

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Mr Jasna Z. Ivanović

**KINETIKA I OPTIMIZACIJA PROCESA IZOLACIJE BILJNIH
EKSTRAKATA SA ANTIBAKTERIJSKIM DEJSTVOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA



Beograd, 2011.

Mentor:

dr **Irena Žižović**, docent
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr **Dušan Mišić**, docent
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

dr **Slobodan Petrović**, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Kandidat:

Datum odbrane: _____

Izvod

Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje kinetike izolacije ekstrakata sa jakim antibakterijskim delovanjem iz biljnog materijala primenom različitih postupaka ekstrakcije. Za izolaciju bioaktivnih supstanci korišćena je natkritična ekstrakcija sa ugljenik(IV)-oksidom, hidrodestilacija i ekstrakcija etanolom sa i bez primene ultrazvuka. Predmetom istraživanja ove doktorske disertacije obuhvaćena je analiza i optimizacija različitih procesa izolacije, kao i ispitivanje sadržaja aktivnih komponenti i/ili antibakterijskog dejstva dobijenih ekstrakta za primenu u farmaceutskoj i/ili prehrambenoj industriji. U eksperimentima je, kao sirovina, korišćeno odabrano začinsko i lekovito bilje (*Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Eugenia caryophyllata*, *Laurus nobilis*, *Angelica archangelica*, *Echinacea angustifolia*, *Verbascum thapsus*, *Calendula officinalis* i *Aloe barbadensis* Miller), lišaj *Usnea barbata* i odabrane mešavine biljnog materijala (karanfilić/origano i karanfilić/timijan).

U disertaciji je posebno ispitana i analizirana kinetika procesa natkritične ekstrakcije. S tim u vezi, ispitivan je uticaj operativnih parametara (pritiska i temperature) i odgovarajućeg predtretmana biljnog materijala sa natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom na kinetiku natkritične ekstrakcije, kao i uticaj prisustva pojedinih biljnih sirovina u smeši (njihovih glavnih komponenata) na povećanje moći rastvaranja natkritičnog ugljenik(IV)-oksida (kosolventski efekat), pa samim tim i na povećanje brzine ekstrakcije i smanjenje potrošnje natkritičnog fluida. U disertaciji su, takođe, prikazani rezultati ispitivanja kinetike ekstrakcije etanolom sa i bez primene ultrazvuka.

Za simulaciju procesa natkritične ekstrakcije iz pojedinačnih biljnih sirovina i izabranih mešavina biljnog materijala korišćeni su postojeći matematički modeli zasnovani na diferencijalnom bilansu mase (Stamenic i sar., 2008; Zizovic i sar., 2005; Sovova i sar., 1994a) i na analogiji sa prenosom toplote (Bartle i sar., 1990; Hong i sar., 1990; Reverchon i sar., 1994 i 1993). Odgovarajući parametri dobijeni primenom navedenih matematičkih modela, zajedno sa podacima o hemijskom sastavu, korišćeni su za interpretaciju fenomena prenosa mase u čvrstoj fazi i u filmu natkritičnog ugljenik(IV)-oksida do kojih dolazi tokom procesa natkritične ekstrakcije iz pojedinih biljnih sirovina i izabranih mešavina biljnog materijala. Za modelovanje procesa ekstrakcija sa etanolom korišćeni su postojeći modeli izvedeni iz drugog Fikovog zakona u cilju određivanja koeficijenata difuzije ekstraktivnih materija u čvrstoj fazi (Crank, 1975; Treybal, 1968). Za rešavanje jednačina navedenih matematičkih modela korišćen je softverski paket Microsoft Fortran PowerStation 4.0.

Za ispitivanje antibakterijskog delovanja biljnih ekstrakata i etarskih ulja korišćena je modifikovana mikrodiluciona ili makrodiluciona metoda u bujonu opisana i preporučena od strane CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2008, SAD), koja se u rutinskoj laboratorijskoj praksi koristi za ispitivanje antibakterijskog delovanja antibiotika, tj. za određivanje vrednosti MIC (minimalne inhibitorne koncentracije) antibiotika. Antibakterijsko delovanje biljnih ekstrakata ispitivano je na sojevima: *Staphylococcus* vrsta, uključujući sojeve *Staphylococcus aureus* koji su rezistentni na meticilin (MRSA), *Enterococcus* vrsta (uključujući vankomicin rezistentne enterokoke, VRE), *Streptococcus*, *Bacillus* i *Geobacillus* vrsta. Ispitan je uticaj pojedinih ekstrakta i na sojeve Gram-negativnih bakterija, *E.coli*, *Enterobacter cloacae* i *Sallmonela* Enteritidis.

Za identifikaciju i kvantifikaciju aktivnih komponenti u izolovanim ekstraktima korišćene su gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC/MS) i tečna hromatografije (HPLC).

Od ispitanih ekstrakata, natkritični ekstrakti *U. barbata* pokazali su najjače antibakterijsko dejstvo na sojeve stafilokoka, enterokoka i streptokoka (uključujući MRSA i VRE sojeve) sa MIC vrednostima od 1,25 do 40 µg/ml. Od trinaest ispitanih sojeva, natkritični ekstrakt *U. barbata* izolovan na 30 MPa i 40 °C imao je jače antibakterijsko delovanje od čiste usninske kiseline na jedanaest sojeva, na osam sojeva delovao je jače od ampicilina, na tri soja jače od eritromicina i na jedan soj jače od penicilina G. Isti ekstrakt je pokazao izuzetno jaku antibakterijsku aktivnost na meticilin rezistentne stafilokoke, pri čemu su vrednosti MIC bile u opsegu 1,25-20 µg/ml. Natkritični ekstrakti *U. barbata* u kojima je identifikovan znatno veći sadržaj usninske kiseline (59,5 % i 36,5 %) nego u etanolnim ekstraktima (0,18-3,59 %). Zbog toga su etanolni ekstrakti *U. barbata* imali slabiji antibakterijski efekat na ispitivane sojeve stafilokoka, enterokoka i streptokoka u poređenju sa natkritičnim ekstraktima. Natkritični ekstrakt sa nižim sadržajem usninske kiseline (36,5 %) je pokazao jače antibakterijsko dejstvo u odnosu na ekstrakt sa višim sadržajem usninske kiseline, što ukazuje da i druge komponente prisutne u ekstraktu doprinose antibakterijskoj aktivnosti.

Proces ekstrakcije antibakterijski najaktivnijeg ekstrakta u ovom istraživanju – natkritičnog ekstrakta lišaja *U. barbata*, optimizovan je sa aspekta predtretmana sirovine. Ustanovljeno je da je optimalan predtretman – predtretman nakritičnim fluidom, kao i varijacija pritiska od 15 MPa do atmosferskog pritiska. Pomenutim predtretmanom ne postiže se samo ušteda natkritičnog fluida, već se ostvaruju i veći prinosi koje nije moguće postići iz sirovine koja je bila podvrgnuta samo mehaničkom predtretmanu (mlevenjem). U skladu sa tim, matematičkim modelovanjem procesa natkritične ekstrakcije iz *U. barbata* dobijene su veće vrednosti ravnotežne rastvorljivosti i koeficijenta prenosa mase u čvrstoj fazi, kao i manji udeo teško dostupne frakcije ekstrakta za slučaj procesa sa predtretmanom natkritičnim fluidom.

Pored lišaja *U. barbata*, timijan je identifikovan kao vredna sirovina za dobijanje ekstrakata sa jakim antibakterijskim delovanjem, jačim od ekstrakata ruzmarina i žalfije. Činjenica da su natkritični ekstrakt i etarsko ulje timijana, pokazali jače antibakterijsko delovanje na sojeve *Bacillus* vrsta (MIC = 40-80 µg/ml) u poređenju sa aktivnošću čistih komponenti, timola, *p*-cimena i njihove smeše (MIC = 160 µg/ml) ukazala je na sinergetski efekat drugih jedinjenja prisutnih u ekstraktima. Etanolni ekstrakti timijana pokazali su najjače antibakterijsko dejstvo na sojeve *Staphylococcus aureus* od ispitanih etanolnih ekstrakata (MIC = 8-64 µg/ml).

Analizom kinetike etanolnih ekstrakcija iz timijana i matematičkim modelovanjem ovih procesa pokazano je da primena ultrazvuka pozitivno utiče na brzinu prenosa mase (opisane odgovarajućim koeficijentima difuzije) kako u fazi ispiranja tako i tokom spore ekstrakcije. Kod ekstrakcija iz timijana sa etanolom na poluindustrijskom nivou, pokazalo se da povećanje temperature pozitivno utiče na povećanje brzine prenosa mase u fazi ispiranja i na povećanje prinosa ekstrakata. Uporednom analizom koeficijenata difuzije za Sokslet ekstrakciju na temperaturi od 80,5 °C iz timijana i za ekstrakcije na poluindustrijskom nivou sa mešanjem, koje su izvedene na istoj i na nižoj temperaturi (40 °C), pokazano je da je mešanje imalo više uticaja na brzinu prenosa mase od povećanja temperature.

Prikazani rezultati ispitivanja kinetike simultane natkritične ekstrakcije iz biljnih mešavina karanfilić/origano i karanfilić/timijan ukazali su na njene prednosti u odnosu na proces natkritične ekstrakcije iz čistog karanfilića sa aspekta povećanja brzine ekstrakcije. Pokazalo se da prisustvo origana (10 %) ili timijana (16 %) u polaznoj smeši biljnog materijala omogućava značajno povećanje (do dva puta) brzine ekstrakcije na početku procesa natkritične ekstrakcije. U isto vreme, prisustvo origana (10 %) ili timijana (16 %) u polaznoj smeši biljnog materijala ima zanemarljiv uticaj na totalni prinos i hemijski sastav ekstrakata u poređenju sa natkritičnom ekstrakcijom iz čistog karanfilića. Prisustvo origana ili timijana u polaznoj smeši biljnog materijala omogućava postizanje zadovoljavajućih prinosa ekstrakata (i do 90 % od onoga postignutog kod natkritične ekstrakcije iz čistog karanfilića) sa oko 70 % manjom potrošnjom natkritičnog fluida, što može biti od značaja za industrijsku proizvodnju.

Ključne reči: prirodni antibakterijski agensi; natkritična ekstrakcija; ultrazvučna ekstrakcija; hidrodestilacija; kinetika ekstrakcije; matematičko modelovanje.

Abstract

This study was aimed to investigate kinetics of isolation of the extracts with strong antibacterial activity from plant material by using different extraction processes. The bioactive substances from plant material were isolated by supercritical carbon dioxide extraction, hydrodistillation and ethanol extraction with and without ultrasound. The scope of the present study was kinetic analysis and optimization of different extraction processes as well as content of active substance and/or antibacterial activity of isolated supercritical extracts for application in pharmaceutical and/or food industry. Selected herbs and spices (*Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Eugenia caryophyllata*, *Laurus nobilis*, *Angelica archangelica*), *Echinacea angustifolia*, *Verbascum thapsus*, *Calendula officinalis*, *Aloe barbadensis* Miller), lichen *Usnea barbata* and selected mixtures of plant materials (clove/oregano and clove/thymus) were used as raw material for experiments.

In this study, supercritical carbon dioxide extraction kinetics was particularly analyzed. Therewith, influence of operating parameters (pressure and temperature) and pretreatment of the plant material with supercritical carbon dioxide on the supercritical extraction kinetics, influence of presence of particular plant material in the mixtures of plants (their main components) on the solubility power of supercritical carbon dioxide (co-solvent effect) and subsequently on increase of extraction rate and reduction of supercritical fluid consumption was investigated in this work as well. The results of investigation of the kinetics of ethanol extractions are also presented here.

Mathematical models based on differential mass balance (Stamenic et al., 2008; Zizovic et al., 2005; Sovova et al., 1994a,b) and heat transfer analogy (Bartle et al., 1990; Hong et al., 1990; Reverchon et al., 1994, 1993) were used for simulation of process of supercritical carbon dioxide extraction from pure plants and chosen mixture of plants for evaluation of parameters that can be used for interpretation of the mass transfer phenomena in the solid and supercritical carbon dioxide phase. Mathematical models based on the Second Fick's Law were used for simulation of ethanol extractions in order to evaluate coefficients of diffusion of extractable substances in solid phase (Crank, 1975; Treybal, 1968). Solution of the equations of above mentioned mathematical models were solved using Microsoft Fortran PowerStation 4.0.

For antibacterial susceptibility testing, modified broth microdilution or macrodilution method was applied in accordance with the prescription of CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2008, USA and corresponding MIC (minimal inhibitory concentration) values were determined. Antibacterial effect of plant extracts on *Staphylococcus* species including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacterial strains as well as *Enterococcus* (including vancomycin resistant strains–VRE), *Streptococcus*, *Bacillus* and *Geobacillus* species was investigated. Antibacterial activity of extracts on the Gram-negative bacteria such as *E.coli*, *Enterobacter cloacae* and *Salmonella* Enteritidis was investigated as well. Identification and quantification of the active principles in isolated extracts were performed by using gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS) and high performance liquid chromatography (HPLC).

Among all tested extracts in this study, supercritical extracts of *U.barbata* showed the strongest antibacterial activity on staphylococci, enterococci and streptococci (including MRSA and VRE strains) with MIC values from 1,25 µg/ml to 40 µg/ml. Testing of thirteen strains showed that the supercritical extract of *U. barbata* isolated at 30 MPa and 40 °C had stronger activity than pure usnic acid on eleven strains, on eight strains its activity was stronger than ampicilline, on three strains it was more active than erythromycine, and it was more active than penicilline G on one strain. The same extract exhibited strong activity on methicillin resistant staphylococci with MIC values of 1,25-20 µg/ml. Much higher content of usnic acid was identified in the supercritical extracts of *U. barbata* (59.5 % i 36.5 %) than in its ethanolic extracts (0.18-3.59 %). Therefore, ethanolic extracts of *U. barbata* had weaker antibacterial effect on tested staphylococci, enterococci and streptococci in comparison with supercritical extracts. Stronger antibacterial activity of supercritical extract with lower content of usnic acid (36.5 %) compared to the extract with higher content of usnic acid indicates that other compounds present in extracts contribute to antibacterial activity as well.

Extraction process for isolation of the most active extract in this study-supercritical extract of lichen *U.barbata* was optimized with respect to pretreatment of raw material. It was found that the optimal pretreatment is the pretreatment with supercritical carbon dioxide with pressure variation from 15 MPa to atmospheric

pressure. Applying mentioned pretreatment enabled not just reduction of the supercritical fluid consumption but also achieving of higher extraction yields which couldn't be achieved from the raw material subjected only to the mechanical treatment (grinding). In accordance with this, by using mathematical modeling for the supercritical extraction processes from *U. barbata*, higher values for solubility and mass transfer coefficient in the solid phase as well as lower value for inaccessible fraction of solute were obtained for the process with applied pretreatment with supercritical carbon dioxide.

Beside lichen *U. barbata*, thyme was identified as valuable raw material for isolation of extracts with strong antibacterial activity as well. Supercritical extract and essential oil isolated from thyme showed stronger antibacterial activity than those isolated from the rosemary and sage. The fact that the thyme supercritical extract and essential oil had stronger antibacterial activity on *Bacillus* strains (MIC=40-80 µg/ml) in comparison with pure thymol, *p*-cymene and thier mixture (MIC=160 µg/ml) indicated existance of synergistic effect of other compounds present in the thyme extracts. Among all tested ethanolic extracts, thyme ethanolic extracts had the strongest antibacterial effect on *Staphylococcus.aureus* strains (MIC=8-64 µg/ml).

Kinetic analysis of thyme extractions with ethanol and mathematical modelling of these processes showed that ultrasound had the strongest effect on the mass transfer rate (described with the relevant diffusion coefficients) in the both, washing period and period of slow extraction. In the case of thyme pilot-plant extraction with ethanol, temperature increase results in increase of the mass trasfer rate in the washing period and extraction yield. Comparative analysis of diffusion coefficients for the Soxhlet extraction from thyme performed at 80.5 °C and the pilot-plant thyme extractions with mixing performed at the same and lower temperature (40 °C) showed that mixing influences mass transfer rate more than temperature increase.

The results of investigation of simulatneous supercritical extraction from the clove/oregano and clove/thyme mixtures indicated that it has advantages over the supercritical extraction process from pure clove buds with respect to increase of the extraction rate. It was shown that the presence of 10 % oregano or 16 % of thyme in the starting mixture of plant materials enables significant increase (two times) of the extraction rate in the initial stage of extraction. In the same time, presence of oregano (10 %) and clove (16 %) in the starting mixture of plant materials has negligible influence on the yield and chemical composition of isolated extracts compared to the supercritical extraction from pure clove. Presence of oregano or thyme in the starting mixture of plant materials enables achieving desirable extraction yields (up to 90 % of the extraction yield from the pure clove) with app. 70 % lower consumption of the supercritical carbon dioxide which could be important for industrial-scale application.

Keywords: natural antibacterials; supercritical extraction; ultrasonic extraction; hydrodistillation; extraction kinetics; mathematical modelling.

Sadržaj

Izvod	3
Abstract	5
Sadržaj	7
Lista oznaka i skraćenica	9
1. UVOD	12
2. TEORIJSKI DEO	14
2.1. Prirodna jedinjenja sa antibakterijskom aktivnošću	14
2.1.1. Antibakterijska aktivnost etarskih ulja i ekstrakata iz lekovitog i začinskog bilja i lišajeva	14
2.1.2. Mehanizam dejstva	19
2.1.3. Sinergetsko dejstvo ekstrakata	20
2.2. Postupci izolacije bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala	21
2.2.1. Klasični postupci izolacije bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala	21
2.2.2. Intenzifikacija konvencionalnih metoda ekstrakcije	25
2.3. Natkritična ekstrakcija (NKE)	26
2.3.1. Natkritični fluidi i njihove osobine	26
2.3.2. Primene natkritičnih fluida i budući trendovi	29
2.3.3. Prednosti i nedostaci NKE	30
2.3.4. Mogućnosti optimizacije	30
2.4. Mehanizam procesa i matematičko modelovanje ekstrakcije sa organskim rastvaračima	32
2.4.1. Mehanizam ekstrakcije sa organskim rastvaračima	32
2.4.2. Mehanizam ultrazvučne ekstrakcije	33
2.4.3. Matematičko modelovanje ekstrakcije sa organskim rastvaračima	33
2.5. Mehanizam procesa i matematičko modelovanje NKE	34
2.5.1. Mehanizam procesa NKE	34
2.5.2. Matematičko modelovanje NKE	34
2.5.2.1. Empirijsko modelovanje	36
2.5.2.2. Modelovanje zasnovano na analogiji sa prenosom toplote	36
2.5.2.3. Modelovanje zasnovano na integraciji diferencijalnog masenog bilansa	37
2.6. Eksergijska analiza	37
2.7. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti	39
2.7.1. Osnovne karakteristike odabranih sojeva bakterija	39
2.7.1.1. Gram-pozitivne koke: stafilokoke, streptokoke i enterokoke	39
2.7.1.2. Gram-pozitivne bakterijske vrste štapićastih bakterija (bacila)	40
2.7.1.3. Familija Enterobacteriaceae: rodovi Escherichia i Salmonella	41
2.7.2. Ispitivanje osetljivosti bakterija na antibakterijska sredstva	41
3. EKSPERIMENTALNI DEO	46
3.1. Sirovine	46
3.2. Različiti postupci izolacije biološki aktivnih etarskih ulja i ekstrakata	47
3.2.1. Hidrodestilacija po Klevenžeru	47
3.2.2. Natkritična ekstrakcija	47
3.2.2.1. Postrojenje za NKE	47
3.2.2.2. Izbor procesnih parametara i uslovi NKE	48
3.2.2.3. Simultana NKE iz biljnih mešavina	49
3.2.3. Ekstrakcija sa etanolom	50
3.2.3.1. Ekstrakcija po Soksletu	50
3.2.3.2. Ultrazvučna ekstrakcija	51
3.2.3.3. Ekstrakcija sa etanolom na poluindustrijskom nivou	52
3.2.4. Kombinovane metode ekstrakcije	53
3.2.5. Izračunavanje termodinamičkih parametara za eksergijsku analizu	54

3.3. Matematičko modelovanje procesa ekstrakcije	57
3.3.1. Modeli korišćeni za simulaciju procesa NKE	57
3.3.1.1. Matematički model Sovove	57
3.3.1.2. Model zasnovan na analogiji sa prenosom toplote	59
3.3.1.3. Matematičko modelovanje na nivou sekrecione strukture	59
3.3.1.4. Opšti parametri modela i korelacije	62
3.3.2. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji	64
3.4. Određivanje hemijskog sastava ekstrakata	65
3.4.1. Gasna hromatografija (GC/FID)	65
3.4.2. Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC/MS)	66
3.4.3. Tečna hromatografija (HPLC)	66
3.5. Antibakterijska aktivnost ekstrakata	67
3.5.1. Mikrodiluciona metoda u bujonu	68
3.5.2. Makrodiluciona metoda u bujonu	68
4. REZULTATI I DISKUSIJA	70
4.1. Prinosi etarskih ulja i ekstrakata	70
4.2. Hemijski sastav	72
4.2.1. Određivanje sadržaja usninske kiseline	72
4.2.2. Hemijski sastav etarskih ulja i natkričnih ekstrakata iz odabranog lekovitog i začinskog bilja	72
4.3. Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata	78
4.3.1. Antibakterijska aktivnost ekstrakata lišaja <i>U. barbata</i>	78
4.3.2. Antibakterijska aktivnost etarskih ulja i natkričnih ekstrakata ruzmarina, žalfije i timijana	80
4.3.3. Antibakterijska aktivnost natkričnih ekstrakata origana i karanfilića	83
4.3.4. Antibakterijska aktivnost etarskog ulja i natkričnog ekstrakta lovora	84
4.3.5. Antibakterijska aktivnost etanolnih ekstrakata timijana i origana	84
4.3.6. Antibakterijska aktivnost ekstrakata anđelike, divizme, ehinacee i nevena	85
4.4. Izbor biljnih sirovina i tehnologija za dobijanje ekstrakata sa jakim antibakterijskim delovanjem na osnovu antibakterijskih ispitivanja	87
4.5. Antibakterijska aktivnost smeša ekstrakata	88
4.6. Kinetika i matematičko modelovanje NKE	90
4.6.1. Kinetika i matematičko modelovanje NKE lišaja iz <i>U. barbata</i>	90
4.6.2. Kinetika i matematičko modelovanje NKE iz odabranog bilja porodice Lamiaceae	94
4.7. Kinetika i matematičko modelovanje procesa ekstrakcija etanolom	96
4.7.1. Kinetika i matematičko modelovanje procesa ekstrakcije sa etanolom laboratorijskom nivou	96
4.7.2. Kinetika i matematičko modelovanje procesa ekstrakcije timijana na poluindustrijskom nivou	102
4.8. Eksergijska analiza različitih postupaka ekstrakcije	104
4.9. Simultana NKE iz odabranih mešavina biljnog materijala	106
4.9.1. Kinetika i matematičko modelovanje simultane NKE iz mešavina biljnog materijala	106
4.9.2. Hemijski sastav ekstrakata izolovanih simultanom NKE iz biljnih mešavina	112
4.9.3. Antibakterijska aktivnost mešavina natkričnih ekstrakata origana i karanfilića	115
5. ZAKLJUČCI	116
6. LITERATURA	119
7. PRILOZI	129
PRILOG 1	129
PRILOG 2	134
BIOGRAFIJA	136

Lista oznaka i skraćenica

Lista oznaka

Oznaka	Značenje	Jedinica	Jednačina
a	specifična površina biljnih čestica	m^2/m^3	40
A_p	ukupna površina čestica	m^2/m^3	7
a_c	specifična površina sekrecione strukture u odnosu na zapreminu NK CO ₂	m^2/m^3	63
a_{nd}	specifična površina nerazorenih trihoma u kojima je etarsko ulje zasićeno sa NK CO ₂	m^2/m^3	55
a_R	specifična površina uljne sfere u odnosu na zapreminu NK CO ₂	m^2/m^3	61
c	koncentracija ulja u netaknutoj sekrecionoj strukturi	$kmol/m^3$	61
c	koncentracija rastvorka u tečnom ekstraktu tokom ekstrakcije ili u natkritičnom fluidu	g/l	1, 76,77, 79-81
c^*	ravnotežna koncentracija etarskog ulja u NK CO ₂ na graničnoj površini natkritični fluid-etarsko ulje	$kmol/m^3$	55,61
c_i	koncentracija na međufaznoj površini čestica-fluid		76
c_{sat}	koncentracija etarskog ulja u razorenom trihomu koja je konstantna tokom ekstrakcije i jednaka koncentraciji uljne faze zasićene sa CO ₂	$kmol/m^3$	57,59
c^{sf}	koncentracija ulja u NK CO ₂ fazi	$kmol/m^3$	53
c_0	početna koncentracija rastvorka u biljnom materijalu	kg/m^3	76
c_∞	koncentracija ekstraktibilnih supstanci nakon beskonačno dugog vremena	kg/m^3	79-81
D	koeficijent difuzije u sferi	m^2/s	7
D_e	koeficijent difuzije u čvrstoj fazi tokom ekstrakcije	m^2/s	52
D_1, D_2	koeficijenti difuzionih procesa u čvrstoj fazi koji se odigravaju paralelno tokom ekstrakcije	m^2/s	81
D_{12}	binarni koeficijent difuzije etarskog ulja (pseudokomponente) u NK CO ₂	m^2/s	70
D_i	koeficijent aksijalne disperzije	m^2/s	53, 74
D_m	difuzivnost etarskog ulja kroz membranu nerazorenih trihoma	m^2/s	55
e	masa ekstrakta u odnosu na masu čvrste faze bez rastvorka	-	48
f	maseni udeo pojedinačnih biljnih sirovina u smeši	%,w/w	28, 29
f_1, f_2	frakcije rastvorka, koje se dobijaju sa difuzionim koeficijentima D_1 i D_2 , respektivno	-	83
\dot{E}_x	eksergija	W	8-10
e_x	specifična eksergija	kJ/kg	11
gZ_0	gravitaciona potencijalna energija	kJ/kg	11
H	visina pakovanog sloja	m	49
h	specifična entalpija	kJ/kg	11
h	aksijalna koordinata ekstraktora	m	5, 35
$I(W_{lost})$	gubitak eksergije	kJ/kg	8,23,26,31,34
J	kriterijum za određivanje optimalnog parametara	-	77
J	brzina prenosa mase	kg/m^3s	35
K	koeficijent prenosa mase kroz česticu	m/s	6
K	prosečni koeficijent prenosa mase u čvrstoj fazi	m/s	61
K	količina nerazorenih ćelija	-	38
k	kinetička konstanta	m/s	3
k	bezdimezioni parametar modela Sovove	m/s	49
k_f	koeficijent prenosa mase u filmu CO ₂ oko razorene čestice biljnog materijala	m/s	66
k_s	koeficijent prenosa mase u čvrstoj fazi	m/s	43
L	visina ekstraktora	m	54
M	broj sekretornih šupljina ili ćelija	-	61
$M(t)$	masa ekstrakta koja se prenese u trenutku t od sfere ka masi fluida	kg	78
M_∞	masa ekstrakta koja se prenese u nakon beskonačno dugog vremena od sfere ka masi fluida	kg	78
N	ukupan broj sekrecionih struktura	-	55,56
N	masa nerastvorne čvrste biljne materije u natkritičnom fluidu	kg	39
N	količina supstance	kmol	60
n	broj eksperimentalnih tačaka	-	75,77
O	količina teže dostupnog ulja		38,39
P	lako dostupna količina ulja		38,39
P	udeo razorenih šupljina ili ćelija	-	61
Pe	Pekletov broj	-	73

q, q_0	koncentracija rastvorka u sferi i početna koncentracija materije koja se ekstrahuje	kg/m ³	1,4,5
q, q^*	koncentracija ekstrakta u čvrstoj fazi i ravnotežna koncentracija na granici faza čvrsto-fluid	kg/m ³	6,7
q_{rs}	preostala količina ekstrakta u čestici biljnog materijala	g/100 g	3
Re	Rejoldsov broj	-	65
R	prečnik uljne sfere razorenog trihoma, koji je funkcija vremena i položaja u ekstraktoru	m	59
R_{nd}	poluprečnik nerazorenih „peltate“ glandularnih trihoma u kojima je etarsko ulje zasićeno sa CO ₂	m	55
Sc	Šmitov broj	-	66
\dot{S}_{gen}	brzina generisanja entropije	W/K	13
Sh	Šervudov broj	-	63
ST	izvorni član	-	53, 55, 61
s	specifična entropija	kJ/kg K	11
u	prividna brzina strujanja CO ₂ kroz sloj biljnog materijala	m/s	5
V	zapremina ekstraktora	m ³	5,6
V_t	zapremina uljne sfere razorenog trihoma	m ³	57
v	specifična zapremina	m ³ /kg	19, 20
x	kg rastvorljivih supstanci po kg nerastvorljive čvrste faze	-	35
x_0	koncentracija rastvorka u odnosu na biljni materijal bez rastvorka u početnom stanju, $x(t=0) = x_0$	-	36
x_i	azeotropski udeli	-	32, 33, 35
x_k	maseni odnos rastvorka unutar čestica (nerazorene ćelije materijala) i nerastvornog dela materijala	-	19,20
Y	prinos ekstrakta	%, w/w	15
y	koncentracija rastvarača u rastvaraču bez rastvorka	-	35
y_r	ravnotežna rastvorljivost ekstrakta (aproksimiranog pseudokomponentom)	%, w/w	40, 42, 47
\dot{W}	spoljašnji rad	W	8
Z	parametar modela po Sovovi koji je direktno proporcionalan k_f	-	49
z	bezdimeziona koordinata	-	48,50
Grčki simboli			
θ	ukupni udeo razorenih „peltate“ glandularnih trihoma (usled mlevenja i izlaganja CO ₂)	-	55,56
ϕ	udeo mlevenjem razorenih „peltate“ glandularnih trihoma	-	56
ϕ_i	zapreminski udeli komponenti u smeši	-	19
ζ^*	konstanta čija je vrednost za CO ₂ =0,224	-	68,69
φ	udeo „peltate“ glandularnih trihoma koji su naknadno razoreni u toku izlaganja biljnog materijala CO ₂	-	58
ε	poroznost sloja	-	5,6,51
μ	koeficijent viskoznosti NK CO ₂	Pa s	68,69
ρ	gustina NK CO ₂	kg/m ³	35b
ρ_s	gustina čvrste faze (biljni materijal)	kg/m ³	35a
τ	bezdimeziona vreme	-	49
ω	faktor acentričnosti smeše	-	20
Donji indeks			
0	početno stanje		
bm	biljni materijal		
c	kritična vrednost		
ch	hemijska reakcija		
EV	isparavanje		
e	ekstrakt		
exp	eksperimentalna vrednost		
k	koristan		
in	vrednost na ulazu		
out	vrednost na izlazu		
m	početak perioda ekstrakcije ulja iz nerazorenih sekrecionih struktura		

mod	vrednost izračunata korišćenjem odgovarajućeg matematičkog modela
Q	prenos toplote
r	redukovana veličina
theor	teorijski
w	koordinata granice između perioda brze i spore ekstrakcije
∞	vrednost nakon beskonačno dugog vremena

Lista skraćenica

Skraćenica	Značenje
AFM	Mikroskopija atomskih sila (<i>eng.</i> Atomic Force Microscopy)
ATP	Adenozintrifosfat
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DIC	Postupak kontrolisane nagle dekompresije (<i>fr.</i> Détente instantanée contrôlée ili <i>eng.</i> Instant controlled pressure drop)
HD	Hidrodestilacija
MAD	Mikrotalasna destilacija (<i>eng.</i> Microwave-assisted distillation)
MIX	Ekstrakt dobijen namešavanjem ekstrakata
MASE	Mikrotalasna ekstrakcija (<i>eng.</i> Microwave-assisted solvent extraction)
MHG	Mikrotalasna hidrodifuzija i gravitacija (<i>eng.</i> Microwave hydrodiffusion and gravity)
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija
MLC	Minimalna baktericidna koncentracija
MSD	Mikrotalasna difuzija pare (<i>eng.</i> Microwave steam diffusion)
MRSA	Meticilin rezistentne stafilokoke
VRE	Vankomicin rezistentne enterokoke
NK CO ₂	Natkritični ugljenik(IV)-oksid
NKE	Natkritična ekstrakcija
PSE	Ekstrakcija sa etanolom na poluindustrijskom nivou
P1	Predtretman sirovine naglom dekompresijom od 15 MPa do pritiska u boci sa CO ₂ (6 MPa)
P2	Predtretman sirovine naglom dekompresijom od 15 MPa do atmosferskog pritiska (0,1 MPa)
SIM	Ekstrakt dobijen simultanom ekstrakcijom iz biljne mešavine
SE	Ekstrakcija sa etanolom u Sokslet aparaturi
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija
SFME	Mikrotalasna ekstrakcija bez rastvarača (<i>eng.</i> Solvent-free microwave extraction)
SD	Difuzija pare (<i>eng.</i> Steam diffusion)

1. UVOD

Poslednjih godina, problem multirezistencije bakterija na antibiotike je, i pored postojanja preko dve stotine vrsta antibiotika na svetskom tržištu lekova, dostigao vrhunac aktuelnosti. Do početka XXI veka svet se suočavao sa problemom rezistencije na tri ili više antibiotika i suženim izborom antibiotika za terapiju bakterijskih infekcija. Danas se, međutim, govori o panrezistentnim patogenim bakterijama koje su razvile otpornost na apsolutno sve postojeće antibiotike. Panrezistentni sojevi, poput *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Klebsiella* i *Acinetobacter* vrsta, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, svakodnevno se umnožavaju i širom sveta dovode do teških infekcija kod životinja i ljudi koje mogu imati smrtni ishod (Mišić i sar., 2009b). Multirezistencija bakterija na antibiotike i nedostatak novih antibiotika na tržištu lekova podstakli su ispitivanja antibakterijskog delovanja supstanci koje nisu antibiotici, uključujući etarska ulja i ekstrakte, kao i razvoj različitih tehnologija za njihovu izolaciju iz biljnog materijala (Mišić i sar., 2010a, 2009a,b; Najdenova i sar., 2001; Tohidpour i sar., 2010; Weckesser i sar., 2007).

U proteklih dvadeset godina najviše je ispitivana antibakterijska aktivnost etarskih ulja izolovanih hidrodestilacijom (Bakkali i sar., 2008; Burt, 2004, 2007; Dorman i Deans, 2000; Tajkarimi i sar., 2010). Hidrodestilacija je jedan od najstarijih i najjednostavnijih tehnoloških postupaka za dobijanje etarskih ulja iz lekovitog i začinskog bilja koji ne zahteva velika investiciona ulaganja u procesnu opremu. Etarska ulja dobijena postupkom hidrodestilacije sadrže pretežno lako isparljiva i aromatična jedinjenja, mono- i seskviterpene i njihove kiseonične derivate koji se smatraju glavnim nosiocima antibakterijske aktivnosti (Bakkali i sar., 2008; Burt, 2004, 2007; Dorman i Deans, 2000; Tajkarimi i sar., 2010). U toku procesa hidrodestilacije usled visoke temperature može doći do termičke razgradnje i hidrolize pojedinih komponenti pa se u takvim slučajevima preporučuje primena ekstrakcije sa organskim rastvaračima. Tokom prethodnih decenija, dokazano je da ekstrakti pojedinih biljaka izolovani pomoću različitih organskih rastvarača, kao što su: etanol, metanol, hloroform, aceton, etilacetat, petroletar i dr. imaju izraženo antibakterijsko delovanje (Chakraborty, 2008; Pundir i sar., 2010; Veličković, 2007; Veličković i sar., 2003), ali je zbog prisustva tragova organskih rastvarača, njihova klinička upotreba ograničena. Pored potrebe za prešičćavanjem ekstrakata od rastvarača, često je za koncentrisanje željenih jedinjenja potrebno koristiti više rastvarača, što postupak čini složenijim i produžava vreme ekstrakcije. U toku uparavanja rastvarača, takođe, može doći do razgradnje termolabilnih komponenti. U industrijskim uslovima veliki problem kod procesa konvencionalne ekstrakcije je regeneracija velikih količina organskih rastvarača.

Poslednjih decenija izolacija biološki aktivnih ekstrakata pomoću natkritičnih fluida, pre svega, natkritičnog ugljenik(IV)-oksida (NK CO₂) sve više dobija na značaju imajući u vidu brojne prednosti ove tehnologije u odnosu na konvencionalne metode izolacije bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala (Reverchon i De Marco, 2006). Proces ekstrakcije sa NK CO₂ omogućava izolaciju ekstrakata na umereno niskim temperaturama od 40-60 °C, za razliku od hidrodestilacije, čime se sprečava termička degradacija lako isparljivih i termolabilnih jedinjenja koja se smatraju glavnim nosiocima antibakterijske aktivnosti. NK CO₂ se najčešće koristi u procesima natkritične ekstrakcije (NKE) iz začinskog i lekovitog bilja jer je netoksičan, nezapaljiv, neeksplozivan, nekorozivan, jeftin, bez mirisa i boje, hemijski inertan, a njegova kritična temperatura ne prevazilazi značajno vrednost ambijentalne temperature. Promenom pritiska i temperature (gustine CO₂) moguće je koncentrisati željene frakcije jedinjenja u ekstraktu i vršiti jednostavno, brzo i potpuno uklanjanje CO₂ od rastvorka. Antibakterijska aktivnost natkritičnih ekstrakata još uvek nije ispitana u dovoljnoj meri (Mišić i sar., 2009a,b, 2010a). Novija istraživanja ukazuju da natkritični ekstrakti iz lekovitog i začinskog bilja (Genena i sar., 2008; Menaker i sar., 2004; Muñoz i sar., 2009), kao i proizvodi na bazi natkritičnih ekstrakata iz lišajeva *U. barbata* (Najdenova i sar., 2001; Weckesser i sar., 2007), deluju na neke sojeve bakterija, pre svega na Gram-pozitivne, a obzirom da ne sadrže tragove rastvarača posebno su pogodni za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

U ovoj disertaciji ispitivana je kinetika različitih procesa izolacije ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom, pri čemu je posebna pažnja posvećena izučavanju kinetike NKE. Poznavanje ekstrakcionih mehanizama i fenomena prenosa mase je od izuzetnog značaja za razvoj poboljšanih metoda za dobijanje funkcionalnih biološki aktivnih ekstrakata iz biljnog materijala i projektovanje poluindustrijskih i industrijskih postrojenja. Iz tog razloga, procesi ekstrakcije sa NK CO₂ su simulirani odgovarajućim matematičkim modelima u cilju procene

parametara koji kontrolišu prenos mase u masi fluida i čvrstoj fazi (koeficijenti difuzije) i datih parametara koji zavise od fazne ravnoteže (rastvorljivost ekstrakta). U ovoj disertaciji su za simulaciju procesa NKE korišćeni model Sovove (Sovová, 1994a), model zasnovan na analogiji sa prenosom toplote (Bartle i sar., 1990; Hong i sar., 1990; Reverchon i sar., 1993, 1994) i model na nivou sekrecionih struktura (Zizovic i sar. 2005, 2007b, 2008; Stamenic i sar., 2008). Procesi ekstrakcije sa organskim rastvaračima simulirani primenom odgovarajućih modela izvedenih iz drugog Fikovog zakona, koji su detaljno opisali Crank (1975) i Treybal (1968), za opisivanje nestacionarne difuzije u čvrstoj fazi, a koji su kasnije koristili mnogobrojni autori (Herodež i sar., 2010; Hojnik i sar., 2008; Škerget i sar., 2010, Šašmaz, 1996, Veljković i Milenović, 2002). Cilj primene navedenih modela za simulaciju NKE procesa bio je da se parametri dobijeni matematičkim modelovanjem dovedu u vezu sa fizičkim parametrima, kao što su procesni parametri (pritisak, temperatura, gustina CO₂) i karakteristike biljnog materijala (tip sekrecionih struktura, različiti delovi iste biljne vrste). Kod procesa ekstrakcije sa etanolom ispitan je uticaj ultrazvuka, temperature i odgovarajućeg predtretmana biljnog materijala sa NKE na brzinu ekstrakcije i prinos ekstrakta, kao i na brzinu prenosa mase u čvrstoj fazi (opisane odgovarajućim koeficijentima difuzije).

Antibakterijska aktivnost biljnih ekstrakata na sojeve *Staphylococcus* vrsta, uključujući i sojeve *Staphylococcus aureus* koji su rezistentni na meticilin (MRSA), *Enterococcus*, uključujući i vankomicin rezistentne enterokoke (VRE), na *Streptococcus*, *Bacillus* i *Geobacillus* vrste, kao i na sojeve Gram-negativnih bakterija, *E. coli* i *Salmonella* Enteritidis ispitana je primenom modifikovane makro- i mikrodilucione metode u bujonu. Sa ispitivanjem osetljivosti sojeva bakterija na delovanje biljnih ekstrakata ispitivana je i njihova osetljivost na neke sintetičke antibiotike u cilju poređenja dobijenih rezultata i njihovog preciznijeg tumačenja.

U ovoj disertaciji posebno je ispitivana antibakterijska aktivnost smeša ekstrakata i ulja koji su pokazali najjaču antibakterijsku aktivnost, kao i antibakterijska aktivnost ekstrakata dobijenih simultanom NKE iz dvokomponentnih smeša biljnog materijala na nabrojane sojeve bakterija u cilju ispitivanja eventualnog sinergetskog efekta. Za ekstrakte koji su pokazali najbolju antibakterijsku aktivnost na navedene sojeve bakterija ispitan je sadržaj aktivnih komponenti primenom gasne i tečne hromatografije u cilju razumevanja veze između hemijskog sastava i antibakterijske aktivnosti ekstrakata.

Ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije bili su:

- određivanje parametara kinetike izolacije ekstrakata sa jakim antibakterijskim dejstvom iz odabranog začinskog i lekovitog bilja i lišaja *Usnea barbata* primenom različitih postupaka ekstrakcije, a pre svega natkritične ekstrakcije sa ugljenik(IV)-oksidom;
- određivanje parametara kinetike simultane natkritične ekstrakcije iz odabranih smeša biljnog materijala sa aspekta mogućeg uticaja pojedinih biljnih sirovina u smeši (odnosno njihovih glavnih komponenti) na povećanje rastvorljivosti u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu (kosolventski efekat) pa samim tim i na povećanje brzine ekstrakcije i smanjenje potrošnje natkritičnog fluida;
- definisanje hemijskog sastava i antibakterijske aktivnosti dobijenih ekstrakata, mešavina odabranih ekstrakata i etarskih ulja i ekstrakata dobijenih simultanom natkritičnom ekstrakcijom iz odabranih biljnih mešavina;
- simulacija različitih procesa ekstrakcije korišćenjem odgovarajućih matematičkih modela u cilju izračunavanja parametara kojima se opisuje prenos mase u posmatranom procesu ekstrakcije;
- uporedna analiza različitih postupaka izolacije antibakterijskih ekstrakata primenom eksperimentalne analize.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Prirodna jedinjenja sa antibakterijskom aktivnošću

Antibiotici predstavljaju grupu hemijskih jedinjenja koja usporavaju rast ili uništavaju mikroorganizme, u prvom redu bakterije. Otkriće antibiotika, kao i njihova uspešna i široka primena dovela su do prekretnice u borbi sa uzročnicima infektivnih oboljenja. Međutim, ubrzo nakon toga, došlo se do saznanja da su bakterije u stanju da razvijaju različite mehanizme odbrane i postaju otporne na dejstva antibakterijskih lekova. Danas, usled prekomerne upotrebe antibiotika u lečenju i prevenciji različitih infektivnih oboljenja, dolazi do rezistencije bakterija na sve veći broj antibiotika. Fenomen multirezistencije je prvi put otkriven šezdesetih godina prošlog veka kod stafilokoka, koje su vrlo brzo razvijale rezistenciju na gotovo sve široko primenjivane antibakterijske lekove (eritromicin, hloramfenikol, gentamicin, amikacin, i dr.). Danas se zna da fenomen rezistencije stafilokoka na antibiotike uključuje veliki broj faktora, kao što su struktura i farmakokinetika antibiotika, fiziološke osobine stafilokoka, pojava gena rezistencije i način njihovog širenja u prirodi, kao i biohemijske osnove mehanizma rezistencije, ali se još uvek otkrivaju novi detalji vezani za ovaj fenomen (Švabić-Vlahović i sar., 2008; Virella i sar., 1997). Obzirom da još uvek nije pronađeno efikasno rešenje problema multirezistencije bakterija na antibiotike, u svetu su danas veoma aktuelna ispitivanja novih antibakterijskih agenasa. S tim u vezi, u svetu se sprovodi sve veći broj ispitivanja antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata i njihovih komponenata kao alternativnih antimikrobnih agenasa i antiseptika za primenu u veterinarskoj i humanoj medicini (Weckesser i sar., 2007). S druge strane, zahtevi potrošača za tzv. zdravom, odnosno nekonzervisanom hranom i zakonska regulativa vezana za primenu sintetičkih aditiva podstakli su ispitivanja alternativnih prirodnih prehrambenih aditiva. Iz tog razloga, danas su veoma aktuelna ispitivanja aktivnosti biljnih ekstrakata na bakterije koje izazivaju kvarenje hrane, kao i na patogene bakterije koje se prenose hranom (Tajkarimi i sar., 2010).

2.1.1. Antibakterijska aktivnost etarskih ulja i ekstrakata iz lekovitog i začinskog bilja i lišajeva

Danas postoji više od 1340 biljnih vrsta za koje se zna da poseduju antibakterijsko delovanje i preko 30000 fenolnih jedinjenja iz biljnih ulja koja se koriste u prehrambenoj industriji. Poslednjih godina sve veći broj istraživanja usmeren je na ispitivanje mogućnosti primene etarskih ulja izolovanih iz lekovitog i začinskog bilja u prehrambenoj industriji u cilju produženja roka trajanja životnih namirnica, odnosno usporavanja ili sprečavanja razvoja patogenih bakterija i poboljšanja kvaliteta prehrambenih proizvoda (Bakkali i sar., 2008; Burt, 2004; Davidson, 2006; Gaysinsky i Weiss, 2007; Gutierrez i sar., 2008a; Lopez-Malovigil i sar., 2005; Moriera i sar., 2007; Patrignani i sar., 2008; Periago i sar., 2006; Ponce i sar., 2008; Raybaudi i sar., 2008; Rojas-Grau i sar., 2008; Razzaghi-Abyaneh i sar., 2008; Tajkarimi i sar., 2010; Vegara i sar., 2011). Pored primene u očuvanju kvaliteta prehrambenih proizvoda, lekovito i začinsko bilje i njihovi ekstrakti korišćeni su vekovima za lečenje kožnih oboljenja (Augustin i Hoch, 2004). Novija ispitivanja pokazala su da pojedina jedinjenja, kao što su karnozolna i usninska kiselina, imaju jako antibakterijsko delovanje na široki spektar bakterija koje izazivaju kožne infekcije (Weckesser i sar., 2007), što ukazuje na mogućnost njihove primene u formulacijama preparata za lečenje u veterinarskoj i humanoj medicini. Zbog porasta rezistencije bakterija na veliki broj antibiotika, biljni ekstrakti i jedinjenja izolovana iz biljnih sirovina dospela su u žižu interesovanja kao alternativni antiseptici i antimikrobni agensi (Augustin i Hoch, 2004; Blaschek i sar., 2004; Weckesser i sar., 2007).

Sva jedinjenja koja ulaze u hemijski sastav biljke su podeljena na primarne i sekundarne metabolite. Primarni metaboliti služe za ishranu i razvoj biljke, i to su: ugljeni hidrati, amino i nukleinske kiseline i pigmenti. Sekundarni metaboliti su sva ostala prisutna jedinjenja od alkaloida do fenola. Ova jedinjenja pomažu biljci da se regeneriše i odbrani od insekata i životinja. Etarska ulja, koja se smatraju nosiocima antibakterijske aktivnosti, spadaju u sekundarne produkte metaboličkih procesa koji se odvijaju u biljkama i predstavljaju složene smeše ugljovodonika, alkohola, etara, terpena i njihovih derivata, aldehida i ketona i drugih organskih jedinjenja (Fisher i Phillips, 2006). Pored etarskih ulja, i druga jedinjenja prisutna u biljnim tkivima, poput

glukozida, saponina, tanina, alkaloida i organskih kiselina, imaju antimikrobno dejstvo (Bajpai i Kang, 2008; Ceylan i Fung, 2004).

Ulja izolovana iz jestivog, lekovitog i začinskog bilja poput origana, ruzmarina, bosiljka, kurkuma, đumbira, belog luka, oraščića, karanfilića, čubra i morača, pojedinačno ili u kombinaciji sa konzervansima, pokazuju direktno ili indirektno delovanje na veliki broj Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Njihova efikasnost u suzbijanju rasta patogenih bakterija zavisi od velikog broja faktora, kao što su: pH, temperatura skladištenja, količina kiseonika, koncentracija etarskog ulja i aktivne komponente (Burt i sar., 2007; Gutierrez i sar., 2008a; Holley i Patel, 2005; Koutsoumanis i sar., 1999; Sandasi i sar., 2008; Tajkarimi i sar., 2010; Viuda-Martos i sar., 2008).

Saponini i flavonoidi se nalaze u voću, povrću, koštunjičavom voću, semenu, stablu, cvetovima, čajevima, vinima, propolisu i medu. Antibakterijska aktivnost saponina, flavonoida, antrahinona, ugljenih hidrata i alkaloida dobijenih ekstrahovanih iz korena, kore i listova nekih biljaka prikazana je u ranije objavljenim radovima (Bahraminejad i sar., 2008; Cushnie i Lamb, 2005; Kuete i sar., 2008; Musyimi, i sar., 2008). Tiosulfinati iz belog luka su, takođe, pokazali jako antibakterijsko dejstvo na Gram-negativne bakterije (Kim i sar., 2008). U novije vreme, pokazalo se da nefenolna jedinjenja izolovana iz karanfilića, cimeta, belog luka, korijenadera, ruzmarina, origana, timijana, žalfije, bosiljka, lavande i limunove trave (Angioni i sar., 2004; Davidson i Naidu, 2000; Daferera i sar., 2000; Gutierrez i sar., 2008a; Holley i Patel, 2005; Nejad Ebrahimi i sar., 2008; Nguefack i sar., 2007; Oussalah i sar., 2004), čubra (Skocibusic i sar., 2006), bergamota (Mandalari i sar., 2007) imaju jako antibakterijsko dejstvo na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.

Novija istraživanja pokazuju da, pored aromatičnog bilja, i lišajevi predstavljaju značajnu sirovinu za prehrambenu, farmaceutsku, kozmetičku industriju, industriju stočne hrane, proizvodnju začina, parfema, boja i dr. Poznato je da su lišajevi sposobni da prežive i prilagode se najrazličitijim stanovištima zbog sporog metabolizma i proizvodnje biološki aktivnih jedinjenja (Cocchietto i sar., 2002). U novijoj literaturi može se naći detaljan pregled izvora lekovitih supstanci u različitim vrstama lišajeva (Shukla i Joshi, 2010).

Usnea barbata ili jevrejska brada (eng. Old Man's Beard, Beard Lichen, Treemoss) pripada familiji Parmeliaceae i raste na stablima i granama različitih drvenastih i četinariskih vrsta. Ovaj lišaj čini kombinaciju dve vrste organizama, gljiva (Ascomycota) i algi (Chlorophyta), koje žive u simbiotskoj zajednici. Ovaj lišaj je teško definisati zbog izuzetne morfološke varijabilnosti. Naseljava severnu hemisferu Azije, Evrope i Severne Amerike. Zbog stalnog smanjenja broja lokacija na kojima se nalazi u Nemačkoj i Nepalju je zaštićena kao vrsta. Danas se sirovina za industrijsku proizvodnju ekstrakta *U. barbata* u Nemačkoj uvozi iz Indonezije. *Usnea* se već 3000 godina koristi u kineskoj medicini, savremenoj homeopatiji i tradicionalnoj medicini širom sveta (Simović, 2003). *U. barbata* je u monografijama nemačke komisije odobrena za lečenje blagih upala sluznice usne duplje i ždrele. Tablete na bazi ekstrakta iz *U. barbata* se koriste za dezinfekciju gornjeg respiratornog trakta, u slučaju bubrežnih infekcija, za lečenje gonoreje (*Candida albicans*) i infekcija koje izaziva *Chlamydia* (Quirin, 2007). U novijoj literaturi se smatra da širok spektar bioloških dejstava *U. barbata*, kao što su: antibakterijsko, antifungicidno, antivirusno, analgetsko, antipiretično i citotoksično delovanje, potiče od prisustva usninske kiseline (Huneck, 1999; Ingólfssdóttir, 2002), koja se nalazi još i u lišajevima rodova *Alectoria*, *Cladonia*, *Lecanora*, *Ramalina* i *Evernia*. Usninska kiselina [2,6-diacetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandion] (C₁₈H₁₆O₇, CAS No.: 125-46-2), koja je izolovana 1844. godine, jedan je od najproučavanijih sekundarnih metabolita iz lišajeva sa komercijalnom primenom u proizvodnji farmaceutika, parfema i u ekologiji (u suzbijanju insekata i drugih štetočina) (Bazin i sar., 2008; Ingólfssdóttir, 2002). Kao čista supstanca, dodaje se u formulacijama krema, pasta za zube, sredstava za ispiranje usta, dezodoranasa i preparata za sunčanje kao aktivna supstanca ili konzervans.

Usninska kiselina pokazala je izuzetno jako antibakterijsko delovanje na Gram-pozitivne bakterije, uključujući sojeve *S. aureus* rezistentne na meticilin (MRSA) i kliničke izolate *Enterococcus* vrsta (Cocchietto i sar., 2002; Lauterwein i sar., 1995; Rowe i sar., 1999; Weckesser i sar., 2007). U novijoj literaturi (Weckesser i sar., 2007) zabeležena je jaka antibakterijska aktivnost usninske kiseline na Gram-pozitivne i Gram-negative bakterije (*Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Peptococcus magnus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella parvula* i *Porphyromonas gingivalis*) i kvasac *Malassezia furfur*.

U tabeli 1 prikazan je literaturni pregled relevantnih ispitivanja antibakterijskog dejstva etarskih ulja i ekstrakata izolovanih iz odabranog lekovitog i začinskog bilja koje je korišćeno u ovoj doktorskoj disertaciji

Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom

(ruzmarin, žalfija, origano, timijan, karanfilić, lovor, anđelika, ehinacea, divizma, neven) i lišaja *U. barbata* na sojeve bakterija koje utiču na kvarenje hrane ili su uzročnici različitih infektivnih oboljenja.

Tabela 1 Prirodna jedinjenja sa antibakterijskim delovanjem u odabranom lekovitom i začinskom bilju i lišaju *U. barbata* –literaturni pregled (2000–2010)

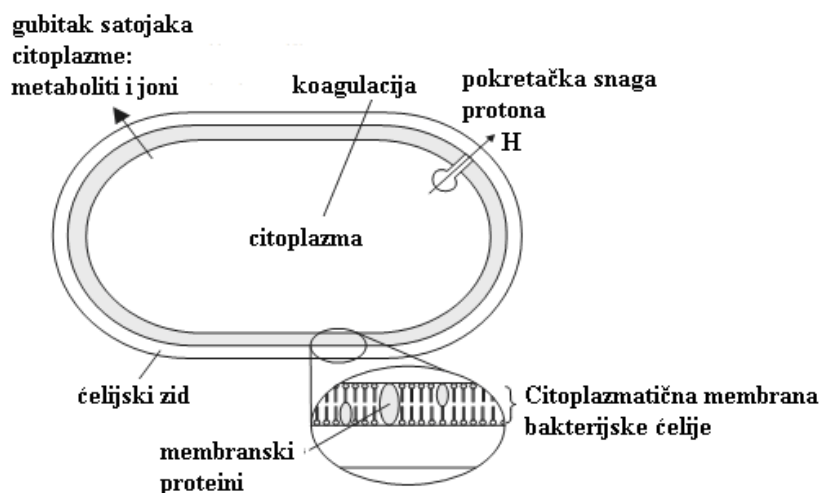
Naziv biljne vrste	Droga	Nosioci antibakterijske aktivnosti u etarskim uljima i/ili ekstraktima	Ispitani sojevi bakterija	Izvor
Origano (<i>Origanum vulgare</i>)	List/cvet	Karvakrol/timol	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Listeria spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella Enteritidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Abdel-Massih i sar., 2010; Bozin i sar., 2006; Leite de Souza i sar., 2009; Rivas i sar., 2010; Soković i sar., 2010; Dušan i sar., 2006; Nedorostova i sar., 2009; Weerakkody i sar., 2010; Gutierrez i sar., 2009; Nostro i sar., 2004
Ruzmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	List	Kamfor/1,8-cineol/borneol/kamozol i karnozolna kiselina/ruzmarinska kiselina	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. aureus rezistentan na metilcin (MRSA)</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>Salmonella Typhi</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>Shigella sonnei</i>	Abdel-Massih i sar., 2010; Bernardes i sar., 2010; Bozin i sar., 2007; Gachkar i sar., 2007; Genena i sar., 2008; Okoh i sar., 2010; Rožman i Jeršek, 2009; Jarrar i sar., 2010; Vegara i sar., 2011; Weckesser i sar., 2007; Yesil Celiktas i sar., 2007; Zaouali i sar., 2010;
Žalfija (<i>Salvia officinalis</i>)	List	Tujon/1,8-cinol/borneol/kamfor/kamozol i karnozolna kiselina	<i>B. subtilis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Proteus sp.</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Bacillus megatherium</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas sobria</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Ashbyia gossypii</i> , <i>Bacillus liqueniformis</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pichia subpelliculosa</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Trichosporum fermentans</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	Bozin i sar., 2007; Bouaziz i sar., 2009; Gautam i sar., 2007; Soković i sar., 2010; Stanojević i sar., 2010; Weckesser i sar., 2007
Timijan (<i>Thymus vulgaris</i>)	List	Timol/karvakrol	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> i <i>Enterococcus spp.</i> , uključujući sojeve MRSA, i sojeve VRE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Al-Bayati, 2008; Ayachi i sar., 2009; Bozin i sar., 2006; Gautam i sar., 2007; Gill i Holley, 2006; Mišić i sar., 2009; Nedorostova i sar., 2009; Soković i sar., 2010; Weckesser i sar., 2007; Vegara i sar., 2011;
Karanfilic (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Pupoljak	Eugenol	<i>E. coli</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>P. Aeruginosa</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. typhi</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	Gill i Holley, 2006; Goni i sar., 2009; Leonard i sar., 2010; Pandima Devi i sar., 2010; Gómez-Estaca i sar., 2010

Lovor (<i>Laurus nobilis</i>)	List	1,8-cineole/linalool/ α -terpini acetat	Staphylococcus spp., <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enteridis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Proteus vulgaricus</i> , <i>Proteus mittergeri</i> , <i>Proteus penneri</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacea</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> (MRSA)	Cavero i sar., 2006; Ivanovic i sar., 2010; Malti i Amarouch, 2009; Otsuka i sar., 2008
Andelika (<i>Angelica archangelica</i>)	Koren	Kumarini	<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> i <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus</i> i <i>Enterococcus</i> , uključujući sojeve MRSA, sojeve VRE kao i referentne sojeve <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> i <i>S. aureus</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i>	Gautam i sar., 2007; Mišić i sar., 2010b; Mišić i sar., 2009b; Ojala i sar., 2000
Ehinacea (<i>Echinacea angustifolia</i>)	Cvet	Alkilamidi/ polisaharidi/ kafeinska kiselina i derivati/ polini	<i>S. aureus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Propionibacterium acne</i> , <i>M. smegmatis</i>	Deng i sar., 2008; Mišić i sar., 2009b; Sharma i sar., 2008; Sharma i sar., 2011
Divizma (<i>Verbascum thapsus</i>)	Cvet/nadzemni deo	Saponini	<i>S. aureus</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>E. coli</i> , <i>Mycobacterium avium</i> i <i>M. smegmatis</i> (list), <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Mišić i sar., 2009; Gautam i sar., 2007; Panchal i sar., 2010
Neven (<i>Calendula officinalis</i>)	Cvet	Flavonoidi, karotenoidi, Glikozidi i steroli	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>T. schoeleinii</i> , <i>Microsporium canis</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Chakraborty, 2008; Roopashree i sar., 2008
Aloa vera (<i>Aloe barbadensis</i> Miller)	List	p-kumarinska kiselina/vitamin C/pirokatehol/ cimetna kiselina	<i>E. coli</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> vrste (uključujući sojeve MRSA), <i>Streptococcus</i> vrste, <i>E. faecalis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Corynebacterium amycolatum</i> , <i>C. pseudodiphthericum</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bacteroides vulgates</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Peptococcus magnus</i>	Arunkumar i Muthuselvam, 2009; Cook, 2008; Gautam i sar., 2007; Lawrence i sar., 2009; Saritha i sar., 2010
Usnea (<i>Usnea barbata</i>)	lišaj (talus)	Ushinska kiselina		Lauterwein i sar., 1995; Mišić i sar., 2010a i 2010b; Najdenova i sar., 2001; Wecksser i sar., 2007

2.1.2. Mehanizam dejstva

I pored brojnih studija antibakterijskog efekta etarskih ulja i jedinjenja izolovanih iz lekovitog i začinskog bilja (Burt, 2004, 2007; Bakkali i sar., 2008; Gutierrez i sar., 2009; Silva i Fernandes Jr., 2010; Tajkarimi i sar., 2010), u literaturi ima malo podataka o mehanizmu njihovog dejstva. Antibakterijsko delovanje etarskih ulja ogleda se u strukturnim i funkcionalnim oštećenjima bakterijske ćelije putem različitih mehanizama, kao što su: napad na fosfolipidni dvoslojni omotač ćelijske membrane, razaranje enzimskih sistema koji sadrže genetski materijal bakterije i formiranje hidrosiperoksidaza masnih kiselina oksidacijom nezasićenih masnih kiselina (Arques i sar., 2008; Burt i sar., 2007; Lanciotti i sar., 2004; Proestos i sar., 2008; Silva i sar., 2007; Skocibusic i sar., 2006). Uzimajući u obzir broj komponenata koje ulaze u sastav etarskih ulja i biljnih ekstrakata više je verovatno da se antibakterijsko delovanje ostvaruje putem više mehanizama (Burt, 2007). Mesta ili mehanizmi delovanja u datoj bakterijskoj ćeliji su označeni na slici 1. Etarska ulja su hidrofobna, što im omogućava da učestvuju u reorganizaciji lipida u ćelijskoj membrani bakterije i na taj način povećavaju njenu propustljivost. Ovo omogućava oslobađanje jona i drugih materija iz ćelije bakterije i usporavanje njenog razvoja (odumiranja bakterijske ćelije).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, pokazalo se su Gram-pozitivne bakterije osetljivije na prisustvo etarskih ulja i ekstrakata (odnosno njihovih komponenata). To se objašnjava postojanjem spoljašnje membrane kod Gram-negativnih ćelija, koja otežava difuziju hidrofobnih jedinjenja kroz liposaharidni omotač (Burt, 2004, 2007).



Slika 1 Mesta u ćeliji bakterije na kojima se ostvaruje dejstvo etarskih ulja i/ili pojedinih komponenti (adaptirano prema Burt i sar., 2004)

Hemijska struktura pojedinih komponenata etarskih ulja i ekstrakata utiče na njihovo specifično delovanje i antibakterijsku aktivnost. Tako je prisustvo hidroksilne grupe u fenolnim jedinjenjima, kao što su karvakrol i timol, veoma značajno za antibakterijsko delovanje bez obzira na njen položaj. Dejstvo timola na *B. cereus*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* je slično kao dejstvo karvakrola, ali se pokazalo da ova dva jedinjenja nemaju isto delovanje na Gram-negativne bakterije. Negativni uticaj fenolnog prstena (destabilizovanih elektrona) na antibakterijsku aktivnost pokazan je na primeru mentola, koji je pokazao slabije dejstvo u poređenju sa karvakrolom (Ultee i sar., 2002). Prisustvo acetatne grupe kod geraniol acetata utiče na povećanje antibakterijskog delovanja veliki broj vrsta Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija u odnosu na sam geraniol (Dorman i Deans, 2000). Pokazalo se da kod nefenolnih jedinjenja prisustvo odgovarajuće alkil grupe utiče na aktivnost (alkenil>alkil). Limonen (1-metil-4-(1-metiletetil)-cicloheksen) se pokazao efikasnijim u odnosu na *p*-cimen u pogledu antibakterijskog dejstva (Dorman i Deans, 2000). Neka jedinjenja prisutna u etarskim uljima, kao što su karvakrol i timol (glavne komponente ulja origana i timijana), deluju na ćelijske proteine u citoplazmičkoj membrani (enzimi, kao što su ATPaze, nalaze se u ćelijskoj membrani i okruženi su lipidnim molekulima) i povećavaju njenu propustljivost. Karvakrol i timol imaju sposobnost razlaganja

spoljašnje membrane kod Gram-negativnih bakterija, pri čemu dolazi do oslobađanja lipopolisaharida i povećanja propustljivosti citoplazmatične membrane za ATP (Helander i sar., 1998). Karvakrol reaguje sa ćelijskom membranom *B. cereus* tako što rastvara fosfolipidni dvosloj i što se umeće između lanaca masnih kiselina (Ultee i sar., 1999). Narušavanje fizičke strukture dovodi do ekspanzije i destabilizacije membrane, povećavajući njenu fluidnost, što prelazi u njenu pasivnu propustljivost (Ultee i sar., 2002, 2000, 1999). Karvakrol, takođe, formira kanale kroz membranu razdvajanjem lanaca masnih kiselina fosfolipida, što dovodi do isticanja fosfatnih jona iz ćelija *S. aureus* i *P. aeruginosa* (Lambert i sar., 2001). Timol se vezuje za membranske proteine hidrofobno i vodoničnim vezama i na taj način menja propustljivost membrane kod ćelija bakterija *Salmonella Typhimurium* i *S. aureus* sojeva. Vrednost pH, takođe, utiče na dejstvo timola tako što je pri nižim pH vrednostima od 5,5 do 6,5 timol nedisosovaniji i hidrofobniji pa može bolje da se veže za proteine i samim tim da se bolje rastvori u lipidnoj fazi (Juven i sar., 1994). Eugenol, glavna komponenta etarskog ulja karanfilića (i do oko 90 %), dovodi u velikoj meri do razgradnje ćelijskog zida i rastvaranja ćelijskog sastava. Pretpostavlja se da hidroksilna grupa vezuje proteine, sprečavajući enzimsko delovanje u *E. aerogenes* (Thoroski i sar., 1989; Wendakoon i Sakaguchi, 1995). *p*-Cimen, biološki prekursor karvakrola i timola, hidrofoban je i dovodi do bubrenja citoplazmatične membrane u većoj meri od karvakrola.

2.1.3. Sinergetsko dejstvo ekstrakata

Kada je kombinovani efekat supstanci veći od pojedinačnih, kaže se da postoji sinergetski efekat, i obrnuto, kada je kombinovano dejstvo manje, kaže se da postoji antagonistički efekat (Burt, 2004). U novijoj literaturi mogu se naći podaci o sinergetskom efektu antibakterijskog delovanja smeša pojedinih etarskih ulja ili pojedinačnih komponenti, kao i smeša etarskih ulja i antibiotika, na neke sojeve bakterija (Abdalla i sar., 2007; Becerril i sar., 2007; Gutierrez i sar., 2009; Rota i sar., 2008). Ispitivanja sinergetskog efekta su od posebnog značaja u pogledu smanjenja količine odgovarajuće aktivne komponente (etarskog ulja, ekstrakta ili čiste supstance) koju treba dodati u dati prehrambeni ili farmaceutski proizvod. Poznato je da primena smeše karvakrola i timola u odgovarajućim odnosima ima sinergetski efekat kod primene na patogene mikroorganizme (Lambert i sar., 2001; Michiels i sar., 2007). Aldehyd cimetine kiseline sa timolom i karvakrolom pokazao je pojačano antibakterijsko delovanje na *S. Typhimurium* (Zhou i sar., 2007). Sinergetski efekat kod smeše karvakrola i *p*-cimenosa posledica je olakšanog prenosa karvakrola unutar ćelije posredstvom *p*-cimenosa, koji utiče na bubrenje ćelijskog zida *B. cereus* (Burt, 2004, 2007; Ultee i sar., 2002). U literaturi je zabeleženo pojačano antibakterijsko dejstvo smeše ulja karanfilića i cimeta u obliku para pri manjoj koncentraciji u odnosu na tečnu fazu (Goni i sar., 2009). Timol i karvakrol u kombinaciji sa uljima kineskog peršuna, korijandera, mirođije i eukaliptusa pokazuju sinergistički i antagonistički efekat, kao i smeša aldehida cimetine kiseline i eugenola na *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* i *Enterobacter* vrste (Burt, 2004, 2007). Karvakrol i timol, u prisustvu soli, imaju antagonistički efekat na *B. cereus* u pirinču; kod primene visokog hidrostatičkog pritiska zabeležen je sinergetski efekat timola i karvakrola na soj *L. monocytogenes* (Burt, 2004, 2007). Pokazalo se da smanjenje kiseonika kod pakovanja u modifikovanoj atmosferi uz primenu etarskih ulja dovodi do povećanja osetljivosti sojeva bakterija na etarska ulja (Burt, 2004, 2007). Smeše eugenola i timola, kao i eugenola i karvakrola, imaju pojačano dejstvo na bakterije koje izazivaju spoljne infekcije (*Streptococcus* i *Prevotella* vrste i *Peptostreptococcus anaerobius*) (Didry i sar., 1994). Eugenol, glavna komponenta u ulju karanfilića, pokazala je sinergetsko dejstvo u kombinaciji sa antibioticima na Gram-negativne bakterije, kao što je *E. coli* (Hemaiswarya i Doble, 2009). Gallucci i sar. (2006) pokazali su da timol ili eugenol u kombinaciji sa penicilinom imaju pojačano dejstvo na MRSA ATCC 25923 soj, dok mircen u kombinaciji sa penicilinom ima antagonističko dejstvo isti soj. Takođe, pokazano je da bisabolol ima pojačano dejstvo sa eugenolom (Pauli, 2001).

Sinergetsko dejstvo nisina i karvakrola na *B. cereus* se povećava sa temperaturom od 8 °C do 30 °C. Ruzmarinski ekstrakt pojačava antibakterijsko dejstvo nisina na *Listeria monocytogenes* i *B. cereus in vitro* i u pilećoj supi, kao i sosevima za testenine sa mesom i sirom (Thomas i Isak, 2006). Dokazano je da ulje origana u kombinaciji sa pakovanjem u modifikovanoj atmosferi produžava rok trajanja sveže piletine (Chouliara i sar., 2007). S druge strane, smeša linaloola i 1,8-cineola (1:1) ima smanjeno dejstvo na *E. coli* u odnosu na čisti

linalool. Novija ispitivanja su pokazala da 1,8-cineol u smeši sa linaloolom može imati i sinergetsko i antagonističko delovanje na Gram-negativne bakterije (Randrianarivelo i sar., 2009). Smeša aromadendrena i 1,8-cineola pokazala je aditivno i u nekim slučajevima sinergističko delovanje na MRSA i VRE sojeve (Mulyaningsih i sar., 2010).

Smeše etarskih ulja origana sa uljima timijana i majorana imaju pojačano delovanje na sojeve *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* O157:H7 i *L. monocytogenes* (Gutierrez i sar., 2008a). Smeša ulja timijana i matičnjaka pokazala je pojačano dejstvo na *L. monocytogenes* (Gutierrez i sar., 2009). U novije vreme ispitivan je sinergistički efekat kombinacija etarskih ulja žalfije sa natrijum nitritom, natrijum benzoatom i kalijum sorbatom (Stanojević i sar., 2010) na *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis* i *Proteus* vrsta., kao i ulja ruzmarina sa cefuroksimom (Jarrar i sar., 2010) na MRSA sojeve. Smeša ulja timijana i anisa pokazala je pojačano antibakterijsko delovanje na *P. aeruginosa* (Al-Bayati, 2008).

Bez obzira na dokazano antibakterijsko delovanje ekstrakata nekih biljaka, njihova primena u kliničkoj veterinarskoj i medicinskoj praksi je i dalje limitirana zbog citotoksičnog delovanja ekstrakata većine vrsta biljaka u niskim koncentracijama nižim od njihovih minimalnih inhibitornih koncentracija. Iz tog razloga uporedo sa ispitivanjima antibakterijske aktivnosti vrše se i ispitivanja toksičnosti biljnih ekstrakata na ćelije domaćina u koncentracijama koje odgovaraju vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija tih ekstrakata (Mišić i sar., 2009a).

2.2. Postupci izolacije bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala

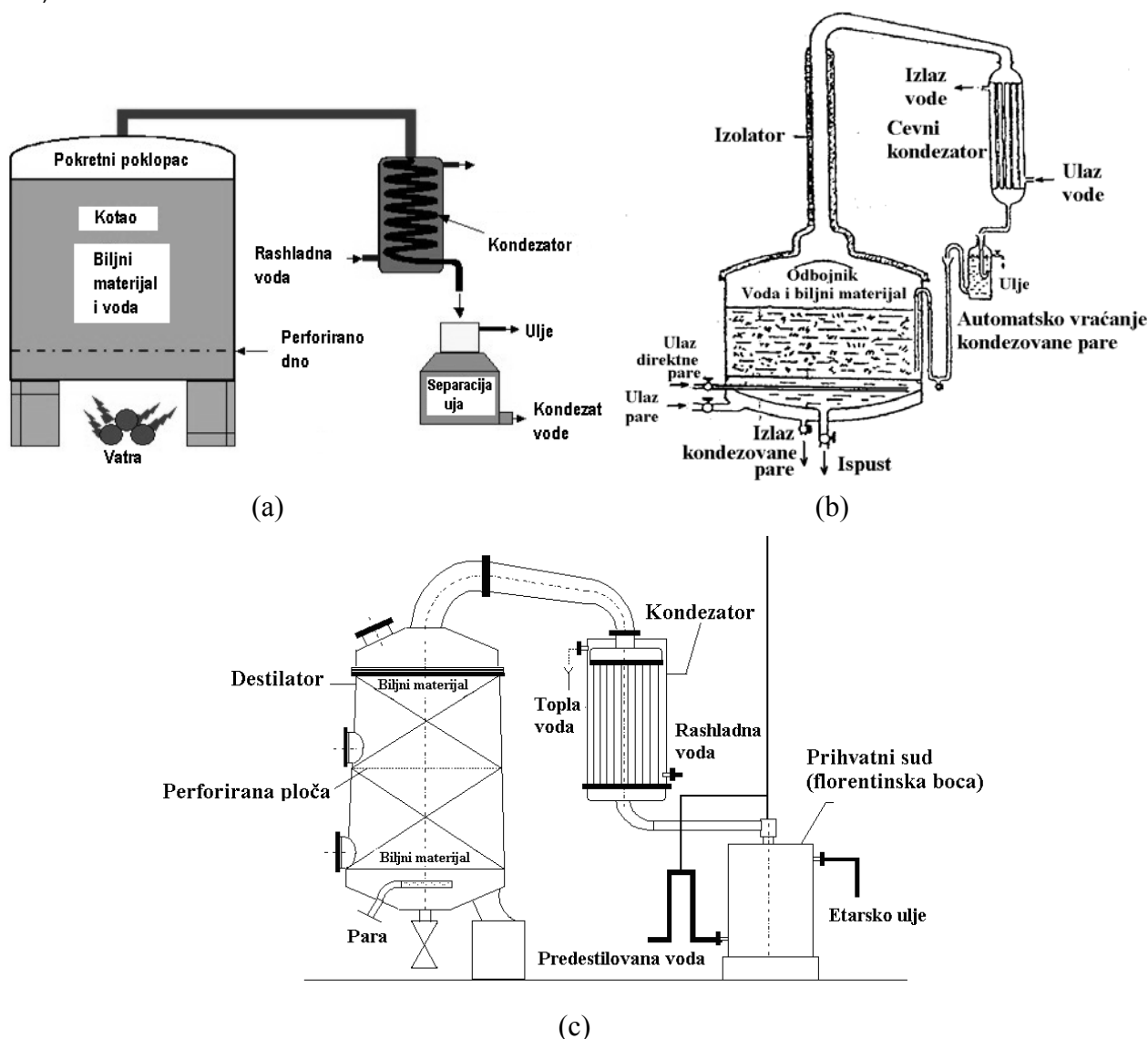
Danas se koristi veliki broj ekstrakcionih tehnika i rastvarača za izolaciju različitih klasa biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala (terpeni, vitamini, karotenoidi, masne kiseline i dr.) (Wang i Weller, 2006). Kod izbora odgovarajuće tehnike ekstrakcije treba voditi računa o toksičnosti rastvarača, selektivnosti procesa u odnosu na željenu grupu jedinjenja, kao i na mogućnost razgradnje aktivnih komponenata u ekstraktu. Pri projektovanju procesa za izolaciju bioaktivnih ekstrakata odlučujući su sledeći faktori: (a) biljna sirovina, (b) totalni prinos koji se ostvaruje datim postupkom, (c) produktivnost, (d) selektivnost i (e) regeneracija iskorišćenog rastvarača. Prva tri faktora su direktno povezana sa ekonomskom održivošću datog procesa, četvrti sa kvalitetom i čistoćom finalnog proizvoda, dok je poslednji u vezi ne samo sa ekonomikom procesa već i sa očuvanjem životne sredine. U ovom odeljku opisane su prednosti i nedostaci tehnologija koje se danas najčešće koriste za dobijanje masnih i etarskih ulja i ekstrakata sa biološkim dejstvom. Obzirom na značaj i brojne prednosti u odnosu na druge metode ekstrakcije, postupak natkritične ekstrakcije biće detaljnije opisan u poglavlju 2.3.

2.2.1. Klasični postupci izolacije bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala

Hidrodestilacija. Postupak hidrodestilacije se primenjuje za izolovanje, prečišćavanje ili razdvajanje supstanci koje se ne mešaju ili se neznatno mešaju sa vodom. U sistemu dve tečnosti koje se ne mešaju zasićene pare tečnosti ponašaju se u skladu sa Daltonovim zakonom koji glasi: "Ukupni pritisak pare smeše jednak je zbiru parcijalnih pritisaka komponenata." Temperatura ključanja ovakve smeše je temperatura na kojoj je suma parcijalnih pritisaka jednaka atmosferskom pritisku. Parcijalni pritisak svake komponente jednak je naponu pare čiste komponente na toj temperaturi. Temperatura ključanja niža je od temperature ključanja svake pojedinačne komponente. Para koja napušta smešu sadrži vodu i željene supstance. Posle kondenzacije dobijaju se dve tečne faze, pri čemu je jedna vodena, a druga organska, tj. željena supstanca. Etarska ulja se tradicionalno dobijaju postupkom **hidrodestilacije** na atmosferskom ili sniženom pritisku (vakuum destilacija). Osnovne prednosti postupaka hidrodestilacije ogledaju se u mogućnosti prerade velikih količina biljne sirovine, što ih čini najrentabilnijim postupcima za izdvajanja ulja iz lekovitih i aromatičnih biljaka.

Postoje tri načina izvođenja hidrodestilacije: obična, vodeno-parna i parna. Kod obične hidrodestilacije biljni materijal se preliva vodom i zagreva (Stanković i sar., 1994). Sirovina je sve vreme potopljena u ključaloj vodi, a pare koje izlaze kondenzuju se u kondenzatoru i destilat se sakuplja u sudu, gde dolazi do odvajanja uljne i vodene faze (slika 2a). Zbog malog prinosa i slabog kvaliteta etarskog ulja, ovaj postupak se primenjuje

u ruralnim sredinama daleko od industrijskih postrojenja, kod malih proizvođača za koje je investicija u kotao za paru velika. Na ovaj način najčešće se destiliše ulje lavande, majčine dušice i ružino ulje Retko se koristi jer tokom procesa može doći do saponifikacije estara, koja je često ubrzana katalitičkim dejstvom nekog metala prisutnog u materijalu od koga je načinjen sud, i nepovoljnog delovanja povišene temperature (Skala i sar., 1999).



Slika 2 (a) Šema postrojenja za (b) običnu hidrodestilaciju, (b) vodeno-parnu hidrodestilaciju (Heckmann, Leipzig), i (c) parnu destilaciju

U slučaju vodeno-parne hidrodestilacije biljni materijal je potopljen u vodi, a vodena para (proizvedena u parnom kotlu) se istovremeno direktno uvodi u suspenziju biljnog materijala čime se postiže pojačano zagrevanje i mešanje suspenzije (slika 2b). Na taj način se ubrzava izdvajanje etarskog ulja, skraćuje vreme trajanja destilacije i ostvaruje veći prinos etarskog ulja (Stanković i sar., 1994). Kroz suspenziju biljnog materijala u destilacionom kotlu prolazi odozdo na gore vodena para, a u kondenzatoru se mešavina para kondenzuje. Destilacioni uređaj ima razdvajač, gde se odvaja ulje od vode, i to kao poseban uređaj. Najbolje rezultate daju uređaji zapremine do 0,3 m³. Oni su laki su za manipulaciju, ne zahtevaju veliki utrošak radne snage i ložište im može biti urađeno za čvrsto, tečno ili gasovito gorivo. Kod uređaja zapremine veće od 1 m³ teško je kontrolisati ponašanje pare sa povećanjem visine i širine sloja sirovine sa kojim para dolazi u kontakt a da se pri tome ne uništi esencijalno svojstvo ulja u tretiranoj sirovini (naročito u donjim slojevima) (Skala i sar., 1999). Pored toga, za destilatore većeg kapaciteta neophodno je obezbediti posebne generatore pare koji bi trebalo da obezbede najmanje 150-350 kg/h pare. Generatori pare veliki potrošači električne energije ili

drugog oblika energije pa se to direktno odražava na konačnu cenu koštanja proizvedenog ulja. Destilacija vodenom parom je najzastupljeniji način dobijanja etarskih ulja. Kod konvencionalnih parnih hidrodestilatora vodena para se generiše odvojeno u parnom kotlu i dovodi u destilacioni kotao u kome se biljni materijal nalazi iznad perforiranog dna ili korpe (Stanković i sar., 1994). Vodena para zajedno sa parama ulja se dalje kondenzuje u višecvnom kondenzatoru, nakon čega se u prihvatnom sudu vrši odvajanje kondenzata vode i ulja. Parna destilacija se koristi u slučajevima kada biljna sirovina ima visok procenat etarskog ulja i kad su komponente etarskog ulja stabilne na temperaturi na kojoj se odvija destilacija ulja. Ovaj način se ne preporučuje kod biljnih sirovina koje imaju manje od 0,1 % etarskog ulja ili sadrže komponente koje se rastvaraju u vodi (Skala i sar., 1999).

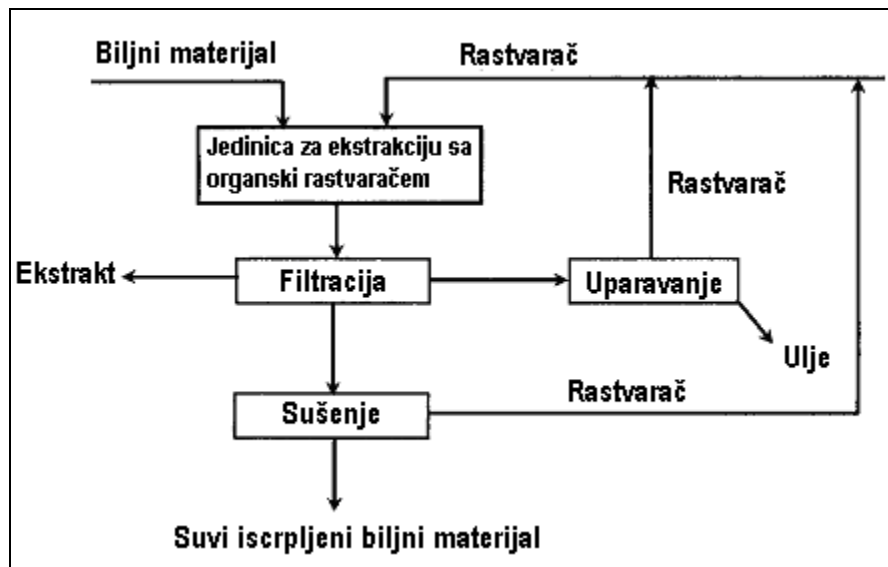
Efikasnost destilacije etarskog ulja zavisi od brzine difuzije etarskog ulja kroz ćelijsku membranu, hidrolize datih komponenti ulja i brzine razgradnje nekih jedinjenja usled temperature na kojoj se izvodi destilacija. Usled povišene temperature i prisustva vlage, prilikom hidrodestilacije može doći do različitih promena etarskog ulja. Čak i kada ne dolazi do hemijskih promena etarskog ulja u toku hidrodestilacije, deo najlakše isparljivih komponenata može direktno ispariti, u vodi mogu da se rastvore neke komponente, a do promene mirisa može doći i zbog razlaganja neisparljivih sastojaka biljke (Skala i sar., 1999).

U procesu hidrodestilacije istovremeno dolazi do odigravanja tri procesa: hidrodifuzije (difuzija etarskog ulja i vruće vode kroz membrane biljnih ćelija), hidrolize i termičke degradacije nekih komponenti etarskog ulja. U većini slučajeva, sa povećanjem temperature dolazi do povećanja stepena difuzije i rastvorljivosti etarskog ulja. Na temperaturi ključanja vode, deo etarskog ulja se rastvara u vodi koja je prisutna u sekretornim žlezdama i prenosi osmozom kroz nabubrele membrane biljnih ćelija i na spoljnu površinu membrane, dok voda ulazi u ćelije žlezda. U procesu destilacije dolazi do hidrolize estara koji su nekad prisutni u etarskim uljima, pri čemu se grade kiseline i alkoholi, što je i jedan od nedostataka hidrodestilacije. Stepenn hidrolize zavisi od vremena kontakta vode i etarskog ulja i manji je u slučaju destilacije vodenom parom. Obzirom da su sve komponente etarskog ulja nestabilne na visokim temperaturama, poželjno je vršiti destilaciju što kraće i na nižoj temperaturi.

U cilju ostvarivanja što većih prinosa etarskog ulja predlaže se: (a) što niža temperatura hidrodestilacije, (b) dodavanje dovoljne količine vode u sistem kod destilacije sa vodom i vodenom parom, da bi se ubrzala difuzija, (c) izbegavanje ekstremnog usitnjavanja biljne sirovine, jer u slučaju destilacije vodenom parom može doći do stvaranja kanala kroz masu biljnog materijala, pri čemu se smanjuje efikasnost destilacije zbog njegovog lošeg kontakta sa vodenom parom, i (d) povećanje brzine destilacije, tj. zagrevanja (Milojević i sar., 2008). Destilacija se u praksi može izvoditi na atmosferskom, na neznatno sniženom i povišenom pritisku. Smanjenjem pritiska u aparatu, količina pare u destilacionom prostoru i brzina ekstrakcije se znatno povećavaju. Površina potrebna za kondenzaciju je oko pet puta veća od one koja je potrebna za destilaciju pri atmosferskom pritisku. Najveća prednost hidrodestilacije pod sniženim pritiskom ogleda se u činjenici da se ona može izvoditi na relativno niskim temperaturama (~50 °C), čime se smanjuje termička i hidrolitička razgradnja etarskih ulja. Hidrodestilacija na povišenom pritisku (~0,4 MPa) se generalno ne preporučuje za destilaciju aromatičnih biljaka, a primenjuje se u cilju povećanja prinosa teško isparljivih ulja i skraćanja vremena destilacije.

Ekstrakcija rastvaračima. Izolacija bioaktivnih jedinjenja **ekstrakcijom organskim rastvaračima** (alkohol, petroletar, benzen, aceton, n-heksan i dr.) primenjuje se kada biljni materijal sadrži termolabilna jedinjenja. Ovim postupkom se dobijaju ekstrakti koji se koriste u industriji parfema, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Ekstrakcija rastvaračem se zasniva na primeni rastvarača različite polarnosti. Od polarnih rastvarača, najčešće se koriste voda, etanol, metanol i glicerol, a od nepolarnih n-heksan, aceton, petroletar, dietiletar, benzen i dr. Uparavanjem nepolarnih rastvarača na normalnom ili sniženom pritisku dobija se *konkret*, a otparavanjem polarnih rastvarača *rezinoid*. Konkreti sadrže voskove i parafine i koriste se kao mirisne supstance u proizvodnji sapuna i krema. Reekstrakcijom konkreta razblaženim alkoholom, filtracijom i odstranjivanjem alkohola pod sniženim pritiskom dobijaju se *apsolutna ulja* koja se koriste u parfimeriji. Maceracija (jednostepena ekstrakcija) se izvodi u uređajima sa perforiranim dnom ispod kojeg se nalazi barboter za direktno uvođenje pare za uklanjanje rastvarača koji zaostaje u drogi, sa odvodom za pare rastvarača i otvorom za punjenje drogom i pražnjenje. U praksi se koriste statički i rotirajući ekstraktori (Pekić, 1983). Pored ovog postupka, koriste se postupak remaceracije (dvostepena maceracija), digestija (maceracija na temperaturama od 50 °C) i perkolacija (rastvarač protiče kroz stub droge odozgo naniže) (Ph. Jug. IV, 1984;

Ph. Jug. V, 2000, Ph. Eur., 2002). U ekstraktima izolovanim ekstrakcijom pomoću organskih rastvarača zaostaju u manjoj ili većoj meri tragovi rastvarača, što često ograničava njihovu primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Drugi nedostatak je česta potreba za primenom višestepene ekstrakcije sa dva ili više organska rastvarača zbog nedovoljne selektivnosti pojedinih rastvarača u odnosu na željenu grupu jedinjenja. Nedostatak ove metode izolacije sa aspekta zaštite životne sredine je i potreba za regeneracijom organskih rastvarača. Na slici 3 je prikazana šema procesa ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja sa organskim rastvaračem.



Slika 3 Šematski prikaz postupka izolacije biološki aktivnih ekstrakata iz biljnog materijala ekstrakcijom sa organskim rastvaračima

“Enfleurage” postupak. U industriji parfema se za izolaciju mirisnih komponenti iz biljnog materijala koristi tzv. hladni i topli “enfleurage” postupak, koji je razvijen u južnoj Francuskoj u XIX veku za dobijanje najfinijih etarskih ulja iz cvetova u kojima se ona nalaze u vrlo maloj količini. Kod hladnog “enfleurage” postupka se velike staklene ploče premazuju sa obe strane slojem životinjske masti (obično se koristi svinjska ili goveđa) ili adsorbensima (aktivni ugalj) u specijalnim komorama. Biljni materijal (latice, celi cvetovi) se nanosi na sloj masti i ostavlja da odstoji par dana, kako bi mirisne komponente difundovale u sloj masti. Proces se ponavlja zamenu iscrpljenog biljnog materijala svežim dok se ne postigne željeno zasićenje mirisa u sloju masti (željena koncentracija). Kod toplog “enfleurage” postupka čvrste masti se zagrevaju i biljni materijal se umešava sa mastima (maceracija sa mastima). Iscrpljeni materijal se odstranjuje i menja svežim dok se ne postigne željena koncentracija mirisa u masti. Ovo je najstariji metod za očuvanje mirisnih komponenti iz biljnog materijala. Masti zasićene mirisnim komponentama se nazivaju pomade. Pomade se prodaju ili se dalje ispiraju ili natapaju vodom ili etanolom, da bi se mirisne komponente izdvojile iz masti. Alkohol se onda odvaja od masti i ostavlja da upari, nakon čega se dobija tzv. *absolut*. Mast u kojoj obično zaostane izvesna količina mirisnih komponenti se dalje obično koristi za pravljenje sapuna (Bauer i sar., 2001; Skala i sar., 1999).

Presovanje. Etarsko ulje se može dobiti i presovanjem, odnosno mehaničkim putem, ukoliko je ono smešteno u perifernim rezervoarima biljke (perikarp agruma), a ceđenjem se dobija emulzija koju gradi etarsko ulje sa sokom iz biljne sirovine. Etarsko ulje se izdvaja iz ove emulzije centrifugiranjem, filtriranjem, primenom enzima ili naknadnom destilacijom. Etarsko ulje dobijeno ovim postupkom je boljeg kvaliteta nego proizvedeno destilacijom vodenom parom (Skala i sar., 1999). Biljna ulja i masti, tj. masna ulja, čiji su osnovni sastojak trigliceridi se tradicionalno dobijaju ekstrakcijom organskim rastvaračima i hladnim presovanjem (hladno ceđena ulja). Jestiva ulja mogu biti rafinisana (hemijski ili fizički) i nerafinisana. Imperativ zdravog života, očuvanje životne sredine, proizvodnja prirodne hrane i čistih nekontaminiranih namirnica koje su sačuvale izvorne nutritivne vrednosti, daju prednost proizvodnji i upotrebi hladno ceđenog nerafinisanog ulja ili hladno ceđenog ulja rafinisanog fizičkom rafinacijom, nad tehnološkim procesima izdvajanja ulja ekstrakcijom i hemijskom (alkalnom) rafinacijom. Jedini problem kod dobijanja ulja mehaničkim presovanjem je zaostajanje

velike količine ulja u pogači, odnosno relativno niski prinosi u odnosi na ekstrakciju sa organskim rastvaračima (Anderson, 2005).

2.2.2. Intenzifikacija konvencionalnih metoda ekstrakcije

Klasični postupci izolacije bioaktivnih supstanci mogu se poboljšati primenom mehaničkog mešanja čime se povećava brzina difuzije i kontaktna površina rastvarač-biljni materijal. U novije vreme se, u cilju povećanja prenosa mase i smanjenja vremena ekstrakcije kod klasičnih postupaka (ekstrakcije organskim rastvaračima i hidrodestilacije), sve više se koriste ultrazvučni talasi i mikrotalasi.

Fizička dejstva ultrazvuka su generisanje toplote u tkivu i pojava kavitacionih mehura. Kavitacioni mehuri se ne mogu širiti u ćeliji zbog čega dolazi do povećanja pritiska i prskanja ćelija i tkiva (Vinatoru i sar., 1997). Ultrazvuk može imati pozitivan efekat na ekstrakcioni proces preko fenomena kavitacije. Ovo podrazumeva (a) intenzifikaciju prenosa mase zbog kolapsa kavitacionih mehura na ili u blizini zidova biljnih ćelija ili na graničnoj površini što vodi formiranju mikročestica, odnosno stvaranju velike kontaktne površine, (b) razaranje biljnih ćelija kojim se oslobađa njihov sadržaj zbog oštećenja ćelijskog zida i membrane; pored toga, usitnjavanjem biljnog materijala povećava se površina kontakta čvrsto-tečno, (c) poboljšanu penetraciju rastvarača u nerazorene biljne ćelije, što rezultuje povećanjem prinosa; pored toga, kada se kavitacioni mehur rasprsne blizu ćelijskog zida indukuje se ultrazvučni mlaz koji nosi rastvarač prema zidu i u ćelije, i (d) kapilarne efekte, tj. prodiranje tečnosti u kapilarama kao i izvesne električne fenomene kojima se može poboljšati ekstrakcija supstanci koje se nalaze u kapilarama (Veličković, 2007). Danas se u literaturi može naći detaljniji opis postupaka ekstrakcije koji uključuju primenu ultrazvuka, kao i prednosti koje se pritom ostvaruju u pogledu prinosa ekstrakta, uštede vremena i energije ili koncentrisanja bioaktivnih komponenti u ekstraktima iz različitog biljnog materijala (Glisic i sar., 2010; Rolan-Gutierrez i sar., 2008; Toma i sar., 2001; Veličković i sar., 2008; Vinatoru i sar., 1999).

Za ultrazvučne ekstrakcije koristi se ultrazvučna kada (sa ultrazvučnim pobuđivačem na spoljnoj strani) ili zatvoreni ekstraktor se ultrazvučnim rogom (za isparljive rastvarače) (Vinatoru i sar., 1999).

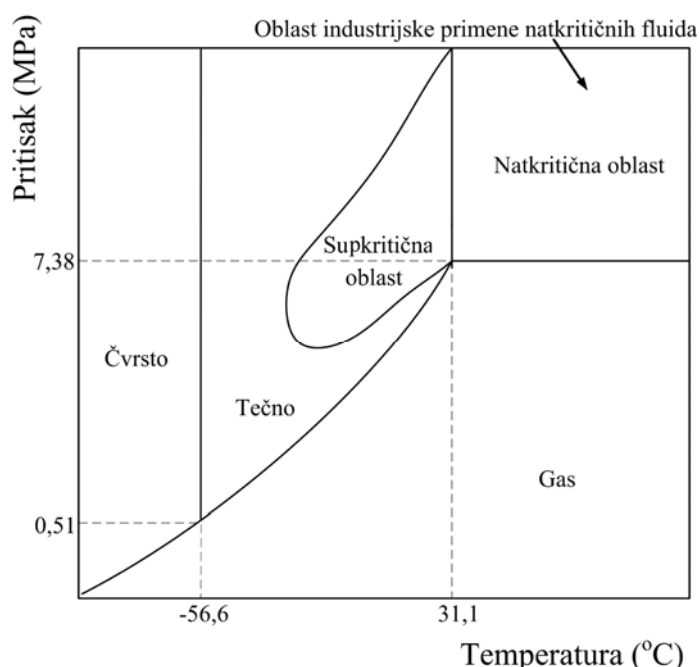
Danas se, takođe, u cilju uštede vremena ekstrakcije i energije, kao i povećanja prinosa ekstrakata i njihove biološke aktivnosti, dosta koriste savremene tehnike ekstrakcije koje uključuju primenu mikrotalasa, kao što su: mikrotalasna ekstrakcija organskim rastvaračima (*eng.* Microwave-assisted solvent extraction - MASE), mikrotalasna ekstrakcija bez rastvarača (*eng.* Solvent-free microwave extraction-SFME), mikrotalasna destilacija (*eng.* Microwave-assisted distillation - MAD) i mikrotalasna difuzija i gravitacija (*eng.* Microwave hydrodiffusion and gravity - MHG) (Bendahou i sar., 2008; Zill-e-Huma, 2010). Primenom mikrotalasa kod destilacije etarskih ulja lavande i timijana postiže se ušteda vremena i energije za izolaciju iste količine eteričnog ulja istog kvaliteta (Golmakani i sar., 2008; Sahraoui i sar., 2008). U slučaju ekstrakcije *Origanum glandulosum* pomoću SFME postupka (Bendahou i sar., 2008), pored uštede rastvarača, postiže se kraće vreme ekstrakcije, veći prinos i veća selektivnost ka aktivnoj komponenti timolu u poređenju sa konvencionalnom hidrodestilacijom i hidrodestilacijom uz primenu mikrotalasa. Primenom postupka hidrodifuzije pomoću mikrotalasa i gravitacije, tzv. MHG postupka, kao i SFME postupkom, pored uštede energije i vremena, dobijen je ekstrakt ruzmarina boljeg kvaliteta i sa boljim antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima u poređenju sa ekstraktom dobijenim konvencionalnom hidrodestilacijom (Bousbi i sar., 2009; Okoh i sar., 2010). Roldán-Gutiérrez i sar. (2008) su pokazali da se primenom procesa ekstrakcije iz lovora, ruzmarina, timijana i origana sa etanolom sa cirkulisanjem rastvarača i sa primenom ultrazvuka za kraće vreme dobijaju ekstrakti boljeg kvaliteta (veći sadržaj okidovanih terpena) u odnosu na proces destilacije sa vodenom parom i proces ekstrakcije sa pregrejanom vodom (150 °C). Postupkom koji se bazira na difuziji pare uz primenu mikrotalasa (*eng.* Microwave steam diffusion - MSD) moguće je za znatno kraće vreme izolovati ekstrakt lavande boljeg kvaliteta u odnosu na postupak koji je baziran samo na difuziji vodene pare bez primene ultrazvuka (*eng.* Steam diffusion-SD) (Farhat i sar., 2009). Pored nabrojanih postupka u literaturi se mogu naći još i podaci o primeni hidrotermičke ekstrakcije ulja lovora uz primenu mikrotalasa različite jačine emitovanih u kontinualnom ili pulsirajućem režimu (Flamini i sar., 2007). Besombes i sar. (2010) su izolovali ulje lavande primenom tzv. DIC procesa (*eng.* Instant controlled pressure drop ili *fr.* Détente Instantanée contrôlée), koji je predložen 1988. godine, a kasnije razvijan u patentima i industrijskoj praksi (Allaf i sar.,

1989, 1994). Ovaj postupak je zasnovan na termomehaničkom tretmanu koji se sastoji u cikličnom izlaganju biljnog materijala zasićenoj vodenoj pari pod pritiskom (reda veličine 0,1-0,6 MPa) i nagloj dekompresiji do vakuuma (5 kPa). Usled nagle dekompresije dolazi istovremeno do samoisparavanja dela vode i isparljivih jedinjenja (etarskog ulja), kao i do ekspanzije i momentalnog hlađenja produkta, čime se sprečava njegova termička degradacija. Primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) ista grupa autora dokazala je da u toku DIC procesa dolazi do razaranja glandularnih trihoma, čime se oslobađa teško dostupni udeo etarskog ulja i samim tim povećava efikasnost njegovog izdvajanja. Eksperimentalna i teorijska studija (Besombes i sar. 2010) pokazala je da je deo lavandinog ulja koji ispari tokom zagrevanja sa vodenom parom zanemarljiv u odnosu na fenomen samoisparavanja. U istom radu postignuti prinos etarskog ulja lavande izolovanog primenom DIC postupka bio je 2 puta veći a vreme ekstrakcije 12 puta kraće u poređenju sa klasičnom destilacijom cveta lavande sa vodenom parom.

2.3. Natkritična ekstrakcija (NKE)

2.3.1. Natkritični fluidi i njihove osobine

Natkritični fluidi su fluidi koji se nalaze na temperaturi i pritisku iznad kritičnih vrednosti pritiska i temperature za dati fluid (iznad tzv. kritične tačke). U natkritičnim uslovima postoji samo jedna tzv. natkritična faza, pri čemu se fluid nalazi u stanju ugušćenog gasa. Iznad kritične tačke, daljim povećanjem temperature, dato jedinjenje se ne može prevesti u gas, niti se daljim povećanjem pritiska prevesti u tečnost. Kao natkritični fluid, najveću primenu nalazi ugljenik(IV)-oksid, a pored njega koriste se i voda, freon, azot, azot(II)-oksid, amonijak, eten, metan, etan, propan, propen, metilamin itd. Na slici 4 prikazan je fazni dijagram pritisak-temperatura za ugljenik(IV)-oksid na kome se može uočiti da u oblasti iznad trojne tačke (-56,6 °C i 0,51 MPa), u kojoj su čvrsta, tečna i gasovita faza u ravnoteži, i ispod kritične tačke (31,1 °C i 7,38 MPa), ugljenik(IV)-oksid može postojati kao bezbojna tečnost (tzv. supkritična oblast).



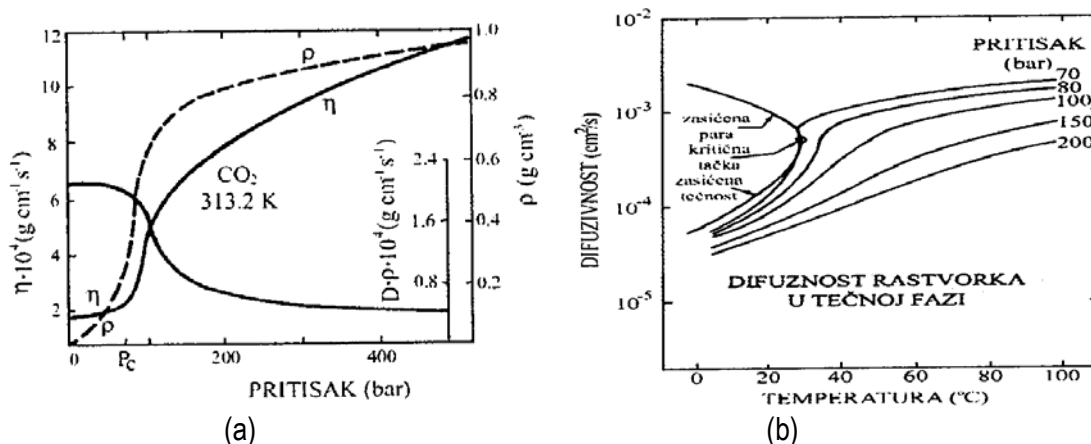
Slika 4 Fazni dijagram (pritisak-temperatura) za CO₂

Vrednosti gustine, viskoznosti i difuzivnosti fluida u natkritičnom stanju nalaze se između vrednosti ovih veličina za gasove i tečnosti (tabela 2 i slika 5). Natkritični fluidi imaju veliku gustinu, blisku tečnosti, što pozitivno utiče na njihovu moć rastvaranja. Difuzivnost i viskoznost natkritičnih fluida slične su kao kod gasova, što olakšava njihovo prodiranje u poroznu strukturu biljnog materijala i dovodi do značajnog povećanja brzine

ekstrakcije i lakog razdvajanja faza u poređenju sa ekstrakcijom organskim rastvaračima (Bruner, 1987). Pored toga, uslovi na kojima se odvija ekstrakcija, mogu se kontrolisati, pa samim tim i efekat separacije rastvorka od rastvarača, promenom temperature i pritiska.

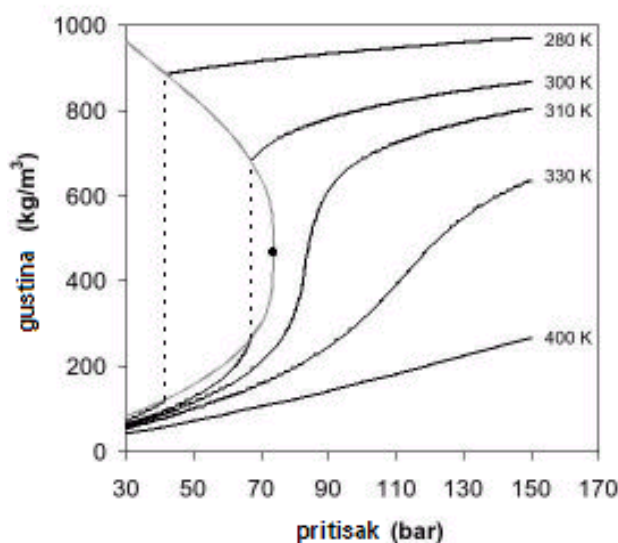
Tabela 2 Vrednosti gustine, viskoznosti i difuzivnosti ugljenik(IV)-oksida u gasovitom, tečnom i natkritičnom stanju (Bruner, 2005)

	Gustina (kg/m ³)	Difuzivnost (cm ² /s) · 10 ⁵	Viskoznost (g/cm s) · 10 ⁴
Gas p=101,3 kPa t=15-30 °C	0,6-2,0	10 000-40 000	0,6-2,0
Natkritični CO₂ p=p _c , t=t _c p=4p _c , t=t _c	200-500 400-900	70 20	1,0-3,0 3,0-9,0
Tečnost p=101,3 kPa t=15-30 °C	600-1600	0,2-2,0	20-300



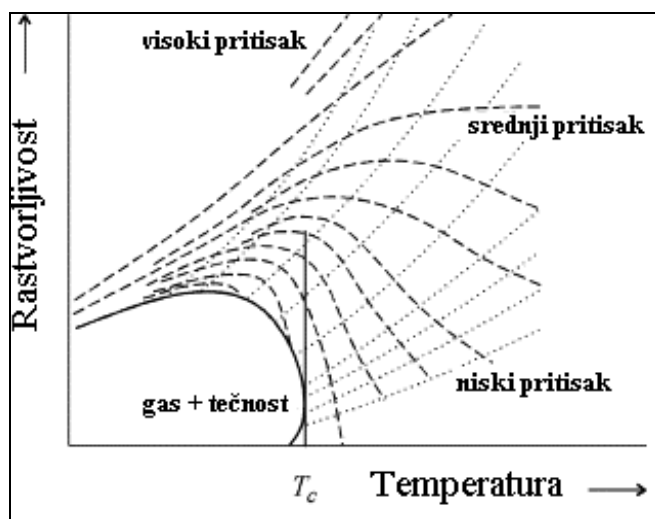
Slika 5 (a) Fizičko-hemijske osobine (viskoznost, gustina, difuzivnost) NK CO₂ i (b) promena difuzivnosti CO₂ sa pritiskom i temperaturom u natkritičnim uslovima

Gustina natkritičnih fluida u zavisnosti od pritiska i temperature može se opisati Benderovom jednačinom (Marr i Gamse, 2000) (slika 6). U oblasti neposredno iznad kritične tačke, relativno male promene pritiska ili temperature, dovode do značajnih promena gustine fluida.



Slika 6 Promena gustine CO₂ po Benderovoj jednačini (Marr i Gamse, 2000)

Sa porastom temperature u ovoj oblasti, gustina rastvarača znatno opada, pa je realno očekivati i smanjenje rastvorljivosti rastvorka. Međutim, na visokim temperaturama, porast napona pare rastvorka može imati veći uticaj na njegovu rastvorljivost od smanjenja gustine rastvarača, pa može doći i do porasta rastvorljivosti sa porastom temperature (Brunner, 2005) (slika 7). Natkrična ekstrakcija zasniva se na rastvorljivosti datih jedinjenja (rastvorka) u ugušćenom fluidu koja se menja u zavisnosti od pritiska i temperature. Ekstrakcija sa NK CO₂ pokazala se kao pogodna metoda za izolovanje jedinjenja srednjih molarnih masa i relativno male polarnosti iz biljnog materijala. Na normalnim uslovima (25 °C i 1 bar) rastvorljivost ovih jedinjenja u gasu je zanemarljiva i direktno povezana sa njihovim naponom pare. Međutim, u natkričnom fluidu, rastvorljivost datih komponenata je za deset redova veličine veća od rastvorljivosti u gasu na istoj temperaturi.



Slika 7 Promena rastvorljivosti slabo isparljivih jedinjenja (tečnosti i čvrstih supstanci) u supkričnom ($T < T_c$) ili natkričnom fluidu ($T > T_c$) u zavisnosti od temperature, pritiska (izobare su označene isprekidanim linijama), i gustine rastvarača (tačkastim linijama označene su jednake gustine) (adaptirano prema Brunner, 2005)

Rastvorljivost komponenti u natkričnom fluidu rezultat je, napona para i interakcija rastvarač-rastvorak. Posledica je složena zavisnost rastvorljivosti čvrstih rastvoraka u natkričnom fluidu od pritiska. U oblastima blizu kritične tačke često dolazi do pojave višestrukih faza. Zbog toga, razumevanje i interpretacije ponašanja faznog sistema u oblastima oko kritične tačke zahteva primenu vrlo složenih termodinamičkih modela kojima mogu da se opišu kompleksne interakcije između malih molekula nepolarnog rastvarača i često velikih molekula rastvorka (Zhao i sar., 2010).

NK CO₂ se pokazao kao odličan rastvarač za nepolarne supstance, dok je njegov afinitet prema polarnim substancama slab. U praksi se često koriste smeše NK CO₂ i drugih rastvarača (kosolvenata) u cilju poboljšanja njegove moći rastvaranja polarnih supstanci. Obično se koristi tečni kosolvent (na primer, etanol) koji se u malim količinama dodaje NK CO₂ i povećava njegovu moć rastvaranja polarnih supstanci. Sa druge strane, povećana moć rastvaranja ima za posledicu smanjenje selektivnosti NK CO₂ (Cavero i sar., 2005). Pored toga, kosolventi su tečni na atmosferskom pritisku i u fazi separacije izdvajaju se zajedno sa željenim supstancama, tako da je potrebno izvesti dodatnu operaciju razdvajanja kosolvenata i finalnog ekstrakta (Reverchon i De Marco, 2006).

2.3.2. Primene natkritičnih fluida i budući trendovi

Prva zapažanja o moći rastvaranja natkritičnih fluida objavljena su u XIX veku, kada je primećeno da metalni halogenidi postaju rastvorljivi u natkritičnom tetrahloretanu i metanolu (Hannay i Hogarth's, 1879). Primena NKE u industrijskim razmerama započela je 80-tih godina dvadesetog veka, i to u rafinerijskoj obradi nafte (ROSE proces), kod prerade kafe i čaja (proces dekofeinizacije) i ekstrakcije hmelja. U tom periodu, kompanije u Nemačkoj i Francuskoj razvile su različite procese u uređajima zapremine od sto do nekoliko stotina litara za dobijanje aroma i drugih prehrambenih aditiva, farmaceuskih i kozmetičkih preparata. Krajem 80-tih godina izgrađena su velika postrojenja za preradu kafe i ekstrakciju hmelja u SAD-u i manja postrojenja za proizvodnju lekova, kozmetičkih preparata i prirodnih proizvoda u Japanu, Južnoj Koreji i Indiji. U novije vreme izgrađena su postrojenja za proizvodnju fitohemikalija i drugih prirodnih jedinjenja na Dalekom Istoku. Danas su, pored navedenih primera, komercijalizovane i druge primene natkritičnih fluida, kao što su: suvo ili hemijsko čišćenje ili odmaščivanje finih elektronskih aparata, procesi impregnacije, dobijanje čestica definisane veličine i strukture u prehrambenoj, farmaceutskoj industriji, industriji boja i drugih premaza, proizvodnja penastih materijala, procesi bubrenja polimera, procesi bojenja tekstila, analitička ispitivanja i drugo (Gamse, 2005; Herrero i sar., 2010; Skala i sar., 2002).

Intenzivno proučavanje procesa NKE i industrijska primena u prehrambenoj industriji započeti su sedamdesetih godina XX veka, što je rezultovalo je brojnim patentima u oblasti NKE hmelja, kafe, čaja, duvana i začina. Danas se NKE koristi u industrijskim razmerama za ekstrakciju kofeina iz kafe i čaja (100 kt/god), ekstrakciju hmelja (60 kt/god) i pesticida iz pirinča (30 kt/god) (Gamse, 2005). Proces NKE se koriste u industrijskim razmerama u prehrambenoj industriji kod prerade aromatičnih biljnih droga, začina i uljarica, kao i kod prečišćavanja tečnih ekstrakata (Skala i sar., 2002).

Industrijska primena natkritičnih fluida posebno dobija na značaju od 90-tih godina prošlog veka, što je rezultovalo naglom porastu broja prijavljenih patenata, koji je po podacima iz 2006. godine bio oko 8600. Najveći broj patenata prijavljen je u Japanu, pri čemu se najveći broj patentata odnosi na različite primene natkritičnih fluida vezanih za zaštitu životne sredine. Odmah iza Japana po broju prijavljenih patenata je SAD, pri čemu se najveći broj patenata odnosi na industriju poluprovodnika. U Nemačkoj je prijavljen najveći broj patenata koji se odnose na tekstil i preradu hrane, dok se u Kini najveći broj patenata odnosi na primenu NKE u oblasti medicinskih nauka, ekstrakcije iz lekovitog bilja i proizvodnje dodataka ishrani (Schütz, 2007).

Kada je reč o novim dostignućima i primenama u oblasti natkritičnih fluida, pregledom novije literature (2007-2010), zapaža se da ima najviše radova koje se odnose na izolaciju funkcionalnih biološki aktivnih ekstrakata ili jedinjenja iz biljnog materijala za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, regeneraciju sporednih proizvoda i u oblasti zaštite životne sredine. Takođe, poslednjih godina zapaža se intenzivnija primena NKE u cilju izolacije proizvoda visoke vrednosti iz biljnog materijala za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, u procesima regeneracije teških metala, razdvajanja enantiomera i kod razvoja sistema za otpuštanje lekova (Brunner i sar., 2005; Gamse, 2005; Herrero i sar., 2010).

Masovna upotreba organskih rastvarača u različitim oblastima svetske industrije danas predstavlja ozbiljnu opasnost za životnu sredinu. Godine 1987. uveden je Montrealski sporazum sa ciljem da se zabrani upotreba i proizvodnja rastvarača koji utiču na oštećenje ozonskog omotača, kao što su hlorofluorougļjovodonici (CFC). Do danas je 170 zemalja potpisalo ovaj Sporazum sa amadmanima donešenim u Londonu (1990), Kopenhagenu (1992) i Pekingu (1999) (Herrero i sar., 2010). Trenutno, u svetu postoji veliki pritisak na industriju na uvođenje novih održivih procesa, koji ne uključuju primenu organskih rastvarača opasnih po životnu sredinu i čovekovo zdravlje. Pored zakonske regulative vezane za zaštitu životne sredine, postoje sve veći zahtevi potrošača za konzumiranjem tzv. „funkcionalne“ hrane, koja, pored nutritivnih vrednosti, ima i ulogu u preventciji različitih oboljenja. S tim u vezi, trenutno se sve više pažnje poklanja ispitivanju novih izvora prirodnih jedinjenja sa biološkim dejstvima i razvoju tehnologija za njihovu izolaciju u što čistijem stanju. U narednim godinama predviđa se dalji porast broja primene prirodnih antibiotika i prezervativa, pa samim tim i napredak u pogledu tehnologija za njihovo dobijanje u što čistijem stanju. U tom pogledu, NKE biće u prednosti, i pored velikih investicionih ulaganja, imajuću u vidu kvalitet i čistoću dobijenih ekstrakata, kao i zakonsku regulativu vezanu za očuvanje životne sredine.

2.3.3. Prednosti i nedostaci NKE

U procesima izolacije biološki aktivnih ekstrakata ili pojedinih komponenti iz biljnog materijala najčešće se koriste supkritični i NK CO₂ zato što je nereaktivan, netoksičan i stabilan rastvarač, bez boje, ukusa i mirisa, lako dostupan i jeftin, potpuno neškodljiv po čovekovo zdravlje i životnu sredinu. Relativno niske vrednosti kritičnih parametara CO₂ ($p_c=73,8$ MPa; $t_c=31,1$ °C) omogućavaju ekstrakciju na niskim temperaturama, čime se sprečava razgradnja termolabilnih komponenti u ekstraktu. Podešavanjem procesnih parametara (pritiska, temperature) utiče se na rastvorljivost željenih komponenti u natkritičnom fluidu (selektivnost) i omogućava lako, brzo i potpuno razdvajanje faza, tako da dobijeni ekstrakti ne sadrže tragove rastvarača, što ih čini posebno pogodnim za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Zamenom organskih rastvarača sa NK CO₂ koji se lako regeneriše u procesu, eliminisani su problemi i troškovi vezani za odlaganje i tretman velikih količina toksičnih organskih rastvarača.

S druge strane, tehnologije koje se zasnivaju na primeni natkritičnih fluida su, zbog relativno velikih investicionih ulaganja u poređenju sa procesima koji se izvode na niskim pritiscima, i pored činjenice da se njihovom primenom dobijaju proizvodi sa izuzetnim karakteristikama u pogledu kvaliteta, sve više ograničene na one procese koji daju proizvode visoke dodatne vrednosti. Izuzetak su industrijska postrojenja za NKE kafe, čaja ili hmelja u kojima se obrađuju velike količine materijala. U praksi se pokazalo da se kapitalna investiciona ulaganja mogu značajno smanjiti izgradnjom postrojenja većih proizvodnih kapaciteta, kod kojih će se proizvoditi različiti finalni proizvodi, naravno samo u slučajevima kada ne postoje previše strogi zahtevi u pogledu finalnog proizvoda (kao kod proizvodnje farmaceutskih preparata) (Skala i sar., 2002).

2.3.4. Mogućnosti optimizacije

Optimizacija procesa NKE podrazumeva izbor procesnih parametara u cilju izolacije najveće količine ekstrakta željenog kvaliteta (fizičke i hemijske karakteristike, biološka aktivnost) uz minimalnu potrošnju natkritičnog fluida i energije. U cilju uštede novca i vremena, prvi korak u procesu projektovanja industrijskih postrojenja za NKE sastoji se u ispitivanju uticaja odgovarajućih procesnih parametara na prinos i kvalitet ekstrakata na laboratorijskom odnosno poluindustrijskom nivou. Simulacija eksperimentalnih rezultata primenom odgovarajućih matematičkih modela je od izuzetnog značaja za optimizaciju procesa NKE i uštedu vremena i novca i o tome će biti više reči u poglavlju 3.4.

Pritisak i temperatura. Gustina, dielektrična konstanta i moć rastvaranja NK CO₂ zavise od pritiska i temperature. Opšte pravilo je da veći pritisak znači i veću gustinu, tj. moć rastvaranja, ali u većini slučajeva i smanjenu selektivnost. U blizini kritične tačke, sa porastom temperature gustina rastvarača znatno opada što dovodi do smanjenja rastvorljivosti rastvorka ali na visokim temperaturama, porast napona pare rastvorka može da ima veći uticaj na njegovu rastvorljivost od smanjenja gustine rastvarača, pa u nekim slučajevima može doći do porasta rastvorljivosti sa porastom temperature. Etarska ulja, koja se smatraju glavnim nosiocima antibakterijske aktivnosti kod aromatičnog bilja, sadrže pre svega mono- i seskviterpene. Na osnovu literaturnih podataka o rastvorljivosti ovih jedinjenja (Reverchon i sar., 1997) i selektivnosti NK CO₂ u odnosu na terpeniska jedinjenja, optimalni opseg pritiska i temperatura je 10-15 MPa i 40-60 °C (Glisic i sar., 2010; Ivanović i sar., 2011a,b; Reverchon i sar., 1997). Kod masnih ulja obično se koriste nešto viši pritisci 15-20 MPa i umerene temperature od 40-60 °C (Danielski i sar., 2007; Stahl i sar., 1980). Za razliku od etarskih i masnih ulja, ekstrakcije jedinjenja veće molekulske mase i/ili polarnosti (uključujući trigliceride, polifenole, dibenzofurane, kao što je usninska kiselina) izvode se na višim pritiscima od 30-50 MPa i temperaturama 40-100 °C (Babovic i sar., 2010; Genena i sar., 2008; Ivanovic i sar., 2009; Nguyen i sar., 1991; Najdenova i sar., 2001; Reverchon i sar., 2006). Povećanjem pritiska povećava se viskoznost i smanjuje difuzivnost natkritičnih fluida. Na izuzetno visokim pritiscima, povećanje temperature može dovesti do smanjenja prinosa ekstrakta usled smanjenja gustine fluida i njegove moći rastvaranja. Međutim, zbog povećanja napona pare, ekstrakcijom na višim temperaturama moguće je dobiti ekstrakte sa većim sadržajem pojedinih aktivnih komponenti (Đorđević i sar., 2010; Nguyen i sar., 1991;). Pri tome, treba imati u vidu da neka fenolna jedinjenja na visokim temperaturama podležu reakcijama oksidacije ili polimerizacije na temperaturama iznad 50 °C (Diaz-Reinoso i sar., 2006).

Kosolventi. Iako je NK CO₂ pogodan za ekstrakciju ulja i lipofilnih jedinjenja, često je njegova moć rastvaranja pojedinih biološki aktivnih jedinjenja veće polarnosti ili veće molekulske mase veoma mala. Uz to, promene pritiska i temperature mogu imati ograničeni uticaj na ekstrakciju jedinjenja kao što su flavonoidi i terpenoidi. U tom slučaju, selektivnost NK CO₂ prema željenoj frakciji jedinjenja, kao i prinos ukupnog ekstrakta, mogu se modifikovati dodatkom male količine polarnih supstanci, tzv. kosolvenata. Dodatkom kosolvenata povećavaju se interakcije između rastvorka i natkritičnog fluida usled povećanja gustine, hemijskih interakcija (formiranje vodoničnih veza), promene strukture biljne matrice (strukturne promene, bubrenje) i raskidanja polarnih veza između rastvoraka i biljne matrice. Kod NKE bioaktivnih supstanci iz biljnog materijala najčešće se kao kosolventi koriste metanol i etanol koji indukuju dipol-dipol interakcije i formiranje vodoničnih veza sa polarnim funkcionalnim grupama (Hamburger i sar., 2004). S druge strane, upotreba kosolvenata kod NKE može dovesti do smanjenja selektivnosti (ekstrakcija neželjenih jedinjenja poput pigmenta) (Dauksas i sar., 1998).

U tabeli 3 prikazan je literaturni pregled procesnih parametara za NKE ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom iz odabranog biljnog materijala (pritisk, temperatura, gustina CO₂, vreme ekstrakcije, % kosolventa).

Tabela 3 Primena NKE u izolaciji ekstrakta sa antibakterijskim dejstvom iz odabranog biljnog materijala

Naziv biljne vrste/droga	p (MPa)/t(°C)/p (kg/m ³)/τ(h)/%kosolventa/γ (%w/w)	Ispitani sojevi bakterija	Izvor
Usnea (<i>Usnea barbata</i>)	30/40-80/746,1-910,6/3/-0,60-2,92	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Pneumococcus</i> sp., <i>Bacillus diptheriae</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Sarcina lutea</i>	Lisickov i sar., 2002; Najdenova i sar., 2001; Weckesser i sar., 2007; Mišić i sar., 2010a,b
Origano (<i>Origanum vulgare</i>)	10-25/40-60/290-880/1-5/0-7 EtOH/0,67- 1,0	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomona</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Mohácsi-Farkas i sar., 2001; Ivanovic i sar., 2011a
Ruzmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	10-25/40-60/290-880/1-5/0-7/0,67-1,0	<i>Geobacillus stearotermophilus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), <i>L. monocytogenes</i>	Muñoz i sar., 2009; Žižović i sar., 2009; Ivanovic i sar., 2009; Weckesser i sar., 2007
Timijan (<i>Thymus vulgaris</i>)	10-11,5/40/630-703/1-5/0/0,85-1	<i>Geobacillus stearotermophilus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Salmonella</i> Enteritidis	Ivanovic i sar., 2011a; Mišić i sar., 2009a; Žižović i sar., 2009
Žalfija (<i>Salvia officinalis</i>)	10-25,5/40-45/500-883/1/0-2 EtOH/0,76-2,3	<i>Geobacillus stearotermophilus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Menaker i sar., 2004; Muñoz i sar., 2009; Weckesser i sar., 2007; Žižović i sar., 2009
Karanfilić (<i>Syzygium aromaticum</i>)	9-30/30-50/285-949/5/0/13,5-20,8	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i>	Clifford i sar., 1999; Della Porta i sar., 1998; Ivanovic i sar., 2011a; Martínez i sar., 2007; Wenqiang i sar., 2007;
Lovor (<i>Laurus nobilis</i>)	10-25/40-60/290-880/1-5/0-7/0,67-1,37	<i>Staphylococcus</i> vrste, <i>L. monocytogenes</i>	Carreda i sar., 2002; Ivanovic i sar., 2009; Muñoz i sar., 2009
Andelika (<i>Angelica archangelica</i>)	12-15/40-50/586-781/2,5-3/2-2,26	<i>Staphylococcus</i> vrste, <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i>	Doneanu i sar., 1998; Kerola i sar., 1994; Mišić i sar., 2009b
Ehinacea (<i>Echinacea angustifolia</i>)	15/40/781/2,5/-0,668	<i>Staphylococcus</i> vrste, <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i>	Mišić i sar., 2009b
Divizma (<i>Verbascum thapsus</i>)	30/40/910,6/2,5/-0,825	<i>Staphylococcus</i> vrste, <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i>	Mišić i sar., 2009b

Predtretman biljnog materijala, veličina čestica, protok CO₂, vreme trajanja ekstrakcije. Pravilan izbor ovih parametara ima za cilj potpuniju ekstrakciju željenih komponenti za kraće vreme i zavisi od termodinamičkih (rastvorljivosti) i kinetičkih parametara koji definišu brzinu prenosa mase pri čemu je bitno poznavanje glavnog otpora prenosu mase. Protok CO₂ je značajan parameter u slučaju kada brzinu procesa ekstrakcije kontroliše spoljašnji prenos mase ili rastvorljivost ekstrakta na datim uslovima pritiska i temperature. Ako je difuzija u poroznu strukturu biljnog materijala, odnosno difuzija kroz čvrst materijal, najsporiji stupanj (što je uglavnom slučaj), veličina čestica biljnog materijala ima ključnu ulogu. Po pravilu, manje čestice znače manji otpor difuziji pošto rastvorak treba da pređe kraći put do mase fluida. Ipak, prilikom usitnavanja materijala treba voditi računa, jer suviše male čestice mogu dovesti do kanalisanja toka fluida u ekstraktoru, pri čemu veliki deo fluida ostaje neiskorišćen, smanjuje se efikasnost procesa, a može doći i do isparavanja lakih komponenti u procesu sitnjenja (mlevenja) biljnog materijala. U praksi se najčešće koristi biljni materijal sa srednjim prečnikom između 0,25 i 2,0 mm (Reverchon i De Marco, 2009). Pored sitnjenja biljnog materijala, bubrenje biljnog materijala izloženog natkritičnom fluidu takođe može da utiče na povećanje brzine ekstrakcije u uštedu natkritičnog fluida odnosno energije (Stamenic i sar., 2010; Stamenic i sar., 2008; Zizovic i sar., 2006; Zizovic i sar., 2005). Povećanjem protoka može se uticati na povećanje brzine prenosa mase u NK CO₂ fazi.

2.4. Mehanizam procesa i matematičko modelovanje ekstrakcije sa organskim rastvaračima

2.4.1. Mehanizam ekstrakcije sa organskim rastvaračima

Proces ekstrakcije sa organskim rastvaračima odvija se u više faza: (a) kvašenje biljnog materijala, spiranje i rastvaranja ekstraktivnih materija sa površine razorenih ćelija i sudova, (b) prodiranje rastvarača u nerazorene ćelije i sekretorne sudove uz istovremeno rastvaranje materija, (c) prenošenje ekstraktivnih materija kroz membranu ćelija iz unutrašnjosti nerazorenih ćelija i sekrecionih sudova do površine čestica biljnog materijala i (d) prenošenje ekstraktivnih materija sa površine čestica biljne sirovine u masu rastvarača.

Materijal ćelijskih zidova odlikuje se difilnim svojstvima, pri čemu je hidrofilnost izražena u mnogo višem stepenu nego hidrofobnost. Rastvarač prodire u kapilare biljnog tkiva i popunjava ćelije i druge šupljine. Usled prisustva vazduha u kapilarama i ćelijama biljnog materijala, vreme prodiranja može biti veoma veliko. Istovremeno se prodiranjem rastvarača u biljna tkiva, odigrava i proces kvašenja, koji zavisi od hemijske sličnosti ekstraktivnih materija i rastvarača. Površinski aktivne supstance poboljšavaju proces kvašenja i prodiranja rastvarača u biljnim tkivima (Ponomarjev, 1976).

Prenos mase unutar biljne matrice uključuje difuziju ekstraktivnih materija kroz ćelijski rastvor i omotač, a brzina prenosa mase zavisi od broja i veličina pora u ćelijskom omotaču (sastoji se od membrane ćelije i ćelijskog zida). Debljina ćelijskog omotača zavisi, pre svega, od vrste biljke i biljnog organa. Pore, po pravilu, razdvajaju ćeliju jednu od druge ili ih odvajaju od okoline. Proces difuzije kroz pore zida je određen debljinom i brojem pora u zidu. Uzimajući u obzir malu veličinu mikropora i kapilara u ćelijskom zidu, prenos mase može se porediti sa prenosom mase kroz polupropustljive membrane. Brzina ekstrakcije čvrsto-tečno je obično limitirana difuzijom ekstraktivnih materija kroz unutrašnjost čestica biljnog materijala (čvrsta faza), dok je rastvaranje ekstraktivnih materija u rastvaraču brz proces, koji ne utiče na brzinu ukupnog procesa. Na povećanje difuzije u čvrstoj fazi može se uticati usitnjavanjem biljne sirovine u cilju povećanja stepena razaranja biljnih ćelija i skraćivanja puta ekstraktivnih materija kroz čestice. Ako je pak, difuzija ekstraktivnih materija sa površine čestice ka masi rastvora limitirajući faktor, onda je potrebno obezbediti dovoljno intenzivno mešanje suspenzije (Veličković, 2007).

2.4.2. Mehanizam ultrazvučne ekstrakcije

Uticao ultrazvuka na povećanje brzine ekstrakcije objašnjava se njegovim uticajem na debljinu tečnog difuzionog graničnog sloja uz česticu biljnog materijala i otpor prenosu mase ekstraktivnih materija. Prema teoriji filma, koeficijent prenosa mase k_L zavisi od efektivnog koeficijenta difuzije D i debljine tečnog difuzionog graničnog sloja, δ , tj., $k_L = \frac{D}{\delta}$. Ultrazvuk visoke frekvencije stvara dva uticaja: (i) hidrodinamički uticaj usled dejstva ultrazvučnog mlaza i (ii) kretanje nerasprnutih osilirajućih mehura (Neis, 2002). Zbog nedostatka odgovarajućih materijalnih dokaza, može se samo pretpostaviti šta se dešava u graničnom sloju. Smatra se da se pod uticajem turbulencije na mikronivou debljina difuzionog graničnog sloja smanjuje, a zbog povećanja temperature može se očekivati smanjenje viskoznosti tečnosti u laminarnom graničnom podsloju. Usled smanjenja debljine graničnog sloja i povećanja viskoznosti rastvora dolazi do povećanja koeficijenta prenosa mase ekstraktivnih materija u rastvor. Povećanje koeficijenta prenosa mase zavisi direktno od primenjene ultrazvučne snage (Neis, 2002). Pored toga, povećanje efikasnosti različitih procesa ekstrakcije uz primenu ultrazvuka objašnjava se, takođe, činjenicom da fenomen kavitacije utiče na razaranje biljnog tkiva, usled čega se oslobađa sadržaj iz biljnih ćelija zbog oštećenja ćelijskog zida i membrane. Razaranjem biljnog tkiva se istovremeno postiže povećanje površine kontakta čvrsto-tečno, a sadržaj biljnih ćelija postaje lako dostupan rastvaraču. Primenom ultrazvuka se, takođe, postiže poboljšana penetracija rastvarača u nerazorene biljne ćelije i kapilare, što rezultuje povećanjem prenosa mase u čvrstoj fazi prinosa i samim tim utiče na efikasnost ekstrakcije.

2.4.3. Matematičko modelovanje ekstrakcije sa organskim rastvaračima

Matematički opis procesa prenosa mase ekstraktivnih materija iz unutrašnjosti čestica biljnog materijala u ekstrakt kod ekstrakcije čvrsto-tečno je složen. Matematički opis i analiza ekstrakcije čvrsto-tečno značajno se pojednostavljuje primenom uprošćenih fizičkih modela. U praksi se u cilju pojednostavljena matematičkog opisa i analize ekstrakcije čvrsto-tečno koristi matematički model zasnovan na nestacionarnoj difuziji ekstraktibilnih supstanci u biljnom materijalu koji je detaljno opisao Treybal (1968) i Crank (1975) a koji su kasnije koristili brojni autori (Hojnik i sar., 2008; Šašmaz, 1996; Škerget i sar., 2010). U toku ekstrakcije čvrsto-tečno, dakle, dolazi do promene gradijenta koncentracije ekstraktivnih materija sa vremenom. Brzina promene koncentracije ekstraktivnih materija pri nestacionarnoj difuziji, pod uslovom da se ne odigrava hemijska reakcija, opisuje se jednačinom drugog Fikovog zakona koji je dat jednačinom (1):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1)$$

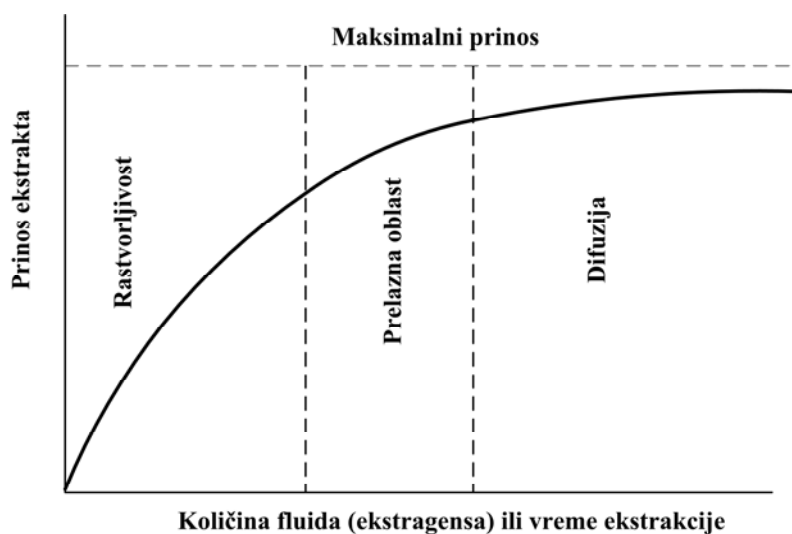
gde je: D - difuzioni koeficijent, a $x=r$ - radijus biljne čestice (aproksimaciju da su čestice biljnog materijala sfere). Rešavanje jednačine (1) za odgovarajuće početne i granične uslove, za sferične čestice prikazano je odeljku 3.3.2.

U literaturi se, takođe, mogu naći podaci o primeni modela zasnovanog na teoriji filma koji uzima u obzir i prenos mase u fazi ispiranja ekstraktivnih materija sa površine razorenih biljnih ćelija, kao i model Ponomareva koji nema fizičku osnovu i predstavlja samo matematički opis promene količine ekstraktivnih materija u biljnoj sirovini u periodu spore ekstrakcije (Ponomarev, 1976; Veljković i Milenović, 2002; Veličković, 2007).

2.5. Mehanizam procesa i matematičko modelovanje NKE

2.5.1. Mehanizam procesa NKE

Brzina NKE u početnoj fazi ekstrakcije zavisi od ravnoteže faza (rastvorljivost datih komponenti) na datom pritisku i temperaturi (ekstrakciona kriva je linearna) (slika 8). Nakon određenog vremena, ekstrakciona kriva dobija konveksni oblik usled promene otpora prenosu mase (usled povećanja uticaja difuzije kroz čvrstu fazu). Na kraju procesa ekstrakcije, brzina zavisi samo od difuzije kroz čvrstu poroznu fazu. Mehanizmi difuzije mogu, u nekim slučajevima, biti veoma složeni u zavisnosti od supstrata koji se ekstrahuje (Lee i Markides, 1990).



Slika 8 Tipična zavisnost prinosa ekstrakta u funkciji vremena ekstrakcije ili količine utrošenog rastvarača (adaptirano prema Lee i Markides, 1990)

Ukoliko je kontrolišući stupanj procesa spoljašnji prenos mase ili ravnoteža faza, brzina ekstrakcije podešava se pravilnim izborom protoka NK CO₂. U većini slučajeva, kad je difuzija u poroznoj strukturi biljnog materijala, odnosno difuzija kroz čvrsto, najsporiji stupanj, stepen usitnjenosti i bubrenje biljnog materijala ima ključnu ulogu (Reverchon i De Marco, 2006; Stamenic i sar., 2010; Zizovic i sar., 2008).

2.5.2. Matematičko modelovanje NKE

Zajedno sa istraživanjima u oblasti NKE, razvijani su i matematički modeli za opisivanje ovih procesa. Prema pristupu procesu NKE, modeli mogu biti empirijski (Kandiah i Spiro, 1990), zasnovani na analogiji prenosa toplote i prenosa mase (Hong i sar., 1990; Reverchon i sar., 1994, 1993) ili na integraciji diferencijalnog bilansa mase za ekstraktor (Reverchon, 1996; Roy i sar., 1996; Sovova i sar., 1994a,b). Poslednjih godina je razvijeno više matematičkih modela za procese NKE kako etarskih, tako i biljnih ulja uopšte. Svi oni se zasnivaju na rešavanju diferencijalnog materijalnog bilansa za ekstraktor, a najveći broj modela kao najsporiji stepen ekstrakcionog procesa uzima difuziju u unutrašnjosti čestice. Bartle i sar. (1990) su uveli model ekstrakcije 1,8-cineola iz lista ruzmarina koji je zasnovan na analogiji sa prenosom toplote. Po ovom modelu, sve čestice biljnog materijala se smatraju sferama i jednačine kojima se opisuje hlađenje "vrole kugle" koriste se da bi se opisao profil koncentracija unutar čestica tokom vremena. Sličan pristup su usvojili Reverchon i sar. (1993, 1994). Model koji su predložili Reverchon i sar. (1993), primenjen na NKE iz lista ruzmarina, bosiljka i majorana, uključivao je pretpostavku da je etarsko ulje smešteno u unutrašnjem delu lista, a da se voskovi nalaze na površini lista. Nakon mlevenja, čestice biljnog materijala se posmatraju kao sfere.

Model opisuje prenos mase između jedne sferične i porozne čestice i natkritičnog rastvarača. Ekstrakcioni proces je opisan sledećim uzastopnim procesima: difuzija natkritičnog rastvarača kroz film oko čvrste čestice, prodiranje i difuzija kroz česticu, rastvaranje rastvorka u natkritičnom fluidu, difuzija rastvorka i rastvarača kroz česticu i zatim kroz film oko čestice do mase fluida. Reverchon (1996) je razvio model i za NKE etarskog ulja iz lista žalfije. Pretpostavljeno je da je etarsko ulje smešteno u vakuolama unutar ćelija, tako da je frakcija slobodno dostupnog ulja na površini čestice zanemarljiva. Shodno tome, koeficijent spoljnog prenosa mase je zanemaren. Goto i sar. (1993) su razvili model zasnovan na lokalnoj adsorpcionoj ravnoteži etarskog ulja na lipidima biljnog lista i primenili ga na NKE lista mente. U literaturi se kod modelovanje procesa NKE etarskih i masnih ulja često koristi model koji je predložila je Sovová (1994a). Ovaj model podrazumeva klipno proticanje fluida kroz pakovani sloj biljnog materijala, pri čemu je pretpostavljeno da su čestice istih dimenzija i da je rastvorak podjednako raspoređen u biljnom materijalu u biljnim ćelijama čiji je sadržaj zaštićen zidovima. Na osnovu ovog modela proces ekstrakcije obuhvata tri perioda ekstrakcije; period brze ekstrakcije u kome se ekstrahuje lako dostupna frakcija ulja oslobođena iz mlevenjem razorenih biljnih ćelija (brzina ekstrakcije limitirana je rastvorljivošću datih komponenti na datim uslovima pritiska i temperature), prelazni period u kome brzina ekstrakcije pored rastvorljivosti počinje da biva limitirana i difuzijom u čvrstoj fazi, i period spore ekstrakcije u kome je brzina određena samo difuzijom rastvorka u čvrstoj fazi (ekstrakcija teže dostupne frakcije ulja iz nerazorenih ćelija). Nedavno je Sovová (2005) uvela novi model za NKE prirodnih proizvoda, zasnovan, takođe, na konceptu netaknutih i razorenih uljnih ćelija, sa dva ekstrakciona perioda; u toku prvog perioda brzina ekstrakcije je limitirana rastvorljivošću lako dostupnog rastvorka u natkritičnom rastvaraču, dok u drugom periodu, ukupnu brzinu procesa određuje difuzija unutar čestice. Model daje detaljan prikaz prvog perioda za različite tipove fazne ravnoteže i različite protoke rastvarača. Broj parametara modela je od 4 do 7 u zavisnosti od složenosti procesa. Goodarznia i Eikani (1998) su razvili troparametarski model. Parametri su koeficijenti prenosa mase, aksijalne disperzije i difuzije unutar čestice. Poslednji koeficijent je parametar za „fitovanje“ modela, dok se prva dva predskazuju primenom eksperimentalnih korelacija. Model je primenjen na eksperimentalne podatke NKE bosiljka, ruzmarina i majorana (Reverchon i sar. 1993). Reis-Vasco i sar. (2000) su razvili dva modela za NKE etarskih ulja iz metvice (*Mentha pulegium L.*). Autori su pretpostavili da se deo etarskog ulja nalazi u glandularnim trihomima na površini lista, a deo u unutarnjoj strukturi lista. Model uzima u obzir desorpciju etarskog ulja lociranog blizu površine lista i otpor prenosu mase pri ekstrakciji ulja iz unutrašnje strukture lista. Drugi model je uključio i aksijalnu disperziju. Simulacije su izvršene za različite odnose količina ulja smeštenog u trihomima i u unutrašnjosti lista. Gaspar i sar. (2003a) su razvili model, koji je uključio pločastu geometriju biljnog materijala i lokaciju etarskog ulja u glandularnim trihomima. Međutim, samo ponašanje trihoma tokom ekstrakcije i prenos mase iz konkretne sekrecione strukture nije uzeto u obzir. Gaspar i sar. (2003b) su uveli metod za razaranje trihoma brzom CO₂ dekompresijom kao vrstu predtretmana za NKE. Nedostatak ovog metoda je to što brze dekompresije, zbog svog uticaja na opremu i velike potrošnje energije, nisu poželjna operacija u industrijskim uslovima. Razvoj fiziologije biljaka, kao i eksperimentalnih tehnika za izolovanje sekretornih struktura i njihovog sadržaja, omogućio je precizniji uvid u strukturu biljnog materijala, tj. u vrstu, oblik i dimenzije sekrecionih struktura u kojima se nalaze etarska ulja. Zahvaljujući tome, danas, se otišlo korak dalje u modelovanju i optimizaciji, kao i opisu fenomena, pre svega prenosa mase, koji se dešavaju tokom procesa NKE (Stamenić i sar., 2008, 2010; Zizović i sar., 2005, 2007a,b). Koncept modelovanja na nivou sekrecionih struktura, koji je detaljno opisan u literaturi novijeg datuma (Stamenić i sar., 2008; Zizović i sar., 2005), uzima u obzir izotermne i izobarne uslove, konstantni protok CO₂, kao i postojanje aksijalne disperzije NK CO₂ u ekstraktoru. U ovom modelu, kao i kod modela Sovove (1994a), ekstrakt koji se nalazi u odgovarajućim sekretornim strukturama (glandularni trihomi, sekretorne cevčice, kanali i ćelije) aproksimiran je pseudokomponentom. U novijoj literaturi je, takođe, na osnovu ponašanja odgovarajućih sekrecionih struktura tokom procesa NKE i rezultata modelovanja, izvršena klasifikacija biljnog materijala na osnovu dominirajućeg otpora prenosu mase tokom ekstrakcionog procesa (Stamenić i sar., 2008; Žižović, 2006). S tim u vezi, pokazalo se da je brzina NKE kod biljaka sa sekretornim kanalima i šupljinama (Zizović i sar., 2007b), limitirana brzinom spoljašnjeg prenosa mase, dok je kod biljnih vrsta čiji su sekundarni metaboliti skladišteni u sekrecionim ćelijama ukupna brzina NKE procesa limitirana difuzijom u čvrstoj fazi (Zizović i sar., 2007a). Kod NKE biljaka Lamiaceae u kojima se etarsko ulje nalazi u glandularnim trihomima, na ukupnu brzinu procesa ekstrakcije utiču spoljašnji prenos mase u periodu brze ekstrakcije, odnosno difuzija u čvrstoj fazi u periodu spore ekstrakcije (Stamenić i sar., 2008, 2010; Zizović i sar., 2005).

2.5.2.1. Empirijsko modelovanje

Empirijski modeli nastaju iz eksperimentalnih podataka i mogu biti korisni ukoliko podaci o mehanizmu prenosa mase i ravnoteži nisu dostupni. Njihov značaj je mali za procesne uslove koji prevazilaze okvire eksperimentalnih, jer ovi modeli praktično predstavljaju samo interpolaciju eksperimentalnih rezultata (Reverchon i De Marco, 2006). Pri empirijskom modelovanju procesa NKE korišćene su dve vrste empirijskih formula, prva, Langmuir-ovog tipa koja je data jednačinom (2):

$$Y = \frac{Y_{\infty} \cdot t}{B + t} \quad (2)$$

i druga, tipa kinetike prvog reda data jednačinom (3):

$$\frac{dq_{rs}}{dt} = -k \cdot q_{rs} \quad (3)$$

gde je t - vreme, Y - prinos, k - kinetička konstanta, B - konstanta, i q_{rs} - preostala količina ekstrakta u čestici biljnog materijala.

2.5.2.2. Modelovanje zasnovano na analogiji sa prenosom toplote

U ovom slučaju, proces natkritične ekstrakcije se posmatra kroz fenomene prenosa toplote, pri čemu se svaka čestica biljnog materijala posmatra kao zagrejana sfera koja se hladi u medijumu uniformnog sastava. Pretpostavke su da je materija koja se ekstrahuje ravnomerno raspoređena u čestici i da se sve čestice u istom trenutku nalaze na istim uslovima ekstrakcije (Bartle i sar., 1990; Hong i sar., 1990; Reverchon i sar., 1993, 1994).

Primenom drugog Fikovog zakona difuzije (jednačina 1), maseni bilans za jednu česticu sfernog oblika može se napisati na sledeći način:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{D}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial q}{\partial r} \right) \quad (4)$$

Korišćenjem analogije između prenosa toplote i mase, i nakon Furijeovih transformacija, može se definisati materijalni bilans za česticu biljnog materijala:

$$\frac{q}{q_0} = \left(\frac{6}{\pi^2} \right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left(- \frac{n^2 \pi^2 D t}{r^2} \right) \quad (5)$$

gde je: n - ceo broj, r - prečnik sfere, D - koeficijent difuzije u sferi ili unutrašnji efektivni koeficijent difuzije, t - vreme ekstrakcije, q - preostala koncentracija rastvorka u sferi i q_0 , početna koncentracija materije koja se ekstrahuje.

Glavni nedostatak modela po analogiji sa prenosom toplote je pretpostavka o istim uslovima ekstrakcije kroz ceo sloj biljnog materijala. Koncept empirijskog i modelovanja zasnovanog na analogiji sa prenosom toplote je napušten relativno brzo, da bi se skoro u potpunosti prešlo na koncept rešavanja diferencijalnog masenog bilansa za ekstraktor.

3.5.2.3. Modelovanje zasnovano na integraciji diferencijalnog masenog bilansa

Koncept modelovanja baziranog na rešavanju diferencijalnog masenog bilansa za ekstraktor je, danas, najšire primenjen oblik modelovanja procesa NKE iz biljnog materijala. Zasnovan je na postavljanju diferencijalnog masenog bilansa za deo ekstraktora i njegovoj integraciji za ceo ekstraktor. Osnovne pretpostavke modela zasnovanih na integraciji diferencijalnog masenog bilansa su konstantna gustina rastvarača i protok natkritičnog fluida kroz sloj čestica, zanemarljiva aksijalna disperzija, kao i aproksimacija kojom se etarsko ulje može okarakterisati osobinama jedne, izabrane pseudokomponente (Žižović, 2005).

Uzimajući u obzir ove pretpostavke moguće je napisati jednačine materijalnog bilansa za diferencijalni deo ekstraktora (6) i čvrstu fazu (7):

$$uV \frac{\partial c}{\partial h} + \varepsilon V \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \varepsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad (6)$$

$$(1 - \varepsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = -A_p K(q - q^*) \quad (7)$$

gde je ε - poroznost sloja, V - zapremina ekstraktora, c - koncentracija ekstrakta u natkritičnom fluidu, q - koncentracija ekstrakta u čvrstoj fazi, u - prividna brzina strujanja fluida, A_p - ukupna površina čestica, q^* - ravnotežna koncentracija na granici faza čvrsto-fluid, K - koeficijent prenosa mase kroz česticu, t - vreme i h - prostorna koordinata ekstraktora.

Imajući u vidu imaseni bilans za jednu česticu sfernog oblika (jednačine 4 i 5), moguće je dobiti i profil koncentracija unutar čestica. Poznavajući početne i granične uslove, kao i uslove ravnoteže, jednačine (6) i (7) se mogu rešiti pogodnom numeričkom metodom.

2.6. Eksergijska analiza

Energetska efikasnost je važan kriterijum za ocenu rada, kako pojedinačnih hemijsko-tehnoloških procesa, tako i složenih sistema procesa, koji sačinjavaju određeni hemijski kompleks ili određeni segment hemijske industrije. Energetska efikasnost ne zavisi samo od količine, već i od kvaliteta korišćene energije, te se za njeno određivanje koristi bilans eksergije hemijsko-tehnološkog procesa. Gubitak eksergije je mera termodinamičke nesavršenosti prouzrokovane nepovratnošću hemijskih i fizičkih promena u okviru procesa. Analiza gubitaka eksergije je složen i obiman posao koji zahteva poznavanje strukture hemijsko-tehnološkog procesa, parametara koji definišu režim rada svih obuhvaćenih uređaja kao i detaljne bilanse mase i energije. Isključivi cilj primene drugog principa termodinamike na analizu efikasnosti je minimiziranje termodinamičkog izgubljenog rada što naravno, izaziva uvećanje termodinamičke efikasnosti sistema.

Eksergijska analiza omogućava izračunavanje efikasnosti korak po korak, odnosno izračunavanje efikasnosti pojedinačnih procesnih jedinica. Korisna je i analiza zasnovana na poređenju alternativnih procesa. Ovo razmatranje mora biti pažljivo i treba da obuhvati sve ekvivalentne jednačine operacije unutar granica procesa. Pri tome se podrazumeva potpuno definisanje granica procesa, tokova sirovina, proizvoda i slično (Cvetković, 1995).

Eksergijski bilans za otvoreni sistem konstantnog protoka stanja (stacionarni proces) dat je jednačinom (8) (Bejan, 2002; Smith i sar., 1999):

$$\dot{E}x_{in} + \dot{E}x_Q = \dot{E}x_{out} + \dot{W} + \dot{W}_{lost} \quad (8)$$

gde su: $\dot{E}x_{in}$ i $\dot{E}x_{out}$ - eksergija na ulazu i izlazu iz datog sistema, $\dot{E}x_Q$ - eksergija koja se prenosi toplotom, \dot{W} - spoljašnji rad u razmeni sa okolinom i \dot{W}_{lost} - gubitak eksergije (označava se u literaturi i sa I , kao ireverzibilnost procesa, izgubljena snaga).

Eksergija na ulazu i izlazu iz datog sistema definisane su na sledeći način:

$$\dot{E}x_{in} = \sum \dot{m} e_x(in) \quad (9)$$

$$\dot{E}x_{out} = \sum \dot{m} e_x(out) \quad (10)$$

Specifična eksergija sistema - e_x sa konstantnim protokom predstavljena je pomoću specifične entalpije - h , hemijske eksergije - e_{ch} , entropije - s , kinetičke energije - $\frac{v_0^2}{2}$ i gravitacione potencijalne energije - $g \cdot Z_0$:

$$e_x = (h - T_0 \cdot s) - (h_0 - T_0 s_0) + e_{ch} + \frac{v_0^2}{2} + g \cdot Z_0 \quad (11)$$

pri čemu je e_x je izražena u kJ/kg, i zavisi od uslova sredine (T_0, p_0). Temperatura i pritisak sredine iznose 293,15 K i 0,1 MPa, respektivno. U jednačini (11) izraz $(h - T_0 \cdot s)$ predstavlja koristan protok struje fluida. e_x predstavlja razliku između korisnog protoka struje u datom stanju i protoka iste struje u stanju okoline. U ovom radu doprinosi hemijske, potencijalne i kinetičke energije su zanemareni.

Sadržaj eksergije koja se prenosi toplotom je data jednačinom (12):

$$\dot{E}_Q = \sum_j \left[\dot{Q}_j \left(1 - \frac{T_0}{T_j} \right) \right] \quad (12)$$

gde su: \dot{Q}_j - toplota razmene u j -toj razmeni toplote, T_j - temperatura rezervoara u j -toj razmeni toplote i \dot{W}_k - spoljašnji koristan rad u k -toj razmeni sa okolinom. Zamenom jednačina (9), (10) i (12) u jednačinu (8) dobija se jednačina (13) pomoću koje se izračunava uništena eksergija (ireverzibilnost procesa ili izgubljena snaga) za otvoreni, stacionarni sistem. Izgubljena snaga je proporcionalna generisanoj entropiji usled faznih transformacija (jednačina 13).

$$\dot{W}_{lost} = T_0 \dot{S}_{gen} = \sum \dot{m} e_x(in) - \sum \dot{m} e_x(out) + \sum_j \dot{Q}_j \left(1 - \frac{T_0}{T_j} \right) - \sum_k \dot{W}_k \quad (13)$$

Eksergija predstavlja radni potencijal sistema u datom stanju u određenoj okolini. Maksimalan koristan rad (\dot{W}_{max}) ili reverzibilan rad dat je kao promena eksergije i predstavlja maksimalan generisan rad ($\Delta E > 0$) ili minimalan potreban rad ($\Delta E < 0$) za prelazak sistema iz jednog u drugo stanje:

$$\dot{W}_{max} = \dot{E}x_{in} - \dot{E}x_{out} = -\Delta E \quad (14)$$

2.7. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti

2.7.1. Osnovne karakteristike odabranih sojeva bakterija

Bakterije su najstariji i najbrojniji jednoćelijski organizmi prokariotske građe za koje se smatra da su nastali pre oko 3,4 milijardi godina, ali su zbog svojih malih dimenzija poslednji živi organizmi otkriveni od strane čoveka. Prisutni su u svim vrstama stanovišta, uključujući i ljudski organizam i mogu se uočiti svetlosnim mikroskopom. Danas postoji više klasifikacija bakterija: (a) klasična klasifikacija (na osnovu morfoloških, tintorelnih, kulturelnih, biohemijskih i antigenskih osobina); (b) numerička klasifikacija (razvrstavanje u takse po sličnosti njihovih osobina); (c) biohemijska klasifikacija (na osnovu bihoemijskih razlika jedinjenja koja se nalaze u ćelijskom zidu pojedinih bakterija); i (d) klasifikacija na osnovu sastava DNK (utvrđuje se frekvencija parova baza u DNK posmatrane vrste bakterija, najčešće guanina i citozina) (Švabić-Vlahović i sar., 2008).

Mikroorganizmi se, na osnovu prirode njihovih interakcija sa ljudima, mogu grupisati u: (a) komenzalne mikroorganizme (sačinjavaju normalnu mikrofloru i nisu uzročnici oboljenja), (b) patogene organizme (specifični su za posebnu vrstu domaćina i vrstu tkiva, uništavaju ćelije domaćina direktno ili, indirektno, proizvodeći toksine koji nanose štetu metabolizmu ćeliji domaćina, (c) oportunističke organizme (obično se nalaze u našem okruženju ili su deo normalne mikroflora i nisu primarni uzročnici oboljenja; mogu izazvati teška oboljenja u slučajevima oslabljenog imuniteta organizma domaćina ili ako nekim putem dospeju na mesta gde se inače ne nalaze, na pr. nakon operacije) i (d) zoonotske mikroorganizme (obično izazivaju oboljenja kičmenjaka sem čoveka, ali se mogu preneti na ljude sa inficiranih životinja ili životinjskih proizvoda) (Kinsbury i sar., 1997).

2.7.1.2. Gram-pozitivne koke: stafilokoke, streptokoke i enterokoke

Stafilokoke su Gram-pozitivne fakultativno anaerobne bakterije loptastog oblika raspoređene u vidu grozdastih formacija (grč. *staphylos*-grozd). Rod *Saphylococcus* obuhvata 32 vrste bakterija od kojih su najznačajniji izazivači oboljenja kod ljudi *S. aureus* (striktni patogen), *S. epidermidis* i *S. saprophyticus* (oportunističke bakterijske vrste). Vrsta *S. aureus* poseduje veliki broj strukturnih i solubilnih faktora virulencije koji mu omogućavaju veliku prodornost, uništavanje tkivnih elemenata, izazivanje zapaljenske reakcije, intoksikaciju organizma domaćina i izbegavanje, mehanizama imunosti. Zbog toga je u stanju da izazove veliki broj toksemičnih oboljenja (stafilokokno trovanje hranom, sindrom oparene kože i toksični šok sindrom), oboljenja kod kojih je stafilokok direktno prisutan u nekoj regiji (kožne infekcije, infekcije respiratornih puteva, urogenitalnog trakta, sinuzitis, osteomijelitis, septični artritis, endokarditis, septikemija i dr.) kao i oboljenja gotovo svih organa i tkiva čovečjeg organizma. Poseduje različite mehanizme rezistencije na antibiotike i smatra se jednim od najznačajnijih bakterijskih agenasa u humanoj medicini (Higerd i Flower, 1997; Švabić-Vlahović i sar., 2008). Vrsta *S. epidermidis* naseljava gotovo sve dostupne regije čovekovog organizma ulazeći u sastav fiziološke mikroflora. Čest je kontaminant medicinskih instrumente (kateteri i implanati) i jedan je od najčešćih izazivača intrahospitalnih infekcija. Vrsta *S. saprophyticus* ima izraženi afinitet za urinarni trakt (Švabić-Vlahović i sar., 2008).

Tokom nekoliko poslednjih decenija, kod stafilokoka je registrovana rezistencija na gotovo sve antibiotike. Primena penicilaza rezistentnih penicilinskih lekova (oksacilina, kloksacilina i meticilina) i inhibitora beta-laktamaza (klavulanska kiselina) u terapiji rezultirala je ubrzo razvojem novog mehanizma rezistencije zasnovanog na promeni afiniteta ciljnog mesta – penicilin vezujućih proteina (meticilin rezistentne stafilokoke-MRSA). Vremenom su stafilokoke razvile rezistenciju na gotovo sve široko primenljivane antibakterijske lekove: eritromicin, hloramfenikol, gentamicin, amikacin, fluorohinolone, sulfonamide, vankomicin i druge. Zbog toga se, danas, u slučaju teških oboljenja izazvanih MRSA sojevima koriste kombinacije antibiotika sa sinergističkim dejstvom (Švabić-Vlahović i sar., 2008). Zabrinjavajuća je činjenica da farmaceutska industrija u

poslednjih dvadesetak godina nije proizvela nijedan novi takozvani „blockbuster antibiotik“ širokog spektra delovanja za široku upotrebu u humanoj i veterinarskoj medicini (Nordmann, 2007). Za krizu u proizvodnji novih klasa antibiotika postoji nekoliko razloga: nedovoljna selektivna toksičnost novih supstanci sa jakim antibakterijskim delovanjem, duga, skupa i neizvesna pretklinička i klinička ispitivanja novih antibiotika (od nekoliko godina do nekoliko decenija) koja zahtevaju pokretanje ogromne višegodišnje marketinške kampanje kako bi novi preparat došao do potrošača (Mišić i sar., 2009b).

Iz gore pomenutih razloga u poslednjih deset godina u svetu su sve aktuelnija ispitivanja antibakterijskog delovanja alternativnih neantibiotskih supstanci kao što su etarska ulja i biljni ekstrakti (sami ili u kombinaciji sa postojećim antibioticima) za lečenje infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima bakterija (Abdalla i sar., 2007; Becerril i sar., 2007; Gutierrez i sar., 2009; Mišić i sar., 2010a,b; Mišić i sar., 2009a,b; Rota i sar., 2008).

Streptokoke i enterokoke su Gram-pozitivne bakterije veličine 0,5-1 μm koje se obično ređaju u parovima ili lancima različite dužine zbog specifičnosti njihove deobe (Švabić-Vlahović i sar., 2008; Higerd i Flower, 1997). Većinom su fakultativni anaerobi; neke vrste su i kapnofilne (rastu bolje u prisustvu 2-10% CO_2). *Streptococcus pyogenes* uzrokuje je veliki broj oboljenja-gnojnu anginu, šarlah, erizipelu, puerperalnu sepsu, infekcije rana, imunopatološka stanja kao što su reumatska groznica, akutni glomerulonefritis i dr. Ova bakterijska vrsta ima izuzetno širok spektar mehanizama kojima izaziva oboljenja kod ljudi: brojne enzime i toksine, strukture kojima izbegava fagocitizu i podstiče inflamaciju; specifičnu antigensku strukturu i dr. Vrsta *S. agalactiae* je oportunistički patogena bakterija koja je mnogo godina bila poznata kao uzročnik mastitisa kod krava. Najznačajnija oboljenja koja ova bakterijska vrsta izaziva kod ljudi su teške infekcije novorođenčadi. *Streptococcus uberis*, je oportunistička bakterija koja kolonizuje više regija u organizmu goveda (stomak, krajnike, kožu i genitalni trakt). Može izazvati zapaljensko oboljenje, mastitis kod krava (Ward i sar., 2009) ali su zabeleženi i slučajevi mastitisa kod žena uzrokovanih ovom vrstom. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* je oportunistički patogena bakterijska vrsta koja kolonizuje organizme konja, krava i svinja. Uzrokuje infekcije rana i respiratornog trakta kod ždrebad i mladih konja. Može se preneti na ljude (zoonotska bakterija) konzumiranjem nepasterizovanog mleka ili mlečnih proizvoda i direktnim kontaktom sa konjima. Najčešća oboljenja koja izaziva kod ljudi su septikemija, meningitis, pneumonija, septični artritis i poststreptokokalni glomerulonefritis (Jovanović i sar., 2008).

Predstavnici roda *Enterococcus* sačinjavaju deo normalne mikroflore intestinalnog i bilijarnog trakta, a u malom broju mogu se naći i u usnoj duplji, vagini i uretri muškaraca. Najčešće se izoluju *E. faecalis* i *E. faecium*. Vrste roda *Enterococcus* izazivaju urinarne infekcije, posebno kod bolesnika sa kateterima. Kod imunokompromitovanih osoba dovode do infekcija bilijarnog trakta i apscesa mekih tkiva. Čest je uzročnik endokarditisa, posebno kod osoba sa oštećenim ili veštačkim srčanim zaliscima. Poslednjih godina vrste ovog roda spadaju u vodeće uzročnike intrahospitalnih infekcija i izuzetno rezistentne na antibiotike (Švabić-Vlahović i sar., 2008).

2.7.1.2. Gram-pozitivne bakterijske vrste štapićastih bakterija (bacila)

Rod *Bacillus* obuhvata više od 50 vrsta Gram-pozitivnih aerobnih ili fakultativno anaerobnih bacila dužine do 10 μm među kojima su najpoznatije patogeni *B. cereus*, *B. subtilis* i *B. anthracis* (Manos i sar., 1997; Quinn i sar., 2002; Švabić-Vlahović i sar., 2008). *B. cereus* može svojim endotoksinima da izazove trovanje hranom: termostabilni toksin je odgovoran za vormitični oblik a termolabilni toksin za dijarejni oblik oboljenja. *B. subtilis* se nalazi u prirodi, povrću, mleku, kobasicama i deo je normalne mikroflore čoveka. Može izazvati oportunističke infekcije: sepsu kod imunokompromitovanih bolesnika i konjunktivitis kod osoba koje već imaju lezije ili hroničnu iritaciju sluzokože vežnjače. Čest je kontaminant bakterioloških podloga. Vrsta *B. anthracis* je aeroban bacil sa centralnom endosporom koji izaziva antraks, oboljenje biljojeda i tipična je zoonoza. Antraks se kod ljudi može javiti kao kožni, crevni i plućni, pri čemu sva tri oblika lako mogu preći u septični oblik. Kod životinja je ovo oboljenje gotovo uvek septično (Manos i sar., 1997; Quinn i sar., 2002; Švabić-Vlahović i sar., 2008).

2.7.1.3. Familija *Enterobacteriaceae*: rodovi *Escherichia* i *Salmonella*

Pripadnici roda *Escherichia* su Gram-negativni, pokretni, fakultativno anaerobni bacili koji čine najbrojniju vrstu fakultativno anaerobne flore digestivnog trakta čoveka i životinja i svrstavaju se u uslovno patogene (oportunističke) bakterije. Od nekoliko vrsta ovog roda jedino *E.coli* ima medicinski značaj (Virella i Schmidt, 1997; Quinn i sar., 2002; Švabić-Vlahović i sar., 2008). Ešerihije su štapići prečnika 1-1,5 µm, dužine 2-4 µm raspoređeni pojedinačno, u parovima i nepravilnim strukturama. *E.coli* izaziva dve grupe infekcija kod čoveka: ekstraintestinalne infekcije (infekcije urinarnog trakta, sepsa i meningitis) i dijarejna oboljenja ili enterokolitis (Švabić-Vlahović i sar., 2008; Virella i Schmidt, 1997). Rodu *Salmonella* pripada preko 2400 stereotipova. To su striktno patogeni mikroorganizmi, uzročnici salmoneloza. *Salmonella* Typhi i *Salmonella* Paratyphi A, B i C izazivaju tifuse i paratifuse. Čovek je jedini rezervoar infekcije. Salmonele se najčešće prenose kontaminiranom hranom životinjskog porekla, koja je nedovoljno termički obrađena, dok je prenošenje između retko. Serovarijetet *S. Enteritidis* je zoonotski mikroorganizam koji kolonizuje reproduktivne organe i jaja živine, a kod ostalih vrsta životinja i kod ljudi uglavnom dovodi do zapaljenja digestivnog sistema. Kod ljudi dovodi do infekcije najčešće putem kontaminirane hrane, uglavnom preko jaja poreklom od inficirane živine (Gantois i sar., 2009; Švabić-Vlahović i sar., 2008; Virella i Schmidt, 1997).

2.7.2. Ispitivanje osetljivosti bakterija na antibakterijska sredstva

Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakta izolovanih iz prirodnog materijala koristi se veliki broj metoda čija je klasifikacija prikazana u tabeli 6. Najčešće se koriste *in vitro* metode koje se mogu se klasifikovati u difuzione, dilucione i autobiografske metode (Burt, 2007). Sve metode koje se koriste za ispitivanje antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata predstavljaju modifikovane metode za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike.

Tabela 6 Metode ispitivanja antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata (Burt, 2007)

Namena	Metoda
Ispitivanje antibakterijske aktivnosti	Difuziona metoda: 1. disk metoda 2. metoda bunarčića
Ispitivanje antibakterijske aktivnosti-određivanje vrednosti MIC	Diluciona metoda: 1 Diluciona metoda u agaru 2. Diluciona metoda u bujonu
Određivanje brzine delovanja ili dužine trajanja antibakterijske aktivnosti	Analiza vremena potrebnog za ubijanje bakterija/Krive preživljavanja
Posmatranje fizičkih efekata antibakterijske aktivnosti	Skenirajuća elektronska mikroskopija

Diluciona metoda. Ova metoda se zasniva na diluciji (razređenju) ispitivanog antibiotika tako da se tako da se antibiotik u određenim koncentracijama dodaje direktno u podlogu. U podlogu se inokuliše ispitivani bakterijski soj u određenom broju. Uključene su i kontrole: podloga bez antibiotika inokulisana ispitivanim bakterijskim sojem; kao i nezasejana podloga sa antibiotikom. Nakon inkubacije od 18 do 24 sata na temperaturi od 37 °C, vrši se očitavanje rezultata; ukoliko je ispitivani mikroorganizam otporan na antibiotik u datoj koncentraciji registruje se zamućenje podloge ili porast kolonija. Najmanja količina antibiotika u podlozi u kojoj nema zamućenja tj. porasta bakterija označava se kao **minimalna inhibitorna koncentracija** (u anglosaksonskoj literaturi, **MIC**-Minimal inhibitory concentration) i predstavlja najmanju koncentraciju tog antibiotika koja inhibira rast bakterija.

(a) *Diluciona metoda u bujonu* se izvodi u epruvetama ili mikrotitracionim pločama. Metoda je, osim za određivanje vrednosti MIC, pogodna i za određivanje vrednosti **minimalne baktericidne koncentracije** (u anglosaksonskoj literaturi, **MLC**-Minimal letal concentration), odnosno najmanje koncentracije antibiotika u kojoj ispitivani mikroorganizmi bivaju ubijeni (baktericidni efekat). U tom cilju se sadržaj iz epruveta tj bazenčića u kojima nema zamućenja presejava na čvrste podloge. Nakon inkubacije od 18 do 24 sata na temperaturi od 37 °C, rezultat se očitava na sledeći način: ukoliko na podlozi nema porasta bakterijskih

kolonija, koncentracija antibiotika u epruveti iz koje je izvršeno presejavanje najmanja je koncentracija koja je delovala baktericidno i predstavlja MLC (Švabić-Vlahović i sar., 2008) Kod ispitivanja antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakat primenom ove metode, određivanje granične tačke (MIC), može biti otežano usled zamućenosti uljane emulzije. Iz ovog razloga u upotrebi su indikatori poput fluorescin diacetata (FDA), ili trifeniltetrazolium hlorida (TTC). Diluciona metoda u bujonu razvijena je prvenstveno za ispitivanje hidrosolubilnih preparata. Pošto se ekstrakti ne rastvaraju ili su slabo rastvorljivi u vodi, da bi se poboljšao kontakt između ekstrakta i ispitivanog mikroorganizama koriste se emulgatori poput Tween 80 i Tween 20 u koncentracijama od 0,001% do 20 %. Upotreba etanola kao rastvarača u koncentracijama od 5 % takođe ima uticaja na antimikrobno dejstvo. Mišljenja povodom upotrebe rastvarača i emulgatora su protivurečna, jer se u nekim slučajevima pokazalo da njihova upotreba može negativno da utiče na antimikrobnu aktivnost supstance.

(b) *Diluciona metoda u agaru* se sastoji u tome da se antibiotik u određenim koncentracijama dodaje u čvrstu podlogu. Na površinu podloge zasejavaju se inokulumi određene gustine ispitivanih bakterija. Na ovaj način, na istoj podlozi može se ispitati čak 10-16 različitih bakterijskih sojeva, a rezultati se očitavaju na osnovu porasta kolonija zasejanih bakterija. Samo one bakterijske ćelije koje su rezistentne na koncentraciju ispitivanog antibakterijskog sredstva koja je inkorporirana u agaru daće vidljiv porast (Švabić-Vlahović i sar., 2008).

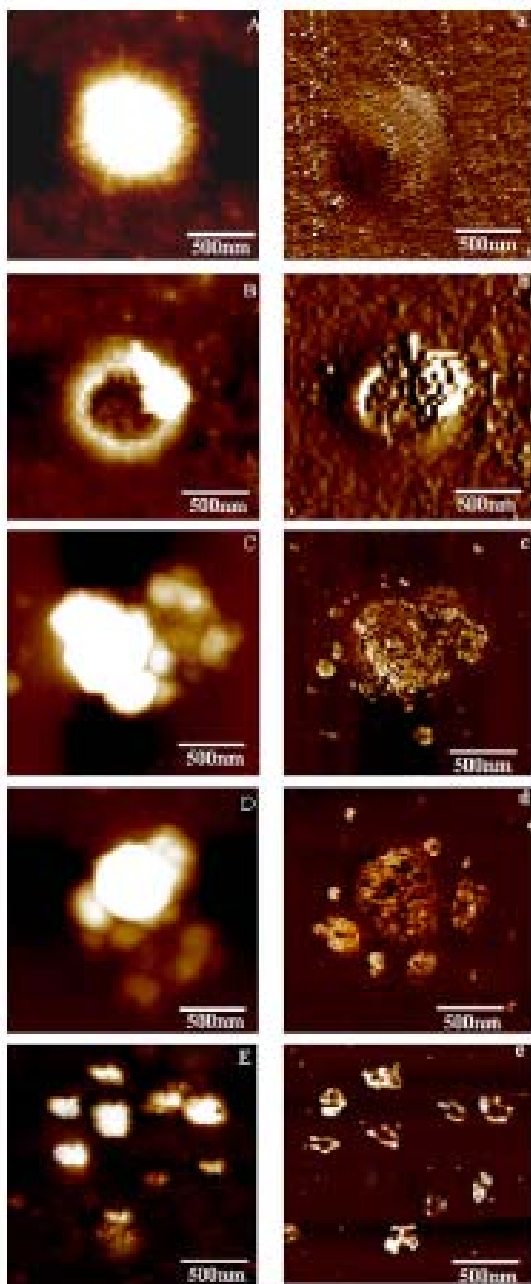
Difuziona metoda. Princip ove metode je da antibakterijska supstanca difunduje u hranljivu podlogu i deluje inhibitorno na zasejane bakterije (Švabić-Vlahović, 2008). Dve najčešće korišćene difuzione metode su: **disk difuziona metoda** i **metoda bunarčića**. Kod disk difuzione metode disk od filter papira, porozna posuda ili cilindar bez dna, postavljaju se na čvrstu hranljivu podlogu koja je zasejana određenim brojem bakterija soja koji se ispituje. Nakon inkubacije, prečnik zone inhibicije koji okružuje postavljeni disk sa antimikrobnom supstancom, smatra se merom inhibitorne snage supstance u odnosu na određeni testirani mikroorganizam. Rezultati difuzionih metoda često su protivurečni. S druge strane, ove metode se lako izvode i često koriste za početno ispitivanje antimikrobne aktivnosti nekog novog, nedovoljno ispitivanog ekstrakta (Mišić, 2003).

(a) *Disk difuziona metoda* se sastoji u impregnaciji diskova od filter papira ili tableta određenom koncentracijom antibiotika Hranljiva podloga se prethodno zaseje suspenzijom određene gustine čiste kulture ispitivanog soja (inokulum). Na hranljivu podlogu se potom stavljaju diskovi ili tablete iz kojih antibiotik difunduje u hranljivu podlogu. Posle inkubacije od 18 do 24 sata na 37 °C, očitava se prečnik zone inhibicije. Ako su svi uslovi standardizovani (veličina inokuluma, sastav i debljina podloge, pH podloge, vreme inkubacije), onda je prečnik zone inhibicije proporcionalan koncentraciji datog antibakterijskog sredstva. Drugim rečima, ako je zasejana bakterija osetljiva na delovanje antibakterijskog sredstva, ona neće porasti u zoni njegove aktivnosti. Širina te zone inhibicije predstavlja stepen osetljivosti bakterije: S (senzitivan-osetljiv soj), i I (intermedijaran-srednje osetljiv soj). Ako je bakterija otporna na dejstvo antibakterijskog sredstva, zona inhibicije je uska ili uopšte ne postoji: R (rezistentan-otporan soj). Prečnik zone inhibicije se meri milimetarskom hartijom i tumači prema prema preporuci proizvođača diska ili tablete (Švabić-Vlahović i sar., 2008). Ova metoda je u modifikovanom obliku iskorišćena i u cilju ispitivanja osetljivosti bakterija na delovanje biljnih ekstrakata. Diskovi od filter papira natopljeni određenom supstancom tj. biljnim ekstraktom, postavljaju se na hranljivu podlogu zasejanu mikrobiološkom kulturom. Antimikrobna aktivnost rezultat je kombinacije dva načina delovanja: direktnog dejstva para na mikroorganizme, i indirektnog dejstva kroz medijum (hranljivu podlogu koja je apsorbirala paru ekstrakta). Iz tog razloga bitno je utvrditi koncentracije apsorbiranih supstanci u hranljivom agaru. Supstance koje su više rastvorljive u vodi, a pri tom i manje isparljive, akumuliraju se u podlozi u većim koncentracijama, nego više isparljive supstance i izuzetno nerastvorljive u vodi. Bitno za ovu metodu, a čega nije bilo u prethodno navedenim metodama, je pojava spontane degradacije nestabilnih supstanci u vazduhu, što svakako ima uticaja na rezultate ove metode. Ova tehnika ima veliki značaj u ispitivanju biljnih ekstrakata, kao potencijalnih supstanci za lečenje infekcija respiratornog trakta, inhaliranjem (Misić, 2003).

(b) *Metoda bunarčića* izvodi se tako što se na hranljivoj podlozi koja je zasejana mikroorganizmima naprave udubljenja u odliku pravilnih rupa. Ova udubljenja (bunarčići), pune se određenom količinom antimikrobne supstance. Nakon inkubacije, jasne zone inhibicije nastaju oko diska ili bunarčića, ako je mikroorganizam osetljiv na antimikrobnu supstancu. U slučaju ispitivanja ekstrakta, ova metoda ima niz

nepogodnosti. Najveći problem predstavlja to što je difuzija ulja kroz agar ograničena, usled male rastvorljivosti u vodi.

Iako su difuzione metode podesnije za rutinski rad jer su jednostavnije za izvođenje, brže i jeftinije, dilucione metode su preciznije (Švabić-Vlahović i sar., 2008; Klančnik i sar., 2010). Nedostatak zone inhibicije kod difuzionih metoda ne mora značiti i malu osetljivost testiranih sojeva na ispitivane biljne ekstrakte ili etarska ulja. To se objašnjava činjenicom da manje polarna i/ili nepolarnih jedinjenja (koja ulaze u sastav eteričnih ulja) zbog svoje hidrofobne prirode ne difunduju ravnomerno kroz hranjivu podlogu (Klančnik i sar., 2010). Zato se za kvantitativno određivanje antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata/etarskih ulja preporučuju agar diluciona metoda i mikrodiluciona metoda u bujonu kojima se dobijaju znatno niže MIC vrednosti. Mikrodiluciona metoda je brža i preciznija i preporučuje se za određivanje MIC vrednosti biljnih ekstrakata na sve tipove bakterija (Klančnik i sar., 2010). Kod određivanja antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata, zbog nerastvorljivosti ekstrakta, kod obe metode dodaju se emulgatori da bi se postigla homogenost smeše. Pošto se u dilucionoju metodi u agaru zasejavanje mikroorganizama vrši na čvrstoj podlozi, u ovom slučaju lakše je odrediti vrednost MIC, jer problem zamućenosti ne postoji (Mišić, 2003).



U novije vreme, za vizuelno detektovanje morfoloških promena bakterijskih sojeva na prisustvo etarskih ulja iz lekovitog bilja (*R. officinalis*) koriste se savremene instrumentalne metode poput metode mikroskopiranja primenom tehnike atomske mikroskopije (u aglosaksonskoj literaturi, AFM-Atomic Force Microscopy) kojom se postiže rezolucija snimanja od nekoliko pikometara i snimanje uzoraka u atomskoj rezoluciji (Jiang i sar., 2011) (slika 9). Na antimikrobnu aktivnost *in vitro* imaju uticaj sledeći faktori: (a) stabilnost antimikrobne supstance, jer neke supstance mogu izgubiti svoju aktivnost na temperaturi inkubacije, (b) veličina inokuluma, jer se velike bakterijske populacije inhibiraju sporije i nepotpunije od malih; takođe, kod velikih populacija veća je verovatnoća nastanka rezistentnih mutanata, (c) dužina inkubiranja, jer u većini slučajeva mikroorganizmi nisu ubijeni, već dolazi samo do inhibicije njihovog rasta tokom kratkotrajnog izlaganja dejstvu antimikrobnog agensa; s druge strane, dužim periodom inkubacije, antimikrobna supstanca može početi da gubi svoje dejstvo, pa je veća verovatnoća da se pojave rezistentni mutanti, ili da počnu da se razmnožavaju manje osetljivi pripadnici mikrobne populacije, (d) metabolička aktivnost mikroorganizma, jer su na dejstvo antimikrobne supstance osetljiviji mikroorganizmi koji aktivno i brzo rastu, nego mikroorganizmi u fazi odmora (stacionarnoj fazi), i (e) sastav hranjive podloge, pH itd. (Mišić, 2003). U novijoj naučnoj literaturi mogu se naći podaci i o *in vivo* ispitivanjima antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata iz biljnog materijala i/ili pojedinačnih komponenti sa antibakterijskom aktivnošću u različitim model sistemima (Tabela 7).

Slika 9 AFM (Atomic Force Microscopy) snimci površine i faza soja *S.aureus* pre i posle isloženosti etarskom ulju ruzmarina u različitim koncentracijama; (a) kontrolni;(b) 2× MIC; (c) 8× MIC; (d) 32× MIC; (e) 128× MIC. Bar=500nm.

Obzirom da ne postoje standardizovane metode za testiranje antibakterijske aktivnosti etarskih ulja na odgovarajućih sojeve bakterija, u praksi se vrši prilagođavanje postojećih eksperimentalnih metoda za ispitivanje antibakterijskog dejstva antibiotika (Burt, 2007; Mišić i sar., 2009a,b, 2010a,b; Švabić-Valhović, 2008). Kako rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti zavise od velikog broja faktora kao što su primenjena metoda, zapremina inokuluma, faza rasta, medijum, pH vrednost medijuma, inkubaciono vreme i temperatura (Janssen i sar., 1987; Rios i sar., 1988) literaturne podatke je teško porediti. Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti se takođe izražavaju različitim terminima (tabela 7).

Tabela 7 Termini kojima se najčešće izražava antibakterijsko delovanje

Termin	Definicija
Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)	<ul style="list-style-type: none"> -Minimalna koncentracija pri kojoj dolazi do zadržavanja ili redukcije sposobnosti preživljanja mikroorganizama -Minimalna potrebna koncentracija za potpunu inhibiciju testiranih mikroorganizama do 48 h inkubacije -Minimalna koncentracija za inhibiciju vidljivog rasta testiranih organizama -Minimalna koncentracija koja dovodi do značajnog opadanja sposobnosti preživljavanja mikroorganizama (>90%)
Minimalna baktericidalna koncentracija (MLC)	<ul style="list-style-type: none"> - Minimalna koncentracija koja smanjuje broj živih bakterija za 99,9% ili više -Minimalna koncentracija pri kojoj se ne zapaža rast nakon podsjevanja u sveži bujon

U novijoj naučnoj literaturi mogu se naći podaci o ispitivanjima antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata iz biljnog materijala i/ili pojedinačnih komponenti sa antibakterijskom aktivnošću u različitim model sistemima (tabela 8).

Tabela 8 Relevantni literaturni pregled rezultata *in vitro* ispitivanja antibakterijske aktivnosti ulja i ekstrakata i/ili njihovih pojedinačnih komponenti u hrani i kozmetičkim proizvodima (2000-2010)

Grupa proizvoda	Ispitivani sistem	Etarsko ulje ili pojed.komponente	Ispitivani bakterijski sojevi	Literaturni izvor
Meso i živina	Mlevena ovčetiina	Ulje origana, nisina i njihove smeše	<i>S. Enteritidis</i>	Govaris i sar., 2010b;
	Paštete od sveže teletine	Ulje origana i timijana	<i>E. coli</i> , <i>E. coli O157:H7</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Emirođlu i sar., 2010
	Teleći ekstrakt	Ulja matičnjaka, majorama, origana i timijana	<i>Enterobacter</i> spp., <i>Listeria</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.	Gutierrez i sar., 2009
	Teletina	Ulje žalfije	<i>S. Anatum</i> and <i>S. Enteritidis</i>	Hayouni i sar., 2008;
	Pileći roštilj	Ulje origana i orašćića	<i>E. coli O157:H7</i>	Shekarforoush i sar., 2007
	Meso	Ulje karanfilića, ulje origana, timijana i korijandera, enkapsulirano uje ruzmarina, čajnog drveta i karanfilića	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>E. coli</i>	Burt, 2004, 2007; Moriera i sar., 2007
	Prženo meso	Ulje origana i smeše ulja origana sa uljima timijana, majorama i žalfije	<i>L. monocytogenes</i>	Du i Li, 2008
	Pileće kobasice	Ulje karanfilića	<i>L. monocytogenes</i>	Mytle i sar., 2006
	Površina mesa	Ulje origana i pimenta (čeri paprika)	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	Oussalah i sar., 2004
	Piletina	Eugenol	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>	Burt, 2004, 2007
	Piletina	Ulje žalfije	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. Typhimurium</i>	Burt, 2004, 2007
	Mlevena svinjetina	Ulje timijana	<i>L. monocytogenes</i>	Burt, 2004, 2007
	Kobasica od svinjske jetre	Enkapsulirano ulje ruzmarina	<i>L. monocytogenes</i>	Burt, 2004, 2007
Mlevena teletina, feta sir	Ulje timijana, žalfije, karanfilića, eukapitusa	Vancomycin-Resistant, <i>Enterococci</i> (VRE), <i>E. coli</i>	Selim i sar., 2010;	
Riba	Delfin	Ulje karanfilića	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>E. coli</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Gómez-Estaca i sar., 2010
	Fileti pastrmke	Ulje origana	<i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Pseudomonas</i> vrste, i <i>Enterobacteriaceae</i>	Frangos i sar., 2010
	Kuvani škampi	Ulje timijana, aldehid cimetne kiseline	<i>Pseudomonas putida</i>	Burt, 2004, 2007
	Fileti krlje	Ulje origana	<i>S. Typhimurium</i>	Burt, 2004, 2007
	Fileti lososa i bakalara	Ulje origana	<i>P. phosphoreum</i>	Burt, 2004, 2007
	Fileti šarana	Timol i karvakrol	Produženje roka trajanja četiri puta	Mahmoud i sar., 2006;
	Šaran	Timol, karvakrol, aldehid cimetne kiseline, alilizotiocijanat, eugenol, izoeugenol, linalool	Produženje roka trajanja	Mahmoud i sar., 2004
Mlečni proizvodi	Sir	Ulje orifana i timijana	<i>E. coli</i> i <i>L. monocytogenes</i>	Govaris i sar., 2010a;
	Obrano mleko u prahu	Ulja matičnjaka, majorama, origana i timijana	<i>Enterobacter</i> spp., <i>Listeria</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., i <i>Pseudomonas</i> spp. <i>E. coli</i>	Gutierrez i sar., 2009
	Mocarela sir, Obrano mleko	Ulje karanfilića, Karvakrol	<i>L. monocytogenes</i>	Burt, 2004, 2007
	Meki sir	DMC baza sa 50 % ulja ruzmarina, žalfije i citrusa	<i>L. monocytogenes</i>	Burt, 2004, 2007
	Jogurt	Ulje karanfilića, kardamona i nane	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Burt, 2004, 2007
	Mlečna industrija	Ulje origana, timijana, ruzmarina, žalfije, kima i karanfilića	Različite kulture i odgovarajuće kvarenje hrane	Viuda-Martos i sar., 2008
Povrće	Paradajz	Ulje origana	<i>S. Typhimurium</i>	Gunduz i sar., 2010
	Laboratorijski medijum i sok od brokolija	Ulje origana, ruzmarina i lovora	<i>L. monocytogenes</i>	Munoz i sar., 2009
	Kupusi	Ulje timijana i šargarepe, ulja matičnjaka, majorama, origana i timijana	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Listeria</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., i <i>Pseudomonas</i> spp	Burt, 2004, 2007; Gutierrez i sar., 2009
	Salata od plavog patlidžana	Ulje origana	<i>E. coli O157:H7</i>	Burt, 2004, 2007
	Seme lucerke	Aldehid cimetne kiseline i timol	<i>Salmonella</i> spp.	Burt, 2004, 2007
Riža	Kuvana riža	Karvakrol, ulje žalfije	Prirodna flora, <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. Typhimurium</i>	Burt, 2004, 2007
Voće	Kivi i dinja	Karvakrol i cimetna kiselima	Prirodna flora	Burt, 2004, 2007
Kozmetički preparati	Sapun, sprej, standardni rastvor, losion	Na-usinat/usninski ekstrakt	<i>S. aureus</i>	Najdenova i sar., 2001

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Sirovine

Za dobijanje etarskih ulja i ekstrakata sa antibakterijskom aktivnošću, pored izabranih biljnih vrsta začinskog i lekovitog bilja iz familije Lamiaceae: ruzmarin (*Rosmarinus officinalis*), žalfija (*Salvia officinalis*), timijan (*Thymus vulgaris*), origano (*Origanum vulgare*), korišćeni su i karanfilić (*Eugenia caryophyllata*), lovor (*Laurus nobilis*), anđelika (*Angelica archangelica*), ehinacea (*Echinacea angustifolia*), divizma (*Verbascum thapsus*), neven (*Calendula officinalis*), Aloa vera (*Aloe barbadensis* Miller) i lišaj *Usnea barbata*, čije su karakteristike date u tabeli 9. Korišćene sirovine su poreklom sa područja Srbije ili zemalja u okruženju (tabela 9).

Biljni materijal i lišaj *U. barbata* sušeni su na vazduhu, u tankom sloju, zaklonjen od direktne sunčeve svetlosti. Osušeni biljni materijal i lišaj *U. barbata* sadržali su 8 - 12 % vlage. Sadržaj vode u sirovinama određivan je primenom volumetrijske titracije prema Karl Fišeru. Sirovina je mlevena i prosejavana do čestica srednjeg prečnika $0,4 \pm 0,1$ mm neposredno pre natkrične ekstrakcije.

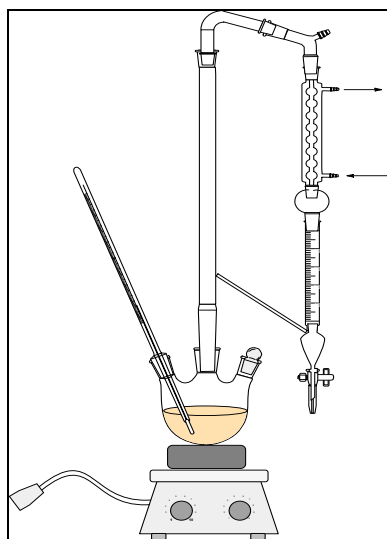
Tabela 9 Sirovine korišćene za ispitivanja

#	Biljna sirovina	Familija	Narodni naziv	Poreklo	Godina sakupljanja	Droga
1	<i>Usnea barbata</i>	Parmeliaceae	Usnea	Negotino na Vardar, okolina Skoplja (Makedonija)	2008, 2010	-
2	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Origano	Zrenjanin-Čenta (Vojvodina, Srbija)	2009	List
3	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	Ruzmarin	Albanija	2005	List
4	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	Žalfija	Hercegovina (BiH)	2005	List
5	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Timijan	Bavanište (Vojvodina, Srbija)	2009	List
7	<i>Angelica archangelica</i>	Apiaceae.	Anđelika	Centralna Srbija	2007	Koren
8	<i>Echinacea angustifolia</i>	Asteraceae	Ehinacea	Centralna Srbija	2007	Nadzemni deo
9	<i>Verbascum thapsus</i>	Scrophulariaceae	Divizma	Centralna Srbija Bavanište (Vojvodina, Srbija)	2007 2009	List Cvet
10	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	Neven	Bavanište (Vojvodina, Srbija)	2009	Cvet
11	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Myrtaceae	Karanfilić	Kanarska ostrva (Španija)	2009	Pupoljci
12	<i>Laurus nobilis</i>	Lauraceae	Lovor	Crna Gora	2007	List
13	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	Asphodelaceae	Aloe vera	Beograd (Srbija)	2007	List

3.2. Različiti postupci izolacije biološki aktivnih etarskih ulja i ekstrakata

3.2.1. Hidrodestilacija po Klevendžeru

Na slici 10 prikazana je aparatura korišćena za laboratorijsko dobijanje etarskog ulja postupkom hidrodestilacije po Klevendžeru. Za hidrodestilacije je korišćeno 50-86 g osušenog i usitnjenog biljnog materijala i 500-800 ml destilovane vode. Na balon (1000 ml), koji je zagrevan pomoću električne obloge, postavljen je hladnjak. Proces destilacije trajao je 4 h, tokom koje je etarsko ulje sakupljano u gornjem, graduisanom delu cevi za merenje predestilisanog ulja. Nakon očitavanja zapremine, izdvojeno etarsko ulje je ispuštano u odmereni stakleni sud sa anhidrovanim Na_2SO_4 . Uzorak je držan u frižideru na 4 °C nekoliko dana. Nakon sušenja, uzorak je korišćen za ispitivanja hemijskog sastava i antibakterijske aktivnosti.



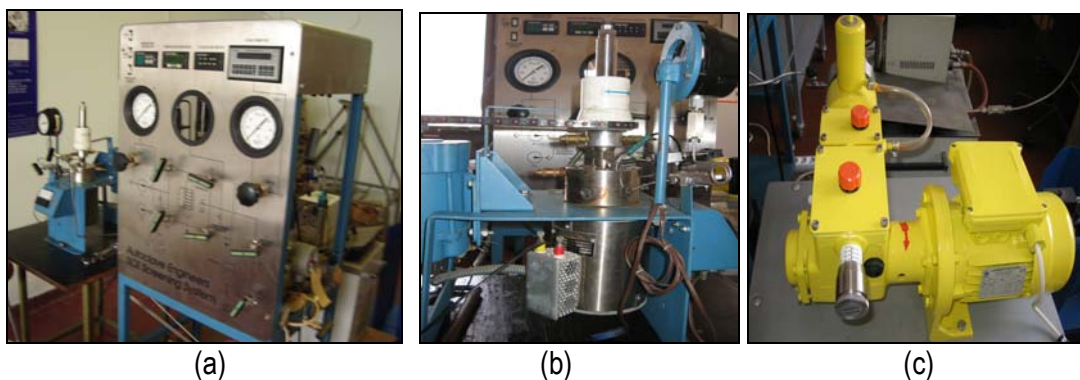
Slika 10 Aparatura za hidrodestilaciju po Klevendžeru

3.2.2. Natkritična ekstrakcija

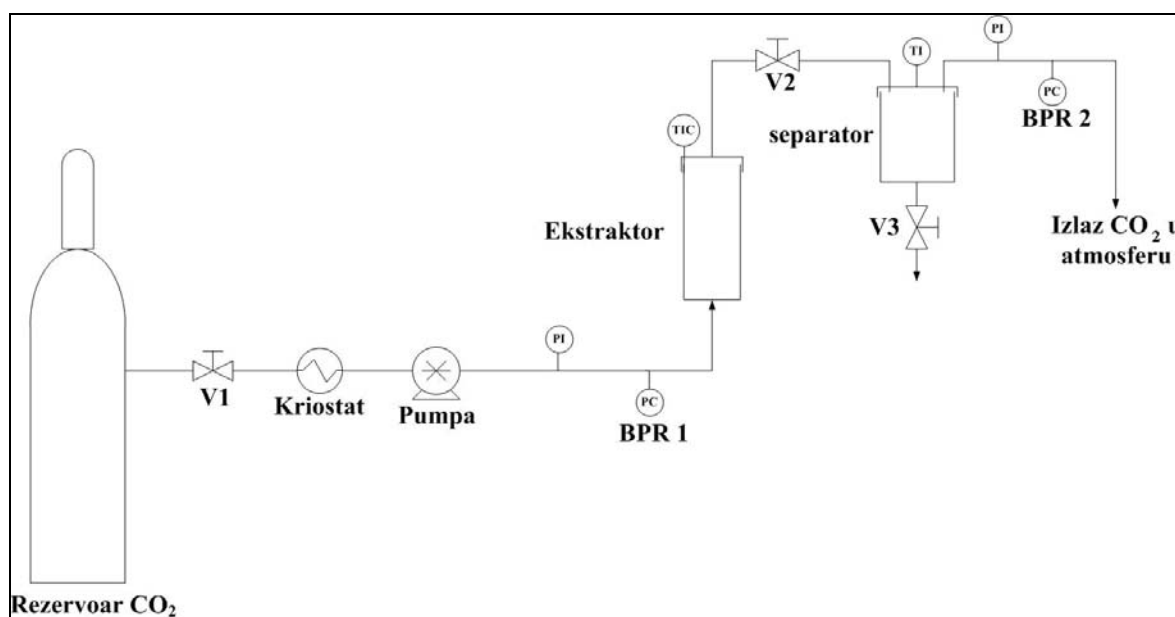
3.2.2.1. Postrojenje za NKE

Za ekstrakcije sa NK CO_2 korišćeno je laboratorijsko postrojenje (Autoclave Engineers SCE Screening System) (slika 11). Uprošćena šema ovog postrojenja prikazana je na slici 12. Ovaj sistem predviđen je za laboratorijska ispitivanja sa šaržama biljnog materijala, uz korišćenje ugljenik(IV)-oksida kao natkritičnog medijuma i najveći dozvoljeni radni pritisak od 41,3 MPa na 238 °C. Tečni ugljenik (IV)-oksid pritiče iz boce sa sifonom, a između izlaza iz boce i pumpe visokog pritiska se hladi u kriostatu, kako bi se sprečilo njegovo isparavanje. Pumpom za tečnosti visokog pritiska (Milton Roy, Francuska) ostvaruje se maksimalni izlazni pritisak od 42 MPa pri protoku od 0,55 l/h. Glava pumpe se dodatno hladi, radi obezbeđenja ravnomernog rada i konstantnog protoka tečne faze. Dva povratna regulatora pritiska (BPR1 i BPR2) se koriste u cilju regulacije pritiska u ekstraktoru i separatoru. Radna zapremina ekstraktora iznosi 150 cm^3 . Ekstraktor je izrađen od nerđajućeg čelika 316SS i opremljen je sa dva grejača radi održavanja neophodne temperature. NK CO_2 napušta ekstraktor i ulazi u separator, gde se promenom pritiska vrši odvajanje rastvarača od rastvorka. Zapremina separatora iznosi 500 cm^3 . Uzorci ekstrakta mogu se uzeti otvaranjem ventila na dnu separatora. Za indikaciju protoka ugljenik(IV)-oksida kroz sistem predviđen je merač protoka. Protok se može

podešavati igličastim ventilom. Ugljenik(IV)-oksid koji napušta separator, nakon prolaska kroz merač protoka, odlazi u atmosferu.



Slika 11 Laboratorijsko postrojenje za NKE (Autoclave Engineers Screening System) (a); ekstraktor (b) i pumpa za tečnosti pod visokim pritiskom (c)



Slika 12 Laboratorijsko postrojenje za NKE (Autoclave Engineers Screening System)

3.2.2.2. Izbor procesnih parametara i uslovi NKE

U tabeli 11 prikazani su ekstrakcioni uslovi za NKE ekstraktivnih materija iz odabranog biljnog materijala. U cilju povećanja efikasnosti NKE (povećanje prinosa ekstrakata za kraće vreme i uz manju potrošnju NK CO₂), pored mehaničkog predtretmana (mlevenje) odabrane sirovine, primenjen je i odgovarajući predtretman biljnog materijala sa NK CO₂. Kod NKE ekstraktivnih materija iz začinskog bilja familije Lamiaceae (ruzmarin, žalfija, timijan, origano) ovaj predtretman se sastojao u izlaganju prethodno usitnjenog biljnog materijala NK CO₂ na pritisku i temperaturi ekstrakcije bez proticanja fluida neposredno pre kontinualne NKE (Zizovic i sar., 2005) U cilju razaranja biljnog tkiva i povećanja efikasnosti ekstrakcije, kod lišaja *U. barbata*, korena anđelike, lista lovora i lista aloe primenjen je predtretman varijacije pritiska nakon kratkog izlaganja biljnog materijala natkritičnom CO₂ (30-60 min u zavisnosti od biljne sirovine). U toku NKE merena je masa izdvojenog ekstrakta i računat maseni prinos ekstrakta (15) u odnosu na specifičnu količinu utrošenog NK CO₂ (kg_{CO2}/kg_{bm}).

$$Y(\%, w / w) = \frac{m_e}{m_{bm}} \cdot 100 \quad (15)$$

Tabela 11 Uslovi NKE

#	Biljna sirovina	Pritisak (MPa)	Temperatura(°C)	Gustina CO ₂ (kg/m ³)
1	<i>Usnea barbata</i>	30	40/60	911/830
2	<i>Origanum vulgare</i>	10	40	630
3	<i>Rosmarinus officinalis</i>	11.5	40	703
4	<i>Salvia officinalis</i>	11.5	40	703
5	<i>Thymus vulgaris</i>	10/11.5	40	630/703
6	<i>Angelica archangelica</i>	15/20	40	781/841
7	<i>Echinacea angustifolia</i>	15/25	40	781/880
8	<i>Verbascum thapsus</i>	15/20/30	40	781/841/911
9	<i>Calendula officinalis</i>	15/20	40/60	781/840
10	<i>Eugenia caryophyllata</i>	10	40	630
11	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	10	40	630

3.2.2.3. Simultana NKE iz biljnih mešavina

Za ispitivanje kinetike i fenomena prenosa mase kod procesa simultane NKE iz dvokomponentnih smeša biljnog materijala korišćeni su osušeni listovi origana i timijana i pupoljci karanfilića. NK CO₂ iz pojedinih biljnih sirovina (origano, timijan i karanfilić), kao i iz smeša karanfilić/origano (C/O) i karanfilić/timijan (C/T), izvedene su na 10 MPa i 40 °C u cilju izolacije natkritičnih ekstrakata bogatih etarskim uljem (mono- i seskviterpenima). Početna masa biljnog materijala je bila 34,5 ± 3,0 g. Usitnjeni i prosejani biljni materijal je izlagan NK CO₂ u trajanju od jednog sata bez proticanja fluida neposredno pre kontinualne ekstrakcije na uslovima ekstrakcije (10 MPa i 40 °C). Izabrani predtretman biljnog materijala primenjen je u skladu sa ranijim istraživanjima (Zizovic i sar., 2005) u cilju povećanja efikasnosti razaranja glandularnih trihoma (sekrecione strukture prisutne u origanu i timijanu).

Ekstrakcije iz origana, timijana i karanfilića, kao i smeša karanfilić/origano i karanfilić/timijan, vođene su do iscrpljivanja biljnog materijala pri čemu su, nakon utroška 94,3 kg CO₂/kg_{bm} (ili nakon 5,0 ± 0,5 h ekstrakcije) utvrđeni totalni prinosi ekstrakata. Maseni protok CO₂ bio je 0,62 ± 0,06 kg/h.

Očekivani ili teorijski prinosi ekstrakata izolovanih simultanom NKE iz C/O i C/T smeša ($y_{\text{theor}}(\text{C/O})$ i $y_{\text{theor}}(\text{C/T})$) izračunati su na osnovu utvrđenih eksperimentalnih ekstrakcionih prinosa iz čistog origana, timijana i karanfilića, kao i masenog udela pojedinih komponenti u ispitivanim dvokomponentim smešama:

$$Y_{\text{theor}}(\text{C/O})(\%, \text{w/w}) = f_{\text{C}} Y_{\text{exp,C}}(\%, \text{w/w}) + f_{\text{O}} Y_{\text{exp,O}}(\%, \text{w/w}) \quad (16a)$$

$$Y_{\text{theor}}(\text{C/T})(\%, \text{w/w}) = f_{\text{C}} Y_{\text{exp,C}}(\%, \text{w/w}) + f_{\text{T}} Y_{\text{exp,T}}(\%, \text{w/w}) \quad (16b)$$

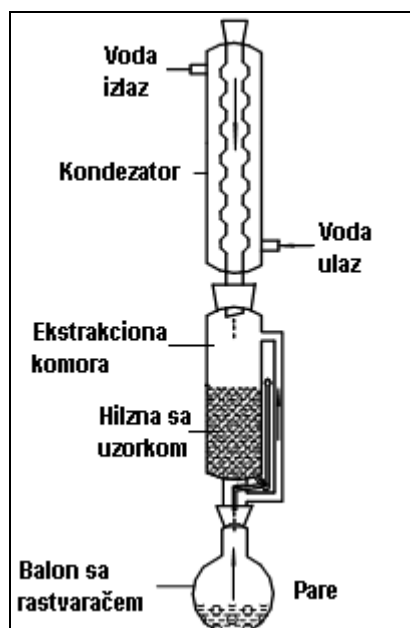
gde su: f_{C} , f_{O} i f_{T} - maseni udeli karanfilića, origana i timijana u početnom biljnom materijalu, a $y_{\text{exp,C}}$, $y_{\text{exp,O}}$ i $y_{\text{exp,T}}$ - eksperimentalne vrednosti prinosa ekstrakata iz čistog karanfilića, origana i timijana.

3.2.3. Ekstrakcija sa etanolom

Za ekstrakcije u Sokslet aparaturi (slika 13) i za ultrazvučne ekstrakcije korišćeni su koncentrovani etanol (96 %) i 70 % vodeni rastvor etanola (Zorka, Šabac). Pored Sokslet i ultrazvučne ekstrakcije, za izolaciju ekstrakata *U. barabata*, korišćeni su i postupci maceracije (1:5) i perkolacije (1:2) sa 70 % etanolom.

3.2.3.1. Ekstrakcija po Soksletu

Za dobijanje ekstrakata pomoću ekstrakcije po Soksletu (slika 13) korišćeno je 50 g usitnjenih listova timijana i origana i cvetova divizme, odnosno 178 g korena anđelike, 52,8 g nadzemnog dela divizme, 81,7 g nadzemnog dela ehinacee i 48,0 g cvetova nevena. Biljni materijal je stavljan u celuloznu hilznu (ili ukoliko je materijal voluminozan u filter vrećice za čaj), koja se postavlja u ekstrakcionu komoru Soksletovog ekstraktora. Soksletov ekstraktor se postavlja na balon u koji je prethodno dodato 600 ml etanola. Na vrhu ekstrakcione komore nalazi se kondenzator. Rastvarač je zagrevan preko električne obloge do temperature ključanja. Pare rastvarača se penju uz destilacionu granu i ulaze u komoru za ekstrakciju. Kondenzator omogućava da se para rastvarača hladi i kapljice vraćaju u ekstrakcionu komoru, natapajući čvrsti materijal.



Slika 13 Aparatura po Soksletu

Ekstrakciona komora, u kojoj se nalazi čvrst materijal, puni se toplim rastvaračem koji rastvara željene komponente. Istog trenutka kada se komora napuni, ona počinje da se prazni preko padine (grane povezane sa destilacionom komorom), pri čemu se rastvarač vraća u destilacioni balon. Ovaj ciklus se ponavlja do obezbojavanja rastvora koje se dešava nakon iscrpljenja biljne sirovine. Tokom svakog ciklusa, deo komponenti se rastvara u rastvaraču. Nakon više ciklusa željeno jedinjenje se koncentriše u destilacionom balonu. Nakon ekstrakcije, rastvarač se odvaja od ekstrakta uparavanjem pomoću rotacionog vakuum uparivača (slika 14).

U cilju ispitivanja kinetike Sokslet ekstrakcije iz osušenih listova origana, timijana i cveta divizme, nakon svakog persefoniranja (4-6 po eksperimentu), uzimano je po 5 ml uzorka iz kojih je rastvarač uklanjan pomoću rotacionog vakuum uparivača (slika 14), merena masa ekstrakta i računat prinos ekstrakta pomoću jednačine (15).



Slika 14 Rotacioni vakuum uparivač

3.2.3.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Za ultrazvučne ekstrakcije (UZE) sa etanolom korišćeno je ultrazvučno kupatilo (Bandelin Sonorex RK 52, BANDELON electronic, 35 kHz, 60 W) sa radnom zapreminom od 1,8 l unutrašnjih dimenzija 150 mm × 140, mm × 100 mm (slika 15). Mase biljnog materijala korišćenog za UZE, kao i korišćeni rastvarači, vremena ekstrakcije i odnosi biljne sirovine i rastvarača (hidromoduli) dati su u tabeli 12.



Slika 15 Ultrazvučno kupatilo

Tabela 12 Mase biljnog materijala korišćenog za UZE

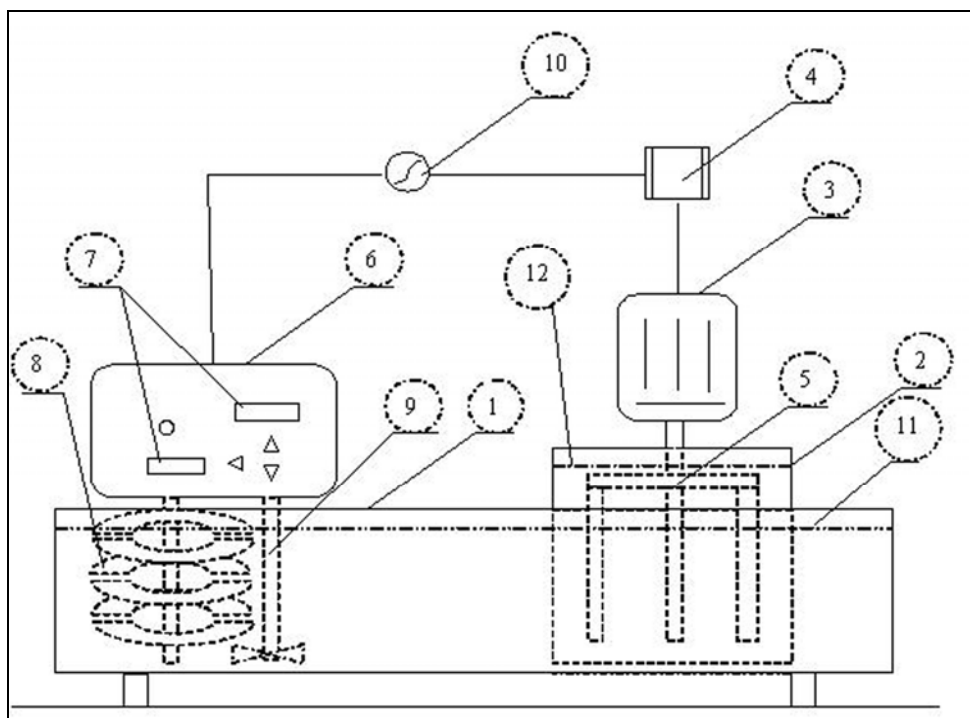
Biljni materijal	Masa (g)	Rastvarač ^a	Vreme sonifikacije (min)	Temperatura (°C)	Hidromodul ^b
Aloa	5,0	A	30	sobna temperat.	1:40
Lovor	5,0	A	30	sobna temperat.	1:40
Neven	5,0	A	45	sobna temperat.	1:80
Anđelika	110,0	A	45	sobna temperat.	1:3
Ehinacea	76,6	A	45	sobna temperat.	1:6,5
Divizma, nadz. deo	51,9	A	45	sobna temperat.	1:8
Divizma, cvet	20,0	B	90	40	1:12
Timijan	20,0	B	90	40	1:12
Origano	20,0	B	90	40	1:12

^a A - Koncentrovani etanol, B - 70 % vodeni rastvor etanola; ^b Odnos mase biljnog materijala i zapremine rastvarača (w/v)

Pre početka procesa ekstrakcije, usitnjeni biljni materijal je stavljan u odgovarajući stakleni sud (erlenmajer ili balon sa okruglim dnom) i prelivan datim rastvaračem. Nakon sonikacije, uzorci su filtrirani i rastvarač je uklanjnjan uparavanjem u rotacionom vakuum uparivaču (slika 14). U cilju ispitivanja kinetike UZE kao biljni materijal korišćeni su osušeni i usitnjeni listovi origana, timijana i cveta divizme. U stakleni balon sa šlifovanim zatvaračem stavljeno je 20,0 g biljnog materijala u filter vrećice koje su stavljene u stakleni balon od 500 ml, a zatim prelivane sa 240 ml etanola. Sonikacija uzorka vršena je u ciklusima: dva puta u trajanju od po 5 min, tri puta u trajanju od po 10 min i 3 puta u trajanju od po 15 min na temperaturi od 40 °C. Posle svakog perioda sonikacije uzimano je po 4 ml uzorka, koji su uparavani u rotacionom vakuum uparivaču. Srednja temperatura uparavanja smeše etanola i vode iznosila je 60 °C. Uparavanje je završeno kada su svi tragovi etanola predestilisani, nakon čega je u balonu zaostao smolast ekstrakt.

3.2.3.3. Ekstrakcija sa etanolom na poluindustrijskom nivou

Za ispitivanje kinetike ekstrakcije sa organskim rastvaračem na poluindustrijskom nivou korišćeni su osušeni i usitnjeni listovi timijana (*Thymus vulgaris*), čiji su ekstrakti pokazali jako antibakterijsko dejstvo. Uprošćena šema korišćenog postrojenja za šaržne procese ekstrakcije na poluindustrijskom nivou prikazana je na slici 16.



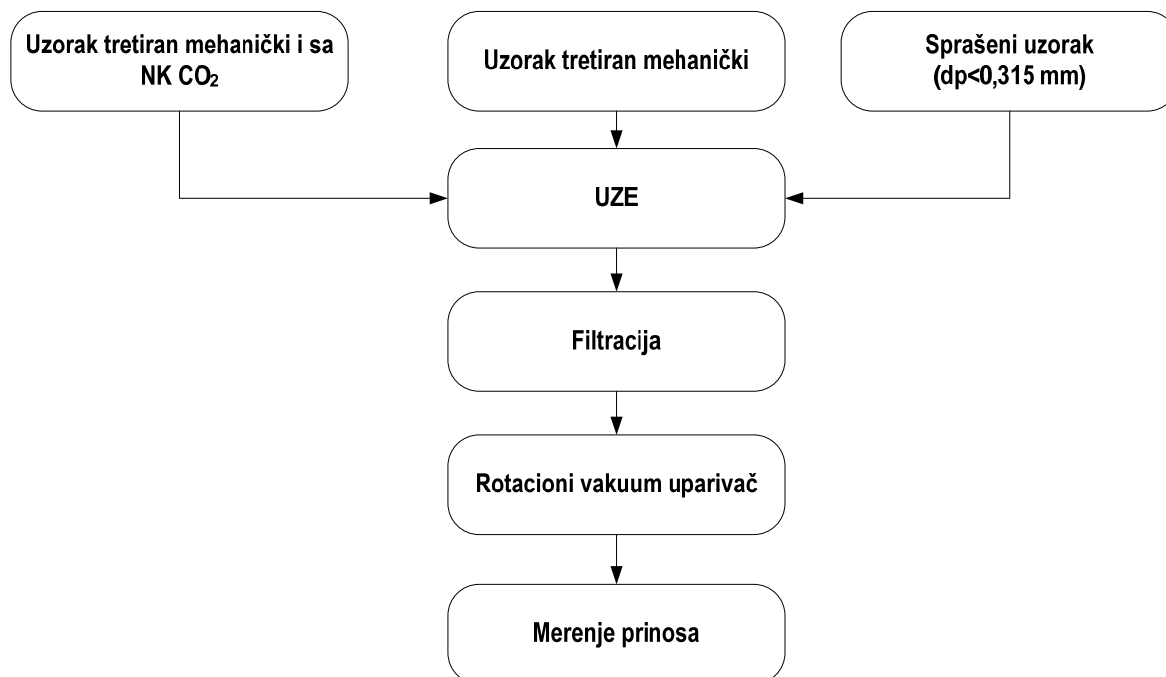
Slika 16 Poluindustrijsko postrojenje za ekstrakciju biljnog materijala

(1 - vodenno kupatilo; 2 - ekstrakcioni sud; 3 - elektromotor; 4 - regulator frekvencije; 5 - mešač; 6 - jedinica za termoregulaciju; 7 - uređaj za indikaciju i kontrolu temperature; 8 - grejači; 9 - mešač za vodenno kupatilo; 10 - izvor električne energije; 11 - nivo vode u kupatilu; 12 - nivo rastvarača i biljnog materijala u ekstrakcionom sudu)

Usitnjeni biljni materijal (600 g) i 7,2 l 70% etanola (odnos mase rastvarača i biljnog materijala 12:1) dodati su u ekstrakcioni sud. Ekstrakcije su izvedene na temperaturama 40 °C i 80,5 °C ($\pm 0,5$ °C) (PSE1 i PSE2, respektivno) u trajanju od 2 h, uz konstantno mešanje pri brzini od 60 obrt/min. U određenim vremenskim intervalima (10, 30, 60, 120, 180, 240 min) iz suda je uzimano 30 ml rastvora. Uzorci su filtrirani, nakon čega je vršeno uklanjanje rastvarača uparavanjem u rotacionom vakuum uparivaču do konstantne mase ekstrakta. Merena je diferencijalna masa ekstrakta i računat prinos ekstrakta na osnovu jednačine (15).

3.2.4. Kombinovane metode ekstrakcije

Za potrebe uporedne analize energetske efikasnosti različitih tehnika ekstrakcije ispitane su NKE, UZE, kao i ultrazvučna ekstrakcija sa predtretmanom biljnog materijala sa NK CO₂ (NKE-UZE) iz osušenih i usitnjenih listova aloe, lovora i korena anđelike (slika 17). Predtretman se sastojao u kratkom izlaganju biljnog materijala NK CO₂ (30 min) na uslovima ekstrakcije (tabela 13) i nagle dekompresije do uslova u boci sa CO₂ (sobna temperatura, 6 MPa). Ovakav predtretman je, u skladu sa prethodnom ispitivanjima (Glisic i sar., 2008; Stamenic i sar., 2008, 2010), primenjen u cilju razaranja biljnog tkiva i povećanja efikasnosti UZE sa etanolom.



Slika 17 Šematski prikaz UZE i NKE-UZE postupka iz materijala sa različitom veličinom čestica

Tabela 13 Uslovi predtretmana listova aloe, lovora i korena anđelike sa NK CO₂

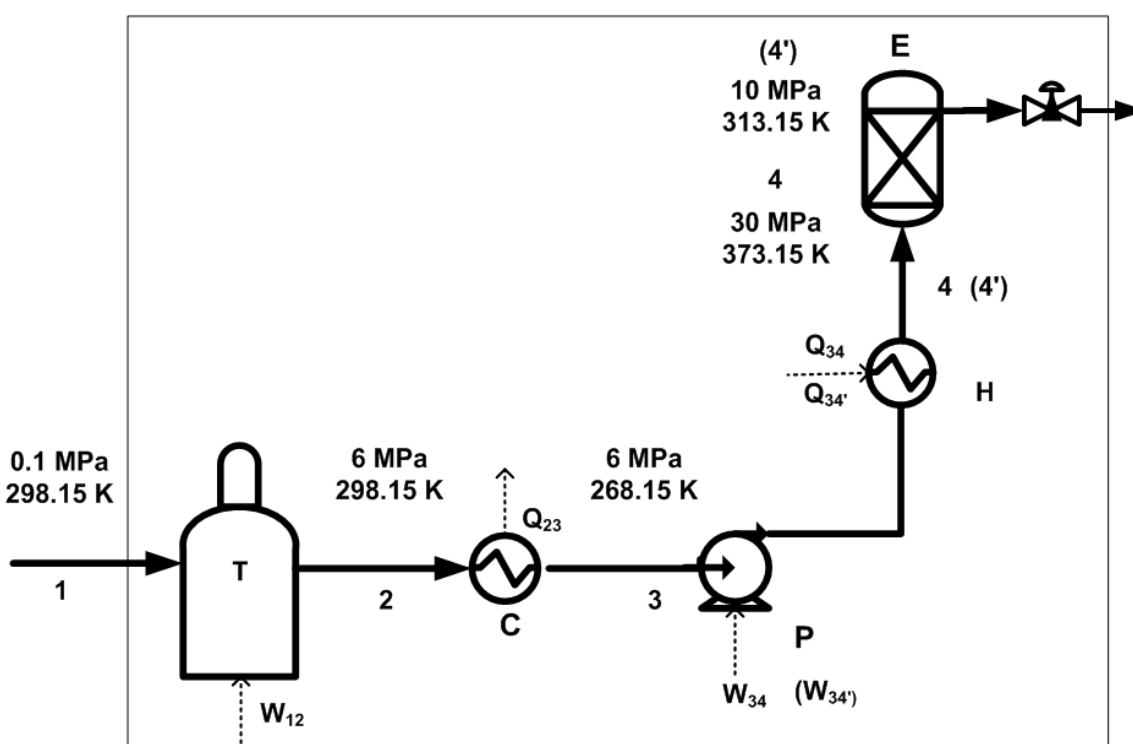
Biljni materijal	m (g)	d _p (mm)	p (MPa)/t (°C)
Aloa	5,0	0,4/prah (<0,315 mm)	10/40
Lovor	4,5	0,4	10/40
Anđelika	14,0	0,4/prah (<0,315 mm)	20/40

3.2.5. Izračunavanje termodinamičkih parametara za eksergijsku analizu

Ispitivanje i poređenje energetske efikasnosti korišćenih metoda ekstrakcije vršeno je primenom eksergijske analize u cilju izračunavanja maksimalnog korisnog rada i gubitaka eksergije. Termodinamički parametri CO₂ (gasoviti, tečni i natkritični), koji je korišćen u procesu NKE (slika 18), dati su u tabeli 14.

Tabela 14 Specifične entalpije za CO₂ (kJ/kg) (Temperature Entropy (T, s)-Diagram for CO₂, CARBO-Kohlensäurewerke GmbH&Co.KG) (Ivanovic i sar., 2009)

	Atmosfera	Tank	Pumpa	NKE	NKE
	1	2	3	4	4'
T (K)	298,15	298,15	268,15	313,15	373,15
p (MPa)	0,1	6	6	10	30
h (kJ/kg)	1000	910	682	807	883
s (kJ/kgK)	5,97	5	4,25	4,62	4,75
v (m ³ /kg)	0,5	0,0053	0,00103	0,0016	0,0015



Slika 18 Tehnološka šema za proces NKE sa ulaznim i izlaznim tokovima CO₂

Termodinamički parametri za koncentrovani etanol i 70 % vodeni rastvor etanola korišćenih za SE i UZE dati su u tabeli 15.

Tabela 15 Termodinamički parametri za 96 % etanol i 70 % vodeni rastvor etanola

Termodinamički parametri:	70 % etanol	96 % etanol
$\Delta_{vap} h^{\ominus}$ (kJ/kg)	1128,2	837
$\Delta_{vap} s^{\ominus}$ (kJ/kgK)	3,190	2,381
c_p (kJ/kgK)	2,962	2,44
ρ (m ³ /kg)	844,7	808,5

Gde su $\Delta_{vap}h^\ominus$ i $\Delta_{vap}s^\ominus$ standardna entalpija i entropija isparavanja rastvarača. Za smešu etanola i vode (70:30) ove vrednosti su izračunate pomoći Li-Keslerove korelacije date jednačinom (17):

$$\Delta_{vap}h^\ominus = RT_c [6,09648 - 1,2886 \cdot T_r + 1,0167 \cdot T_r^2 + \omega(15,6875 - 13,472 \cdot T_r + 2,615 \cdot T_r^2)] \quad (17)$$

gde je T_r - redukovana temperatura (T_b/T_c), T_b - normalna temperatura ključanja u K, R - univerzalna gasna konstanta, 8,314 kJ/kgK, dok je $\Delta_{vap}h$ u kJ/kg. Kritična temperatura, T_c i faktor acentričnosti smeše ω dobijaju se iz sledećih jednačina (18-20) korišćenjem azeotropskih udela x_i (Demirel, 1999; Reid i sar., 1988):

$$T_c = \sum_{i=1}^c \phi_i T_{ci} \quad (18)$$

$$\phi_i = \frac{x_i V_{ci}}{\sum_{i=1}^c x_i V_{ci}} \quad (19)$$

$$\omega = \sum_{i=1}^c x_i V_{ci} \quad (20)$$

gde je c - broj komponenata smeše. Standardna entropija isparavanja i specifični toplotni kapacitet se dobijaju iz:

$$\Delta_{vap}s^\ominus = \frac{\Delta_{vap}h^\ominus}{T_b} \quad (21)$$

$$c_p = \sum_{i=1}^c x_i c_{pi} \quad (22)$$

Za izračunavanje maksimalnog korisnog rada i gubitka eksergije za ekstrakcije sa etanolom (UZE i SE) korišćene su sledeće jednačine (Đorđević i sar., 2003; Ivanovic i sar., 2009; Sievers i Eggers, 1996):

$$I_{EV} = \Delta_{vap}h^\ominus - T_0 \cdot \Delta_{vap}s^\ominus + mc_p(T_b - T_0) \quad (23)$$

$$W_{max,EV} = \Delta_{vap}h^\ominus - T_0 \cdot \Delta_{vap}s^\ominus \quad (24)$$

Za izračunavanje maksimalnog korisnog rada i gubitka eksergije za NKE (Slika 17) korišćene su sledeće jednačine:

$$W_{max} = -\Delta E = h_1 - h_4 - T_0(s_1 - s_4) \quad (25)$$

$$I = [h_1 - h_4 - T_0(s_1 - s_4)] + [Q_{23}(1 - \frac{T_0}{T}) + Q_{34}(1 - \frac{T_0}{T})] - (W_{12} - W_{34}) \quad (26)$$

Zapreminski rad koji se troši na sabijanje CO₂ u boci (adijabatski proces, $dQ=0$), W_{12} i rad komprimovanja do željenog pritiska u ekstraktoru, W_{34} , dati su izrazima (27) i (28):

$$W_{12} = p_1(v_2 - v_1) \quad (27)$$

$$W_{34} = p_3(v_4 - v_3) \quad (28)$$

Odvedena toplote (hladjenje u kriostatu) (izobarski proces, $p_2 = p_3$) Q_{23} i dovedena toplota u toku grejanja ekstraktora Q_{34} izračunavaju se pomoću jednačina (29) i (30):

$$Q_{23} = \Delta h_{23} = h_2 - h_3 \quad (29)$$

$$Q_{34} = \Delta h_{34} - V\Delta p_{34} \quad (30)$$

Za proces NKE-UZE promena eksergije i maksimali korisni rad, kao i njihove vrednosti po 1 kg, izračunati su korišćenjem jednačina (31)-(34).

$$I = I_{SCE} + I_{EV} \quad (31)$$

$$W_{\max} = W_{\max,SCE} + W_{\max,EV} \quad (32)$$

$$W_{\max,e} = W_{\max} \frac{m_{\text{solvent}}}{m_{\text{ekstrakt}}} \quad (33)$$

$$I_e = I \frac{m_{\text{solvent}}}{m_{\text{ekstrakt}}} \quad (34)$$

3.3. Matematičko modelovanje procesa ekstrakcije

3.3.1. Modeli korišćeni za simulaciju procesa NKE

3.3.1.1. Matematički model Sovove

Najviše primenjivani model za modelovanje procesa NKE iz biljnog materijala je predložila Sovova (1994a,b). Univerzalnost ovog modela je u njegovoj primenljivosti za NKE iz bilo kog biljnog materijala i na ekstrakciju kako lakših etarskih frakcija, tako i težih frakcija. Takođe, uz određene uslove, ovaj model pruža i analitička rešenja, što je svakako doprinelo njegovij širokoj upotrebi.

Model posmatra klipno proticanje natkritičnog rastvarača kroz fiksiran sloj mlevenog biljnog materijala. Materijalni bilans za deo cevnog reaktora se može predstaviti sledećim jednačinama:

$$-\rho_s(1-\varepsilon)\frac{\partial x}{\partial t} = J(x,y) \quad (35a)$$

$$\rho\varepsilon\frac{\partial y}{\partial t} + \rho u\frac{\partial y}{\partial h} = J(x,y) \quad (35b)$$

gde je: u - brzina strujanja CO₂ kroz sloj biljnog materijala (m/s), ε - poroznost biljnog sloja, ρ - gustina natkritičnog fluida (kg/m³), ρ_s - gustina biljnog materijala (kg/m³), x - kg rastvorljivih supstanci po kg nerastvorljive čvrste faze i bezdimenziona veličina, y - kg rastvorljivih supstanci po kg rastvarača i bezdimenziona veličina, h - aksijalna koordinata ekstraktora (m), i J - fluks prenosa mase (kg/m³s).

Set jednačina (35) rešava se za granične uslove :

$$x(h, t=0) = x_0 \quad (36)$$

$$y(h=0, t) = 0 \quad (37)$$

Osnovna postavka modela je da je deo ćelija (hipotetičkih jedinica u kojima je sadržana rastvorljiva supstanca tj. ulje) otvoren ili razoren procesom mlevenja. Na početku procesa ekstrakcije ukupna količina ulja u biljnom materijalu O , se može podeliti na lako dostupnu količinu ulja, P , i količinu teže dostupnog ulja koja se nalazi unutar netaknutih ćelija, K

$$O=P+K \quad (38)$$

Količina ulja na početku procesa ekstrakcije se može predstaviti kao:

$$x(t=0) = x_0 = \frac{O}{N} = x_p + x_k = \frac{P}{N} + \frac{K}{N} \quad (39)$$

gde je N , masa nerastvorne čvrste biljne materije u natkritičnom fluidu.

Da bi se predstavila analitička rešenja sistema jednačina (35), potrebno je uvesti bezdimenzione promenljive r , Y , z , τ :

$$r = \frac{x}{x_k}, Y = 1 - \frac{y}{y_r}, z = \frac{k_f a_0}{u} h, \tau = \frac{k_f a_0 \rho y_r}{(1-\varepsilon)\rho_s x_k} t \quad (40)$$

gde je k_f - koeficijent prenosa mase u filmu NK CO₂ (m/s), a_0 - specifična površina biljnih čestica (m⁻¹), y_r - ravnotežna rastvorljivost ulja u CO₂ (kg ulja/ kg CO₂) i x_k - granična vrednost kg rastvorljivih supstanci po kg nerastvorljive čvrste faze. Veličina x_k se može objasniti i na sledeći način: kada pri iscrpljivanju biljnog materijala lako dostupnim uljem, masa rastvorljivih supstanci po masi nerastvorljive čvrste faze opadne na vrednost x_k , menja se mehanizam prenosa mase, a jednačina za fluks prenosa mase J ima oblik:

$$J(x > x_k, y) > J(x \leq x_k, y) \quad (41a)$$

$$J(x > x_k, y) = k_f a_0 \rho (y_r - y) \quad (42b)$$

$$J(x \leq x_k, y) = k_s a_0 \rho_s x \quad (43c)$$

Jednačine (35) i granični uslovi (36) i (37), uvođenjem bezdimenzionih promenljivih (40), dobijaju novu formu:

$$\frac{dr}{d\tau} = \frac{dY}{dz} = -J^*(r, Y) \quad (44)$$

$$r(z, \tau = 0) = r_0 \quad (45)$$

$$Y(z = 0, \tau) = 1 \quad (46)$$

gde je:

$$J^*(r, Y) = J(x, y) / (k_f a_0 \rho y_r) \quad (47)$$

Lako dostupno ulje iz razorenih biljnih ćelija se prvo ekstrahuje, a zatim sledi sporija ekstrakcija ulja iz mlevenjem netaknutih ćelija. Proces ekstakcije se može podeliti na tri perioda: brz period, prelazni period i spor period. U toku prvog, tzv. brzog perioda brzina ekstakcije je limitirana rastvorljivošću lako dostupnog ulja. Na kraju ovog perioda čestice biljnog materijala na ulazu u reaktor su oslobođene lako dostupnim uljem i počinje ekstrakcija teže dostupnog ulja. Međutim, čestice na kraju pakovanog sloja su još uvek bogate lako dostupnim uljem. Tada je ekstrakcija u tzv. "prelaznom periodu". Kada je celokupna količina dostupnog ulja iscrpljena iz pakovanog, biljnog sloja nastupa treći, spori period ekstakcije, gde ukupnu brzinu procesa određuje difuzija unutar čestice.

Udeo ekstrakta ukupne mase biljne sirovine koji se ekstrahuje tokom prvog, drugog i trećeg ekstakcionog perioda je predstavljen kao:

$$e = \left. \begin{cases} \left(x_k \frac{\tau}{Z} \right) [1 - \exp(-Z)] & \text{for } \tau < \tau_m \\ \left(\frac{x_k}{Z} \right) [\tau - \tau_m \cdot \exp(z_w - Z)] & \text{for } \tau_m \leq \tau < \tau_n \\ x_0 - \left(\frac{x_k}{kZ} \right) \ln \{ 1 + [\exp(r_0 kZ) - 1] \exp[k(\tau_m - \tau)] / r_0 \} & \text{for } \tau \geq \tau_n \end{cases} \right\} \quad (48)$$

gde je:

$$Z = \frac{k_f a_0 H}{u}, \quad k = \frac{k_s \rho_s x_k}{k_f \rho y_r \tau}, \quad \tau_m = r_0 - 1, \quad \tau_n = \frac{1}{k} \ln \frac{1 + \tau_m e^{r_0 kZ}}{1 + \tau_m} \quad (49)$$

$$z_w = \frac{1}{kr_0} \ln \frac{r_0 \exp[k(\tau - \tau_m)] - 1}{r_0 - 1} \quad \text{za } \tau_m \leq \tau \leq \tau_n \quad (50)$$

Parametri k_f i k_s predstavljaju koeficijente prenosa mase rastvorka, a_0 je specifična međufazna površina, H je visina pakovanog sloja biljnog materijala, ρ je gustina CO_2 , ρ_s je gustina biljnog materijala, a ε je poroznost pakovanog sloja. Koeficijent ukupnog prenosa mase u CO_2 fazi je izračunat i korelisan sa površinskom brzinom natkričnog fluida U/ε (Sovová i sar., 1994b):

$$k_f a_0 = 1.55(U / \varepsilon)^{0.54} \quad (51)$$

3.3.1.2. Model zasnovan na analogiji sa prenosom toplote

Na osnovu modela koji su predložili Bartle i sar. (1990), a koji su kasnije koristili Reverchon i sar. (1993, 1994) i Hong i sar. (1990), ekstrakciona kriva je podeljena na dva perioda: prvi deo predstavlja period ekstrakcije konstantne brzine ekstrakcije, nakon koga sledi period tzv. spore ekstrakcije u kome je brzina limitirana otporom prenosu mase rastvorka u čvrstoj fazi. Za opisivanje procesa nestacionarnog prenosa mase u periodu spore ekstrakcije ovaj model koristi drugi Fikov zakon, čije je analitičko rešenje dato jednačinom (52):

$$\frac{m(t)}{m_0} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-Dn^2 \pi^2 t}{r^2}\right) \quad (52)$$

Ovaj model je korišćen za izračunavanje efektivne difuzivnosti u čvrstoj fazi D .

3.3.1.3. Matematičko modelovanje na nivou sekrecione strukture

Matematičko modelovanje procesa na nivou sekrecione strukture, tj. na mikro nivou, ima za cilj da objasni fenomene karakteristične za proces ekstrakcije iz određenog tipa sekrecione strukture, uzevši pri tome u obzir njeno ponašanje tokom ekstrakcionog procesa, odnosno uticaj rastvarača i uslova ekstrakcije na biljno tkivo i sekrecione strukture. Ovakav pristup zahteva poznavanje fiziologije biljaka i primenu elektronske mikroskopije, radi detektovanja uticaja ekstrakcionog procesa i određivanja dimenzija sekrecionih struktura. Rezultat ovakvog posmatranja je razjašnjavanje fenomena na mikro nivou i iznalaženje optimalnog načina izvođenja procesa za svaki tip sekrecione strukture.

Materijalni bilans za natkričnu fazu u ekstraktoru, za izotermni i izobarski proces, može se napisati u obliku (Žižović, 2006):

$$\frac{\partial c^{sf}}{\partial t} = D_l \frac{\partial^2 c^{sf}}{\partial x^2} - u \frac{\partial c^{sf}}{\partial x} + ST \quad (53)$$

gde je: c^{sf} - koncentracija etarskog ulja u natkričnoj fazi, D_l - koeficijent aksijalne disperzije, u - površinska brzina natkričnog fluida, i ST - član izvora koji opisuje prenos mase etarskog ulja iz određenog tipa sekrecione strukture u natkričnu fazu. Etarsko ulje predstavljeno je pseudokomponentom.

Odgovarajući početni i granični uslovi su:

$$t = 0, \quad 0 \leq x \leq L, \quad c^{sf} = 0 \quad (54a)$$

$$t > 0, \quad x = 0, \quad c^{sf} = 0 \quad (54b)$$

$$t > 0, \quad x = L, \quad \frac{\partial c^{sf}}{\partial x} = 0. \quad (54c)$$

Član izvora, ST , zavisi od lokacije etarskog ulja unutar biljnog materijala, odnosno od njegove sekretorne strukture. Iscrpna istraživanja u skorijoj prošlosti rezultovala su saznanjima o postojanju sekretornih struktura koje su karakteristika određene familije biljaka, a čiji je proizvod etarsko ulje. Identifikovane sekretorne strukture su glandularni trihomi, sekretorne cevčice, sekretorne ćelije i sekretorne šupljine (Svoboda i Svoboda, 2000). Za modelovanje NKE iz biljnih vrsta familije Lamiaceae u kojima se sekundarni metaboliti sintetišu u glandularnim trihomima, izvorni član za slučaj NKE sa predtretmanom je dat izrazom (55) (Žižović, 2006):

$$ST = N\theta ak(c^* - c^{sf}) + N(1 - \theta)a_{nd} \frac{3}{R_{nd}} D_m (c - c^{sf}) \quad (55)$$

pri čemu je:

$$\theta = \frac{\phi N + (1 - \phi)\varphi N}{N} \quad (56)$$

gde je : N - ukupan broj trihoma, D_m - difuzivnost ulja u nenapukloj, istegnutoj membrane trihoma, k_f - koeficijent prenosa mase, c^* - ravnotežna koncentracija etarskog ulja u NK CO₂ na međufaznoj površini napukli trihom-natkritični fluid, c - koncentracija etarskog ulja u nerazorenom trihomu, R_{nd} - prečnik nerazorenog trihoma u kojem se nalazi etarsko ulje zasićeno sa CO₂ jednak prečniku uljne sfere u trenutku pucanja trihoma, $a_{nd} = \frac{4\pi R_{nd}^2}{V_\varepsilon}$ - specifična površina netaknutih trihoma u kojima je ulje zasićeno sa CO₂ data

po zapremini natkritičnog fluida (konstantna tokom ekstrakcije), $a = \frac{4\pi R^2}{V_\varepsilon}$ - specifična površina razorenih

trihoma po zapremini natkritičnog fluida i R - prečnik uljne sfere razorenog trihoma, koji je funkcija vremena i položaja u ekstraktoru. ϕ , u izrazima (55) i (56), predstavlja udeo trihoma razorenih mlevenjem biljnog materijala, φ je udeo trihoma koji nisu razoreni mlevenjem već u toku izlaganja biljnog materijala NK CO₂, a θ predstavlja udeo trihoma razorenih mlevenjem i izlaganjem biljnog materijala natkritičnom fluidu.

Pri definisanju matematičkog modela na nivou sekrecionih struktura za modelovanje NKE iz biljnih vrsta su kojima se ulje nalazi u glandularnim trihomima usvojene su sledeće pretpostavke (Zizovic, 2006):

- Proces je izoterman i izobaran i osobine natkritičnog fluida su konstantne.
- Protok natkritičnog fluida kroz ekstraktor je konstantan.
- U ekstraktoru postoji aksijalno mešanje natkritičnog fluida.
- Etarsko ulje je predstavljeno pseudokomponentom.
- Trihomi su sferičnog oblika. Srednji prečnik je određen SEM analizom i iznosi 50 μm.
- Ukupni udeo razorenih trihoma u toku predtretmana, θ (jednačina 56) jednak je zbiru udela trihoma koji biva razoren mlevenjem, ϕ i udela trihoma koji naknadno popuca u toku izlaganja biljnog materijala NK CO₂ bez proticanja fluida neposredno pre kontinualne NKE, $(1 - \phi)\varphi$.
- U toku izlaganja biljnog materijala NK CO₂, dolazi do njegovog prodiranja kroz membranu trihoma i rastvaranja u ulju usled čega dolazi do povećanja zapremine uljne faze i istežanja membrane trihoma.
- Nakon što je postignuta ravnoteža između NK CO₂ i CO₂ rastvorenog u trihomima netaknutim procesom mlevenja, deo ovih trihoma puca zbog istežanja membrane i njihov sadržaj ulja postaje lako dostupan za NK CO₂.
- Proces pucanja trihoma usled istežanja membrane je istovremen za celu frakciju trihoma koji će podleći razaranju bez obzira na njihovu poziciju u ekstraktoru.
- Uljna faza svakog trihoma razorene opne zadržava sferičan oblik i zasićena je sa CO₂. Tokom procesa ekstrakcije količina ulja u razorenom trihomu se smanjuje, odnosno smanjuje se zapremina uljne sfere, što je funkcija vremena i položaja u ekstraktoru.
- Koncentracija etarskog ulja u uljnoj sferi razorenog trihoma je konstantna tokom ekstrakcije i jednaka je koncentraciji uljne faze zasićene sa CO₂.

- l) Difuzija u filmu oko uljne faze kontroliše proces ekstrakcije koji sledi
 m) Preostali deo trihoma $(1-\phi)(1-\varphi)$ ostaje netaknut do kraja procesa ekstrakcije, ali usled istezanja membrana postaje propusna i spor proces ekstrakcije iz netaknutih trihoma počinje. Difuzija ulja kroz membranu kontroliše ovaj proces. Proces je spor i zapremina trihoma ostaje ista do kraja procesa.

Pošto ulje razorenog trihoma postaje lako dostupno za NK CO₂, glavni otpor ekstrakcionom procesu je difuzija kroz film koji okružuje uljnu sferu, tako da se smanjenje zapremine uljne sfere razorenog trihoma može definisati sledećom jednačinom:

$$\frac{d(c_{sat} V_t)}{dt} = 4\pi R^2 k_f (c^* - c^{sf}) \quad (57)$$

gde je: c_{sat} - koncentracija etarskog ulja u razorenom trihomu koja je konstantna tokom ekstrakcije i jednaka koncentraciji uljne faze zasićene sa CO₂, a V_t - zapremina uljne sfere koja je data jednačinom:

$$V_t = \frac{4}{3} \pi R^3 \quad (58)$$

Prema jednačinama (59) i (60), R se može dobiti iz:

$$-\frac{dR}{dt} = \frac{k_f}{c_{sat}} (c^* - c^{sf}) \quad (59)$$

sa početnim uslovom $R = R_{nd}$ u trenutku pucanja trihoma i početka ekstrakcije ($t = t_d$).

Nakon što ulje u trihomima koji ostaju celi do kraja procesa NKE postane zasićeno sa CO₂, počinje spor proces difuzije ulja sa natkritičnim rastvaračem kroz istegnutu membranu ka masi fluida. Difuzija kroz membranu kontroliše proces ekstrakcije iz netaknutih trihoma, a promena koncentracije ulja u netaknutim trihomima može se izračunati iz materijalnog bilansa za trihom pod pretpostavkom da je protok kroz nerazorenu membranu konstantan.

$$-\frac{dN}{dt} = 4\pi r^2 D_m \frac{dc}{dr} = const. \quad (60)$$

gde je N - broj molova.

U slučaju NKE iz biljnog materijala u kome se sekundarni metaboliti nalaze u sekretornim šuplinama i ćelijama u slučaju kada je $d_c < d_p$ (karanfilić), izvorni član se izračunava na sledeći način (Žižović, 2006):

$$ST = a_R M P k (c^* - c^{sf}) + M(1-P) a_c K (c - c^{sf}) \quad (61)$$

gde je k_f - koeficijent prenosa mase u filmu NK CO₂ oko čestice, c^* - ravnotežna koncentracija etarskog ulja u NK CO₂ na graničnoj površini natkritični fluid-etarsko ulje, c - koncentracija ulja u netaknutoj sekretionoj

strukturi, $a_R = \frac{d_R^2 \pi}{V_\varepsilon}$ - specifična površina uljne sfere u odnosu na zapreminu NK CO₂, zavisna od vremena i

položaja u ekstraktoru, $a_c = \frac{d_c^2 \pi}{V_\varepsilon}$ - specifična površina sekretione strukture u odnosu na zapreminu NK

CO₂, d_c - prečnik sekretione strukture, zavisna od vremena i položaja u ekstraktoru, M - broj sekretornih šupljina i ćelija, P , udeo razorenih sekretornih šupljina i ćelija, i K - koeficijent prenosa mase u čvrstoj fazi.

Pretpostavke usvojene prilikom postavljanja jednačina matematičkog modela za opis procesa natkritične ekstrakcije sekretornih ćelija i šupljina su sledeće:

- a) Proces je izoterman i izobaran i osobine natkritičnog fluida su konstantne.

- b) Protok natkritičnog fluida kroz ekstraktor je konstantan.
- c) U ekstraktoru postoji aksijalno mešanje natkritičnog fluida.
- d) Etarsko ulje je predstavljeno pseudokomponentom.
- e) Frakcija sekrecionih struktura razorenih mlevenjem (P) jednaka je odnosu srednjeg prečnika sekrecione strukture i srednjeg prečnika čestice i jednaka je verovatnoći da će sekreciona zapremina unutar zapremine čestice biti dotaknuta mlevenjem kao trodimenzionim procesom.
- f) Uljna faza svake razorene sekrecione strukture posmatra se kao sfera sa ravnotežnom količinom CO_2 rastvorenom u sebi. Tokom ekstrakcionog procesa, količina ulja u razorenim strukturama se smanjuje (zapremina sfera se smanjuje) i funkcija je vremena i pozicije u ekstraktoru.
- g) Ekstrakcije ulja iz razorenih i nerazorenih struktura su paralelni procesi.

Za izračunavanje izvornog člana ST kod modelovanja procesa simultane NKE iz smeša biljnog materijala korišćena je jednačina (57) u slučaju mešavina C/O (90:10, w/w) i C/T (84:16, w/w) dok je u ostalim slučajevima korišćena jednačina (55).

Na osnovu modela na nivou sekretornih struktura određene su ravnotežne koncentracije etarskog ulja u NK CO_2 na graničnoj površini natkritični fluid-etarsko ulje, c^* (55,61), difuzivnost etarskog ulja kroz membranu nerazorenih trihoma, D_m . (jednačina 55) i koeficijent prenosa mase u čvrstoj fazi, K . (jednačina 61).

3.3.1.4. Opšti parametri modela i korelacije

U ovom delu poglavlja će biti prikazani načini izračunavanja parametara modela koji ne zavise od tipa sekrecione strukture, kao što su: rastvorljivost NK CO_2 u etarskom ulju, rastvorljivost etarskog ulja u NK CO_2 , koeficijent prenosa mase u filmu NK CO_2 oko uljne faze, binarni koeficijent difuzije za sistem etarsko ulje/ NK CO_2 , viskozitet NK CO_2 i koeficijent aksijalne disperzije u natkritičnoj fazi.

Rastvorljivost NK CO_2 u etarskom ulju se računa na osnovu empirijske korelacije (Gaspar i sar., 2003b):

$$c_{\text{CO}_2}^{\text{oil}} = k_1 P^6 + k_2 P^5 + k_3 P^4 + k_4 P^3 + k_5 P^2 + k_6 P \quad (62)$$

gde su konstante k_1 - k_6 empirijski koeficijenti. Na osnovu ove rastvorljivosti može se izračunati vrednost koncentracije ulja u uljnoj fazi zasićenoj sa CO_2 (c_{sat}).

Rastvorljivost etarskog ulja u NK CO_2 fazi (c^*) se procenjuje na osnovu literaturnih podataka o rastvorljivosti pseudo-komponenti u NK CO_2 (Kim i Hong, 1999; Reverchon i sar., 1994). Koeficijent prenosa mase (k_f) u filmu NK CO_2 oko uljne faze procenjuje se na osnovu empirijske korelacije (Tan i sar., 1988):

$$Sh = 0,38 Re^{0,83} Sc^{1/3} \quad (63)$$

pri čemu je:

$$k_f = \frac{Sh D_{12}}{d_p} \quad (64)$$

gde je:

$$Re = \frac{\rho d_p u}{\mu} \quad (65)$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D_{12}} \quad (66)$$

$$Sh = \frac{k_r d_p}{D_{12}} \quad (67)$$

Viskoznost NK CO₂ je procenjen na osnovu empirijske korelacije (Jossi i sar., 1962):

$$\begin{aligned} [(\mu - \mu^*)\xi^* + 10^{-4}]^{1/4} = & 0,10230 + 0,023364\rho_r + 0,058533\rho_r^2 - \\ & - 0,040758\rho_r^3 + 0,0093324\rho_r^4 \end{aligned} \quad (68)$$

i

$$\mu^* \xi^* = 34,0 \times 10^{-5} T_r^{0,94} \quad \text{za } T_r \leq 1,50 \quad (69a)$$

$$\mu^* \xi^* = 17,78 \times 10^{-5} (4.58T_r - 1.67)^{5/8} \quad \text{za } T_r > 1,50 \quad (69b)$$

gde je: μ^* - viskoznost NK CO₂ na normalnim pritiscima (0,1-5 bar), a ξ^* - konstanta čija je brojna vrednost 0,0224 za CO₂.

Binarni koeficijent difuzije za sistem etarsko ulje/NK CO₂ (D_{12}) računa se prema sledećoj jednačini (Catchpole i King, 1994):

$$D_{12} = 5,152D_c T_r (\rho_r^{-2/3} - 0,4510) R / X \quad 1 < \rho_r < 2,5 \quad (70)$$

$$X = (1 + (V_{c2}/V_{c1})^{1/3})^2 / (1 + M_1/M_2)^{1/2} \quad (71)$$

$$R = 1,0 \pm 0,1 \quad X < 2 \quad (72a)$$

$$R = X^{0,17} \pm 0,1 \quad 2 < X < 10 \quad (72b)$$

gde su: D_c - kritična difuzivnost za CO₂ (m²/s), T_r - redukovana temperatura, ρ_r - redukovana gustina za CO₂, V_{c1} i V_{c2} - kritične molarne zapremine za CO₂ i ulje respektivno (m³/kmol), M_1 i M_2 - molarne zapremine za CO₂ i ulje respektivno (m³/kmol).

Koeficijent aksijalne disperzije u natkritičnoj fazi određuje se na osnovu sledeće korelacije (Tan i Liou, 1989):

$$Pe = 1,634 Re^{0,265} Sc^{-0,919} \quad (73)$$

$$P_e = \frac{ud_p}{D_i} \quad (74)$$

Model na nivou sekrecione strukture uspešno je primenjen prilikom simulacije procesa NKE iz velikog broja biljaka različitih familija (Stamenic i sar., 2008, Zizovic i sar., 2005, 2007a,b).

Kritična zapremina pseudokomponente je određena pomoću Lidersenove metode. Lidersenov metod se koristi za izračunavanje doprinosa grupa za određivanje kritičnih temperatura, zapremina i pritiska (McKetta, 1990). Kriterijum za određivanje optimalnih parametara matematičkih modela dat je jednačinom (75) (Sovová i sar., 1994b):

$$J = (1/m) \sum_1^m (Y_j - Y_{j,exp})^2 \quad (75)$$

pri čemu je m - broj eksperimentalnih tačaka, Y_j - prinos u eksperimentalnoj tački j i $Y_{mod,j}$ - prinos u tački j, prema modelu.

3.3.2. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji

Za određivanje koeficijenata nestacionarne difuzije u čvrstoj fazi u procesima ekstrakcija sa etanolom i NKE korišćen model koji je se bazira na nestacionarnoj difuziji u čvrstoj fazi. Proces nestacionarne difuzije opisan je jednačinom drugog Fikovog zakona (jednačina 1) čije se analitičko rešenje za različitu geometriju čestica može naći u literaturi (Crank, 1975; Treybal, 1968). Početni i granični uslovi dati su jednačinom (76):

$$\begin{aligned} \text{početni uslovi: } c &= c_0 \quad t = 0 \quad 0 \leq r \leq R \\ c &= c_i = 0 \quad t > 0 \quad \text{za } r = R \quad (\text{konstantna koncentracija na granici faza}) \\ \text{granični uslovi: } \frac{\partial c}{\partial r} &= 0 \quad t \geq 0 \quad \text{za } r = 0 \quad (\text{simetrija sistema}) \end{aligned} \quad (76)$$

gde je c - koncentracija rastvorka nakon datog vremena t , c_i - koncentracija na međufaznoj granici (površina čestice-fluid) i c_0 - koncentracija rastvorka u biljnom materijalu na početku procesa.

Opšte rešenje jednačine (2) za sferične čestice (Crank, 1975; Treybal, 1968) dato je jednačinom (77):

$$\frac{c - c_0}{c_i - c_0} = 1 + \left[\frac{2R}{\pi r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \sin \frac{\pi n r}{R} \cdot \exp \left\{ - \frac{D n^2 \pi^2 t}{R^2} \right\} \right] \quad (77)$$

Masa rastvorka koja se prenese od sfere ka masi fluida u trenutku t u odnosu na količinu rastvorka koja se prenese nakon beskonačnog vremena data je jednačinom (78):

$$\frac{M(t)}{M_{\infty}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left\{ - \frac{D n^2 \pi^2 t}{R^2} \right\} \quad (78)$$

Uzimajući u obzir da nakon kratkog perioda svi članovi sem prvog postaju zanemarljivi i da je masa rastvorka preneti sa sfere u trenutku t jednaka koncentraciji u rastvoru (c), dobija se jednačina (79):

$$\frac{c_{\infty} - c}{c_{\infty}} = \frac{6}{\pi^2} \exp \left(- \frac{\pi^2 \cdot D \cdot t}{R^2} \right) \quad (79)$$

Logaritmovanjem obe strane jednačine (5) i zamenom eksperimentalnih vrednosti za c i c_0 , tj. kada se $\ln \left(\frac{c}{c_0} \right)$ nacrti u funkciji vremena t dobija se prava linija (Hojnik i sar., 2008).

$$\ln \left(\frac{c_{\infty}}{c_{\infty} - c} \right) = 0,498 + 9,87 \frac{Dt}{R^2} \quad (80)$$

U literaturi novijeg datuma (Herodež i sar., 2003; Hojnik i sar., 2008; Škerget i sar., 2010), se na osnovu ranije studije Osburn i Katz (1944), uzimaju u obzir dva paralelna procesa difuzije koji se odigravaju u čvrstoj fazi u periodima tzv. brze i spore ekstrakcije (81).

$$\frac{c_{\infty} - c}{c_{\infty}} = \frac{6}{\pi^2} \left[f_1 \exp \left(- \frac{\pi^2 \cdot D_1 \cdot t}{r^2} \right) + f_2 \exp \left(- \frac{\pi^2 \cdot D_2 \cdot t}{r^2} \right) \right] \quad (81)$$

gde su: f_1 i f_2 - frakcije rastvora, koje se dobijaju sa difuzionim koeficijentima D_1 i D_2 , respektivno.

U krajnjim fazama ekstrakcije, samo drugi član desne strane jednačine se primenjuje. Parametar D_2 se dobija iz nagiba, a parametar f_2 iz odsečka krive, gde je član $\ln\left[\frac{c_\infty - c}{c_\infty}\right]$ prikazan u funkciji vremena. U početnim fazama ekstrakcije, drugi eksponencijalni član teži jedinici i dodatkom f_2 iz predhodnog proračuna, se mogu odrediti D_1 i f_1 .

Hojnik i sar. (2008) koristili su matematički model koji uzima u obzir dva paralelna procesa difuzije koji se odigravaju unutar čvrste čestice za modelovanje ekstrakcije nevena sa različitim organskim rastvaračima (heksan, petroletar, tetrahidrofuran, aceton, etanol i acetonitril). Herodež i sar. (2003) koristili su isti model za određivanje koeficijenata difuzije pojedinih komponenti sa antioksidativnim dejstvom iz matičnjaka u toku etanolne ekstrakcije u periodima brze i spore ekstrakcije. Škerget i sar. (2010) koristili su ovaj model za izračunavanje difuzionih koeficijenata lutien diestara iz meksičkog nevena (*Tagetes Erecta*) u čvrstoj fazi u brzom i sporom stupnju ekstrakcije sa NK CO₂ i tečnog propana.

Ravnotežna koncentracija (ili koncentracija zasićenja) ekstrakta divizme, origana i timijana, u 70 % vodenom rastvoru etanola, odnosno u NK CO₂ u slučaju NKE (c_∞) predstavlja koncentraciju ekstrakta u korišćenim rastvaračima nakon beskonačno dugog vremena, tj. kada su svi otpori savladani. Obzirom da su ekstrakcije sa etanolom šaržni procesi, a proces NKE karakteriše kontinualni protok NK CO₂, za određivanje ravnotežnih koncentracija korišćene su različite procedure. U prvom slučaju, ravnotežne koncentracije ekstraktibilnih substanci na datoj temperaturi sa 70 % vodenim rastvorom etanola određivane su izvođenjem ekstrakcija do potpunog iscrpljenja istih iz biljnog materijala. Kod procesa NKE c_∞ određivana na sledeći način. Samleveni materijal je stavljen u ekstrakcionu ćeliju i u prisustvu NK CO₂ vršena je kompresija do uslova ekstrakcije. Nakon toga izvršena je nagla dekompresija u cilju razaranja biljnog tkiva i sekrecionih struktura koji nisu razoreni mlevenjem u cilju smanjenja otpora pri prenosu mase kroz ćelijski zid. Odmah potom je ponovo vršeno komprimovanje u ekstraktoru do ekstrakcionih uslova. Ravnotežna koncentracija je određena iz nagiba ekstrakcione krive u početnom stupnju ekstrakcije za koji se smatra da je natkritični fluid zasićen ekstraktibilnom supstancom. Ravnotežne koncentracije su dalje korišćene za određivanje koeficijenta difuzije (D_1 i D_2) za SE, UZE i NKE primenom modela zasnovanog na drugom Fikovom zakonu.

3.4. Određivanje hemijskog sastava ekstrakata

3.4.1. Gasna hromatografija (GC/FID)

Gasnohromatografska analiza rađena je na Hewlett-Packard gasnom hromatografu, model HP-5890 Series II apparatus [Hewlett-Packard, Waldbronn (Germany)], opremljenom split-splitless injektorom i autosemplerom povezanim sa HP-5 kolonom (25m x 0,32 mm, debljine filma 0,52 μl) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 ml/min), korišćen je split režim od 1:30. temperatura injektora iznosila je 250 °C, a detektora 300 °C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40-260 °C (4 °C/min), a potom držana konstantnom na 260 °C 10 min. Nakon postizanja zadatih uslova, injektovano je 1 μl rastvora uzoraka u hloroformu. Za kvantifikacione svrhe procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC/FID) uzeti su kao osnova.

3.4.2. Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC/MS)

Isti analitički uslovi korišćeni su i za potrebe GC/MSD analize rađene na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu [Hewlett-Packard, Palo Alto, CA (USA)], s tim što je tu rađeno sa HP-5MS kolonom (30m x 0,25mm x 0,25 µm) i što je kao noseći gas korišćen helijum. Temperatura transfer linije iznosila je 260 °C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu m/z 40-450.

Hloroformski rastvori uzoraka etarskih ulja i ekstrakata (0,2 µl) injektirani su u split-režimu (1:30), a samo u posebno naznačenim slučajevima u splitless režimu. Identifikacija pojedinačnih komponenata vršena je masenospektrometrijski i preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST/Wiley), različitih načina pretrage (PBM/NIST/AMDIS ver 2.1) i raspoloživih literaturnih podataka (Adams, 2007).

3.4.3. Tečna hromatografija (HPLC)

Ekstrakti dobijeni NKE, P, M i SE sa 70 % etanolom su rastvarani u smeši acetona i metanola (3:2) do koncentracije 10 mg/ml. Sadržaj usninske kiseline u ekstraktima je određivan pomoću validirane HPLC metode. Za HPLC analize korišćen je Hewlett Packard Agilent 1100 aparatura opremljena Zorbax Eclipse XDB-C18 kolonom (4,6x150 mm; 5 µm) i UV/DAD detektorom pri čemu je kao mobilna faza korišćeno 15 % rastvarača A, 85 % rastvarača B (A = H₂O/H₃PO₄, pH=2,75; B = 10 % A + 90 % acetonitrila), izokratni protok od 1,5 ml/min, na 25 °C, u toku 20 min; Spektri su snimani na talasnoj dužini, λ = 282 nm), pri čemu je kao standard korišćena (+)-usninska kiselina (Carl Roth, Germany) u koncentraciji od 1 mg/ml. Svaka analiza ponovljena je tri puta.

Validacija metode

Naziv metode: HPLC određivanje sadržaja usninske kiseline

Validaciona studija: Detekcioni limit je određen na osnovu 6 merenja maksimalno razblaženog standardnog rastvora usninske kiseline (UA).

Određivanja su vršena u sledećim uzorcima:

A - rastvor usninske kiseline 0,26 mg/ml

B - biljni ekstrakt U₄₀

C - „spajkovan“ uzorak B

D - biljni ekstrakt U₆₀

Za određivanje linearnosti metode korišćeni su rastvori usninske kiseline u koncentracijama: 0,0325; 0,065; 0,13; 0,26; 0,39 i 0,52 mg/ml.

Tačnost metode je određena korišćenjem dva uzorka: rastvora usninske kiseline (uzorak A) i spajkovanog uzorka biljnog ekstrakta (uzorak C).

Preciznost je određena duplim merenjima četiri uzorka (A, B, C, D) u šest serija.

3.5. Antibakterijska aktivnost ekstrakata

U tabeli 16 dat je pregled ispitivanih sojeva bakterija i metoda korišćenih za ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata izolovanih različitim tehnikama iz odabranog biljnog materijala kao i njihovih mešavina. Mešavine ekstrakata dobijene su namešavanjem izolovanih ekstrakata i etarskih ulja kao i simultanom ekstrakcijom iz dvokomponentnih smeša biljnog materijala (karanfilić i origano).

Tabela 16 Metode korišćene za ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskih ulja, ekstrakata dobijenih različitim metodama ekstrakcije i njihovih mešavina

Naziv biljne vrste	Metod izolacije	Metod ispitivanja antibak.aktiv.	Ispitivane vrste bakterija
Pojedinačne sirovine			
Origano (<i>Origanum vulgare</i>)	HD/SE/UZE	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i> , <i>Salmonella</i>
	NKE	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj. VRE), <i>Salmonella</i>
Ruzmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	HD/NKE	BMD ⁱ	<i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>
Žalfija (<i>Salvia officinalis</i>)	HD/NKE	BMD ⁱ	<i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA)
Timijan (<i>Thymus vulgaris</i>)	HD/NKE	BMD ⁱ	<i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)
	SE/UZE	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i>
Karanfilić (<i>Syzgium aromaticum</i>)	NKE	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)
Lovor (<i>Laurus nobilis</i>)	HD/NKE	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i>
Anđelika (<i>Angelica archangelica</i>)	SE/UZE/NKE	BMD ^a	<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. coli</i>
Ehinacea (<i>Echinacea angustifolia</i>)	SE/UZE/NKE	BMD ^a	<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. coli</i>
Divizma (<i>Verbascum thapsus</i>)-nad.deo	SE/UZE/NKE	BMD ^a	<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. coli</i>
Divizma (<i>Verbascum thapsus</i>)-cvet	SE/UZE	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i>
Neven (<i>Calendula officinalis</i>)	SE/UZE/NKE	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)
Usnea (<i>Usnea barbata</i>)	NKE/SE/P/M	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)
Čiste supstance			
(+)-usninska kiselina	-		<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Salmonella</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)
timol	-		<i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>
p-cimen			<i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>
timol+p-cimen			<i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>
Mešavine			
C/O(MIX)	1:1	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)
C/O(SIM)			<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)
U ₄₀ :T _{HD}	1:1	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)
	7:3	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)
U ₄₀ :T _{HD} :A _{NKE}	2:2:1	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)
U ₄₀ :T _{HD} :A _{NKE}	2:2:1	BMD ⁱ	<i>Staphylococcus</i> (uklj. MRSA), <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> (uklj.VRE)

ⁱ mikrodiluciona metoda u bujonu; ^a makrodiluciona metoda u bujonu; MRSA sojevi (meticilin rezistentne stafilokoke, *eng.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*); VRE sojevi (Vankomicin rezistentne enterokoke, *eng.* Vancomycin-Resistant Enterococci);

3.5.1. Mikrodiluciona metoda u bujonu

Mikrodiluciona metoda u bujonu se izvodi u mikrotitracionim pločama sa „U“ dnom (Spektar). U svim bazenčićima nalazi se antibiotik (ekstrakt) u različitim koncentracijama kao i test mikroorganizam inokulisan u precizno određenom broju. Posle inkubisanja vrši se determinacija vrednosti MIC datog ekstrakta, a to je najmanja koncentracija antibiotika koja sprečava vidljivi porast bakterija. Metoda se izvodi prema preskripciji CLSI (Clinical and laboratory standards institute, USA, 2008)

Za izvođenje ove metode upotrebljena je podloga Mueller Hinton bujon sa korigovanom količinom katijona (Ca^{2+} i Mg^{2+}), skraćeno CAMHB (od engleskog naziva „*cation adjusted Mueller Hinton Broth*“) proizvođača Becton Dickinson, USA. Radi lakšeg očitavanja rasta bakterija u mikrotitracionim pločama, dodat je i indikator, za gram-pozitivne bakterije - brom krezol purpuno (Merck) u koncentraciji od 1,6 % i to 1 μ l/ml podloge. Za ispitivanje *Streptococcus* vrsta u CAMHB je dodat i sterilni fetalni teleći serum (Sigma) u koncentraciji od 5 %. Priprema inokuluma bakterija vršena je takođe prema preskripciji CLSI za mikrodilucioni metod. Ispitujuće kolonije suspendovane su u 9 ml sterilnog fiziološkog rastvora tako da je intenziteta zamućenosti bio identičan 0,5 standardu MacFarland skale (1-2x10⁸ bakterija/ml). Prema preskripciji metode, soj koji se ispituje mora biti zasejan u mikrotitracione ploče tako da finalna gustina inokuluma ispitujućeg soja ne sme da pređe broj od 5 x 10⁴ bakterija. Ovaj broj bakterija dobijen je tako što je prethodno pripremljena suspenzija bakterija razblažena u odnosu 1:20 pomoću takozvanog intermedijarnog razblaživača. Intermedijarni razblaživač je sterilna destilovana voda sa 0,02 % Tween 80 (Merck). Intermedijarno razblaženje inokuluma dobijeno je prenošenjem 2 ml suspenzije bakterija gustine 1-2x10⁸ u 40 ml intermedijarnog razblaživača, tako da 10 μ l ovog intermedijarnog razblaženja sadrži 5-8 x 10⁵ bakterija. Tako je u bazenčiće uneto po 10 μ l ovako pripremljenog inokuluma svakog soja koji je ispitivan.

Pripremanje rastvora ekstrakata vršeno je rastvaranjem ekstrakta u koncentrovanom 1,2 propanediol-u (propilen glikolu) (Acros Organics). Pripremljene su ispitivane koncentracije ekstrakata od 2560 μ g/ml, 1280 μ g/ml, 640, μ g/ml, 320 μ g/ml, 160 μ g/ml, 80 μ g/ml, 40 μ g/ml, 20 μ g/ml, 10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml i 1,25 μ g/ml. Ploče su inkubisane na temperaturi od 37 °C u trajanju od 16 do 20 h.

Paralelno sa ovim ispitivanjima, radi kontrole, vršeno je i određivanje vrednosti MIC hloramfenikola za sve ispitivane bakterijske vrste osim za *Bacillus* vrste za koje su određivane vrednosti MIC ciprofloksacina. Postupak ispitivanja odvijao se takođe prema preporukama CLSI. U ovu svrhu upotrebljene su aktivne supstance ciprofloksacina i hloramfenikola čistoće 100 % (Sigma), a rastvarač za oba antibiotika bila je destilovana voda.

Takođe su, u ovom ispitivanju, bile postavljene i kontrole Mueller Hinton bujona bez dodatka ulja ali sa zasejanim sojevima bakterija koji su bili ispitivani kao i kontrole MH bujona u koje su bila dodata ulja ali koji nisu bili zasejani ispitivanim sojevima bakterija (CLSI, 2008).

Očitavanje rezultata je vršeno vizuelno-posmatranjem dna mikrotitracionih ploča odozdo, u dobro osvetljenoj prostoriji radi eventualno prisutnog vidljivog rasta bakterija. Rast bakterija se vidi kao talog glatkih ili narezuckanih ivica oblika dugmeta veličine ≥ 2 mm, ili kao turbidimetrijsko zamućenje. Istovremeno, u slučaju vidljivog rasta bakterija u CAMHB, indikator najčešće menja boju iz ljubičaste u žutu. Provera prisustva rasta bakterija u bazenčićima vršena je upoređivanjem sa kontrolama inokulisanih CAMHB bez ekstrakata. Najniža koncentracija ekstrakta u kojoj nije bilo vidljivog rasta soja bakterije koji je ispitivan uzimana je kao vrednost MIC za taj soj.

3.5.2. Makrodiluciona metoda u bujonu

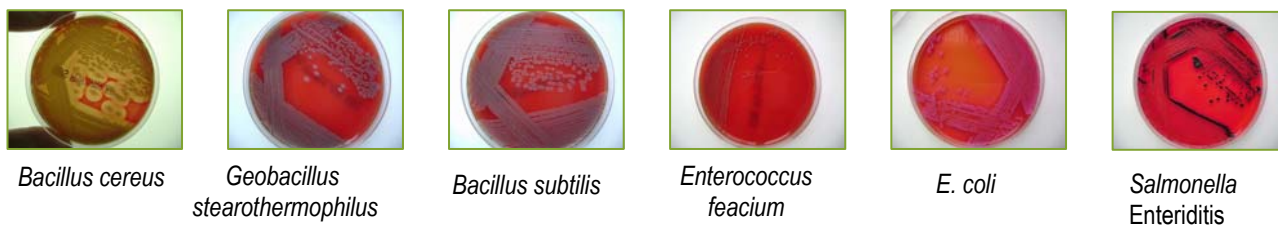
Makrodiluciona metoda u bujonu izvodi se gotovo na identičan način kao i mikrodiluciona metoda u bujonu. Osnovna razlika je što se metoda izvodi u epruvetama uz značajno veći utrošak hranljivih podloga i biljnih ekstrakata, ali očitavanje rezultata tj. određivanje vrednosti MIC je lakše nego kod ostalih dilucionih metoda. Takođe, razlikuje se i način pripremanja inokuluma ispitujućeg soja bakterija: nakon pripreme osnovne suspenzije bakterija gustine 1-2x10⁸ /mL, pripremljeno je i razblažanje te suspenzije od gustine 1-

2×10^7 bakterija/mL. Odatle je u epruvete inokulisano po 50 μ l te suspenzije čime je postignuta finalna gustina od 5×10^5 bakterija po mililitru podloge. Upotrebene su iste podloge koje su pripremljene na već opisani način.

Za ispitivanje antibakterijskog delovanja ekstrakata biljaka upotrebljeni su sojevi *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* i *Geobacillus* vrsta kao predstavnici Gram-pozitivnih bakterija, a iz grupe Gram-negativnih bakterija upotrebljeni su sojevi *E.coli*, *Enterobacter* i *Salmonella* vrsta iz familije enterobakterija (*Enterobacteriaceae*). Odabrane vrste bakterija značajne su za veterinarsku i humanu medicinu kao uzročnici infekcija kože i drugih organskih sistema ali i kao uzročnici alimentarnih infekcija tj infekcija koje se prenose putem hrane.

Svi sojevi bakterija korišćeni u ovom ispitivanju izolovani su iz kliničkih materijala dostavljenih na rutinsku mikrobiološku analizu u laboratoriju za bakteriologiju Katedre za Mikrobiologiju, UB.

Za izolaciju bakterija korišćene su konvencionalne mikrobiološke metode uz upotrebu Columbia agara (Becton Dickinson) sa dodatkom 6 % ovčije krvi, MacConkey agara (bioMerieux) i hranljivog bujona (BioLab). Za tipizaciju stafilokoka do vrste primenjen je automatski identifikacioni sistem API STAPH (bioMerieux). Za tipizaciju *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* i *Geobacillus* vrsta upotrebljen je komercijalni identifikacioni sistem BBL Crystal Gram positive ID kit (Becton Dickinson), a za tipizaciju do vrste gram-negativnih bakterija primenjen je automatski identifikacioni sistem BBL Crystal Enteric/nonfermenter ID kit (Becton Dickinson). Detekcija sojeva MRS izvršena je najpre disk difuzionom metodom na Miler Hinton agaru (Becton Dickinson) uz upotrebu antibiogram diskova cefoksitina i oksacilina (Becton Dickinson), a potom je izvršena i detekcija PBP2A proteina karakterističnih samo za sojeve MRS i to primenom lateks aglutinacionog testa MRSA SLIDEX ID KIT (bioMerieux). Detekcija sojeva VRE izvršena je primenom antibiogram diskova vankomicina (Becton Dickinson) takođe na Miler Hinton agaru primenom disk difuzione metode. Radi definitivne potvrde o pripadnosti safilikoka kategoriji MRS i enterookoka kategoriji VRE primenjene su i molekularne metode u cilju detekcije gena rezistencije. međutim opis ovih mteoda i nabranje materijala koji su korišćeni u tu svrhu prevazilaze temu ove doktorske disertacije. U ispitivanje su bili uključeni i referentni sojevi iz kolekcije ATCC (Becton Dickinson).



Slika 19 Neki od ispitivanih sojeva bakterija koji su izolovani i identifikovani na fakultetu Veterinarske medicine u Beogradu

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U okviru ove studije najpre su, primenom tradicionalnih i novijih metoda ekstrakcije (hidrodestilacija, ekstrakcija etanolom sa i bez ultrazvuka, natkrična ekstrakcija sa CO₂), izolovana etarska ulja i ekstrakti iz odabranog bilja familije Lamiaceae (ruzmarin, žalfija, timijan i origano), lovora, karanfilića, anđelike, divizme, ehinacee, nevena, aloe i lišaja *U. barbata* i određeni njihovi ekstrakcioni prinosi. Nakon toga je testirana antibakterijska aktivnost izolovanih etarskih ulja i ekstrakata na sojeve bakterija koje izazivaju kožne infekcije i/ili mogu izazvati kvarenje hrane u cilju ispitivanja mogućnosti njihove primene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Imajući u vidu problem rezistentnosti bakterija na veliki broj sintetičkih komercijalnih antibiotika, testiranja antibakterijskih efekata biljnih ekstrakata kao alternativnih prirodnih agenasa, uključila su i sojeve stafilokoka koje su otporne na meticilin (MRSA sojevi), kao i vankomicin rezistentne enterokoke (VRE sojevi). Ekstrakti lišaja *U. barbata*, pre svega natkrični ekstrakti, pokazali su najjače antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve bakterija koje je bilo uporedivo ili, u nekim slučajevima, jače od komercijalnih sintetičkih antibiotika. Iz tog razloga je, za ekstrakte *U. barbata* kao i za etarska ulja i ekstrakte izolovane iz timijana, origana, ruzmarina, žalfije, lovora i karanfilića koji su, takođe, pokazali umereno jaku do jaku antibakterijsku aktivnost, ispitan sadržaj aktivnih supstanci primenom metoda HPLC i GC/MS. U radu su, dalje, prikazani rezultati ispitivanja energetske efikasnosti tehnologija kojima su dobijeni ekstrakti sa najjačim antibakterijskim delovanjem primenjena je eksergijska analiza.

Etarska ulja i ekstrakti sa najjačim antibakterijskim efektom su dalje namešavani u različitim odnosima pri čemu se pokazalo da kod određenih mešavina postoji sinergijski efekat u pogledu antibakterijske aktivnosti na pojedine ispitane sojeve. U okviru studije, analizom kinetike simultane NKE iz odabranih mešavina biljnih materijala utvrđeno je da prisustvo pojedinih biljnih sirovina u smeši (odnosno njihovih glavnih komponenti) utiče na povećanje rastvorljivosti u NK CO₂ (kosolventski efekat) pa samim tim i na povećanje brzine ekstrakcije i smanjenje potrošnje natkričnog fluida. Proces simultane NKE ispitan je i sa aspekta mogućnosti izolacije mešavina ekstrakata sa pojačanim antibakterijskim delovanjem u odnosu na natkrične ekstrakte dobijene iz pojedinačnih biljnih sirovina.

4.1. Prinosi etarskih ulja i ekstrakata

Etarska ulja iz osušenih listova ruzmarina, žalfije, timijana, origana i lovora izolovana postupkom hidrodestilacije bila su u tečnom stanju i svetlo žute do žute boje. Dobijeni natkrični ekstrakti iz lišaja (*U. barbata*) (slika 20) bili su žućkasto-zelenkaste boje i u praškastom polučvrstom stanju, dok su njegovi etanolni ekstrakti bili praškasti i zelenkastobraon boje. Prinosi ekstrakata *U. barbata* dobijeni različitim metodama ekstrakcije prikazani su u tabeli 17. Natkrični ekstrakti iz odabranog začinskog i lekovitog bilja izolovani na pritiscima 10-30 MPa bili su polučvrstom stanju na ambijentalnim uslovima (sem ekstrakta karanfilića koji je bio tečan) i različite boje i mirisa u zavisnosti od biljne sirovine i uslova na kojima su izolovani. Tako su ekstrakti izolovani iz ruzmarina, žalfije, timijana, divizme i ehinacee na nižim pritiscima (10-15 MPa) bili braonkastožućkaste, iz origana narandžastožućkaste, a iz anđelike žutozelenkaste boje. Ekstrakti dobijeni na višim pritiscima, 15-30 MPa (iz ehinacee, anđelike, divizme i nevena) bili su tamno naranžaste do braonkaste boje u zavisnosti od biljne sirovine. Natkrični ekstrakt karanfilića bio je svetlo žute boje i u tečnom stanju. Zapažanja po pitanju arome su u skladu sa činjenicom da u toku procesa NKE koji se izvodi na umerenim temperaturama (40-60 °C) ne dolazi ili dolazi u manjoj meri do degradacije komponenta ekstrakata pa oni sadržavaju aromu i boju sirovine iz koje su izolovani.



Slika 20 Ekstrakt lišaja dobijen natkričnom ekstrakcijom

Etanolni ekstrakti bili su u smolastom ili praškastom stanju i imali su sličan i neutralni miris, izuzev ekstrakta timijana i origana koji su imali nešto jači miris (na njihova etarska ulja i natkritične ekstrakte). Ekstrakti dobijeni UZE bili su svetlije braon ili braonzelenkate boje dok su ekstrakti dobijeni SE bili tamno zelene do tamno braon boje u zavisnosti od biljne sirovine.

Tabela 17 Prinosi ekstrakata izolovanih iz lišaja *U. barbata*

Metoda	Oznaka	Temperatura (°C)	Pritisak (MPa)	Prinos ^a (%)
NKE	U ₄₀	40	30	0,60
NKE	U ₆₀	60	30	0,38
Maceracija	U _M	25	0,1	3,13
Perkolacija	U _P	25	0,1	4,35
Sokslet ekstrakcija	U _{SE}	80,5	0,1	10,18

^amaseni prinos računat u odnosu na masu sirovine.

Prinosi ekstrakata iz odabranog začinskog i lekovitog bilja izolovani različitim metodama ekstrakcije prikazani su u tabeli 18.

Tabela 18 Prinosi etarskih ulja i ekstrakata iz lekovitog i začinskog bilja na laboratorijskom nivou (%)

Metoda→			NKE		HD	SE	UZE	NKE-UZE	
#	Biljna sirovina	Droga	Temperatura (°C)	Pritisak (MPa)	Prinos (%)				
1	<i>Origanum vulgare</i>	list	40	10,0	1,00	0,400	23,6	15,6	
2	<i>Rosmarinus officinalis</i>	list	40	11,5	1,02	0,516	-	-	-
3	<i>Salvia officinalis</i>	list	40	11,5	2,13	0,86	-	-	-
4	<i>Thymus vulgaris</i>	list	40	11,5	1,23	1,09	29,8	18,4	-
				10,0	1,15				
5	<i>Angelica archangelica</i>	koren	40	15,0	2,26	-	11,0	1,45 ^a	3,57
				20,0	1,98			2,39 ^b	
6	<i>Calendula officinalis</i>	cvet	40	10,0	1,37	-	3,5	2,39	-
				20,0	3,22		28,1	20,0	
7	<i>Echinacea purpurea</i>	nadzemni deo	40	15,0	0,688	-	9,55	1,17	-
				25,0	0,821				
8	<i>Verbascum thapsus</i>	nadzemni deo	40	30,0	0,825	-	17,6	1,33	-
				20,0	1,28				
				15	0,463				
		cvet	-	-	-	-	49,0	23,1	-
9	<i>Eugenia caryophyllata</i>	pupoljci	40	10	18,2	-	-	-	-
10	<i>Laurus nobilis</i>	list	40	10	1,37 ^c	1,43	-	10,0	12,0
			100	30	2,81 ^d				
11	<i>Aloe vera</i>	list	40	10	0,13	-	-	6,00 ^a	14,0
			100	30	1,40			8,00 ^b	

^a d_p=0.400 mm

^b sprášeni biljni materijal

4.2. Hemijski sastav

Za ekstrakte koji su pokazali najjače antibakterijsko delovanje ispitan je sadržaj aktivnih komponenti primenom metoda gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC/MS) ili tečne hromatografije (HPLC).

4.2.1. Određivanje sadržaja usninske kiseline

Za ekstrakte izolovane iz lišaja *U. barbata* primenom različitih metoda ekstrakcije ispitan je sadržaj (+)-usninske kiseline, koja se smatra glavnim nosiocem antibakterijske aktivnosti. Rezultati ispitivanja sadržaja usninske kiseline dobijeni primenom metode tečne hromatografije (HPLC) prikazani su u tabeli 19. Proces NKE se pokazao kao najpogodniji za izolaciju ekstrakata iz lišaja *U. barbata* (30 MPa; 40 i 60 °C) sa najvećim sadržajem usninske kiseline. U ekstraktu izolovanom na povišenoj temperaturi (60 °C; U₆₀) identifikovan najveći sadržaj usninske kiseline u odnosu na ekstrakt izolovan na istom pritisku i nižoj temperaturi (40 °C; U₄₀). Manji udeo usninske kiseline u U₄₀ se može objasniti činjenicom da se pri većoj gustini natkritičnog CO₂, usled veće moći rastvaranja natkritičnog fluida, izdvaja velika količina drugih jedinjenja velike molekulske mase. Ekstrakti dobijeni perkolacijom i maceracijom sadržali su izuzetno mali udeo usninske kiseline (~300 puta manji u odnosu na U₆₀ i ~20 puta manji u odnosu na U_{SE}). Manji udeo usninske kiseline u etanolnim ekstraktima u odnosu na natkritične ekstrakte može se objasniti znatno manjom selektivnošću etanola kao rastvarača poređenju sa NK CO₂ na datim uslovima pritiska i temperature (30 MPa; 40 °C i 60 °C) koje su predložili Najdenova i sar. (2001). Visoki prinosi usninske kiseline (90 %) mogu se ostvariti postupkom ekstrakcije sa etanolom u kombinaciji sa kristalizacijom sa vodom koji je opisan u patentu GB 2096996 A (Stankovic i Randelović, 1981). Najveći prinos usninske kiseline računat u odnosu na masu sirovine ostvaruje se ekstrakcijom u Sokslet aparaturi (tabela 19).

Tabela 19 Sadržaj (+)-usninske kiseline u ekstraktima *U. barbata* dobijenim različitim metodama ekstrakcije

Metoda	Oznaka	Sadržaj UA ^a (%)	Sadržaj UA u lišaju (g _{UA} / 100 g lišaja)
NKE	U ₄₀	36,49	0,219
NKE	U ₆₀	59,48	0,226
Maceracija	U _M	0,25	0,00783
Perkolacija	U _P	0,18	0,00783
Sokslet ekstrakcija	U _{SE}	3,59	0,365

^a Sadržaj usninske kiseline u ekstraktu određen primenom HPLC;
U₄₀-natkritični ekstrakt izolovan na 30MPa i 40 °C; U₆₀-natkritični ekstrakt izolovan na 30MPa i 60 °C.

4.2.2. Hemijski sastav etarskih ulja i natkritičnih ekstrakata iz odabranog lekovitog i začinskog bilja

U tabelama 20-23 prikazan je hemijski sastav etarskih ulja i natkritičnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom izolovanih iz izabranog začinskog i lekovitog bilja.

Etarska ulja ruzmarina, žalfije i timijana sadržala su uglavnom mono- i seskviterpene i njihove oksidovane derivate (93-97 %) dok je sadržaj u natkritičnim ekstraktima izolovanim na 11,5 MPa i 40 °C bio znatno manji (3,84 %, 13,05 % i 45 % za ruzmarin, žalfiju i timijan, respektivno). Od ovih ekstrakata, natkritični ekstrakt timijana sadržao je najviše monoterpenskih jedinjenja. Najzastupljenije jedinjenje u etarskom ulju i natkritičnom ekstraktu timijana bio je monoterpenski alkohol timol (48,5 % u etarskom ulju i 39,7 % u natkritičnom

ekstraktu), što je u skladu predhodnim literaturnim podacima (Bozin i sar., 2006; Diaz-Maroto i sar., 2005; Gutierrez i sar., 2008; Oszagyh i sar., 1996).

Tabela 20 Hemijski sastav etarskih ulja i natkritičnih ekstrakta ruzmarina, žalfije i timijana

Biljni materijal	<i>Rosmarinus officinalis</i>			<i>Salvia officinalis</i>		<i>Thymus vulgaris</i>		
	Naziv jedinjenja	RI ^a	R _{HD}	R _{NKE}	S _{HD}	S _{NKE}	T _{HD}	T _{NKE}
Monoterpeni			97,06	3,84	92,74	14,83	95,67	44,97
<i>cis</i> -salven	856				0,34			
<i>trans</i> -salven	867				0,06			
triciklen	921	0,15			0,15			
α -tujen	930				0,05		0,34	
α -pinen	932	15,92	0,03		4,87		0,85	
kamfen	946	3,4			4,88		0,65	
tuja-2,4(10)-dien	953	1,35	0,06					
β -pinen	974	0,34			0,92		0,48	
β -mircen	988	0,91			0,62		0,77	
δ^3 -karen	1008	1,49					0,12	
α -terpinen	1014	0,19			0,17		0,97	
<i>p</i> -cimen	1020	2,23			0,64		25,46	0,37
limonen	1024	4,19			3,48			
γ -terpinen	1060				0,2		5,67	
<i>cis</i> -sabinen hidrat	1065						0,17	
<i>p</i> -cimenen	1089	0,39						
diktioten	1155				0,34			
α -felandren	1002	0,14			0,06		0,08	
β -fekandren	1025						0,59	
1,8-cineol	1026	12,96	0,1		9,11	0,34	0,6	
α -terpinolen	1089				0,17		0,18	
linalool	1095	4,1	0,21		0,46		2,7	0,48
α -fenhol	1114	0,81						
α -tujon	1102				33,55	3,52		
β -tujon	1112	0,14			5,6	0,55		
hizantenon	1124	0,6						
α -kamfonelal	1105				0,1			
<i>iso</i> -tujil alkohol	1138				0,18			
<i>trans</i> -pinokarveol	1135	0,24						
kamfor	1141	15,58	0,41		20,81	3,66	0,41	
<i>trans</i> -pinokamfon	1158	1,43						
borneol	1165	9,17	0,91		3,37	1,96	1,42	0,52
terpinen-4-ol	1174	1,84	0,12		0,61		1,08	
<i>p</i> -cimen-8-ol	1179	0,36	0,06				0,17	
α -terpineol	1186	2,22	0,29		0,23		0,21	
mirtenol	1194	0,43	0,05		0,16	0,33		
verbenon	1204	13,28	1,28					
<i>trans</i> -karveol	1215	0,13						
citronelol	1223	0,18						
<i>cis</i> -mirtanol	1238	0,62	0,09					
<i>trans</i> -mirtanol	1240	1,42						
karvakrol metal etar	1241						0,83	
<i>trans</i> -2-hidroksi-pinokamfon	1247		0,1					
timohinon	1248							0,77
bornilacetat	1286	0,34	0,04		1,61	0,83		
timol	1289						48,49	39,7
2,5-bornanedion (ti)						0,25		
karvakrol	1298	0,13					3,43	3,13

Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom

piperitenon	1340	0,38	0,09				
acetofloroglucin (ti)					1,78		
exo-2,10-bornanediol (ti)					1,61		
Seskviterpeni		1,35	3,43	6,55	23,88	3,86	1,6
α -kopaen	1374		0,07				
metil eugenol	1403		0,14				
<i>trans</i> - β -kariofilen	1417	0,28	0,41	0,39	0,3	2,26	1
selina-4(15),5-dien	1450				0,34		
α -humulen	1452		0,08	1,1	4,68		
geranil aceton	1453		0,04				
γ -muurolen	1478	0,07	0,12	0,61			
β -selinen	1489		0,09				
leden	1497			0,14			
α -muurolen	1500		0,08				
β -bisabolen	1505		0,07				
γ -kadinen	1513	0,1	0,1			0,1	
δ -kadinen	1522	0,12	0,21			0,19	
Kariofilen oksid	1582		0,12	0,2	0,61	1,06	0,6
spatulanol	1577	0,1					
viridiflorol	1593			2,72	12,42	0,14	
Humulen epoksid I	1593			0,16	0,45		
Humulen epoksid II	1608			0,75	2,67		
allo-aromadendren-epoksid	1623			0,33	1,95		
8-hidroksibiciclogermakren	1661			0,15	0,46		
kariofila-4(12),8(13)-dien-5- α -ol	1639	0,19					
epi- α -kadinol	1638					0,11	
γ -eudezmol	1630		0,06				
<i>cis</i> -metil jasmonat	1648		0,21				
14-hidroksi-9-epi- <i>trans</i> -kariofilen	1668	0,49					
valeranon	1674		0,1				
<i>p</i> -fenilenediacetamid (ti)			0,13				
sedanolid	1719		0,93				
sedanolid (neocnidilid)	1722		0,47				
Kiseline i Estri		0	80,95	0,07	10,31	0	39,45
metil estar azelaaldehidne kiseline			0,09				
palmitinska kiselina	1959		0,1				1,25
metil palmitat	1921		5,62				3,01
metil linoleat	2095		66,78		0,79		24,05
metil elaidat							1,13
metil oleat			0,38		2,86		8,13
metil stearat	2124		3,86				0,64
metil arahidat	2306		0,74				
metil 2-oktilciklopropen-1-oktanoat (ti)			0,49				
metil behenat	2531		0,7				0,34
Ostala jedinjenja		0	2,19	0,07	6,66	0	0,9
2-(2,2,4-Trimetil-3-ciklopenten-1-il) etanol	1209		0,12				
1-hidroksimetil-7,7-dimetilbiklo[2.2.1]heptan-2-on (ti)					6,12		
4-acetilpirogolol*				0,07	0,35		
3-butil ftalid	1647		0,55				
heksahidrofarnesilaceton	1845		0,13				
pimara-8,15-dien	1908				0,19		
4,8,12,16-tetrametilheptadekan-4-olid (ti)			0,24				
α -tokoferol (vitamin E)			1,15				0,9
Diterpeni		0	0	0,35	41,12	0	0
sklaren	1942				0,44		

<i>trans</i> -biformen	1988			0,27		
manool	2057		0,35	37,19		
labda-7,14-dien-13-ol	2096			1,57		
feruginol				0,49		
izokarnozol				1,16		
Triterpeni		0	0,99	0	0,63	0,83
Skvalen	2757		0,99		0,63	0,83
Voskovi		0	5,63	0	1,64	7,04
pentakozan	2500		0,25			0,47
heksakozan	2600		0,17			
heptakozan	2700		2,19		1,15	0,62
metil lignocerat (Metil tetrakozanoat)			0,2			
nonakozan	2900		1,81		0,49	5,43
hentriakontan	3100		1,01			0,52
Total ID %^c		98,41	94,84	99,71	92,41	99,53
Broj komponenti		40	54	39	33	29

^b Kovačevi indeksi; ti-delimična identifikacija; ^dUkupni procenat identifikovanih jedinjenja (čija je zastupljenost veća od 0.20 % je prikazana u tabeli).

Značajan udeo u natkritičnim ekstraktima ruzmarina i žalfije izolovanih na relativno niskom pritisku i temperaturi (11,5 MPa i 40 °C; gustina CO₂ 630 kg/m³) čine komponente velike molekulske mase - masne kiseline i voskovi. Razlike koje postoje u odnosu na literaturne podatke su rezultat vođenja natkritične ekstrakcije na nešto višem pritisku (11,5 MPa u odnosu na 10 MPa iz literature), i korišćenja totalnog ekstrakta za analize.

Tabela 21 Sadržaj aktivnih komponenti natkritičnih ekstrakata izolovanih iz lista origana, timijana i pupoljka karanfilića na 10 MPa i 40 °C.

Biljni materijal			<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
Naziv jedinjenja	RI ^a	RT/MS ^b			
timohinon	1248	18,15	-	13,30	0,70
timol	1289	19,67	-	6,0	42,52
karvakrol	1298	20,04	-	57,28	2,54
eugenol	1356	21,93	64,06	-	
<i>trans</i> -kariofilen	1417	23,65	12,97	1,01	1,63
eugenil acetat	1521	27,08	19,93	0,1	
Voskovi			tr	4,89	25,08
ID^c %			96,96	81,53	72,47

U etarskom ulju origana dobijenom hidrodestilacijom po Klevendžeru identifikovan je visok sadržaj monoterpenskoga alkohola karvakrola (63,6 %) (izomer timola) i njegovog prekursora *p*-cimena (14,64 %) (tabela 22).

Tabela 22 Hemijski sastav etarskog ulja origana

Naziv jedinjenja	RI	RT/MS	O _{HD}
α -tujen	924	6,89	1,01
α -pinen	932	7,04	0,33
kamfen	946	7,47	0,37
sabinen	969	8,303	0,76
β -pinen	974	8,35	0,22
mircen	988	8,91	0,92
α -terpinen	1014	9,7	1,07
p -cimen	1020	10	14,67
limonen	1024	10,1	0,48
1,8-cineol	1026	10,19	0,50
(Z)- β -ocimen	1032	10,48	0,41
γ -terpinen	1054	11,14	3,32
terpinolen	1086	12,18	0,83
borneol	1165	14,87	0,73
Terpinen-4-ol	1174	15,29	1,18
carvacrol metil etar	1241	17,57	0,72
timol	1289	19,36	1,81
karvakrol	1298	19,84	63,60
(Z)-kariofilen	1408	23,21	2,59
γ -elemene	1434	24,26	0,39
9-epi-(E)-kariofilen	1464	25,11	0,42
β -bisabolen	1505	25,99	1,47
δ -amorfen	1511	26,4	0,31
spatulenol	1577	28,03	0,32
kariofilen oksid	1582	28,13	1,59
Total ID (%)			100
Broj komponenti			25

U etarskom ulju lovora dobijenom hidrodestilacijom (L_{HD}) identifikovano je 34 komponenti, i to: 19,68 % monoterpena, 78,77 % okidovanih monoterpena, 1,06 % seskviterpena i 0,53 % oksidovanih seskviterpena. Najzastupljenije komponente bile su: 1,8-cineol (33,4 %), linalool (16,0 %), α -terpinil acetat (13,8 %), sabinen (6,91 %), metil eugenol (5,32 %), α -pinen (4,39 %) i β -pinen (3,52 %) (tabela 23). Sličan hemijski sastav etarskog ulja lovora objavio je veći broj autora (Careda i sar., 2002; Dadaliolu i Evrendilek, 2004; Flamini i sar., 2007; Müller-Riebau i sar., 1997; Ozek i sar., 1998; Verdian-rizi, 2008; Yalçin i sar., 2007). Od 54 identifikovane komponente (93 %) u natkritičnom ekstraktu lovora najzastupljeniji su bili: oksidovani monoterpeni (43,2 %) i masne kiseline (31,13 %), optom seskviterpeni i njihovi oksidovani derivati (12,43 %). Najzastupljenije komponente bili su: metil linoleat (16,18 %), α -terpinil acetat (12,88 %), linalool (9,00 %), metil eugenol (8,67 %), metil arahidonat (6,28 %) i eugenol (6,14 %). U poređnom analizom hemijskog sastava etarskog ulja i natkritičnog ekstrakta lovora (L_{HD} i L_{NKE}) (tabela 36) može se zaključiti da je L_{NKE} sadržao više nego duplo manje monoterpenskih jedinjenja (43,89 %) u poređenju sa L_{HD} (98,4 %). Careda i sar. (2002) su ispitivali dinamiku izolacije pojedinih grupa jedinjenja u toku NKE za 4 h. Ustanovili su da se monoterpeni ekstrahuju gotovo u potpunosti u toku prvog sata ekstrakcije dok se količina oksidovanih monoterpena u vremenu neznatno smanjuje. U toku ekstrakcije se povećava količina izdvojenih seskviterpena dok se količina izdvojenih oksidovanih seskviterpena gotovo ne menja u toku 3 h.

Kada je reč o jedinjenjima koja se smatraju nosiocima antibakterijske aktivnosti, uzorak L_{NKE} je sadržao znatno više eugenola i metil eugenola i znatno manju količinu 1,8-cineola u odnosu na ranija ispitivanja hemijskog sastava ekstrakta lovora izolovanog NKE na sličnim uslovima (Carreda i sar., 2002). Ovo može biti rezultat primenjenog kraćeg vremena ekstrakcije (1,4 h) ili različitog porekla biljne sirovine.

Tabela 23 Hemijski sastav etarsko ulja (L_{HD}) i natkritičnog ekstrakta lovora (L_{NKE})

Components	RI	L _{NKE}	L _{HD}
<i>p</i> -ksilene	871,6	0,44	
α -tujen	919,2		0,55
α -pinen	924,8		4,39
kamfen	938,9		0,30
sabinen	965,0		6,91
β -pinen	967,2		3,52
dehidro-1,8-cineol	984,4		0,21
β -mircen	985,1		0,14
α -felandren	997,1		0,17
δ^3 -karen	1002,7		0,24
α -terpinen	1009,3		0,42
<i>p</i> -cimen	1017,7		0,41
limonen/ β -felandren	1020,9		1,59
1,8-cineol	1025,0	2,53	33,4
γ -terpinen	1051,3		0,74
<i>cis</i> -sabinen hidrat	1061,5	0,25	0,30
terpinolen	1080,7		0,33
linalool	1096,3	9,00	16,0
δ -terpineol	1161,0	0,49	0,57
terpinen-4-ol	1170,3	0,90	2,38
<i>p</i> -cimen-8-ol	1175,5	0,23	
α -terpineol	1184,5	2,54	2,83
nerol	1227,0	0,44	0,19
linalil acetat	1250,4	0,58	0,34
4-tujen-2 α -il acetat	1296,1	0,20	0,28
bornil acetat	1278,7	0,27	0,47
δ -terpinil acetat	1310,1	0,55	0,68
exo-2-hidroksicineol acetat	1335,8	0,31	0,20
α -terpinil acetat	1343,8	12,88	13,8
eugenol	1352,8	6,14	1,77
β -elemen	1383,8	0,69	
metil eugenol	1400,4	8,67	5,32
β -kariofilen	1409,8	0,87	0,43
α -guaian	1429,7	0,18	
α -humulen	1444,1	0,71	
allo-aromadendren	1451,2	0,16	
germakren D	1472,0	0,55	
β -selinen	1476,8	0,33	
biciklogermakren	1487,3	0,72	0,36
germakren A	1493,0	0,39	
γ -kadinen	1504,7	0,29	
δ -kadinen	1514,4	0,32	0,27
<i>trans</i> -kadina-1,4-dien	1522,5	0,41	
α -kadinen	1534,0	0,79	
dauca-5,8-dien	1565,9	0,56	
spatulenol	1567,9	0,79	0,27
kariofilen oksid	1572,7	0,46	0,26
viridiflorol	1581,4	0,49	
ledol	1592,3	0,21	
dihidro- <i>cis</i> - α -kopaene-8-ol	1608,7	0,20	
eremoligenol	1619,5	0,37	
β -eudesmol	1640,0	1,45	
šiobunol	1680,3	0,25	
sedanolid	1712,4	1,21	
neocnidilid	1717,7	0,36	
oplopanon	1729,1	0,17	
neofitadien izomer I	1806,8	0,26	
dehidrosausurea lakton	1823,8	0,35	

heksahidrofarnesil aceton	1835,0	0,40
metil palmitat ¹	1915,4	1,49
eremantin (vanillosimin)	1981,0	0,20
metil linoleat	2087,2	16,18
metil petroselinat ²	2092,2	5,95
fitol	2102,4	1,33
metil stearat ³	2117,5	1,23
metil arahidonat	2215,1	6,28

1-metil heksadekanoat; 2-metil *cis*-6-oktadekanoat; 3- metil oktadekanoat; RI-Kovačevi indeksi.

4.3. Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata

4.3.1. Antibakterijska aktivnost ekstrakata lišaja *U. barbata*

Antibakterijske aktivnosti ekstrakta izolovanih iz lišaja *U. barbata* primenom NKE na 30 MPa i na temperaturama 40 °C (U₄₀) i 60 °C (U₆₀), kao i čiste (+)-usninske kiseline (UA), ispitane su primenom mikrodilucione metode u bujonu, pri čemu su određene vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) prikazane u tabelama 24-27. U cilju ispitivanja mogućnosti primene natkritičnih ekstrakata lišaja *U. barbata* u formulacijama različitih preparata za lečenje kožnih infekcija u veterinarskoj i humanoj medicini ispitana je njihova aktivnost na stafilokoke (uključujući i MRSA sojeve), streptokoke i enterokoke (uključujući i VRE sojeve) (tabela 24). Natkritični ekstrakti *U. barbata* pokazali su jako do izuzetno jako antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka sa MIC vrednostima u osegu 1,25-160 µg/ml. Sojevi *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. uberis* i *S. equi* ssp. *zooepidermicus* bili su najosetljiviji na delovanje natkritičnih ekstrakata *U. barbata* (MIC=1,25-10,0 µg/ml). Sojevi *Staphylococcus* i *Enterococcus* vrsta kao i referentni soj *S. aureus* ATCC 11632 bili su osetljiviji na delovanje natkritičnog ekstrakta izolovanog na nižoj temperaturi (U₄₀). Oba ekstrakta pokazala su izuzetno jako antibakterijsko delovanje na MRSA sojeve sa MIC vrednostima od ≤1,25 µg/ml (*S. aureus* i *S. epidermidis*) do 40 µg/ml (*S. haemolyticus*) posebno ekstrakt izolovan na nižoj temperaturi (U₄₀).

Analizom hemijskog sastava primenom tečne hromatografije, utvrđen veći sadržaj usninske kiseline u uzorku U₆₀ nego u U₄₀ koji je pokazao jače antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve. Ovo ukazuje da, pored usninska kiselina, koja se smatra glavnim nosiocem antibakterijske aktivnosti, i druga jedinjenja doprinose ukupnoj antibakterijskoj aktivnosti natkritičnih ekstrakata *U. barbata* (tabela 19).

Tabela 24 MIC vrednosti ispitivanih ekstrakata na sojeve streptokoka, enterokoka i stafilokoka

#	izolovani soj	Poreklo	MIC (µg/ml)	
			U ₄₀	U ₆₀
1	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615		20	40
2	<i>S. uberis</i>	koža zamorca	5	10
3	<i>S. equi</i> ssp. <i>zooepidermicus</i>	koža psa	5	10
4	<i>E. faecalis</i> (VRE)	prepucijum psa	20	40
5	<i>E. faecalis</i> (VRE)	mozak psa	20	40
6	<i>E. faecalis</i> (VRE)	humani urin	20	40
7	<i>E. faecalis</i>	jetra miša	20	20
8	<i>S. intermedius</i>	uho psa	5	≤1,25
9	<i>S. epidermidis</i>	oko mačke	5	10
10	<i>S. intermedius</i>	oko psa	5	5

U₄₀-natkritični ekstrakt *U. barbata* izolovan na 40 °C; U₆₀- natkritični ekstrakt *U. barbata* izolovan na 60 °C

Na osnovu rezultata ispitivanja antibakterijske aktivnosti natkritičnih ekstrakata *U. barbata in vitro*, na MRSA sojeve (MIC vrednosti od ≤1,25 do 40 µg/ml) može se zaključiti da je ekstrakt U₄₀ pokazao jače delovanje na sojeve MRSA u odnosu na ostale ekstrakte *U. barbata* (tabela 25).

Tabela 25 MIC vrednosti ispitivanih ekstrakata na odabrane sojeve meticilin rezistentnih stafilokoka

#	Izolovani soj	Poreklo	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			U ₄₀	U ₆₀
1	<i>S. aureus</i>	bris uha psa	$\leq 1,25$	20
2	<i>S. haemolyticus</i>	bris nosa psa	20	40
3	<i>S. intermedius</i>	bris rane psa	20	20
4	<i>S. haemolyticus</i>	bris oka psa	5	10
5	<i>S. capitis</i>	bris uha psa	10	20
6	<i>S. haemolyticus</i>	bris rane mačke	20	40
7	<i>Staphylococcus netipiziran</i>	bris oka mačke	$\leq 1,25$	$\leq 1,25$
8	<i>S. epidermidis</i>	bris kože mačke	$\leq 1,25$	$\leq 1,25$
9	<i>S. haemolyticus</i>	bris uha mačke	10	20
10	<i>S. aureus</i>	bris kože mačke	20	40
11	<i>Staphylococcus netipiziran</i>	bris uha psa	10	20
12	<i>Staphylococcus netipiziran</i>	urin psa	20	10

U tabeli 26 prikazani su rezultati uporedne analize antibakterijske aktivnosti ekstrakata iz lišaja *U. barbata* izolovanih primenom različitih metoda ekstrakcije sa čistom usninskom kiselinom i komercijalnim sintetičkim antibioticima. Za razliku od natkritičnih ekstrakata iz lišaja *U. barbata*, koji su pokazali izuzetno jako antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka (MIC vrednosti za većinu sojeva bile u opsegu 1,25-40 $\mu\text{g/ml}$), etanolni ekstrakti pokazali su slabo (MIC vrednosti od 1280 $\mu\text{g/ml}$) do umereno jako antibakterijsko delovanje (MIC vrednosti od 80-640 $\mu\text{g/ml}$) (tabela 26).

Tabela 26 Uporedna analiza antibakterijske aktivnosti ekstrakata *U. barbata* izolovanih različitim metodama ekstrakcije

#	Izolovani soj	Poreklo	UA	U ₄₀	U ₆₀	U _M	U _P	U _{SE}	Eritromicin	Penicilin G	Ampicillin
1	<i>S. agalactiae</i> ATCC 27959	-	10	20	40	160	80	320	$\leq 0,015$	0,25	8
2	<i>S. uberis</i>	bris kože zamorca	10	5	10	80	320	80	>32	>8	128
3	<i>E. faecalis</i> (VRE)	bris prepucijum psa	40	20	40	1280	1280	640	1	>8	64
4	<i>E. faecalis</i> (VRE)	mozak psa	40	20	40	1280	1280	640	>32	>8	128
5	<i>E. faecalis</i> (VRE)	humani urin	40	20	40	1280	1280	640	0,5	>8	128
6	<i>S. aureus</i> ATCC 11632	-	40	40	80	640	640	320	0,5	4	64
7	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	40	160	160	640	640	320	0,25	1	8
8	<i>S. intermedius</i>	bris uha psa	10	5	$\leq 1,25$	320	320	80	0,125	0,125	0,06
9	<i>S. epidermidis</i>	bris oka mačke	10	5	10	320	160	80	0,25	1	16
10	<i>S. intermedius</i>	bris oka psa	40	5	5	320	160	80	0,5	0,5	8
11	<i>S. epidermidis</i>	bris kože psa	40	40	40	320	320	80	0,5	0,25	0,125
12	<i>S. aureus</i> (MRSA)	bris kože psa	20	5	160	320	320	320	>32	1	16
13	<i>S. aureus</i> (MRSA) ATCC 33591	-	80	5	160	80	80	160	0,5	4	8

Uporednom analizom antibakterijske aktivnosti ekstrakata iz lišaja *U. barbata* (tabela 26) pokazalo se da natkritični ekstrakt izolovan na 40 °C, U₄₀, ima jaču antibakterijsku aktivnost od čiste usninske kiseline, kao i od nekih komercijalnih sintetičkih antibiotika (pre svega ampicilina) na pojedine sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka (uključujući MRSA i VRE sojeve). Ekstrakt izolovan Sokslet ekstrakcijom (SE) je pokazao umereno jako do jako antibakterijsku aktivnost (MIC = 80-640 $\mu\text{g/ml}$), dok su etanolni ekstrakti dobijeni maceracijom (U_M) i perkolacijom (U_P) pokazali slabo (MIC = 1280 $\mu\text{g/ml}$) do umereno jako antibakterijsko delovanje (MIC = 80-640 $\mu\text{g/ml}$) na ispitivane sojeve enterokoka, stafilokoka i streptokoka.

Jače antibakterijsko dejstvo natkritičnih ekstrakata u odnosu na etanolne može se objasniti činjenicom da je u njima identifikovan znatno veći sadržaj usninske kiseline (36,5-59,5 %) u odnosu na etanolne ekstrakte (0,18-3,59 %) (tabela 19).

U cilju ispitivanja mogućnosti primene natkritičnih ekstrakata *U. barbata* i čiste usninske kiseline kao prezervativa od mikrobiološkog kvarenja u prehrambenoj industriji ispitano je njihovo delovanje na patogene iz hrane, stafilokoke izolovane iz sira i *Salmonella* sojeve iz uginulog pileta (tabela 27). Ispitivani sojevi *S. aureus* bili su najosetljiviji na prisustvo čiste usninske kiseline i natkritičnih ekstrakata *U. barbata*. *Salmonella* sojevi su pokazali malu osetljivost na čistu usninsku kiselinu i natkritične ekstrakte *U. barbata*. S druge strane, čista usninska kiselina imala je jače antibakterijsko delovanje na neke od ispitanih sojeva *S. aureus* od ceftriaksona (tabela 27).

Tabela 27 Delovanje natkritičnih ekstrakata *U. barbata* na patogene bakterije koje se prenose hranom

#	Izolovani soj	Poreklo	U ₄₀	U ₆₀	UA*	Ceftriakson
			MIC (µg/ml)			
1	<i>S. aureus</i>	sir	20	80	2,5 (2,5)	4
2	<i>S. aureus</i>	sir	20	320	2,5 (10)	4
3	<i>S. aureus</i>	sir	10	160	2,5 (2,5)	4
4	<i>S. aureus</i>	sir	20	320	5 (20)	2
5	<i>S. aureus</i>	sir	20	320	5 (10)	2
6	<i>S. aureus</i>	sir	10	320	5 (10)	2
7	<i>S. aureus</i>	sir	10	160	5 (5)	4
8	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	40	>1280	10 (40)	2
9	<i>S. Enteritidis</i>	uginulo pile	>1280	>1280	>1280	≤0,125
10	<i>S. Typhimurium</i>	uginulo pile	>1280	>1280	>1280	≤0,125
11	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	-	>1280	>1280	>1280	≤0,125

*MIC vrednosti u zagradama odnose se na nezagrejan rastvor usninske kiseline u DMSO (slabija rastvorljivost).

Weckesser i sar. (2007) su utvrdili izuzetno jako antibakterijsko delovanje čiste usninske kiseline i natkritičnog ekstrakta koji je sadržao 4 % usninske kiseline na izabrane sojeve anaerobnih bakterija, posebno na *S. aureus* (uključujući i sojeve MRSA), *Propionibacterium acnes* i *Corynebacterium* vrste, ukazujući na mogućnost njihove primene u preparatima za lečenje zapaljenskih oboljenja kože kao što su akne i seboreja. Najdenova i sar. (2001) su ispitivali stabilnost usninske kiseline dobijene prečišćavanjem natkritičnog ekstrakta (rekristalizacijom sa etanolom iz hloroformskog rastvora natkritičnog ekstrakta) kao i njene komercijalne soli natrijum usninata (BINAN) u sapunima, losionima i sprejevima kao i aktivnost ovih preparata na sojeve *S. aureus*.

4.3.2. Antibakterijska aktivnost etarskih ulja i natkritičnih ekstrakata ruzmarina, žalfije i timijana

U tabeli 28 prikazani su rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i natkritičnih ekstrakata iz odabranog začinskog bilja familije Lamiaceae (ruzmarin, žalfija i timijan) na odabrane patogene bakterije iz hrane.

Izolati ruzmarina bili su efikasniji od izolata žalfije u suzbijanju rasta *Enterococcus*, *Bacillus* i *Salmonella* sojeva. Ranija ispitivanja nekoliko grupa autora su, takođe, pokazala da etarsko ulje ruzmarina ima jače delovanje na *B. subtilis*, *Salmonella* Enteritidis i *E. coli* sojeve u odnosu na etarsko ulje žalfije (Bozin i sar., 2007; Gutierrez i sar., 2008; Weckesser i sar., 2007). Interesanto je da, i pored velike razlike u pogledu hemijskog sastava (tabela 20), etarska ulja i natkritični ekstrakti, kako ruzmarina, tako i žalfije, imaju slični i u nekim slučajevima isti antibakterijski efekat na ispitivane sojeve bakterija, sem u slučaju *Bacillus* i *Geobacillus* vrsta (tabela 28). Smatra se da antibakterijska aktivnost etarskog ulja i natkritičnog ekstrakta ruzmarina potiče od visokog sadržaja okidovanih monoterpena, pre svega borneola, kamfora i verbenona, kao i 1,8-cineola i α -pinena (Moghtader i Afzali, 2009; Santoyo i sar., 2005). S druge strane, smatra se da su glavni nosioci antibakterijske aktivnosti natkritičnog ekstrakta žalfije α - i β -pinen, kao i α -tujon (Menaker i sar., 2004), a etarskog ulja žalfije - kamfor, 1,8-cineol, α/β -tujon, eukaliptol i borneol (Hayouni i sar., 2008). U ovom radu, izolovana etarska ulja i natkritični ekstrakti su imali sličnu ili u nekim slučajevima istu antibakterijsku aktivnost

bez obzira na velike razlike u pogledu hemijskog sadržaja (naročito u slučaju ruzmarina i žalfije) (tabela 20), što ukazuje na doprinos različitih grupa jedinjenja ukupnoj antibakterijskoj aktivnosti.

Tabela 28 MIC vrednosti etarskih ulja i ekstrakata ruzmarina (R), žalfije (Ž) i timijana (T) na odabrane patogene iz hrane

#	Ispitivani soja ^a	Poreklo	R _{HD}	R _{NKE}	Ž _{HD}	Ž _{NKE}	T _{HD}	T _{NKE}	Hloramfenikol	Ciprofloksacin
MIC (µg/ml)										
1	<i>B. subtilis</i>	a	640	320	1280	1280	80	≤40	-	≤0,5
2	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	a	640	640	640	1280	80	≤40	-	≤0,5
3	<i>B. cereus</i>	a	320	640	160	2560	≤40	≤40	-	≤0,5
4	<i>E. faecium</i> 1	a	>1280	>1280	1280	1280	320	320	≤4	-
5	<i>E. faecium</i> 2	a	1280	1280	1280	1280	320	320	≤4	-
6	<i>E. faecium</i> 3	a	1280	1280	1280	2560	320	320	≤4	-
7	<i>E. coli</i> 1	b	>1280	>1280	>2560	>2560	640	640	≤4	-
8	<i>E. coli</i> 2	b	>1280	>1280	>2560	>2560	640	640	≤4	-
9	<i>E. coli</i> 3	b	>1280	>1280	>2560	>2560	640	640	≤4	-
10	<i>S. Enteritidis</i>	c	>1280	>1280	>2560	>2560	640	640	≤4	-
11	<i>S. Enteritidis</i>	c	>1280	>1280	>2560	>2560	640	640	≤4	-
12	<i>S. Enteritidis</i>	c	>1280	>1280	>2560	>2560	640	640	≤4	-

^aSvi sojevi *Bacillus* i *Enterococcus* vrsta izolovani su iz kravljeg mleka i sira; ^bSvi sojevi *E. coli* izolovani su iz uzoraka fecesa živine; ^cSvi sojevi *Salmonella* izolovani su iz ugrušaka neoplođenih jaja.

Od ispitivanih sojeva bakterija, *Bacillus* vrste su pokazale najveću osetljivost na sve testirane izolate, a posebno na etarsko ulje i natkritični ekstrakt timijana. Gram-pozitivne bakterije bile su osetljivije na prisustvo svih testiranih etarskih ulja i natkritičnih ekstrakata (tabela 28). Gram-negativne bakterije, generalno, pokazuju manju osetljivost na etarska ulja zbog hidrofилne spoljašnje membrane koja sprečava prodiranje hidrofobnih etarskih ulja u ćelijsku membranu bakterije (Burt, 2004, 2007). I pored toga, u ovom radu, ispitivana etarska ulja i natkritični ekstrakti timijana pokazali su umereno jaku antibakterijsku aktivnost i na Gram-negativne bakterije, *E. coli* i *Salmonella* Enteritidis (MIC = 640 µg/ml). Ispitivani sojevi bakterija bili su podjednako osetljivi na prisustvo etarskog ulja i natkritičnog ekstrakta timijana sem u *B. cereus* i *G. stearothermophilus* sojeva koji su bili osetljiviji na prisustvo natkritičnog ekstrakta timijana (tabela 28).

Smatra se da antibakterijska aktivnosti etarskog ulja timijana potiče od oksidovanih monoterpena, timola i karvakrola kao i njihovih biosintetičkih prekursora γ-terpinena i p-cimena (Al-Bayati, 2008; Burt, 2004, 2007; Bozin i sar., 2006; Gutierrez i sar., 2008; Michiels i sar., 2007). Ranija ispitivanja pokazala su da timol, karvakrol, p-cimen i terpinen imaju jako antibakterijsko delovanje na bakterije koje izazivaju kvarenje hrane i patogene bakterije (Burt, 2007; Burt, 2004; De Nobile i sar., 2008; Dorman i Deans, 2000; Michiels i sar., 2007). Jači antibakterijski efekat etarskog ulja i natkritičnog ekstrakta timijana u ovoj studiji, može se objasniti najvećim sadržajem oksidovanih monoterpena u poređenju sa izolatima ruzmarina i žalfije (tabela 21), posebno timola (39,7-48,5 %). Razlike u hemijskom sastavu natkritičnog ekstrakta i etarskog ulja timijana su manje izražene nego kod ruzmarina i žalfije. Naime, u etarskom ulju timijana, u ovom radu, timol, karvakrol i p-cimen koji se smatraju nosiocima antibakterijske aktivnosti činili su 77 % ukupnog sastava, dok je izolovani natkritični ekstrakt sadržao nešto manju količinu timola (39,7 %), slični sadržaj karvakrola (3,43 %) i znatno manju količinu p-cimene u odnosu na etarsko ulje (tabela 20).

U cilju ispitivanja doprinosa timola i p-cimena ukupnoj antibakterijskoj aktivnosti izolata timijana, u ovom radu je dalje ispitana antibakterijska aktivnost čistog timola, p-cimena kao i njihove mešavine. Odnos timola i p-cimena (1,9:1,0) je ispitivan u cilju utvrđivanja eventualnog sinergetskog efekta. Ovaj maseni odnos izabran je u skladu sa masenim odnosom ovih komponenti u izolovanom etarskom ulju timijana u ovom radu (tabela 21). Obzirom da natkritični ekstrakt timijana sadrži svega 0,37 % p-cimena, njegova aktivnost poređena je samo sa timolom. Antibakterijske aktivnosti timola, p-cimena i njihove mešave na sojeve *Enterococcus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Escherichia* i *Salmonella* vrste prikazane su u tabeli 29. Timol je pokazao značajno veću antibakterijsku aktivnost u poređenju sa p-cimenom na sve testirane sojeve. Vrednosti MIC mešave timijana i p-cimena bile su između MIC vrednosti za timol i p-cimen (MIC=160-320 µg/ml) ukazujući da ne postoji sinergetski efekat za izabrani maseni odnos timola i p-cimena.

S druge strane, izolati timijana, a posebno natkritični ekstrakt pokazali su jače antibakterijsko delovanje na sojeve *Bacillus* vrsta u poređenju sa aktivnošću čistih komponenti, timola, i *p*-cimena i njihove smeše ukazujući na sinergetski efekat drugih jedinjenja u ekstraktu. Timol i smeša timola i i *p*-cimena imali su jače antibakterijsko delovanje na sojeve *Enterococcus*, *E. coli* i *Salmonella* u poređenju sa etarskim uljem i natkritičnim ekstraktom timijana što ukazuje da timol najviše doprinosi antibakterijskoj aktivnosti izolat timijana.

Tabela 29 Antimikrobne aktivnosti timola, *p*-cimena i njihove mešavine na različite sojeve patogena iz hrane

Ispitivani soj ^a	timol	MIC (µg/ml)	
		timol+ <i>p</i> -cimen (1,9:1)	<i>p</i> -cimen
<i>B. cereus</i>	160	160	2560
<i>G. stearotermophilus</i>	160	160	2560
<i>B. subtilis</i>	160	160	2560
<i>E. faecium</i> 1	160	320	2560
<i>E. faecium</i> 2	160	320	2560
<i>E. faecium</i> 3	160	320	2560
<i>E. coli</i> 1	320	320	1280
<i>E. coli</i> 2	160	320	1280
<i>E. coli</i> 3	160	320	1280
<i>S. Enteritidis</i> 1	320	320	2560
<i>S. Enteritidis</i> 2	320	640	2560
<i>S. Enteritidis</i> 3	320	640	2560

^aSvi sojevi *Bacillus* i *Enterococcus* vrsta izolovani su iz kravljeg mleka i sira; ^bSvi sojevi *E. coli* izolovani su iz uzoraka fecesa živine; ^cSvi sojevi *Salmonella* izolovani su iz ugrušaka neoplođenih jaja.

Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i natkritičnih ekstrakata žalfije i timijana na sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka uključujući i meticilin rezistentne stafilokoke prikazani su u tabelama 30 i 31. Natkritični ekstrakt žalfije pokazao je umereno jako antibakterijsko delovanje na *S. intermedius*, *S. epidermidis* i *S. aureus* dok je etarsko ulje žalfije nije pokazalo značajni antibakterijski efekat na ispitivane sojeve.

Tabela 30 MIC vrednosti ispitivanih ekstrakata žalfije (*Salvia officinalis*) na odabrane sojeve bakterija

#	Ispitivani soj	Poreklo	MIC (µg/ml)	
			Ž _{NKE}	Ž _{HD}
1	<i>S. aureus</i> ATCC 11632	-	-	2560
2	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	640	2560
3	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	-	-	2560
4	<i>S. agalactiae</i> ATCC 27959	-	-	2560
5	<i>S. equi</i> ssp. <i>Zooepidermicus</i>	koža psa	-	2560
6	<i>S. uberis</i>	koža zamorca	-	2560
7	<i>S. epidermidis</i> 1	humani urin	320	1280
8	<i>S. epidermidis</i> 2	bris rane psa	1280	>2560
9	<i>S. intermedius</i>	bris oka psa	640	1280
10	<i>S. intermedius</i>	uho psa	-	320
11	<i>S. epidermidis</i>	oko mačke	-	320
12	<i>S. intermedius</i>	oko psa	-	320
13	<i>S. caitis</i> (MRSA)	uho psa	-	1280
14	<i>S. haemolyticus</i> (MRSA)	oko psa	-	1280
15	<i>S. haemolyticus</i> (MRSA)	nos psa	-	1280
16	<i>S. epidermidis</i> (MRSA)	koža mačke	-	1280
17	<i>E. faecalis</i> (VRE)	prepucijum psa	-	2560
18	<i>E. faecalis</i> (VRE)	mozak psa	-	2560
19	<i>E. faecalis</i> (VRE)	humani urin	-	2560
20	<i>E. faecalis</i>	jetra miša	-	2560

Za razliku od natkritičnog ekstrakta timijana koji nije pokazao antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve stafilokoka (izuzev na *S. intermedius*), streptokoka i enterokoka uključujući i MRSA i VRE sojeve

(tabela 31), etarsko ulje timijana imalo umereno jako antibakterijsko delovanje sa MIC vrednostima od 160-640 µg/ml sem u slučaju sojeva streptokoka.

Tabela 31 MIC vrednosti ispitivanih izolata timijana (*Thymus vulgaris*) na odabrane sojeve bakterija

#	Ispitivani soj	Poreklo	T _{HD}	MIC (µg/ml)	
				T _{NKE}	
1	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	-	1280	2560	
2	<i>S. agalactiae</i> ATCC 27959	-	1280	2560	
3	<i>S. uberis</i>	koža zamorca	1280	2560	
4	<i>S. equi</i> ssp. <i>zooepidermicus</i>	koža psa	1280	2560	
5	<i>E. faecalis</i> (VRE)	prepucijum psa	640	2560	
6	<i>E. faecalis</i> (VRE)	mozak psa	640	2560	
7	<i>E. faecalis</i> (VRE)	humani urin	640	1280	
8	<i>E. faecalis</i>	jetra miša	640	2560	
9	<i>S. aureus</i> ATCC 11632	-	160	>2560	
10	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	640	>2560	
11	<i>S. intermedius</i>	uho psa	160	1280	
12	<i>S. capitis</i> (MRSA)	uho psa	320	>2560	
13	<i>S. haemolyticus</i> (MRSA)	oko psa	320	2560	
14	<i>S. haemolyticus</i> (MRSA)	nos psa	320	2560	
15	<i>S. epidermidis</i> (MRSA)	koža mačke	320	2560	
16	<i>S. epidermidis</i>	oko mačke	160	1280	
17	<i>S. intermedius</i>	oko psa	160	320	
18	<i>S. epidermidis</i>	koža psa	640	1280	

5.3.3. Antibakterijska aktivnost natkritičnih ekstrakata origana i karanfilića

U tabeli 32 prikazana je antibakterijska aktivnost natkritičnih ekstrakata izolovanih iz osušenih listova origana i pupoljaka karanfilića na odabrane sojeve bakterija. Na osnovu vrednosti MIC može se zaključiti da je natkritični ekstrakt origana imao jako antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka, kao i na meticilin rezistentne stafilokoke. Natkritični ekstrakt origana pokazao je najjaču antibakterijsku aktivnost na referentne *S. pyogenes* i *S. agalactiae* sojeve (MIC=2,5 µg/ml) kao i na *S.intermedius* i *S.aureus* (MRSA) sojeve (MIC=10,0 µg/ml).

Tabela 32 MIC vrednosti ispitivanih ekstrakata origana (O) i karanfilića (C) na odabrane sojeve bakterija

#	Ispitivani soj	Poreklo	O	C
1	<i>S.intermedius</i>	uho psa 898/09	10	160
2	<i>S.aureus</i>	bris nosa, čovek, 891/09	20	640
3	<i>S.intermedius</i>	koža psa, 890/09	20	160
4	<i>S.intermedius</i>	koža psa, 895/09	10	160
5	<i>S.aureus</i> (MRSA)	bris rane psa, 185/07	10	320
6	<i>S.haemolyticus</i> (MRSA)	bris uha mačke, 666/08	40	320
7	<i>S.aureus</i> ATCC 11632	-	20	640
8	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	-	2,5	10
9	<i>S. agalactiae</i> ATCC 27956	-	2,5	640
10	<i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	ljudski urin, 1228/08	40	1280
11	<i>Enterococcus</i> sp.	Jetra miša, 1084/08	80	1280
12	<i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	ljudski urin, 1218/08	40	640
13	<i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	mozak, štene, 166/09	80	1280
14	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidermicus</i>	koža psa	5	320

Jaka antibakterijska aktivnost natkritičnog ekstrakta origana može se objasniti visokim sadržajem karvakrola (57 %), timola (6,0 %) i timohinona (13,3 %). Natkritični ekstrakt karanfilića pokazao izuzetno jaku

antibakterijsku aktivnost na *Streptococcus agalactiae* (MIC=10,0 µg/ml), umerenu aktivnost na ispitivane sojeve stafilokoka i streptokoka (MIC=160-640 µg/ml) i slabu aktivnost na ispitivane sojeve enterokoka. Antibakterijska aktivnost karanfilca rezultat je visokog sadržaja, pre svega, eugenola (64 %) , potom *trans*-kariofilena (13 %) i eugenil acetata (23,6 %) (tabela 52). Slabiji antibakterijski efekat natkritičnog ekstrakta karanfilca u odnosu na origano može se objasniti slabijim antibakterijskim delovanjem eugenola u odnosu na karvakrol i timol (Michiels i sar., 2007).

5.3.4. Antibakterijska aktivnost etarskog ulja i natkritičnog ekstrakta lovora

Na osnovu vrednosti MIC prikazanih u tabeli 33, može se zaključiti da su etarsko ulje i natkritični ekstrakt lovora (L_{HD} i L_{NKE}) pokazali isti antibakterijski efekat na ispitivane sojeve bakterija. Izolati lovora pokazali su umereno do slabo antibakterijsko delovanje na *S. intermedius* i *S. aureus* sojeve (MIC=640-1280 µg/ml) pri čemu je jedan od ispitivanih *S. intermedius* sojeva bio osetljiviji na prisustvo L_{HD} i L_{NKE} MIC vrednošću od 640 µg/m. Etarsko ulje i natkritični ekstrakt lovora pokazali su slabo dejstvo na ispitivane *Salmonella* Enteritidis sojeve (MIC>1280 µg/m).

Na osnovu ranije objavljenih radova u literaturi (Dorman i Deans, 2000), nosioci antibakterijske aktivnosti izolovanog etarskog ulja i natkritičnog ekstrakta lovora mogli bi biti linalool (L_{NKE} - 9,00 %, L_{HD} - 16,0 %), α-terpinil acetat (L_{NKE} - 12,88 %; L_{HD} - 13,8 %), metil eugenol (L_{NKE} - 8,67 %; L_{HD} - 5,32 %), eugenol (L_{NKE} - 6,14 %; L_{HD} - 1,77 %) i α-terpineol (L_{NKE} - 2,54 %; L_{HD} - 2,83 %) (tabela 23). U natkritičnom ekstraktu lovora identifikovan je visok sadržaj metil estara (metil linoleata, 16,18 %; metil arahidonata, 6,28%). Poznato je, takođe, da eugenol ima jako antibakterijsko dejstvo (Leite i sar., 2007). Masne kiseline i njihovi estri takođe mogu imati antibakterijsko i antigljivično dejstvo (Agoramoorthy i sar., 2007). Natkritični ekstrakt lovora u ovom radu imao sadržao je malu količinu 1,8-cineola u odnosu na etarsko ulje, ali je, s druge strane, imao visok sadržaj eugenola, metil eugenola i metil estara koji su najverovatnije doprineli njegovoj antibakterijskoj aktivnosti (tabela 23).

Tabela 33 MIC vrednosti ispitivanih ekstrakata lovora (*Laurus nobilis*) na odabrane sojeve bakterija

#	Ispitivani soj	Poreklo	MIC (µg/ml)	
			L _{HD}	L _{NKE}
1	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	1280	1280
2	<i>S. intermedius</i>	uho psa	640	640
3	<i>S. intermedius</i>	uho psa	1280	1280
4	<i>S. aureus</i>	feta sir	1280	1280
5	<i>S. aureus</i>	mleko	1280	1280
6	<i>S. aureus</i>	grlo čoveka	1280	1280
7	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	-	>1280	>1280
8	<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	>1280	>1280

4.3.5. Antibakterijska aktivnost etanolnih ekstrakata timijana i origana

U cilju ispitivanja mogućnosti primene etanolnih ekstrakata origana i timijana u prehrambenoj industriji, ispitana je njihova antibakterijska aktivnost na neke patogene bakterije izolovane iz uzoraka hrane (tabela 34). Etanolni ekstrakti timijana i origana dobijenih ekstrakcijom po Soksletu i ultrazvučnom ekstrakcijom pokazali su umereno jako (O_{UZE}) do jako antibakterijsko delovanje na sojeve *Staphylococcus aureus* izolovanih iz uzoraka sira. Ekstrakti izolovani Sokslet ekstrakcijom pokazali su jače antibakterijsko delovanje na ispitane sojeve stafilokoka (MIC = 8-64 µg/ml) u odnosu na ekstrakte izolovane ultrazvučnom ekstrakcijom. Za razliku od etanolnog ekstrakta timijana dobijenog UZE koji je pokazao jako antibakterijsko delovanje (MIC = 16-64 µg/ml), O_{UZE} je pokazao umereno jako antibakterijsku aktivnost na iste testirane sojeve stafilokoka (MIC = 512 µg/ml).

Tabela 34 MIC vrednosti etanolnih ekstrakata timijana (*Thymus vulgaris*) i origana (*Origanum vulgare*)

#	Ispitivani soj ^a	T _{SE}	T _{UZE}	O _{SE}	O _{UZE}
MIC (µg/ml)					
1	<i>S. aureus</i>	32	64	16	512
2	<i>S. aureus</i>	32	64	32	512
3	<i>S. aureus</i>	32	64	32	512
4	<i>S. aureus</i>	32	64	16	512
5	<i>S. aureus</i>	32	64	64	512
6	<i>S. aureus</i>	16	32	32	512
7	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	8	16	16	512
8	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	16	32	16	512

^a*Staphylococcus aureus* (# 1-6 izolovane su iz uzoraka sira)

Uporedni prikaz rezultata ispitivanja antibakterijske aktivnosti ekstrakata origana izolovanih različitim metodama ekstrakcije prikazani su u tabeli 35.

Tabela 35 Uporedna analiza antibakterijske aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata origana (*Origanum vulgare*) izolovanih UZE, SE i NKE na patogene vrste bakterija koje izazivaju alimentarne infekcije

#	Ispitivani soj	Poreklo	O _{UZE}	O _{HD}	O _{SE}	O _{NKE}
MIC (µg/ml)						
1	<i>S. Enteritidis</i>	J.A. feces živine	256	512	256	1024
2	<i>S. Enteritidis</i>	Ž. Feces živine	512	256	512	512
3	<i>S. Enteritidis</i>	V. Feces živine	256	256	256	512
4	<i>S. Typhimurium</i>	J.A. feces živine.	128	256	256	512
5	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	-	512	512	512	1024
6	<i>S. aureus</i>	sir	512	512	64	256

Etanolni ekstrakti i etarsko ulje origana pokazali su umereno jako antibakterijsko delovanje na testirane *Salmonella* sojeve (MIC = 128-512 µg/ml) za razliku od natkritičnog ekstrakta organa koji je imao slabo do umereno jako antibakterijsko delovanje na iste sojeve. *S. aureus* soj je bio najosetljiviji na prisustvo ekstrakta origana dobijenog Sokslet ekstrakcijom (O_{SE}).

4.3.6. Antibakterijska aktivnost ekstrakata anđelike, divizme, ehinacee i nevena

Uporedni prikaz rezultata ispitivanja antibakterijske aktivnosti etanolnih i natkritičnih ekstrakata anđelike, divizme i ehinacee na određene vrste bakterije dat je u tabeli 36. Za razliku od natkritičnih ekstrakata, ekstrakti divizme dobijeni pomoću UZE i SE bili su u sprasenom stanju i potpuno rastvorljivi u vodi.

Na ispitivane sojeve Gram-negativnih bakterija ekstrakti nisu pokazali dejstvo pri ispitivanim koncentracijama, što je posledica različite strukture i sastava ćelijskog zida Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, pa zato i različite propustljivosti njihovih membrana (Burt, 2007).

Gram-pozitivne bakterije bile su najosetljivije na prisustvo ekstrakata anđelike, potom divizme i u najmanjoj meri na ekstrakte ehinacee (sem E_{UZE} koji je pokazao umerenu antibakterijsku aktivnost). Ekstrakti A_{UZE}, A_{NKE}, D_{UZE} i E_{UZE} pokazali su umerenu antibakterijsku aktivnost na ispitivane *Saphyloccous* vrste (MIC = 160-640 µg/ml) pri čemu je A_{UZE} imao znatno jače antibakterijsko delovanje na *S. epidermidis* (MIC ≤ 40 µg/ml).

Tabela 36 MIC vrednosti ispitivanih ekstrakata anđelike (A), divizme (D) i ehinacee (E) na odabrane sojeve bakterija

#	Ispitivani soj	Poreklo	A _{UZE}	A _{NKE}	D _{UZE}	D _{SE}	D _{NKE}	E _{UZE}	E _{SE}	E _{NKE}
1	<i>S. epidermidis</i>	Bris kože psa	≤40	320	1280	640	>2560	320	>2560	>2560
2	<i>S. haemolyticus</i>	bris uha mačke	320	320	640	320	>2560	2560	>2560	2560
3	<i>S. aureus</i>	Uzorak mleka krave sa mastitisom	320	320	640	320	>2560	>2560	>2560	2560
4	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	1280	640	640	160	>2560	2560	>2560	2560
5	<i>Enterobacter cloacae</i>	bris kože, svinja	>2560	>2560	>2560	>2560	>2560	>2560	>2560	>2560
6	<i>E.coli</i>	humani urin	>2560	>2560	>2560	>2560	>2560	>2560	>2560	>2560

A_{NKE} i E_{NKE}-natkritični ekstrakti anđelike i ehinacee izolovani na 15 MPa i 40°C; D_{NKE}-natkritični ekstrakt divizme izolovan na 30MPa i 40°C.

Etanolni ekstrakti izolovani iz cveta divizme pomoću Sokslet i ultrazvučne ekstrakcije pokazali su jače antibakterijsko delovanje na testirane sojeve stafilokoka izolovanih iz uzoraka sira (MIC = 64-256 µg/ml) u odnosu na ekstrakte koji su izolovani istim metodama iz nadzemnog dela divizme na stafilokoke izolovane iz briseva kože psa, uha mačke i uzoraka mleka krave sa mastitisom (MIC = 160-2560 µg/ml) (tabela 37).

Tabela 37 MIC vrednosti etanolnih ekstrakata cveta divizme

#	Ispitivani soj ^a	D _{SE}	D _{UZE}
1	<i>S. aureus</i>	128	256
2	<i>S. aureus</i>	128	256
3	<i>S. aureus</i>	128	256
4	<i>S. aureus</i>	64	128
5	<i>S. aureus</i>	64	128
6	<i>S. aureus</i>	128	128
7	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	128	128
8	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	128	128

^asojevi stafilokoka (#1-6) izolovani su iz uzoraka sira.

Etanolni ekstrakt (UZE) i natkritični ekstrakt nevena izolovan na nižem pritisku (pri nižoj gustini CO₂), N_{1NKE}, pokazali su umereno antibakterijsko delovanje na ispitivane *Saphylococcus* i *Streptococcus* vrste (MIC = 160-640 µg/ml) (tabela 38). Ekstrakt izolovan na većem pritisku (pri većoj gustini CO₂) i etanolni ekstrakt izolovan ekstrakcijom po Soksletu (N_{SE}) su pokazali slabo antibakterijsko delovanje na sve ispitivane sojeve bakterija izuzev *Streptococcus pyogenes*. *Enterococcus* vrste su bile najmanje osetljive na prisustvo svih ispitivanih ekstrakata nevena. Najveću antibakterijsku aktivnost imali su N_{UZE} i N_{1NKE} (MIC = 160 µg/ml). Slabija antibakterijska aktivnost ekstrakta nevena izolovanog pri višem pritisku, kao i ekstrakta izolovanog SE sa etanolom, rezultat su slabije selektivnosti CO₂ veće gustine odnosno etanola kao rastvarača ka jedinjenjima manjih molekulskih masa koja se smatraju nosiocima antibakterijske aktivnosti.

Tabela 38 MIC vrednosti ispitivanih ekstrakata nevena (*Calendula officinalis*) na odabrane sojeve bakterija

#	Ispitivani soj	Poreklo	N _{UZE}	N _{SE}	N _{1NKE}	N _{2NKE}
1	<i>S.intermedius</i>	-	640	>2560	640	2560
2	<i>S.aureus</i>	bris nosa, čovek, 981/09	2560	>2560	>2560	2560
3	<i>S.intermedius</i>	koža psa, 890/0	320	>2560	640	1280
4	<i>S.intermedius</i>	koža psa, 895/09	320	>2560	640	2560
5	<i>S.aureus</i> (MRSA)	bris rane psa, 185/07	1280	>2560	2560	2560
6	<i>S.haemolyticus</i> (MRSA)	bris uha mačke, 666/08	2560	>2560	2560	2560
7	<i>S.aureus</i> ATCC 11632	-	1280	>2560	1280	2560

8	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	-	320	1280	320	640
9	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 27956	-	640	>2560	640	2560
10	<i>Enterococcus sp.</i> (VRE)	-	>2560	>2560	>2560	>2560
11	<i>Enterococcus sp.</i>	jetra miša, 1084/08	>2560	>2560	>2560	>2560
12	<i>Enterococcus sp.</i> (VRE)	humani urin, 1218/08	>2560	>2560	>2560	>2560
13	<i>Enterococcus sp.</i> (VRE)	mozak, štene, 166/09	2560	>2560	2560	2560
14	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidermicus</i>	koža psa	320	>2560	320	2560
15	<i>Streptococcus uberis</i>	koža, zamorac, 1118/09	160	>2560	160	2560

N1_{NKE}-natkritični ekstrakt nevena izolovan na 10 MPa i 40°C; N2_{NKE}-natkritični ekstrakt nevena izolovan na 20 MPa i 40°C.

4.4. Izbor biljnih sirovina i tehnologija za dobijanje ekstrakata sa jakim antibakterijskim delovanjem na osnovu antibakterijskih ispitivanja

Na osnovu rezultata prikazanih u odeljku 5.3. može se zaključiti je ekstrakt izolovan iz lišaja *U. barbata* pomoću ekstrakcije sa NK CO₂ na 30 MPa i 40 °C (U₄₀) pokazao najjače antibakterijsko delovanje na testirane sojeve stafilokoka (uključujući MRSA sojeve), enterokoka (uključujući VRE sojeve) sa MIC vrednostima od 1,25 µg/ml do 40 µg/ml. Natkritični ekstrakt *U. barbata* - U₄₀ je pokazao jače antibakterijsko delovanje od čiste usninske kiseline kao i od komercijalnih sintetičkih antibiotika (eritromicin, penicilin G i ampicilin) na pojedine sojeve (tabela 26). Iz tog razloga, u ovoj studiji je dalje detaljno ispitana i analizirana kinetika NKE iz *U. barbata* kao i mogućnosti optimizacije procesa NKE sa aspekta povećanja brzine ekstrakcije i uštede natkritičnog fluida. Isti ekstrakt je, takođe, korišćen za namešavanje sa etarskim uljem timijana i ekstraktima anđelike, koji su pokazali umerenu do jaku antibakterijsku aktivnost (MIC= 40-640 µg/ml) u različitim odnosima, a u cilju ispitivanja postojanja sinergetskog efekta kod datih smeša.

Pored U₄₀, natkritični ekstrakt i etarsko ulje timijana pokazali su jako (*Bacillus* vrste, MIC=40-80 µg/ml) i umereno jako antibakterijsko delovanje na (enterokoke, *Sallmonela* i *E. coli* sojeve, MIC=320-640 µg/ml). Natkritični ekstrakti ruzmarina i žalfije pokazali su umereno jako delovanje na bacile iz hrane (MIC=160-640 µg/ml) kao i na sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka uključujući MRSA i VRE sojeve (Ž_{NKE}). Natkritični ekstrakt origana je, takođe, pokazao jaku (MIC=2,5-512 µg/ml), a natkritični ekstrakt karanfilića umerenu antibakterijsku aktivnost na iste sojeve. Iz tog razloga u studiji su, takođe, prikazani rezultati ispitivanja i analize kinetike NKE iz timijana, origana, ruzmarina, NKE iz mešavine origana i karanfilića u cilju ispitivanja uticaja pojedinih biljnih vrsta (njihovih glavnih komponenti) na povećanje moći rastvaranja NK CO₂ i povećanje brzine ekstrakcije ali i izolacije mešavina ekstrakata sa pojačanim antibakterijskim delovanjem.

Ekstrakcijom u Sokslet aparaturi i ultrazvučnom ekstrakcijom sa etanolom se, takođe, mogu izolovati ekstrakti sa umerenim (divizma) do jakim (timijan i origano) antibakterijskim delovanjem na stafilokoke, tako da je u ovoj studiji takođe ispitana i analizirana kinetika ovih procesa.

Pored ispitivanja kinetike, procesi ekstrakcija sa NK CO₂ i sa etanolom, kojima su izolovani ekstrakti sa umereno do jakim antibakterijskim efektom (iz timijana, origana i divizme), analizirani su sa aspekta energetske efikasnosti primenom eksperimentalne analize, pri čemu su analizirani maksimalni korisni rad u gubici eksperimentalne energije po 1 kg izolovanog ekstrakta.

4.5. Antibakterijska aktivnost smeša ekstrakata

U cilju ispitivanja pojačanog antibakterijskog delovanja smeša ekstrakata (sinergetski efekat), u ovoj studiji, vršeno je namešavanje ekstrakata i etarskih ulja koji su pokazali najjače antibakterijsko dejstvo na ispitivane sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka, uključujući MRSA i VRE sojeve. Za namešavanje ekstrakata izabrani su natkritični ekstrakt iz lišaja *U. barbata* (U_{40}) koji je pokazao izuzetno jaku antibakterijsku aktivnost (MIC = 1,25-40 $\mu\text{g/ml}$ za većinu sojeva), etarsko ulje timijana (T_{HD}), koje je pokazalo umerenu do jaku antibakterijsku aktivnost (MIC=40-640 $\mu\text{g/ml}$), i natkritični i etanolni ekstrakt anđelike (A_{NKE} i A_{UZE}), koji su pokazali slabu do umereno jaku antibakterijsku aktivnost (MIC,=,320-1280 $\mu\text{g/ml}$). Odnosi navedenih komponenta u smešama, kao i odgovarajuće MIC vrednosti prikazane su u tabeli 39.

Obzirom da su dobijene vrednosti MIC za dvo- i trokomponente smeše bile između vrednosti MIC za pojedinačne U_{40} , T_{HD} i A_{NKE} (A_{UZE}) može se zaključiti da ne postoji sinergetski efekat kod odabranih smeša pri datom odnosu izabranih biljnih ekstrakata i ulja. Imajući u vidu rezultate antibakterijske aktivnosti T_{HD} , kao i A_{NKE} i A_{UZE} prikazanih u tabelama 28 i 36 (160-1280 $\mu\text{g/ml}$ i 320-2560 $\mu\text{g/ml}$, respektivno), može se zaključiti da se njihovo antibakterijsko dejstvo na ispitivane sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka može poboljšati dodatkom U_{40} u ovde ispitanom odnosu.

Tabela 39 Antibakterijsko delovanje čistog etarskog ulja timijana (T_{HD}) i njegovih mešavina sa natkritičnim ekstraktom lišaja *U. barbata* (U_{40}) i ekstraktima anđelike (A_{UZE} i A_{NKE})

#	Ispitivani soj	Poreklo	U_{40}	T_{HD}	$U_{40}:T_{HD}$		$U_{40}:T_{HD}:A_{NKE}$		$U_{40}:T_{HD}:A_{UZE}$
					1:1	7:3	2:2:1		2:2:1
					MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
1	<i>S.intermedius</i>	uho psa 898/09	5	640	10	5	10	10	10
3	<i>S.intermedius</i>	koža psa, 890/09	-	640	5	10	10	10	10
5	<i>S.aureus</i> (MRSA)	bris rane psa, 185/07	5	320	40	40	40	40	40
6	<i>S.haemolyticus</i> (MRSA)	bris uha mačke, 666/08	10	640	80	40	160	160	160
7	<i>S.aureus</i> ATCC 11632	-	40	320	80	80	80	80	40
8	<i>S.pyogenes</i> ATCC 19615	-	20	320	40	40	320	320	320
9	<i>S.agalactiae</i> ATCC 27959	-	20	640	160	160	320	320	320
10	<i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	ljudski urin	20	1280	40	40	80	40	40
11	<i>Enterococcus</i> sp.	Jetra miša	20	1280	40	40	20	40	40
13	<i>Enterococcus</i> sp (VRE)	mozak, štene	20	1280	40	40	40	40	40
14	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidermicus</i>	koža psa	5	320	160	160	160	160	160
15	<i>S. uberis</i>	Koža, zamorca, 1118/09	5	1280	80	40	40	40	40

Od ispitanih mešavina, najjače antibakterijsko delovanje pokazale su mešavine natkritičnog ekstrakta *U.barbata* (U_{40}) i etarskog ulja timijana (T_{HD}) u odnosu 1:1 i 7:3. Mešavina $U_{40}:T_{HD}$ u odnosu 1:1 pokazala je izrazito jako antibakterijsko delovanje na soj *S. intermedius* poreklom sa kože psa sa dobijenom vrednosti MIC od 5 $\mu\text{g/ml}$. Takođe, vrlo jako antibakterijsko delovanje navedena mešavina ekstrakata ispoljila je na soj *S. intermedius* poreklom iz uha psa, sa dobijenom vrednosti MIC od 10 $\mu\text{g/ml}$. Vrednosti MIC navedene mešavine ekstrakata za najveći broj sojeva iznosile su od 40 do 80 $\mu\text{g/ml}$, što se smatra jakim antibakterijskim delovanjem. Umereno antibakterijsko delovanje ispitivane mešavine $U_{40}:T_{HD}$ imale su na sojeve *Streptococcus agalactiae* ATCC 2795 i *Streptococcus equi* ssp. *zooepidermicus* poreklom sa kože psa sa dobijenom vrednosti MIC od 160 $\mu\text{g/ml}$. Ispitivana mešavina $U_{40}:T_{HD}$ (7:3) imala je podjednako jako delovanje na većinu ispitivanih sojeva bakterija sa dobijenim identičnim vrednostima MIC.

Umereno do jako antibakterijsko delovanje na testirane sojeve bakterija imale su mešavine $U_{40}:T_{HD}:A_{NKE}$ (2:2:1) i $U_{40}:T_{HD}:A_{UZE}$ (2:2:1) sa dobijenim vrednostima MIC od 10 $\mu\text{g/ml}$ do 320 $\mu\text{g/ml}$. Ove mešavine ekstrakata su, takođe, imale izraženo antibakterijsko delovanje na sojeve *S. intermedius* poreklom sa uha i kože psa i *S.aureus* (MRSA) iz brisa rane psa (MIC = 10-40 $\mu\text{g/ml}$).

Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom

Može se reći da su ispitivani ekstrakti tj. njihove mešavine najslabije delovale na streptokoke i enterokoke jer su dobijene vrednosti MIC svih mešavina ekstrakata za većinu sojeva iznosile 40 µg/ml do 320 µg/ml.

4.6. Kinetika i matematičko modelovanje NKE

U ovom odeljku prikazani su rezultati ispitivanja kinetike procesa NKE kojima su izolovani ekstrakti sa jakim antibakterijskim dejstvom. Za analizu kinetike NKE procesa korišćeni su odgovarajući matematički modeli prethodno opisani u odeljku 3.3. S tim u vezi, prikazani su odgovarajući parametri matematičkih modela kojima se opisuje prenos mase u NK CO₂ i čvrstoj fazi.

Ispitana je kinetika i mogućnost optimizacije procesa NKE iz lišaja *U. barbata*, čiji su natkritični ekstrakti pokazali najjaču antibakterijsku aktivnost, sa aspekta povećanja prinosa i brzine ekstrakcije. Pored toga, prikazani su rezultati ispitivanja i analize kinetike NKE iz ruzmarina, žalfije i timijana, čiji su natkritični ekstrakti takođe pokazali umereno do jako antibakterijsko delovanje.

4.6.1. Kinetika i matematičko modelovanje NKE lišaja iz *U. barbata*

U ovoj disertaciji, ispitan je uticaj temperature na kinetiku NKE iz lišaja *U. barbata* na pritisku od 30 MPa kao i uticaj predtretmana varijacije pritiska na prinos i brzinu ekstrakcije na istim uslovima pritiska i temperature (30 MPa; 40 °C). Predtretman biljnog materijala, koji je primenjivan neposredno pre kontinualne NKE, sastojao se u izlaganju sirovine natkritičnom fluidu (1 h) na 40 °C i 15 MPa bez proticanja fluida, nakon čega je izvršena nagla dekompresija do pritiska u boci sa CO₂, odnosno do 6 MPa (P1), ili do atmosferskog pritiska, 0,1 MPa (P2). U tabeli 40 prikazani su ostvareni prinosi natkritičnih ekstrakata iz lišaja *U. barbata* na pritisku od 30 MPa i temperaturama 40 °C i 60 °C, sa i bez primene predtretmana biljnog materijala.

Tabela 40 Prinosi natkritičnih ekstrakata iz lišaja *U. barbata*

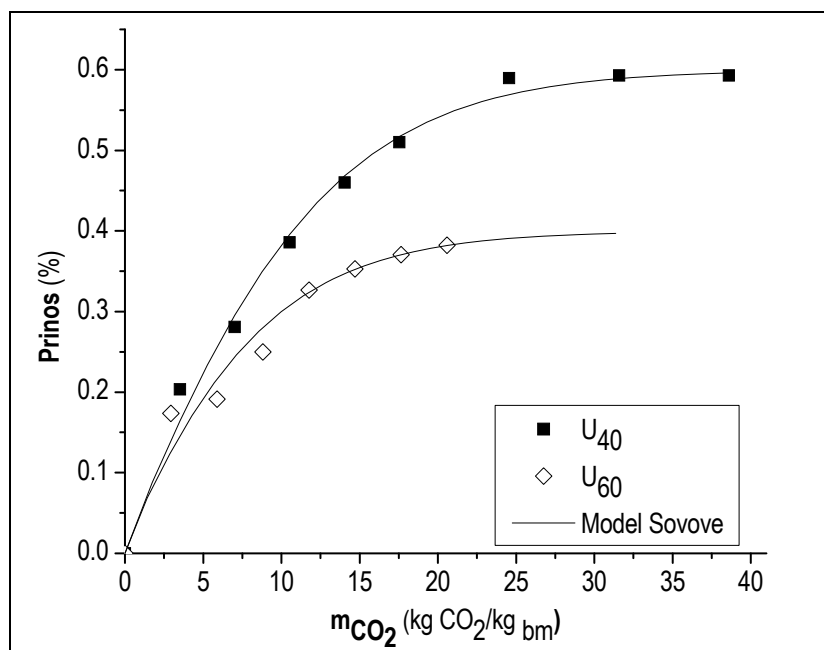
Sirovina	Uzorak	Predtretman	Pritisak (MPa)	Temperatura (°C)	Masa biljnog materijala (g)	Prinos ^a
A	U ₄₀	ne	30	40	28,5	0,60
	U ₆₀	ne	30	60	34,0	0,38
	U ₄₀	P1	30	40	28,0	0,62
B	U ₄₀	ne	30	40	31,0	0,39
	U ₄₀	P2	30	40	30,0	0,56
C	U ₄₀	ne	30	40	27,4	1,05
	U ₄₀	P1	30	40	30,0	1,05
	U ₄₀	P2	30	40	30,4	1,21

A - osušeni lišaj *U. barbata* sakupljan 2008 godine star godinu dana; B - sirovina A stara 3 godine; C-osušeni lišaj *U. barbata* sakupljan 2010 godine.

P1 - dekompresija sa 15 MPa do pritiska u boci sa CO₂ (6 MPa); P2 - dekompresija sa 15 MPa do atmosferskog pritiska.

^aTotalni prinosi ekstrakata u odnosu na masu sirovine (%).

Uticaj temperature na kinetiku NKE ekstraktivnih materija iz lišaja *U. barbata* na pritisku od 30 MPa prikazan je na slici 21, dok je uticaj predtretmana varijacije pritiska na kinetiku NKE iz tri različite sirovine lišaja *U. barbata* sa područja Makedonije (u daljem tekstu označene kao sirovina A, B i C) na 30 MPa i 40 °C prikazan na slici 22. Ekstrakcione krive date su kao zavisnost prinosa ekstrakta od specifične potrošnje natkritičnog CO₂ izražene u kg_{CO2} po kg biljnog materijala. Na slikama 21 i 22 su, pored eksperimentalnih ekstrakcionih kriva, prikazane i odgovarajuće krive koje odgovaraju modelu Sovove (1994a).



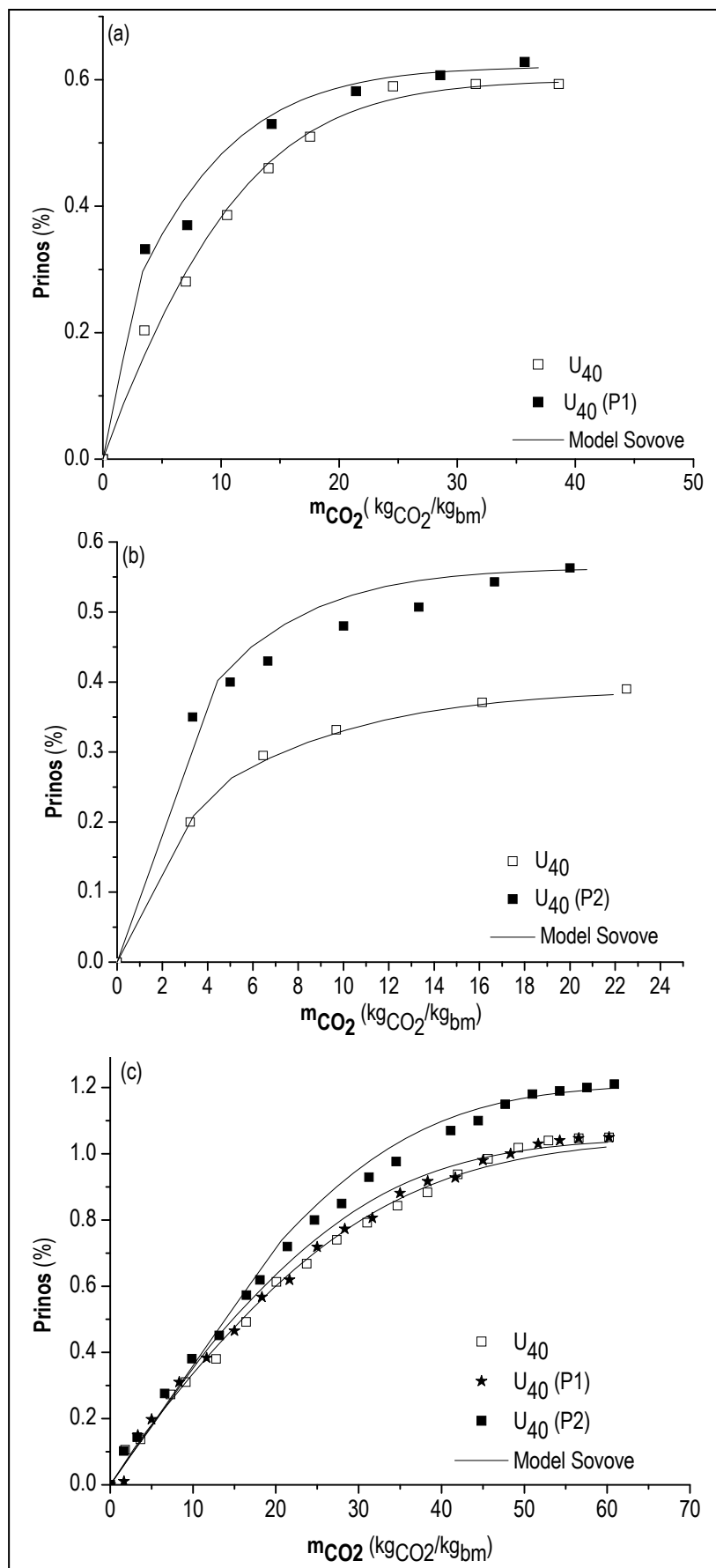
Slika 21 Uticaj temperature na prinos natkritičnog ekstrakta *U. barbata*

Optimizovane vrednosti koeficijenta prenosa mase kroz čvrstu fazu (k_s), ravnotežne rastvorljivosti ulja u NK CO₂ (y_r) i frakcija teže dostupnog rastvorka u mlevenjem nerazorenom tkivu (x_k) dobijene matematičkim modelovanjem po modelu Sovove prikazane su u tabeli 41. Matematički model Sovove je uspešno simulirao eksperimentalne rezultate na datim uslovima (slike 21 i 22), pri čemu je optimizacioni parametar J bio reda veličine 10^{-4} (tabela 41).

Prinos ekstrakta *U. barbata* izolovan na nižoj temperaturi bio je za oko 35 % viši u odnosu na prinos ekstrakta koji je izdvojen na istom pritisku (30 MPa) i višoj temperaturi (60 °C) (slika 21). To se objašnjava činjenicom da na nižoj temperaturi natkritični fluid ima veću gustinu i veću moć rastvaranja, pa se u ekstraktu, pored usninske kiseline, nalaze i druga jedinjenja velike molekulske mase. U prilog tome ide i identifikovani manji udeo usninske kiseline u U₄₀ (tabela 19). Na osnovu podataka dobijenih matematičkim modelovanjem, može se uočiti da je vrednost ravnotežne rastvorljivosti ekstrakta u natkritičnom CO₂, y_r (tabela 41) veća za NKE na 60 °C. Imajući u vidu da je ekstrakt aproksimiran pseudokomponentom - usninskom kiselinom, ovaj podatak ukazuje na bolje rastvaranje usninske kiseline na 30 MPa i na temperaturi od 60 °C, što može biti rezultat povećanja napona pare sa porastom temperature.

Pošto je natkritični ekstrakt izolovan na nižoj temperaturi (40 °C) pokazao jače delovanje na ispitivane sojeve bakterija (odjeljak 5.3.1.) u odnosu na ekstrakt izolovan na 60 °C, proces NKE na 30 MPa i 40 °C je dalje ispitivan sa aspekta mogućnosti povećanja prinosa i brzine ekstrakcije primenom predtretmana varijacije pritiska (slika 22 i tabela 41).

Na primeru NKE iz sirovine A i C može se zaključiti da se primenom predtretmana P1 ne postiže povećanje prinosa ekstrakcije (tabela 40 i Slike 22 a i 22c). Primenom predtretmana P2 postignuto je povećanje prinosa ekstrakta u slučaju NKE iz sirovine B za 44 % i u slučaju sirovine C za 15 %. Veće povećanje prinosa kod primene predtretmana P2 posledica je intezivnijeg razaranja tkiva lišaja usled veće varijacije pritiska (nagla dekompresija izvršena je od 15 MPa do atmosferskog pritiska-0,1 MPa) u odnosu na predtretman P1 (nagla dekompresija od 15 MPa do 6 MPa).



Slika 22 Uticaj primene predtretmana biljnog materijala na prinos natkritičnog ekstrakta *U. barbata* : (a) sirovina A, (b) sirovina B i (c) sirovina C

Tabela 41 Parametri modela Sovove

Parametri modela	U ₄₀	U ₄₀ (P1)	U ₆₀	U ₄₀	U ₄₀ (P2)	U ₄₀	U ₄₀ (P1)	U ₄₀ (P2)
	Sirovina A			Sirovina B		Sirovina C		
Eksperimentalni i izračunati								
ε	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
dp , (mm)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$q_{CO_2} \cdot 10^5$, (kg/s)	8,33	7,82	8,08	8,71	7,41	6,67	6,39	7,00
ρ_{CO_2} , (kg/m ³)	910,6	910,6	830,4	910,6	910,6	910,6	910,6	910,6
$u \cdot 10^4$, (m/s)	1,279	1,201	1,361	1,337	1,137	0,837	0,802	0,879
$D_{12} \cdot 10^9$, (m ² /s)	4,66	4,66	6,53	4,66	4,66	4,66	4,66	4,66
$k_r \cdot 10^5$, (m/s)	0,684	0,648	0,957	0,708	0,619	0,462	0,466	0,482
Optimizacioni parametri								
$x_k \cdot 10^3$	5,9	4,0	4,0	2,8	2,0	10	9,0	8,5
$k_s \cdot 10^9$ (m/s)	3,5	4,0	5,0	4,5	6,0	1,6	1,7	2,0
$y_r \cdot 10^4 k$ (kg _{ekstrakt} /kg _{CO2})	2,0	2,5	2,5	6,0	9,0	3,6	3,6	3,8
$J \cdot 10^4$	9,89	7,93	5,19	0,15	4,80	1,89	2,23	5,30

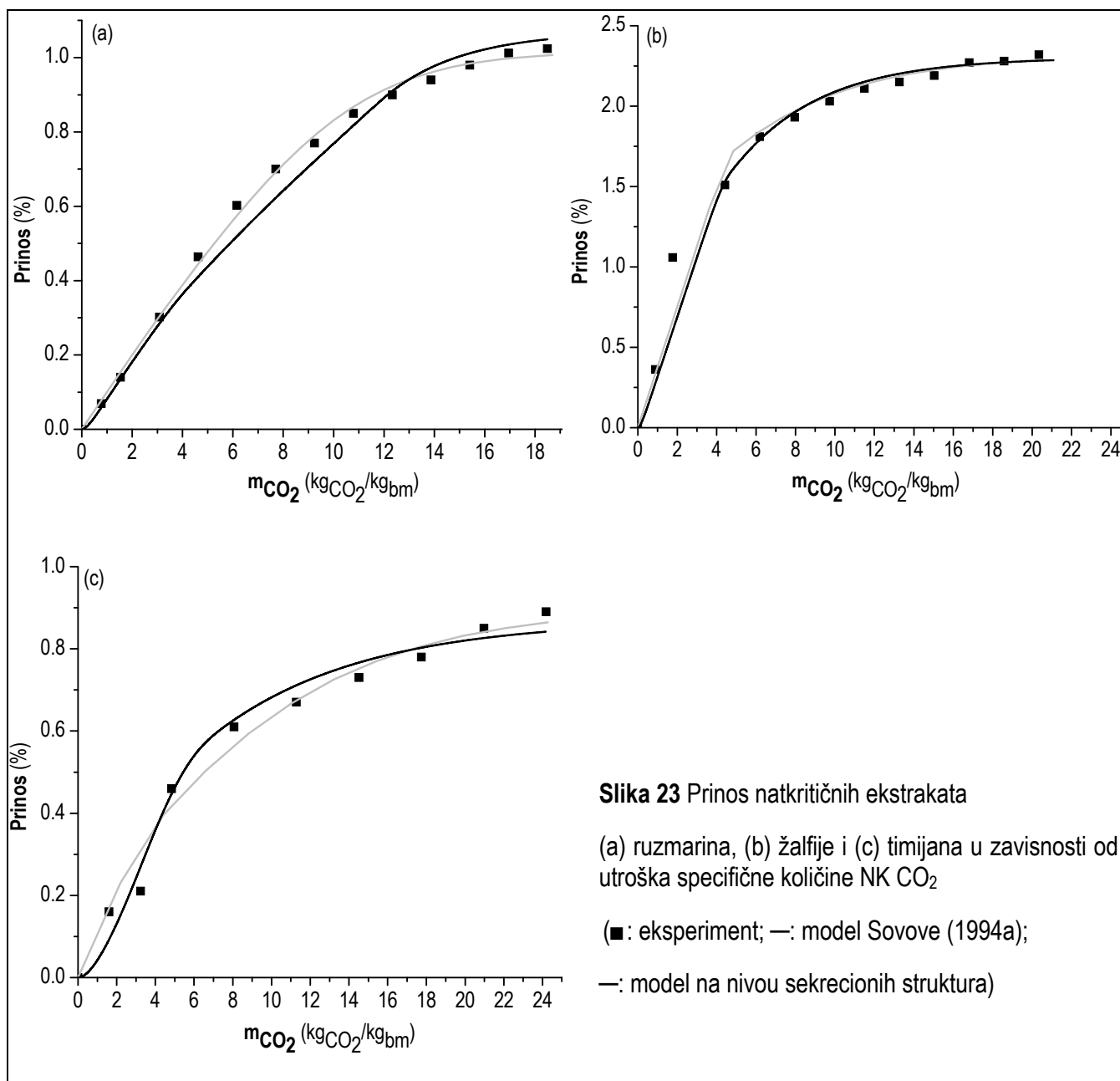
Predtretman varijacije pritiska kod procesa NKE iz lišaja *U. barbata* doprinosi porastu y_r u odnosu na proces NKE koji je uključivao samo mlevenje sirovine. Taj porast je najizraženiji kod procesa NKE iz sirovine B (50 %) sa primenom predtretmana P2 i kod procesa NKE iz sirovine A (25 %) sa primenom predtretmana P1, dok je najmanji porast ostvaren kod procesa NKE iz sirovine C (5,6 %) sa predtretmanom P2. Niže vrednosti y_r za procese NKE bez predtremana ukazuju da se primenom mlevenja ne oslobađa sva količina supstanci koja se na datim uslovima pritiska i temperature može rastvoriti u natkritičnom fluidu. Drugim rečima, kod procesa NKE iz lišaja *U. barbata* bez primene predtretmana P1 i P2 nisu postignute ravnotežne rastvorljivosti ekstraktibilnih materija i (aproksimirane usninskom kiselinom) na 30 MPa i 40 °C. S druge strane, izlaganjem samlevene sirovine natkritičnom fluidu i primenom nagle dekompresije (predtretmani P1 i P2) dolazi do oslobađanja dodatne količine ekstraktibilnih supstanci koje postaju lako dostupne natkritičnom fluidu i rastvaraju se u njemu, što utiče na porast parametra y_r .

Optimizacioni parametar x_k , kojim se opisuje udeo teško dostupne frakcije ekstraktibilnih supstanci ima manju vrednost za NKE iz sirovina A, B i C sa primenom predtretmana P1 ili P2, što ukazuje da sa varijacijom pritiska dolazi do razaranja tkiva lišaja i da samim tim veća količina ekstraktibilnih supstanci postaje lako dostupna NK CO₂ (tabela 41). Razaranjem tkiva predtremanom varijacije pritiska, pre svega primenom predtretmana P2, istovremeno se postiže povećanje brzine prenosa mase u čvrstoj fazi jer se skraćuje put koji supstance prelaze iz čvrste u fazu natkritičnog fluida. Tome u prilog idu i veće vrednosti parametra k_s za proces NKE sa primenom predtretmana P1 i P2 (tabela 41) u odnosu na proces NKE bez predtretmana. Vrednost k_s za proces NKE sa primenom predtretmana P1 je slična kao u slučaju NKE bez predtretmana, što ukazuje da se primenom male varijacije pritiska ne postiže dovoljni stepen razaranja tkiva lišaja koji bi omogućio povećanje brzine prenosa mase u čvrstoj fazi.

Primena predtretmana P2 omogućava ekstrakciju supstanci koje nije moguće ekstrahovati primenom NKE iz samo samlevenog lišaja *U. barbata* i pozitivno utiče na brzinu prenosa mase u čvrstoj fazi. Time se objašnjava postizanje većih ekstrakcionih prinosa i veće brzine ekstrakcije kod procesa NKE sa primenom predtretmana P2 u odnosu na proces NKE iz sirovine koja je podvrgnuta samo mlevenju (tabela 40 i slika 22).

4.6.2. Kinetika i matematičko modelovanje NKE iz odabranog bilja familije Lamiaceae

Na slici 23 prikazane su ekstrakcione krive za NKE ekstraktivnih supstanci iz ruzmarina, žalfije i timijana na 11,5 MPa i 40 °C, kao i krive dobijene matematičkom simulacijom primenom modela Sovove (1994a) i modela na nivou sekrecionih struktura (Zizovic i sar., 2006, 2008). Optimizovane vrednosti koeficijenta prenosa mase kroz čvrstu fazu, k_s , ravnotežne rastvorljivosti etarskog ulja u natkritičnom ugljendioksidu, y_r , udela teže dostupne faze, x_k , i srednje kvadratno odstupanje eksperimentalnih ekstrakcionih prinosa od prinosa uzračunatih modelom Sovove (1994b), J , prikazani su u tabeli 42. Ekstrakti ruzmarina, žalfije i timijan bili su aproksimirani najzastupljenijom komponentom (metil linoleat, manool i timol za ruzmarin, žalfiju i timijan, respektivno).



Optimizovane vrednosti parametara modela na nivou sekrecionih struktura, rastvorljivost ekstrakata u natkritičnom fluidu, c^* , i difuzivnost rastvorka kroz membranu glandularnog trihoma, D_m , su, takođe, prikazane u tabeli 42. Za razliku od Sovovinog modela, optimizacija parametra kojim se opisuje rastvorljivost ekstrakta, c^* , vrši se u granicama literaturnih vrednosti za pseudokomponetu ili jedinjenje koje je po strukturi slično pseudokomponenti. Frakcija glandularnih trihoma razorena mlevenjem i u toku predtretmana sa NK CO₂, θ (koja je proporcionalno srazmerna količini lako dostupne frakcije), određena je na osnovu statističke analize SEM mikrografa za timijan (Zizovic i sar., 2008; Stamenic i sar., 2008). Kod modela Sovove teže dostupna frakcija rastvorka je optimizacioni parametar. Dakle, pored toga što pruža precizniji uvid u fenomene prenosa mase (na mikro nivou) koji se odigravaju u toku NKE (D_m), model na nivou sekrecionih struktura zahteva i manji broj optimizacionih parametara u odnosu na model Sovove.

Tabela 42 Parametri modela Sovove i modela na nivou sekretornih struktura

Biljni materijal	Ruzmarin	Žalfija	Timijan
Eksperimentalni i izračunati parametri			
ε	0,45	0,45	0,45
d_p (mm)	0,400	0,400	0,400
$q_{CO_2} \cdot 10^4$ (kg/s)	0,722	1,14	1,14
$u \cdot 10^4$ (m/s)	0,646	1,020	1,020
$k \cdot 10^5$ (m/s)	0,592	1,740	0,592
$D_{12} \cdot 10^8$ (m ² /s)	0,9	2,56	1,77
$D_1 \cdot 10^7$ (m ² /s)	2,31	1,23	2,31
$N \cdot 10^{-6}$	11,20	21,52	4,43
$R_{nd} \cdot 10^6$ (m)	29	29	29
Optimizacioni parametri			
Model Sovove			
$x_k \cdot 10^{-3}$	9,8	9,2	7,0
$y_r \cdot 10^{-3}$	0,50	3,8	1,05
$k_s \cdot 10^{-7}$ (m/s)	0,6	1,3	1,4
$J \cdot 10^3$	0,18	4,17	1,41
Model na nivou sekrecionih struktura			
$c^* \cdot 10^3$ (kmol/m ³)	2,5	9,0	6,0
$D_m \cdot 10^{12}$ (m ² /s)	4,0	5,5	6,5
θ	0,65	0,65	0,65
$J \cdot 10^3$	0,184	4,44	0,428

4.7. Kinetika i matematičko modelovanje procesa ekstrakcija etanolom

Etanolni ekstrakti timijana, origana i divizme izolovani SE i UZE su pokazali umereno (divizma) do jako (timijan i origano) antibakterijsko delovanje na testirane sojeve bakterija (odjeljak 4.3.). Iz tog razloga, u ovoj disertaciji je ispitana kinetika SE i UZE sa etanolom. Eksperimentalne ekstrakcione krive date su kao zavisnost ekstrakcionih prinosa od vremena ekstrakcije. Eksperimentalni podaci i odgovarajući matematički modeli zasnovanim na drugom Fikovom zakonu korišćeni su za analizu koeficijenata difuzije u čvrstoj fazi. Obzirom da su od navedenih, etanolni ekstrakti pokazali najjače antibakterijsko delovanje, u ovoj disertaciji je, takođe, ispitana kinetika ekstrakcije timijana na poluindustrijskom nivou sa mešanjem. S tim u vezi, ispitan je uticaj temperature na ekstrakcioni prinos i brzinu prenosa mase u toku ekstrakcije.

4.7.1. Kinetika i matematičko modelovanje procesa ekstrakcije sa etanolom laboratorijskom nivou

Prinosi ekstrakata dobijeni SE iz cveta divizme i lista timijana i origana prikazani su u tabeli 43. Najveći prinos ekstrakta dobijenog SE ostvaren je kod cveta divizme. To se objašnjava većom gustinom sekrecionih struktura u tkivu cveta divizme. Totalni prinosi ekstrakata timijana, origana i divizme izolovanih pomoću SE su viši od prinosa ekstrakata dobijenih pomoću UZE na 40 °C sa istim rastvaračem pri istom odnosu rastvarača i biljne sirovine (1:12) što je posledica dužeg vremena trajanja ekstrakcije, više temperature (80,5 °C) i različite rastvorljivosti biljnih komponenata.

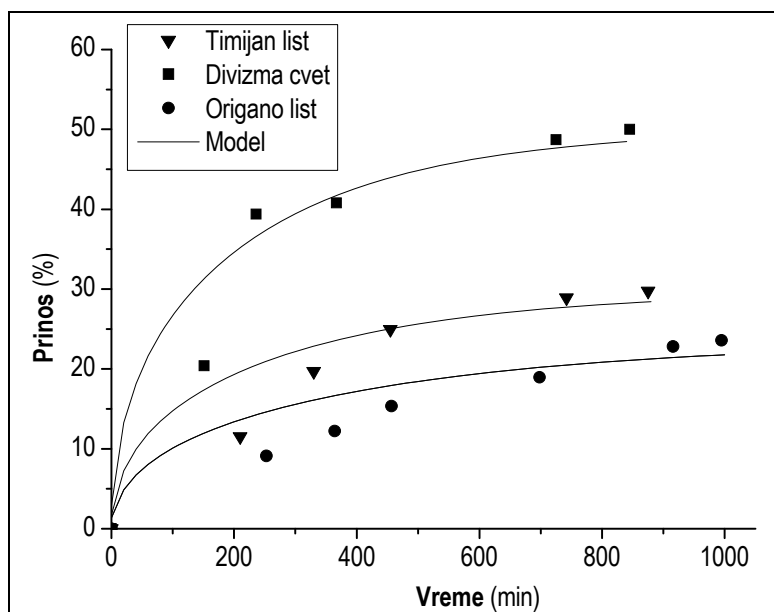
Tabela 43 Prinosi etanolnih ekstrakata divizme, timijana i origana dobijeni različitim metodama ekstrakcije (%)

Biljna sirovina	SE ^a	UZE
Hidromodul ^b	1:12	1:12
divizma	49,0 (5)	23,1
timijan	29,8 (4)	18,4
origano	23,6 (6)	15,6

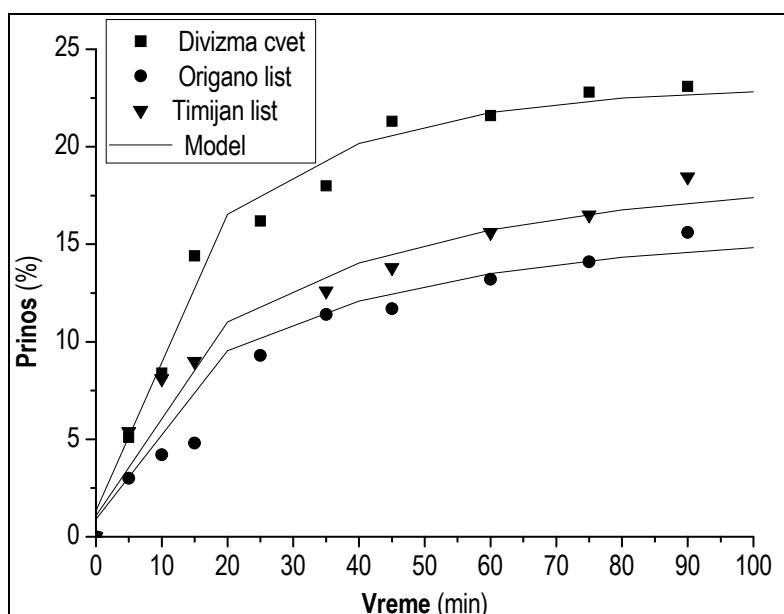
^aU zagradi je dat broj presifoniranja; ^bOdnos mase biljnog materijala i ukupne zapremine rastvarača (stvarni hidromodul kod SE je promenljiv i manji od vrednosti date u tabeli zbog toga što je zapremina rastvarača u čauri sa biljnim materijalom manja)

Na slikama 24 i 25 prikazana je zavisnost ekstrakcionih prinosa od vremena trajanja SE i UZE, kao i eksperimentalne krive dobijene simulacijom pomoću modela koji se bazira na rešavanju jednačine drugog Fikovog zakona (jednačina 1) kojim se opisuje nestacionarna difuzija rastvorka u čvrstoj fazi (Crank, 1976; Treybal, 1968). Iz tabele 43 i sa slika 24 i 25 se može zaključiti da su prinosi suvog ekstrakta i vreme trajanja procesa ekstrakcije sa etanolom umnogome zavisili od primenjene tehnike ekstrakcije, biljne vrste, vrste biljnog materijala i temperature. U slučaju SE i UZE korišćen isti hidromodul, 1:12 na osnovu ranijih istraživanja (Glisic i sar., 2010, 2011). Ranija ispitivanja UZE bioaktivnih supstanci iz biljnog materijala su pokazala da povećanje odnosa rastvarač/sirovina pozitivno utiče na kavitaciju i izloženost biljnog materijala kavitacionom polju pa samim tim i na efikasnost ekstrakcije (Gaete-Garretón i sar., 2011). Zhang i Wang (2008) su, takođe, pokazali da povećanje odnosa rastvarač/sirovina utiče na povećanje prinosa ekstrakta kod procesa UZE iz semena konoplje. Naime, pri većim odnosima rastvarač/sirovina, tj. pri većem razblaženju rastvora postoji jača pogonska sila za prenos ulja u rastvarač. Isti autori su, takođe, pokazali da za određene uslove ekstrakcije i biljnu sirovinu postoji tzv. optimalni odnos rastvarač/sirovina (Zhang i Wang, 2008) nakon čega dalje razblaženje ne utiče na efektivnost ekstrakcije. To se objašnjava činjenicom da je proces ekstrakcije limitiran prenosom mase u čvrstoj fazi (Zhang i Wang, 2008).

Vrednosti koeficijenata difuzije rastvorka u čvrstoj fazi dobijene modelovanjem (jednačina 79) prikazane su u tabeli 44. Usvojeno je da su čestice sferičnog oblika, sa srednjim prečnikom $2R = 0,40$ mm.



Slika 24 Rezultati modelovanja ekstrakcije po Soksletu



Slika 25 Rezultati modelovanja ultrazvučne ekstrakcije

Tabela 44 Difuzioni koeficijenti

	$D_{SE} \cdot 10^{13} (m^2/s)$	$D_{UZE} \cdot 10^{12} (m^2/s)$
Divizma	2,40	2,65
Origano	1,40	1,65
Timijan	1,70	1,90

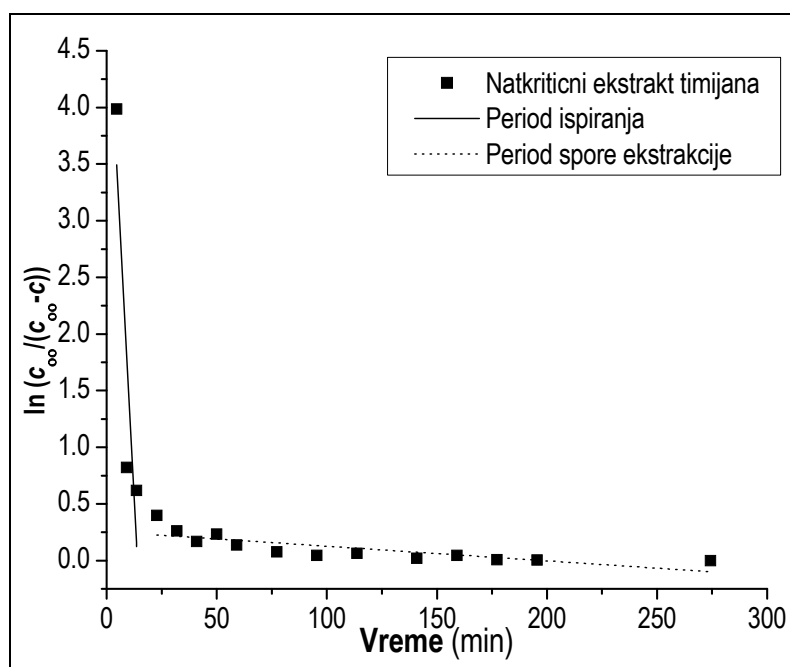
Difuzioni koeficijent D je veći za red veličine kod UZE u odnosu na SE. Ovi rezultati su u skladu sa uticajem prethodno objašnjene uticaja fenomena kolapsa kavitacionih mehura na prenos mase, kako u fazi spiranja, tako i u periodu spore ekstrakcije (poglavlje 2.4.2)

Na slikama 24 i 25 jasno se uočava da Fikov model bolje opisuje eksperimentalne rezultate u drugoj fazi ekstrakcije za razliku od početnog perioda ekstrakcije. Iz tog razloga opravdanija je primena modela koji se takođe zasniva na drugom Fikovom zakonu ali koji uzima u obzir dva paralelna procesa difuzije (Crank, 1975, Herodež i sar., 2003; Hojnik i sar., 2008; Osburn i Katz, 1944; Šekrget i sar., 2010) (jednačina 81).

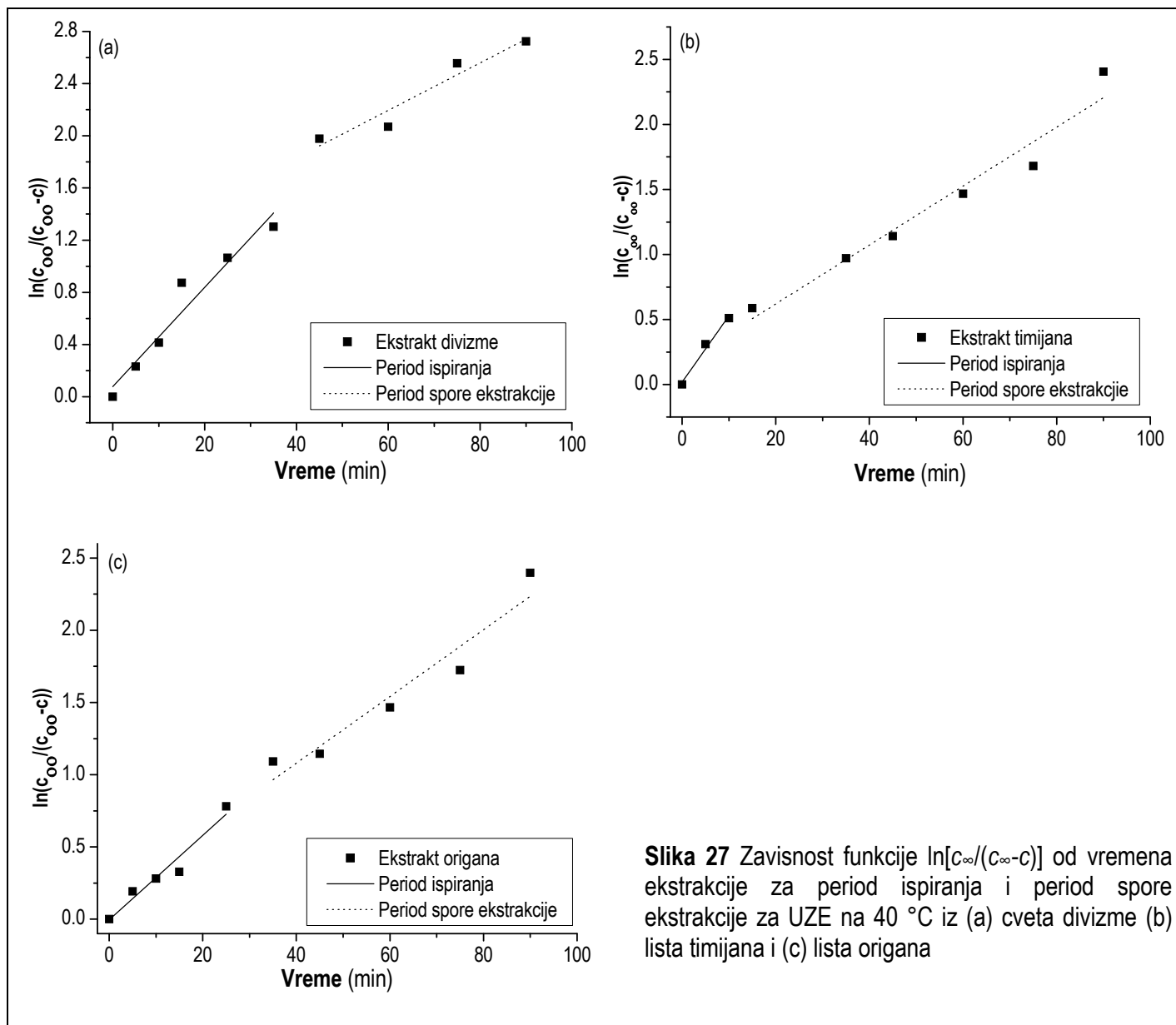
Pomoću ovog modela izračunati su koeficijenti difuzije D_1 i D_2 (koeficijenti difuzije u čvrstoj fazi u toku perioda ispiranja i spore faze ekstrakcije) u procesima SE i UZE sa etanolom kao i za NKE (iz timijana) radi uporedne analize. Zavisnost funkcije $\ln\left(\frac{c_\infty}{c_\infty - c}\right)$ od vremena trajanja ekstrakcije, kod različitih tehnika ekstrakcije i korišćenih biljnih sirovina, prikazana je na slikama 26-28. Vrednosti ravnotežnih koncentracija, $c_\infty=c(t=\infty)$ prikazane su u tabeli 45. Proces NKE iz timijana je korišćen za uporednu analizu koeficijenata difuzije za ekstrakcije sa etanolom.

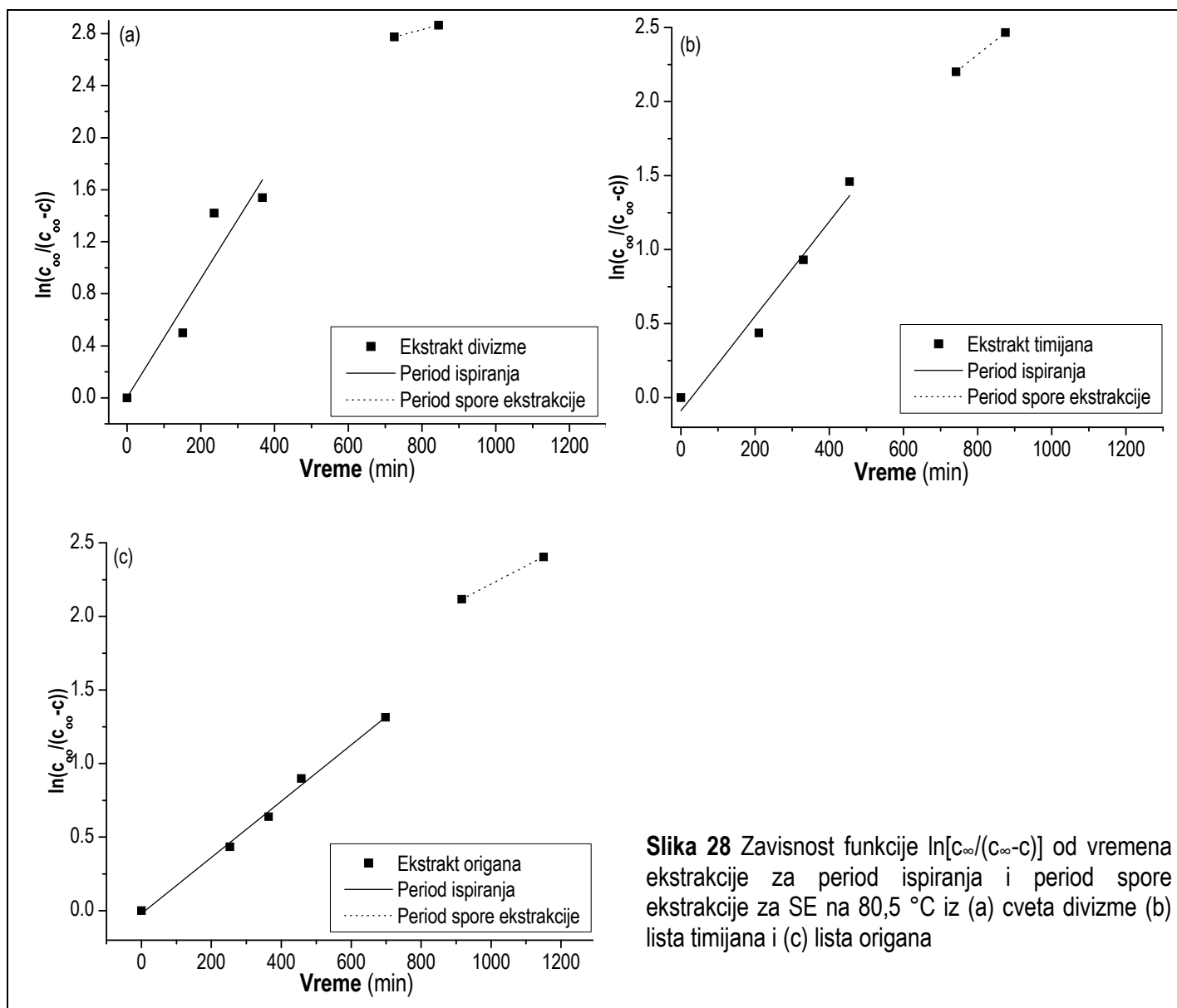
Tabela 45 Vrednosti c_∞ (kg/m³) ekstraktibilnih supstanci kod ekstrakcija sa 70 % etanolom i NK CO₂

Biljna sirovina	Metoda ekstrakcije				
	SE	UZ	NKE	PSE1	PSE2
Divizma	43,3	20,6	-		
Timijan	27,1	18,4	0,90	24,0	27,0
Origano	21,6	14,3	-		



Slika 26 Zavisnost funkcije $\ln\left[\frac{c_\infty}{c_\infty - c}\right]$ od vremena ekstrakcije za period ispiranja i period spore ekstrakcije za NKE na 40 °C iz lista timijana





Slika 28 Zavisnost funkcije $\ln[c_{\infty}/(c_{\infty}-c)]$ od vremena ekstrakcije za period ispiranja i period spore ekstrakcije za SE na 80,5 °C iz (a) cveta divizme (b) lista timijana i (c) lista origana

Na prikazanim slikama (26)-(28) jasno se uočavaju se dva karakteristična perioda i to:

- ispiranje, okarakterisano brzim porastom koncentracije ekstrahovanih materija na samom početku procesa (strmiji nagib krive), što je rezultat rastvaranja ekstrahovanih materija sa površine razorenih biljnih ćelija,
- spora ekstrakcija, okarakterisana sporim porastom koncentracije u kasnijoj fazi ekstrakcije, što je posledica spore difuzije ekstraktivnih materija iz nerazorenih biljnih ćelija.

Usled kontinualnog odigravanja procesa NKE dolazi do opadanja koncentracije (u datom trenutku) sa vremenom pa je na slici 26 dobijena opadajuća kriva, dok se procesi UZE i SE odigravaju šaržno usled čega koncentracija (kumulativna) raste sa vremenom pa su slikama (28) i (29) dobijene rastuće krive. Vrednosti ravnotežnih koncentracija, c_{∞} za različite ekstrakcione metode date su u tabeli 45.

Difuzioni koeficijenti brže i sporije faze ekstrakcije (D_1 , D_2) kao i udeli ekstrakta ($F_1 = \frac{6f_1}{\pi^2}$, $F_2 = \frac{6f_2}{\pi^2}$) su prikazani u tabeli 46.

Prenos mase je brži u periodu ispiranja, pa su i koeficijenti difuzije bržeg perioda ekstrakcije veći u odnosu na koeficijente difuzije sporijeg perioda za sve tri biljne sirovine (do 10 puta za ekstrakcije sa organskim rastvaračem, a čak do 300 puta za NKE). Najveći koeficijent difuzije u prvoj fazi ekstrakcije dobijen je natkritičnom ekstrakcijom, a najmanji Sokslet ekstrakcijom (kod NKE timijana D_1 je 115 puta veće u odnosu

na D_1 dobijeno SE). Kod UZE dobijene su veće vrednosti D_1 nego kod SE, što je posledica dejstva ultrazvuka na prenos mase.

Tabela 46 Koeficijenti difuzije za karakteristične periode različitih metoda ekstrakcija iz korišćenih sirovina

Biljna sirovina	Metoda ekstrakcije	$D_1 \cdot 10^{10}$ (m ² /s)	$D_2 \cdot 10^{11}$ (m ² /s)	f_1	f_2	F_1	F_2
<i>Verbascum thapsus</i>	SE	0,184	0,305	1,468	0,117	0,892	0,108
	UZE	1,54	7,37	1,100	0,545	0,669	0,331
<i>Thymus vulgaris</i>	SE	0,13	0,81	0,842	0,802	0,512	0,487
	UZE	2,07	9,18	0,253	1,392	0,154	0,846
	NKE	15,0	0,523	0,370	1,274	0,225	0,775
<i>Origanum vulgare</i>	SE	0,0774	0,498	1,034	0,610	0,629	0,371
	UZE	1,18	9,36	0,038	1,607	0,023	0,977

Matematički modeli zasnovani na drugom Fikovom zakonu koji su korišćeni u ovoj studiji za procenu i analizu koeficijenata difuzije u čvrstoj fazi su jednostavni i zahtevaju mali broj ulaznih i optimizacionih parametara. Primenom ovih modela moguće je izvršiti brzu i jednostavnu procenu koeficijenata difuzije u čvrstoj fazi. S druge strane, primena ovde opisanih modela koji se baziraju na opisivanju nestacionarne difuzije ima izvesna ograničenja kada je reč ekstrakciji po Soksletu.

Naime, u toku ekstrakcije u aparaturi po Soksletu, u svakom trenutku postoje dva rastvora: jedan u balonu, čiji se sastav ne menja u toku vremena do narednog presifoniranja, a drugi u komori, tj. u delu aparature u kome se nalazi punjenje sa biljnim materijalom. Hemijski sastav rastvora u komori se menja u toku trajanja jednog ciklusa, kako zbog ekstrakcije bioaktivnih materija, tako i zbog promene zapremine doticanjem rastvarača u toku punjenja komore. U toku procesa ekstrakcije u aparaturi po Soksletu uzorak se uzima iz balona nakon svakog presifoniranja, pri čemu se, nakon uparavanja, dobija podatak o koncentraciji ekstraktibilnih materija u balonu u trenutku kada se sav rastvor iz komore prelije u balon. Međutim, kako se sam proces difuzije odvija u čauri sa biljnim materijalom, precizni podaci o koeficijentu difuzije u tačnoj fazi mogu se dobiti jedino analizom promene koncentracije rastvorka u komori. Stoga, vrednosti koeficijenata difuzije koje su određene na osnovu koncentracija merenih u balonu (proizvoljne zapremine u granicama fizički realnog za sam proces) predstavljaju prividne vrednosti difuzije koje ne odgovaraju u potpunosti realnim. Ekstrakcija u Sokslet aparaturi se u praksi koristi za određivanje ukupne količine ekstraktibilnih materija u biljnom materijalu za dati rastvarač i temperaturu.

U dostupnoj naučnoj literaturi, Stanojević i sar. (2007) su za modelovanje procesa ekstrakcije u aparaturi po Soksletu iz *Hieracium pilosella* L. koristili empirijsku jednačinu Ponomareva. Ovaj model se koristi u inženjerskoj praksi za određivanje koeficijenta ispiranja (mera mase ekstraktibilnih materija koje se rastvore nakon potapanja biljnog materijala u rastvarač) i koeficijenta spore ekstrakcije (brzina rastvaranja ekstraktibilnih materija u odnosu na njihovu početnu masu u periodu spore ekstrakcije) (Ponomarev, 1976; Veličković, 2007). Stanojević i sar. (2007) su koristili jednačinu Ponomareva za analizu promene ukupne količine ekstraktivnih materija, kao i pojedinih komponenti (hlorogene kiseline, umbeliferona i apigenin-7-O-glukozida) iz *Hieracium pilosella* L. u toku vremena kod ekstrakcije po Soksletu. Međutim, modelovanje procesa ekstrakcije pomoću jednačine Ponomareva nema fizičku osnovu i predstavlja samo matematički opis promene količine ekstraktivnih materija u biljnoj sirovini u periodu spore ekstrakcije (Ponomarev, 1976; Stanojević i sar., 2007; Veljković i Milenović, 2002). U skadu sa prethodnim komentarima može se zaključiti da nijedan od postojećih modela nije pogodan za precizno utvrđivanje koeficijenata difuzije u čvrstoj fazi u toku Sokslet ekstrakcije zbog načina izvođenja ovog postupka.

4.7.2. Kinetika i matematičko modelovanje procesa ekstrakcije timijana na poluindustrijskom nivou

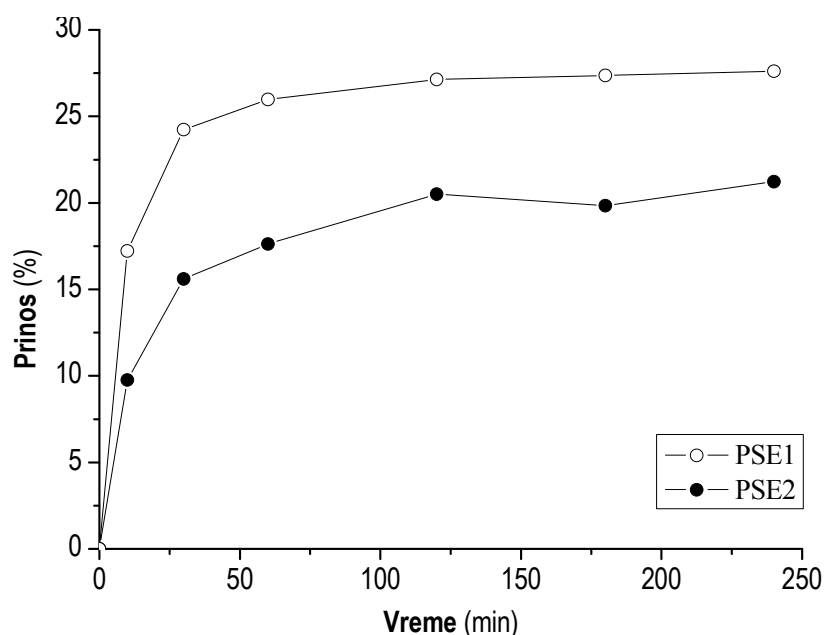
Ekstrakcije iz osušenih listova timijana izvedene su na poluindustrijskom postrojenju (slika 16) na temperaturama 40 °C i 80,5 °C sa mešanjem. U cilju uporedne analize uticaja rastvarača, primene ultrazvuka i temperature na ekstrakciju timijana na laboratorijskom i poluindustrijskom nivou, u tabeli 47 prikazani su prinosi ekstrakata izolovanih iz lista timijana pomoću ekstrakcije sa etanolom i natkritičnim CO₂.

Tabela 47 Prinosi ekstrakata izolovanih iz lista timijana pomoću ekstrakcije sa etanolom na laboratorijskom i poluindustrijskom nivou

Metoda	Uzorak	Temperatura (°C)	Ultrazvuk	Mešanje	Prinos (%)
Laboratorijski nivo					
Soklet ekstrakcija	SE	80,5	ne	ne	29,76±2,16
Ultrazvučna ekstrakcija	UZE	40,0	da	ne	18,4±0,75
Natkritična ekstrakcija	NKE	40,0	ne	ne	1,15±0,15
Poluindustrijski nivo					
Šaržna ekstrakcija	PSE1	40,0	ne	da	21,23±0,52
Šaržna ekstrakcija	PSE2	80,5	ne	da	27,60±0,37

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 47 uočava se da se UZE ekstrakcijom postižu slični prinosi kao sa SE, ali za znatno kraće vreme (90 min). Najniži prinosi ostvareni su za NKE što se objašnjava selektivnošću NK CO₂ prema nepolarnim i slabo polarnim jedinjenjima na uslovima koji su korišćeni u ovoj studiji (jedinjenja relativno male molekulske mase, etarsko ulje i voskovi). Kod šaržne ekstrakcije na poluindustrijskom nivou vidi se da porast temperature utiče na povećanje prinosa za oko 40 %, što se posledica boljeg rastvaranja pojedinih komponenti i/ili prenosa mase rastvorka.

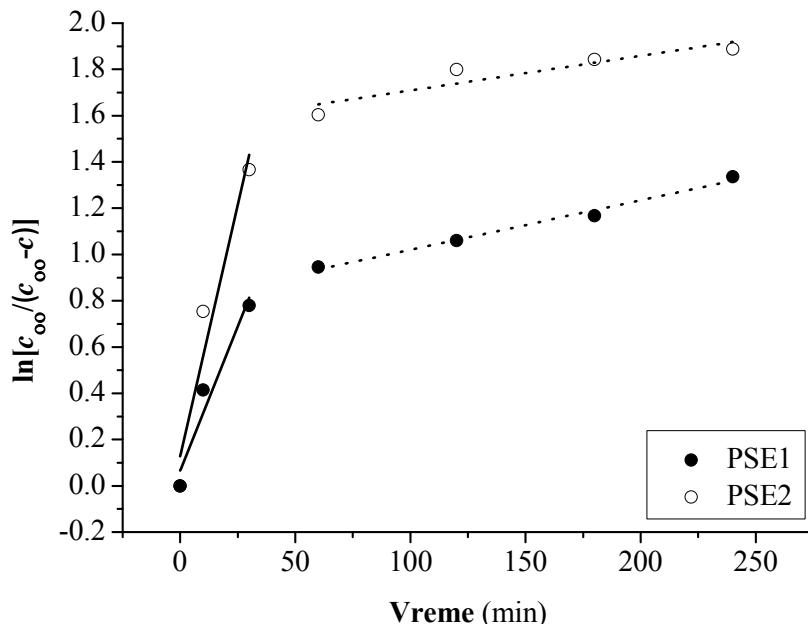
Na slici 30 prikazana je promena prinosa etanolnog ekstrakta timijana u toku šaržne ekstrakcije sa mešanjem na različitim temperaturama. U prvoj fazi, gde dolazi do spiranja rastvorka koji se nalazi na površini čestica biljnog materijala, a oslobođen je mlevenjem, uočava se nagli porast prinosa timijana. U drugoj fazi brzina ekstrakcije opada jer je limitirana samo difuzijom rastvorka iz unutrašnjosti biljne matrice ka masi rastvora.



Slika 30 Uticaj temperature na kinetiku ekstrakcije timijana etanolom na poluindustrijskom nivou

Zavisnost funkcije $\ln\left(\frac{c_{\infty}}{c_{\infty}-c}\right)$ od vremena trajanja ekstrakcije za ekstrakciju timijana sa etanolom i NK

CO₂ uz primenu mešanja na različitim temperaturama prikazana je na slici 31. Koeficijenti difuzije rastvorka u čvrstoj fazi za period brže i sporije ekstrakcije (D_1 , D_2) kao i odgovarajući udeli ekstrakata ($F_1 = \frac{6f_1}{\pi^2}$, $F_2 = \frac{6f_2}{\pi^2}$) prikazani su u tabeli 48.



Slika 31 Zavisnost funkcije $\ln[c_{\infty}/(c_{\infty}-c)]$ od vremena ekstrakcije za period ispiranja (—) i period spore ekstrakcije (---) timijana sa etanolom na poluindustrijskom nivou na različitim temperaturama

Tabela 48 Koeficijenti difuzije rastvorka za različite metode ekstrakcije timijana

Metoda ekstrakcije	f_1	f_2	F_1	F_2	$D_1 \cdot 10^{10}$ (m ² /s)	$D_2 \cdot 10^{11}$ (m ² /s)
Laboratorijski nivo						
SE	0,842	0,802	0,512	0,488	0,13	0,81
UZE ₄₀	0,253	1,392	0,153	0,846	2,07	9,18
NKE	0,370	1,274	0,225	0,775	15,0	0,523
Poluindustrijski nivo						
PSE1	0,910	0,732	0,554	0,446	4,04	3,408
PSE2	1,298	0,346	0,790	0,210	7,04	2,430

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti sledeće:

- vrednosti koeficijent difuzije u fazi ispiranja (prenos mase lako dostupnog rastvorka sa površine razorenog biljnog tkiva u masu fluida) su za jedan red veličine veći od vrednosti koeficijenta difuzije u fazi spore ekstrakcije u kojoj se odvija spora difuzija rastvorka iz unutrašnjosti biljne matrice kroz čvrstu fazu do mase fluida;
- najveća vrednost D_1 za NKE objašnjava se činjenicom da NK CO₂ ima difuzivnost (viskozitet) manji u odnosu etanol. Pored toga, u ovoj studiji je korišćen predtretman biljnog materijala sa NK CO₂ koji omogućio oslobađanje dodatne količine rastvorka iz biljne matrice i učinio ga lako dostupnim natkritičnom fluidu; mala vrednost D_2 je najverovatnije posledica zaostajanja male količine rastvorka koja sporo difunduje iz unutrašnjosti biljne matrice zbog eventualnog zaostajanja u najfinijim strukturama tkiva;
- primena ultrazvuka kod ekstrakcija etanolom utiče značajno na povećanje prenosa mase u tečnoj i čvrstoj fazi (za oko 94 % u odnosu na SE sa istim rastvaračem i na povišenoj temperaturi, 80,5 °C). Ultrazvuk je značajno uticao na povećanje prenosa mase u čvrstoj fazi (~90 % u odnosu na SE);

- povećanje temperature kod šaržne ekstrakcije sa mešanjem na poluindustrijskom nivou je imalo pozitivni uticaj na dodatno povećanje prenosa mase rastvorka u masu fluida (~75 %) i negativni na prenos mase u fazi spore ekstrakcije;
- mešanje ima pozitivni uticaj na prenos mase rastvorka fazi ispiranja i tokom spore ekstrakcije;
- uvođenje mešanja i/ili povećanje temperature (PSE) pozitivno utiču na prenos mase rastvorka u fazi ispiranja u odnosu na SE. Nedostatak PSE je znatno duže vreme ekstrakcije potrebno za postizanje sličnih prinosa (4 h) kao kod UZE (1,5 h) za istu biljnu sirovinu (list timijana) na istoj temperaturi.

4.8. Eksergijska analiza različitih postupaka ekstrakcije

U cilju procene energetske efikasnosti procesa ekstrakcije sa NK CO₂ i etanolom kojima su izolovani ekstrakti sa jakim antibakterijskim delovanjem korišćena je eksergijska analiza. Pri tome su izračunate vrednosti maksimalnog korisnog rada ($W_{max,e}$) i gubitka eksergije (I_e) po 1 kg ekstrakta na primerima za procese NKE, SE i UZE iz timijana, origana i divizme. Obzirom da je etanolni ekstrakt timijana pokazao najjače antibakterijsko delovanje, u ovoj disertaciji je, takođe, analiziran i proces ekstrakcije timijana sa etanolom na poluindustrijskom nivou, na različitim temperaturama, uz primenu mešanja (PSE 1 i PSE 2). Vrednosti maksimalnog korisnog rada i gubitaka eksergije za ekstrakcije iz timijana, origana i divizme date su u tabeli 49. Dobijene vrednosti $W_{max,e}$ i I_e značajno su veće za NKE u poredjenju sa ekstraktijama sa etanolom (SE, UZE, PSE). Ukoliko W_{max} ima negativan predznak, kao u slučaju NKE, tada razlika radne sposobnosti ($\Delta E > 0$) predstavlja maksimalni korisni rad koji se može dobiti iz sistema, odnosno ako ima pozitivan predznak ($\Delta E < 0$) minimalan rad koji treba utrošiti za odigravanje date promene stanja. Slične vrednosti $W_{max,e}$ i I_e za procese ekstrakcije SE i PSE2 iz timijana mogu se objasniti činjenicom da se oba procesa izvode na istoj temperaturi, kao i da se njima ostvaruju slični prinosi ekstrakata. U poluindustrijskim uslovima preporučuje se rad na višoj temperaturi jer se taj način ostvaruju manji gubici eksergije po 1 kg ekstrakta zbog postizanja većeg prinosa ekstrakta timijana (23 %) (tabela 49).

Tabela 49 Izračunate vrednosti maksimalnog korisnog rada ($W_{max,e}$) i gubitaka eksergije (I_e) po 1 kg ekstrakata za UZE, SE i NKE iz odabranih biljnih sirovina

Biljna sirovina	Metoda ekstrakcije	Prinos ekstrakta (%)	Masa ekstrakta (g)	W_{max} (kJ/kg)	I (kJ/kg)	$W_{max,e}$ (kJ/kg extract) 10 ³	I_e (kJ/kg extract) 10 ³
<i>Origanum vulgare</i>	UZE	15,6	3,12	177,1	341,5	11,52	22,22
	SE	23,58	11,79	177,1	341,5	7,62	14,68
<i>Verbascum tapsus</i>	UZE	23,1	4,62	177,1	341,5	7,78	15,0
	SE	49,0	24,5	177,1	341,5	3,64	7,07
<i>Thymus vulgaris</i>	UZE	18,45	3,69	177,1	341,5	9,74	18,79
	SE	29,76	14,88	177,1	341,5	6,03	11,63
	PSE1	21,23	127,4	177,1	341,5	8,45	16,30
	PSE2	27,60	165,6	177,1	341,5	6,50	12,54
	NKE	1,15	0,368	-209,5	293,5	-1718,0	2393,0

U cilju ispitivanja mogućnosti smanjenja gubitaka eksergije po 1 kg ekstrakta, u ovoj disertaciji je, takođe, analiziran proces ultrazvučne ekstrakcije sa etanolom iz biljnog materijala sa predtretmanom sa NK CO₂ (NKE-UZE). Predtretman se sastojao u kratkom izlaganju biljnog materijala natkritičnom fluidu (30 min) na uslovima ekstrakcije i nagle dekompresije do pritiska u boci sa CO₂ (~6 MPa). Vrednosti maksimalnog korisnog rada i gubitaka eksergije po 1 kg ekstrakta izračunate su na primerima ekstrakcija iz aloa i lovora, dobijene vrednosti poredene su sa vrednostima za NKE i UZE bez primene predtretmana (tabela 50).

Na osnovu priloženog, može se zaključiti da se smanjenje gubitaka eksergije po 1 kg ekstrakta može, u nekim slučajevima (aloe), postići primenom predtretmana biljnog materijala (mlevenjem ili mlevenjem i odgovarajućim predtretmanom sa NK CO₂). Naglom dekompresijom neposredno pre UZE postiže se razaranje

biljnog tkiva i oslobađanje ekstraktibilnih supstanci koje postaju lako dostupne rastvaraču. Time se omogućava brža ekstrakcija, tj. manja potrošnja CO₂, uz ostvarenje istih ili većih prinosa ekstrakta za isto vreme ekstrakcije. Finijim mlevenjem biljnog materijala ($d_p < 0,200$ mm) može se, takođe, uticati na smanjenje vrednosti maksimalnog korisnog rada i gubitaka eksergije po 1 kg ekstrakta kod UZE (aloe) (tabela 50). U slučaju UZE listova aloe, pokazalo se da primena predtretmana biljnog materijala sa NK CO₂ (izlaganje biljnog materijala natkritičnom fluidu na uslovima ekstrakcije 30 min i nagla dekomresija do uslova u boci sa CO₂) ima veći uticaj od intenzifikacije mlevenja (smanjenja veličine čestica biljnog materijala). Primena predtretmana biljnog materijala sa natkritičnim CO₂, s druge strane, može uticati na povećanje gubitaka eksergije po 1 kg ekstrakta, što je bio slučaj sa NKE-UZE lista lovora (tabela 50).

Tabela 50 Izračunate vrednosti maksimalnog korisnog rada ($W_{max,e}$) i gubitaka eksergije (I_e) po 1 kg ekstrakata za različite postupke ekstrakcije aloe i lovora

Biljna sirovina	d_p (mm)	Metoda ekstrakcije	Prinos ekstrakta (%)	W_{max} (kJ/kg)	I (kJ/kg)	$W_{max,e}$ (kJ/kg extract) 10 ³	I_e (kJ/kg extract) 10 ³
Aloe Vera	0,400	NKE	1,53	-246,7	454,5	-226	416
		NKE-UZE	14	-82	434,7	-0,7	75
		UZE	6	127,1	148,4	68	80
	<315	UZE	8	127,1	148,4	51	60
Lovor	0,400	NKE	4,18	-246,7	454,5	-98	180
		NKE-UZE	12	-82	434,7	-0,9	129
		UZE	10	127,1	148,4	41	48

Rasipanje energije kod NKE može se objasniti činjenicom da se CO₂ oslobađa u atmosferu i ono se može smanjiti njegovim vraćanjem u proces, što je uobičajna praksa kod procesa natkritičnih ekstrakcija u poluindustrijskim i industrijskim uslovima. U radu Sievers i Eggers (1996) korišćena je eksergijska analiza u cilju procene eksergijskih gubitaka prilikom NKE i čvrsto-tečne ekstrakcije hmelja. Autori su predložili da se mogu postići mnogo niži troškovi energije prilikom NKE regenerisanjem toplote uvođenjem dodatnih uređaja. Iz prethodnog se može zaključiti da energetski zahtevi procesa ekstrakcije bioaktivnih supstance iz biljnog materijala zavise, kako od primenjene tehnike (metoda ekstrakcije, predtretman biljnog materijala), tako i od vrste biljnog materijala.

4.9. Simultana NKE iz odabranih mešavina biljnog materijala

U ovoj disertaciji, simultana NKE iz mešavina karanfilić/origano (C/O) i karanfilić/timijan (C/T) ispitana je sa aspekta (a) uticaja pojedinih biljnih sirovina (njihovih glavnih komponenti) na povećanje rastvaračke moći NK CO₂ i samim tim na povećanje brzine ekstrakcije, kao i (b) mogućnosti izolacije ekstrakata sa pojačanim antibakterijskim delovanjem u odnosu na natkritične ekstrakte izolovane iz pojedinačnih biljnih sirovina.

4.9.1. Kinetika i matematičko modelovanje simultane NKE iz mešavina biljnog materijala

Za ispitivanja kinetike i optimizaciju procesa simultane NKE korišćeni su pupoljci karanfilića i listovi origana i timijana. NKE iz pojedinih biljnih sirovina i mešavina karanfilić/origano (C/O) i karanfilić/timijan (C/T) izvedene su na 10 MPa i 40 °C. Početni maseni udeli pojedinih biljnih sirovina u mešavinama i ukupni prinosi ekstrakata dobijeni NKE iz karanfilića, origana i timijana i mešavina C/O i C/T nakon iscrpljivanja biljnog materijala prikazani su u tabeli 51.

Natkritični ekstrakt karanfilića je bio svetlo žute boje u tečnom stanju dok su natkritični ekstrakti origana i timijana bili u polučvrstom stanju i brankasto-žučkaste boje na sobnim uslovima. Utvrđeni prinos natkritičnog ekstrakta karanfilića od 18,2 % bio je u skladu sa ranijim literaturnim podacima (13,5-20,8 %, w/w) (Clifford i Al-Saidi, 1999; Della Portai sar., 1998; Martínez i sar., 2007; Wenqiang i sar., 2007). Prinos natkritičnog ekstrakta origana u ovoj studiji bio je nešto niži (1,00 %) u odnosu na postojeće literaturne podatke (Menaker i sar., 2004; Simándi i sar., 1998) usled razlike u pogledu ekstrakcionih uslova i porekla biljne sirovine. Prinos natkritičnog ekstrakta timijana bio je u skladu sa pretodno publikovanim (0,75-2,0 %, w/w) (Grosso i sar., 2010; Oszagán i sar., 1996; Zeković i sar., 2000).

Tabela 51 Ukupni prinosi natkritičnih ekstrakata (% w/w)

	Pojedinačne biljne sirovine			Origano + Karanfilić					Timijan + Karanfilić	
				Origano (% ^a)					Timijan (% ^a)	
	Karanfilić	Origano	Timijan	10	50	86	95	98	10	16 ^b
Masa šarže(g)	31,5	31,5	32,0	35	35	35	35	35	35	37,4
C/O ili C/T ^c				90:10	50:50	14:86	5:95	2:98	90:10	84:16
C:O ili C:T ^d	1:0	0:1	0:1	163.8:1	18.2:1	3:1	1:1	1:3	142.4:1	85.1:1
<i>Eksperimentalni prinos (E)</i>	18,2	1,0	1,15	17,3	10,14	3,60	2,13	1,50	16,20	16,03
<i>Teorijski prinos (T)</i>				16,44	9,71	3,43	1,89	1,30	16,48	15,52
<i>Razlika: 100 T-E /T</i>	-	-	-	5,23	4,42	4,96	12,7	15,4	1,70	5,02

^a Maseni procenat (u odnosu na masu šarže).

^b Mešavina sa 16 %, w/w timijana bi trebalo da sadrži istu ukupnu količinu karvakrola, timola i timohinona kao C/O (90:10, %, w/w) (na osnovu GC/MS analize čiji su rezultati takođe prikazani u ovoj studiji).

^c Odnos masenih procenata pojedinih biljnih sirovina u šarži (w/w)

^d Teorijski ili očekivani odnos natkritičnih ekstrakata karanfilić:origano (C:O) ili karanfilić:timijan(C:T) u finalnom ekstraktu.

Očekivani ili teorijski prinosi ekstrakata C/O i C/T ($y_{\text{teor}}(C/O)$ i $y_{\text{teor}}(C/T)$) izračunati su korišćenjem eksperimentalno utvrđenih prinosa ekstrakata iz čistog origana, timijana i karanfilića, kao i masenih udela pojedinih biljnih sirovina u šarži (tabela 51) primenom jednačina 26 i 27.

Kao što je i očekivano na osnovu eksperimentalno utvrđenih prinosa ekstrakata iz čistog karanfilića, origana i timijana, prinosi ekstrakata izolovanih simultanom NKE iz smeša C/O i C/T su opadali sa porastom masenog udela origana odnosno timijana u šarži (tabela 51).

U cilju ispitivanja i analize kinetike, rastvorljivosti ekstrakta i fenomena prenosa mase za simultanu NKE najpre je ispitana simultana NKE iz smeše C/O (5:95, w/w) u cilju dobijanja ekstrakta koji sadrži jednake udele natkritičnih ekstrakata karanfilića i origana u finalnom ekstraktu (tabela 51). Takođe je ispitana frakciona simultana NKE iz iste mešavine - C/O (5:95, w/w) u cilju praćenja brzine ekstrakcije glavnih komponenti

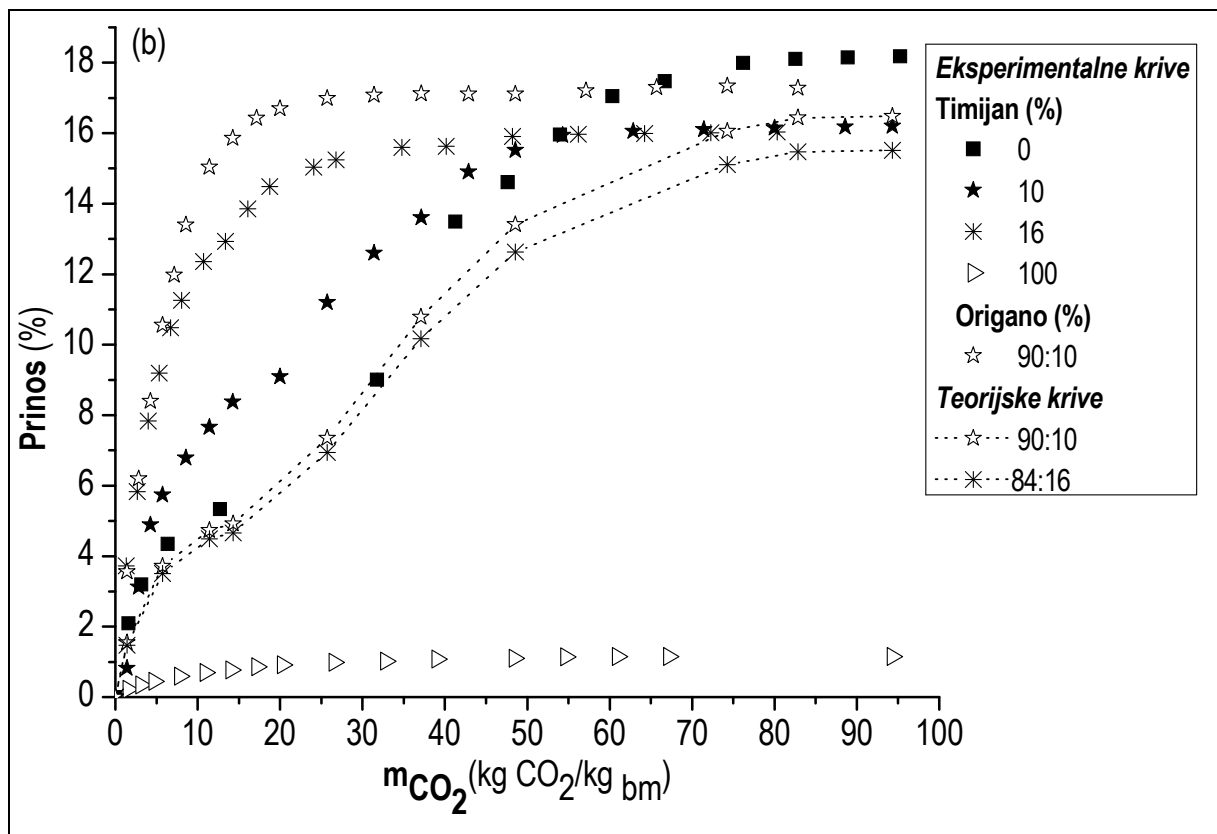
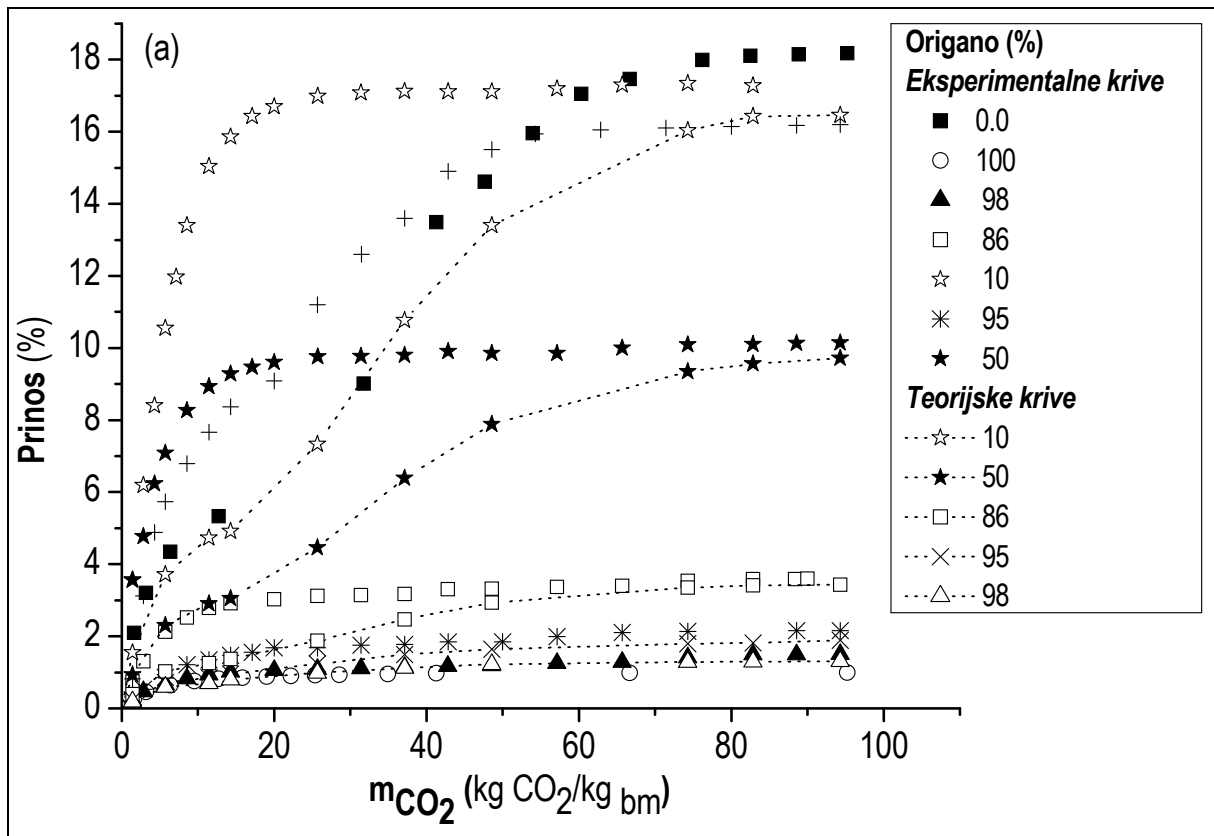
prisutnih u obe biljne sirovine. Na bazi ovih, preliminarnih rezultata, sprovedena su ispitivanja simultane NKE iz smeša C/O (14:86, w/w) i C/O (2:98, w/w) iz kojih bi se trebao dobiti finalni ekstrakt sa odnosom natkritičnih ekstrakata karanfilića i origana 3:1 i 1:3, respektivno. Na kraju su ispitane simultane NKE iz mešavina C/O (90:10, w/w) i C/O (50:50, w/w) odnosno C/T (90:10 %, w/w i 84:16 %, w/w) za koje se očekivalo da će dati finalne ekstrakte sa zanemarljivo malim udelom komponenti prisutnih u origanu odnosno timijanu (tabela 51). Pored origana, timijan je izabran za ispitivanja simultane NKE kao druga komponenta pored karanfilića zato što njegovo etarsko ulje sadrži kao glavnu komponentu timol (Zeković i sar., 2000), koji je izomer karvakrola (najzastupljenija komponenta u ulju origana) (Simándi i sar., 1998).

Eksperimentalni podaci za NKE iz pojedinačnih biljnih sirovina korišćeni su za konstruisanje teorijskih ekstrakcionih kriva za simultanu NKE iz smeša C/O (slika 32a) i C/T (slika 32b) sa različitim masenim udelima pojedinačnih biljnih sirovina u šarži.

Na slici 32 može se uočiti da se gotovo kompletna ekstrakcija iz origana (~90 % ekstraktibilnih supstanci na datim uslovima) i timijana (~85 %) završi već nakon jednog sata ekstrakcije uz realtivno malu potrošnju NK CO₂ (20 kg CO₂/kg_{bm}) na datim uslovima ekstrakcije (10 MPa; 40 °C). Nasuprot tome, svega 35 % ekstrakta karanfilića biva izolovano za isto vreme ekstrakcije na istoim uslovima i pri istoj potrošnji NK CO₂.

Na osnovu eksperimentalnih rezultata simultane NKE iz smeša C/O i C/T mogu se uočiti sledeći efekti:

- a) brzine ekstrakcija za simultane NKE iz smeša C/O i C/T su bile veće od očekivanih na bazi NKE pojedinačnih biljnih sirovina (karanfilića, origana i timijana). U slučaju simultane NKE iz smeše C/O (90:10) uočeno je značajno povećanje brzine ekstrakcije (za oko dva puta) u toku prvog sata ekstrakcije (period konstantne brzine ekstrakcije). Teorijski očekivani prinos za istu smešu postignut je već nakon potrošnje od svega 17 kgCO₂ po 1 kg biljne mešavine (slika 32a). Nasuprot tome, kod simultane NKE iz smeša sa većim udelom origana u šarži (>50 %), za postizanje teorijskih prinosa bilo je potrebno znatno više vremena i utrošenog NK CO₂ (50-60 kgCO₂/kg_{bm} ili 2,8-3,4 h ekstrakcije). Slično povećanje brzine ekstrakcije postignuto je i u slučaju simultane NKE smeše C/T sa 16 % u šarži (C/T; 84:16). Kod simultane NKE smeše teorijski prinos je postignut za 1,5 h ekstrakcije pri utrošku svega 25 kgCO₂ po 1 kg šarže (slika 32b).
- b) Dodatak malih količina origana i timijana karanfiliću (10:90 %, ili 16:84 %, w/w, respektivno) imalo je zanemarljiv uticaj na teorijski ili očekivani prinos (tabela 24). Naime, dodatkom malih količina (10-16 %) origana ili timijana postignuta je izolacija 90 % ekstraktibilnih supstanci na datim uslovima od teorijski očekivane količine uz oko 70 % manji utrošak NK CO₂ (slika 32).



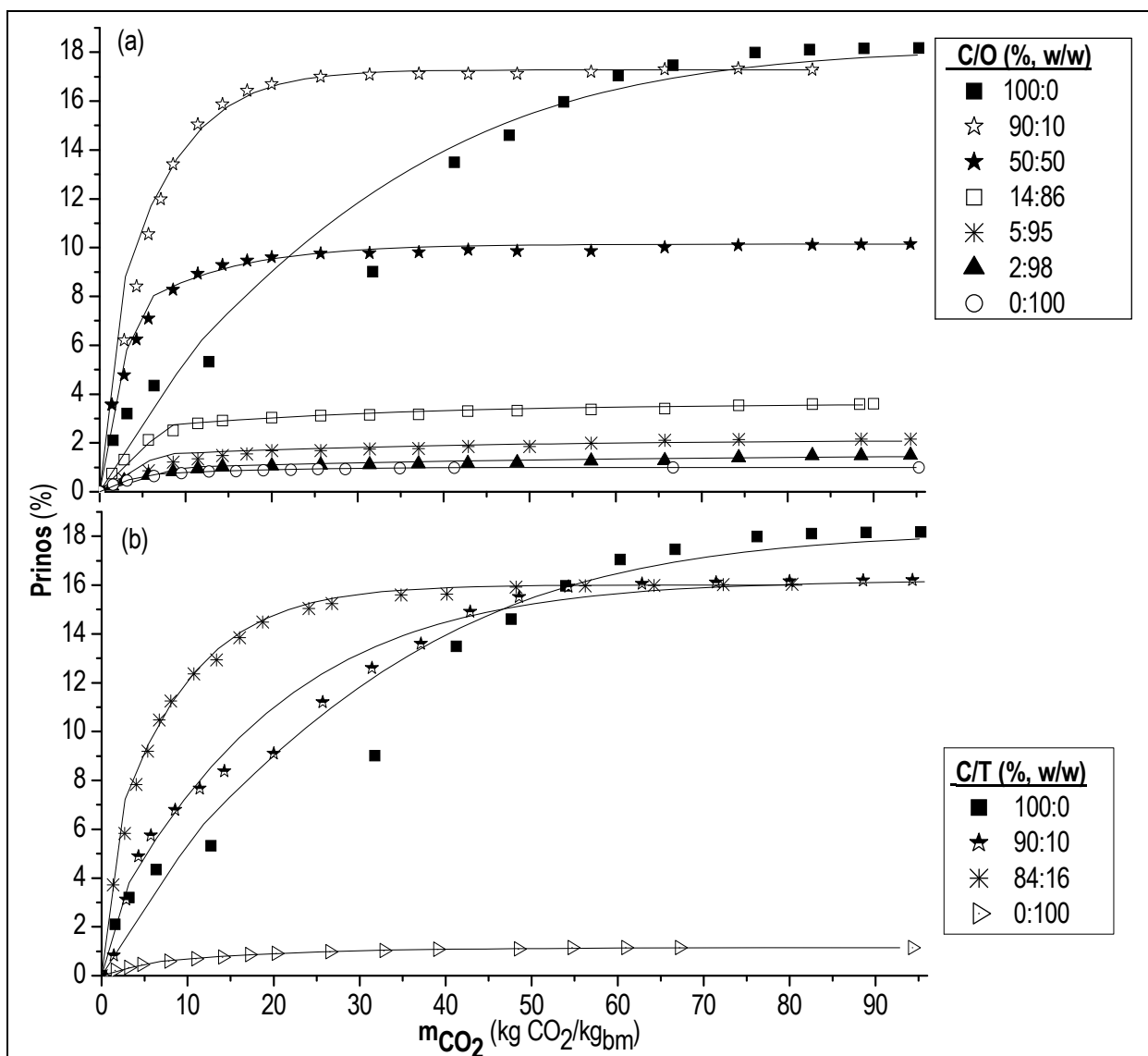
Slika 32 Ekperimentalne i teorijske ekstrakcione krive za simultanu NKE na 10 MPa i 40 °C iz smeša (a) C/O i (b) C/T

Sa ciljem da se objasne ovi efekti korišćene su sledeće analize:

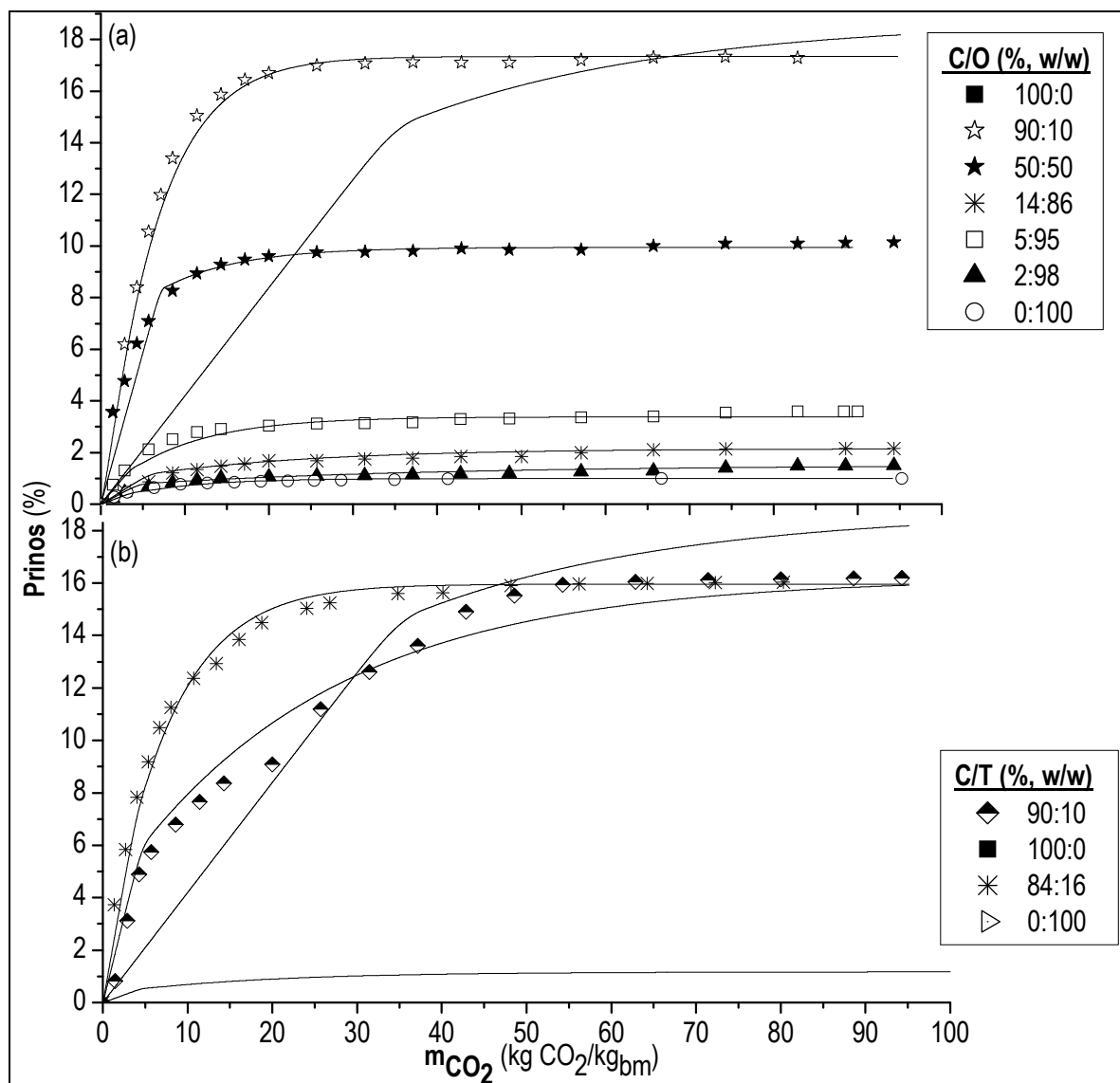
a) matematičko modelovanje (model Sovove (1994a), model zasnovan na analogiji sa prenosom toplote (Bartle i sar., 1990; Hong i sar., 1990; Reverchon i sar., 1993) i modelovanje na nivou sekrecionih struktura (Stamenic i sar., 2008; Zizović i sar., 2005, 2007b, 2008) u cilju analize specifičnih parametara (rastvorljivost ekstrakata i parametri kojima se opisuje prenos mase u CO₂ i čvrstoj fazi).

b) GC/FID i GC/MS analize hemijskog sastava natkritičnih ekstrakata izolovanih pomoću NKE iz pojedinih biljnih sirovina i simultanom NKE iz C/O i C/T smeša u cilju analize uticaja pojedinih jedinjenja prisutnim u ispitivanim biljnim vrstama na ukupnu brzinu ekstrakcije.

Ekperimentalno utvrđeni prinosi natkritičnih ekstrakata kao i prinosi izračunati primenom modela Sovove i modela na nivou sekrecionih struktura prikazani su na slikama (33) i (34). Parametri korišćenih modela kao i vrednosti optimizacionog kriterijum *J* prikazani su u tabeli 52.



Slika 33 Prinos ekstrakta u funkciji od specifične količine utrošenog NK CO₂ (—:model Sovove)



Slika 34 Prinos ekstrakta u funkciji od specifične količine utrošenog NK CO₂
(—:model na nivou sekrecionih struktura)

Na osnovu GC/MS analize u ovoj studiji ustanovljeno je da su najzastupljenija jedinjenja u natkritičnim ekstraktima bili karvakrol (origano), timol (timijan) i eugenol (karanfilić i smeše C/O i C/T). Ova jedinjenja usvojena su kao pseudokomponente kojima su aproksimirani odgovarajući ekstrakti za izračunavanja binarnih koeficijenata difuzije kod matematičkog modelovanja NKE origana, timijana i karanfilića odnosno njihovih mešavina. Binarni koeficijent difuzije za sisteme karvakrol/NK CO₂ i timol/NK CO₂ kao i eugenol/NK CO₂ je u direktnoj vezi sa brzinom prenosa mase kroz granični sloj natkritičnog fluida oko čestice biljnog materijala (izražena preko koeficijenta difuzije kroz film, k_f).

Prema literaturnim podacima (Gupta i Shim, 2007), karvakrol ima veću rastvorljivost u NK CO₂ u odnosu na eugenol na sličnim uslovima pritiska i temperature. Nasuprot tome, u ovoj studiji, jedan od optimizovanih parametara modela Sovove (1994a), rastvorljivost ekstrakta, y_r ukazuje na veću rastvorljivost jedinjenja prisutnih u karanfiliću u odnosu na rastvorljivost origana i timijana koji su imali slične vrednosti y_r . Iako se očekivalo da vrednost ovog parametra (y_r) za NKE iz C/O i C/T meša bude istog reda veličine i između vrednosti za NKE iz pojedinačnih biljnih sirovina, ona je bila veća i to za jedan red veličine za pojedine meše C/O i C/T. Naime, za C/O(10:90) ili C/T (16:84) meše utvrđena je čak 10 puta veća vrednost za parametar kojim se opisuje rastvorljivost ekstrakta (y_r) (tabela 52). Nasuprot tome za simultanu NKE iz meša C/O sa većim udelom origana u polaznoj šarži vrednost ovog parametra bila je istog reda veličine i čak manja u odnosu na pretodno utvrđene vrednosti ovog parametra za NKE samog origana i karanfilića. U skladu sa

prethodnim, ravnotežna koncentracija etarskog ulja u NK CO₂ na graničnoj površini natkritični fluid-etarsko ulje (c*) izračunata pomoću modela na nivou sekrecionih struktura je takođe bila jedan red veličine veća kod simultane NKE smeša C/O i C/T (10 - 50 % origana ili timijana u šarži) u odnosu na NKE iz pojedinačnih biljnih sirovina i smeša sa većim udelom origana.

Tabela 52 Parametri modela za NKE karanfilića (C), origana (O) i timijana (T) i njihovih mešavina (C/O i C/T).

Biljni materijal	pojedinačne biljne sirovine			biljne mešavine						
	C	O	T	C/O				C/T		
Origano ili timijan (%)	0	100	100	10	50	86	95	98	10	16
Eksperimentalni izračunati parametri										
ε	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
$q_{CO_2} \cdot 10^4$ (kg/s)	1,56	1,78	1,83	1,74	1,83	1,67	1,70	1,72	1,86	1,69
$u \cdot 10^4$ (m/s)	3,46	3,95	4,06	3,86	4,06	3,70	3,77	3,82	4,13	3,75
$D_l \cdot 10^7$ (m ² /s)	1,74	1,88	1,91	1,89	1,96	1,83	1,85	1,87	1,98	1,84
$D_{12} \cdot 10^8$ (m ² /s)	1,46	1,50	1,50	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46
$k_f \cdot 10^5$ (m/s)	5,14	5,84	5,96	5,61	5,84	5,42	5,50	5,58	5,95	5,33
Optimizacioni parametri										
Model Sovove										
$x_k \cdot 10^2$	15,0	0,38	0,70	10,0	3,0	1,0	0,65	0,56	14,0	11,0
$k_s \cdot 10^7$ (m/s)	1,0	2,06	1,70	3,0	2,0	0,70	0,55	0,45	1,3	2,2
$y_r \cdot 10^3$ (kg _{extract} /kgCO ₂)	5,00	1,40	1,0	50,0	25,0	3,50	2,20	1,10	20,0	50,0
$k_s^{eff} = k_s \cdot x_k \cdot 10^9$ (m/s)	15,0	0,78	1,19	30,0	6,00	0,70	0,36	0,25	18,2	24,2
J	0,55	$1,22 \cdot 10^{-4}$	$6,18 \cdot 10^{-5}$	0,10	$4,70 \cdot 10^{-3}$	$4,09 \cdot 10^{-3}$	$2,09 \cdot 10^{-3}$	$2,99 \cdot 10^{-3}$	0,15	$1,28 \cdot 10^{-2}$
Model Reverchon i sar. (Hong i sar.)										
$D_e \cdot 10^{-12}$ (m ² /s)	0,60	1,9	1,3	2,7	2,5	1,25	1,15	0,75	0,90	1,7
J	4,52	$6,89 \cdot 10^{-4}$	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$5,37 \cdot 10^{-2}$	$8,91 \cdot 10^{-2}$	$1,68 \cdot 10^{-2}$	$1,31 \cdot 10^{-2}$	$7,18 \cdot 10^{-3}$	$8,9 \cdot 10^{-3}$	$4,05 \cdot 10^{-3}$
Model na nivou sekrecionih struktura										
$c^* \cdot 10^2$ (kmol/m ³)	0,8	0,5	0,5	6,5	4,5	1,5	0,8	0,7	2,5	3,5
$D_m \cdot 10^{12}$ (m ² /s)	–	7,5	3,5	8,5	6,5	5,5	2,5	1,5	–	–
$K \cdot 10^{12}$ (m/s)	9,5	–	–	50,0	–	–	–	–	10	45
θ	–	0,65	0,65	–	0,65	0,65	0,65	0,65	–	–
P	0,15	–	–	0,15	–	–	–	–	0,15	0,15
J	1,21	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$4,84 \cdot 10^{-2}$	$4,49 \cdot 10^{-2}$	$5,17 \cdot 10^{-3}$	$5,25 \cdot 10^{-3}$	$8,88 \cdot 10^{-3}$	$4,84 \cdot 10^{-2}$	$2,89 \cdot 10^{-2}$

Iz ovoga se može zaključiti sledeće:

- primenjeni predtretman biljnog materijala (izlaganje usitnjenog biljnog materijala NK CO₂ u toku 1 h bez proticanja natkritičnog fluida neposredno pre kontinualne NKE) uticao je na povećanje brzine iscrpljivanja ekstrakta iz origana i timijana;
- udeo teško dostupne frakcije rastvorka u nerazorenim ćelijama (x_k) bio je znatno manji u slučaju NKE iz origana i timijana u poređenju sa NKE iz karanfilića (tabela 52);
- relativno visok udeo razorenih trihoma u listu origana i timijana (usled mlevenja kao i rastvaranja u CO₂) (θ) i nizak udeo sekretornih šupljina pupoljaka karanfilića razorenih tokom mlevenja (P) su takođe u skladu sa prethodnim (b);
- nizak udeo teško dostupne frakcije ekstrakta za origano i timijan ukazuje na to da se najveći deo rastvorka oslobađa tokom mlevenja i bubrenja u CO₂ (usled pucanja trihoma koji se nalaze na površini listova) pri čemu postaje lako dostupan natkritičnom fluidu (Stamenic i sar., 2008; Zizović i sar., 2005, 2008);
- prethodna ispitivanja su pokazala da pucanje trihoma i oslobađanje rastvorka tokom jednočasovnog izlaganja biljnog materijala NK CO₂ bez proticanja fluida neposredno pre kontinualne NKE značajno utiče na smanjenje otpora pri prenosu mase u čvrstoj fazi (Zizović i sar., 2005).

U skladu sa (a)-(b), mala količina teško dostupne frakcije kod NKE origana i timijana lakše difunduje iz čvrste u CO₂ fazu (veće vrednosti koeficijenta prenosa mase, k_s) (tabela 52). Proizvodom k_s i x_k koji je definisan kao "efektivni" ukupni prenos mase možda se ipak najbolje može objasniti brzina ekstrakcije u tzv. periodu spore ekstrakcije. Različiti udeli origana u smešama C/O odnosno timijana u smešama C/T su testirani u cilju potvrde ove pretpostavke i izračunavanja "efektivnog" koeficijenta ukupnog prenosa mase. Njegova vrednost za NKE čistog karanfilića bila je reda veličine 10⁻⁸ (m/s) dok je za smeše C/O sa većim udelima origana (14:86, w/w i 2:98, w/w) kao i za sam origano bila za jedan i više redova veličine manja (red veličine 10⁻⁹ do 10⁻¹⁰ (m/s)). S druge strane, vrednost k_s^{eff} za smeše C/O sa manjim udelom origana C/O (90:10) i C/T (84:16) je značajno veća nego za NKE iz čistog karanfilića. Ovo može biti rezultat sledećeg: veoma male količine glavnih komponenti u origanu i timijanu (pre svega karvakrol u origanu i timol u timijanu) koje su lako dostupne NK CO₂ i rastvorene u njemu nakon primene gore pomenutog predtretmana, ponašaju se kao modifikatori NK CO₂ menjajući njegovu moć rastvaranja. Značajni porast moći rastvaranja (tabela 52 i slika 32) dovodi do brže ekstrakcije komponenti prisutnih u karanfiliću u prvom stupnju ekstrakcije (period brze ekstrakcije). Zbog toga, rastvoraku koji ostaje u biljnoj matrici sada treba manje vremena da difunduje kroz čvrstu fazu (veće vrednosti k_s^{eff}). Srednja vrednost koeficijenta prenosa mase kroz čvrstu fazu (K) značajno raste za NKE smeša C/O (90:10) ili C/T (84:16) u odnosu na NKE iz samog karanfilića. Na osnovu eksperimentalnih podataka jasno je da dodavanje većih količina origana (udeli >50 %, w/w) ne utiče značajno na brzine simultane NKE u odnosu na teorijski očekivane u skladu sa brzinama NKE iz čistih komponenti i njihovim udelima u šarži (slika 32 i tabela 51). Ovo je rezultat zaostajanja veće količine rastvorka u sekrecionim šupljinama karanfilića kojoj treba više vremena da difunduju iz čvrste faze u masu natkritičnog fluida. Efektivna difuzivnost u čvrstoj fazi izračunata pomoću modela Reverchon i sar. (1993), D_e (tabela 52) takođe ukazuje na značajno povećanje brzine prenosa mase u čvrstoj fazi kod NKE iz smeša C/O i C/T sa manjim udelom origana ili timijana u odnosu na NKE čistog karanfilića. Otpor prenosu mase u čvrstoj fazi raste za NKE smeša C/O sa većim udelom origana (>50:50, w/w) u odnosu na NKE čistog karanfilića. Pored toga, otpor prenosu mase u čvrstoj fazi je veći nego kod NKE čistog origana najverovatnije zbog konkurentnih brzina difuzije jedinjenja prisutnih iz obe biljne vrste (tabela 51). Difuzivnost ekstrakta kroz membranu nabubrelih nerazorenih trihoma (D_m) je veća za NKE origana nego kod NKE timijana što ukazuje na mogućnost prisustva (ekstrakcije) veće količine težih jedinjenja kod timijana (tabela 52).

4.9.2. Hemijski sastav ekstrakata izolovanih simultanom NKE iz biljnih mešavina

U tabeli 53 prikazan sadržaj glavnih komponenti (karvakrol, timol, timohinon, eugenol, *trans*-kariofilen, eugenil acetat i voskovi) u natkritičnim ekstraktima izolovanim pomoću NKE iz čistog origana, timijana i karanfilića na 10 MPa i 40 °C kao i ekstrakata izolovanih simultanom NKE iz smeša karanfilić/origano i karanfilić/timijan sa različitim masenim odnosima pojedinačnih biljnih sirovina u polaznoj šarži. U natkritičnom ekstraktu karanfilićaa identifikovan je visok sadržaj oksidovanih monoterpena pre svega eugenola i eugenil acetata kao i seskviterpena *trans*-kariofilena što je u skladu sa postojećim literaturnim podacima (Clifford i Al-Saidi, 1999; Della Porta i sar., 2007; Martínez i sar., 2007; Wenqiang i sar., 2007; Yazdani i sar., 2005). Monoterpenski alkoholi karvakrol i timol bili su najzastupljenije komponente u natkritičnim ekstraktima origana i timijana što se i očekivalo na osnovu postojećih literaturnih podataka (Díaz-Maroto i sar., 2005; Menaker i sar., 2004; Ocaña-Fuentes i sar., 2010; Oszagván i sar., 1996; Zeković i sar., 2000).

Sadržaj karvakrola, timohinona i timola u ekstraktima raste sa porastom udela origana u početnoj smeši C/O biljnog materijala, dok sadržaj eugonola (glavne komponente ekstrakta karanfilića) opada. U ovoj studiji se pokazalo da ekstrakti dobijeni simultanom NKE iz smeša C/O (90:10, w/w) ili C/T (90:10, w/w) sa niskim udelom origana i timijana imaju sličan hemijski sastav kao ekstrakt izolovan iz čistog karanfilića. S druge strane, komponente prisutne u origanu i timijanu (karvakrol, timol i timohinon) prisutne su samo u tragovima (tabela 53).

Tabela 53 Sadržaj aktivnih komponenti u natkritičnim ekstraktima origana, timijana i karanfilića i ekstrakata izolovanih simultanom NKE iz njihovih mešavina (% w/w)

Biljni materijal			C	O	T	C/O (SIM)					C/T (SIM)	
		origano (%)										timijan (%)
Naziv jedinjenja	RI ^a	RT/MS ^b				10	50	86	95	98	10	
timohinon	1248	18,15	-	13,30	0,70	0,18	0,19	2,55	1,39	2,17	tr,	
timol	1289	19,67	-	6,0	42,52	0,05	0,33	1,06	0,51	0,92	0,30	
karvakrol	1298	20,04	-	57,28	2,54	0,31	2,82	13,20	17,46	31,22	tr,	
eugenol	1356	21,93	64,06	-		62,96	60,14	48,97	44,15	33,35	63,14	
trans-kariofilen	1417	23,65	12,97	1,01	1,63	12,74	11,43	8,59	8,20	4,77	12,62	
eugenil acetat	1521	27,08	19,93	0,1		19,66	17,93	13,50	13,58	11,15	19,31	
Voskovi			tr	4,89	25,08	0,29	0,65	3,76	4,45	5,03	0,5	
ID^c %			96,96	81,53	72,47	96,19	93,48	91,62	89,74	88,62	95,87	

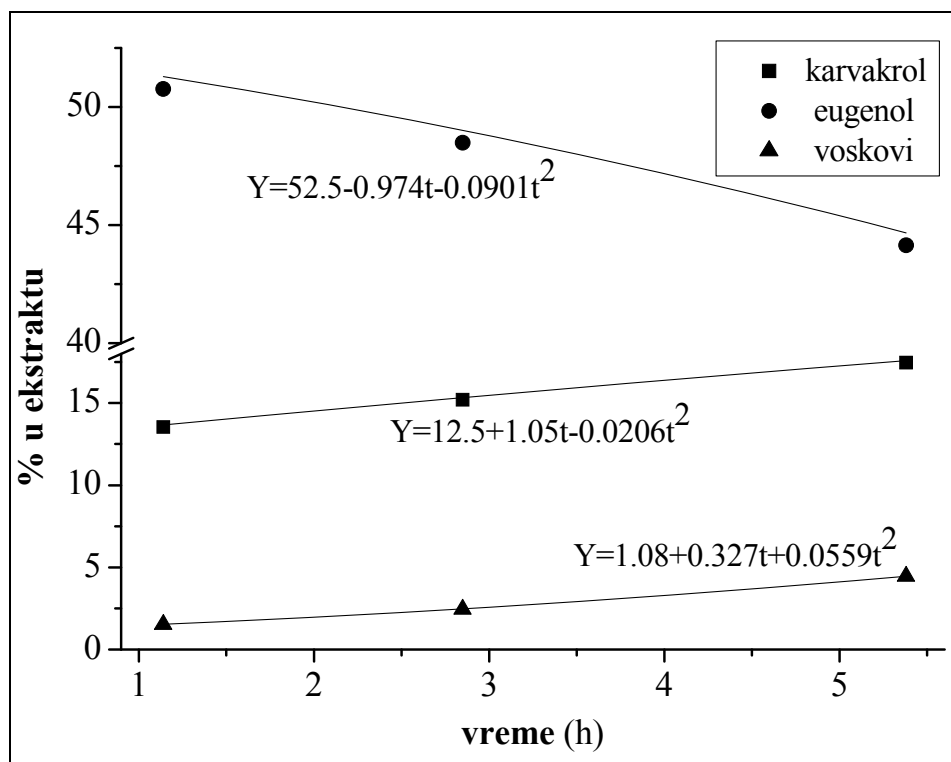
^a Kovačevi indeksi; ^b Retenciono vreme komponente dobijeno GC/MS; ^c Ukupni procenat identifikovanih jedinjenja; tr., komponente prisutne u tragovima, udeo $\leq 0,01$ %

U ekstraktu origana identifikovan je mnogo viši sadržaj karvakrola i (76,3 %) nego u ekstraktu timijana (45,76 %). Pored toga, ekstrakt timijana sadržao je veći procenat voskova u poređenju sa ekstraktom origana. Time bi se verovatno mogla objasniti niža difuzivnost rastvorka u čvrstoj fazi za NKE timijana i simultanu NKE iz smeša C/T (niže vrednosti k_s , k_s^{eff} , D_m i K) u poređenju sa NKE iz origana i simultanu NKE iz smeša C/O za iste ili slične masene odnose pojedinačnih component.

Prisustvo malih količina origana u početnoj smeši biljnog materijala C/O (90:10, w/w) kao i timijana u smeši C/T (84:16, w/w) uticalo je na: (a) zanemarljivo smanjenje ukupnog prinosa ekstrakata u poređenju sa NKE iz čistog karanfilića (slika 32 i tabela 53), (b) povećanje brzine ekstrakcije za oko dva puta (slika 32) i, (c) zanemarljivo malu promenu hemijskog sastava u poređenju sa čistim natkritičnim ekstraktom karanfilića (tabela 53). Manji porast brzine ekstrakcije kod simultane NKE smeše C/T (90:10, w/w) u poređenju sa porastom brzine ekstrakcije kod NKE smeše C/O (90:10, w/w) može se objasniti manjim ukupnim sadržajem timola, karvakrola i timohinona u ekstraktu timijana u poređenju sa ekstraktom origana. Naime, studija je pokazala da samo male i definisane količine ovih jedinjenja mogu menjati u željenom pravcu rastvaračku moć NK CO₂. Tako je, NKE smeše C/T (84:16 %, w/w) bila izvedena sa ciljem da se započne ekstrakcija sa potencijalnom istom količinom timola, karvakrola i timohinona kao kod C/O (90:10 %, w/w) (tabela 3). Kao što je očekivano, slična brzina NKE smeše C/T (84:16, w/w) postignuta je kao kod NKE C/O (90:10, w/w) čime je prethodna pretpostavka mogućnosti promene moći rastvaranja NK CO₂ potvrđena (slika 24). U isto vreme, povećani otpor prenosu mase u čvrstoj fazi (tabela 52) i samim tim nešto manji porast ukupnog ekstrakcionog prinosa za NKE smeše C/T u poređenju sa NKE smeše C/O, može se objasniti prisustvom veće količine voskova u ekstraktu timijana (tabela 53).

Prisustvo većih količina origana u početnoj smeši biljnog materijala (C/O: 14:86, w/w; i, 2:98, w/w) uticao je na: (a) povećanje ukupnog ekstrakcionog prinosa (u odnosu na teorijski očekivan), (b) postizanje gotovo iste brzine ekstrakcije kao što je teorijski očekivana (grafikon 14) i, (c) značajne razlike u hemijskom sastavu izolovanih ekstrakata u poređenju sa čistim ekstraktima karanfilića ili origana (tabela 53).

U radu je ispitan, takođe, hemijski sastav frakcija izolovanih frakcionom NKE iz smeše C/O (5:95, w/w) koja je na osnovu prethodno utvrđenih eksperimentalnih prinosa iz pojedinačnih biljnih sirovina trebalo da da finalni ekstrakt sa podjednakim udelima natkritičnih ekstrakata karanfilića i origana. S tim u vezi ispitana je dinamika izolacije glavnih komponenti prisutnih u ekstraktima karanfilića i origana. Frakcije su sakupljane u toku ekstrakcije nakon 20, 50 i 94,3 kgCO₂/kg_{bm} (ili nakon 1,14 h, 2,85 h i 5,38 h od početka ekstrakcije) da bi se analizirala promena hemijskog sastava u početnom, prelaznom i periodu spore ekstrakcije. Kumulativna promena hemijskog sastava ekstrakta je data u masenim procentima posmatranih jedinjenja (karvakrol, eugenol i voskovi). Pokazalo se da se izolovana količina karvakrola i voskova u ekstraktu ne menja u toku ekstrakcije, dok se količina izolovanog eugenola smanjuje u kasnijim stupnjevima ekstrakcije (slika 35).



Slika 35 Procentualni sadržaj aktivnih jedinjenja (karvakrol i eugenol) i voskova u funkciji vremena (C/O (5:95))

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti sledeće. Usled predtretmana biljnog materijala sa NK CO₂, veći deo ekstraktibilnih supstanci origana (karvakrol) postaje lako dostupan i rastvoran u NK CO₂. U toku izlaganja biljnog materijala NK CO₂, natkritični fluid sa već rastvorenim komponentama origana difunduje u sekretorne šupljine i ćelije karanfilića. Rastvoreni karvakrol modifikuje rastvaračku moć NK CO₂ ponašajući se kao kosolvent i pospešujući ekstrakciju težih jedinjenja kao što su eugenol, eugenil acetat i *trans*-kariofilen. Jedan deo ekstrakta origana (karvakrol) najverovatnije ostaje u najfinijim sekretornim šupljinama dok je istovremeno povećana količina eugenola, eugenil acetata i *trans*-kariofilena rastvorena u NK CO₂ unutar biljne matrice. Povećanoj količini eugenola, eugenil acetata i *trans*-kariofilena sada potrebno je više vremena da difunduje iz čvrste faze u CO₂ fazu. Na ovaj način može se objasniti veći otpor prenosu mase u čvrstoj fazi u toku simultane NKE smeše C/O u poređenju sa NKE iz čistog karanfilića (tabela 52).

Ranija ispitivanja (Reverchon i sar., 1997) pokazala su da je pri NKE na pritiscima do 10 MPa i na temperaturama između 40 °C i 50 °C rastvorljivost voskova zanemarljiva kao što je zabeleženo i u ovoj studiji (tabela 53). Činjenica je da i pri NKE na niskim pritiscima dolazi do izdvajanja voskova (Reverchon i sar., 1997) ali parafinska jedinjenja su nepolarna tako da ista očigledno ne doprinose povećanju rastvaračke moći nepolarnog CO₂. Polarna jedinjenja kao što su niži alkoholi (etanol i metanol) se najčešće koriste kao kosolventi u procesima NKE. Povećani sadržaj vode u biljnom materijalu (~30 %) takođe može uticati na rastvaračku moć NK CO₂ kao odnosno njegovu selektivnost ka određenim jedinjenjima (Ivanovic i sar., 2011b) Karvakrol i timol su monoterpenski alkoholi su polarniji od parafina pa je mnogo verovatnije da ova jedinjenja doprinose povećanju moći rastvaranja NK CO₂ (Ivanovic i sar., 2011a).

4.9.3. Antibakterijska aktivnost mešavina natkritičnih ekstrakata origana i karanfilića

U tabeli 54 su prikazane MIC vrednosti mešavina natkritičnih ekstrakata origana i karanfilića dobijenih namešavanjem ekstrakata iz pojedinačnih biljnih sirovina u odnosu 1:1 (C/O(MIX)), kao i ekstrakta dobijenog procesom simultane NKE iz mešavine origana i karanfilića (18,2:1). Radi komparativne analize antibakterijske aktivnosti ispitivanih smeša natkritičnih ekstrakata origana i karanfilića, u tabeli su, takođe, prikazane vrednosti MIC čistih natkritičnih ekstrakata (O i C). Obe mešavine pokazale su umereno do jako antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka uključujući i meticilin rezistentne sojeve stafilokoka i vankomicin rezistentne enterokoke. Pored toga, obe mešavine pokazale su je pojačano antibakterijsko delovanje na *S. haemolyticus* (MRSA) soj poreklom iz brisa uha mačke, dok je ekstrakt dobijen namešavanjem takođe pokazao pojačano delovanje i na ispitivani soj *S. pyogenes* ATCC 19615.

Tabela 54 Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti NK ekstrakata origana, karanfilića i njihovih mešavina

#	Ispitivani soj	Poreklo	O	C	VREDNOST MIC (µg/ml)	
					C/O(MIX)	C/O(SIM)
1	<i>S.intermedius</i>	uho psa 898/09	10	160	40	20
2	<i>S.aureus</i>	bris nosa, čovek, 891/09	20	640	80	40
3	<i>S.intermedius</i>	koža psa, 890/09	20	160	80	40
4	<i>S. intermedius</i>	koža psa, 895/09	10	160	40	20
5	<i>S.aureus</i> (MRSA)	bris rane psa, 185/07	10	320	80	40
6	<i>S. haemolyticus</i> (MRSA)	bris uha mačke, 666/08	40	320	<1,25	<1,25
7	<i>S.aureus</i> ATCC 11632		20	640	80	160
8	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615		2,5	10	<1,25	10
9	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 27956		2,5	640	80	80
10	<i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	ljudski urin, 1228/08	40	1280	160	160
11	<i>Enterococcus</i> sp.	Jetra miša, 1084/08	80	1280	320	160
12	<i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	ljudski urin, 1218/08	40	640	160	160
13	<i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	mozak, štene, 166/09	80	1280	320	160
14	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i>	koža psa	5	320	10	5

C-natkritični ekstrakt karanfilića; O- natkritični ekstrakt origana; C/O(MIX)-namešani ekstrakt karanfilića i origana u odnosu 1:1; C/O(SIM)-ekstrakt izolovan simultanom NKE iz smeše karanfilića i origana (1:18,2) koji bi na osnovu eksperimentalno utvrđenih prinosa iz pojedinačnih biljnih sirovina trebao da da finalni ekstrakt jednakim udelima ekstrakta karanfilića i origana (1:1)

5. ZAKLJUČCI

1. Natkritični ekstrakti izolovani iz lišaja *Usnea barbata*, a pre svega ekstrakt izolovan na 30 MPa i 40 °C, su pokazali najjače antibakterijsko delovanje od svih ostalih ispitanih ekstrakata i etarskih ulja na testirane sojeve stafilokoka, enterokoka (uključujući sojeve meticilin rezistentnih stafilokoka i vankomicin rezistentnih enterokoka) i streptokoka sa vrednostima MIC između 1,25 µg/ml i 40 µg/ml. Od trinaest ispitanih sojeva, natkritični ekstrakt iz lišaja *U. barbata*, izolovan na 30 MPa i 40 °C je pokazao jače antibakterijsko delovanje od ampicilina na osam sojeva, na tri soja je imao jače dejstvo od eritromicina i na jedan soj je delovao jače od penicilina G. Natkritični ekstrakt iz lišaja *U. barbata*, izolovan na 30 MPa i 40 °C pokazao je jače antibakterijsko delovanje od čiste usninske kiseline na jedanaest od ukupno trinaest ispitanih sojeva. Pored toga, natkritični ekstrakt iz lišaja *U. barbata*, izolovan na 30 MPa i 40 °C pokazao je izuzetno jaku antibakterijsku aktivnost na dvanaest meticilin rezistentnih stafilokoka pri čemu su određene MIC vrednosti bile u opsegu 1,25 do 20 µg/ml.
2. Najveći sadržaj usninske kiseline identifikovan je u natkritičnim ekstraktima *U barbata* (59,5 % i 36,5 %). Sadržaj usninske kiseline u etanolnim ekstraktima lišaja *U. barbata* bio je znatno manji, (0,18-3,59 %). Iz tog razloga, etanolni ekstrakti *U.barbata* su imali znatno manji antibakterijski efekat u odnosu na natkritične ekstrakte na ispitivane sojeve stafilokoka, enterokoka i streptokoka.
3. Jače antibakterijsko delovanje natkritičnog ekstrakta iz lišaja *U. barbata* izolovanog na 30 MPa i 40 °C na ispitivane sojeve, u odnosu na natkritični ekstrakt izolovan na istom pritisku i temperaturi od 60 °C koji je imao veći sadržaj usninske kiseline, kao i na čistu usninsku kiselinu dokazuje sinergetski efekat i drugih komponenti prisutnih u natkritičnim ekstraktima.
4. Kod procesa natkritične ekstrakcije iz lišaja *U. barbata*, primenom optimalnog predtretmana biljne sirovine koji se sastoji u izlaganju sirovine natkritičnom fluidu i nagloj dekompresiji do atmosferskog pritiska neposredno pre kontinualne natkritične ekstrakcije, pored povećanja brzine ekstrakcije, postižu se ekstrakcioni prinosi koje nije moguće ostvariti ekstrakcijom iz sirovine koja je bila podvrgnuta samo mehaničkom predtretmanu (mlevenje). Matematičkim modelovanjem procesa natkritične ekstrakcije iz *U. barbata*, dobijene su iste ili veće vrednosti ravnotežne rastvorljivosti i koeficijenta prenosa mase u čvrstoj fazi kao i manji udeo teško dostupne frakcije ekstrakta za slučaj procesa sa predtretmanom biljnog materijala. Ovi rezultati su u skladu sa činjenicom da dekompresijom dolazi do razaranja tkiva u većoj meri nego u slučaju primene samo mehaničkog predtretmana (mlevenje) biljnog materijala, pri čemu veća količina ekstraktibilnih supstanci postaje lako dostupna natkritičnom fluidu i biva rastvorena u njemu. Pored toga, razaranjem tkiva pri nagloj dekompresiji dolazi do povećanja brzine prenosa mase u čvrstoj fazi što takođe doprinosi povećanju ukupne brzine procesa natkritične ekstrakcije.
5. Timijan je identifikovan kao značajna sirovina za izolaciju ekstrakata sa antibakterijskim delovanjem. Natkritični ekstrakt i etarsko ulje timijana su imali umereno do jako antibakterijsko delovanje na patogene bakterije iz hrane uključujući i Gram-negativne bakterije koje generalno imaju manju osetljivost na etarska ulja (sojevi *Bacillus*, *Enterococcus* vrsta, *Salmonella* Enteritidis i *E.coli*). Ekstrakti timijana imali su jače antibakterijsko delovanje od ekstrakata ruzmarina i žalfije koji su pokazali slabu do umerenu aktivnost na Gram-pozitivne i nikakvu ili slabu aktivnost na Gram-negativne bakterije (MIC=1280-2560 µg/ml). Etarsko ulje timijana je takođe pokazalo umereno jako antibakterijsko delovanje na stafilokoke i enterokoke koje izazivaju zapaljenska oboljenja kože i sluzokože.
6. Natkritični ekstrakt i etarsko ulje timijana, pokazali su jače antibakterijsko delovanje na sojeve *Bacillus* vrsta (MIC=40-80 µg/ml) u poređenju sa aktivnošću čistih komponenti, timola, *p*-cimena i njihove smeše (MIC=160 µg/ml) ukazujući na sinergetski efekat drugih jedinjenja u ekstraktu. Timol, kao i smeša timola i *p*-cimena imali su jače antibakterijsko delovanje na sojeve *Enterococcus*, *E. coli* i *Salmonella* u poređenju

sa etarskim uljem i natkritičnim ekstraktom timijana što ukazuje da timol najviše doprinosi njihovoj antibakterijskoj aktivnosti.

7. Etanolni ekstrakti timijana pokazali su najjače anibakterijsko dejstvo na sojeve *S. aureus* od ispitanih etanolnih ekstrakata (MIC=8-64 µg/ml). Pritom su ekstrakti timijana izolovani Sokslet ekstrakcijom imali jače antibakterijsko dejstvo (MIC=8-32 µg/ml) od ekstrakata izolovanih ultrazvučnom ekstrakcijom (MIC=16-64 µg/ml).
8. Analizom kinetike etanolnih ekstrakcija iz timijana i matematičkim modelovanjem ovih procesa pokazalo se da primena ultrazvuka pozitivno utiče na brzinu prenosa mase (opisane odgovarajućim koeficijentima difuzije) kako u fazi ispiranja tako i tokom spore ekstrakcije. Kod ekstrakcija iz timijana sa etanolom na poluindustrijskom nivou, pokazalo se da povećanje temperature pozitivno utiče na povećanje brzine prenosa mase u fazi spiranja ekstraktibilnih materija sa površine razorenih biljnih ćelija, pa samim tim i na povećanje ukupnog prinosa ekstrakata. Uoprednom analizom koeficijenata difuzije za Sokslet ekstrakciju na temperaturi od 80,5 °C iz timijana i za ekstrakcije na poluindustrijskom nivou sa mešanjem koje su izvedene na istoj i na nižoj temperaturi (40 °C), može se zaključiti da je mešanje imalo više uticaja na brzinu prenosa mase od povećanja temperature.
9. Natkritični ekstrakt origana je pokazao jaku antibakterijsku aktivnost na sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka sa MIC vrednostima između 2,5 µg/ml i 80 µg/ml. Etanolni ekstrakti origana pokazali su umeren do jak antibakterijski efekat na sojeve stafiloka iz sira (MIC=16-512 µg/ml). Natkritični ekstrakt karanfilića (10 MPa i 40 °C) pokazao je umerenu antibakterijsku aktivnost na sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka (MIC=160-640 µg/ml). Etarsko ulje i natkritični ekstrakt lovora (10 MPa i 40 °C), kao i etanolni i natkritični ekstrakti (15 MPa i 40 °C) nevena, pokazali su slabo do umereno delovanje na ispitivane sojeve stafilokoka, streptokoka i enterokoka sa MIC vrednostima u opsegu 160-1280 µg/ml. Etanolni i natkritični ekstrakti (15 MPa i 40 °C) anđelike i divizme pokazali su umereno jako antibakterijsko delovanje na ispitane sojeve stafilokoka (MIC=160-640 µg/ml) za razliku od ekstrakata iz ehinacee koji nisu imali antibakterijsko dejstvo na iste sojeve (MIC>2560 µg/ml).
10. Na osnovu analize antibakterijskog dejstva mešavina natkritičnog ekstrakta *U. barbata*, etarskog ulja timijana i ekstrakta anđelike (natkritični i etanolni) može se zaključiti da ne postoji sinergijski efekat kod odabranih smeša pri datom odnosu izabranih biljnih ekstrakata i ulja. S druge strane, antibakterijska aktivnost etarskog ulja timijana i ekstrakata anđelike se može poboljšati dodatkom natkritičnog ekstrakta *U. barbata* u ispitanoj mešavini.
11. Energetski zahtevi procesa ekstrakcije bioaktivnih substanci iz biljnog materijala zavise kako od primenjene tehnike (metoda ekstrakcije, predtretman biljnog materijala) tako i od vrste biljnog materijala. Dobijene vrednosti korisnog rada i gubitaka eksergije bile su značajno veće za proces natkritične ekstrakcije u poređenju sa ekstrakcijama sa etanolom. Do rasipanja energije kod natkritične ekstrakcije dolazi usled oslobađanja ugljenik(IV)-oksida u atmosferu. Ovaj gubitak se može smanjiti njegovim vraćanjem u proces, što je uobičajna praksa kod procesa natkritičnih ekstrakcija u poluindustrijskim i industrijskim uslovima. U slučaju ekstrakcije sa etanolom, gubitak eksergije se može smanjiti finijim mlevenjem biljnog materijala ($d_p < 0,200\text{mm}$) ili primenom predtretmana sa natkritičnim fluidom.
12. Kod ekstrakcije iz timijana sa etanolom u poluindustrijskim uslovima, sa povećanjem temperature ostvaruje se manji gubitak eksergije zbog postizanja većeg prinosa ekstrakta.

13. Rezultati ispitivanja kinetike simultane natkritične ekstrakcije iz biljnih mešavina karanfilić/origano i karanfilić/timijan ukazali su na prednosti iste u odnosu na proces natkritične ekstrakcije iz čistog karanfilića sa aspekta povećanja brzine ekstrakcije. Pokazalo se da prisustvo 10-16 %,w/w origana ili timijana u polaznoj smeši sa karanfilićem omogućava značajno povećanje (dva puta) brzine ekstrakcije na početku procesa natkritične ekstrakcije. U isto vreme prisustvo (10 %,w/w) origana ili (16 %,w/w) timijana u polaznoj smeši sa karanfilićem ima zanemarljiv uticaj na totalni prinos ekstrakata u poređenju sa natkritičnom ekstrakcijom iz čistog karanfilića. Obe biljke (origano i timijan) sadrže jedinjenja koja su najvećim delom rastvorena već u toku postizanja radnih uslova u ekstraktoru. Na osnovu rezultata analize kinetike simultane natkritične ekstrakcije iz datih biljnih mešavina i hemijskih analiza utvrđeno je da se karvakrol i timol ponašaju kao kosolventi koji modifikuju rastvaračku moć natkritičnog ugljenik(IV)-oksida. Ovaj efekat dovodi do povećanja rastvorljivosti težih i manje rastvorljivih jedinjenja prisutnih uglavnom u karanfiliću (eugenol, *trans*-kariofilen i eugenol acetat). Prisustvo (10 %,w/w) origana ili (16 %,w/w) timijana u polaznoj smeši sa karanfilićem omogućava postizanje zadovoljavajućih prinosa ekstrakata (i do 90 % od onoga postignutog kod natkritične ekstrakcije iz čistog karanfilića) sa oko 70 % manjom potrošnjom natkritičnog fluida što može biti od značaja za industrijsku proizvodnju.
14. Ekstrakt dobijen iz mešavine karanfilića i origana (5 % karanfilića i 95 % origana) koji je sadržao približno jednake udele ekstrakta karanfilića i origana, pokazao je jako antibakterijsko delovanje na *Staphylococcus haemolyticus* rezistentan na meticilin (MIC>1,25 µg/ml). Antibakterijsko delovanje ovog ekstrakta bilo je jače od delovanja natkritičnih ekstrakata iz čistog karanfilića (MIC=320 µg/ml) i origana (MIC=40 µg/ml) na *S. haemolyticus*.
15. Matematički modeli koji su korišćeni u analizi kinetike natkritične ekstrakcije, pre svega model Sovove i model na bazi sekrecionih struktura, dobro opisuju eksperimentalne rezultate sa odstupanjima od eksperimentalnih rezultata reda veličine 10^{-4} - 10^{-3} . Pomenuti modeli mogu se uspešno koristiti za određivanje parametara kojima se opisuje rastvorljivost ekstrakata i prenos mase u natkritičnom fluidu i čvrstoj fazi na različitim uslovima (pritisak, temperature, gustina ugljenik(IV)-oksida, veličina čestica, protok natkritičnog ugljenik(IV)-oksida, itd.). Prednost modela na nivou sekrecionih struktura ogleda se u tome što pruža precizniji uvid u fenomene prenosa mase (na mikro nivou) koji se odigravaju u toku natkritične ekstrakcije i zahteva optimizaciju dva parametra za razliku od modela Sovove koji zahteva tri optimizaciona parametra.

6. LITERATURA

- Abdel-Massih, R.M., Fares, R., Bazzi, S., El-Chami, N., Baydou, E., The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line, *Leukemia Research* 34 (2010) 1052-1056.
- Adams, R.P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 2007.
- Allaf K., Louka, N., Bouvier, J.M., Parent, F., Forget, M., French Patent N° 9309720, International Extension PCT FR 94/00975, 1994.
- Allaf K., P. Vidal, Gradient Activity Report N°CR/89/103, University of Technology of Compiègne, June 1989.
- Al-Bayati, F.A., Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts, *Journal of Ethnopharmacology* 116 (2008) 403-406.
- Anderson, D., *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6th Edition, 5th Volume Set. (Ed. by Fereidoon Shahidi), John Wiley & Sons, Inc, 2005.
- Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, D., J., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., Cabras, P., Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 3530-3535.
- Arques, J. L., Rodriguez, E., Nunez, M., & Medina, M., Inactivation of gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system, *European Food Research and Technology* 227 (2010) 77-82.
- Arun Kumar, S., Muthuselvam, M., Analysis of Phytochemical Constituents and Antimicrobial Activities of *Aloe vera* L. Against Clinical Pathogens, *World Journal of Agricultural Sciences* 5 (2009) 572-576.
- Augustin, M., Hoch, Y., *Phytotherapie bei Hauterkrankungen*, Urban und Fischer, München (2004) 1-7.
- Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System software (AMDIS ver. 2.1), National Institute of Standards and Technology (NIST), Standard Reference Data Program, Gaithersburg, MD, USA, 2005.
- Ayachi, A., Alloui, N., Bennoune, O., Yakhlef, G., Daas Amieur, S., Bouzid, W., Djemai Zoughlache, S., Boudjellal, K., Abdessemed, H., Antibacterial Activity of Some Fruits; Berries and Medicinal Herb Extracts Against Poultry Strains of *Salmonella*, *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science* 6 (2009) 12-15.
- Babovic, N., Djilas, S., Jadrnanin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S., Zizovic, I., Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11 (2010) 98-107.
- Bahraminejad, S., Asenstorfer, R.E., Riley, I.T., Schultz, C.J., Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots of oats (*Avena sativa* L.), *Journal of Phytopathology* 156 (2008) 1-7.
- Bajpai, V.K., Rahman, A., & Kang, S.C., Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria, *International Journal of Food Microbiology* 125 (2008) 117-122.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., Biological effects of essential oils-a review, *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 446-475.
- Balachandran, S., Kentish, S.E., Mawson, R., The effects of both preparation method and season on the supercritical extraction of ginger, *Separation and Purification Technology* 48 (2006) 94-105.
- Bartle, K. D., Clifford, A. A., Hawthorne, S. B., Langenfeld, J. J., Miller, D. J., Robinson, R. A., Model for Dynamic Extraction Using a Supercritical Fluid, *Journal of Supercritical Fluids* 3 (1990) 143-149.
- Bauer, K. Dorothea, G., Horst, S., *Common Fragrance and Flavor Materials*, WILEY-VCH, 2001, p. 170.
- Bazin, M. A., Le Lamer, A.C., Delcros, J.G., Rouaud, I., Uriac, P., Boustie, J., Corbel, J.C., Tomasi, S., Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (2008) 6860-6866.
- Becerril, R., Gomez-Lus, R., Goni, P., Lopez, P., Nerin, C., Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 1003-1011.
- Bejan, A., Fundamentals of exergy analysis, entropy generation minimization, and the generation of flow architecture, *International Journal of Energy Research* 26 (2002) 545-565.
- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.M., Bernardini, A. F., Costa, J., Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation, *Food Chemistry* 106 (2008) 132-139.
- Bernardes, W.A., Lucarini, R., Tozatti, M.G., Souza, M.G.M., Silva, M.L.A., da Silva, A.A., i sar., Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol., *Chemistry and Biodiversity* 7 (2010) 1835-1840.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E., Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 7879-7885.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G., Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54 (2006) 1822-1828.

- Bousbia, N., Vian, M.A., Ferhat, M.A., Petitcolas, E., Meklati, B.Y., Chemat, F., Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity, *Food Chemistry* 114 (2009) 355–362.
- Brunner, G., Stofftrennung mit überkritischen Gasen (Gasextraktion). *Chemie-Ingenieur-Technik*, 59 (1987) 12–22.
- Brunner, G., Supercritical fluids: technology and application to food processing, *Journal of Food Engineering* 67 (2005) 21–33.
- Bouaziz, M., Yangui, T., Sayadi, S., Dhoui, A., Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia, *Food and Chemical Toxicology* 47 (2009) 2755–276.
- Burt S. Essential oils - their antimicrobial properties and potential application in foods – a review, *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253, 2004.
- Burt, S.A., Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food, Ph.D. thesis, Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Veterinary Public Health Utrecht University, 2007.
- Caredda, A., Marongiu, B., Porcedda, S. Soro, C., Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Characterization of *Laurus nobilis* Essential Oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (2002) 1492-1496.
- Catchpole, O.J., Measurement and Correlation of Binary Diffusion Coefficients in Near Critical Fluids, *Industrial&Engineering Chemistry Research*. 33 (1994) 1828-1837.
- Cavero, S, García-Risco,M.R., Marín, F.R., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns,F.J., Reglero, G., Ibañez, E., Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds fromoregano, chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays, *Journal of Supercritical Fluids* 38 (2006) 62-69.
- Ceylan, E., Fung, D.Y.C., Antimicrobial activity of spices, *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 12 (2004) 1-55.
- Chakraborty, G. S, Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Calendula officinalis* (linn.), *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 2 (2008) 65-66.
- Clifford, A.A., Al-Saidi, A.B.S.H.R., A comparison of the extraction of clove buds with supercritical carbon dioxide and superheated water, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 364 (1999) 635-637.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, Approved standard M100-0S18, Vol.28, No.1, CLSI, Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Clinical Laboratory Standards Institute (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement, vol. 26 (3).
- Cocchietto, M., Skert N., Nimis, P. L., A review on usnic acid, an interesting natural compound, *Naturwissenschaften* 89 (2002) 137–146.
- Cock I. E., Antimicrobial Activity of *Aloe barbadensis* Miller Leaf Gel Components, *The Internet Journal of Microbiology*. 2008 Volume 4 Number 2
- Coulson, J.M., Richardson, J.F., (with Backhurst J.R. and Haker J. H.): Chemical engineering, Vol. 2, 4th ed. Particle technology and separation processes, Pergamon Press Oxford, 1991, p. 385.
- Crank, J. The mathematics of diffusion, Oxford University Press, Oxford 1975.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(2005) 343-356.
- Cvetković, R. M., Približno odredjivanje energetske efikasnosti hemijsko-tehnoloških procesa, Magistarska teza, Tehnološki fakultet, Leskovac (1995).
- Davidson, P.M.(2006). Food antimicrobials: Back to Nature, *ISHS Acta Horticulturae* 709: I International Symposium on Natural Preservatives in Food Systems, 29-33.
- Davidson, P.M., Naidu, A.S., Phytophenols. In Naidu, A.S., Natural food antimicrobial systems, Boca Raton, Florida: CRC, 2000, p. 265-295.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungi toxicity on *Penicillium digitatum*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48 (2000) 2576-2581.
- Danielski, L., Campos, L.M.A.S., Bresciani, L.V.F., Hense, H., Yunes, R.A., Ferreira, S.R.S., Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile, *Chemical Engineering and Processing* 46 (2007) 99–106.
- Dauksas, E., Venskutonis, P. R., Povilaityte, V., Sivik, B., Rapid screening of antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extracts obtained by supercritical carbon dioxide at different extraction conditions. *Nahrung/Food*, 45 (1998) 338 – 341.
- De Souza, E.L., De Barros, J.C., Da Conceição M.L., Neto, N.J.G., da Costa, A.C.V., Combined application of origanum vulgare l. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods, *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (2009) 387-393.
- Della Porta, G., Taddeo, R., D'Urso, E., Reverchon, E., Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO₂ extraction, *LWT-Food Science and Technology* 31 (1998) 454–460.
- Deng S, Wang Y, Inui T., Chen, S.N., Farnsworth, N.R., Cho, S., Franzblau, S.G., Pauli, G., F., Anti-TB Polyynes from the roots of *Angelica sinensis*, *Phytotherapy Research* 22 (2008) 878–882.
- Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R., Pandian, S.K., Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane, *Journal of Ethnopharmacology* 130 (2010) 107-115.
- Díaz-Maroto, M.C., Díaz-Maroto Hidalgo, I.J., Sánchez-Palomo, E., PérezCoello, M.S., Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 5385-5389.
- Diaz-Reinoso, B., Moure, A., Domingez, H., Parajo, J. C., Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 2441-2469.

- Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M., Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria, *Pharmaceutica Acta Helvetica* 69 (1994) 25-28.
- Doneanu, C., Anitescu, G., Supercritical carbon dioxide extraction of *Angelica archangelica* L. root oil, *Journal of Supercritical Fluids* 12 (1998) 59-67.
- Du, H., & Li, H., Antioxidant effect of cassia essential oil on deep-fried beef during the frying process, *Meat Science* 78 (2008) 461-468.
- Dušan, F., Marián, S., Katarína, D., Dobroslava, B., Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability, *Toxicology in Vitro* 20 (2006) 1435-1445.
- Djordjević, B., Valent, V., Šerbanović, S., Termodinamika sa termotehnikom, TMF, Univerzitet u Beogradu, Beograd (2003).
- Eggers, R., 1996. Supercritical fluid extraction of oilseeds/lipids. In "Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry", AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, p. 35-60.
- Emiroğlu, Z.K., Yemiş, G.P., Coşkun, B.K., Candoğan, K., Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties, *Meat Science* 86 (2010) 283-288.
- Farhata, A., Giniesb, C., Romdhanea, M., Chemat, F., Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy Experimental and theoretical study, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 5077-5085.
- Fisher, K., Phillips, C., Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology* 19 (2008) 156-164.
- Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P.L., Ceccarini, L., Ricci, A. S., Longo, I., Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven, *Journal of Chromatography A* 1143 (2007) 36-40.
- Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A., Savvaidis, I.N., Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets, *Food Microbiology* 27 (2010) 115-121.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I., Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils, *Food Chemistry*, 102(2007) 898-904.
- Gaete-Garretón, L., Vargas-Hernández, Y., Cares-Pacheco, M.G., Sainz, J., Alarcón, J., Ultrasonically enhanced extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina, *Ultrasonics* 51 (2011) 581-585.
- Gallucci, N., Casero, C., Oliva, M., Zygadlo, J., Demo, M., Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics, *Molecular Medicinal Chemistry* 10 (2009) 30-32.
- Gaspar, F., Leeke, G.A., Al-Duri, B., Santos, R., Modelling the disruption of essential oils glandular trichomes with compressed CO₂, *Journal of Supercritical Fluids* 25 (2003b) 233-245.
- Gaspar, F., Lu, T., Santos, R., Al-Duri, B., Modelling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 25 (2003a) 247-260
- Gautam, R., Saklani, A., Jachak, S.M., Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agent, *Journal of Ethnopharmacology* 110 (2007) 200-234.
- Gaysinsky, S., Weiss, J., Aromatic and spice plants: uses in food safety, *Stewart Post Harvest Review* 4 (2007) 1-9.
- Genena, A. K., Hense, H., Smânia, A. Jr., Machado de Souza, S., Rosemary (*Rosmarinus officinalis*)-study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28 (2008) 463-469.
- Gill, A.O., Holley, R.A., Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membrane by plant oil aromatics, *International Journal of Food Microbiology* 108 (2006) 1-9.
- Glisic, S., Ivanovic, J., Ristic, M., Skala, D., Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: kinetic sata, chemical composition and selectivity of diterpenes, *Journal of Supercritical Fluids* 52 (2010) 62-70.
- Glisic, S.B., Ristic, M., Skala, D. U., The combined extraction of sage (*Salvia officinalis* L.): Ultrasound followed by supercritical CO₂ extraction, *Ultrasonics Sonochemistry* 18 (2011) 318-326.
- Glisic, S., Smelcerovic, A., Zuehlke, S., Spiteller, M., Skala, D., Extraction of hyperforin and adhyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 45 (2008) 332-337.
- Golmakani, M.T., Rezaei, K., Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Food Chemistry* 109 (2008) 925-930.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P., Biodegradable gelatinechitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation, *Food Microbiology* 27 (2010) 889-896.
- Goni, P., Lopez, P., Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Becerril, R., Nerin, C., Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils, *Food Chemistry* 116 (2009) 982-989.
- He, H. P., Corke, H., Cai, J. G., Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oil and Squalene from *Amaranthus* Grain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 7921-7925.
- Goodrum, J.W., Kilgo, M.B., Peanut oil extraction with SC-CO₂: solubility and kinetic functions, *Transactions of the ASAE*, 30 (1987) 1865-1868.
- Goto, M., Sato, M., Hirose, T., Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide, *Journal of Chemical Engineering of Japan* 26 (1993) 401-407.
- Govaris, A., Botsoglou, E., Sergelidis, D., Chatzopoulou, P. S., Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere, *LWT - Food Science and Technology* 4 (2011) 1240-1244.

- Grosso, C. J., Coelho, P., Pessoa, F.L.P., Fareleira, J.M.N.A., Barroso, J.G., Urieta, J.S., Palavra, A.F., Sovová, H., Mathematical modelling of supercritical CO₂ extraction of volatile oils from aromatic plants, *Chemical Engineering Science* 11 (2010) 3579–3590.
- Gündüz G.T., Gönül, S.A., Karapinar, M., Efficacy of sumac and oregano in the inactivation of *Salmonella* Typhimurium on tomatoes, *International Journal of Food Microbiology* 141 (2010) 39–44.
- Gupta, R.B., Shim, J.J., Solubility in supercritical carbon dioxide, CRC Press, Taylor & Francis Group, Florida, USA, 2007, pp. 176, 349.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients, *International Journal of Food Microbiology* 124(2008a) 91-97.
- Gutierrez, J., Rodriguez, G., Barry-Ryan, C., Bourke, P., Efficacy of plant essential oils against food borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: antimicrobial and sensory screening, *Journal of Food Protection* 71(2008b), 1846-1854.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components, *Food Microbiology* 26 (2009) 142–150.
- Hamburger, M., Bauman, D., Adler, S., Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants-effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances, *Phytochemical Analysis* 15 (2004) 46-54
- Hannay, L.B., Hogarth, J., On the Solubility of Solids in Gases, *Proceedings of Royal Society* 29 (1879) 324-342.
- Hatami, T., Meireles, M.A.A., Zahed, G., Mathematical modeling and genetic algorithm optimization of clove oil extraction with supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 51 (2010) 331–338.
- Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., Hamdi, M., Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat, *International Journal of Food Microbiology* 125 (2008) 242-251.
- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., Von Wright, A., Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 3590-3595.
- Hemaiswarya, S., Dobl, M., Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria, *Phytomedicine* 16 (2009) 997–1005.
- Herodež, Š. S., Hadolin, M., Škerget, M. and Knez, Ž., Solvent extraction study of antioxidants from *Melissa officinalis* L. leaves. *Food Chemistry* 80 (2003) 275-282.
- Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2495-2511.
- Higerd, T.B., Flower, S., Gram-Positive Cocci: Staphylococci and Streptococci, in: *Microbiology and Infectious Diseases* 3rd edition (ed. Gabriel Viella, M.D.), Williams&Wilkins, Baltimore, Marzland, USA, 1997, p. 101-113.
- Hojnik, M., Škerget, M., Knez, Ž., Extraction of lutein from Marigold flower petals e Experimental kinetics and modelling, *LWT - Food Science and Technology* 41 (2008) 2008-2016.
- Holley, R.A., Patel, D., Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials, *Food Microbiology* 22 (2005) 273-292.
- Hong, I.K., Rho, S.W., Lee, K.S., W.H. Lee, Yoo, K.P., Modeling of soybean oil bed extraction with supercritical carbon dioxide, *Korean Journal of Chemical Engineering* 7 (1990) 40-46.
- Hrcic, D., Mernik, M., Knez Hrcic, M., Use of Generic Algorithm for Fitting Sovová's Mass Transfer Model, 57 (2010) 767-774.
- Hrcic, D., Mernik, M., Knez Hrcic, M., Knez Z., Fitting Sovova's mass transfer model using an evolutionary algorithm and differential evolution, *International Journal of Innovative Computing and Applications* 2 (2010) 237-243.
- Ingolfsdottir, K., Molecules of Interest, Usnic acid, *Phytochemistry* 61 (2002) 729-736.
- Isenberg, H. (2008). *Microbiology Procedures Handbook, Vol. 2, Antimicrobial susceptibility testing*. Washington DC, USA: American Society for Microbiology Press.
- Ivanović, J., Đilas, S., Jadrantin, M., Vajs, V., Babović, N., Petrović, S., Žižović, I., Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Antioxidants from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Sage (*Salvia officinalis* L.), *Journal of Serbian Chemical Society* 74 (2009a) 717-732.
- Ivanović, J., Mišić, D., Ristić, M., Pešić, O., Žižović, I., Supercritical CO₂ extract and essential oil of bay (*Laurus nobilis* L.)-chemical composition and antibacterial activity, *Journal of Serbian Chemical Society* 75 (2010) 395–404.
- Ivanovic, J., Ristic., M., Skala, D., Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO₂ density and moisture content of plantmaterial, *Journal of Supercritical Fluids* 57 (2011b) 129-136.
- Ivanovic, J., Zizovic, I., Ristic, M., Stamenic, M., Skala, D., The analysis of simultaneous clove/oregano and clove/thyme supercritical extraction, *Journal of Supercritical Fluids* 55 (2011a) 983-991.
- Ivanović, J., Žižović, I., Petrović, S., Skala, D., Analysis of different processes of extraction: yield of extracts obtained from Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) and Sweet bay (*Laurus nobilis* L.) and exergy analysis of applied processes, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 15 (2009b) 271-278.
- Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., Baerheim Svendsen, A., Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods, *Planta Medica* 53 (1987) 396-398.
- Jarrar, N., Abu-Hijleh, A., Adwan, K., Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2010) 121-123.
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y-J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C-J., Zu, J-G., Li, X-L., Chemical composition and antimicrobial activity of the

- essential oil of Rosemary, *Environmental toxicology and pharmacology* 32 (2011) 63-68.
- Jossi, J.A., Stiel, L.I., Thodos, G., The viscosity of pure substances in the dense gaseous and liquid phases, *AIChE Journal* 8 (1962) 59-63.
- Jovanović, M., Stevanović, G., Tošić, T., Stošović, B., Zervos, M.J., *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* meningitis, *Journal of Medical Microbiology* 57 (2008) 373-375.
- Kandiah, M., Spiro, M., Extraction of ginger rhizome: kinetic studies with supercritical carbon dioxide, *International Journal of Food Science & Technology* 25 (1990) 328-338.
- Kerrola, K., Kallio, H., Extraction of volatile compounds of angelica (*Angelica archangelica* L.) root by liquid carbon dioxide, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42 (1994) 2235-2245.
- Kingsbury, D.T., Higerd, T.B., Schmidt, M.G., Basic bacteriology, in: *Microbiology and Infectious Diseases* 3rd edition (ed. Gabriel Viella, M.D.), Williams&Wilkins, Baltimore, Marzland, USA, 1997, p. 3.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S.S., Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts, *Journal of Microbiological Methods* 81 (2010) 121-126.
- Koutsoumanis, K., Lambropoulou, K., Nychas, G.J.E., A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella* Enteritidis in a food model system supplemented with a natural antimicrobial, *International Journal of Food Microbiology*, 49 (1999) 63-74.
- Kuete, V., Tsafack Mbaveng, A., Tsaffack, M., Penlap Beng, V., Etoa, F.X., Nkengfack, A.E., J Meyer, J.M., Lall, N., Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of *Bersamaengleriana* (Melianthaceae), *Journal of Ethnopharmacology* 115 (2008) 494-501.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P., Nychas, G.-J. E., A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *Journal of Applied Microbiology* 91 (2001) 453-462.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., Gardin, F., Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits, *Trends in Food Science and Technology*, 15 (2004) 201-208.
- Lawrence, R., Tripathi, P., Jeyakumar, E., Isolation, purification and evaluation of antibacterial agents from aloe vera, *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (2009) 906-915.
- Lee, M. L., Markides, K. E., *Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*. Chromatography Conferences, Inc. Provo, Utah, 1990, p. 326.
- Leonard, C.M., Virijevic, S., Regnier, T., Combrinck, S., Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms, *South African Journal of Botany* 76 (2010) 676-680.
- Lopez-Malo vigil, A., Palou, E., Alzamora, S.M., Naturally occurring compounds plant source in: *Antimicrobials in food* 3rd (eds. Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branen, A.L.), Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005, p. 429-446.
- Mahmoud, B. S. M., Kawai, Y., Yamazaki, K., Miyashita, K., Suzuki, T., A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds, *Food Chemistry* 99 (2006), 656-662.
- Malti, J.E., Amarouch, H., Antibacterial effect, histological impact and oxidative stress studies from *Laurus nobilis* extract, *Journal of Food Quality* 32 (2009) 190-208.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson, M.J., Narbad, A., Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry, *Journal of Applied Microbiology* 103 (2007) 2056-2064.
- Manos, J., Schmidt, M.G., Del Bene, V., Gram-Positive Rods: *Corynebacteria*, *Listeria*, *Clostridium*, and *Bacillus*, in: *Microbiology and Infectious Diseases* 3rd edition (ed. Gabriel Viella, M.D.), Williams&Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 1997, p. 113-124.
- Marr, R., Gamse, T. Use of supercritical fluids for different process including new development-a review, *Chemical Engineering and Processing* 39 (2000) 19-28.
- Martínez, J., Martínez, J. M., Fitting the Sovová's supercritical fluid extraction model by means of a global optimization tool, *Computers & Chemical Engineering* 32 (2008) 1735-1745.
- Martínez, J., Rosa, P.T.V., Meireles, M.A.M., Extraction of clove and vetiver oils with supercritical carbon dioxide: modeling and simulation, *The Open Chemical Engineering Journal* 1 (2007) 1-7.
- McKetta, J. J., *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*, Volume 36, USA (1990) 76.
- Menaker, A., Kravets, M., Koel, M., Orav, A., Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs, *Comptes Rendus Chimie* 7 (2004) 629-633.
- Michiels, J., Missotten, J., Fremaut, D., De Smet, S., Dierick, N., In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and *trans*-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora, *Livestock Science*, 109 (2007) 157-160.
- Milojević S., Stanković T.D., Plić R., Lazić M.L., Veljković V.B., Kinetics of distillation of essential oil from committed ripe Juniper (*Juniperus communis* L.) berries, *Biochemical Engineering Journal* 3 (2008) 574-553.
- Mišić I., Ispitivanje antimikrobne aktivnosti australijskih etarskih ulja, *Diplomski rad*, TMF, Beograd, (2003)
- Mišić, D., Ašanin, D., Ivanović, J., Žižović, I., Investigation of antibacterial activity of supercritical extracts of plants, as well as of extracts obtained by other technological processes on some bacteria isolated from animals, *Acta Veterinaria* 59 (2009b) 557-568.
- Misic, D., Ivanovic, J., Zizovic, I., Antibacterial activity of supercritical *Usnea barbata* extract against staphylococci, streptococci and enterococci originated in animals, 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Vienna,

- Austria, 10-13th April 2010 (abstract štampan i u casopisu Clinical microbiology and infection, 16 (2010a) S349, abstract p1246).
- Mišić, D., Nišavić, J., Žižović, I., Ivanović, J., Antibakterijsko delovanje i citotoksični efekat natkritičnog ekstrakta timijana i ekstrakta timijana dobijenog procesom hidrodestilacije, Veterinarski glasnik, 63 (2009a) 17-27.
- Mišić, D., I. Žižović, J. Ivanović, Antibakterijsko delovanje mešavina ekstrakata usnee, timijana i anđelike dobijenih različitim tehnološkim procesima protiv nekih vrsta bakterija značajnih za veterinarsku medicinu, Veterinarski glasnik 64 (2010b) 65-74.
- Moriera, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S., Effects of clove and tea tree oils on *Escherichai coli* O157:H7 in blanching spinach and minced cooked beef, Journal of Food Processing and Preservation 31 (2007) 379-391.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M., Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens, Phytomedicine 17 (2010) 1061-1066.
- Muñoz, M., Guevara, L., Palop, A., Tabera, J., Fernández, P. S., Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogeneses* in broth and food systems using flow cytometry, LWT-Food Science and Technology, 42 (2009) 220-227.
- Musyimi, D.M., Muema, O., Muema, P.M., Phytochemical compounds and antimicrobial activity of extracts of aspilia plant (*Aspilia mossambicensis*)(Oliv) Wild., International Journal of Botany 4 (2008) 56-61.
- Mytle, N., Anderson, G.L., Doyle M.P., Smith, M.A., Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters, Food Control 17 (2006) 102-107.
- Najdenova, V., Lisickov, K., Đarmati, Z., Antimicrobial activity and stability of usnic acid and its derivatives in some cosmetic products, Olaj, Szapan, Kozmetika 50 (2001) 158-160
- Nejad Ebrahimi, S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., Yousefzadi, M., Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages, Food Chemistry 110 (2008) 927-931.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J., Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria, Food Control 20 (2009) 157-160.
- Neis, U., Ultrasound in environmental engineering II: Intesification of biological and chemical processes by ultrasound, TU Hamburg-Hamburg, 2002, p. 79.
- Nguyen, U., Frakman, G., Evans, A.D., Process for extracting antioxidants from Labiatae herbs, United States Patent 5,017,397, 1991
- Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L. Superbugs in the coming new decade: multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* in 2010, Current Opinion in Microbiology 10 (2007) 1-5.
- Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Roccaro, A.S., Alonzo, V., Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol, FEMS Microbiology Letters 230 (2004) 191-195.
- Nguefack, J., Nguikwie, S.K., Fotio, D., Dongmo, B., Amvam Zollo, P.H., Leth, V., Nkengfack, A.E., Poll, L., Fungicidal potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* to control *Alternaria padwickii* and *Bipolaris oryzae*, two seed-borne fungi of rice (*Oryza Sativa* L.), Journal of Essential Oil Research 19 (2007) 581-587.
- Ocaña-Fuentes, A., Arranz-Gutiérrez, E., Señorans, F.J., Reglero, G., Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: anti-inflammatory properties based on cytokine response on macrophages THP-1, Food and Chemical Toxicology 48 (2010) 1568-1575.
- Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., Vuorela, P., Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland, Journal of Ethnopharmacology 73 (2000) 299-305.
- Okoh, O. O., Sadimenko, A. P., Afolayan, A. J., Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods, Food Chemistry 120 (2010) 308-312.
- Osburn, J. O., & Katz, D. L., Structure as a variable in the application of diffusion theory to extraction, Transactions of the American Institute of Chemical Engineers 40 (1944) 511-531.
- Oszagván, M., Simádi, B., Sawinsky, J., Supercritical fluid extraction of volatile compounds fromlavandin and thyme, Flavour and Fragrance Journal 11 (1996) 157-165.
- Oszagván, M., Simádi, B., Sawinsky, J., Horvath, K., Kery, A., Lamberkovics, E., Supercritical fluid extraction of essential oils from mixtures of medicinal plants, in: M. Perrut, G. Brunner (Eds.), Proceedings of the 3rd Symposium on Supercritical Fluids, ISASF, Strasbourg, 1994, p. 453-458.
- Otsuka, N., Liu, M., Shiota, S., Ogawa, W., Kuroda, T., Hatano, T., Tsuchiya, T., Anti-methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Compounds Isolated from *Laurus nobilis*, Biological & Pharmaceutical Bulletin 31 (2008) 1794-1797.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiea, S., Saucier, L., Lacroix, M., Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle, Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (2004) 5598-5605.
- Palaniappan, K., Holley, R.A., Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria, International Journal Food Microbiology 140 (2010) 164-168.
- Panchal, M. A., Murti, K., Lambole, V., Pharmacological properties of verbascum thapsus-a review, International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 5 (2010) 73-77.

- Patrignani, F., Iucci, L., Belletti, N., Gardini, F., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., Effects of sub-lethal concentrations of hexanal and 2-(E)-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile compounds of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli*, International Journal of Food Microbiology 123 (2008) 1-8.
- Pauli, A., Antimicrobial properties of essential oil constituents, International Journal of Aromatherapy 11 (2001) 126-133.
- Periago, P.M., Conesa, R., Delgado, B., Fernández, P.S., Palop, A., *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials, Food Technology and Biotechnology 44 (2006) 17-23.
- Ph. Eur. (2002): European Pharmacopoeia, Fourth edition, Strasbourg.
- Ph. Jug. IV (1984): Farmakopeja SFRJ, Pharmacopoeia Jugoslavica. Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, Beograd.
- Ponce, A.G., Roura, S.I., Del Valle, C.E., Moreira, M.R., Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and *in vivo* studies, Postharvest Biology and Technology 49 (2008) 294-300.
- Пономарев, Д. В., Экстрагирование лекарственного сырья, Медицина, Москва, 1976.
- Proestos, C., Bozaris, I., Kapsokefalou, S. M., Komaitis, M., Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms, Food Technology and Biotechnology 46 (2002) 151-156.
- Quirin, K. W., Herbal Extracts in Support of Natural Cosmetics Preservation, Natural Ingredients, Cosmetic Science Technology, (2007) 20-30.
- Raybaudi, R.M.M., Mosqueda-Melgar, J., Martin-Belloso, O., Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon, International Journal of Food Microbiology 121 (2008) 313-327.
- Randrianarivelo, R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., Menut, C., Andrianoelisoa, H.S., Raherimandimby, M., Danthu, P., Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamomum fragrans*, Food Chemistry 114 (2009) 680-684.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Yoshinari, T., Rezaee, M.B., Jaimand, K., Nagasawa, H., Sakuda, S., Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*, International Journal of Food Microbiology 123 (2008) 228-233.
- Reid R. C., Prausnitz J. M., Poling B. E., The Properties of Gases & Liquids, 4th Edition, McGraw-Hill, 1988.
- Reis-Vasco, E.M., Coelho, J.A.P., Palavra, A.M.F., Marrone, C., Reverchon, E., Mathematical modelling and simulation of pennyroyal essential oil supercritical extraction, Chemical Engineering Science 55 (2000) 2917-2922.
- Reverchon, E., De Marco, I., Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, Journal of Supercritical Fluids 38 (2006) 146-166.
- Reverchon, E., Marrone, C., Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling, Chemical Engineering Science 52 (1997) 3421-3428.
- Reverchon, E., Osseo, L.S., Supercritical CO₂ Extraction of Basil Oil: Characterization of Products and Process Modeling, Journal of Supercritical Fluids 7 (1994) 185-194.
- Rios, J. L., M. C. Recio, and A. Villar, Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity—a review of the literature, Journal of Ethnopharmacology 23 (1988) 127-149.
- Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C.M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S., Duffy, G., Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol, International Journal of Food Microbiology 139 (2010) 70-78.
- Rojas-Grau, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P.R., Martin-Belloso, O., Pan, Z., McHugh, T.H., Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, Barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films, Journal of Food Engineering 81(2007) 634-641.
- Roldan-Gutierrez, J.M., Ruiz-Jimenez, J., Luque de Castro, M.D. Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction, Talanta 75 (2008) 1369-1375.
- Roopashree T.S, Raman Dang, Shobha Rani R.H, Narendra, C., Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*, International Journal of Applied Research in Natural Products 1 (2008) 20-28.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., Jordán, M. J., Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils, Food Control 7 (2008) 681-687.
- Roy, B.C., Goto, M., Hirose, T., Extraction of ginger oil with supercritical carbon dioxide: experiments and modeling, Industrial Engineering and Chemical Research 35 (1996) 607-612.
- Rožman, T., Jeršek, B., Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*, Acta agriculturae Slovenica, 93 (2009) 51 – 58.
- Sahraoui, N., Vianb, M. A., Bornardc, I., Boutekedjireta, C., Chemat, F., Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils. Comparison with conventional steam distillation, Journal of Chromatography A 1210 (2008) 229-233.
- Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M., The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. Food Control 19 (2008) 1070- 1431.
- Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senoráns, F. J., Reglero, G., Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction, Journal of Food Protection 68 (2005) 790-795.
- Saritha, V., Antioxidant And Antibacterial Activity Of Aloe Vera Gel Extracts, International Journal Of Pharmaceutical & Biological Archives 1(2010) 376-384.

- Şaşmaz, D. A., Evaluation of the Diffusion coefficient of Rapeseed Oil During Solvent Extraction with Hexane, *JAOCs* 73 (1996) 669-671.
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J., Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils, *Fitoterapia* 77 (2006) 279-285.
- Schütz, E., Supercritical Fluids and Applications-A Patent Review, *Chemical Engineering Technology* 30 (2007) 685-688.
- Selim, S., Antimicrobial activity of essential oils against Vancomycin-Resistant enterococci (VRE) and *Escherichia coli* O157:H7 in feta soft cheese and minced beef meat, *Brazilian Journal of Microbiology* 42 (2011) 187-196.
- Sharma, M., Schoop, R., Suter, A., Hudso, J. B., The Potential Use of Echinacea in Acne: Control of *Propionibacterium acnes* Growth and Inflammation, *Phytotherapy Research* 25 (2011) 517-520.
- Sharma, M., Vohra, S., Amason, J.T., Hudson J.B., Echinacea extracts contain significant and selective activities against human pathogenic bacteria, *Pharm Biol* 46 (2008) 111-116.
- S. Shekarforoush, A.H.K. Nazer, R. Firouzi and M. Rostami, Effects of storage temperatures and essential oils of oregano and nutmeg on the growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in barbecued chicken used in Iran, *Food Control* 18 (2007) 1428-1433.
- Schempp, C.M., Pelz, K., Wittmer, A., Schoepf, E., Simon, J.C., Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria, *Lancet* 353 (1999) 2129.
- Shukla, V., Joshi, G. P., Rawat, M.S.M., Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review, *Phytochemical Review* 9 (2010) 303-314.
- Simándi, B., Oszagyan, M., Lemberkovics, E., Kéry, A., Kaszács, J. F., Mátyás, T. T., Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin, *Food Research International* 31 (1998) 723-728.
- Simović, Đ. Jevrejska brada (*Usnea barbata* L.), *Poljoprivreda info, lekovito bilje*, 2003 (<http://www.poljoprivreda.info/?oid=16&id=106>).
- Silva, N.C.C., Fernandes Jr., A., Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity, *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 16 (2010) 402-413.
- Singh, A., Singh, R. K., Bhunia, A. K., Singh N., Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 36 (2003) 787-794.
- Sievers, U., Eggers, R., Heat recovery in supercritical fluid extraction process with separation at subcritical pressure, *Chemical Engineering and Processing* 35 (1996) 239-246.
- Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S., Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, *Hem. Ind.* 56 (2002) 179-190.
- Skala, D., Žižović, I., Petrović, S.S., Etarska ulja-distilacija, ekstrakcija, izbor tehnologije i kvalitet, *Pregledni rad, Hemijska industrija* 53 (1999) 123-139.
- Skocibusic, M., Bezic, N., Dunkic, V., Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia, *Food Chemistry* 96(2006) 20-28.
- Smith, R. L., Inomata, H., Kanno, M., Arai, K., Energy analysis of supercritical carbon dioxide extraction processes, *Journal of Supercritical Fluids* 15 (1999) 145-156.
- Sovová, H., Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-I. Modelling of extraction curves, *Chemical Engineering Science* 49 (1994a) 409-414.
- Sovová, H., Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-II. Extraction of grape oil, *Chemical Engineering Science* 49 (1994b) 415-420.
- Sovova, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation, *Journal of Supercritical Fluids* 33 (2005) 35-52.
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P.D., Brkić, D., Van Griensven L. J. L. D., Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model, *Molecules* 15 (2010) 7532-7546.
- Svoboda, P., Svoboda, T. G., *Secretory Structures of Aromatic and Medicinal Plants*, Microscopix Publications, United Kingdom, 2000, p. 9-11
- Stahl, E., Schutz, E., Mangold, H. K., Extraction of Seed Oils with Liquid and Supercritical Carbon Dioxide, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28 (1980) 1153-1157
- Stamenic, M., Zizovic, I., Orlovic, A., Skala, D., Mathematical modelling of essential oil SFE on themicro-scale-classification of plantmaterial, *Journal of Supercritical Fluids* 46 (2008) 285-292.
- Stamenic, M., Zizovic, I., Eggers, R., Jaeger, P., Heinrich, H., Rój, E., Ivanovic, J., Skala, D., Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide, *J. of Supercritical Fluids*, 52 (2010) 125-133.
- Stanković, M., Randelović, M., A process for the isolation of (+)-usnic acid from *Usnea barbata* L., UK Patent Application GB 2096996 A, 1981.
- Stanković, M.Z., Veljković, V.B., Lazić, M.L., Bioaktivni proizvodi iz ploda kleke (*Juniperus communis* L.), Monografija, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, Leskovac, 1994.
- Stanojević, D., Čomić, Lj., Stefanović, O., Solujić-Sukdolac, S., In vitro synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. and some preservatives, *Archive of Biological Science, Belgrade* 62 (2010) 175-183.
- Stanojević, Lj., Stanković, M., Nikolić, Lj., Nikolić, V., The influence of the operation conditions and the extraction techniques on the yield, kinetics and the composition of ethanol extracts of *Hieracium pilosella* L., *CI&CEQ* 13 (2007) 199-204.
- Škerget, M., Bezjak, M., Makovšeg, K., Knez, Ž., Extraction of Lutein Diesters from *Tagetes Erecta* using Supercritical CO₂ and Liquid Propane, *Acta Chimica Slovenica* 57 (2010) 60-65.
- Šmelcerović, A., Đorđević, S., Lepojević, Ž., Veličković, D., The analysis of the kinetics of extraction of resinoids and hypericines from amber, *Hypericum perforatum* L., *Journal of Serbian Chemical Society* 67 (2002) 457-463.

- Švabić-Vlahović, M. i grupa autora. Medicinska bakteriologija, Savremena administracija, Beograd, 2008.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food control* 21 (2010) 1199-1218.
- Tan, C.S., Liang, S.K., Liou, D.C., Fluid-solid mass transfer in supercritical fluid Extractor, *Chemical Engineering Journal* 38 (1988) 17-22.
- Thoma, M., Vinatouru, M., Panywnyk, L., Mason, T. J., Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, *Ultrasonic sonochemistry* 8 (2001) 137-142.
- Thomas, L.V. and Isaak, T., Nisin synergy with natural antioxidant extracts of the herb rosemary, *Acta Horticulturae (ISHS)* 709 (2006) 109-114.
- Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C., Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*, *Journal of Food Protection* 52 (1989) 399-403.
- Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., Nazemi, J., Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Phytomedicine* 17 (2010) 142-145.
- R.E. Treybal, Mass Transfer Operations, 2nd Edition, MacGraw-Hill Kogakusha, Tokyo, Japan, 1968.
- Ultee, A., Bennink, M. H. J., Moezelaar, R., The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002) 1561-1568.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., Alberda, M., Hoekstra, F. A., Smid, E. J., Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol, *Archives of Microbiology* 174 (2000) 233-238.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (1999) 4606-4610.
- Vegara, S., Funes, L., Martí, N., Saura, D., Micol, V., Valer, M., Bactericidal activities against pathogenic bacteria by selected constituents of plant extracts in carrot broth, *Food Chemistry* 128 (2011) 872-877.
- Veličković, D., Ultrazvučna ekstrakcija žalfije (*Salvia* L.), Monografija, Zadužbina Andrejević, Beograd, 2007.
- Veličković, D.T., Milenović, D.M., Ristić, M.S., Veljković, V.B., Ultrasonic extraction of waste solid residues from the *Salvia* sp. Essential oil hydrodistillation, *Biochemical Engineering Journal* 42 (2008) 97-104.
- Veličković, D.T., Randelović, N. V., Ristić, M. S., Šmelcerović, A.A., Veličković, A.S., Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *Salvia pratensis* L., *Salvia glutinosa* L. and *Salvia aethiopis* L., *Journal of Serbian Chemical Society* 67 (2002) 639-646.
- Veljković, V., Milenović, D., Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.) II. Poređenje modela kinetike ekstrakcije, *Hemijska Industrija* 56 (2002) 60-67.
- Vinatoru, M., An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonic sonochemistry* 8 (2001) 303-313.
- Vinatoru, M., Toma, M., Mason, T. J., Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and its constituents, *Advances in Sonochemistry*, 5 (1999) 209-249.
- Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P.I., Lazurca, D., Mason, T.J., The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials, *Ultrasonics Sonochemistry* 4 (1997) 135-139.
- Virella, G., Gram-Negative Rods II: Enterobacteriaceae and Other Enteropathogenic Gram-Negative Rods, in: *Microbiology and Infectious Diseases 3rd edition* (ed. Gabriel Viella, M.D.), Williams&Wilkins, Baltimore, Marzland, USA, 1997, p.144-146.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Angel Perez-Alvarez, J., Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet, *International Journal of Food Science and Technology* 43 (2008) 526-531.
- Wang, L., Weller, C. L., Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006) 300-312.
- Ward, P.N., Holden, M.T.G., Leigh, J.A. i sar., Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*, *BMC Genomics*, 54 (2009) 1-17.
- Wendakoon, C. N., Sakaguchi, M., Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices, *Journal of Food Protection* 58 (1995) 280-283.
- Wenqiang, G., Shufen, L., Ruixiang, Y., Shaokun, T., Can, Q., Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods, *Food Chemistry* 101 (2007) 1558-1564.
- Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, Dykes, G. A., *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria, *Food Control* 21 (2010) 1408-1414.
- Yazdani, F., Mafi, M., Farhadi, F., Tabar-Heidar, K., Aghapoor, K., Mohsenzadeh, F., Reza Darabi, H., Supercritical CO₂ extraction of essential oil from clove bud: effect of operation conditions on the selective isolation of eugenol and eugenyl acetate, *Zeitschrift für Naturforschung B* 60 (2005) 1197-1201.
- Lin, J. Y., Zeng, Q.X., An, Q., Zeng, Q. Z., Jian, L.X., Zhu, Z.W., Ultrasonic Extraction of Hempseed Oil, *Journal of Food Process Engineering* xxx (2011) xxx.
- Yesil-Celiktas, O., Nartop, P., Gurel, A., Bedir, E., Vardar-Sukan, F., Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* calli, *Journal of Plant Physiology* 164 (2007) 1536-1542.
- Yoda, S: K., Marques, M.O.M., Petenate, A. J., Meireles, M.A.M., Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂+water: extraction kinetics and identification of extracted components, *Journal of Food Engineering* 57 (2003) 125-134.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussai, M., Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities, *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 3144-3152.

- Zeković, Z., Lepojević, Ž., Vujić, D., Supercritical extraction of thyme (*Thymus vulgaris* L.), *Chromatographia* 51 (2000) 175–179.
- Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., Li, J., Yan, W., The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella* Typhimurium, *Journal of Food Safety* 27 (2007) 124-133.
- Zhao, Y., Liu, W., Wu, Z., Solubility Model of Solid Solute in Supercritical Fluid Solvent Based on UNIFAC, *Industrial Engineering and Chemical Research* 49 (2010) 5952–5957.
- Zhang, Z.S., Wang, L.J., Li, D., Jiao, S.S., Chen, X. D., Ma, Z.H., Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed, *Separation and Purification Technology* 62 (2008) 192-198.
- Zill-e-Huma, Hydrodiffusion assistée par micro-ondes. Nouvelle technique d'eco-extraction d'antioxydants, PhD Thesis, Academie d'aix-Marseille Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 2010.
- Žižović, I., Ekstrakcija etarskih ulja natričnim ugljenik(IV)-oksidom – matematičko modelovanje i optimizacija procesa, Tehnološko-metalurški fakultet, Doktorska teza, Beograd, 2006.
- Zizovic, I., Eggers, R., Heinrich, H., Jagger, P., Stamenic, M., Ivanovic, J., Skala, D., Swelling of the plant material and SFE process optimization, in: *Proceedings of the 11th Meeting on Supercritical Fluids, Barcelona, 2008*, CD Proceedings #P NP 44.
- Žižović, I., Mišić, D., Ašanin, R., Ivanović, J., Antibakterijska aktivnost etarskih ulja odabranih biljaka porodice Lamiaceae izolovanih različitim metodama, *Zbornik radova Tehnološkog fakulteta, Leskovac 2009*, br. 19, p. 20-26.
- Zizovic, Z., Stamenic, M., Ivanovic, J., Orlovic, A., Ristic, M., Djordjevic, S., Petrovic, S. D., Skala, D., Supercritical carbon dioxide extraction of sesquiterpenes from valerian root, *Journal of Supercritical Fluids* 43 (2007a) 249-258.
- Zizovic, I., Stamenic, M., Orlovic, A., Skala, D., Supercritical carbon dioxide essential oil extraction of Lamiaceae family species: mathematical modelling on the micro-scale and process optimization, *Chemical Engineering Science* 60 (2005) 6747–6756.
- Zizovic, I., Stamenic, M., Orlovic, A., Skala, D., Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale, *Journal of Supercritical Fluids* 39 (2007b) 338-346.

7. PRILOZI

PRILOG 1

Listing programa u FORTRAN 4.0

Model Sovove (1994)

```

dimension r(50,50),y(50,50),e(100),z(100),h(100),t(100),tau(100)
real maspro,m,m0,mi,ks,kf,k,int1,int2
open(1,file='profil koncentracija unutar cestica.rez')
open(2,file='profil koncentracija unutar ekstraktora.rez')
open(3,file='prinos masa.rez')
open(4,file='prinos vreme.rez')
*
unos neophodnih parametara
*
proracun
x0=m0/m
r0=x0/xk
u=(maspro/ro)/((d*.01)**2.*3.14/4.)
re=ro*dp*.001*u/mi
sc=mi/(ro*d12)
sh=0.38*re**.83*sc**(1./3.)
kf=sh*d12/(dp*.001)
k=(ks*ros*xk)/(kf*ro*yr)
zuk=2.7*(u/poroz)**.54*huk*.001/u
taum=r0-1.
taun=taum+(1./k)*alog((1+taum*exp(r0*k*zuk))/(1.+taum))
t(1)=0.
h(1)=0.
int1=tuk/10.
nn=nint(int1)+1
do 4 kk=2,nn
4 t(kk)=t(kk-1)+10.
int2=huk/10.
n=nint(int2)+1
do 5 j=2,n
5 h(j)=h(j-1)+10.
do 10 j=1,nn
tau(j)=((2.7*(u/poroz)**.54*ro*yr)/((1-poroz)*ros*xk))*t(j)*60.
do 20 i=1,n
z(i)=(2.7*(u/poroz)**.54/u)*h(i)*.001
zw=(1./(k*r0))*alog((r0*exp(k*(tau(j)-taum))-1.)/(r0-1.))
*
prvi period
if (tau(j).le.taum) then
r(j,i)=r0-tau(j)*exp(-z(i))
y(j,i)=exp(-z(i))
e(j)=(xk*tau(j)/zuk)*(1-exp(-zuk))
end if
*
drugi period
if (tau(j).gt.taum.and.tau(j).le.taun.and.z(i).gt.zw) then
r(j,i)=r0-taum*exp(-(z(i)-zw))
y(j,i)=(taum*exp(zw-z(i)))/(r0-exp(k*(taum-tau(j))))
e(j)=(xk/zuk)*(tau(j)-taum*exp(zw-zuk))
end if
*
treći period
if (tau(j).gt.taum.and.tau(j).le.taun.and.z(i).lt.zw.or.
$tau(j).gt.taun) then

```

Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom

```

    r(j,i)=r0/(1+exp(-r0*k*z(i))*(r0*exp(k*(tau(j)-taum))-1))
    y(j,i)=(r0*exp(k*(tau(j)-taum)))/
    $(exp(r0*k*z(i))+r0*exp(k*(tau(j)-taum))-1)
    e(j)=x0-(xk/(k*zuk))*
    $alog(1+(exp(r0*k*zuk)-1)*exp(k*(taum-tau(j))))/r0
    end if
    if (r(j,i).le.0.) then
    r(j,i)=0.
    end if
    write(1,'(f12.5,2x,f12.5,2x,f12.5)')t(j),h(i),r(j,i)
    write(2,'(f12.5,2x,f12.5,2x,f12.5)')t(j),h(i),y(j,i)
20 continue
    write(3,'(f12.5,2x,f12.5)')t(j)*60*maspro/(m*.001),e(j)*100.
    write(4,'(f12.5,2x,f12.5)')t(j),e(j)*100.
10 continue
end
```

Model zasnovan na analogiji sa prenosom toplote

```

double precision q0
dimension t(150),t1(150)
real int1,maspro,m0
open(1,file='prinos masa.rez')
open(2,file='prinos vreme.rez')
*   unos neophodnih parametara
*   proracun
    r=dp*.001/2.
    q0=(m0*.001/(4.*r**3.*3.14/3.))
    t(1)=0.
    int1=tuk/20.
    nn=nint(int1)+1
    do 4 kk=2,nn
4   t(kk)=t(kk-1)+20.
    do 20 i=1,nn
    q1=0.
    t1(i)=t(i)*60.
    do 10 n=1,10
    q1=q1+((1./n**2.)*exp(-(n**2.*3.14**2.*d*t1(i)/r**2.)))
10 continue
    q=q1*(6./3.14**2.)*q0
    q=(q0-q)
    e=q*(4.*r**3.*3.14/3.)
    write(1,'(f12.5,x,f12.5)')t(i)*60.*maspro/(m*.001),e*100./(m*.001)
    write(2,'(f12.5,x,f12.5)')t(i)*60.,e*100./(m*.001)
20 continue
end
```

Model na nivou sekrecionih struktura (Stamencic i sar., 2008; Zizovic i sar., 2005)

Trihomi

```

    dimension cg(60),cgg(60),cz(60),czz(60),
    $r1(60),r11(60),r2(60),r22(60),b(60)
    real k,l,kol
    double precision brzl,ve
    open(1,file='izopopt.pod') – ovo mozes da promenis, posto sam kopirao iz programa za izop
    open(2,file='izopopt.rez')
    read(1,'(5f12.0)')x,taumax,dx,dtau,tausr
    read(1,'(7f12.0)')ve,poroz,a,fi,brzl,eps,eps1
    read(1,'(4f12.0)')cgz,cprim,cz0,r0
    read(1,'(4f12.0)')dmem,dax,u0,k
```

```

l=0.165
  tmax=taumax*100.*60.
q=x/dx
  m=nint(q)
  tau=0.
  p2=0.
  do 4 i=1,m+1
    r1(i)=r0
    r11(i)=r0
    r22(i)=r0
    r2(i)=r0
    cz(i)=cz0
    czz(i)=cz0
  4  cg(i)=0.
    kol=0.
10  tau=tau+dtau
    t=tau*100.
    cg(1)=0.
    do 5 i=2,m+1
      r11(i)=r1(i)-k*(cgz-cg(i))*dtau*tmax/cprim
      if (r11(i).le.eps) then
        r11(i)=0.
        p1=0.
      else
        p1=a*(3./r11(i))*(brzi*4.*r11(i)**3.*3.14/(3.*ve*poroz))
        $*k*(cgz-cg(i))
        p3=0.
        goto 17
      end if
      czz(i)=cz(i)-dtau*tmax*(dmem*(cz(i)-cg(i))/(4.*3.14*r0**2.))
      b(i)=cz(i)-czz(i)
      if ((cz(i)-czz(i)).le.eps1) then
        p3=0.
      else
        p3=(1.-a)*(1.-fi)*(3./r0)*(brzi*4.*r0**3.*3.14/
        $(3.*ve*poroz))*dmem*(3./r0)*(czz(i)-cg(i))
      end if
17  cgg(i)=cg(i)+dtau*tmax*((dax/l**2.)*(cg(i+1)-2.*cg(i)+cg(i-1)))/dx*
    $*2.-(u0/(poroz*1))*(cg(i+1)-cg(i-1))/(2.*dx)+p1+p2+p3)
    if (cgg(i).lt.0.) then
      cgg(i)=0.
    end if
    if (cgg(i).gt.cgz) then
      cgg(i)=cgz
    end if
  5  continue
  cgg(m+1)=cgg(m)
  do 7 j=1,m+1
    r1(j)=r11(j)
    r2(j)=r22(j)
    cz(j)=czz(j)
  7  cg(j)=cgg(j)
    kol=kol+cgg(m+1)*0.3*dtau*tmax/(623.*3600.)
    proc=kol*136.*100./0.14
    write(2,'(f7.3,2x,f15.10)')t,proc
    if(tau.lt.taumax) goto 10
  continue
end

```

Sekretorne šupljine i ćelije

dimension cgg(60),cg(60),rr(60),r(60),ce(30),pomer(30),zapr(60)

```

real k,l,kol,mesto(30),masa(60)
open(1,file='cara.pod') – i ovo mozes da promenis
  open(2,file='cara.rez')
  read(1,'(5f10.0)')x,dx,l,tmax,dt
  read(1,'(3f10.0)')k,dax,dulje
  read(1,'(5f10.0)')u,poroz,ve,brcev,protok
  read(1,'(4f10.0)')cz,r0,cprim,dc
  q1=1./dx
  m=nint(q1)
  t=0.
  do 4 i=1,m+1
    mesto(i)=0.
    r(i)=r0
    rr(i)=r0
    cgg(i)=0.
4  cg(i)=0.
  kol=0.
10 t=t+dt
  vreme=t*240.
  cg(1)=0.
  do 5 i=2,m+1
    if (r(i).gt.l) then
      p2=0.
      p1=k*6.*((1.-poroz)/poroz)*(cz-cg(i))/(2.*rr(i))
      rr(i)=r(i)-k*(cz-cg(i))*dt*tmax/cprim
    else
      p1=0.
      if (mesto(i).gt.l) then
        p2=0.
        goto 12
      end if
      if ((cg(i)-cg(i-1)).lt.0.) then
        mesto(i)=0.
        goto 11
      end if
      masa(i)=protok*dt*tmax*150.2*(cg(i)-cg(i-1))/((brcev/m)*2.)
      zapr(i)=masa(i)/960.
      pomer(i)=zapr(i)/((dc/2.)**2.*3.14)
      mesto(i)=mesto(i)+pomer(i)
      if (i.eq.(m+1).or.i.eq.m) then
        mesto(i)=mesto(i-1)
      end if
11 ce(i)=(cz-cg(i))*exp(-k*mesto(i)/dulje)+cg(i)
      p2=k*brcev*2.*(dc/2.)**2.*3.14*(ce(i)-cg(i))/(ve*poroz)
      if(p2.le.0.) then
        p2=0.
      end if
    end if
    continue
12 cgg(i)=cg(i)+dt*tmax*((dax/x**2.)*(cg(i+1)-2.*cg(i)+cg(i-1))/dx**2
  $-(u/(poroz*x))*(cg(i+1)-cg(i-1))/(2.*dx)+p1+p2)
    if (cgg(i).lt.0.) then
      cgg(i)=0.
    end if
  5  continue
  cgg(m+1)=cgg(m)
  do 7 j=1,m+1
    r(j)=rr(j)
  7  cg(j)=cgg(j)
  kol=kol+cgg(m+1)*0.12*dt*tmax/(623.*3600.)
  proc=kol*150.2*100./075
  write(2,'(f7.3,2x,f15.10)')vreme,proc

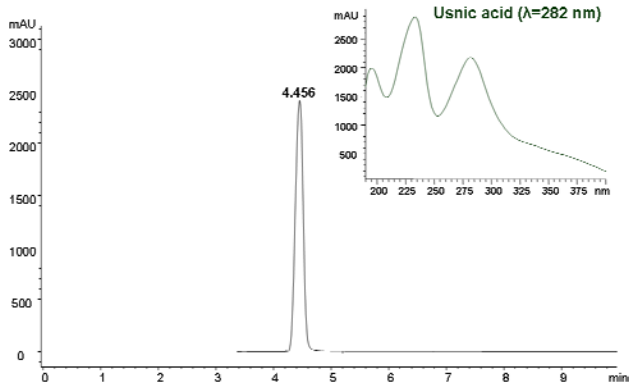
```

Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom

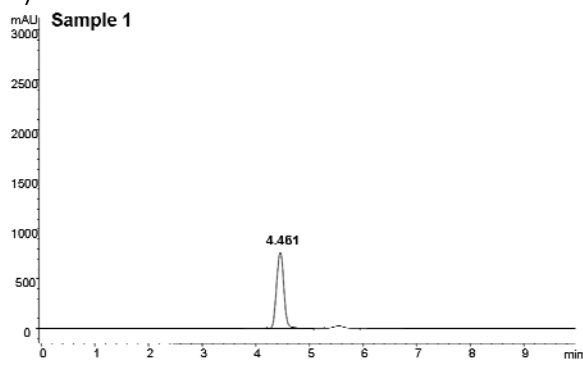
```
if(t.lt.1.) goto 10  
continue  
end
```

PRILOG 2

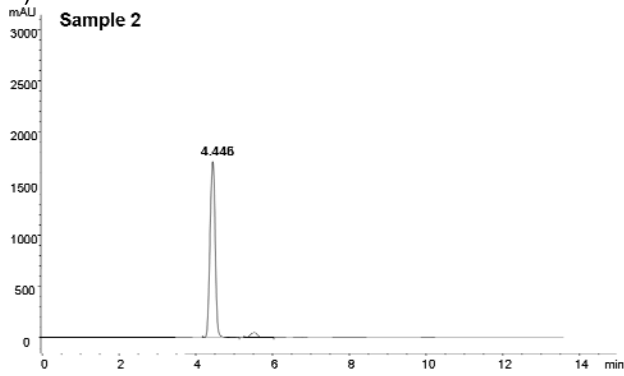
1)



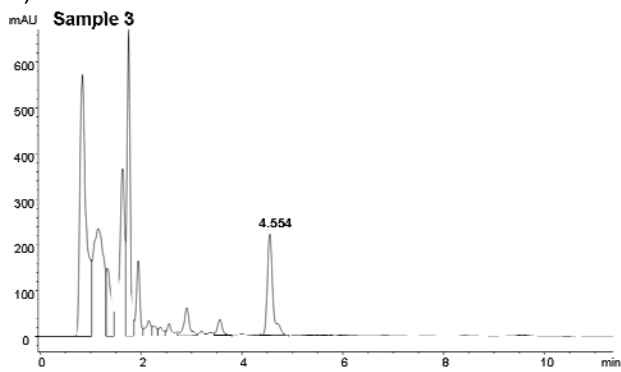
2)



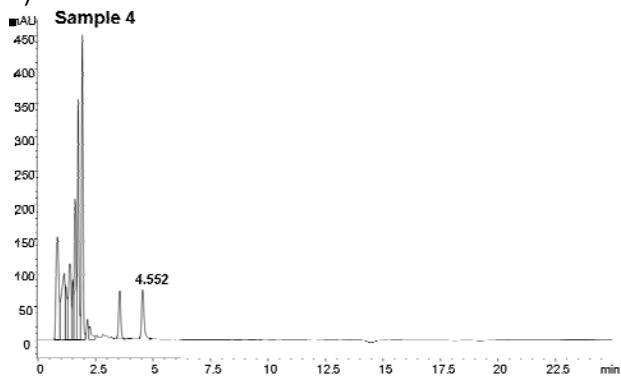
3)



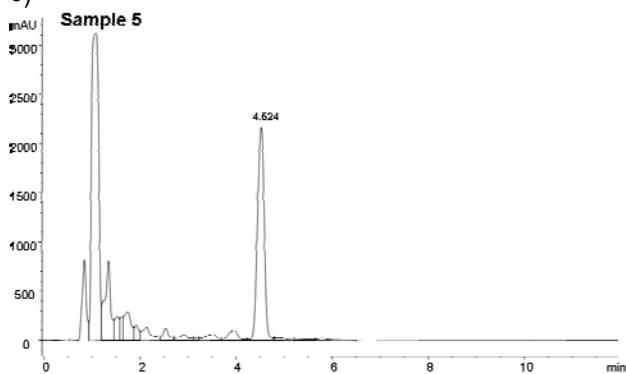
4)



5)



6)



Slika 1 HPLC spektar uzoraka ekstrakata izolovanih različitim metodama (odozgo na dole; 1-U₄₀; 2-U₆₀;3-U_M; 4-U_P; 5-U_{SE}) (t_R (UA)=4,5 min)

BIOGRAFIJA

Jasna Z. Ivanović rođena je 1981. godine u Aleksincu gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 2005. god., a magistrirala 2009. god. na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Osnovne studije završila je sa prosečnom ocenom 8,95 i ocenom 10 na diplomskom radu. Magistarske studije završila je sa prosekom 9,88 i odbranjenom tezom „Izolacija antioksidativne frakcije iz ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) i žalfije (*Salvia officinalis* L.) natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom-optimizacija procesa“ na Katedri za Organsku hemijsku tehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu.

Od 2006. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik, a zatim kao istraživač-saradnik na Katedri za Organsku hemijsku tehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu gde radi na realizaciji više istraživačkih tema iz oblasti ekstrakcija biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

KINETIKA I OPTIMIZACIJA PROCESA IZOLACIJE BILJNIH EKSTRAKATA SA ANTIBAKTERIJSKIM DEJSTVOM

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 07.07.2014.

Tasna Ivanovic

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

KINETIKA I OPTIMIZACIJA PROCESA IZOLACIJE BILJNIH EKSTRAKATA SA ANTIBAKTERIJSKIM DEJSTVOM

која је моје ауторско дело.

Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис

Tasna Ivanovic

У Београду, 07.07.2014.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.