dobijen na 300 bar i 40°C. PCA je primenjena kako bi se smanjio broj dimenzija u kompleksnom sistemu sa 17 varijabli. Prve tri glavne komponente su obuhvatile preko 80% ukupne varijanse modela. Može se uočiti da su PC1 i PC2 obuhvatile 68% od ukupne varijanse modela, dok je PC3 obuhvatila svega 23,2% varijanse.

6. *LITERATURA*

Abd El Tawab, A.M., Shahin, N.N., AbdelMohsen, M.M., 2014. Protective effect of *Satureja montana* extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Chem. Biol. Interact.* 224, 196–205.

Amin, A.R.M.R., Kucuk, O., Khuri, F.R., Shin, D.M., 2009. Perspectives for Cancer Prevention With Natural Compounds. *J. Clin. Oncol.* 27, 2712–2725.

Andrade, M., das Graças Cardoso, M., de Andrade, J., Silva, L., Teixeira, M., Valério Resende, J., da Silva Figueiredo, A., Barroso, J., 2013. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. *Antioxidants* 2, 384–397.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.

Baser, K., Buchbauer, G., 2009. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, 1st ed. CRC press, Boca Raton, Florida, USA.

Bevan, C.D., Marshall, P.S., 1994. The use of supercritical fluids in the isolation of natural products. *Nat. Prod. Rep.* 11, 451.

Bežić, N., Skočibušić, M., Dunkić, V., 2005. Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Bot. Croat.* 64, 313–322.

Bhardwaj, P., Alok, U., Khanna, A., 2013. *In vitro* cytotoxicity of essential oils: A review. *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 3(3), 675-681.

Brunner, G., 2005. Supercritical fluids: Technology and application to food procesing. *J. Food Eng.* 67, 21-33.

Coelho J. P., Cristino A. F., Matos P. G., Rauter A. P., Nobre B. P., Mendes R. L., Barroso J. G., Mainar A., Urieta J. S., Fareleira J. M. N. A, Sovová H., Palavra A. F. 2012. Extraction of volatile oil from aromatic plants with supercritical carbon dioxide: experiments and modeling. *Molecules*, 17, 10550-10573.

Coşkuner, Y., Karababa, E., 2007. Physical properties of coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *J. Food Eng.* 80, 408–416.

Četojević-Simin, D.D., Čanadanović-Brunet, J.M., Bogdanović, G.N., Četković, G.S., Tumbas, V.T., Đilas, S.M., 2004. Antioxidative and antiproliferative effects of *Satureja montana* L. extracts. J. BUON 9, 443–449.

Čavar S., Maksimović M., Šolić M.E., Jerković-Mujkić A., Bešta R. 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. Food Chem. 111, 648-653.

Četković, G.S., Mandić, A.I., Čanadanović-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Tumbas, V.T., 2007. HPLC Screening of Phenolic Compounds in Winter Savory (*Satureja montana* L.) Extracts. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 30, 293–306.

Darrah, H.H., 1980. The Cultivated Basils. Buckeye Printing Independence, MO.

Diaz-Maroto C., M., Perez-Coello S. M., Cabezudo D. M. 2002. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices, Comparison with simultaneous distillation–extraction. J. Chrom. A., 947, 23-29.

Dighe, R.D., Shiradkar, M.R., Rohom, S.S., Dighe, P.D., 2011. Synthesis and SAR of methyl linked cyclohexyl thiophenyl triazoles for their anti-alzheimer activity. Der Chem. Sin. 2, 70–87.

Dunkić, V., Kremer, D., Dragojević Müller, I., Stabentheiner, E., Kuzmić, S., Jurišić Grubešić, R., Vujić, L., Kosalec, I., Randić, M., Srećec, S., Bezić, N., 2012. Chemotaxonomic and Micromorphological Traits of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis . (*Lamiaceae*). Chem. Biodivers. 9, 2825–2842.

Eikani, M.H., Golmohammad, F., Rowshanzamir, S., 2007. Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). J. Food Eng. 80, 735–740.

Entela Haloc, I., Toska, V., Baldisserotto, A., Goci, E., Vertuani, S., Manfredini, S., 2014. Evaluation of antifungal activity of *Satureja montana* essential oil before and after inclusion in beta-cyclodextrine. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 6, 189–191.

Erler, F., Ulug, I., Yalcinkaya, B., 2006. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. Fitoterapia 77, 491–494.

Filip S., Vidović S., Adamović D., Zeković Z. 2014. Fractionation of non-polar compounds of basil (*Ocimum basilicum* L.) by supercritical fluid extraction (SFE), J. Supercrit. Fluid. 86, 85-90.

Filip S., Vidović S., Vladić J., Pavlić B., Adamović D., Zeković Z., 2016. Chemical composition and antioxidant properties of *Ocimum basilicum* L. extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction: drug exhausting method. J. Supercrit. Fluid. 109, 20-25.

Filip, S., 2014. Ekstrakcija bosiljka (*Ocimum basilicum*, *Lamiaceae*) ugljenedioksidom u sperkričnom stanju i modelovanje ekstrakcionog sistema. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki Fakultet.

Fitsiou E., Anastopoulos I., Chlichlia K., Galanis A., Kourkoutas I., Panayiotidis M.I., Pappa A. 2016. Antioxidant and antiproliferative properties of the essential oils of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica* and their major constituents. Anticancer Res. 36, 5757-5746.

Fleisher, A., 1981. Essential oils from two varieties of *Ocimum basilicum* L. Grown in Israel. J. Sci. Food Agric. 32, 1119–1122.

Gajula, D., Verghese, M., Boateng, J., Shackelford, L., Mentreddy, Sims, C., Asiamah, D., Walker L.T. 2010. Basil (*Ocimum basilicum* and *Ocimum tenuiflorum*) reduces azoxymethane induced colon tumors in fisher 344 male rats. Res. J. Phytochem. 4(3), 136-145.

Gajula, D., Verghese, M., Boateng, J., Walker L.T., Shackelford, L., Mentreddy, S.R., Cedric, S. 2009. Determination of total phenolics, flavonoids and antioxidant and chemoprotective potential of basil (*Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L.). Int. J. Immunother. Cancer Res. 5(4), 130-143.

Ghosh S., S. Dutta, P.K. Ghosh, P. Bhattacharjee, S. Das, 2016. Design of a polyherbal mix by supercritical carbon dioxide extraction and its encapsulation by spray draying: Phytochemical properties and shelf-life study of the encapsulate, J. Food Process Eng. 1-15.

Grayer, R.J., Kite, G.C., Veitch, N.C., Eckert, M.R., Marin, P.D., Senanayake, P., Paton, A.J., 2002. Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in *Ocimum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 327–342.

Grosso C., Figueiredo A.C., Burillo J., Mainar A.M., Urieta J.S., Barroso J.G., Coelho J.A., Palavra A.M.F., 2009. Enrichment of the thymoquinone content in volatile oil from *Satureja montana* using supercritical fluid extraction. *J. Sep. Sci.* 32, 328-334.

Grosso, C., Ferraro, V., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Coelho, J.A., Palavra, A.M., 2008. Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chem.* 111, 197–203.

Guenther, E., 1949. *The essential oils*. Robert E. Krieger Publ. Co., Malabar, Florida.

Harborne, J.B. (Jeffrey B., Baxter, H., Moss, G.P.), 1999. *Phytochemical dictionary : a handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor & Francis.

Hussain A.I., Anwar F., Sherazi S.T.H., Przybylski R. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of Basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations, *Food Chem.* 108, 986-995.

Igić, R., Vukov, D., 2000. *Praktikum iz sistematike viših biljaka*. Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.

Itharat, A., Houghton, P., Eno-Amoogaye, E., Burke, P., Sampson, J., Raman, A. 2004. *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plant used traditionally to treat cancer. *J. Ethopharmacol.* 90, 33-38.

Jančić, R., 2004. *Botanika farmaceutika*, Drugo izdanje. ed. Službeni glasnik, Beograd.

Jančić, R., 2013. *Botanika farmaceutika*. Službeni glasnik, Beograd.

Jayasinghe, C., Gotoh, N., Aoki, T., Wada, S., 2003. Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 51, 4442–4449.

Kathirvel P., Ravi S. (2012). Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its *in vitro* cytotoxicity against HeLa and Hep-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Nat. Prod. Res.* 26(12), 1112-1118.

Keita, S.M., Vincent, C., Schmit, J.-P., Belanger, A., 2000. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suave* L. in the Republic of Guinea. *Flavour Fragr. J.* 15, 339–341.

Kelm, M.A., Nair, M.G., Strasburg, G.M., DeWitt, D.L., 2000. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine* 7, 7–13.

Khitam J.H., Shahlah J.A.A.S., Raad A.K., Javed A., Mohd J., Showkat R.M. (2013). Essential oil composition and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* from Iraq. *Int. Res. J. Pharm.* 4, 117-120.

King, J.W., 2002. Supercritical fluid extraction: Present status and prospects. *Grasas y Aceites*. 53, 8–21.

Koparal A.T., Zeytinoglu M. (2003). Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. *Cytotechnology*, 43, 1-3, 149-154.

Kustrak, D., Kuftinec, J., Blazevic, N., Maffei, M., 1996. Comparison of the Essential Oil Composition of Two Subspecies of *Satureja montana*. *J. Essent. Oil Res.* 8, 7–13.

Lachowicz, K.J.; Jones, G.P.; Briggs, D.R.; Bienvenu, F.E.; Palmer, M.V.; Ting, S.S.; Hunter, M., (1996). Characteristics of essential oil from basil (*Ocimum Basilicum* L.) grown in Australia. *J. Agric. Food Chem.* 44 (3), 877-881.

Lang, Q., Wai, C., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-a practical review. *Talanta* 53, 771–782.

Lawrence, B., Hogg, J., Terhune, S., Pichitakul, N., 1972. Essential Oils and Their Constituents. IX. The Oils of *Ocimum sanctum* and *Ocimum basilicum* from Thailand. *Flavor Ind.* 47–49.

Lawrence, B.M., 1988. A World Perspective. Proceedings of the 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours, in: Proceedings of the 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours. Elsevier Sciences Publisher B.V, Washington, DC, p. 161.

Leal, P. F., Chaves, F. C. M., Ming, L. C., Petenate, A. J., Meireles, M. A. 2006. Global yields, chemical compositions and antioxidant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) extracts obtained by supercritical fluid extraction. *J. Food Process Eng.* 29(5), 547-559.

Leal, P.F., Maia, N.B., Carmello, Q.A.C., Catharino, R.R., Eberlin, M.N., Meireles, M.A.A., 2008. Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction (SFE): Global Yields, Chemical Composition, Antioxidant Activity, and Estimation of the Cost of Manufacturing. *Food Bioprocess Technol.* 1, 326–338.

Lee, J., Scagel, C.F., 2009. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chem.* 115, 650–656.

Liu, R.H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* 134, 3479S–3485S.

Lubsandorzheva P.B., N.B. Boldanova, Zh. B. Dashinamzhilov, 2013. Chemical composition and *in vitro* antioxidant activity of essential oil from a hepatoprotective herbal mix. *Pharm. Chem. J.* 47, 58-61.

Luque de Castro, M., Jimenéz-Carmona, M., 2000. Where is supercritical fluid extraction going? *TrAC Trends Anal. Chem.* 19, 223–228.

Mandal, S., Mandal M., 2015. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Chemistry and biological activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5(6), 421-428.

Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E., 1996. Differences in Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian Cultivars Related to Morphological Characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3926–3929.

Mastelić, J., Jerković, I., 2003. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. *Food Chem.* 80, 135–140.

Mazutti, M., Beledelli, B., Mossi, A.J., Cansian, R.L., Dariva, C., de Oliveira, J.V. 2006. Chemical characterization of *Ocimum Basilicum* L. extracts obtained by high pressure CO₂ extraction. *Quim. Nova.* 29, 6, 1198-1202.

Mehta, R.G., Murillo, G., Naithani, R., Peng, X., 2010. Cancer Chemoprevention by Natural Products: How Far Have We Come? *Pharm. Res.* 27, 950–961.

Mihajilov-Krstev, T., 2009. Hemijski sastav i antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta roda *Satureja* L. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.

Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Jovanović, V., Mitić, V., Stojanović-Radić, Z., Zlatković, B., 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidative and

anticholinesterase activity of *Satureja Montana* L. ssp montana essential oil. Open Life Sci. 9, 668–677.

Miladi H., Ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E. 2013. Chemical composition and cytotoxic and antioxidant activities of *Satureja montana* L. essential oil and its antibacterial potential against *Salmonella* Spp. strains. J Chem. 2013, 1-9.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63.

Nebedum, J., Ajeigbe, K., Nwobodo, E., Uba, C., Adesanya, O., Fadare, O., Ofusori, D., 2009. Comparative Study of the Ethanolic Extracts of Four Nigerian Plants Against Some Pathogenic Microorganisms. Res. J. Med. Plant 3, 23–28.

Neergheen, V.S., Bahorun, T., Taylor, E.W., Jen, L.-S., Aruoma, O.I., 2010. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. Toxicology 278, 229–241.

Nguefack, J., Budde, B.B., Jakobsen, M., 2004. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. Lett. Appl. Microbiol. 39, 395–400.

Nikolovski, B., 2009. Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz bobica kleke (*Juniperus communis*) i semenki tikve (*Cucurbita pepo*) natkričnim ugljendioksidom. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.

Norhuda, I., Jusoff, K., 2009. Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) as a clean technology for palm kernel oil extraction. J. Biochem. Technol. 1, 75–78.

Oganesyan, E.T., Nersesyan, Z.M., Parkhomenko, A.Y., 2007. Chemical composition of the above-ground part of *Coriandrum sativum*. Pharm. Chem. J. 41, 149–153.

Ohno, M., Abe, T., 1991. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). J. Immunol. Methods. 145(1-2), 199-203.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 18, 414–420.

Paton, A., 1992. A Synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. Kew Bull. 47, 403.

Pavlič, B., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Zeković, Z., 2015. Isolation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil by green extractions versus traditional techniques. J. Supercrit. Fluids. 99, 23–28.

Pekić, B., 1983. Hemija i tehnologija farmaceutskih proizvoda (alkaloidi i etarska ulja). Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad.

Perez-Rozes R., Risco E., Roser V., Penalver P., Cnigueral S. (2008). Antioxidant activity of eleven essential oils by two different *in vitro* assays. 39th International Symposium on Essential Oils, Quedingburg, Germany.

Pripdeevech P., Chumpolsri W., Suttiarporn P., Wongpornchai S. (2010). The chemical composition and antioxidant activities of basil from Thailand using retention indices and comprehensive two-dimensional gas chromatography. J. Serb. Chem. Soc. 75, 1503-1513.

Radonic, A., Milos, M., 2003. Chemical composition and antioxidant test of free and glycosidically bound volatile compounds of savory (*Satureja montana* L. subsp. montana) from Croatia. Nahrung/Food. 47, 236–237.

Rai, M.K., Qureshi, S., Pandey, A.K., 1999. In vitro susceptibility of opportunistic *Fusarium* spp. to essential oils. Mycoses 42, 97–101.

Reverchon, E., De Marco, I. 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. J. Supercrit. Fluids. 38: 146 – 166.

Rice-Evans, C., Packer, L., 2003. Flavonoids in health and disease. CRC press, Boca Raton, Florida, USA.

Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2009. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction - A review. J. Food Eng. 95(2), 240-253

Sánchez, E., García, S., Heredia, N., 2010. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 76, 6888–94.

Serrano C., Matos O., Teixeira B., Ramos C., Neng N., Nogueira J., Leonor Nunes M., Marques A. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. J. Sci. Food Agric. 91, 1554-1560.

Silva, F.V.M., Martins, A., Salta, J., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Mira, D., Gaspar, N., Justino, J., Grosso, C., Urieta, J.S., Palavra, A.M.S., Rauter, A.P., 2009. Phytochemical Profile and Anticholinesterase and Antimicrobial Activities of Supercritical versus Conventional Extracts of *Satureja montana*. J. Agric. Food Chem. 57, 11557–11563.

Simon, J.E., Chadwick, A.F., Craker, L.E., 1984. Herbs: an indexed bibliography, 1971-1980 : the scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the Temperate Zone. Archon Books.

Simon, J.E., Quinn, J., Murray, R.G., 1990. Basil: A source of essential oils. Advances in new crops. Timber Press, Portland.

Singh K., Rani R., Bansal S., Medhe S., Srivastava M.M. 2015. Antioxidant activity of essential oil of *Coriandrum sativum* and standardization of HPTLC method for the estimation of major phytomarkers. J. Anal. Chem. 70(2), 220-224.

Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S., 2002. Primena nadkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji. Hem. Ind. 56, 179–190.

Skočibušić, M., Bezić, N., 2004. Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. Phyther. Res. 18, 967–970.

Sovová, H., Stateva, R.P., 2011. Supercritical fluid extraction from vegetable materials. Rev. Chem. Eng. 27, 79–156.

Stanić, G., Blažeković, B., Knežević, S. V., 2004. Anatomical and phytochemical characterization of *Satureja montana* L. subsp. *montana* and *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis. subsp. *liburnica*. Farm. Glas. Glas. Hrvat. Farm. društva 60, 593–602.

Surh, Y.J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat. Rev. Cancer 3, 768–780.

Šilić, C., 1979. Monografija roda *Satureja* L., *Calamintha* Miller, *Micromeria* Benth., *Acinos* Miller i *Clinopodium* L. u flori Jugoslavije. Zemaljski muzej BiH, Sarajevo.

Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M., Impicciatore, M., 2006. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. Life Sci. 78, 1419–1432.

Trifan, A., Aprotosoie, A.C., Brebu M., Cioancă, O., Gille, E., Hăncianu, M., Miron, A., 2015. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from Romanian *Satureja montana* L. Farmacia 63, 413-416.

Tucakov, J., 1990. Lečenje biljem, fitoterapija. Beograd.

Umerie, S.C., Anaso, H.U., Anyasoro, L.J.C., 1998. Insecticidal potentials of *Ocimum basilicum* leaf-extract. *Bioresour. Technol.* 64, 237–239.

Vardar-Unlu G., Candan F., Sokmen A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen M.N., Donmez E., Tepe B. (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 63–67.

Vitas, J.S., Malbaša, R. V., Lončar, E.S., Kravić, S.Ž., Milanović, S.D., 2011. Fatty acids in milk products obtained by kombucha cultivated on winter savory tea. *Prehrambena Ind.* 22, 25–28.

Vladić J., Zeković Z., Jokić S., Svilović S., Kovačević S., Vidović S. 2016. Winter savory: Supercritical carbon dioxide extraction and mathematical modeling of extraction process. *J. Supercrit. Fluids.* 117, 89-97.

Volpato, G., Damasceno, D., Calderon, I., Rudge, M.V.C., 2002. Review of Brazilian plants with proven hypoglycemic effect in the control of diabetes mellitus. *Rev. Bras. Plantas Med.* 4, 35–45.

Wakao, N., Kaguei, S., 1983. Heat and mass transfer in packed beds. Gordon and Breach Science Publishers.

Wang, L., Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* 17(6), 300-312.

Wongsa, P., Chaiwarit, J., Zamaludien, A., 2012. *In vitro* screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chem.* 131, 964–971.

Yepez, B., Espinosa, M., López, S., Bolanos, G., 2002. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilib.* 194–197, 879–884.

Yun, Y.S., Nakajima, Y., Iseda, E., Kunugi, A., 2003. Determination of Antioxidant Activity of Herbs by ESR. *J. Food Hyg. Soc. Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* 44, 59–62.

Zarlaha A., Kourkoumelis N., Stanojković T.P., Kovala-Demertzi D. 2014. Citotoxic activity of essential oil and extracts of *Ocimum basilicum* against human carcinoma cells. Molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor. *Dig. J. Nanomater. Bios.* 9(3) 907-917.

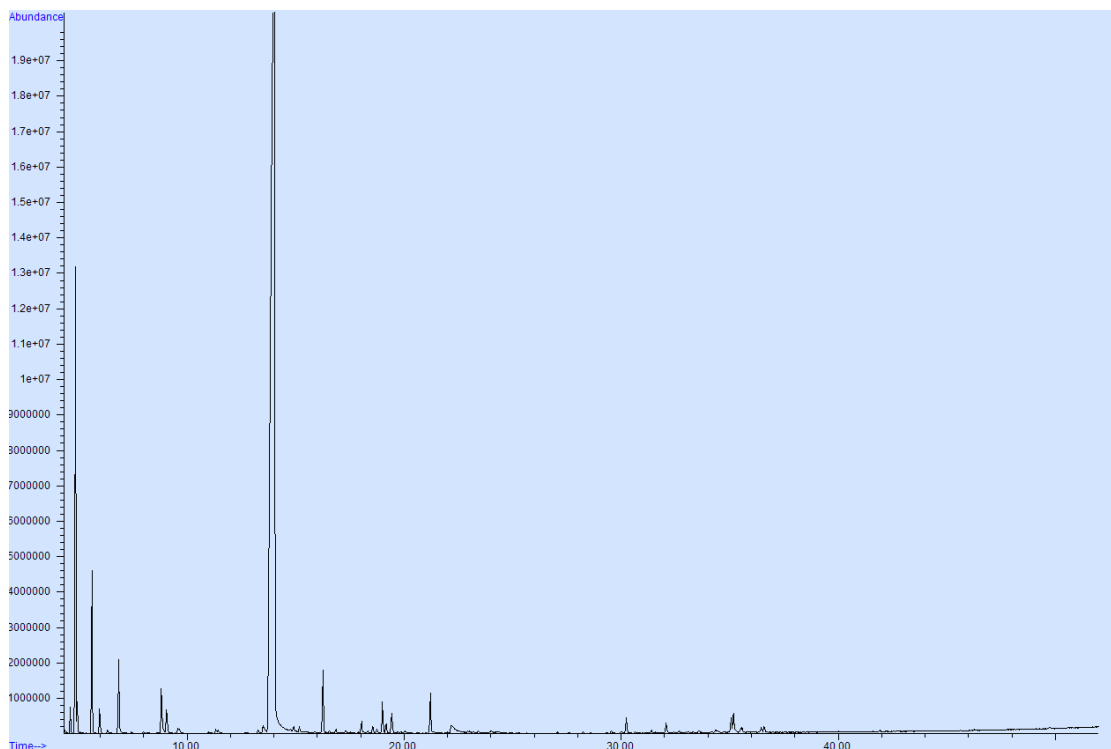
Zeggwagh, N.A., Sulpice, T., Eddouks, M., Pnpe, U.F.R., 2007. Anti-hyperglycaemic and Hypolipidemic Effects of *Ocimum basilicum* Aqueous Extract in Diabetic Rats Physiogenex , Toulouse , France. Am. J. Pharmacol. Toxicol. 2, 123–129.

Zeković Z., Bušić A., Komes D., Vladić J., Adamović D., Pavlić B. 2015. Coriander seeds processing: sequential extraction of non-polar and polar fractions using supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound-assisted extraction. Food Bioprod. Process. 95, 218–227

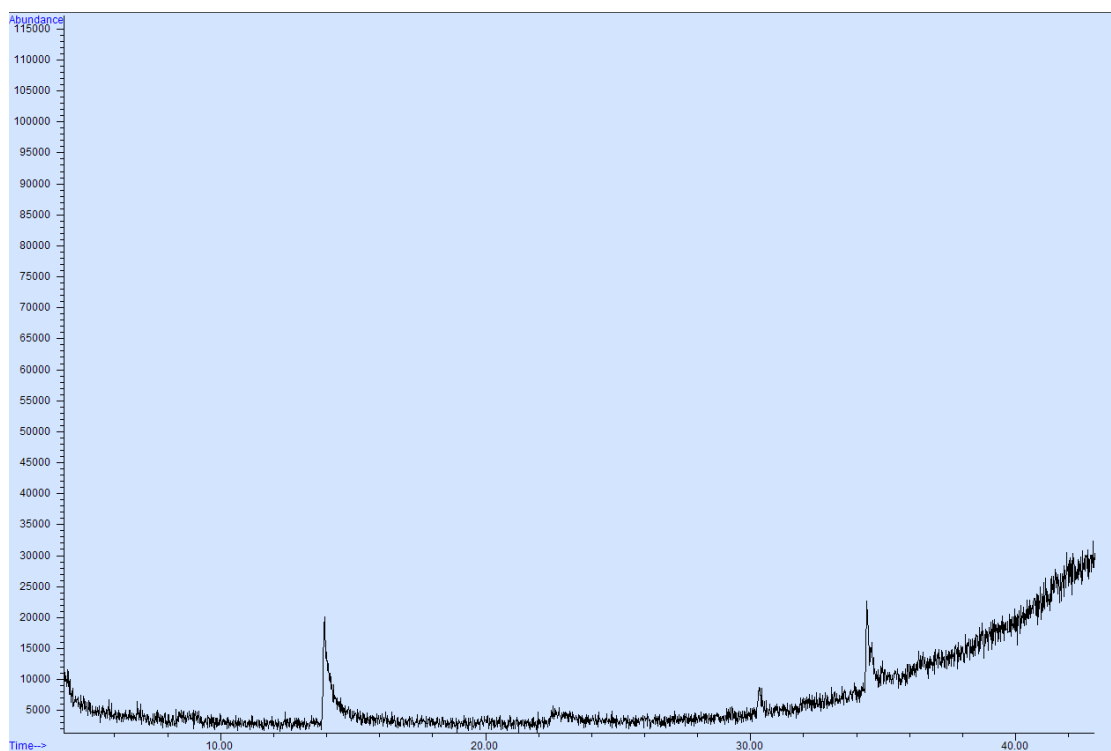
Zeković Z., Pavlić B., Cvetanović A., Đurović S. 2016. Supercritical fluid extraction of coriander seeds: Process optimization, chemical profile and antioxidant activity of lipid extracts. Ind. Crops and Prod. 94, 353-362.

Zeković Z., Filip S., Vidović S., Jokić S., Svilović S., 2014. Mathematical modeling of *Ocimum basilicum* L. supercritical CO₂ extraction. Chem. Eng. Technol., 37(12), 2123-2128.

7. PRILOG

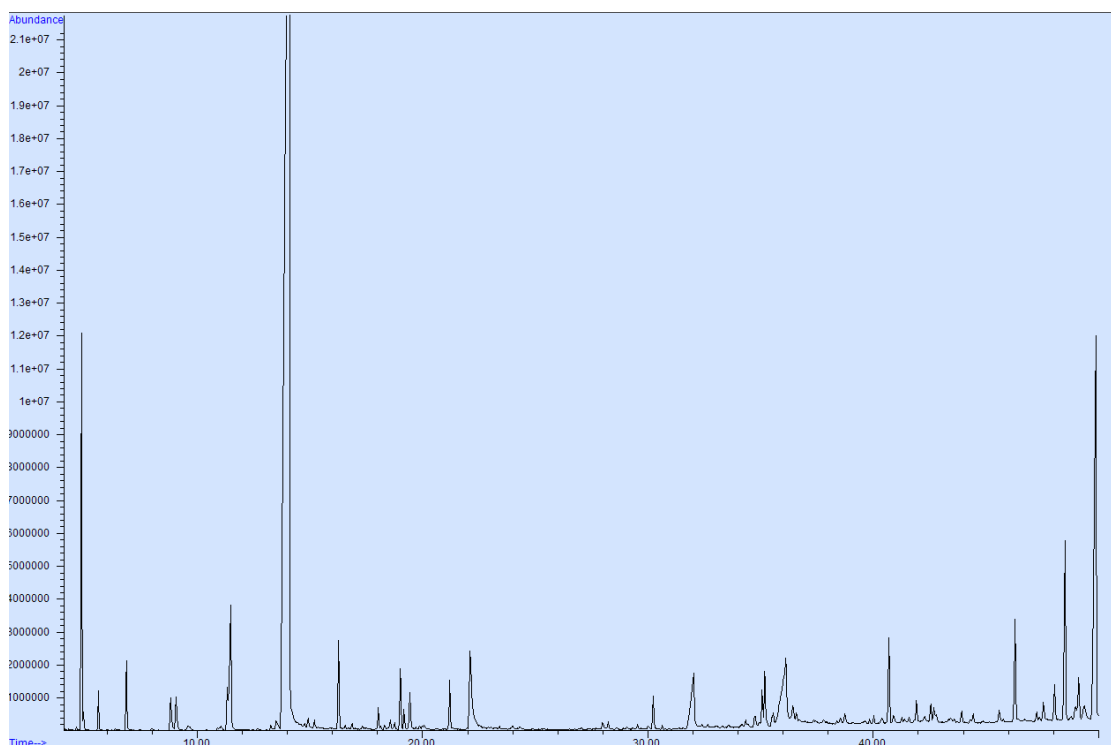


Slika P 1. GC hromatogram EU rtanjskog čaja (*S. montana*)

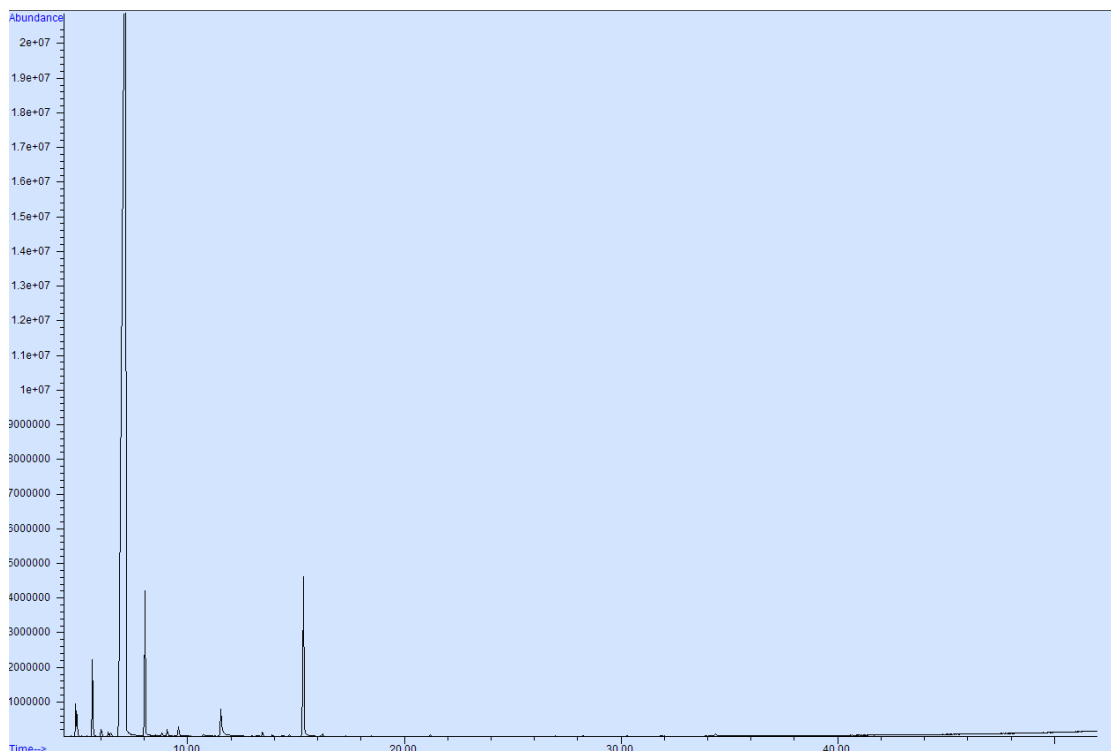


Slika P 2. GC hromatogram ekstrakta rtanjskog čaja dobijenog superkričnom

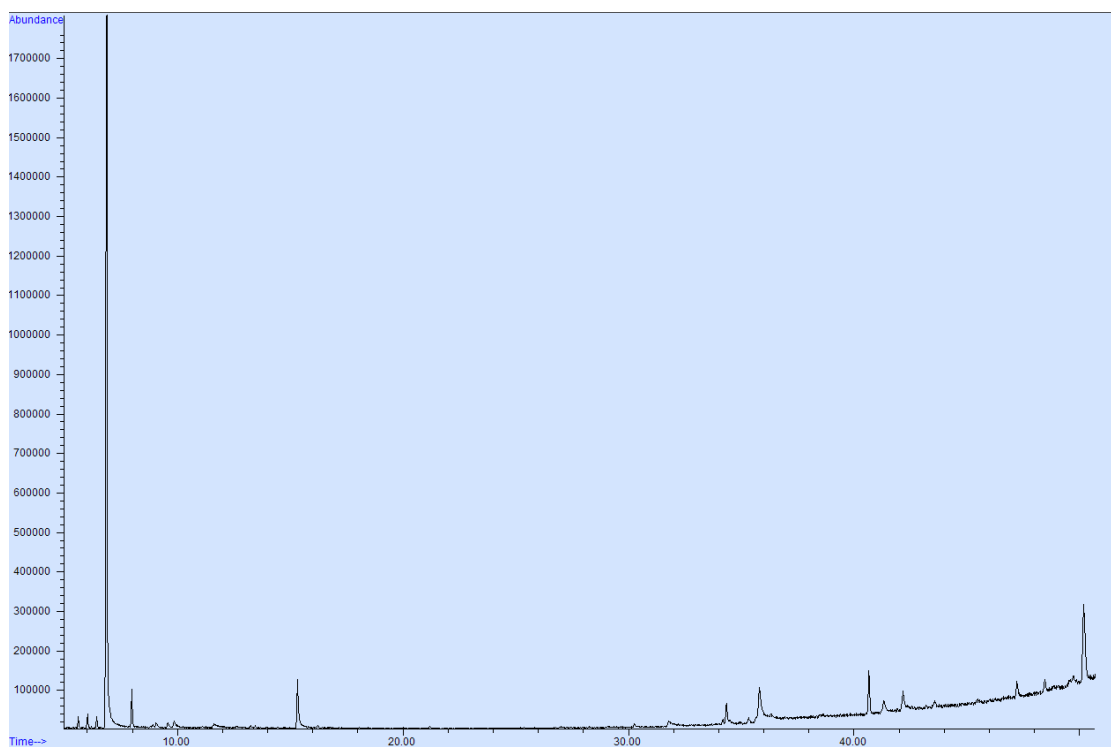
ekstrakcijom na 100 bar, 40°C

**Slika P 3.** GC hromatogram ekstrakta rtanjskog čaja dobijenog superkritičnom

ekstrakcijom na 300 bar, 40°C

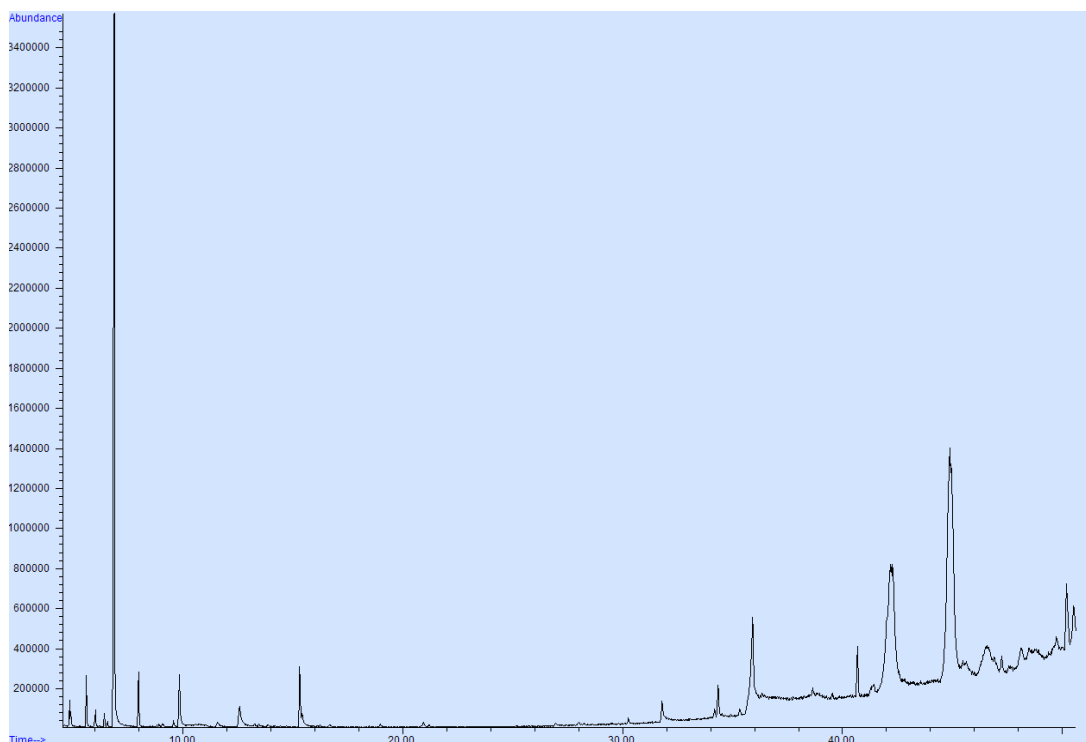


Slika P 4. GC hromatogram EU korijandera (*C. sativum*)



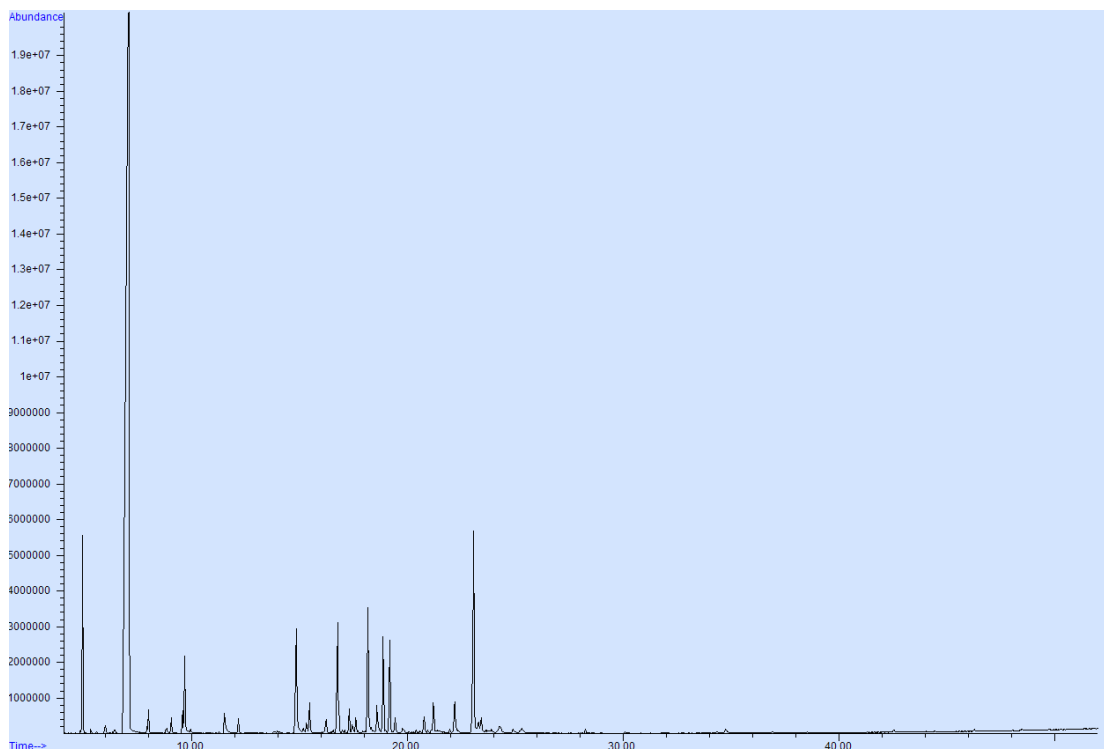
Slika P 5. GC hromatogram ekstrakta korijandera dobijenog superkričnom ekstrakcijom

na 100 bar, 40°C

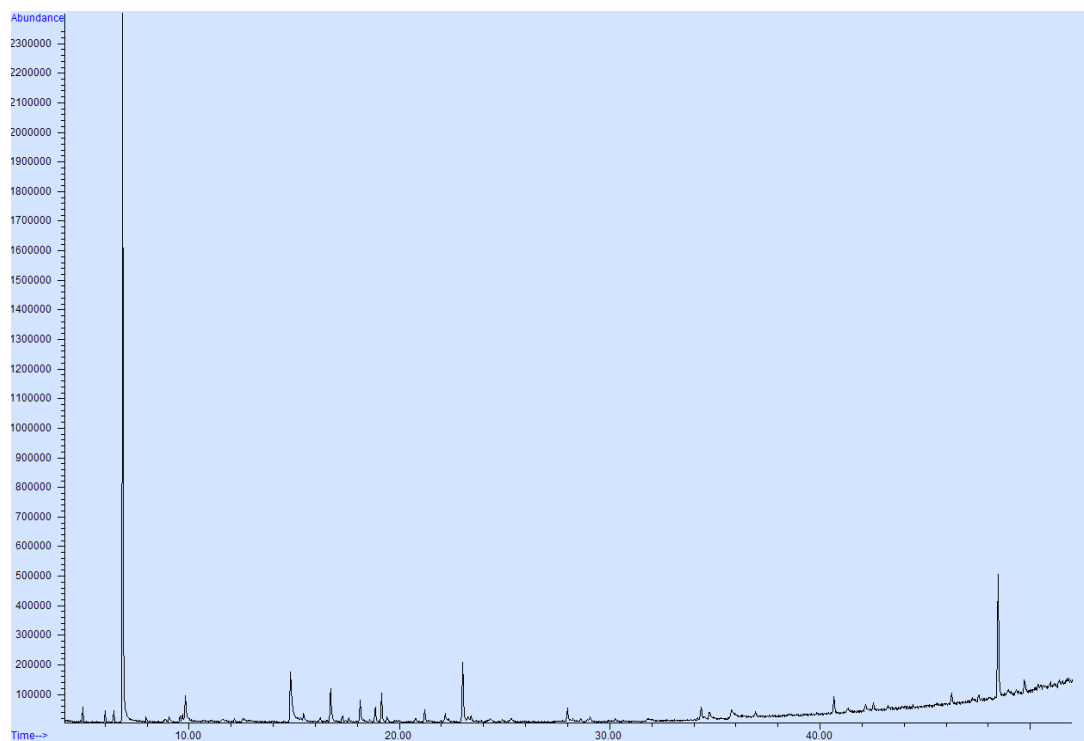


Slika P 6. GC hromatogram ekstrakta korijandera dobijenog superkričnom ekstrakcijom

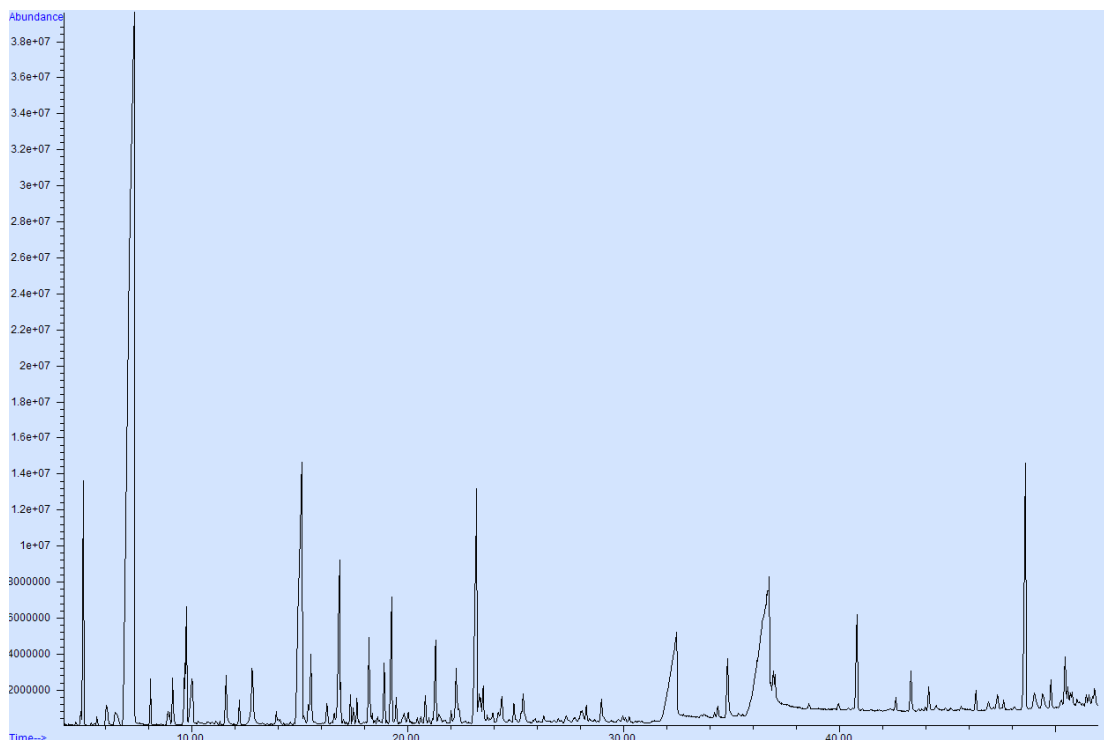
na 300 bar, 40°C



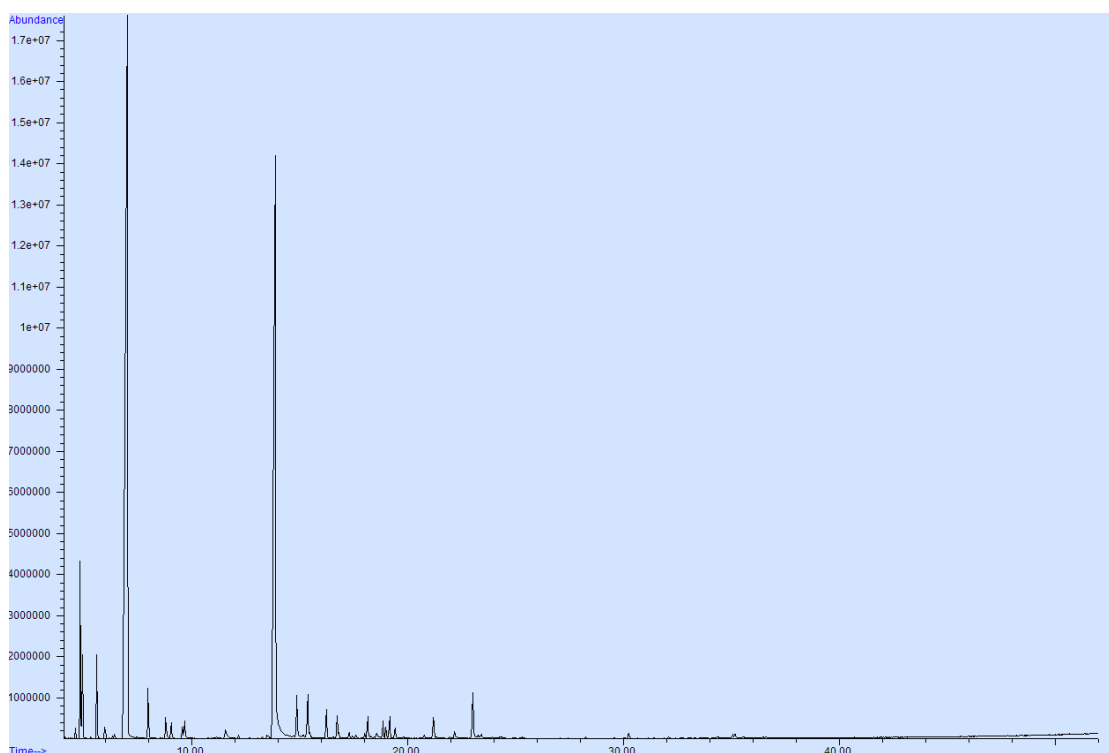
Slika P 7. GC hromatogram EU bosiljka (*O. basilicum*)



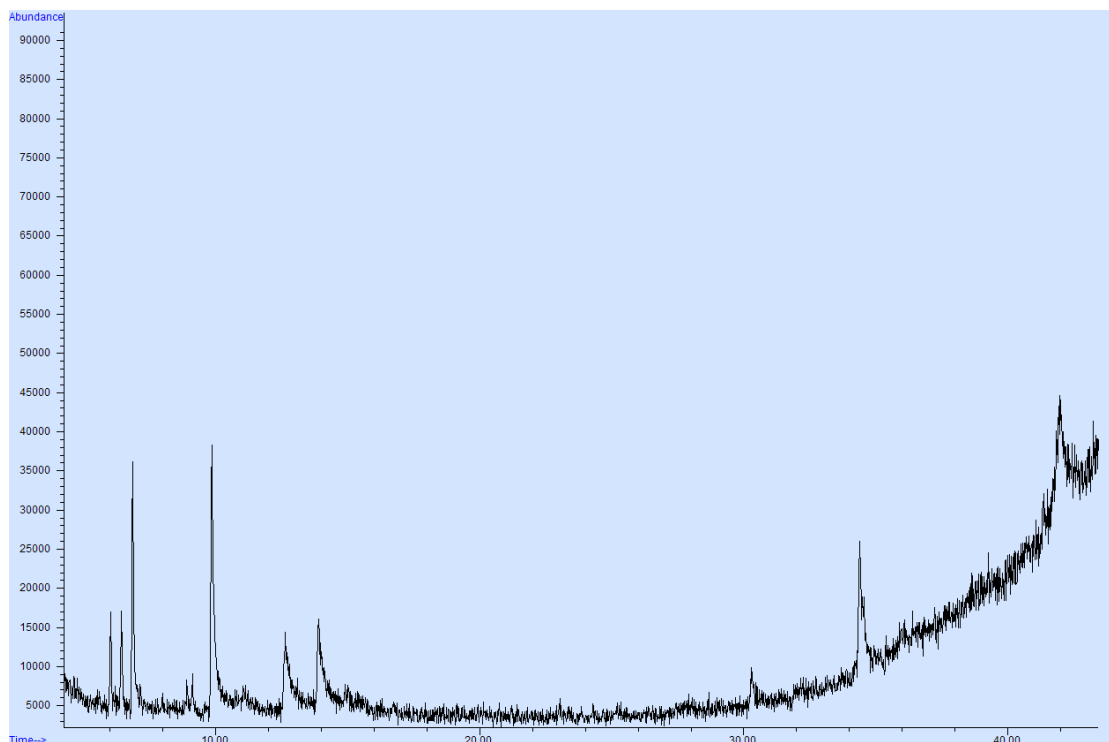
Slika P 8. GC hromatogram ekstrakta bosiljka dobijenog superkričnom ekstrakcijom na
100 bar, 40°C



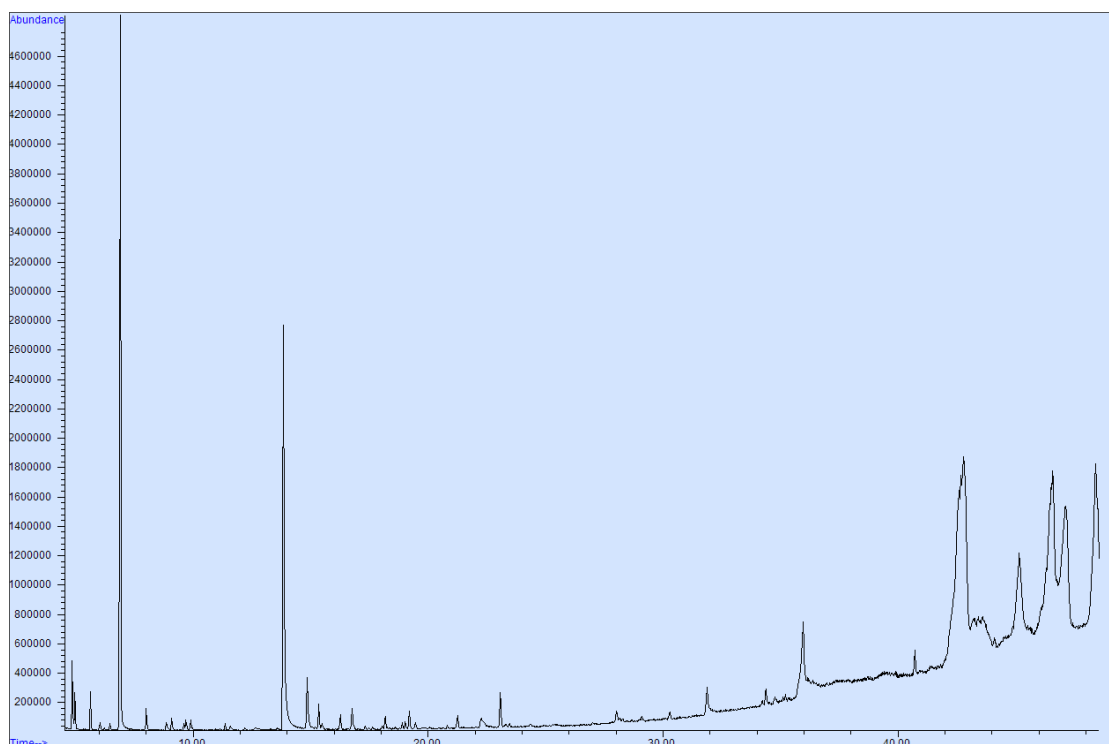
Slika P 9. GC hromatogram ekstrakta bosiljka dobijenog superkričnom ekstrakcijom na 300 bar, 40°C



Slika P 10. GC hromatogram EU biljne smeše uzorak CBS (*S. montana* + *C. sativum* + *O. basilicum*)



Slika P 11. GC hromatogram ekstrakta biljne smeše dobijenog superkritičnom ekstrakcijom na 100 bar, 40°C



Slika P 12. GC hromatogram ekstrakta biljne smeše dobijenog superkritičnom ekstrakcijom na 300 bar, 40°C