

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI
FAKULTET
NOVI SAD

Dipl. ph Jelena Vladić

**SAVREMENE METODE EKSTRAKCIJE RTANJSKOG
ČAJA (*Satureja montana* L.), HEMIJSKI SASTAV I
BIOLOŠKA AKTIVNOST ODABRANIH EKSTRAKATA
DOKTORSKA DISERTACIJA**

Mentori: Dr Zoran Zeković

Dr Tatjana Čebović

Novi Sad, 2017.

Univerzitet u Novom Sadu

Tehnološki fakultet

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada (dipl., mag., dokt.):

Doktorska disertacija

VR

Ime i prezime autora:

Jelena Vladić

AU

**Mentor (titula, ime, prezime,
zvanje):**

Dr Zoran Zeković, redovni profesor
Dr Tatjana Čebović, vanredni profesor

MN

Naslov rada:

Savremene metode ekstrakcije rtanjskog čaja
(*Satureja montana* L.), hemijski sastav i biološka
aktivnost dobijenih ekstrakata

NR

Jezik publikacije:

Srpski, latinica

JP

Jezik izvoda:

srp. / eng.

JI

Zemlja publikovanja:

Republika Srbija

ZP

Uže geografsko područje:

AP Vojvodina

UGP

Godina:

2017.

GO

Izdavač:

autorski reprint

IZ

Mesto i adresa:

21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

MA

Fizički opis rada:

(7 poglavlja / 187 stranica / 19 slika / 32 tabele / 306
referenci / 51 prilog)

FO

Naučna oblast:

Tehnološko inženjerstvo

NO

Naučna disciplina:

Farmaceutsko inženjerstvo

ND

Predmetna odrednica, ključne reči:

Satureja montana, superkrična ekstrakcija, subkrična voda, spray drying, karvakrol, antioksidantna aktivnost, hepatoprotektivni efekat

PO

UDK

Čuva se:

Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad

ČU

Važna napomena:

Nema

VN

Izvod:

U okviru ove disertacije su ispitane mogućnosti primene savremenih postupaka za dobijanje ekstrakata rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.).

IZ

U ekstraktima dobijenim primenom superkričnog ugljendioksida (različitih gustina) utvrđeno je prisustvo karvakrola kao najzastupljenije komponente. Ekstrakt sa najvećim sadržajem karvakrola je dobijen pri uslovima 350 bar i 50 °C (60,82%), dok je najveći prinos karvakrola ostvaren pri pritiscima 325 i 350 bar i temperaturi 60 °C, i iznosio je 2,4 g/100 g droge. Primenom ugljendioksida na većim pritiscima se ostvaruje efikasnija ekstrakcija karvakrola iz droge, kao i proizvodnja ekstrakata sa većim sadržajima karvakrola. Druge komponente prisutne u ekstraktima u znatno nižim koncentracijama su: *p*-cimen, borneol, *trans*-kariofilen, kariofilen-oksid, γ -terpinen i linalool.

Da bi se utvrdila mogućnost unapređenja prinosa ekstrakcije superkričnim ugljendioksidom, kao i poboljšanja kvaliteta ekstrakata, ispitan je uticaj različitih predtretmana biljnog materijala. Ustanovljeno je da predtretman vodom najznačajnije povećava prinos ekstrakcije (za 25%), dok je ultrazvučni predtretman najadekvatniji izbor za dobijanje ekstrakata sa najvećim sadržajem karvakrola (66,46%). Međutim, najveći prinos ekstrakcije karvakrola iz 100 g droge postignut je primenom etanola i vode kao predtretmana.

Ekstrakti dobijeni primenom subkrične vode (uz variranje temperature i vremena ekstrakcije) su hemijski okarakterisani i radi utvrđivanja uslova ekstrakcije pri kojima se postiže najveći kvalitet ekstrakata u pogledu sadržaja polifenolnih komponenti, kao i antioksidantne aktivnosti,

primenjena je metoda odzivne površine (RSM). Utvrđena je prednost primene subkritične vode u odnosu na klasičnu metodu ekstrakcije u pogledu sadržaja polifenolnih komponenti i antioksidantne aktivnosti.

Suvi ekstrakti *S. montana* dobijeni *spray drying* tehnologijom sušenja (sa različitim koncentracijama maltodekstrina) su ispitani u pogledu fizičkih i hemijskih osobina. Takođe, radi ispitivanja mogućnosti primene u vidu funkcionalnih ili prehrambenih proizvoda, izvršena je senzorna analiza dobijenih suvih ekstrakata, i analizirana je njihova farmakološka aktivnost u smislu ACE inhibitornog i antioksidantnog delovanja.

Ustanovljeno je da je najniža koncentracija maltodekstrina (10%) najadekvatnija za dobijanje suvog ekstrakta *S. montana* sa najvećim sadržajem polifenolnih komponenti, sadržajem etarskog ulja i u pogledu antioksidantne i ACE inhibitorne aktivnosti. Takođe, suvi ekstrakt sa 10% maltodekstrina ispunjava i ostale fizičko-hemijske parametre, kojima se osigurava kako efikasno sušenje, tako i kvalitet ekstrakta.

In vivo aktivnost odabranih ekstrakata *S. montana* ispitana je na modelu hepatotoksičnosti indukovane primenom ugljentetrahlorida. Analiziran je uticaj ekstrakata na funkciju jetre, enzimske parametre oksidativnog stresa i serumske parametre oksidativnog oštećenja izazvanog ugljentetrahloridom i ustanovljen je hepatoprotektivni učinak ekstrakata *S. montana*. Takođe, ispitano je dejstvo ekstrakata na rast Ehrlich-ovih ascitnih tumora implantiranih miševima, kao i na biohemijske parametre oksidativnog stresa u ćelijama tumora i utvrđeno je da je vreme aplikacije ekstrakata od izuzetnog značaja.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:

DP

Datum odbrane:

DO

03.07.2015.

Članovi komisije:
KO

predsednik: dr Senka Vidović, docent, Tehnološki fakultet u Novom Sadu

član: dr Zoran Zeković, redovni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu

član: dr Tatjana Čebović, vanredni profesor, Medicinski fakultet u Novom Sadu

član: dr Stela Jokić, vanredni profesor, Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph documentation
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Contents code: PhD thesis
CC

Author: Jelena Vladić
AU

Mentor: Dr Zoran Zeković
Dr Tatjana Čebović
MN

Title: Contemporary methods of extraction of winter
savory (*Satureja montana* L.), chemical composition
and biological activity of obtained extracts
TI

Language of text: Serbian
LT

Language of abstract: Serbian / English
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2017
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: (7 chapters / 187 pages / 19 figures / 32 tables / 306
references / 51 appendices)
PD

Scientific field Technological Engineering
SF

Scientific discipline
SD

Pharmaceutical Engineering

Subject, Key words
SKW

Satureja montana, supercritical extraction, subcritical water, spray drying, carvacrol, antioxidant activity, hepatoprotective effect

UC

Holding data:
HD

Library of Faculty of Technology, Novi Sad, 21000
Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1

Note:
N

None

Abstract:
AB

This dissertation investigates the possibilities of applying contemporary processes for obtaining extracts of winter savory (*Satureja montana* L.).

Carvacrol was determined to be the most abundant component in extracts acquired by using supercritical carbon dioxide (of various densities). Extract with the richest content of carvacrol was obtained under conditions of 350 bar and 50 °C (60,82%), while the highest carvacrol yield was produced under 325 bar and 350 bar pressures and at a 60 °C temperature reaching 2.4 g/100 g of dry weight. By applying carbon dioxide on higher pressures, a more efficient carvacrol extraction from herbal material is performed, alongside production of extracts with higher carvacrol content. Other components in the extracts present in significantly lower concentrations are the following: *p*-cymen, borneol, *trans*-caryophyllene, caryophyllene-oxide, γ -terpinene and linalool.

In order to recognize the possibility of improving the extraction yield produced by employing supercritical carbon dioxide and enhancing the quality of extracts, the influence of several different pre-treatments was investigated. It was determined that the water pre-treatment raises the extraction yield the most (for 25%), while the ultrasonic pre-treatment was the most adequate choice for acquiring extracts with the highest content of carvacrol (66.46%). However, the highest carvacrol extraction yield from 100 g of dry weight was achieved by applying ethanol and water as pre-treatment.

Extracts which were attained with subcritical water (by varying the temperature and time of extraction) were chemically characterized and Response Surface Method (RSM) was applied for the purposes of

determining conditions of extractions under which the highest quality of extracts in terms of content of polyphenolic compounds and antioxidant activity is reached. The advantage of employing subcritical water over the classical method of extraction in respect of content of polyphenolic components and antioxidant activity was demonstrated.

Dry extracts of *S. montana* obtained by using the spray drying technology (with different concentrations of maltodextrine) were examined in terms of their physical and chemical characteristics. Also, in order to investigate the possibility of their use as functional or food products, sensory analysis of attained extracts was performed, and furthermore, their pharmacological activity in terms of the ACE inhibitory and antioxidant effect was analysed as well.

It was determined that the lowest concentration of maltodextrin (10%) was the most adequate for obtaining dry extracts of *S. montana* with the richest content of polyphenolic components and essential oil, and in respect of antioxidant and ACE inhibitory activities. Also, dry extract with 10% of maltodextrin meets all other physical-chemical parameters, which provide efficient drying and quality of extracts.

In vivo activity of selected extracts of *S. montana* was examined on a model of hepatotoxicity induced by applying carbon tetrachloride. The influence of extracts on liver function, enzyme parameters of oxidative stress, and serum parameters of oxidative damage caused by carbon tetrachloride was analysed and hepatoprotective effect of *S. montana* extracts was determined. In addition, the influence of extracts on the growth of Ehrlich ascite tumors implanted in mice was investigated, and their impact on biochemical parameters of oxidative stress in tumor cells as well, and it was determined that the time of application of extracts is of great significance.

Accepted on Scientific Board on:

AS

Defended:

DE

3rd July 2015

Thesis Defend Board:

DB

president: dr Senka Vidović, docent, Faculty of Technology, Novi Sad

member: dr Zoran Zeković, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad

member: dr Tatjana Čebović, associate professor, Faculty of Medicine, Novi Sad

member: dr Stela Jokić, associate professor, Faculty of Food Technology, Osijek

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	OPŠTI DEO.....	3
2.1.	<i>Satureja montana</i> L.....	3
2.1.1.	Hemijski sastav.....	5
2.1.2.	Upotreba i delovanje.....	8
2.1.3.	Značajne komponente.....	10
2.2.	Savremene metode ekstrakcije.....	13
2.2.1.	Superkrična ekstrakcija.....	14
2.2.2.	Ekstrakcija subkričnom vodom.....	19
2.3.	<i>Spray drying</i> tehnologija sušenja.....	23
2.3.1.	Princip <i>spray drying</i> procesa.....	24
2.3.2.	Izazovi u sušenju.....	28
2.3.3.	Nosači u sušenju.....	30
2.4.	Oksidativni stres.....	34
2.4.1.	Oksidativna oštećenja biomolekula.....	35
2.4.2.	Fenoli kao antioksidanti.....	36
2.4.2.1	Bolesti uzrokovane oksidativnim stresom.....	37
2.4.3.	Ispitivanje antioksidantne zaštite.....	39
2.4.3.1	Ispitivanja na životinjama.....	40
3.	EKSPERIMENTALNI DEO.....	41
3.1.	Biljni materijal.....	41
3.2.	Hemikalije.....	41
3.3.	Aparati i uređaji.....	41
3.4.	Ispitivanje biljnog materijala.....	42
3.4.1.	Određivanje veličine čestica biljnog materijala.....	42
3.4.2.	Određivanje sadržaja etarskog ulja.....	43
3.4.3.	Određivanje sadržaja vlage.....	43
3.5.	Ekstrakcija <i>S. montana</i> superkričnim ugljendioksidom.....	43
3.5.1.	Ekstrakcija <i>S. montana</i> superkričnim ugljendioksidom uz predtretman biljnog materijala.....	45

3.5.2. Gasno-hromatografska analiza ekstrakata <i>S. montana</i> dobijenih superkritičnim ugljendioksidom.....	45
3.6. Ekstrakcija <i>S. montana</i> subkritičnom vodom.....	46
3.6.1. Eksperimentalni dizajn	47
3.6.2. GC/MS analiza ekstrakata <i>S. montana</i> dobijenih subkritičnom vodom.....	49
3.6.3. Ekstrakcija <i>S. montana</i> smešom etanol-voda	49
3.6.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	50
3.6.5. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	50
3.6.6. Određivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata	51
3.7. Sušenje ekstrakata <i>S. montana</i> primenom <i>spray drying</i> tehnologije.....	51
3.7.1. Priprema tečnog ekstrakta za sušenje <i>spray drying</i> procesom	51
3.7.2. Efikasnost procesa sušenja	53
3.7.3. Određivanje sadržaja etarskog ulja.....	53
3.7.4. Gasno-hromatografska analiza ulja izdvojenog iz suvih ekstrakata <i>S. montana</i>	53
3.7.5. Određivanje sadržaja vlage.....	53
3.7.6. Određivanje higroskopnosti.....	53
3.7.7. Određivanje indeksa rastvorljivosti u vodi i indeksa apsorpcije vode.....	54
3.7.8. Određivanje nasipne zapremine	54
3.7.9. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida i antioksidantne aktivnosti suvih ekstrakata <i>S. montana</i>	54
3.7.10. Analiza ACE inhibitorne aktivnosti	55
3.7.11. Senzorna analiza prahova	56
3.8. <i>In vivo</i> ispitivanja antioksidantnih i citotoksičnih efekata ekstrakata <i>S. montana</i>	56
3.8.1. Eksperimentalne životinje	56
3.8.2. Eksperimentalne metode u <i>in vivo</i> ispitivanjima.....	59
3.8.3. <i>In vivo</i> ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata <i>S. montana</i> za ćelije Ehrlich-ovog ascitnog tumora	62
3.8.4. Statistička analiza	62
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	63
4.1. Ispitivanje polaznog materijala.....	63
4.2. Hemijska analiza etarskog ulja <i>S. montana</i>	63
4.3. Ekstrakcija <i>S. montana</i> superkritičnim ugljendioksidom.....	65
4.3.1. Prinos ekstrakcije <i>S. montana</i> superkritičnim ugljendioksidom	65

4.3.2. Hemijska analiza ekstrakata <i>S. montana</i>	69
4.4. Uticaj predtretmana biljnog materijala na proces ekstrakcije <i>S. montana</i> superkritičnim ugljendioksidom	76
4.4.1. Uticaj predtretmana biljnog materijala na prinos ekstrakcije	76
4.4.2. Uticaj predtretmana biljnog materijala na hemijski sastav superkritičnih ekstrakata	79
4.4.3. Uticaj predtretmana biljnog materijala na antioksidantnu aktivnost superkritičnih ekstrakata	82
4.5. Ekstrakcija subkritičnom vodom	84
4.5.1. Uticaj nezavisnih na zavisne promenljive	87
4.5.2. Optimizacija procesa ekstrakcije	90
4.5.3. Hemijski sastav isparljive frakcije ekstrakata <i>S. montana</i> dobijenih subkritičnom vodom	90
4.5.4. Poređenje ekstrakcije subkritičnom vodom i konvencionalne ekstrakcije	97
4.6. Karakterizacija ekstrakata dobijenih <i>spray drying</i> tehnologijom sušenja	99
4.6.1. Prinos i efikasnost procesa sušenja	99
4.6.2. Sadržaj vlage u prahu	100
4.6.3. Higroskopnost	101
4.6.4. Nasipna zapremina	101
4.6.5. Indeks rastvorljivosti u vodi i indeks apsorpcije vode	103
4.6.6. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida	103
4.6.7. Sadržaj etarskog ulja i njegov hemijski sastav	104
4.6.8. Antioksidantna aktivnost	106
4.6.9. ACE inhibitorna aktivnost	107
4.6.10. Senzorna analiza	109
4.7. Ispitivanje <i>in vivo</i> biološke aktivnosti odabranih ekstrakata	112
4.7.1. Uticaj ekstrakata <i>S. montana</i> u sistemu <i>in vivo</i> oštećenja jetre	113
4.7.2. Uticaj ekstrakata <i>S. montana</i> na aktivnost antioksidantnih enzima kod oksidativnog stresa indukovano primenom CCl_4	116
4.8. <i>In vivo</i> citotoksičnost ekstrakata <i>S. montana</i> na ćelije Ehrlich-ovog ascitnog tumora	122
4.8.1. Uticaj ekstrakata <i>S. montana</i> na zapreminu ascitesa, vijabilnost i broj ćelija	122
4.8.2. Uticaj ekstrakata <i>S. montana</i> na antioksidantni status ćelija Ehrlich-ovog ascitnog tumora	124

5.	ZAKLJUČCI	131
6.	LITERATURA	138
7.	PRILOG.....	157

1. UVOD

Značaj i neophodnost naučnih istraživanja u oblasti lekovitog bilja su neosporni, imajući u vidu rastući trend korišćenja preparata na bazi bilja u profilaktičke i terapijske svrhe, kao i sve veću ulogu biljaka i u drugim oblastima, kao što kozmetički, prehrambeni, poljoprivredni i hemijski sektor. Prirodni proizvodi su se uglavnom dobijali konvencionalnim načinima proizvodnje koji veoma često podrazumevaju primenu toksičnih rastvarača, kao i njihovo prisustvo u tragovima u finalnim proizvodima, potom dobijanje proizvoda neodgovarajućeg kvaliteta, nisku efikasnost procesa uz veliki utrošak energije i vremena. S druge strane, sve razvijenija svest o negativnim uticajima ljudskih aktivnosti na životnu sredinu doprinela je razvoju koncepta „zelenih“ tehnologija. U okviru ovog koncepta razvijene su savremene metode ekstrakcije čija primena ima za cilj postizanje kompromisa između ekonomskih i ekoloških zahteva. Osnovna ideja je obezbediti efikasnu i brzu proizvodnju bez neželjenih efekata na okolinu, uz dobijanje zdravstveno bezbednih proizvoda standardizovanog i visokog kvaliteta.

Za ispitivanje, u okviru ove disertacije, odabrana je *Satureja montana* L. (rtanjski čaj), biljna vrsta koja pripada najmnogobrojnijoj porodici lekovitih biljaka *Lamiaceae*. Ova aromatična biljka je karakteristična za područje Balkanskog poluostrva i veoma je zastupljena u narodnoj medicini za tretiranje različitih tegoba i bolesti.

Jedan od ciljeva disertacije je bio ispitivanje postupaka dobijanja ekstrakata *S. montana* ekstrakcionim metodama koje su razvijene u okviru koncepta „zelenih“ tehnologija. Ugljendioksid u superkričnom stanju (uz variranje parametara procesa - temperature i pritiska) primenjen je kao ekstragens radi dobijanja ekstrakata koji su hemijski analizirani. Da bi se utvrdila mogućnost unapređenja prinosa ekstrakcije superkričnim ugljendioksidom, kao i poboljšanja kvaliteta ekstrakata, ispitan je uticaj različitih predtretmana biljnog materijala na prinos, hemijski sastav i antioksidantnu aktivnost dobijenih ekstrakata.

Druga inovativna metoda ekstrakcije koja je primenjena radi dobijanja ekstrakata *S. montana* je ekstrakcija subkričnom vodom (uz variranje temperature i vremena ekstrakcije). Dobijeni ekstrakti su hemijski okarakterisani i radi utvrđivanja uslova ekstrakcije pri kojima se postiže najveći kvalitet ekstrakata u pogledu sadržaja polifenolnih komponenti, kao i antioksidantne

aktivnosti, primenjena je metoda odzivne površine (RSM). Takođe, radi utvrđivanja prednosti primene subkritične vode, u odnosu na tradicionalne tehnike ekstrakcije, izvršeno je poređenje u pogledu kvaliteta ekstrakata, to jest, sadržaja polifenolnih komponenti i antioksidantne aktivnosti.

Jedan od zadataka postavljenih prilikom izrade disertacije je bio i ispitivanje mogućnosti dobijanja ekstrakata *S. montana* u formi prahova (suvih ekstrakata), s obzirom da ova forma preparata postaje sve aktuelnija jer nudi određene prednosti u odnosu na tečne forme. Produžena stabilnost, manji prostor za skladištenje, olakšan transport, kao i mogućnost maskiranja neprijatnih mirisa i ukusa su samo neki od razloga povećane prisutnosti ove forme preparata na tržištu. Sušenje raspršivanjem (*spray drying*) je savremena tehnologija proizvodnje ekstrakata koja je ispitana u okviru ove disertacije. Finalni proizvodi *S. montana* dobijeni *spray drying* tehnologijom sušenja su ispitani u pogledu fizičkih i hemijskih osobina. Takođe, da bi se evaluirala mogućnost upotrebe kod ljudi u vidu funkcionalnih ili prehrambenih proizvoda, izvršena je senzorna analiza dobijenih suvih ekstrakata, i analizirana je njihova farmakološka aktivnost u smislu ACE inhibitornog i antioksidantnog delovanja.

Kroz tehnološki pristup ove doktorske disertacije ispitane su metode dobijanja ekstrakata *S. montana* visokog kvaliteta, to jest, ekstrakata sa visokim sadržajem biološki aktivnih komponenti kojima se pripisuju značajne biološke aktivnosti. Međutim, za kompletniju evaluaciju farmakološke potentnosti ekstrakata, osim *in vitro* testova, neophodno je izvršiti istraživanje uticaja ekstrakata u *in vivo* uslovima, posebno imajući u vidu da se ispoljavanje delovanja ekstrakata u *in vitro* sistemu značajno razlikuje od delovanja u živim sistemima, kao i da su ekstrakti lekovitog bilja smeša velikog broja konstituenata, koji mogu u živim organizmima da ispolje značajno različite efekte.

Ispitana je *in vivo* aktivnost odabranih ekstrakata *S. montana* na modelu hepatotoksičnosti indukovane primenom hepatotoksina ugljentetrahlorida. Analiziran je uticaj ekstrakata na funkciju jetre, enzimske parametre oksidativnog stresa i serumske parametre oksidativnog oštećenja izazvanog ugljentetrahloridom. Takođe, ispitano je dejstvo ekstrakata na rast Ehrlich-ovih ascitnih tumora implantiranih miševima, kao i na i biohemijske parametre oksidativnog stresa u ćelijama tumora.

2. OPŠTI DEO

2.1. *Satureja montana* L.

Familija *Lamiaceae* (usnatice) obuhvata oko 7000 vrsta koje su zastupljene na skoro čitavoj zemljinoj kugli, izuzev arktičkih oblasti. Najveća raznovrsnost rodova i vrsta ove familije se nalazi na Mediteranu. U flori Balkanskog poluostrva, *Lamiaceae* su zastupljene sa 371 vrstom, od kojih su 84 endemske vrste Balkana. U flori Srbije zastupljeno je 30 rodova usnatice sa 147 vrsta (Šilić, 1979; Jančić, 2004; Raja, 2012). U okviru genusa *Satureja*, nalazi se preko 30 vrsta koje su rasprostranjene uglavnom u istočnom delu Mediterana (Slavkovska i sar., 2001). Sistematski položaj vrste *S. montana*, odnosno rtanjskog čaja, prikazan je u tabeli 1.

Tabela 1. Sistematski položaj vrste *S. montana*

Carstvo (<i>regnum</i>)	<i>Plantae</i>
Razdeo (<i>divizio</i>)	<i>Magnoliophyta</i>
Klasa (<i>classis</i>)	<i>Rosopsida</i>
Red (<i>ordo</i>)	<i>Lamiales</i>
Podred (<i>subordo</i>)	<i>Lamiineae</i>
Familija (<i>familia</i>)	<i>Lamiaceae</i>
Podfamilija (<i>subfamilia</i>)	<i>Nepetoideae</i>
Tribus (<i>tribus</i>)	<i>Satureja</i>
Podpleme (<i>subtribus</i>)	<i>Satureja</i>
Rod (<i>genus</i>)	<i>Satureja</i> L.
Vrsta (<i>species</i>)	<i>Satureja montana</i>

Vrsta *S. montana* je polužbun (visine do 50 cm) sa snažnim, vretenastim korenom i uspravnim ili povijenim grančicama koje odrvenjuju. Grančice su vitke, tupo četvorobride do gotovo okrugle i obrasle dlačicama. Listovi su linearno lancetasti, nenazubljeni, bez izražene peteljke, dugi 1-2 cm, široki 2-3 cm. Cvetovi su sa drškom, dugi oko 1 cm. Krunice su bele, ružičaste ili ljubičaste boje, gornja usna krunice je zaobljena i ravna, donja je nešto duža, trorežnjevita i purpurno

istačkana. Od 3 do 7 cvetova se nalazi u okviru metličastih cvasti (slika 1). Vreme cvetanja je od jula do oktobra (Stanić i sar., 2004; Jančić, 2004).



Slika 1. Vrsta *S. montana*

Stanište vrste su livade i kameniti pašnjaci, napuštene kulture, u mediteranskom i submediteranskom području. Staništa ove vrste su u pojasu od samog mora pa do ispod 1200 m nadmorske visine, ali se često na nekim primorskim planinama nalaze lokaliteti i na većim visinama.

Zbog nezahtevne kultivacije, kao i posedovanja prehrambenog i farmaceutskog značaja, genus *Satureja* je širom sveta veoma rasprostranjen. *S. montana* je nedavno kultivisana i u Srbiji. Na eksperimentalnom polju u Bačkom Petrovcu (slika 2) gaji se selekcionisana linija *S. montana* u ekološkim uslovima (Adamović i sar., 2013).



Slika 2. Selekcionisana linija *S. montana* na eksperimentalnom polju u Bačkom Petrovcu

2.1.1. Hemijski sastav

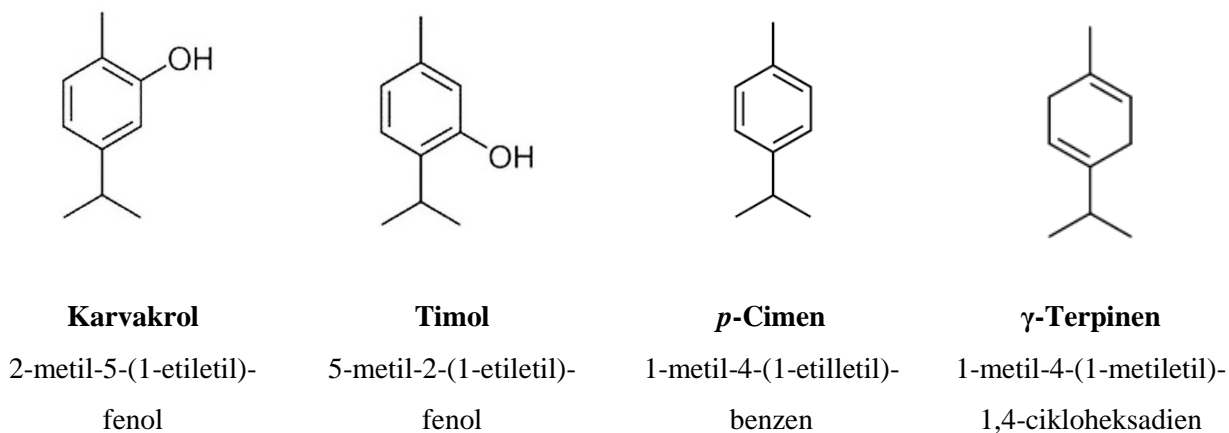
Etarsko ulje predstavlja najčešće istraživani aspekt ove biljne vrste i zapažena je značajna varijabilnost kako sadržaja etarskog ulja, tako i njegovog hemijskog sastava. Razlog pomenute varijabilnosti može biti činjenica da produkcija sekundarnih metabolita, uključujući i etarsko ulje, izuzetno zavisi od uslova sredine i dodatnih faktora kao što su: stadijum razvoja (faza ontogenetskog razvoja), geografsko stanište, način branja, temperatura, dostupnost vode, nutritivenata, atmosferski uslovi, napad patogena i herbivora (Kuštrak i sar., 1996; Gulluce i sar., 2003; Skočibušić i Bežić, 2003; Bežić i sar, 2005; Bakkali i sar., 2008; Andrade i sar., 2013).

S. montana spada u srednje bogate vrste u pogledu sadržaja etarskog ulja, koji varira u zavisnosti od prethodno pomenutih faktora i kreće se od 0,9 do 2,2% (Angelini i sar., 2003; Skočibušić i sar., 2004; Bežić i sar., 2005; Mihajilov-Krstev, 2009). Za rod *Satureja* je utvrđeno postojanje dva hemotipa, u zavisnosti od toga da li su u njemu dominantne komponente fenoli ili terpeni alkoholi (Serrano i sar., 2011). U drugoj studiji je opisano razvrstavanje na dve grupe sa podgrupama: vrste koje sadrže fenole (karvakrol-tip i timol-tip) i vrste koje ne sadrže fenole (monoterpen-ugljovodonični tip, monoterpen-alkoholni tip i monoterpen-ketonski tip) (Abdolhossein i sar., 2004). Etarsko ulje *S. montana* pripada fenolnom hemotipu, gde su u većini slučajeva najzastupljeniji karvakrol i timol, sa značajnim varijacijama. U tabeli 2 je dat pregled sadržaja dominantnih komponenti etarskog ulja *S. montana*, u različitim studijama.

Osim karvakrola i timola, u ulju su prisutni i njihovi biohemijski prekursori, monoterpeni ugljovodoniци γ -terpinen i *p*-cimen (slika 3). U značajnom procentu mogu biti prisutni i borneol, linalool, kao i seskviterpenska jedinjenja β -kariofilen i kariofilen-oksidi (Mihajilov-Krstev, 2009). Etarsko ulje sadrži i manji procenat α -tujena, α -terpinena, γ - i α -pinena i mircena (Skočibušić i Bežić, 2004). Takođe, u nekoliko studija je zabeleženo i prisustvo timokinona (Radonić i Miloš, 2003; Mastelić i Jerković, 2003, Grosso i sar., 2009a).

Tabela 2. Sadržaj dominantnih komponenti etarskog ulja *S. montana*

Komponenta	Sadržaj (%)	Literatura
Karvakrol	63,4	Ćavar i sar., 2013.
	13,7	Bežić i sar., 2009.
	23,3	Ćavar i sar., 2008.
	45,7	Skočibušić i Bežić, 2004.
	3,8-6,9	Mastelić i Jerković, 2003.
	18,0	Fraternale i sar., 2007.
	37,0	Prieto i sar., 2007.
	16,1-52,4	Miloš i sar., 2001.
	2,2-55,9	Ibraliu i sar., 2011.
	52,2-62,0	Grosso i sar., 2009a.
	84,0	Kuštrak i sar., 1996.
45,7	Bežić i sar., 2005.	
Timol	30,9-46,0	Mastelić i Jerković, 2003.
	19,4	Ćavar i sar., 2013.
	31,7	Ćavar i sar., 2008.
	2,6-20,6	Miloš i sar., 2001.
	8,6-11,0	Grosso i sar., 2009a.
	0,4-27,3	Ibraliu i sar., 2011.
	9,9	Fraternale i sar., 2007.
3,9	Bežić i sar., 2005.	
<i>p</i>-Cimen	12,6	Skočibušić i Bežić, 2004.
	14,1	Fraternale i sar., 2007.
	3,0-28,9	Miloš i sar., 2001.
	11,8	Bežić i sar., 2009.
	6,9-12,8	Grosso i sar., 2009a.
γ-Terpinen	7,1-13,5	Mastelić i Jerković, 2003.
	8,1	Skočibušić i Bežić, 2004.
	7,6-9,7	Mastelić i Jerković, 2003.
	3,0	Prieto i sar., 2007.
	0,3-8,9	Ibraliu i sar., 2011.
	6,4-9,4	Grosso i sar., 2009a.
10,6	Bežić i sar., 2009.	



Slika 3. Strukture najzastupljenijih komponenti etarskog ulja *S. montana*

Veliki broj studija koje su sprovedene sa ciljem utvrđivanja hemijskog sastava ulja potvrdile su prisustvo komponenti sa značajnim farmakološkim svojstvima, i na taj način je primena ove biljne vrste u tradicionalnoj medicini dobila naučno opravdanje. Naredni korak je bio unaprediti proces dobijanja ulja, u smislu redukcije troškova i negativnih efekata na životnu sredinu, uz potencijalno poboljšanje kvaliteta samog ulja. Stoga su usledile studije u kojima se poredi hemijski sastav etarskog ulja *S. montana* dobijen hidrodestilacijom sa savremenim metodama ekstrakcije. Grosso i sar. (2009a) utvrdili su sličan hemijski sastav ulja dobijenog hidrodestilacijom i superkritičnim ugljendioksidom, u pogledu oksidovanih monoterpena. Međutim, utvrđeno je da je sadržaj timokinona u ekstraktu dobijenom primenom superkritične ekstrakcije ugljendioksidom 10 puta veći u odnosu na sadržaj u ulju dobijenom hidrodestilacijom. U drugoj studiji, autori navode isti zaključak, sadržaj ulja se neznatno razlikuje, sem u sadržaju timokinona (0,2% u etarskom ulju dobijenom hidrodestilacijom i 2,9% u superkritičnom ekstraktu) (Silva i sar., 2009).

Osim prisustva značajnih lipofilnih komponenti, primenom HPLC analize je ispitan hemijski sastav ekstrakata i utvrđeno je prisustvo značajnih hidrosolubilnih antioksidanata. Kao i u slučaju hemijskog profila etarskog ulja, sadržaj komponenti se značajno razlikuje u studijama. U vodenom-alkoholnom ekstraktu *S. montana* ustanovljeno je prisustvo kafene, siringinske i rozmarinske kiseline kao najdominantnijih komponenti, dok su identifikovane i galna, ferulna, cinamična i vanilna kiselina, kao i tri flavonoida: luteolin, rutin i kvercetin (El Tawab i sar., 2014). U

ekstraktima dobijenim od neisparljivih frakcija *S. montana* nakon hidrodestilacije i ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom, zabeleženo je prisustvo galne, kafene, siringinske, gentizinske, ferulne, hlorogenske, kumarinske i vanilne kiseline, kao i prisutnost epikatehina i katehina (Silva i sar., 2009). Takođe, sličan sastav je zabeležen i u studiji u kojoj su ekstrakti dobijeni maceracijom sa smešom metanol/voda i potom je vršena sukcesivna ekstrakcija sa različitim rastvaračima (hloroform, etil acetat, *n*-butanol i petroletar) (Ćetković i sar., 2007). Pored toga, navodi se da *S. montana* sadrži glikozide luteolina i apigenina, triterpensku kiselinu - ursolnu (Stanić i sar., 2004), kao i kalcijum i magnezijum (Dunkić i sar., 2012). Sadržaj ukupnih fenola se kreće od 4,43 do 12,41%, tanina 0,08-4,90%, a ukupnih flavonoida 0,06-0,40%, pri čemu stabljika sadrži najmanje, a listovi i cvetovi više ovih komponenti (Dunkić i sar., 2012).

2.1.2. Upotreba i delovanje

S. montana je aromatična biljka koja se tradicionalno upotrebljava kao začin i prirodni konzervans hrane. Uobičajeni je sastojak narodnih lekova u terapiji raznih digestivnih, respiratornih i urinarnih tegoba. Veoma često se koristi i u svojstvu tonika, za jačanje organizma. Osim toga, preporučuje se i kod upala kože i sluzokože (Vitas i sar., 2011).

Dugogodišnja prisutnost ove biljne vrste u tradicionalnoj medicini, kao i porast interesovanja za prirodnim lekovima, bili su osnova za mnogobrojna naučna istraživanja koja su sprovedena radi potvrde njene biološke aktivnosti.

Utvrđeno je da etarsko ulje rtanjskog čaja ispoljava antimikrobnu aktivnost prema različitim vrstama patogena, kao što su *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa*. Ovo delovanje je različitog stepena, pa su tako Gram-pozitivne bakterije, kao što je *B. subtilis*, pokazale veću osetljivost. Posebno je značajan bakteriostatski efekat na *P. aeruginosa*, Gram-negativnu bakteriju rezistentnu na veliki broj antimikrobnih lekova (Ćavar, 2008). Antimikrobna aktivnost je evaluirana u još nekoliko studija (Skočibušić i Bežić, 2004; Bežić i sar., 2005; Oussalah i sar., 2007; Ćavar i sar., 2008; Silva i sar., 2009; Serrano i sar., 2011; Mihajilov-Krstev, 2014) i rezultati ovih istraživanja sugerišu potencijal upotrebe etarskog ulja ove biljne vrste kao prirodnog konzervansa hrane i mogućeg izvora antibakterijskih aditiva u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

U jednoj od studija ispitana je mogućnost primene ekstrakata *S. montana* kao neuroprotektivnog agensa. Iako mehanizam nastanka Alchajmerove bolesti nije tačno definisan, terapija se sprovodi inhibitorima enzima acetilholinesteraze i butirilholinesteraze. Utvrđeno je inhibitorno delovanje *S. montana* ekstrakata na pomenute enzime (Silva i sar., 2009).

Kroz *in vivo* studiju je ustanovljena diuretska aktivnost etarskog ulja i ekstrakata *S. montana* (Stanić i Samaržija, 1993). Takođe, istraživana je efekat vodeno-alkoholnih ekstrakata na prevremenu ejakulaciju. Rezultatima studije se sugerše da *S. montana* može biti razmotrena kao prirodni lek za tretman ovog stanja, bez negativnih efekata na druge parametre seksualne funkcije, kao i bez sedativnog efekta. Dodatno, zabeleženo povećanje nivoa testosterona potvrđuje pozitivan uticaj na seksualnu funkciju muškaraca (Zavatti i sar., 2011). Dalje, registrovan je internacionalni patent o upotrebi ekstrakata *S. montana* u tretmanu prevremene ejakulacije (Baraldi, 2006). Osim toga, *S. montana* je pokazala i potentnu anti-HIV-1 aktivnost (Yamasaki i sar., 1998).

Etarsko ulje i ekstrakti su ispoljili antiproliferativno delovanje na humane eritroleukemijske K562 ćelije (Lampronti i sar., 2006), kao i na HeLa (karcinom cerviksa), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke) ćelijske linije (Četojević-Simin i sar., 2004).

Protektivni efekat *S. montana* vodeno-alkoholnog ekstrakta je utvrđen kod testikularnog oštećenja pacova indukovano ciklofosamidom. Kao glavni mehanizmi delovanja ekstrakta *S. montana* navode se antiapoptička i antioksidantna aktivnost (El Tawab i sar., 2014).

Antifungalna aktivnost etarskog ulja *S. montana* je ustanovljena ispitivanjem dejstva na 8 različitih gljiva i dva fitopatogena. Maksimalna antifungalna aktivnost etarskog ulja je ustanovljena sa *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Pyricularia oryzae* (zona inhibicije > 70%) (Haloc i sar., 2014).

Antioksidantna aktivnost ove biljne vrste je evaluirana u velikom broju studija. Autori su ispitivali antioksidantni kapacitet etarskog ulja (Prieto i sar., 2007; Čavar i sar., 2008; Serrano i sar., 2010; Čavar i sar., 2013; Mihajilov-Krstev, 2014), ekstrakata dobijenih konvencionalnim metodama ekstrakcije sa različitim rastvaračima - voda (hladna/vrela), mešavina vode i alkohola, etil-acetat, *n*-butanol, metanol (Četković i sar., 2007; Serrano i sar., 2010; Hassanein i sar., 2014), kao i ekstrakata dobijenih savremenim metodama ekstrahovanja (Grosso i sar., 2009b). Vrednosti antioksidantne aktivnosti u različitim studijama dobijane su primenom različitih metoda, sa

različitom pripremom ekstrakata. Stoga je poređenje izuzetno otežano. Međutim, autori se slažu u zajedničkom zaključku da *S. montana* pokazuje veliki potencijal u ulozi prirodnog antioksidanta. Neophodno je preći na viši nivo istraživanja i potvrde antioksidantne aktivnosti, to jest studije na životinjama, s obzirom da se antioksidantna aktivnost drugačije ispoljava u živim organizmima.

2.1.3. Značajne komponente

Oksidovani monoterpeni - **karvakrol** i **timol**, predstavljaju najdominantnije komponente etarskog ulja *S. montana*. Radi ispitivanja farmakološke potentnosti ova dva izomera, sproveden je veliki broj studija.

Njihov antioksidantni potencijal potvrđen je u *in vitro/in vivo* uslovima i često se pripisuje prisustvu hidroksilne grupe povezane sa aromatičnim prstenom. Karvakrol i timol predstavljaju efikasne skevindžere slobodnih radikala, uključujući peroksil radikal, superoksid radikal, hidrogen peroksid i azotne okside (Aeschbach i sar., 1994; Yanishlieva i sar., 1999; Prieto i sar., 2007; Aristatile i sar., 2010; Guimaraes i sar., 2010; Slamenova i sar., 2011; Suganthi i Manpal, 2013).

Usled sposobnosti inhibicije acetilholinesteraze (AChE), karvakrol se razmatra kao terapijski agens u tretmanu Alchajmerove bolesti. Fenolna hidroksilna grupa karvakrola se veže za AChE, što vodi gubitku funkcije AChE. Interesantno je da je timol, koji je njegov izomer, ispoljio 10 puta slabiju acetilholinesteraznu aktivnost. Takođe, u okviru njegove neuroprotektivnosti, navodi se anksiolitički, kao i antikonvulzivni efekat karvakrola. Sugerise se da zbog male molekulske mase i lipofilne prirode karvakrol može da prođe krvno-moždanu barijeru, što doprinosi efektivnoj neuroprotektivnoj funkciji (Savelev i sar., 2004; Jukić i sar., 2007; Orhan i sar., 2008; Melo i sar., 2011; Kaufmann i sar., 2011; Boskabady i sar., 2011; Suganthi i Manpal, 2013).

Ustanovljeno je hepatoprotektivno delovanje karvakrola u *in vivo* sistemu (Canbek i sar., 2008; Aristatile i sar., 2009; Aristatile i sar., 2011). Osim toga, potvrđen je anti-inflamatorni, analgetski i antiulcerozni efekat karvakrola (Hotta i sar., 2010; Guimarães i sar., 2010; Guimarães i sar., 2012; Silva i sar., 2012), kao i preventivni kod gojaznosti (Cho i sar., 2012).

Karvakrol i timol ispoljavaju širok spektar antimikrobne aktivnosti i aktivni su protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, kako onih prisutnih u hrani, tako i kliničkih izolata.

Potvrđeno je da karvakrol oštećuje ćelije *Bacillus cereus*, dovodeći do smrti bakterije (Ultee i Smid, 2001), dok njegov izomer timol dezintegriše spoljašnju membranu i povećava permeabilnost citoplazmatske membrane za ATP kod bakterija kao što su *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* (Helander i sar., 1998; Zhou i sar., 2007). Osim toga, njihova bakteriostatska i baktericidna aktivnost utvrđena je protiv *Vibrio cholera*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putidam*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis*, *Shigella sp* (Kim i sar., 1995; Ultee i sar., 2000; Lambert i sar., 2001; Friedman i sar., 2002; Bagamboula i sar., 2004; Valero i Giner, 2006; Ravishankar i sar., 2008; Ravishankar i sar., 2010; Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010; Mathela i sar., 2010).

Pretpostavlja se da je prisustvo slobodne hidroksilne grupe i sistema delokalizovanih elektrona ključno za antibakterijsko delovanje. Osnova za ovu tvrdnju je da *p*-cimen, koji je prekursor karvakrola, i razlikuje se od njega samo po odsustvu hidroksilne grupe, i iako poseduje veći particioni koeficijent za lipidne membrane, ispoljava toksičnost u znatno nižem stepenu od karvakrola (Ultee i sar., 2002; Bezić i sar., 2005).

Broj studija u kojim se ispituje antiproliferativna potentnost karvakrola i timola je u konstatnom porastu. U jednoj od studija demonstrirano je da je karvakrol izuzetno potentan inhibitor rasta A549 ćelijske linije (humani karcinom pluća), jer dovodi do smanjenja broja ćelija, degeneracije morfologije i smanjenja količine proteina (Koparal i Zeytinoglu, 2003). Takođe, antitumorski efekat karvakrola je evaluiran i kod tumora pluća indukovanog sa 9,10-dimetil-1,2-benzantracenom (Zeytinoglu i sar., 1998), dok je za timol potvrđeno da je potentan antiproliferativni agens za ćelije moždanog tumora (Aydin i sar., 2016), kao i SAGS humanih gastričnih karcinomskih ćelija (Kang i sar., 2016). Osim toga, u studiji Ozkan i Erdogan (2011) potvrđen je značajan efekat i timola i karvakrola, kao i ulja u čijem su sastavu u odnosu na hidrogen peroksidom-indukovanu citotoksičnost i membransko oštećenje u Hep G2 ćelijama (ćelije tumora jetre).

Značaj i kvalitet etarskog ulja *S. montana* ne ogleđa se samo u sadržaju njegovih najdominantnijih konstituenata - karvakrola i timola. Poznato je da mnogobrojne komponente prisutne u manjim koncentracijama mogu doprinositi ukupnom biološkom efektu kroz

sinergistički efekat. Za neke od njih utvrđeno je da ispoljavaju antioksidantnu aktivnost: ***p*-cimen**, ***γ*-terpinen** i **linalool** (Ruperto i Baratta, 2000; Politeo, 2007). *p*-Cimen je biološki prekursor karvakrola, prirodni alkil-supstuisani aromatični ugljovodonik i poznat je kao najznačajniji hidrofobni antibakterijski konstituent. Osim toga, *p*-cimen izaziva bubrenje citoplazmatske membrane u većoj meri od karvakrola. Stoga, u kombinaciji sa karvakrolom *in vitro*, *p*-cimen se inkorporira u citoplazmatsku membranu i dovodi do intenzivnijeg transporta karvakrola kroz membranu (Ultee i sar., 2002). *γ*-Terpinen se dosta primenjuje u izradi parfema i aroma, i zastupljen je u mnogim aromatičnim i lekovitim biljnim vrstama. Zapravo, prisustvo *γ*-terpinena se smatra izuzetno značajnim za antioksidantno i antibakterijsko dejstvo etarskih ulja koje ga poseduju u svom sastavu. Brzo se oksiduje u alkil benzen *p*-cimen (Nabavi i sar., 2015). Linalool pokazuje slabiju antimikrobnu aktivnost u odnosu na karvakrol, timol i eugenol, ali je takođe dobar antimikrobni agens (Bagamboula i sar., 2004).

Izuzetno značajnim smatra se prisustvo **timokinona** (2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon). Njegovi mnogobrojni farmakološki benefiti su evaluirani u brojnim studijama sprovedenim na molekulskim, ćelijskim i modelima životinja, kao i u nekoliko kliničkih studija. Utvrđen je njegov antiepileptični efekat kod dece sa učestalim napadima (Akhondian i sar., 2011), kao i drugi efekti poput: antioksidantnog, antikancerogenog, antiinflamacijskog, hepatoprotektivnog, imunomodulišućeg, neuroprotektivnog u slučaju Alchajmerove bolesti i dr. (Daba i sar., 1998; Badary i sar., 2003; Gali-Muhtasib i sar., 2006; Banerjee i sar., 2010; Taborsky i sar., 2012; Woo i sar., 2012).

2.2. Savremene metode ekstrakcije

Adekvatnost odabrane ekstrakcione tehnike utiče na izdvajanje i sastav dobijenog ekstrakta, kao i na delovanje samog finalnog proizvoda. Stoga, ekstrakcija predstavlja izuzetno važan korak u postupku dobijanja biljnih preparata. Bioaktivne komponente iz biljnog materijala mogu da se ekstrahuju primenom klasičnih metoda ekstrakcije, kao što su Soxhlet ekstrakcija, maceracija i hidrodestilacija. Glavni nedostaci konvencionalnih ekstrakcionih tehnika su: dugo vreme ekstrakcije, mali prinos, nedovoljna selektivnost, potreba za naknadnim procesuiranjem i prečišćavanjem, degradacija termolabilnih komponenti, upotreba rastvarača koji su štetni za životnu sredinu, kao i mogućnost njihovog zaostajanja u finalnom proizvodu. Navedeni nedostaci su stvorili potrebu za razvojem i implementacijom novih tehnologija, koje se razvijaju u okviru koncepta zelene ekstrakcije.

Zelena ekstrakcija prirodnih proizvoda je zamišljena kao koncept kojim se štite i životna sredina i zdravlje ljudi i, u isto vreme, podstiče kompetitivnost među industrijama za implementacijom ekološki i ekonomski prihvatljivih inovativnih metoda (Chemat i Strube, 2015).

S obzirom da koncept adjuvantne terapije prirodnim proizvodima postaje sve zastupljeniji, verovatno zbog neželjenih posledica primene sintetskih lekova, različiti industrijski sektori, kao što su farmaceutski, kozmetički i prehrambeni, imaju povećane potrebe za proizvodnjom prirodnih proizvoda. Da bi se ispunili ti zahtevi, teži se povećanju efikasnosti ekstrakcije (prinos i selektivnost prema željenim komponentama), redukciji upotrebe i/ili eliminaciji toksičnih rastvarača, i sve to zajedno sa umerenom potrošnjom energije. Stoga su skoriji trendovi u ekstrakcionim tehnikama upravo fokusirani na pronalaženje savremenih metoda ekstrakcije. U tom smislu, ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom i subkritičnom vodom su svrstane u obećavajuće alternativne tehnologije, kojima se obezbeđuje kvalitetan proizvod, uz potpuno uklapanje u koncept čistih i ekološki bezbednih procesa.

2.2.1. Superkrična ekstrakcija

Superkrična ekstrakcija je postupak u kom se kao rastvarač koristi fluid koji se nalazi u superkričnom stanju, to jest, na temperaturi iznad svoje kritične temperature i pritisku iznad svog kritičnog pritiska. Fizičko-hemijske karakteristike superkričnog fluida se nalaze između karakteristika tečnosti i gasova, što ih čini efikasnim rastvaračima (Sahena i sar., 2009). Superkrični fluidi poseduju veliku gustinu koja je bliska gustini tečnosti, što rezultuje velikom sposobnošću rastvaranja. S druge strane, poseduju veliku difuzivnost i mali viskozitet, kao gasovi, što doprinosi lakšoj penetraciji u materijal i rastvaranju (Sahena i sar., 2009; Filip, 2014). Ukoliko se fluid nalazi na temperaturi iznad kritične, ne može da pređe u tečno stanje bez obzira na primenjeni pritisak (Sahena i sar., 2009; Xu i sar., 2011). Takođe, fluid ne može da pređe u superkrično stanje, bez obzira na stalno povećanje pritiska, ukoliko se nalazi na temperaturi nižoj od kritične temperature (Aladić, 2015).

Proces ekstrakcije superkričnim fluidima može se sumirati u pet uzastopnih faza (Jokić, 2011; Aladić, 2015):

1. difuzija superkričnog fluida do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje;
2. prodiranje i difuzija superkričnog fluida kroz spoljašnji sloj sfernog omotača čvrstog inertnog materijala;
3. kontakt superkričnog fluida sa rastvorenom supstancom na površini neizreagovanog jezgra i ekstrakcija rastvorene komponente;
4. difuzija rastvorene komponente u superkričnom fluidu kroz sloj spoljašnjeg sfernog omotača čvrstog inertnog materijala na spoljašnju površinu čestice;
5. difuzija rastvorene komponente u superkričnom fluidu kroz film fluida koji okružuje česticu.

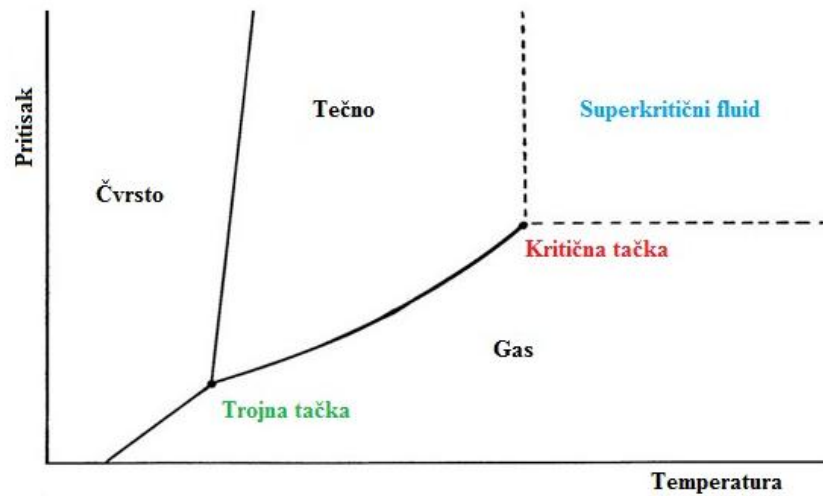
Bilo koji fluid može da se koristi kao superkrični rastvarač, međutim, njegova kritična svojstva, toksičnost, troškovi i sposobnost rastvaranja, određuju adekvatnost njegove primene (Pereira i sar., 2010). U tabeli 3 su prikazana fizičko-hemijska svojstva pojedinih superkričnih fluida. Generalno, superkrični fluidi imaju sposobnost rastvaranja kao organski rastvarači, ali sa boljom difuzijom, nižom viskoznošću i manjim površinskim naponom.

Tabela 3. Kritične tačke pojedinih fluida

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

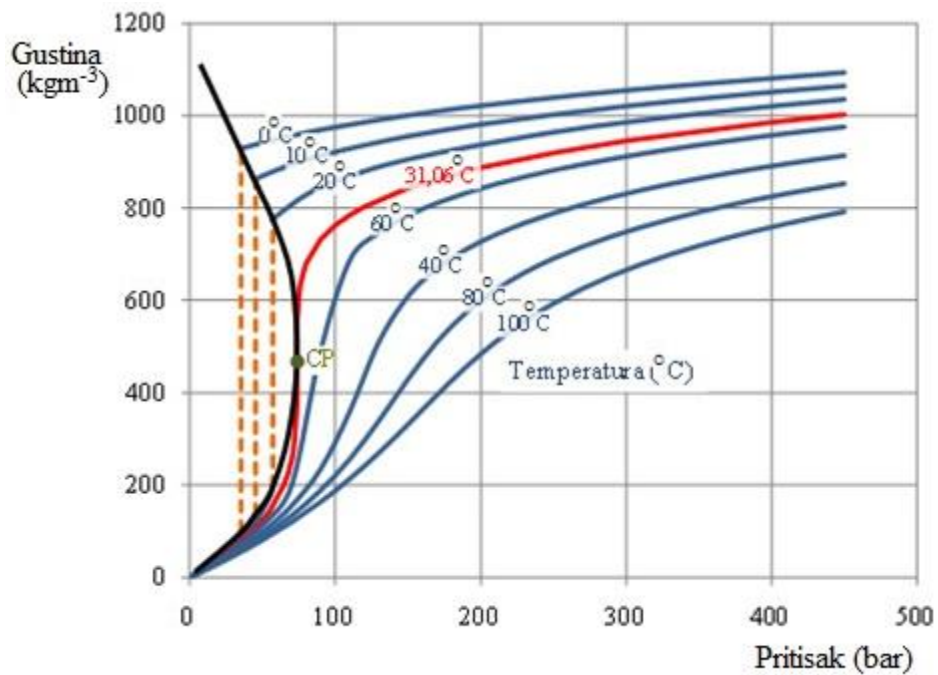
Najčešće korišćeni fluid u superkritičnom stanju je ugljendioksid (CO₂). Superkritični CO₂ se pokazao kao veoma poželjan rastvarač s obzirom da je netoksičan, nezapaljiv, hemijski inertan, bez ukusa i mirisa, jeftin i lako dostupan u većim količinama. Posедуje povoljne osobine postizanja superkritičnog stanja ($T_k = 31,06$ °C, $P_k = 73,8$ bar). Takođe, isparava na niskim temperaturama, stoga se lako izdvaja iz ekstrakata čime se obezbeđuje čist finalni proizvod bez tragova rastvarača. Velika prednost njegove upotrebe je lako podesiva selektivnost rastvaranja variranjem parametara procesa. Osim toga, ekstrakcija superkritičnim CO₂ spada u „čiste tehnologije“, jer nema sekundarnih proizvoda štetnih za okolinu. CO₂ je u potpunosti ekološki prihvatljiv rastvarač (eng. *Generally Recognised as Safe - GRAS*). Dodatno, njegovo bitno svojstvo je da ne ekstrahuje teške metale, ukoliko su prisutni u sirovini (Pasquali i sar., 2008; Herrero i sar., 2010; Xu i sar., 2011; Jokić i sar., 2014).

Sposobnost rastvaranja CO₂ se može opisati pomoću gustine, koja zavisi od procesnih parametara - pritiska i temperature (slika 4). Neposredno iznad kritičnih tačaka za temperaturu i pritisak, relativno male promene njihovih vrednosti mogu dovesti do značajnih promena u gustini ugljendioksida, što dalje rezultuje variranjem rastvorljivosti komponenti u rastvaraču. Stoga, variranjem pritiska i temperature ekstrakcije, menja se sposobnost rastvaranja CO₂ u širokim granicama i omogućava da se iz biljnog materijala dobiju etarska i biljna ulja, začini i aromatične komponente, kao i komponente sa farmakološki značajnim aktivnostima (Jokić, 2011; Aladić, 2015).



Slika 4. Fazni dijagram (pritisak-temperatura) za ugljendioksid

Kao generalno pravilo superkritične ekstrakcije može se usvojiti da moć rastvaranja superkritičnog fluida raste sa gustinom na datoj temperaturi, kao i sa temperaturom pri datoj gustini (Filip, 2014). Na slici 5 je dat grafički prikaz gustine CO₂ u funkciji pritiska i temperature (Aladić, 2015).



Slika 5. Gustina CO₂ u funkciji pritiska i temperature

CO₂ je pogodan rastvarač za ekstrakciju nepolarnih sastojaka. Kao takav, poseduje mali afinitet prema polarnim komponentama, što je upravo jedan od najvećih nedostataka ekstrakcije superkritičnim CO₂. Ovaj problem može biti prevaziđen modifikacijom polarnosti superkritičnog CO₂ dodatkom polarnih modifikatora (korastvarača, npr. etanola, metanola, vode), čime se povećava afinitet rastvarača i prema polarnijim komponentama (Herrero i sar., 2010).

Prednosti upotrebe superkritičnih fluida za ekstrakciju bioaktivnih komponenti mogu se sumirati u narednim tačkama:

- superkritični fluid ima veći koeficijent difuzije i manji viskozitet i površinski napon od tečnog rastvarača, što olakšava penetraciju u matriks uzorka i poboljšava transfer mase. vreme ekstrakcije se posledično redukuje u odnosu na konvencionalne tehnike;
- selektivnost superkritičnog fluida je veća od tečnih rastvarača i njegova solvaciona sposobnost se može podešavati menjanjem pritiska i/ili temperature;
- separacija proizvoda od rastvarača izvodi se sniženjem pritiska, što štedi vreme u odnosu na konvencionalne tehnike;
- superkritična ekstrakcija se izvodi na relativno niskim temperaturama, stoga je adekvatna i za ekstrakciju termolabilnih komponenti;
- moguća je i ekstrakcija komponenti koje poseduju visoke temperature ključanja, na relativno niskim temperaturama;
- koristi se mala količina rastvarača koji je prihvatljiv za okolinu;
- postoji mogućnost recirkulacije rastvarača i minimalnog generisanja otpada;
- kapacitet procesa je podesiv i može biti od nekoliko miligrama (za laboratorijske uslove), do nekoliko tona po uzorku (za potrebe industrijske proizvodnje) (Lang i Wai, 2001; Azmir i sar., 2013; Aladić, 2015).

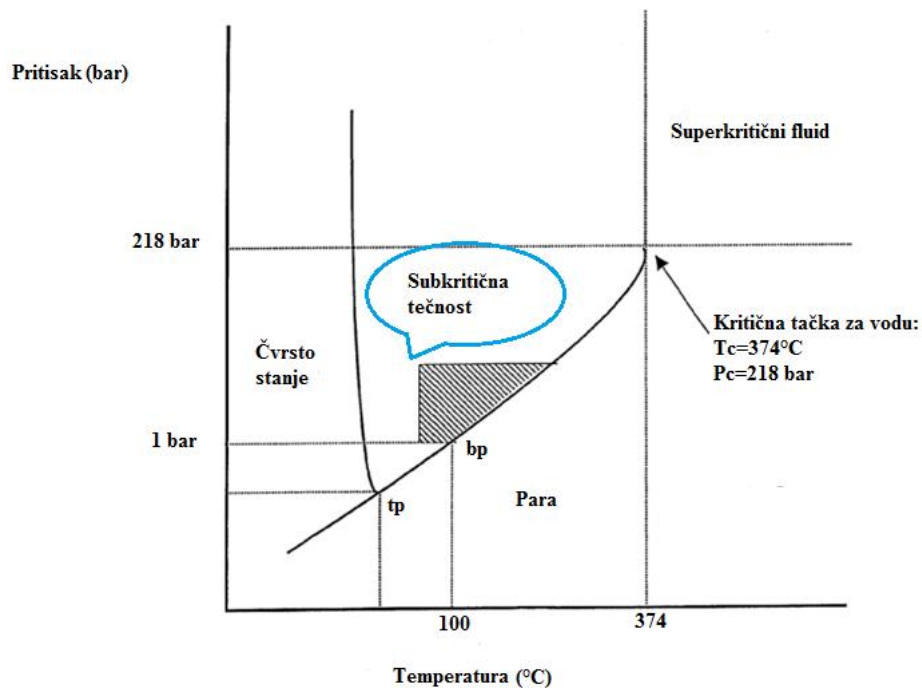
Uspešnost ekstrakcije bioaktivnih komponenti zavisi od parametara procesa koji su u potpunosti podesivi. Glavni parametri koji utiču na ekstrakciju su: temperatura, pritisak, protok CO₂, vreme ekstrakcije, veličina čestica, sadržaj vlage u materijalu, kao i njihova međusobna interakcija. Radi iskorišćenja prednosti ove ekstrakcione metode neophodno je sprovesti procese optimizacije (Reverchon i Marco, 2006; Azmir i sar., 2013).

Ekstrakcija superkritičnim fluidima je prepoznata kao odlična alternativa klasičnim postupcima ekstrakcije i danas postaje sve više aktuelna u oblastima dobijanja proizvoda u prehrambenoj,

farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Razlog sporije implementacije ove tehnologije u industrijske proizvodne procese je sofisticiranost i visoki investicioni troškovi opreme, kao i neophodnost kompleksnijeg inženjerskog pristupa, s obzirom da se tokom procesa koriste relativno visoki pritisci (Tonhubthimthong i sar., 2001; Gupta i sar., 2012).

2.2.2. Ekstrakcija subkritičnom vodom

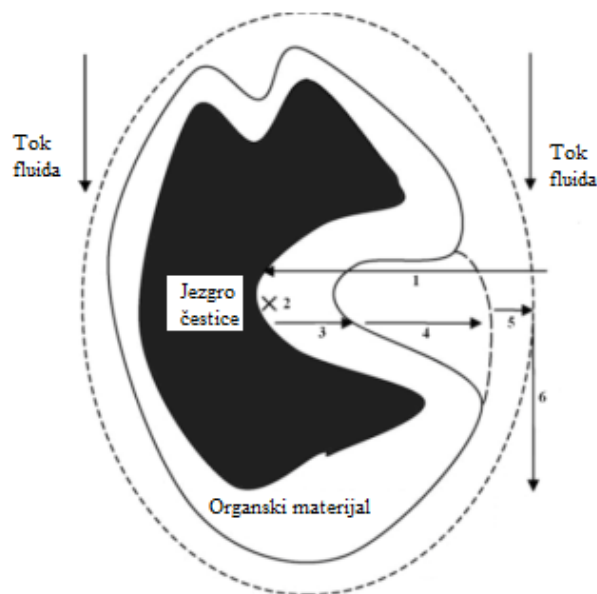
Voda je izrazito polaran rastvarač sa visokom vrednošću dielektrične konstante na sobnoj temperaturi i pri atmosferskom pritisku. Ovo svojstvo je čini neadekvatnim ekstragensom nepolarnih organskih komponenti. Međutim, sa povećanjem temperature, dolazi do modifikacije njenih svojstava, to jest smanjenja permitivnosti, viskoziteta i površinskog napona, kao i povećanja difuzionog karaktera vode. Povećanjem temperature sa 25 na 250°C, dielektrična konstanta se smanjuje sa 80 na 27, što je veoma blisko metanolu ($\epsilon=33$) i etanolu ($\epsilon=24$). Pod ovim uslovima, voda ima sposobnost rastvaranja širokog opsega umereno i niskopolarnih analita (Teo i sar., 2010). Polarnije komponente sa većom rastvorljivošću u vodi na sobnoj temperaturi, ekstrahuju se efikasnije na nižim temperaturama, dok umereno polarnim i nepolarnim komponentama odgovara manja polarnost rastvarača, koja se ostvaruje povećanjem temperature. Navedene promene u svojstvima vode usled povećanja temperature iskorišćene su kao osnovni princip ekstrakcije subkritičnom vodom. Ova nova tehnika ekstrakcije se sprovodi na temperaturi između 100 (tačka ključanja) i 374°C (kritična tačka) i pritiscima dovoljno visokim da se održi tečno stanje vode (slika 6) (Smith, 2006; Haghghi Asl i Khajenoori, 2013).



Slika 6. Fazni dijagram vode u funkciji temperature i pritiska

Mehanizam ekstrakcije subkritičnom vodom sastoji se iz faza desorpcije, difuzije i rastvaranja (Wiboonsirikul i Adachi, 2008). Detaljnije se može podeliti u šest faza, koje su prikazane i na slici 7 (Haghighi Asl i Khajenoori, 2013):

1. brz ulaz fluida
2. desorpcija rastvorka iz matriksa
3. difuzija rastvorka kroz organski materijal
4. difuzija rastvorka kroz statički fluid u poroznom materijalu
5. difuzija rastvorka kroz film fluida van čestica
6. elucija rastvorka.



Slika 7. Šematski prikaz ekstrakcionog mehanizma

Efekat prve faze je uglavnom zanemarljiv. Iako za većinu biljnih materijala ograničavajući korak obično predstavlja difuzija rastvorene komponente kroz čvrsti materijal, raspodjela rastvorka između čvrstog materijala i rastvarača se navodi kao limitirajući faktor ekstrakcije subkritičnom vodom (Haghighi Asl i Khajenoori, 2013).

Sa modifikacijom svojstava vode na povišenoj temperaturi, kapacitet fluida za rastvaranje analita se povećava. Redukovana viskoznost, ali i poboljšana difuzivnost vode, omogućavaju bolju penetraciju kroz matriks. Povećanjem temperature može se uticati na slabljenje veza između analita i matriksa. Stoga, termalna energija može da nadjača kohezijone (rastvorak-rastvorak) i

adhezione (rastvorak-matriks) interakcije smanjenjem aktivacione energije koja je neophodna za proces desorpcije. Transfer analita od matriksa ka subkritičnoj vodi se postiže difuzijom i konvekcijom. Prisustvo pritiska može ubrzati ekstrakciju ukoliko je analit zarobljen unutar pora matriksa i takođe doprinosi ulasku vode u zone matriksa koje inače nisu prekrivene vodom, na atmosferskom pritisku (Teo i sar., 2010).

Parametri ekstrakcije i njihov uticaj

Glavni parametri koji utiču na selektivnost i efikasnost ekstrakcije su temperatura, pritisak i dodatak modifikatora (Teo i sar., 2010). Sprovedena su brojna istraživanja sa ciljem evaluacije efikasnosti ekstrakcije subkritičnom vodom, obično poređenjem sa tradicionalnim metodama (Soxhlet, destilacija vodenom parom). Na osnovu rezultata tih studija pokazano je da je nova metoda ekstrakcije brža, jeftinija i efikasnija u pogledu prinosa procesa (Haghighi Asl i Khajenoori, 2013).

Uticaj temperature

Temperatura je najdominantniji faktor u procesu ekstrakcije subkritičnom vodom. Utiče na njene fizičko-hemijske osobine, menjajući joj difuzivnost, viskozitet i površinski napon. Korišćenjem visokih temperatura poboljšava se efikasnost ekstrakcije na više načina. Osim već pomenutog potpomognutog prekidanja veze između analita i matriksa, olakšava se kvašenje materijala snižavanjem površinskog napona rastvarača, rastvorka i matriksa. Potom, povećanjem temperature smanjuje se viskoznost rastvarača, što omogućava lakšu penetraciju u materijal rezultujući povećanom efikasnošću procesa. Dodatno, smanjenjem difuzionih svojstava vode poboljšava se transfer mase, što dalje doprinosi bržoj ekstrakciji (Mustafa i Turner, 2011).

Međutim, sa povećanjem temperature moguća je degradacija komponenti i intenziviranje procesa kao što su oksidacija i hidroliza. Stoga, neophodno je eksperimentalno utvrditi optimalnu temperaturu ekstrakcije za različite biljne materijale (Teo i sar., 2010).

Uticaj pritiska

U toku ekstrakcije pritisak se obično varira u opsegu od 10 do 80 bar da bi održao vodu u njenoj tečnoj fazi, na temperaturi ekstrakcije. Upotreba povećanog pritiska na visokim temperaturama i smanjen površinski napon rastvarača pomažu rastvaraču, koji je unutar pora matriksa, da dođe u kontakt sa analitom i ekstrahuje ga. Korišćenjem pritiska tokom ekstrakcije može se povećati

pritisak na matriks što rezultuje razaranjem i, posledično, povećanom transferu analita od uzorka do rastvarača. Takođe, visok pritisak tokom ekstrakcije kontroliše probleme vezane za mehuriće vazduha koji se mogu naći unutar matriksa i koji sprečavaju kontakt rastvarača i analita. Ipak, uticaj pritiska tokom ekstrakcije subkritičnom vodom veoma često nije značajan, usled dominantnog efekta temperature (Luthria, 2008; Teo i sar., 2010; Mustafa i Turner, 2011; Aliakbarian i sar., 2012).

Dodatak aditiva

Dodatak nekih organskih i neorganskih modifikatora i aditiva može poboljšati rastvorljivost analita i povećati interakciju sa vodom. Takođe, može uticati na fizičko-hemijske karakteristike vode na visokoj temperaturi (Teo i sar., 2010). Aditivi koji mogu biti od značaja su protektivni antioksidanti kao što su askorbinska kiselina i BHT (butil-hidroksi toluol), posebno prilikom ekstrakcije analita sklonih oksidaciji. CO₂ se nekada dodaje u cilju smanjenja pH vrednosti vode (Teo i sar., 2010; Mustafa i Turner, 2011).

Ekstrakcija subkritičnom vodom je izuzetno pogodna tehnika ekstrakcije, pre svega zbog jednostavne manipulacije njenom dielektričnom konstantom i, samim tim, selektivnošću za željenim komponentama (Pourali i sar., 2010). Ova osobina je čini adekvatnom za uspešnu ekstrakciju različitih vrsta jedinjenja: etarskih ulja (Gamiz-Gracia i Castro, 2000; Ayala i De Castro, 2001; Ozel i sar., 2003; Eikani, 2007), lipida (Kaufmann i sar, 2001; Hata i sar., 2008; Santos Freitas i sar., 2008), karotenoida (Deneryi sar., 2004; Loranty i sar., 2010), lignana (Ho i sar., 2007; Ho i sar., 2008), fenolnih komponenti (Chen i sar., 2007; Hartonen i sar., 2007, Pourali i sar., 2010; Zeković i sar., 2014). Dodatno, redukovano vreme ekstrakcije i potrošnje rastvarača, uz povećanu efikasnost procesa, nadoknađuju jedinu manu - inicijalno veliko ulaganje u opremu.

Uz ekonomsku isplativost, obezbeđivanje kvalitetnog prirodnog proizvoda željenih karakteristika i ispunjavanje zahteva savremene čiste tehnologije, može se konstatovati da ekstrakcija subkritičnom vodom ispunjava sve zahteve za širu implemetaciju u proizvodne industrijske procese.

2.3. *Spray drying* tehnologija sušenja

Spray drying (sušenje raspršivanjem) predstavlja jednostepeni proces ukljanjanja tečnosti (rastvarača), u kojem se tokom procesa tečna napojna smeša raspršuje u struji gasovitog medijuma za sušenje i skoro trenutno dobija suvi prah. Ova tehnologija je adekvatna za procesuiranje različitih vrsta materijala: rastvora, emulzija, suspenzija i pasta. U zavisnosti od napojne smeše, finalne čestice mogu biti nano veličina (210-280 nm), mikronskih veličina (10-50 μm), ili u formi aglomerata (do 3 mm) (Gharsallaoui i sar., 2007; Jafari i sar., 2008; Haque i sar., 2015).

Zbog mogućnosti dobijanja finalnog proizvoda standardizovanog kvaliteta i osobina, u pogledu sadržaja aktivnih materija, sadržaja vlage, nasipne zapremine, veličine čestice i drugih fizičko-hemijskih svojstava praha, *spray drying* predstavlja tehnologiju koja je zastupljena u nekoliko industrijskih sektora uključujući prehrambeni, farmaceutski, biotehnoški i hemijski. Koristi se za proizvodnju prahova od materijala različitih funkcionalnih svojstava: mleko, kafa, voćni sokovi i pulpa, biljni ekstrakti, enzimi, etarska ulja, aromatične komponente i različiti farmaceutski proizvodi (Filkova i sar., 2006; Angel i sar., 2009; Jayasundera i sar., 2010; Haque i sar., 2015).

Ekonomske prednosti čvrstih formi ekstrakata nad tečnim su brojne: redukovanje zapremine i mase ekstrakata, olakšano rukovanje/manipulacija, transport i skladištenje, značajno duži rok upotrebe, kao i mogućnost brzog rekonstituisanja ove forme u tečnu dodatkom tečnosti. Takođe, ova tehnologija je adekvatna za sušenje proizvoda koji su termorezistentni i/ili termosenzitivni. Kvalitet finalnog proizvoda zavisi od prirode materijala, parametara procesa sušenja i njihove interakcije (Singh i Dixit, 2014; Haque i sar., 2015).

Prednosti i mane ove tehnologije su (Haque i sar., 2015):

1. sušenje je gotovo trenutno i tom prilikom se proizvode manje-više uniformne i sferične čestice od nano do mikronskih veličina, sa mogućom kontrolom veličine i morfologije čestica;
2. kapacitet proizvodnje može da varira od nekoliko grama do preko 100 tona po satu;

3. proces je veoma brz i veći deo evaporacije se dešava u manje od nekoliko sekundi. Stoga, termalna degradacija, denaturacija i gubitak nutritijenata su minimalni. Ovo čini sušenje termički osetljivih materijala mogućim, sa maksimalnom retencijom aktivnih supstanci;
4. proces je kontinuiran i moguća je kompletna automatska kontrola procesa;
5. različiti dizajni *spray dryer*-a su dostupni i zadovoljavaju različite specifikacije proizvoda;
6. kontrola osobina dobijenog praha je ostvariva skoro u potpunosti;
7. proces je umereno ekonomičan. U odnosu na proces liofilizacije, *spray drying* proces je 4 do 7 puta ekonomičniji (Chavez i Ledebor, 2007).

Uprkos brojnim prednostima, ova tehnologija poseduje i neke mane:

1. industrijski *spray dryer*-i, posebno oni sa velikim kapacitetom, postali su sofisticirani u pogledu strukture i kontrolnog mehanizma. samim tim, ovo zahteva i veliko inicijalno kapitalno ulaganje;
2. termalna efikasnost procesa je relativno mala, osim ako je razlika između ulazne i izlazne temperature velika (Masters, 1997; Bankar i sar., 2014);
3. u nekim slučajevima, sakupljanje praha je otežano i dolazi do smanjenog prinosa zbog eliminacije finih čestica sa iskorišćenim (izlaznim) vazduhom i/ili značajnog zaostajanja proizvoda na zidovima komore;
4. *spray drying* zahteva specijalno obučeno osoblje za uspešno upravljenje procesom i održavanje.

2.3.1. Princip *spray drying* procesa

Tokom *spray drying*-a, dispergovane kapi tečne napojne smeše se izlažu struji vrelog vazduha radi postizanja brze evaporacije rastvarača i formiranja suvih čestica koje potom bivaju sakupljene.

Izbor dizajna i metode raspršivanja je izuzetno bitan kako bi se smanjila termalna i dehidrataciona degradacija proizvoda. Uvek je poželjno da izlazna temperatura bude što niža i da se sušenje postiže u što kraćem vremenskom intervalu (Masters, 1997). Hlađenje evaporacijom,

uzrokovano transferom vlage iz kapi u medijum za sušenje, održava kapi/čestice daleko ispod ulazne temperature i čak ispod izlazne temperature tokom većeg dela boravka u komori. Stoga, termalna degradacija, čak i veoma osetljivih materijala, može se redukovati ovim procesom (Broadhead i sar., 1992; Haque i sar., 2015).

Spray drying je konvektivni proces sušenja i sastoji se iz 4 fundamentalne faze: (1) Atomizacija tečne napojne smeše u kapi; (2) kontakt kapi i medijuma za sušenje, (3) evaporacija rastvarača iz kapi i (4) separacija i sakupljanje praha.

Atomizacija

Prvi korak u *spray drying* procesu je atomizacija ili raspršivanje. Efikasan proces atomizacije se može definisati kao konvertovanje tečne napojne smeše u fine kapljice jednakih veličina, što vodi uniformnom transferu toplote i mase tokom procesa sušenja. Zahvaljujući posledičnoj redukciji veličine čestica i disperziji u struji vazduha, površina čestica eksponencijalno raste, i postiže se cilj ove faze: kreiranje maksimalne površine za transfer toplote između vrelog vazduha i napojne smeše, radi optimizacije masenog i toplotnog transfera. Na ovaj način se postiže sušenje napojne smeše za veoma kratko vreme. Vlaga se uklanja bez narušavanja integriteta materijala koji se suši (Gharsallaoui i sar., 2007; Murugesan i Orsat, 2012).

Atomizacija se postiže atomizerima koji se mogu klasifikovati na osnovu vrste energije koja deluje na napojnu smešu prilikom atomizacije. Komercijalno najzastupljeniji su rotacioni (centrifugalni) i mlazni raspršivači, sa jednim i dva fluida, kao i ultrazvučni (Filkova i sar., 2007; Murugesan i Orsat, 2012; Haque i sar., 2015). Izbor atomizera se vrši na osnovu svojstava napojne smeše (npr. koncentracija i viskoznost), kao i željenih karakteristika finalnih proizvoda (Masters, 1997).

Atomizacija predstavlja ključni korak za postizanje boljih ekonomskih operativnih troškova i visokog kvaliteta proizvoda. Veličina kapljica, kao i veličina nastalih čestica, zavise od vrste atomizera koji se koristi i procesnih parametara, kao što su: rotaciona brzina, pritisak i protok napojne smeše (Masters, 1997; Cheuyglintase, 2009; Haque i sar., 2015). Što se veća energija upotrebi za atomizaciju, dobijaju se manje čestice (Gharsallaoui i sar., 2007).

Uslovi koje bi atomizer trebalo da ispuni (Patel i sar., 2009):

- neophodno je da raspršuje napojnu smešu u sitne kapi koje će se distribuirati u komori i mešati sa vrelim gasom;
- kapi ne bi trebalo da budu velike, jer će se nekompletno sušiti, niti premale, jer će otežati separaciju i skupljanje praha, a takođe mogu biti i spaljene.

U najvećem broju slučajeva kao medijum za sušenje koristi se atmosferski vazduh. Tokom procesa, atmosferski vazduh se uvodi kroz filtracioni sistem i temperatura mu se reguliše prema unapred definisanim procesnim parametrima. Ukoliko je materijal koji se suši osetljiv na kiseonik ili je nestabilan, može se koristiti azot ili neki drugi inertni gasovi (Cal i Sollohub, 2010). Ulazna temperatura vazduha je izuzetno važan faktor u uklanjanju vlage iz disperzije. Performanse i efikasnost procesa sušenja zavise od vlažnosti i temperature vazduha, koji se mogu kontrolisati i podešavati tokom procesa (Baker, 1997; Murugesan i Orsat, 2012).

Kontakt između kapi i medijuma za sušenje

Drugi korak *spray drying* procesa je mešanje raspršenih kapi sa strujom vrelog vazduha što olakšava evaporaciju rastvarača i vodi produkciji suvog praha. Kontakt između raspršenih kapljica i vrelog gasovitog medijuma može se ostvariti na više načina, pa u zavisnosti od toga postoji istostrujni, suprotnostrujni i mešoviti tok (Haque i sar., 2015).

U istostrujnim dizajnima, smer kretanja napojne smeše i vazduha je isti. Ova vrsta sušenja je prioritarna za sušenje termosenzitivnih materijala, jer vlažni materijal dolazi u kontakt sa najsvuļljim medijumom za sušenje (onim koji sadrži najmanje vlage), dok osušeni prah dolazi u kontakt sa medijumom za sušenje koji se postepeno hladi. U ovoj metodi sušenja visok stepen evaporacije vlage omogućava da temperatura praha bude značajno niža nego temperatura vazduha koji napušta komoru. Tečne kapi dolaze u kontakt sa vazduhom (ulazne) temperature 150 - 220 °C, što izaziva skoro trenutnu evaporaciju rastvarača, tako da temperatura vazduha pada na umerenu (obično 50 - 80 °C) sprečavajući degradaciju uzrokovanu temperaturom (Gharsallaoui i sar., 2007).

U suprotnostrujnim dizajnima, raspršene kapi i medijum za sušenje se kreću u suprotnim pravcima. U ovom procesu, najvreliji vazduh dolazi u kontakt sa česticama praha, što može

uzrokovati nepovratno toplotno oštećenje proizvoda (Masters, 1997). Međutim, ovi dizajni su superiorni u pogledu toplotne i energetske ekonomičnosti.

Mešoviti tok, kao kombinacija isto- i suprotnostrujnih metoda razvijena je radi iskorišćenja benefita oba procesa, to jest da bi se obezbedio odgovarajući kvalitet uz ekonomične troškove (Haque i sar., 2015).

Evaporacija rastvarača iz kapi

Kada kapi napojne smeše dođu u kontakt sa vrelim vazduhom dešava se evaporacija rastvarača i nastaju suve čestice praha. Tokom evaporacije gradijent temperature i pritiska pare između kapi i gasovitog medijuma uspostavlja se na takav način da se prenos toplote odvija od medijuma za sušenje ka kapima, dok se transfer mase odvija iz kapi ka medijumu za sušenje. Kada medijum za sušenje i kapi dođu u međusobni kontakt, toplotni transfer uzrokuje povećanje temperature kapi dok se ne postigne konstantna vrednost, gde veći deo rastvarača isparava iz kapi. U ovom stanju brzina difuzije rastvarača iz unutrašnjosti ka površini kapi postaje gotovo konstantna i jednaka površinskoj brzini isparavanja. Konačno, kada čvrsti sadržaj u kapima/česticama poraste do određene vrednosti (što odgovara kritičnom sadržaju vlage), efektivna difuzija vlage se značajno smanjuje. Brzina sušenja rapidno se smanjuje kako se granica sušenja postepeno pomera ka unutrašnjosti čestica. Efektivna difuzija vlage i brzina sušenja postaju funkcija prirode i koncentracije čvrstog dela. Kada čvrste čestice napuste komoru za sušenje, njihova temperatura je slična izlaznoj temperaturi vazduha. U praksi čim vrelo vazduh dođe u kontakt sa kapima napojne smeše, sušenje se odvija gotovo trenutno i dolazi do rapidne evaporacije sa površine svake kapi (Haque i sar., 2015). Ovo brzo isparavanje održava kapi hladnim dok se ne postigne suvo stanje. Obično je vreme sušenja reda veličine 5-100 s (Corrigan, 1995). Međutim, u dobro dizajniranim sistemima 15-30 s je uobičajeno vreme za prolazak čestice kroz zonu sušenja (Fogler i Kleinschmidt, 1938; Gharsallaoiu i sar., 2007).

Priroda proizvoda i ulazna/izlazna temperatura vazduha igraju značajnu ulogu u procesu sušenja. Ako se koristi veća temperatura, isparavanje rastvarača i formiranje čestica se dešava brže. Ukoliko je razlika između ulazne i izlazne temperature veća, gradijenti temperature i pritiska pare će biti veći, što vodi bržoj evaporaciji i formiranju čestica. Što je manja veličina čestica, to je veći odnos površine prema zapremini i brži proces sušenja. Za idealan proces sušenja finalni proizvod

bi trebalo da bude dovoljno suv pre kontakta sa zidom komore, tako da bi sav prah mogao biti sakupljen (Haque i sar., 2015).

Separacija i sakupljanje praha

Finalni korak u *spray drying* procesu je sakupljanje praha. Ovo uključuje separaciju suvih čestica od medijuma za sušenje, što se najčešće postiže korišćenjem ciklona i vrećastog filtera koji je pozicioniran van komore za sušenje. Separacija čestica od medijuma za sušenje zavisi od gustine, veličine čestica i njihove brzine taloženja unutar ciklona (Haque i sar., 2015).

Primena ciklona je metoda inertne separacije i predstavlja najzastupljeniji industrijski pristup za segregaciju na osnovu razlike u gustini između faza. Ovaj koncept koristi prednost manje brzine čestica veće gustine u odnosu na vazduh kao medijum manje gustine, kada su obe faze izložene vrtložnom rotacionom kretanju. Efikasnost separacije zavisi od dizajna samog ciklona, operativnih uslova, kao i raspodele veličina čestica ulaznog materijala. Prednosti upotrebe ciklona su mehanička jednostavnost (ne poseduje pokretne delove), visok stepen efikasnosti u sakupljanju praha i mogućnost jednostavnog čišćenja i pranja uređaja (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

2.3.2. Izazovi u sušenju

Uprkos ogromnom napretku koji je ostvaren kroz implementaciju *spray drying* tehnologije u uobičajenu industrijsku proizvodnu praksu, veoma često se javljaju problemi kao što su: nemogućnost sušenja, nedovoljna efikasnost i neadekvatan kvalitet proizvoda (visok sadržaj vlage, niska koncentracija marker komponenti, itd.). Kao najčešći razlog limitirane upotrebe *spray drying*-a navodi se lepljivost koja se može javiti tokom sušenja, ali i skladištenja suvih prahova.

Lepljivost se može definisati kroz dve vrste pojava - kohezija i adhezija. Kohezija je pojava lepljivosti između čestica, dok je adhezija pojava lepljivosti između čestica i zida komore za sušenje ili ciklona. Kohezija je unutrašnje svojstvo praha i mera je sile koja drži čestice zajedno. Nakon dolaska u međusobni kontakt, čestice se slepljuju zajedno, osim ako veza između njih nije prekinuta korišćenjem sile, koja bi trebalo da bude jača od kohezivne sile. Kohezija je uzrok

pojave „pogača” (*caking*, to jest sjedinjavanje čestica), obično nakon izlaganja visokoj temperaturi i vlažnosti (Mani i sar., 2002).

Materijali koji se suše mogu da se podele na lepljive i nelepljive. Ova podela je u potpunosti relativna, s obzirom da se isti materijal može ponašati različito u zavisnosti od procesnih parametara. Nelepljivi materijali se mogu sušiti dosta jednostavnijim postupkom u odnosu na lepljive, i tom prilikom se dobijaju prahovi relativno male higroskopnosti i veće protočnosti. Kod lepljivih materijala, tokom sušenja može doći do lepljenja na zidove komora ili dobijanja forme sirupa, što u oba slučaja doprinosi znatno nižem prinosu i manjoj efikasnosti sušenja, kao i operativnim problemima. Neki od materijala su osetljivi na uslove sušenja u tolikoj meri da samo nekoliko stepeni variranja temperature tokom procesa može dovesti do pojave lepljivosti praha (Bhandari i sar., 1993; Mani i sar., 2002).

Problem lepljivosti praha je uglavnom uzrokovan prisustvom komponenti male molekulske mase, kao što su šećeri (glukoza, fruktoza, saharoza) i organske kiseline, koje poseduju nisku temperaturu ostakljavanja (eng. *Glass Transition Temperature*, Tg). Tg se može definisati kao temperatura na kojoj dolazi do promene amornog sistema iz staklastog ka gumenastom stanju i može se meriti pomoću diferencijalnog kalorimetra (eng. *Differential Scanning Calorimeter*, DSC) (Mani i sar., 2002). Ovaj parametar se može koristiti kao referentni parametar prilikom planiranja *spray drying*-a i karakterizacije svojstava, kvaliteta, stabilnosti i bezbednosti proizvoda. Strukturne promene, kao što su lepljivost, kristalizacija, aglomerizacija i *caking*, nastaju u amorfnim praškovima kada se procesuiraju i skladište na temperaturama iznad Tg (Oliveira i sar., 2010.).

Kada temperatura čestica postane viša od temperature lepljivosti, amorfni materijal se menja iz staklastog stanja u gumenasto stanje (nalik tečnom) i postaje lepljiv. Ovo gumenasto stanje uzrokuje adheziju materijala za površine uređaja. Autori su utvrdili da je temperatura lepljivosti 20 °C viša od Tg i površina čestica postaje lepljiva ukoliko je temperatura površine čestica viša od temperature lepljivosti (Roos i Karel., 1991b; Bhandari i sar., 1997b; Truong i sar., 2005a; Wang i Langrish, 2009).

Niskomolekularne komponente u svojoj čistoj formi poseduju nisku Tg, dok dugolančani molekuli imaju više Tg. Radi lakšeg razumevanja ponašanja niskomolekularnih šećera, u tabeli 4 su dati podaci o molekulskoj masi, Tg i lepljivim osobinama najčešćih šećera (Bhandari et al.,

1997a; Mani i sar., 2002). Osim toga, tačka lepljivosti u proizvodima bogatim šećerima i organskim kiselinama, dodatno se snižava sa povećanjem sadržaja vode, istovremeno sa Tg (Roos i Karel, 1991a, 1991b). Voda prisutna u materijalu je glavna komponenta odgovorna za depresiju Tg, s obzirom da ima veoma nisku vrednost Tg (-135 °C) (Johari i sar., 1987; Mani i sar., 2002).

Probleme lepljivosti i zaostajanja na zidovima moguće je eliminisati/smanjiti, uz istovremeno povećanje stabilnosti proizvoda, ukoliko se napojnoj smeši dodaju komponente koje poseduju visoku Tg (Mani i sar., 2002). Na taj način se postiže viša Tg cele smeše, pa samim tim i temperature lepljivosti. Stoga, manje je verovatno da će temperatura čestica postati viša od temperature lepljivosti, što redukuje lepljivost samog proizvoda (Wang i Langrish, 2009). Napravljena je korelacija između Tg i kritične viskoznosti, i utvrđeno da se kritična viskoznost dostiže na temperaturi 10 - 20 °C iznad Tg. To dalje vodi zaključku da temperatura površine čestica tokom sušenja ne bi trebalo da bude veća od 10 - 20 °C iznad Tg (Roos i Karel, 1991b; Bhandari i sar., 1997a; Mani i sar., 2002).

Tabela 4. Tg, fizičke karakteristike i lepljive osobine niskomolekularnih šećera

Materijal	Molekulska masa (g/mol)	Tg (°C)	Relativna higroskopnost	Relativna lepljivost
Fruktoza	180	5	veoma visoka	veoma visoka
Glukoza	180	31	visoka	visoka
Saharoza	342	62	umerena	umerena
Laktoza	342	101	niska	niska

2.3.3. Nosači u sušenju

Dodatak nosača (aditiva) prilikom sušenja je izuzetno bitan zbog uticaja na svojstva prahova i stabilnost krajnjeg proizvoda. Kao nosači najčešće se koriste ugljeni hidrati velike molekulske mase, kao što su skrob, modifikovani skrobovi, maltodekstrini, arapska guma i ciklodekstrini. Njihova osnovna funkcija je povećanje Tg napojne smeše, što posledično smanjuje lepljivost, zaostajanje na zidovima i tendenciju ka aglomeraciji tokom sušenja i skladištenja, i sve zajedno vodi stabilnijem proizvodu (Roos i Karel, 1991; Bhandari i sar., 1993; Truong i sar., 2005b; Oliveira i sar., 2010).

Tabela 5. Molekulske mase i Tg aditiva u sušenju

Aditivi		Molekulska masa (g/mol)	Tg (°C)
Maltodekstrin	DE 36	500	100
	DE 25	720	121
	DE 20	900	141
	DE 10	1800	160
	DE 5	3600	188
Skrob			243

Osim povećanja Tg, ovi agensi se veoma često koriste i za zaštitu proizvoda od nepoželjnih ambijentalnih uslova, kao što su kiseonik, vlaga i visoka temperatura. Takođe, upotrebljavaju se za maskiranje ukusa i mirisa, redukciju isparljivosti i reaktivnosti pojedinačnih komponenti, poboljšanje fizičkih karakteristika, a njihovim dodatkom je moguće uticati na atraktivnost proizvoda i vizuelnu dopadljivost, što je od ogromnog značaja prilikom plasmana proizvoda. Agensi se mogu koristiti pojedinačno ili u kombinaciji. Poželjno je da su stabilni, jeftini, dostupni, a u cilju smanjenja troškova procesa poželjno je dodavanje najmanje moguće količine kojom se obezbeđuje kvalitetan proizvod željenih karakteristika (Re, 1998; Tonon i sar., 2011; Sansone, 2011; Singh i Dixit, 2014). U nastavku su dati opisi najčešće upotrebljivanih nosača za sušenje, dok su u tabeli 5 date molekulske mase i Tg pojedinih aditiva (Bhandari i sar., 1997, Bhandari i Howes, 1999, Mani i sar., 2002).

Skrobovi i modifikovani skrobovi

Skrob je jedan od zastupljenijih prirodnih polimera, jeftin je i može se ekstrahovati iz više izvora, kao što su kukuruz, krompir, pirinač, pšenica. Nerastvoran je u hladnoj vodi, ali se rastvara u zagrejanju, i formira pastu visoke viskoznosti. Jedna od metoda za modifikaciju skroba je pirokonverzija gde se skrob izlaže zagrevanju, obično u kiseljoj ili baznoj sredini. Parcijalna hidroliza skroba je takođe zastupljena, kao i repolimerizacija za formiranje izuzetno razgranatih polimera. Rezultat je modifikovani skrob, koji ima visok stepen rastvorljivosti u hladnoj vodi i

nizak viskozitet rastvora u odnosu na nativni skrob, i kao takav može biti primenjen u koncentraciji do 50% bez značajnog povećanja viskoznosti napojne smeše (Oliveira i sar., 2010).

Arapska guma

Arapska guma je suvi gumeni eksudat dobijen iz stabala i grana *Acacia senegal* ili drugih biljnih vrsta roda *Acacia* koje rastu u oblastima Sudana i Senegala. Iako postoji mnogo *Acacia* vrsta, samo nekoliko njih može da obezbedi količinu gume koja je neophodna za industrijsku primenu. Hemijski, arapska guma predstavlja kompleksni polisaharid sa izuzetno razgranatom strukturom. Molekulska masa arapske gume je u opsegu od 240.000 do 580.000. Zbog svojih povoljnih emulgujućih svojstava, niskog viskoziteta u vodenim rastvorima i visokog stepena rastvorljivosti, značajno olakšava i unapređuje proces *spray drying*-a. Glavni razlog njene limitirane upotrebe je visoka cena i nedostupnost. Najveći proizvođač arapske gume je Sudan, a usled nerešenih i nestabilnih socijalnih i političkih uslova u zemlji, intezivno se traga za adekvatnom zamenom arapske gume (Rosenberg i sar., 1990; Oliveira i sar., 2010; Tonon i sar., 2011).

Ciklodekstrini

Ciklodekstrini se intezivno koriste kao solubilizatori i stabilizatori. To su kristalni, nehigroskopni, ciklični oligosaharidi koji se dobijaju enzimskom degradacijom skroba. Među najzastupljenijim vrstama u upotrebi su α -, β - i γ -ciklodekstrin. Postoji još nekoliko njihovih derivata, kao što su dimetil- β -ciklodekstrin, 2-hidroksietil- β -ciklodekstrin i trimetil- β -ciklodekstrin. Ciklodekstrini su molekuli rigidne strukture koji poseduju centralnu šupljinu čija veličina zavisi od tipa ciklodekstrina. Zbog razmeštaja hidroksilnih grupa u molekulu, unutrašnja površina šupljine je hidrofobna, dok je spoljašnja hidrofilna, što omogućava formiranje inkluzionih kompleksa sa raznim molekulima. Formiranje inkluzionog kompleksa značajno menja karakteristike ciklodekstrina, menjajući mu hemijsku reaktivnost, poboljšavajući rastvorljivost, stabilizujući supstance osetljive na toplotu, svetlost, oksidaciju, kao i lako isparljive komponente (Oliveira i sar., 2010).

Maltodekstrini

Maltodekstrini su polimeri koji se dobijaju kiselom ili enzimskom hidrolizom skroba i sastoje se od jedinica D-glukoze koje su primarno povezane α -1,4 vezama. Ovi proizvodi se uobičajeno klasifikuju po svom dekstroznom ekvivalentu (DE). Dekstrozni ekvivalent je mera stepena

hidrolize skroba i obrnuto je proporcionalna molekulknoj masi. Tg maltodekstrina raste obrnuto proporcionalno sa DE, pa je od 100 °C za maltodekstrine sa DE 36, do 188 °C za maltodekstrine sa DE 5. Stoga, maltodekstrini sa nižim DE se uglavnom koriste kao dodaci za sušenje u *spray drying*-u (Oliveira i sar., 2010).

Utvrđeno je da maltodekstrin ima sposobnost modifikovanja površinske lepljivosti niskomolekularnih šećera i organskih kiselina, i na taj način čini mogućim ulaz u bezbedan režim sušenja, što ga klasifikuje u efikasne nosače prilikom sušenja. Sam ili u kombinaciji, maltodekstrin je pogodan za proizvodnju praha različitih vrsta materijala: riblje ulje, ulje mandarine, herbalni ekstrakti, proteinski hidrolizat pilećeg mesa, voćna pulpa, itd. Takođe, koristi se za optimizaciju tehnoloških, funkcionalnih i organoleptičkih karakteristika praha. Razlozi njegove veoma rasprostranjene upotrebe su: niska higroskopnost i viskoznost, veoma dobra rastvorljivost u vodi, kao i niska cena i dostupnost. Bez ukusa je i mirisa.

Jedna od potencijalnih mana maltodekstrina je da zbog njegove niske Tg, usled izlaganja gotovih proizvoda visokoj temperaturi, može doći do formiranja kristalne strukture i daljeg narušavanja strukturnog integriteta zida čestica, što rezultira aglomeracijom ili formiranjem pogače. Dodatno, može doći do otpuštanja aktivne supstance i degradacije/oksidacije tokom skladištenja (Martinelli i sar., 2007; Goula i Adamopoulos, 2008; Sansone, 2011; Nadeem i sar., 2011; Caliskan i Dirim, 2016).

Primenom različitih nosača i parametara sušenja dobijaju se prahovi različitih svojstava. Stoga je neophodno poznavati karakteristike materijala koji se suši i, na osnovu toga, odabrati ulazne parametre kojima se obezbeđuje optimalnost i funkcionalnost procesa, dobijaju prahovi željenih karakteristika i smanjuju troškovi (Singh i Dixit, 2014).

Faktori koji utiču na osobine suvih ekstrakata su brojni: ulazna i izlazna temperatura vazduha, brzina atomizera, protok napojne smeše, vrsta i koncentracija nosača i dr. S obzirom da sušenje predstavlja veoma kompleksnu interakciju između parametara procesa i napojne smeše, uključujući i dodatne efekte radne sredine (vlažnost i temperatura radnog prostora), nije moguće ustanoviti validna pravila o uticaju parametara sušenja na konačna svojstva praha koja će biti univerzalna za sve materijale. Stoga, neophodno je eksperimentalno doći do optimalnih uslova neophodnih za sušenje određenog materijala (Goula i Adamopoulos, 2003) kojima se obezbeđuje

proizvod adekvatnog kvaliteta u pogledu fizičkih, hemijskih, senzornih i nutritivnih karakteristika, uz visok prinos procesa.

2.4. Oksidativni stres

Kiseonik, iako neophodan za život svih aerobnih organizama, može biti izuzetno toksičan u slučaju neadekvatnog metabolisanja. U toku normalnog aerobnog metabolizma, u mitohondrijalnom elektron-transportnom sistemu, jedan deo molekuskog kiseonika se delimično redukuje i tom prilikom može doći do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS).

Pored nepotpune redukcije kiseonika u elektron-transportnom sistemu, slobodni radikali i ROS mogu se generisati i drugim enzimskim i neenzimskim mehanizmima, uključujući jonizujuće zračenje, toksične ksenobiotike, inflamacijske procese, imunski odgovor, jone prelaznih metala, aktivnost redoks-enzima, metabolizam membranskih lipida itd. Najznačajnije ROS uključuju radikalske vrste, kao što su superoksid-anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil-radikal ($\cdot OH$), peroksi-radikal (ROO^{\cdot}) i alkoksi-radikal (RO^{\cdot}), kao i neradikalske vrste - vodonik peroksid (H_2O_2), hipohloritnu kiselinu ($HOCl$), singlet-kiseonik (1O_2) i ozon (O_3) (Bhattacharya, 2015).

Hidroksil-radikal je visoko reaktivan, poseduje sposobnost da inicira lipidnu peroksidaciju i direktno se adira na druga jedinjenja. Superoksid-anjon radikal je takođe veoma reaktivan, ali zbog niske liposolubilnosti, dejstvo mu je ograničeno. Vodonik-peroksid pod dejstvom jona prelaznih metala generiše visokoreaktivni $\cdot OH$. Zbog liposolubilnosti lako difunduje kroz biološke membrane i prodire do ćelijskih delova bogatih prelaznim metalima, kao što su mitohondrije (Aruoma, 1998).

Pod hipoksičnim uslovima, mitohondrijalni respiratorni lanci proizvode azot oksid, koji može generisati azotne reaktivne vrste (RNS). ROS/RNS dalje mogu generisati druge reaktivne vrste indukujući prekomernu lipidnu peroksidaciju (Valko i sar., 2006).

ROS su proizvodi normalnog ćelijskog metabolizma i igraju značajnu ulogu u stimulaciji signalnih puteva u ćeliji, kao odgovor na intra- i ekstracelularne uslove sredine. Međutim, ako se proizvode u količini većoj od one koja se može kontrolisati, mogu dovesti do oksidativnog stresa. Tačnije, ukoliko se naruši balans između produkcije slobodnih radikala i ROS i njihove eliminacije protektivnim mehanizmima, dolazi do oksidativnog stresa. Ovo odsustvo ravnoteže

vodi oštećenju važnih biomolekula i ćelija, sa potencijalnim uticajem na ceo organizam. Oksidativni stres može uzrokovati oštećenje lipida, proteina, ugljenih hidrata, kao i DNK u ćelijama i tkivima, pa čak može dovesti i do smrti ćelije indukovane DNK fragmentacijom i lipidnom peroksidacijom. Ove posledice oksidativnog stresa postavljaju molekularnu bazu razvoja kardiovaskularnih bolesti, kancera, neurodegenerativnih oboljenja, dijabetesa i autoimunih poremećaja (Vladimir-Knežević i sar., 2012).

2.4.1. Oksidativna oštećenja biomolekula

Lipidna peroksidacija predstavlja metabolički proces oksidativnog oštećenja lipida. Glikolipidi, fosfolipidi i holesterol su najčešće mete oksidativnog oštećenja i potencijalno letalne peroksidne modifikacije. Lipidi takođe mogu biti oksigenovani od strane enzima kao što su lipooksigenaze, ciklooksigenaze i citohrom P450. Kao rezultat lipidne peroksidacije nastaje čitav niza proizvoda. Glavni primarni proizvodi su lipidni hidroperoksidi (LOOH). Malonilaldehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (4-HNE) su aldehidi koji se formiraju kao sekundarni produkti. Među nekoliko supstrata, proteini i DNK su posebno osetljivi na modifikacije uzrokovane ovim aldehydima. MDA i 4-HNE imaju najznačajniju ulogu u višestrukim ćelijskim procesima i mogu da učestvuju u sekundarnim štetnim reakcijama promovisanjem intra- i intermolekularnih protein/DNK interakcija. Ove interakcije dalje mogu indukovati promene u biohemijskim svojstvima molekula i na taj način ubrzati razvoj različitih patoloških stanja (Ayala i sar., 2014).

Modifikacija genetskog materijala rezultuje oksidativnim oštećenjima koja predstavljaju prvi korak uključen u procese mutageneze, karcinogeneze i starenja. Dobro je poznato da se u različitim kancerskim tkivima dešava oštećenje DNK uzrokovano slobodnim radikalima. Identifikovano je više od 100 produkata kao rezultat oksidacije DNK. Oštećenje DNK indukovano ROS uključuje: prekide lanca DNK, modifikacije baza, interakciju sa proteinima, lipidnim peroksidima, sprečavanje ili indukciju transkripcije, indukciju signalnih transdukcionih puteva i dr. Usled modifikacije baza mogu nastati različiti modifikovani proizvodi, među kojima je 8-hidroksiguanin jedan od najistraženijih. Ovaj oksidovani DNK proizvod je značajan jer se relativno lako formira, i predstavlja biomarker oksidativnog stresa u organizmu i potencijalni biomarker karcinogeneze (Valko i sar., 2006).

S obzirom da su proteini najzastupljeniji ćelijski konstituenti, predstavljaju veoma značajnu metu za napade ROS. Relativno male strukturne promene usled oksidacije, mogu značajno izmeniti biološku aktivnost proteina. $\cdot\text{OH}$ je jedan od najreaktivnijih ROS u indukovanju oksidativnog oštećenja ovih biomolekula. Procesom oksidacije proteina, dolazi do nastanka novih funkcionalnih grupa, kao što su hidroksilna i karbonilna grupa, što doprinosi izmeni funkcije i degradaciji (Kruidenier i Verspage, 2002). Efekti oksidacije proteina uključuju fragmentaciju polipeptidnog lanca, promenu naelektrisanja proteina, povećanu osetljivost na proteolizu, protein-protein interakcije i agregaciju nastalih produkata (Stadtman, 1990).

Oksidativne modifikacije proteina su uključene u etiologiju i progresiju različitih hroničnih inflamatornih bolesti kao što su kancer, ateroskleroza, reumatoidni artritis, akutni pankreatitis, starenje, neurodegenerativne bolesti. Do akumulacije oksidovanih proteina u organizmu može doći usled (1) prekomerne produkcije ROS i RNS i/ili smanjenja antioksidantnog kapaciteta organizma, (2) smanjene sposobnosti degradacije oksidovanih proteina usled smanjene koncentracije proteaza i/ili povećanog nivoa inhibitora proteaza (Bartosz i Kołakowska, 2010).

2.4.2. Fenoli kao antioksidanti

Radi neutralizacije štetnih efekata ROS/RNS, uključuju se različiti antioksidantni mehanizmi - endogena antioksidantna enzimska zaštita (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, katalaza i dr.) ili neenzimska odbrana (glutacion, vitamin A, vitamin E, itd.) (Valko i sar., 2006).

Antioksidanti mogu da inhibišu ili u potpunosti spreče oksidaciju supstrata, kada su prisutni u niskoj koncentraciji u odnosu na supstrat koji se oksiduje. Pretpostavlja se da polifenoli mogu da se ponašaju kao antioksidanti brojnim mehanizmima. Neki od predloženih mehanizama su:

- sposobnost doniranja atoma vodonika i samim tim neutralizacija nepoželjnog radikala (pri čemu sami antioksidanti prelaze u stabilizovanu radikalsku formu);
- supresija formiranja slobodnih radikala regulacijom enzimske aktivnosti (Pietta, 2000);
- heliranje metalnih jona uključenih u slobodno radikalsku produkciju (Perron i Brumaghim, 2009);
- interakcija fenolnih komponenti sa fiziološkim antioksidantima (Fraga i sar., 2010);

- regulisanje i zaštita antioksidantnih mehanizama odbrane (Pietta, 2000).

U uslovima bolesti, odbrana protiv ROS je oslabljena ili oštećena i često nedovoljna, pa je u takvim uslovima eksterno snabdevanje antioksidantima esencijalno za kompenzovanje štetnih posledica oksidativnog stresa (Ratnam i sar., 2006; Reuter i sar., 2010). Epidemiološkim studijama je dokazano da polifenoli, to jest prirodni proizvodi bogati polifenolima, mogu da deluju preventivno, profilaktički ili da se koriste kao efikasna adjuvantna terapija kod bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom, kao što su kardiovaskularne, neurodegenerativne, starenje, kancer, dijabetes i dr.

2.4.2.1 Bolesti uzrokovane oksidativnim stresom

Kardiovaskularna oboljenja predstavljaju jedan od vodećih uzroka smrti u svetu. Etiologija bolesti je povezana je sa mnogobrojnim faktorima rizika koji se ne mogu eliminisati i modifikovati (genetske predispozicije, starost, pol), ali i nekih koji se mogu modifikovati, kao što su pušenje, loša ishrana, stres, fizička neaktivnost i dr. U studijama je dokazano da ROS-indukovani oksidativni stres igra značajnu ulogu u različitim bolestima kao što su ateroskleroza, ishemija srca, hipertenzija, kardiomiopatija, srčana hipertrofija i kongestivna srčana insuficijencija. Odgovoran je za modifikaciju fosfolipida i proteina, uzrokujući peroksidaciju i oksidaciju tiolnih grupa. Oksidativni stres dovodi do promena u membranskoj permeabilnosti, funkcionalnim modifikacijama različitih ćelijskih molekula, kao i abnormalnosti u funkciji miocita (Sen i Chakraborty, 2011).

Polifenoli se ponašaju kao potentni inhibitori LDL oksidacije i ovaj tip oksidacije se razmatra kao ključni mehanizam u razvoju ateroskleroze. Drugi mehanizmi kojima se može ispoljiti protektivnost polifenola su antioksidantni, antiinflamacijski efekat, povećanje HDL i poboljšanje endotelijalne funkcije. Osim toga, doprinose stabilizaciji aterosklerotskog plaka (Pandey i Rizvi, 2009).

Ustanovljeno je da je oksidacija LDL strogo povezana sa rizikom od koronarnih bolesti srca i infarktom miokarda. Studije su pokazale da resveratrol inhibiše oksidaciju LDL heliranjem bakra ili direktnom skevindžer aktivnošću. Potom, unos hrane bogate polifenolima negativno korelira sa hipertenzijom (Medina-Ramon i sar., 2011).

Moždane strukture su veoma osetljive na oksidativna oštećenja zbog visokog sadržaja oksidovanih polinezasićenih masnih kiselina, prisustva redoks-aktivnih metala i korišćenja kiseonika. Oksidativni stres se povećava sa starenjem i stoga se može smatrati značajnim uzročnim faktorom **neurodegenerativnih bolesti** koje su tipične za stariju populaciju, kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest (Valko i sar., 2007). U bolestima kao što je Alchajmerova bolest, brojnim studijama je dokazano da oksidativno oštećenje igra glavnu ulogu u gubitku neurona i progresiji demencije. Ustanovljeno je da je oksidativno oštećenje uzrokovano β -amiloidom, toksičnim peptidom koji igra značajnu ulogu u patogenezi bolesti, posredovano vodonik peroksidom (Esposito i sar., 2002). Pojedini polifenoli (poreklom iz voća) imaju sposobnost prolaska krvno-moždane barijere i mogu ispoljiti neuroprotektivni efekat protiv vodonik peroksida (Dai i sar., 2006). Takođe, za neke je ustanovljeno da pokazuju protektivni efekat kod toksičnosti izazvane β -amiloidom. Osim toga, pozitivni efekti kod demencije, usled umerene konzumacije vina, pripisuju se upravo prisustvu resveratrola, za koji je dokazano da je efikasan antioksidant.

Studijama je pokazano da se konzumacijom zelenog čaja može redukovati rizik od razvoja Parkinsonove bolesti. Epigalokatehin galat je pokazao zaštitnu ulogu protiv neurotoksina N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, koji se smatra induktorom Parkinsonove bolesti. Takođe, štiti neurone aktivacijom signalnih puteva, uključujući MAP kinazu, koja je fundamentalna za preživljavanje ćelija (Rossi i sar., 2008). Terapeutska uloga katehina u Parkinsonovoj bolesti se pripisuje i njegovoj sposobnosti heliranja gvožđa. Dodatno, antioksidantna funkcija je povezana sa indukcijom ekspresije antioksidantnih i detoksikujućih enzima (Pandey i Rizvi, 2009).

Starenje se može definisati kao progresivni gubitak fizioloških funkcija organizma nakon reproduktivne faze života. Štetni efekti slobodnih radikala koji se stvaraju tokom aerobnog metabolizma uzrokuju oštećenje DNK, lipida i proteina, neadekvatne interakcije između DNK, proteina i drugih strukturnih molekula (Valko i sar., 2007). Ustanovljeno je da unos hrane bogate polifenolima može značajno redukovati štetne efekte starenja i doprineti odlaganju procesa starenja (Pandey i Rizvi, 2009).

Pod **kancerom** se podrazumevaju oboljenja za koja je karakteristična nekontrolisana deoba ćelija uz odsustvo apoptoze, invazivnost i, ponekad, pojava metastaza. Višestepeni proces kao što je razvoj kancera karakteriše se kumulativnim dešavanjima više događaja u pojedinačnoj ćeliji koji

se mogu opisati kroz tri stadijuma - inicijacija, promocija i progresija. ROS je zastupljen u sva tri stadijuma kancerogeneze. Tokom prve faze dolazi do strukturnih promena DNK i genskih mutacija. Faza promocije se karakteriše povećanom proliferacijom ćelija i pod dejstvom različitih faktora, prelazi u treću fazu, koja je ireverzibilna - progresija. U ovoj fazi ROS može da uzrokuje dodatne izmene u ćelijama koje su već transformisane i može da poveća stopu migracije ćelija, čime doprinosi povećanju antiproliferativnog kapaciteta, invazivnosti i sposobnosti metastaziranja (Valko i sar., 2006; Vladimir-Knežević i sar., 2012).

Različite kliničke i epidemiološke studije su potvrdile negativnu korelaciju između unosa polifenola i incidence kancera (Ferry i sar., 1996; De Stefani i sar., 1999; Knekt i sar., 2002). Nekoliko mehanizama se mogu identifikovati kao odgovorni za antitumorsku aktivnost polifenola: antiproliferacija, estrogena/antiestrogena aktivnost, prevencija oksidacije, indukcija detoksikujućih enzima, antiinflamacijska aktivnost, regulacija imunskog odgovora (Pandey i Rizvi, 2009).

2.4.3. Ispitivanje antioksidantne zaštite

Da bi se evaluirala efikasnost fenola kao antioksidanata i objasnio mehanizam njihove aktivnosti, koristi se širok spektar eksperimentalnih metoda, od najprostijih hemijskih antioksidantnih testova kroz biološki relevantnije bazirane na ćelijama, do najznačajnijih u smislu preciznosti, na životinjskim modelima, i kliničkih studija na ljudima. Uzimajući u obzir sve poznate prednosti i ograničenja, svaki upotrebljeni metod obezbeđuje korisne informacije na određenom nivou biološkog organizma (Vladimir-Knežević i sar., 2012).

Kada se razmatra biološka aktivnost prirodnih komponenti i proizvoda, treba imati u vidu da ekstrakti, kao i etarska ulja, zapravo predstavljaju kompleksne mešavine mnogobrojnih konstituenata i biološki efekat koji ispoljavaju može biti rezultat sinergije svih molekula ili samo delovanja najdominantnijih komponenti. U literaturi, u većini slučajeva se analizira delovanje samo najzastupljenijih komponenti, kao što su karvakrol, timol, linalool i dr. Međutim, moguće je da se aktivnost glavne komponente modifikuje prisustvom manje zastupljenih komponenti. Verovatno je da nekoliko komponenata igra ulogu u definisanju mirisa, teksture, gustine i boje, potom ćelijske penetracije, lipofilnog i hidrofilnog karaktera i fiksiranja za ćelijske zidove i membrane, kao i ćelijsku distribuciju. Poslednja osobina je veoma značajna, jer distribucija u

ćeliji određuje različite tipove radikalnih reakcija, u zavisnosti od njihove raspodele u ćeliji. U tom smislu, za utvrđivanje biološkog delovanja značajnije je ispitati uticaj celog ekstrakta nego samo pojedinačne komponente, jer se koncept sinergizma čini značajnim.

2.4.3.1 Ispitivanja na životinjama

Da bi se prevazišle razlike između *in vitro* testova i celog organizma i stvorili uslovi za sprovođenje kliničkih studija, istraživanja na životinjama se primenjuju široko u polju istraživanja antioksidantne aktivnosti (Mortensen i sar., 2008). Kapacitet i efikasnost antioksidanata *in vivo* mogu biti ocenjeni preciznije zbog njihovog efekta na nivou oksidacije u biološkim tečnostima i tkivima. Stoga su studije na životinjama uglavnom fokusirane na ukupni antioksidantni kapacitet, lipidnu peroksidaciju i merenja aktivnosti antioksidantnih enzima. Hepatoprotektivne studije sa životinjskim modelima koriste egzogeno administrirane hepatotoksine, kao što je ugljentetrahlorid (CCl₄) ili paracetamol, slobodni radikal koji generiše komponentu koja indukuje oksidativni stres povezan sa oštećenjem biomolekula i ćeljskom smrću. Utvrđeno je da polifenoli mogu da štite jetru od ćeljskog oksidativnog oštećenja i da održavaju intracelularni nivo antioksidantnih enzima (Fernandez-Martinez i sar., 2007; Amat i sar., 2010; Vladimir-Knežević i sar., 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu (Srbija); Samostalnog odseka za biohemiju, Institut za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Vojvodine Novi Sad (Srbija); TUBITAK Marmara Istraživačkog centra, Prehrambenog instituta, Gebze, Kocaeli (Turska); SP Laboratorije, Bečej (Srbija) i Centra za energiju, biomasu i biotehnologiju, Karlovac (Hrvatska).

3.1. Biljni materijal

S. montana L. (rtanjski čaj) je plantažno gajena 2012. godine, na eksperimentalnom polju u Bačkom Petrovcu (Institut za organsku proizvodnju i biodiverzitet, Novi Sad). Herba (nadzemni deo biljke), sušena je u tankom sloju na vazduhu. Nakon toga je skladištena u papirnim vrećama, na sobnoj temperaturi na tamnom i suvom mestu.

3.2. Hemikalije

Folin-Ciocalteu reagens, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH^{*}), ferihlorid, galna kiselina, katehin, karvakrol, linalool, α -terpineol, ugljentetrahlorid, maltodekstrin (Sigma Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka); etanol (Centrohem, Šabac, Srbija); metanol (J. T. Baker, Deventer, Holandija); komercijalni ugljendioksid (≥ 99 %) (Messer Tehnogas, Novi Sad, Srbija); komercijalni azot (Messer, Zaprešić, Hrvatska); destilovana voda, TKA water purification system tip: 05.30C 7-DEN (Sigma Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka). Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu su bili stepena analitičke čistoće.

3.3. Aparati i uređaji

- Uređaj za ekstrakciju ugljendioksidom u superkričnom stanju (HPEP - High Pressure Extraction Plant) - NOVA Swiss, Effretikon, Švajcarska;

- Sistem za ekstrakciju subkritičnom vodom, sa regulatorom temperature - PARR Instrument Company, SAD;
- *Spray dryer* komora za sušenje - Anhydro, Danska;
- Atomizer - Bosch, Nemačka;
- Peristaltička pumpa, magnetna mešalica - IKA Werke GmbH & Co. KG, Nemačka;
- Analitička vaga - Sartorius 2474, Nemačka;
- Vortex mikser - EV 100, Tehnica, Železniki, Slovenija;
- Mlin za kafu - Bosch, Nemačka;
- Šejker - Model 3015 GFL, Schuttelapparate Shakers, Nemačka;
- Rotavapor - Devarot, Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija;
- Spektrofotometar - Jenway 6300 VIS, Velika Britanija;
- Aparat za gasnu gromatografiju: GC 6890N, MS 5795; MS 5975C; 7697A Headspace sampler - Agilent, SAD;
- Aparat za tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom (HPLC) - Agilent, SAD;
- Set sita - Erweka, Nemačka.

3.4. Ispitivanje biljnog materijala

3.4.1. Određivanje veličine čestica biljnog materijala

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

$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i}$$

gde je:

m_i - maseni procenat i-te frakcije,

d_i - srednji prečnik i-te frakcije.

3.4.2. Određivanje sadržaja etarskog ulja

Sadržaj etarskog ulja u biljnom materijalu određen je po oficinalnoj metodi hidrodestilacije propisanoj po *Ph. Jug.* IV.

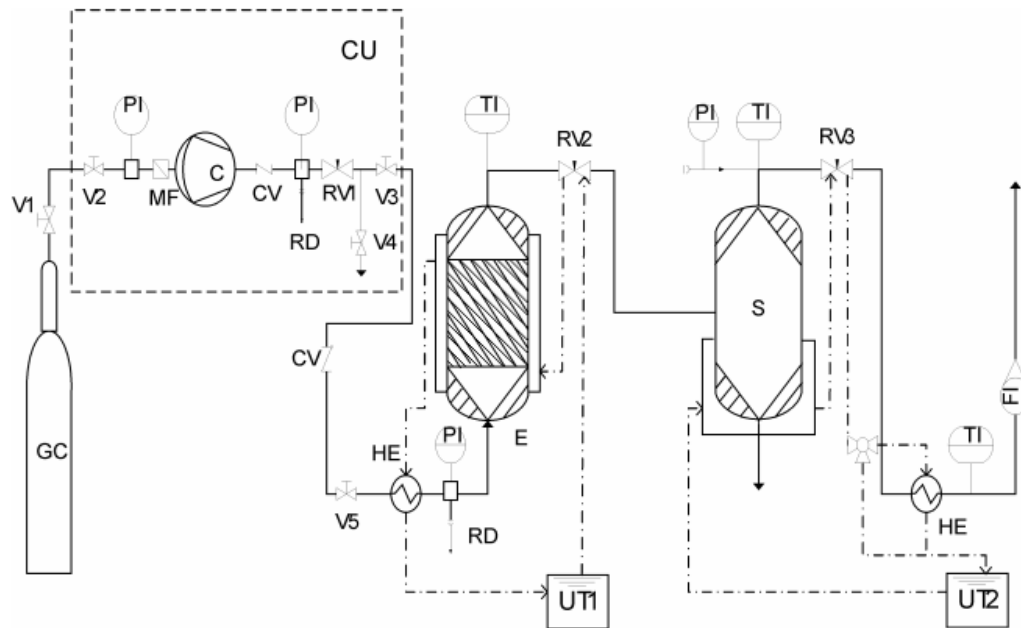
3.4.3. Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage u biljnom materijalu je određen gravimetrijskim postupkom, na osnovu gubitka sušenjem (105 °C, 3 h), koji propisuje *Ph. Jug.* IV.

3.5. Ekstrakcija *S. montana* superkritičnim ugljendioksidom

Ekstrakcija biljne droge *S. montana* izvršena je u laboratorijskom uređaju High Pressure Extraction Plant, čija je šema prikazana na slici 8 (Filip, 2014).

Odmeri se 60 g uzorka i unese u ekstraktor (E). Biljni materijal u ekstraktoru se najpre oslobađa prisutnog vazduha prodivavanjem CO₂ iz boce (GC) u gasovitom stanju, nakon čega se zatvore ventil (V5) i regulacioni ventil (RV2). Ultratermostatima (UT1) i (UT2) se održavaju radne temperature u ekstraktoru (E) i separatoru (S) pri zatvorenom ventilu (V1) boce sa CO₂. Zatim se, nakon otvaranja ventila od V1 do V5 (V4 je zatvoren), kompresor, na kome je podešen pritisak nešto iznad radnog, se pusti u pogon i regulacionim ventilom (RV1) se podesi radni pritisak. Ugljendioksid se nakon prolaska kroz izmenjivač toplote (HE) otvaranjem ventila (V5) uvodi u ekstraktor, pri čemu je regulacioni ventil (RV2) zatvoren. Otvaranjem i podešavanjem regulacionih ventila (RV2) i (RV3) se ostvaruje željeni pritisak u separatoru, kao i održavanje radnog protoka ekstragensa (Filip, 2014).



Slika 8. Šema laboratorijskog uređaja za ekstrakciju ugljendioksidom

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

Ekstrakcija biljnog materijala je vršena pri sledećim uslovima ekstrakcije: pritisak ugljendioksida od 100 do 350 bar (sa korakom od 25 bar između eksperimenata) i na temperaturama 40, 50 i 60 °C, pri konstatnom protoku ugljendioksida od 0,194 kg/h. Separacioni uslovi su bili pritisak 15 bar i temperatura 23 °C.

Prinos ekstrakcije praćen je nakon svakih 30 minuta, do kraja procesa ekstrakcije. Ukupni prinos ekstrakcije je izražen kao masa ekstrakta (g) u 100 g droge (% m/m). Ekstrakti su preneti u staklene bočice i skladišteni u frižideru na temperaturi 4 °C, radi prevencije moguće degradacije.

3.5.1. Ekstrakcija *S. montana* superkritičnim ugljendioksidom uz predtretman biljnog materijala

Neposredno pre ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom, uzorak droge *S. montana* (60,0 g) je bio podvrgnut različitim predtretmanima:

1. Biljni materijal je preliven sa 36 g vode, uz intezivno mešanje 1 h (oznaka uzorka - E1).
2. Biljni materijal je smešten u ekstraktor i izložen ugljendioksidu u trajanju od 1 h, pri pritisku 100 bar i temperaturi 40 °C (E2).
3. Biljni materijal, smešten u staklenu čašu, izlagan je ultrazvučnim talasima (snaga 125 W, frekvencija 50 Hz) u trajanju od 1 h (E3).
4. Biljni materijal je preliven sa 10 g 96% etanola, uz intezivno mešanje 15 minuta (E4).

Nakon primenjenog odgovarajućeg predtretmana, vršena je ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju (uslovi: pritisak 100 bar, temperatura 40 °C, odnosno gustina CO₂ 628,7 kg/m³, vreme ekstrakcije 4,5 h, protok ugljendioksida 0,194 kg/h). Uslovi u separatoru su bili p=15 bar i t=23 °C. Nakon ekstrakcije, dobijeni ekstrakti su preneti u staklenu ambalažu i skladišteni na temperaturi od 4 °C, radi sprečavanja moguće degradacije.

3.5.2. Gasno-hromatografska analiza ekstrakata *S. montana* dobijenih superkritičnim ugljendioksidom

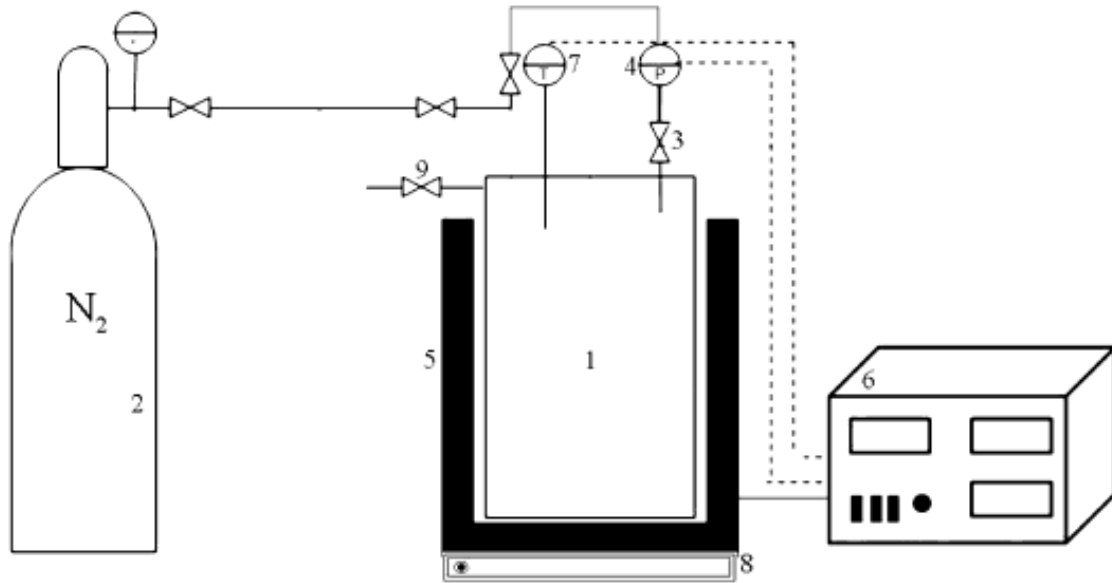
Analiza uzoraka izvršena je pomoću GC/MS i GC/FID hromatografije. Za razdvajanje komponenti korišćen je gasni hromatograf GC 9890N, opremljen split/splitless injektorom, HP-5MS kapilarnom kolonom (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm). Kvantifikacija supstanci izvršena je na osnovu standarda (karvakrol, linalool, α-terpineol). Uzorci i rastvori referentnih standardnih supstanci su injektovani u zapremini od 5 µl, pri split odnosu 1:30. Kvantifikacija komponenata je urađena pomoću plameno-jonizujućeg detektora (FID), korišćenjem kalibracionog dijagrama za svaku pojedinačnu komponentu. Standardne supstance su rastvorene u metanolu pri čemu je dobijena serija rastvora koncentracija od 1 do 500 µg/mL. Minimalni koeficijent korelacije (r) za dobijene jednačine iznosio je 0,99. Uslovi rada GC/MS instrumenta: temperatura injektora 250 °C; linearni temperaturni režim od 60 do 150 °C (4 °C/min). Kao gas nosač korišćen je He (2

mL/min). Uslovi rada GC/FID instrumenta: temperatura injektora 250 °C; linearni temperaturni režim od 60 do 150 °C (4 °C/min); temperatura detektora 300 °C.

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

3.6. Ekstrakcija *S. montana* subkritičnom vodom

Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju je rađena u diskontinualnom ekstraktoru pod visokim pritiskom, sa zapreminom 450 mL, maksimalnim radnim pritiskom od 200 bar i temperaturom 350 °C, povezanim sa kontrolorom temperature. Šematski prikaz aparature je dat na slici 9 (Zeković i sar., 2014). U svim probama, 5 g droge je u ekstraktoru (1) preliveno sa 50 mL vode. Radni pritisak je postignut puštanjem azota iz gasnog cilindra (2) kroz ulazni ventil (3) i meren je manometrom (4). Azot je korišćen da bi se izbegla moguća oksidacija na visokim temperaturama zbog prisustva kiseonika u vazduhu. Električnom grejnom oblogom (5) je vršeno zagrevanje ekstraktora i temperatura je merena i kontrolisana uz pomoć regulatora (6), koji je povezan sa temperaturnom sodnom (7). Magnetna mešalica (8) (broj obrtaja 750 o/min) je korišćena za mešanje sa ciljem povećanja prenosa mase i toplote, kao i sprečavanja lokalnog pregrevanja materijala na unutrašnjim zidovima ekstraktora. Temperatura u opsegu 79,15 - 220,5 °C i vreme ekstrakcije 5,9 - 34,1 min su bile nezavisne promenljive, dok je pritisak tokom ekstrakcije bio konstantan (30 bar). Nakon ekstrakcije, ekstraktor je hlađen u vodenom kupatilu sa ledom do temperature 30 °C i ispuštan je azot otvaranjem izlaznog ventila (9). Ekstrakti su nakon filtracije premešteni u staklenu ambalažu i skladišteni na tamnom mestu i temperaturi 4 °C.



Slika 9. Šematski prikaz aparature za ekstrakciju subkritičnom vodom: (1) ekstraktor; (2) boca sa azotom; (3) ulazni ventil za gas; (4) manometar; (5) električna grejna obloga; (6) digitalni kontroler; (7) temperaturna sonda; (8) magnetna mešalica; (9) izlazni ventil za gas

3.6.1. Eksperimentalni dizajn

U cilju određivanja uticaja temperature i vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i na antioksidantnu aktivnost ekstrakata, korišćena je metoda odzivne površine (eng. *Response Surface Methodology* - RSM). Korišćen je centralno-kompozitni eksperimentalni dizajn sa dva numerička faktora na pet nivoa. Nezavisne promenljive korišćene u eksperimentalnom dizajnu su bile temperatura (T , 79,15 - 220,5 °C) i vreme ekstrakcije (t , 5,9 - 34,1 min). Ukupno je dobijeno 11 ekstrakata (osam aksijalnih tačaka na rastojanju $\pm 1,414$ od centralne tačke i tri ponavljanja centralne tačke). Za svaku eksperimentalnu tačku dizajna urađena su tri ponavljanja i srednja vrednost je korišćena kao ispitivana promenljiva. Veza između kodiranih i pravih vrednosti je data jednačinom:

$$X = \frac{x_i - x_0}{\Delta x} \quad (1)$$

gde je:

X – kodirana vrednost

x_i – odgovarajuća stvarna vrednost

x_o – stvarna vrednost u centru domena

Δx – inkrement x_i koji odgovara promeni x za jednu jedinicu.

Prirodne i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih, koje su korišćene u RSM dizajnu, date su u tabeli 6.

Tabela 6. Eksperimentalni domeni prirodnih i kodiranih vrednosti nezavisno promenljivih

Nezavisne promenljive	Nivoi				
	(-1,414)	(-1)	(0)	(1)	(+1,414)
Temperatura (°C)	79,15	100	150	200	220,5
Vreme ekstrakcije (min)	5,9	10	20	30	34,1

Zavisne promenljive su fitovane prema polinomnom modelu drugog reda, kojim se može opisati veza između ispitivanih i nezavisno promenljivih (Bezerra i sar., 2008) i koji je dat sledećom jednačinom:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

gde je Y zavisna promenljiva (odziv), X_i i X_j su nezavisne promenljive koje utiču na zavisno promenljivu, a β_0 , β_i , β_{ii} i β_{ij} su regresioni koeficijenti za odsečak, linearni, kvadratni i interreakcioni koeficijent.

Optimalni uslovi ekstrakcije su određeni korišćenjem eksperimentalno određenih vrednosti zavisno promenljivih za odzive, odnosno sadržaje ukupnih fenola i flavonoida, kao i antioksidantnu aktivnost. Postupanje sa višestrukim odzivima i odabir optimalnih uslova je baziran na odabranoj funkciji poželjnosti. Dizajn eksperimenta i analiza višestruke linearne regresije su urađeni pomoću softvera Design-Expert v.7 Trial (Stat-Ease, Minneapolis,

Minnesota, USA). Rezultati su statistički testirani analizom varijanse (ANOVA) sa nivoom signifikantnosti od 0,05. Adekvatnost modela je ispitana pomoću koeficijenta determinacije (R^2), koeficijenta varijacije (CV) i p -vrednosti za modele.

3.6.2. GC/MS analiza ekstrakata *S. montana* dobijenih subkritičnom vodom

Analiza ekstrakata je sprovedena korišćenjem GC/MS sistema koji se sastoji iz Agilent 7697A Headspace semplera, 6890N gasnog hromatografa (GC) i 5975C masenog selektivnog detektora. Kapilarna GC analiza je izvedena na DB-5MS (60 m × 0,25 mm ID, 0,25 μm) kapilarnoj koloni (5% difenil, 95% dimetilpolisiloksan) sa helijumom kao nosećim gasom. 1 mL alikvota uzorka je mešan sa internim standardom (1-bromo-2-fluorobenzen) do finalne koncentracije od 2 mg/L koja je dodata u vijalu od 20 mL. Nakon izlaganja vijale pritisku (helijum na 1,034 bar) u trajanju od 15 min, uzorci su injektovani u kapilarnu kolonu u split odnosu (16,2:1), 0,5 min na temperaturi 110 °C. Temperatura transferne linije je podešena na 150 °C. Helijum pri konstatnom pritisku od 1,386 bar i konstantnom protoku od 1 mL/min je korišćen kao gas nosač. Temperatura je bila 50 °C 2 min i povećana na 300 °C (10 °C/min), a zatim održavana na 300 °C 5 min. Maseni spektrometar je radio u elektron jonizacionom modu (70 eV) u masenom opsegu m/z 45–550. Temperatura jonskog izvora je bila podešena na 300 °C.

Identifikacija isparljivih komponenti je uslovno izvršena poređenjem spektara komponenti iz ekstrakata sa masenim spektrima iz baze podataka (NIST98 i Wiley7N) i poređenjem njihovih GC Kovačevih indeksa koji su dobijeni na bazi retencionog vremena *n*-alkana C7-C25. Neizotermalni linearni retencioni indeksi su računati nakon analize *n*-alkana pod istom uslovima. Semikvantitativna analiza isparljivih komponenti ekstrakata je izvedena korišćenjem 1-bromo-2-fluorobenzena kao unutrašnjeg standarda.

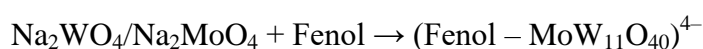
3.6.3. Ekstrakcija *S. montana* smešom etanol-voda

Droga (5,0 g) je ekstrahovana sa 50 mL ekstragensa. Ekstrakcija je vršena uz mešanje, korišćenjem šejkera (100 rpm) u trajanju 120 min. Različiti ekstrakti su dobijeni korišćenjem pet različitih koncentracija ekstragensa - smeše etanol/voda u različitim odnosima (etanol u koncentracijama 21,7; 30; 50; 70 i 78,3%) i na pet različitih temperatura (33,8; 40; 55; 70 i 76,2

°C). Nakon ekstrakcije, vršena je filtracija i ekstrakti su preneti u staklenu ambalažu i skladišteni na tamnom mestu i temperaturi 4 °C.

3.6.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima *S. montana* je određen metodom po Folin-Ciocalteu (Singelton i Rosi, 1965; Kähkönen i sar., 1999), koja se zasniva na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon. Nastali fenoksidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol-MoW₁₂O₄₀)⁴⁻:



Mo(VI) (žuto obojen) + e⁻ → Mo(V) (plavo obojen)

Reakciona smeša je pripremljena mešanjem ekstrakta (0,1 mL), 7,9 mL destilovane vode, 0,5 mL reagensa Folin-Ciocalteu i 1,5 mL 20% natrijum karbonata (Na₂CO₃). Nakon inkubacije od 1 h na sobnoj temperaturi, merena je apsorbanca ispitivane smeše na talasnoj dužini od 750 nm. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta. Ukupan sadržaj fenola u analiziranim uzorcima izražen je kao mg ekvivalenta galne kiseline po 100 g droge (mg GAE/100 g).

3.6.5. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima određen je kolorimetrijskom metodom po Markham-u (1989). Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida zasnovano je na njihovoj osobini da sa metalima daju odgovarajuće metalo-komplekse.

Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 1 mL uzorka sa 4 mL destilovane vode i 0,3 mL 5% natrijum nitrita (NaNO₂). Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 6 minuta. Nakon inkubacije u reakcionu smešu je dodato 0,3 mL aluminijum hlorid heksahidrata (AlCl₃ × 6H₂O) i 5 minuta kasnije 2 mL 1 M natrijum hidroksida (NaOH). Dobijena smeša je dopunjena destilovanom vodom do ukupne zapremine od 10 mL. Apsorbanca uzorka je merena na talasnoj dužini od 510 nm. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta. Ukupan sadržaj flavonoida u analiziranim uzorcima izražen je kao mg ekvivalenta katehina po 100 g droge (mg CE/100 g).

3.6.6. Određivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata

Antioksidantna aktivnost ekstrakata *S. montana* je određena primenom DPPH spektrofotometrijskog testa (Espin i sar., 2000). Metoda je zasnovana na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog DPPH[•] radikala u redukovanu, žuto obojenu formu. Slobodni DPPH[•] radikal reaguje sa antioksidantnom komponentom, koja je donor vodonikovih atoma, pri čemu dolazi do redukcije (nastaje DPPH-H forma), odnosno ljubičasto obojeni stabilni DPPH[•] radikal se transformiše u žuto obojenu neutralnu formu DPPH-H. Promena intenziteta boje je proporcionalna broju „uhvaćenih” radikala.

Različite zapremine prethodno pripremljenih ekstrakata *S. montana* su pomešane sa metanolom (95%) i 90 µM 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) da bi se dobile različite finalne koncentracije ekstrakata. Nakon 60 min inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbanca je merena na talasnoj dužini 517 nm. RSC (%) vrednost („kapacitet hvatanja radikala“; eng. *Radical Scavenging Capacity*) je računata prema sledećoj formuli:

$$(\%)RSC = 100 - \frac{A_{uzorka} \times 100}{A_{slepe\ probe}} \quad (3)$$

gde je:

A_{uzorka} - apsorbanca uzorka

$A_{slepe\ probe}$ - apsorbanca slepe probe.

Antioksidantna aktivnost je izražena kao IC₅₀ vrednost, što predstavlja koncentraciju ekstrakta neophodnu da se neutrališe 50% DPPH radikala, u prethodno definisanim eksperimentalnim uslovima, a izračunata je iz jednačine linearne regresije.

3.7. Sušenje ekstrakata *S. montana* primenom *spray drying* tehnologije

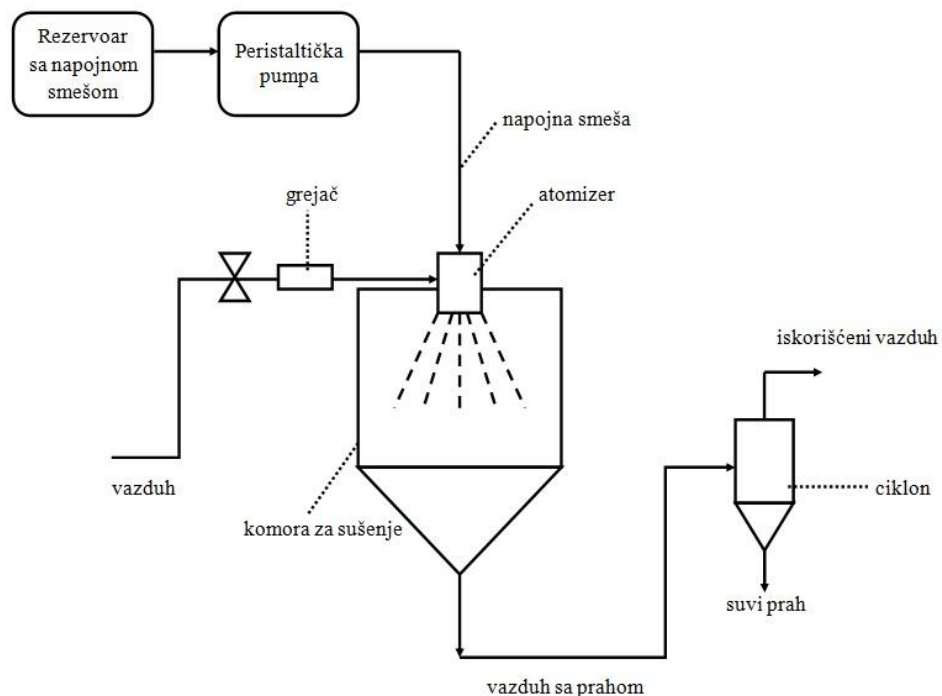
3.7.1. Priprema tečnog ekstrakta za sušenje *spray drying* procesom

Tečni ekstrakt *S. montana* je dobijen korišćenjem 50% etanola kao ekstragensa, pri čemu je odnos droge i rastvarača bio 1:5. Ekstrakcija je vršena na sobnoj temperaturi, na tamnom mestu,

u trajanju od 5 dana (oficinalni postupak koji propisuje *Ph. Jug.* IV). Nakon ekstrakcije, izvršena je filtracija i tečni ekstrakt je skladišten na tamnom mestu do sušenja.

Kao nosač prilikom sušenja tečnih ekstrakata *S. montana* korišćen je maltodekstrin (DE16) u koncentracijama 10, 30 i 50%. Rastvor maltodekstrina je pripreman rastvaranjem u destilovanoj vodi i neposredno pre svakog sušenja je dodat tečnom ekstraktu *S. montana*. Tako pripremljena homogenizovana smeša je konstantno tokom procesa mešana pomoću magnetne mešalice i grejana na temperaturi 30 °C. Ubacivanje napojne smeše u *spray drying* sistem je vršeno pomoću peristaltičke pumpe (protok 4,3 L/h). Šematski prikaz *spray drying* procesa je dat na slici 10.

Sušenje je sprovedeno u poluindustrijskom uređaju koji se koristi u svrhe naučno-istraživačkog rada i razvoj metoda sušenja. Brzina atomizera je iznosila 20.000 - 21.000 rpm. Ulazna temperatura vazduha je bila u opsegu 135-140 °C, dok je izlazna temperatura bila u opsegu 60-70 °C. Prah je separatisan iz struje vazduha pomoću ciklonske separacione metode. Nakon sakupljanja, skladišten je u staklenoj ambalaži, u eksikatoru, do narednih analiza.



Slika 10. Šematski prikaz *spray drying* procesa

3.7.2. Efikasnost procesa sušenja

Efikasnost procesa sušenja se izražava kao procenat mase finalnog praha dobijenog u procesu sušenja u odnosu na masu čvrste materije (suvog ostatka), prethodno utvrđene u napojnoj smeši, odnosno tečnom ekstraktu.

3.7.3. Određivanje sadržaja etarskog ulja

Sadržaj etarskog ulja u suvim ekstraktima određen je po oficinalnoj metodi hidrodestilacije propisanoj po *Ph. Jug.* IV.

3.7.4. Gasno-hromatografska analiza ulja izdvojenog iz suvih ekstrakata *S. montana*

GC/MS i GC/FID analize ulja izdvojenog iz suvih ekstrakata *S. montana* su urađene prema proceduri opisanoj u poglavlju 2.4.2.

3.7.5. Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage u uzorcima suvog ekstrakta određen je gravimetrijskim postupkom, na osnovu gubitka sušenjem (105 °C, 3 h), koji propisuje *Ph. Jug.* IV.

3.7.6. Određivanje higroskopsnosti

Higroskopsnost je određena prema metodi opisanoj u studiji od strane autora Cai i Corke (2000), sa izvesnim modifikacijama. Uzorak suvog ekstrakta (približno 1 g) se prenese u Petrijevu šolju i postavi u eksikator u kome su prethodno postignuti uslovi: temperatura 23 °C i relativna vlažnost 70% (što se obezbeđuje pomoću rastvora natrijum-hlorida). Higroskopsnost se izražava kao gram apsorbovane vode po 100 g suvog ekstrakta, nakon dva i sedam dana.

3.7.7. Određivanje indeksa rastvorljivosti u vodi i indeksa apsorpcije vode

Indeks rastvorljivosti u vodi (eng. *Water Solubility Index* - WSI) i indeks apsorpcije vode (eng. *Water Absorption Index* - WAI) su određeni prema metodi opisanoj u studiji Phoungchandan i Sertwasana (2010). Određena masa praha (2,5 g) i destilovane vode (30 mL) se energično promeša u kivetu za centrifugiranje; inkubira u vodenom kupatilu na temperaturi 30 °C (30 min) i centrifugira 15 minuta (3000 o/min). Supernatant se pažljivo odlije u prethodno izmerenu Petri šolju i suši na 105 °C, preko noći.

Indeks rastvorljivosti u vodi predstavlja odnos mase osušenog čvrstog dela supernatanta i mase početnog suvog uzorka, izražen u procentima. Indeks apsorpcije vode predstavlja odnos mase čvrstih peleta zaostalih nakon centrifugiranja i mase početnog suvog uzorka, izražen u procentima.

3.7.8. Određivanje nasipne zapremine

Nasipna zapremina je određena merenjem zapremine određene mase suvog ekstrakta *S. montana*. 20 g suvog ekstrakta je preneseno u graduisanu menzuru zapremine 100 mL i potom izloženo vibraciji (2 min). Nakon toga, očitana je zapremina praha i vrednost nasipne zapremine je izražena kao masa (u g) suvog ekstrakta po mL.

3.7.9. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida i antioksidantne aktivnosti suvih ekstrakata *S. montana*

Radi analiziranja sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidantne aktivnosti u suvim ekstraktima *S. montana*, prethodno je izvršena ekstrakcija polifenolnih komponenti, po proceduri opisanoj u studiji González-Gómez i sar. (2010) sa izvesnim modifikacijama. 2 g suvog ekstrakta *S. montana* je pomešano sa 20 mL metanola i mešano u šejkeru 24 h, zaštićeno od svetlosti. Profiltrirani ekstrakti su preneseni u staklenu ambalažu i skladišteni na tamnom i hladnom mestu.

Određivanje ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidantne aktivnosti suvih ekstrakata je urađeno prema procedurama opisanim u poglavljima 2.5.4, 2.5.5. i 2.5.6, s tim da je sadržaj ukupnih fenola izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline po g suvog ekstrakta (mg GAE/g),

sadržaj ukupnih flavonoida kao mg ekvivalenta katehina po g suvog ekstrakta (mg CE/g), a IC_{50} vrednost kao $\mu\text{g/mL}$.

3.7.10. Analiza ACE inhibitorne aktivnosti

ACE (angiotenzin konvertirajući enzim) inhibitorni test je urađen po metodi opisanoj u studiji Yoshie-Stark i sar. (2008). Osnovna reakcija metode je razgradnja hipuril-L-histidil-leucina (HHL) sa ACE, pod definisanim uslovima (80 min, 37 °C) i čiji je produkt hipurna kiselina (HA). Reakcija razgradnje HHL u prisustvu ACE, praćena je bez i u prisustvu potencijalne inhibitorne supstance (ekstrakta) (probe A i B), dok su se pod istim uslovima izvodile i kontrolne probe (slepe probe reakcije A i B). U testu je uzorak (različitih koncentracija) rastvoren u 0,2 mol/L kalijum fosfatnog pufera (pH 8,30), inkubiran 80 minuta na 37 °C sa hipuril-His-Leu (HHL) u 0,2 mol/L kalijum fosfatnom puferu koja sadrži 300 mmol/L natrijum hlorida (NaCl) (pH 8,30) i rastvor ACE. Finalne koncentracije HHL i ACE su bile 10 mmol/L i 25 mU/mL. Reakcija je stopirana dodavanjem 1 mol/L hlorovodonične kiseline (HCl) (110 μL). Hipurna kiselina (HA) se oslobađa iz HHL katalitičkom aktivnošću ACE, što je određeno pomoću tečne hromatografije na obrnutoj fazi pod visokim pritiskom (RP-HPLC). 20 μL rastvora je injektovano direktno na Zorbax Eclipse XDB-C18 kolonu (4,6 ID \times 150 mm, 5 μm , 80 Å) radi razdvajanja HA od HHL. Kolona je eluirana 50% metanolom i 0,1% trifluorosirćetnom kiselinom (u vodi), sa protokom 1 mL/min, na 22 °C. UV - detektor je bio podešen na talasnoj dužini od 228 nm. Na osnovu površine pikova izvršena je integracija i kvantitativno je određen sadržaj HA u uzorku. Vrednost ACE inhibicije je izračunata prema sledećoj formuli:

$$\text{ACE inhibitorna aktivnost (\%)} = \frac{(A - A_0) - (B - B_0)}{(A - A_0)} \quad (4)$$

gde je:

A – sadržaj HA u reakciji bez prisustva inhibitora (ekstrakta);

B - sadržaj HA sa potencijalnim inhibitorom (ekstraktom);

A_0 i B_0 - slepe probe A i B (gde je HCl bio dodat u uzorak pre rastvora enzima).

ACE inhibitorna aktivnost ekstrakata je izražena kao masa uzorka (u mg) potrebna za inhibiciju 50% ACE aktivnosti, u prethodno opisanim reakcionim uslovima.

3.7.11. Senzorna analiza prahova

Senzorna analiza je sprovedena kroz testove koji su se sastojali iz dva dela i predstavljaju evaluaciju senzorne percepcije suvih prahova *S. montana*, od strane volontera koji su dobrovoljno pristali da učestvuju u testu. U ispitivanje je bilo uključeno 50 pripadnica ženskog pola, starosti od 25 do 30 godina, nepušači.

U prvom delu ispitivanja, koji je sproveden po modifikovanoj proceduri opisanoj u studiji Sansone i sar. (2011), ispitanice su ocenjivale intezitet i prijatnost mirisa suvih ekstrakata (ekstrakt je bio struktuisan u liniji 15 cm dužine, 1 cm širine), ocenama od „ekstremno prijatno“ do „ekstremno neprijatno“. Pre početka ocenjivanja, volonterkama je omogućeno da pomirišu komercijalno dostupnu čajnu mešavinu (English breakfast, Twinings™, London), čiji je miris definisan kao prijatan i korišćen je kao kontrolna proba.

Drugi deo ispitivanja se odnosio na ocenu ukusa suvih ekstrakata. 100 mg suvog ekstrakta je rastvoreno u 100 mL hladne vode, i 30 mL uzorka pripremljenog na prethodno opisan način je testirano od strane volonterki. Volonterima je objašnjeno da ne gutaju rastvor, već da ga nakon probanja odmah ispljunu. Vodeni rastvori su ocenjivani sa: „veoma prijatan“, „prijatan“, „neprijatan“ i „ekstremno neprijatan ukus“.

3.8. *In vivo* ispitivanja antioksidantnih i citotoksičnih efekata ekstrakata *S. montana*

3.8.1. Eksperimentalne životinje

Postupak rada sa životinjama i svi eksperimentalni protokoli su sprovedeni u skladu sa Pravilnikom o radu i korišćenju laboratorijskih životinja koje uređuje Etička komisija pri Univerzitetu u Novom Sadu. U toku eksperimentalnog rada, za potrebe u okviru ovog istraživanja, korišćene su ženke miševa soja Hannover National Medicinal Institute (Hann: NMRI).

Eksperimentalne životinje su dobijene iz laboratorije Samostalnog odseka za biohemiju Instituta za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine (Novi Sad, Srbija). Životinje su čuvane pod strogo kontrolisanim uslovima (temperatura 25 °C, vlažnost vazduha 30-50%, režim svetlo/tama 12 h) u odgovarajućim kavezima i bez ograničenja pristupa hrani (LM2 sa 19% protein, Veterinarski zavod Subotica, Srbija) i vodi. Eksperimentalni deo *in vivo* istraživanja sproveden je na ženka miševa, starosti 6-8 nedelja, telesne mase 25 g ± 10%.

Eksperimenti su sprovedeni sa suvim ekstraktom *S. montana* (sušenim sa 10% maltodekstrina), rastvorenim u vodi i ekstraktom *S. montana* dobijenim superkritičnim CO₂ (uslovi ekstrakcije: 350 bar, 50 °C), rastvorenim u maslinovom ulju. U delu ispitivanja I korišćeni su ekstrakti koncentracije 1%, dok su u delu II ispitane dve koncentracije ekstrakata, 1 i 5%. Rastvori ekstrakata su čuvani na temperaturi do 4 °C. Pre aplikacije su zagrejani na temperaturu tela. Životinjama su jednokratno aplicirani ekstrakti intraperitonealno (i.p.), dok je kontrolnoj grupi apliciran fiziološki rastvor.

Postupak in vivo ispitivanja

I

Miševi soja NMRI su metodom slučajnog izbora podeljeni u grupe od po 6 jedinki i tretirani po sledećem protokolu (Ćebović, 2008):

Kontrolna grupa (CTRL) - životinje (n = 6) kojima je apliciran fiziološki rastvor (i.p.) (koncentracija 1 mL/kg telesne mase) tokom 7 dana;

Negativna kontrolna grupa - (CTRL + CCl₄) - životinje (n = 6) kojima je apliciran fiziološki rastvor (i.p.) (koncentracija 1 mL/kg telesne mase) tokom 7 dana; i rastvor CCl₄ (koncentracija 2 mL/kg telesne mase) sedmog dana, 24 h pre žrtvovanja;

Grupa SDE1 - životinje (n = 6) kojima je apliciran 1% vodeni rastvor suvog ekstrakta *S. montana* (i.p.), tokom 7 dana;

Grupa SFE1 - životinje (n = 6) kojima je apliciran 1% rastvor superkritičnog ekstrakta *S. montana* (i.p.), tokom 7 dana;

Grupa SDE1+CCl₄ - životinje (n = 6) tretirane sa 1% vodenim rastvorom suvog ekstrakta *S. montana* (i.p.), tokom 7 dana; i rastvor CCl₄ (koncentracija 2 mL/kg telesne mase) sedmog dana, 24 h pre žrtvovanja;

Grupa SFE1+CCl₄ - životinje (n = 6) tretirane sa uljanim rastvorom superkritičnog ekstrakta *S. montana* (i.p.) koncentracije 1%, tokom 7 dana; i rastvor CCl₄ (koncentracija 2 mL/kg telesne mase) sedmog dana, 24 h pre žrtvovanja.

Osmi dan, na kraju eksperimenta, životinje su nakon merenja anestezirane sa izofluranom i dekapitovane. Za potrebe biohemijskih analiza, uzorkovana je krv iz donje šuplje vene (*vena cava inferior*). Nakon uklanjanja žučne kese, uzorci jetre (1 g) su homogenizovani u TRIS-HCl/saharoznom medijumu (50 nM, 0,25 M, pH 7,4), 1:3, 4 °C, pomoću Potter-Elvehjem-ovog seta za homogenizaciju. Dobijeni homogenizat je potom centrifugiran na 3000 o/min 10 min i koncentracija proteina je utvrđena biuretskom metodom, primenom bovinog serum albumina kao standarda (Wood, 2012). Za svaki ispitivani ekstrakt, ponovljen je isti postupak.

II

Miševi soja NMRI podeljeni su slučajnim izborom u grupe od po 6 jedinki i tretirane su po sledećem protokolu (Ćebović, 2008):

Grupa EAC - životinje sa implantiranim ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAC) tretirane sa po 2 mL/kg fiziološkog rastvora, i.p. (n = 6)

Grupa PRETRETMAN – životinje pretretirane sa po 2 mL/kg ispitivanog ekstrakta, i.p. tokom 7 dana (n = 6)

Grupa TRETMAN – životinje su tretirane sa po 2 mL/kg ispitivanog ekstrakta, i.p., 7 dana, od dana implantacije EAC (n = 6)

Grupa POSTTRETMAN – životinje su postretirane sa po 2 mL/kg ispitivanog ekstrakta, i.p. tokom 7 dana, 7 dana nakon implantacije (n = 6).

Nakon 14 dana od dana implementacije EAC, sve životinje su žrtvovane i ascites je sakupljen za dalje biohemijske analize. Za svaki ispitivani ekstrakt, ponovljen je isti postupak.

3.8.2. Eksperimentalne metode u *in vivo* ispitivanjima

In vivo ispitivanje antioksidantnih svojstava ekstrakata *S. montana* podrazumevalo je praćenje vrednosti biohemijskih parametara (iz homogenizata jetre i hemolizata krvi) oksidativnog stresa i ispitivanje potencijalne hepatoprotektivne aktivnosti ekstrakata *S. montana*, nakon intoksikacije sa CCl_4 .

Primenom biohemijskih testova, određena je aktivnost nekoliko antioksidantnih enzima: ksantin oksidaze (XOD), katalaze (CAT), peroksidaze (Px), glutation peroksidaze (GSHPx), glutation reduktaze (GR), kao i sadržaja redukovanog glutationa (GSH) i intenziteta lipidne peroksidacije (LPx). Radi dobijanja podataka o potencijalnom hepatoprotektivnom efektu ispitivanih ekstrakata, određeni su parametri: aspartat transaminaza (AST), alanin transaminaza (ALT), bilirubin, sadržaj hidroksiprolina i DNK iz hepatocita.

Ksantin oksidaza (XOD). Sadržaj ksantin oksidaze (XOD) je određen spektrofotometrijskim postupkom merenja promene apsorbancije na 293 nm, pri transformaciji ksantina u mokraćnu kiselinu (Bergmayer, 1970).

U uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) zapremine 20-50 μL , dodato je 3 mL rastvora EDTA i ksantina (koncentracija 1 mol/L) u fosfatnom puferu (pH 7,5). Nakon određenog vremena reakcija je zaustavljena, a reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 min. Apsorbancija reakcionog proizvoda je izmerena na 293 nm. Rezultati su izračunati na osnovu specifičnog apsorpcionog koeficijenta mokraćne kiseline ($\epsilon = 1,2 \times 10^4 \text{ L/mol cm}$) i izraženi u nmol mokraćne kiseline koji nastaje tokom 1 min po 1 mg proteina homogenata jetre.

Katalaza (CAT). Sadržaj katalaze određen je primenom vodonik peroksida (H_2O_2) kao supstrata (Beers i Sizer, 1950). Uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) zapremine 20-50 μL , dodat je u 3 mL rastvora fosfatnog pufera (pH 7, koncentracija 0,05 mol/L), koji je prethodno pripremljen dodavanjem 0,075 mL 30% H_2O_2 i dopunjavanjem do 50 mL. Nakon toga reakcija je zaustavljena, a reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 min. Izmerena je apsorbancija na 240 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon = 4,36 \times 10^4 \text{ L/mol cm}$).

Peroksidaza (Px). Sadržaj peroksidaze (Px) određen je primenom vodonik peroksida kao supstrata (Simon i sar., 1974). Na uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) zapremine 20-50 μL dodato je 3 mL fosfatnog pufera (0,1 mol/L, pH 7), 50 μL rastvora gvajakola (0,02 mol/L) i 40 μL

rastvora vodonik peroksida (0,14 mL 30% H₂O₂ u 100 mL H₂O). Nakon toga reakcija je zaustavljena, a reakciona smeša centrifugirana je na 3000 o/min tokom 10 min. Merena je apsorbanca reakcionog proizvoda na 436 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon = 2,3 \times 10^4$ L/mol cm).

Glutation peroksidaza (GSHPx). Sadržaj glutacione peroksidaze (GSHPx) određen je primenom kumol hidroperoksida (α - dimetil-benzilhidroperoksid) kao supstrata (Chin, 1976).

Uzorak homogenata jetre (hemolizata krvi) zapremine 20-50 μ L i 0,75 mL TRIS/HCl pufer (0,05 mol/L, pH=7,6) su pomešani i termostatirani 10 min na 37 °C. Potom je dodato 0,1 mL rastvora GSH (koncentracija 0,0021 mol/L) i 0,1 mL metanolnog rastvora kumol hidroperoksida (1:200) i dobijena smeša je termostatirana 5 min na 37 °C. Za zaustavljanje reakcije dodat je 1 mL 20% rastvora TCA. Reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min tokom 10 min. Zatim je u 2 mL TRIS/HCl pufera pH 8,9 (pufer II) (koncentracije 0,4 mol/L), dodat 1 mL supernatanta i 0,1 mL rastvora DTNB (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeve kiseline) (0,02 g u 5 mL pufera II)). Merena je apsorbanca reakcionog proizvoda na 412 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon = 1,36 \times 10^4$ L/mol cm).

Glutation reduktaza (GR). Sadržaj glutacione reduktaze utvrđen je praćenjem enzimske reakcije redukcije oksidovanog glutaciona (GSSG) u prisustvu NADPH (Goldberg i Spooner, 1983).

Na uzorak homogenizata jetre (hemolizata krvi) od 20-50 μ L, dodato je 0,2 mL 2% rastvora GSSG, 0,3 mL rastvora NADPH (0,001 mol/L) i 2 mL fosfatnog pufera (pH=7,6). Reakcija je zaustavljena i reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min tokom 10 min. Apsorbanca nastalog proizvoda je merena na 340 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon = 6,22 \times 10^3$ L/mol cm).

Redukovani glutation (GSH). Sadržaj redukovanog glutaciona (GSH) je određen na osnovu sadržaja neproteinskih sulfhidrilnih ostataka pomoću Ellman-ovog reagensa (Beuthler, 1984).

Određivanje GSH u krvi: Uzorak hemolizata krvi zapremine 2 mL centrifugiran je sa 3 mL rastvora 4% sulfosalicilne kiseline tokom 10 min na 3000 o/min. Potom je supernatant pomešan sa Ellman-ovim reagensom u odnosu 1:4. Apsorbanca nastalog obojenog proizvoda je merena na 412 nm. Sadržaj GSH izračunat je iz molarnog apsorpcionog koeficijenta i preračunat na mL eritrocita preko hematokrita.

Određivanje GSH u homogenizatu jetre: Uzorak homogenizata jetre, zapremine 1 mL, centrifugiran je sa 2 mL rastvora 4% sulfosalicilne kiseline tokom 10 min na 3000 o/min. Potom je supernatant pomešan sa Ellman-ovim reagensom u odnosu 1:40. Apsorbanca nastalog obojenog proizvoda je merena na 412 nm. Sadržaj GSH izračunat je iz molarnog apsorpcionog koeficijenta i preračunat na masu (mg) proteina preko ukupnih proteina.

Određivanje koncentracije ukupnih proteina. Ukupni proteini određeni su biuretskom metodom (Wood, 2012). Na uzorak homogenata jetre zapremine 20 - 50 μ L, dodato je 3 mL rastvora biuretskog reagensa ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,15%; K, Na tartarat - 0,6%; rastvor KI - 0,1% u 0,85 mol/L NaOH i deoksiholat - 1,5%) i nakon 30 min merena je apsorbancija nastalog proizvoda na 540 nm. Sadržaj proteina je određen preko kalibracione krive dobijene merenjem apsorbance rastvorka različitih koncentracija albumina goveđeg seruma - BSA (5 - 50 mg/L).

Intenzitet lipidne peroksidacije (LPx). Intenzitet lipidne peroksidacije određen je spektrofotometrijski na osnovu reakcije tiobarbiturne kiseline (TBA) sa TBA-reaktivnim vrstama (TBARS) (Buege i Aust, 1978). Merena je oksidacija lipida ćelijskih membrana preko reakcije lipid-peroksidnih proizvoda nastalih u reakcionom sistemu malonilaldehida sa TBA.

Uzorak homogenizata jetre (hemolizata krvi) 20-50 μ L i 3 mL Činidle rastvora (3,75 g TBA, 15 g CCl_3COOH , 20,72 mL 37% HCl i jedna do dve kapi α -tokoferola na 1 L rastvora) su pomešani i smeša je potom zagrevana, 15 min na ključalom vodenom kupatilu. Nakon toga, rastvor je centrifugiran 10 min na 3000 o/min i apsorbanca supernatanta je merena na 535 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon = 1,56 \times 10^5$ L/mol cm).

Serumski parametri funkcije jetre - AST, ALT, bilirubin. Sadržaji serumske aspartat transaminaze i alanin transaminaze su određeni fotometrijski, merenjem količine nastalog hidrazona na 546 nm, po Reitmann-u i Wotton-u. Detaljan opis se može naći u Spasić i sar. (2000). Sadržaj bilirubina je određen fotometrijski, primenom reakcije sa dijazo reagensom. Detaljan opis metode se može naći u Kovačević i sar. (1994).

Određivanje hidroksiprolina. Koncentracija hidroksiprolina u jetri je određena prema Woessner-u (1961).

Određivanje sadržaja DNK hepatocita. Detaljan opis određivanja je dostupan u studiji Schulte-Hermann i sar. (1994).

3.8.3. *In vivo* ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata *S. montana* za ćelije Ehrlich-ovog ascitnog tumora

Određivanje broja tumorskih ćelija i ćelijske varijabilnosti. Ascites Ehrlich-ovog tumora je prenesen u rastvor Krebs-Ringer-ovog fosfatnog pufera (0 °C, pH 7,4). Dobijena suspenzija je potom podvrgnuta nizu centrifugiranja 4500 o/min (4 °C) i 12000 o/min (2,5 min) da bi se dobila gusta suspenzija ćelija (1:1). Nakon toga, određena je masa ćelija, kao i broj ćelija, koji je izražen kao broj ćelija/mm³ (brojanje vršeno u Neubauer-ovoj komori).

Vijabilnost ćelija je određena primenom tripan plavog (0,4% rastvor u Krebs-Ringer-ovom fosfatnom puferu), boje koja ne ulazi u intaktne ćelije, već boji oštećene ćelije. Rezultati su izraženi kao % oštećenih ćelija.

Biohemijske analize. Aktivnosti antioksidantnih enzima (XOD, CAT, Px, GSHPx, GR), količina GSH i intezitet LPx, određeni su u ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC) po procedurama koje su opisane u prethodnom poglavlju.

3.8.4. Statistička analiza

Rezultati dobijeni merenjem šest uzoraka, izraženi su kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Primenjen je Studentov t-test radi identifikacije statističkih razlika. Statistički značajnim su smatrane vrednosti $p \leq 0,05$. Za poređenje rezultata dobijenih za različite ekstrakte i različite koncentracije, korišćene su statističke metode jednofaktorske i dvofaktorske analize varijanse (ANOVA). Značajne statističke razlike su identifikovane primenom *Tuckey* i *Bonferroni* post-hoc testova.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Za istraživanje u ovoj disertaciji je korišćen nadzemni deo *S. montana*. U prvom delu ispitivanja, izvršena je karakterizacija polaznog materijala, u smislu ispitivanja sadržaja vlage, sadržaja etarskog ulja i stepena usitnjenosti droge. Primenjena je savremena metoda ekstrakcije (superkritična ekstrakcija ugljendioksidom) radi dobijanja ekstrakata rtanjskog čaja, i ispitan je uticaj temperature i pritiska (odnosno gustine ekstragensa) na prinos ekstrakcije i hemijski sastav ekstrakata. Potom je analiziran uticaj različitih predtretmana biljnog materijala na prinos, sastav i antioksidantnu aktivnost ekstrakata dobijenih superkritičnim ugljendioksidom.

Druga savremena metoda ekstrakcije koja je primenjena za dobijanje ekstrakata rtanjskog čaja je ekstrakcija subkritičnom vodom, uz variranje temperature i vremena ekstrakcije. Dobijeni ekstrakti su ispitani u odnosu na hemijski profil i antioksidantnu aktivnost. Radi utvrđivanja prednosti primene ove „zelene” ekstrakcione tehnologije, izvršena je i klasična metoda ekstrakcije (maceracija). Takođe, primenjena je klasična metoda ekstrakcije radi dobijanja tečnih ekstrakata koji su sušeni *spray drying* tehnologijom. Dobijeni suvi ekstrakti su fizičko-hemijski, farmakološki i senzorno okarakterisani. U drugom delu ispitivanja, sprovedena su *in vivo* istraživanja biološke aktivnosti odabranih ekstrakata *S. montana*, u smislu utvrđivanja potencijalnih antioksidantnih, hepatoprotektivnih i citotoksičnih svojstava ekstrakata.

4.1. Ispitivanje polaznog materijala

Mlevenjem suvog biljnog materijala (droge) i analizom prosejavanjem, određen je srednji prečnik čestica usitnjenog materijala, koji je iznosio 0,301 mm. U ispitivanom biljnom materijalu sadržaj vlage je iznosio $11,34 \pm 0,04\%$. Postupkom hidrodestilacije je određen sadržaj etarskog ulja u drogi koji iznosi 0,95% (V/m).

4.2. Hemijska analiza etarskog ulja *S. montana*

Etarsko ulje *S. montana* dobijeno oficinalnim postupkom hidrodestilacije je analizirano u odnosu na kvalitativni sastav i rezultati su dati u tabeli 7, dok je hromatogram prikazan u odeljku Prilog (P1.1.). Primenom GC/MS metode analize identifikovano je 20 komponenti u etarskom ulju

rtanjskog čaja, sa ukupnim udelom 98,65%. Najveći broj identifikovanih komponenti pripada grupi oksidovanih monoterpena (8 komponenti), sa relativnim udelom 78,70%. U okviru ove grupe se nalazi najzastupljenija komponenta etarskog ulja rtanjskog čaja - karvakrol, sa relativnim udelom 74,93%. U grupi monoterpenskih ugljovodonika najdominantnija komponenta je biološki prekursor karvakrola - *p*-cimen (9,99%), dok je *trans*-kariofilen najzastupljeniji seskviterpen (1,69%). Osim pomenutih, komponente koje su prisutne u etarskom ulju u relativnom udelu većem od 1% su γ -terpinen (4,66%) i borneol (1,68%). Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da ispitano etarsko ulje pripada fenolnom - karvakrol hemotipu.

Tabela 7. Rezultati GS/MS analize etarskog ulja *S. montana*

Komponenta	Relativni udeo (%)
<i>Monoterpenski ugljovodonici</i>	
Kamfen	0,20
β -Pinen	0,06
β -Mircen	0,49
α -Terpinen	0,82
γ -Terpinen	4,66
<i>p</i> -Cimen	9,99
<i>Oksidovani monoterpeni</i>	
Eukaliptol	0,39
<i>Trans</i> -sabinen	0,32
Linalool	0,68
Borneol	1,68
Terpinen 4-ol	0,50
α -Terpineol	0,10
Karvon	0,10
Karvakrol	74,93
<i>Seskviterpeni</i>	
<i>Trans</i> -kariofilen	1,69
α -Amorfen	0,24
β -Bisabolen	0,46
γ -Kadinen	0,20

δ-Kadinen	0,44
Kariofilen oksid	0,74
Udeo identifikovanih komponenti	98,65

Primenom GC/FID metode, utvrđen je kvantitativni sadržaj karvakrola u etarskom ulju *S. montana* koji iznosi 54,08 g/100 g, odnosno 54,08% (m/m), kao i sadržaj karvakrola u 100 g droge, to jest prinos destilacije (0,51 g/100 g droge).

Dobijeni rezultat kvantitativnog sadržaja karvakrola u ispitivanom uzorku je manji u odnosu na njegov relativni udeo određen GC/MS metodom. Razlike u primeni ove dve metode su detaljno opisane u radu Zeković i sar. (2015).

4.3. Ekstrakcija *S. montana* superkritičnim ugljendioksidom

4.3.1. Prinos ekstrakcije *S. montana* superkritičnim ugljendioksidom

Uticaj parametara superkritične ekstrakcije *S. montana* (pritiska i temperature) na prinos istraživani je u opsegu pritiska 100 - 350 bar (sa korakom od 25 bar između eksperimenata) i na tri temperature 40, 50 i 60 °C. U tabeli 8 su prikazani kumulativni prinosi ekstrakcija, nakon 4,5 h, pri konstantnom protoku CO₂, dok su grafički prikazi kinetike superkritičnih ekstrakcija na različitim pritiscima i tri temperature prikazani na slikama 10 - 12.

Ukupni prinos ekstrakcija je bio u opsegu 1,88 - 3,09; 1,54 - 4,04 i 0,97 - 4,30% (m/m), za ekstrakte dobijene pri različitim pritiscima i temperaturama 40, 50 i 60 °C, redom. Povećanjem pritiska od 100 do 350 bar, pri konstantnoj temperaturi (40 °C), što odgovara povećanju gustine CO₂ (od 628,7 do 934,9 kg/m³), postiže se 1,64 puta veći prinos ekstrakcije. Na temperaturi 60 °C sa povećanjem pritiska gustina CO₂ raste od 290 do 863,2 kg/m³, rezultujući povećanjem prinosa 4,43 puta. Najniži prinos ekstrakcije je zabeležen pri uslovima 100 bar i 60 °C, dok je najveći ostvaren pri 350 bar i 60 °C.

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima koji su zabeleženi u studiji Grosso i sar. (2009a) u kojoj se navodi prinos ekstrakcije *S. montana* 0,9 - 1,8%, pri korišćenju sličnih uslova procesa superkritične ekstrakcije (pritisk 90 i 100 bar; temperatura 40 i 50 °C).

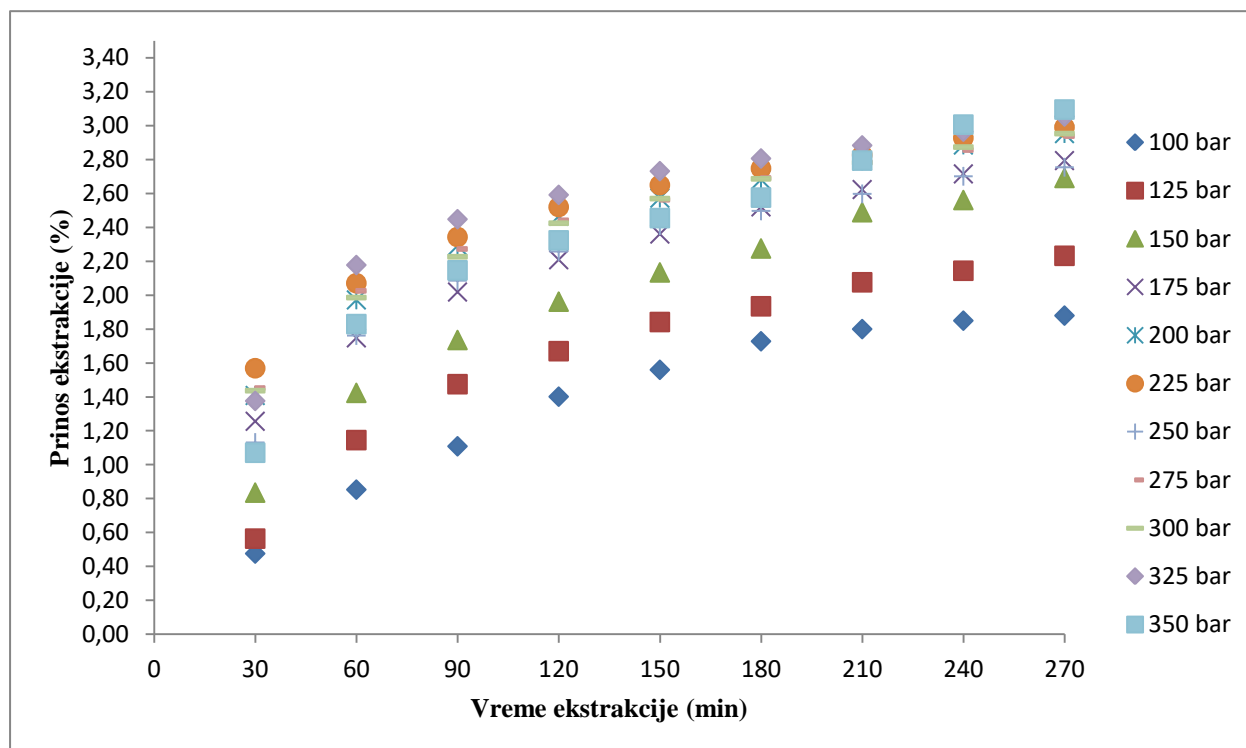
U odnosu na postupak hidrodestilacije, primenom superkričnog ugljendioksida najmanje gustine (100 bar/60 °C), postignut je približno isti prinos (0,97%). U svim ostalim ekstrahiranjama supekričnim ugljendioksidom, ostvaren je 1,62 - 4,53 puta veći prinos u odnosu na prinos destilacije.

Tabela 8. Prinos ekstrakcije *S. montana* superkričnim CO₂ (vreme ekstrakcije 4,5 h)

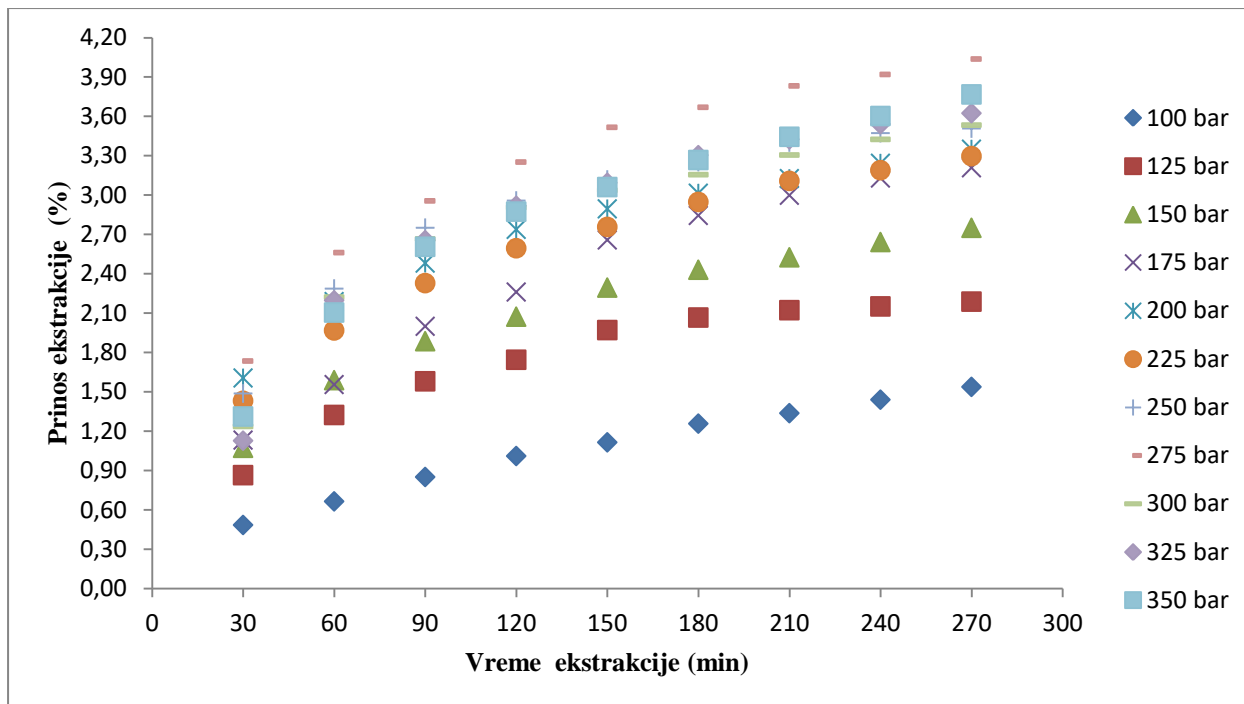
Pritisak (bar)	Temperatura (°C)	Gustina CO₂ (kg/m³)	Prinos ekstrakcije (g/100 g droge; %)
100	40	628,70	1,88
	50	384,40	1,54
	60	290,00	0,97
125	40	704,50	2,23
	50	542,10	2,19
	60	446,95	2,61
150	40	780,30	2,69
	50	699,80	2,75
	60	603,90	2,41
175	40	810,10	2,79
	50	742,10	3,21
	60	663,85	3,00
200	40	839,90	2,95
	50	784,40	3,35
	60	723,80	3,24
225	40	859,75	2,99
	50	809,40	3,30
	60	755,30	3,67
250	40	879,60	2,75
	50	834,40	3,51
	60	786,80	3,91
275	40	894,80	2,94
	50	852,50	4,04
	60	808,40	3,71

300	40	910,00	2,95
	50	870,60	3,53
	60	830,00	3,44
325	40	922,45	3,05
	50	885,00	3,62
	60	846,60	4,04
350	40	934,90	3,09
	50	899,40	3,77
	60	863,20	4,30

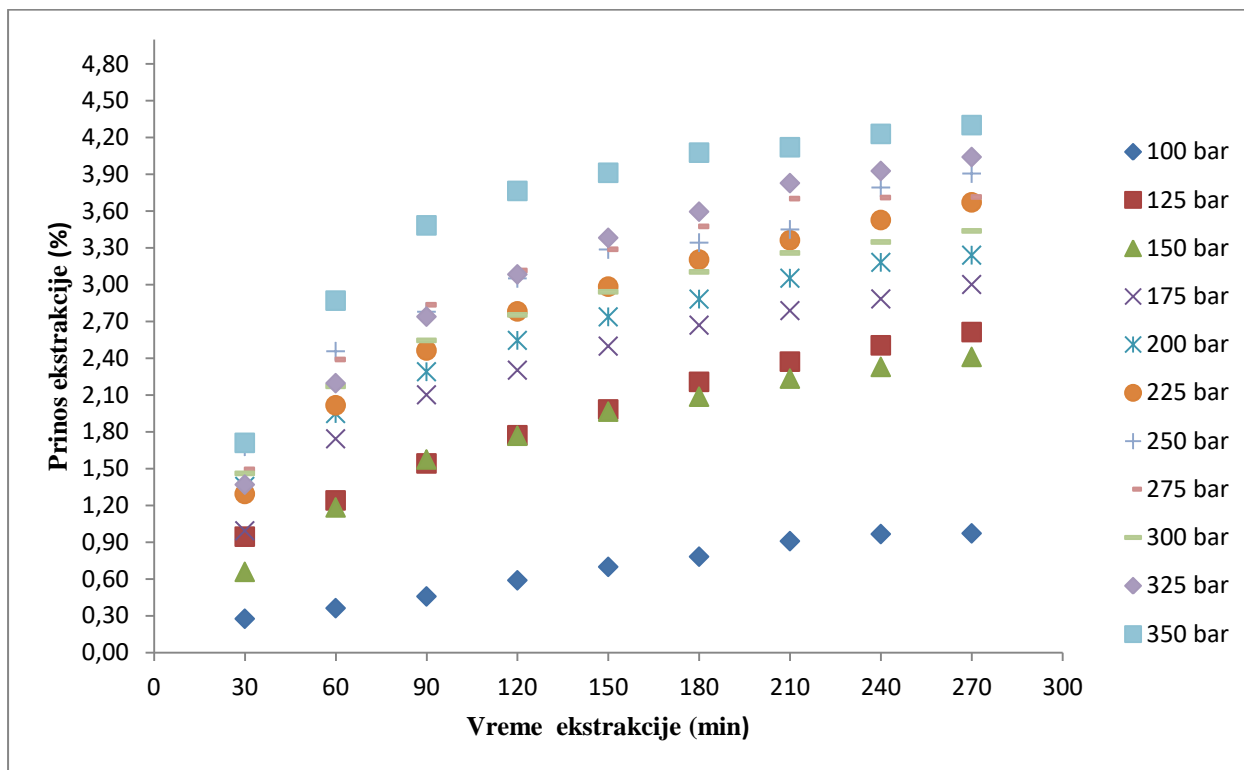
Iz rezultata prikazanih na slikama 11 - 13 mogu se zapaziti dva perioda ekstrakcije. Period brze ekstrakcije tokom koga su ekstrahovane komponente koje su lako rastvorljive u superkritičnom ugljendioksidu, i period spore ekstrakcije u kome se ekstrahuju komponente više tačke ključanja i veće molekulske mase, kao što su masna ulja, voskovi, pigmenti i dr. Može se uočiti da se povećanjem pritiska povećava prinos, što je u skladu sa konstatacijom da sa povećanjem gustine CO₂ raste i njegova solvaciona moć.



Slika 11. Kinetika ekstrakcije pri različitim pritiscima (temperatura 40 °C)



Slika 12. Kinetika ekstrakcije pri različitim pritiscima (temperatura 50 °C)



Slika 13. Kinetika ekstrakcije pri različitim pritiscima (temperatura 60 °C)

4.3.2. Hemijska analiza ekstrakata *S. montana*

U cilju utvrđivanja hemijskog profila ekstrakata *S. montana* dobijenih superkritičnim CO₂, primenjena je GC/MS metoda analize (tabele 9 - 11; Prilog: slike P1.2 - P.34.). U ispitivanim ekstraktima, utvrđeno je prisustvo 22 komponente. Procenat ukupnih identifikovanih komponenti je bio 90,00 - 95,83; 87,99 - 96,28; i 84,35 - 95,09%, za ekstrakte dobijene na različitim pritiscima i temperaturama 40, 50 i 60 °C, redom. Komponente identifikovane u ekstraktima mogu se razvrstati u grupe: monoterpeni ugljovodonici, oksidovani monoterpeni, seskviterpeni i alifatični ugljovodonici. U svim analiziranim ekstraktima dominantni su oksidovani monoterpeni sa relativnim udelima 59,98 - 83,46; 61,61 - 82,23, i 62,77 - 83,33%, za ekstrakte dobijene na različitim pritiscima i temperaturama 40, 50 i 60 °C, redom. U značajno nižim udelima su prisutne ostale grupe jedinjenja, pri različitim pritiscima: monoterpeni ugljovodonici (4,62 - 13,34; 4,04 - 11,08 i 3,83 - 9,85%, na temperaturama 40, 50 i 60 °C), seskviterpeni (4,99 - 8,28; 4,23 - 8,82 i 4,16 - 9,16%, na temperaturama 40, 50 i 60 °C) i alifatični ugljovodonici (0 - 10,86; 0 - 11,03 i 0 - 9,87%, na temperaturama 40, 50 i 60 °C).

Najdominantnija komponenta u svim dobijenim ekstraktima je bila karvakrol. Relativni sadržaj ovog monoterpena u ekstraktima dobijenim na različitim pritiscima i temperaturi 40 °C je iznosio 54,30 - 79,38%, u ekstraktima dobijenim na temperaturi 50 °C 55,87 - 78,61% i u ekstraktima dobijenim na 60 °C 57,09 - 79,61%.

U studijama koje su za cilj imale ispitivanje sastava superkritičnih ekstrakata *S. montana*, autori navode sadržaj karvakrola kao najzastupljenije komponente: 41,70 - 64,50% (Grosso i sar., 2009a); 52,70% (Silva i sar., 2009) i 53,00% (Coelho i sar., 2012). Imajući u vidu važnost karvakrola u pogledu njegovih mnogobrojnih bioloških efekata, značaj rezultata ostvarenih u ovoj studiji ogleda se u signifikantno većem relativnom udelu karvakrola u odnosu na navedene studije.

Druga dominantna komponenta u ekstraktima je *p*-cimen. Sadržaj ovog monoterpenkog ugljovodonika je bio u opsegu 3,64 - 10,24; 3,33 - 9,07 i 3,21 - 8,28%, u ekstraktima dobijenim na različitim pritiscima i temperaturama 40, 50 i 60 °C. Rezultati su u skladu sa sadržajem *p*-cimena u superkritičnim ekstraktima *S. montana*, publikovanim od strane drugih autora: 10,1% (Silva i sar., 2009) i 6,0 - 17,8% (Grosso i sar., 2009).

Komponente koje su detektovane u manjem procentu (ali većem od 1%) su borneol, *trans*-kariofilen, kariofilen oksid i γ -terpinen, dok su β -bisabolen, δ -kadinen, linalool i eukaliptol prisutni praktično u tragovima.

Za pojedine konstituente koji su detektovani u ekstraktima *S. montana* utvrđeni su biološki značajni efekti. Ustanovljeno je da *p*-cimen i γ -terpinen poseduju acetilholinesteraznu aktivnost (Miyazawa i Yamafuji, 2006; Silva i sar., 2009). Za α -terpinen, *p*-cimen, borneol i linalool je utvrđeno da ispoljavaju antioksidantnu aktivnost (Ruperto i Baratta, 2000; Vardar-Unlu i sar., 2003; Hussain i sar., 2008). Stoga, prisutnost komponenti koje su detektovane u značajno manjem udelu nije zanemarljiva, posebno imajući u vidu da ekstrakti predstavljaju kompleksne mešavine velikog broja komponenti. Biološki efekat ekstrakta može biti refleksija delovanja samo dominantne komponente ili svih komponenti, uključujući i one u malim koncentracijama (Bakkali i sar., 2008).

Tabela 9. Rezultati GC-MS analize *S. montana* ekstrakata (relativni udeo; %); temperatura ekstrakcije 40 °C

Komponenta	Pritisak (bar)										
	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325	350
Monoterpeni ugljovodoni											
β -Miracen	0,14	0,35	0,28	0,46	0,08	0,08	0,05	nd ^a	0,06	nd	nd
α -Terpinen	0,40	0,47	0,47	0,60	0,21	0,17	0,21	0,17	0,13	nd	0,21
γ -Terpinen	0,48	1,11	1,37	2,04	1,20	1,24	1,01	1,01	0,79	1,12	0,78
<i>p</i> -Cimen	7,13	7,83	8,79	10,24	5,00	5,33	4,77	4,34	3,64	5,08	4,23
<i>m</i> -Cimen	nd	nd	nd	nd	0,44	0,52	0,32	nd	nd	nd	nd
Oksidovani monoterpeni											
Eukaliptol	0,70	0,68	0,74	0,83	0,33	nd	nd	0,23	0,24	0,31	nd
<i>Trans</i> -sabinen hidrat	0,80	0,79	0,56	0,75	0,27	0,36	0,36	0,35	0,30	0,40	0,16
<i>Cis</i> -sabinen hidrat	0,26	0,29	0,33	0,25	0,12	0,16	0,16	0,19	0,19	0,24	0,19
Linalool	0,51	0,70	0,70	0,52	0,47	0,40	0,34	0,30	0,39	0,36	0,34
Borneol	2,42	2,00	1,99	2,14	1,34	1,29	1,42	1,29	1,44	1,52	1,42
Terpinen 4-ol	0,70	0,45	0,55	0,56	0,45	0,44	0,43	0,29	0,47	0,33	0,57
α -Terpineol	0,08	0,08	nd	nd	nd	0,08	0,08	0,16	0,18	0,17	nd
Karvon	0,82	0,87	1,01	0,63	0,69	0,85	0,54	nd	0,53	0,75	0,87
Karvakrol	67,58	60,70	57,43	54,30	71,34	72,69	73,21	77,36	76,67	79,38	76,10
Seskviterpeni											
<i>Trans</i> -kariofilen	2,80	2,45	2,79	2,92	2,03	2,04	2,26	2,10	1,97	2,06	2,08
α -Amorfen	0,55	0,60	0,67	0,66	0,32	0,37	0,43	0,38	0,31	0,37	0,36
β -Bisabolen	0,89	0,98	0,95	1,10	0,66	0,64	0,72	0,72	0,63	0,66	0,71
γ -Kadinen	0,59	0,57	0,61	0,68	0,39	0,35	0,42	0,45	0,44	0,39	0,33
δ -Kadinen	1,02	1,06	1,09	1,18	0,68	0,61	0,79	0,77	0,63	0,69	0,77
Kariofilen oksid	1,58	1,63	1,54	1,74	0,95	1,07	1,14	1,31	1,01	1,12	1,58
Alifatični ugljovodoni											
Heptakozan	0,59	1,51	1,66	1,94	0,95	0,97	0,89	nd	nd	nd	0,27
Nonakozan	2,74	7,29	8,84	8,92	7,20	5,77	6,32	nd	nd	nd	nd
Ukupno	92,77	92,40	92,39	92,44	95,10	95,43	95,83	91,41	90,00	94,93	90,96

^a nije detektovano

Tabela 10. Rezultati GC-MS analize *S. montana* ekstrakata (relativni udeo; %); temperatura ekstrakcije 50 °C

Komponenta	Pritisak (bar)										
	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325	350
Monoterpeni ugljovodoni											
β -Miracen	0,61	0,44	0,47	0,05	nd	nd	0,05	nd	0,11	0,08	nd
α -Terpinen	0,28	0,50	0,51	0,16	0,23	0,21	0,19	0,20	0,16	0,20	0,15
<i>p</i> -Cimen	5,17	9,07	8,85	3,33	5,14	4,69	4,77	5,24	4,73	4,97	3,96
γ -Terpinen	nd	0,83	1,25	0,50	1,20	0,99	0,67	0,90	0,89	0,90	0,80
<i>m</i> -Cimen	nd	nd	nd	nd	0,54	0,51	0,35	nd	nd	nd	nd
Oksidovani monoterpeni											
Eukaliptol	0,58	0,75	0,72	0,24	0,21	nd	nd	0,38	0,32	0,41	0,42
<i>Trans</i> -sabinen	0,71	0,67	0,62	0,24	0,26	0,24	0,22	0,21	0,22	0,29	0,33
<i>Cis</i> -sabinen hidrat	0,31	0,32	0,30	0,11	0,20	0,19	0,18	0,20	0,17	0,22	0,15
Linalool	0,80	0,82	0,69	0,29	0,37	0,36	0,43	0,32	0,30	0,40	0,29
Borneol	2,70	2,20	2,06	1,14	1,26	1,26	1,44	1,41	1,60	1,49	1,56
Terpinen 4-ol	0,92	0,79	0,64	0,33	0,31	0,30	0,53	0,54	0,68	0,43	0,84
α -Terpineol	0,05	0,18	0,22	0,09	nd	0,07	0,09	nd	0,07	0,10	nd
Karvon	1,77	0,90	0,49	0,89	0,27	0,67	1,02	0,50	0,51	0,60	nd
Karvakrol	65,55	57,43	55,87	69,06	69,91	68,85	73,31	74,67	74,80	78,29	78,61
Seskviterpeni											
<i>Trans</i> -kariofilen	3,19	2,76	2,65	1,56	2,31	2,21	2,16	2,11	2,22	2,32	2,40
α -Amorfen	0,62	0,57	0,62	0,26	0,38	0,36	0,33	0,34	0,39	0,43	0,46
β -Bisabolen	1,24	1,08	0,98	0,51	0,66	0,70	0,63	0,59	0,70	0,71	0,74
γ -Kadinen	0,63	0,63	0,53	0,30	0,32	0,34	0,32	0,47	0,45	0,40	0,53
δ -Kadinen	1,30	1,11	1,02	0,59	0,75	0,71	0,61	0,61	0,81	0,67	0,78
Kariofilen oksid	1,84	1,75	1,64	1,01	1,25	1,13	0,94	1,24	1,41	1,35	1,26
Alifatični ugljovodoni											
Heptakozan	0,51	1,09	2,02	0,44	0,81	0,95	0,90	nd	nd	nd	0,17
Nonakozan	2,05	5,25	9,01	6,92	9,65	5,20	7,14	nd	nd	nd	0,19
Ukupno	90,84	89,12	91,15	87,99	96,05	89,91	96,28	89,93	90,54	94,25	93,64

Tabela 11. Rezultati GC-MS analize *S. montana* ekstrakata (relativni udeo; %); temperatura ekstrakcije 60 °C

Komponenta	Pritisak (bar)										
	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325	350
Monoterpeni ugljovodoni											
β -Miracen	0,40	0,35	0,44	0,04	0,05	0,03	nd	nd	nd	nd	nd
α -Terpinen	0,21	0,41	0,44	0,17	0,18	0,12	0,10	0,24	nd	0,20	0,25
γ -Terpinen	nd	0,32	0,69	0,46	0,56	0,51	0,52	0,83	0,63	0,63	0,73
<i>p</i> -Cimen	3,68	7,71	8,28	4,01	5,01	3,95	3,21	5,47	3,37	4,96	5,02
<i>m</i> -Cimen	nd	nd	nd	0,41	0,60	0,29	nd	nd	nd	nd	nd
Oksigenovani monoterpeni											
Eukaliptol	0,55	0,65	0,63	0,28	nd	nd	0,17	0,36	nd	0,62	0,77
<i>Trans</i> -sabinen hidrat	0,95	0,48	0,72	0,28	0,27	0,11	0,33	0,25	0,43	0,31	0,27
<i>Cis</i> -sabinen hidrat	0,41	0,26	0,23	0,14	0,15	0,12	nd	0,14	0,26	0,23	0,15
Linalool	1,32	0,86	0,66	0,32	0,30	0,29	0,56	0,44	0,37	0,46	0,37
Borneol	3,12	2,27	1,86	1,25	1,38	1,25	1,44	1,59	1,52	1,75	1,56
Terpinen 4-ol	1,08	1,14	0,55	0,34	0,33	0,54	0,41	0,66	0,30	0,69	0,87
α -Terpineol	0,29	0,20	0,20	0,07	0,09	0,11	nd	0,10	0,15	nd	nd
Karvon	2,21	1,46	0,83	0,52	1,10	1,49	0,47	0,85	0,69	1,16	nd
Karvakrol	67,91	61,62	57,09	64,96	73,13	65,95	71,83	77,58	79,61	76,41	76,31
Seskviterpeni											
<i>Trans</i> -kariofilen	3,68	2,70	2,66	1,77	2,02	1,77	2,13	2,09	2,25	2,59	2,60
α -Amorfen	0,80	0,63	0,62	0,27	0,41	0,34	0,37	0,41	0,36	0,36	0,52
β -Bisabolen	1,37	1,08	0,95	0,52	0,63	0,515	0,61	0,66	0,73	0,68	0,75
γ -Kadinen		0,61	0,52	0,34	0,37	0,28	0,47	0,36	0,52	0,40	0,44
δ -Kadinen	1,48	1,16	1,06	0,53	0,71	0,52	0,63	0,61	0,85	0,67	0,67
Kariofilen oksid	1,83	1,66	1,58	0,73	0,95	0,95	1,10	1,01	1,38	1,44	1,29
Alifatični ugljovodoni											
Heptakozan	0,18	1,17	1,48	0,63	0,84	0,75	nd	nd	nd	nd	0,20
Nonakozan	0,66	4,77	8,39	7,33	6,03	4,99	nd	nd	nd	nd	0,25
Ukupno	92,10	91,51	89,86	85,36	95,09	84,88	84,35	93,65	93,40	93,56	93,02

U cilju utvrđivanja kvantitativnog sadržaja karvakrola kao dominantne komponente u ekstraktima, primenjena je GC/FID metoda. Prema rezultatima ove analize, sadržaj karvakrola je bio u opsegu 41,51 - 60,17% (g/100 g ekstrakta) za ekstrakte dobijene na različitim pritiscima i temperaturi 40 °C; 46,44 - 60,82% za ekstrakte na temperaturi 50 °C i 43,27 - 59,74% za ekstrakte na temperaturi 60 °C (tabela 12).

Najmanji sadržaj karvakrola je utvrđen u ekstraktu dobijenom na pritisku 150 bar i temperaturi 40 °C (gustina ugljendioksida 780,30 kg/m³), dok je najveći (60,82%) pri uslovima ekstrakcije 350 bar i 50 °C (gustina ugljendioksida 899,40 kg/m³). Vrednost veoma bliska prethodnoj je zabeležena i u nekoliko ekstrakata dobijenim na nižim pritiscima i temperaturama: 60,17% (300 bar, 40 °C); 60,02% (300 bar, 50 °C) i 59,74% (275 bar, 60 °C). Na nivou industrijske proizvodnje, ovo zapažanje može biti korisno zbog redukcije troškova proizvodnje i ukupne cene ekstrakata na tržištu, usled korišćenja nižih pritisaka i temperatura.

Tabela 12. GC/FID analiza karvakrola (% , g/100 g ekstrakta); temperatura 40, 50 i 60 °C

Temperatura (°C)	Pritisak (bar)										
	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325	350
40	52,97	52,60	41,51	45,42	57,20	55,25	56,13	52,87	60,17	52,56	55,72
50	50,36	49,70	47,63	55,35	51,99	46,44	52,60	59,10	60,02	51,81	60,82
60	59,14	56,49	52,94	55,49	55,46	43,27	52,05	59,74	58,63	59,50	55,88

Prinos ekstrakcije karvakrola se nalazi u intervalu 0,57 - 2,40 g/100 g droge (tabela 13). Uslovi procesa kojima se obezbeđuje ekstrakt sa najvećim i najmanjim sadržajem karvakrola, nisu isti kao oni kojima se ostvaruje najveći, odnosno najmanji prinos ekstrakcije karvakrola. Najveća količina karvakrola je ekstrahovana korišćenjem ugljendioksida na temperaturi 60 °C i pritiscima 325 i 350 bar, dok je najmanji prinos ekstrakcije karvakrola ostvaren pri uslovima 100 bar/60 °C, pri kojima se ostvaruje i najniži prinos ekstrakcije (0,97%). Može se uočiti da se primenom „blagih” uslova ekstrakcije (100 bar) ekstrahuje manja količina karvakrola, dok se korišćenjem ugljendioksida veće gustine ostvaruje veći prinos ekstrakcije, usled povećane rastvorljivosti karvakrola.

U poređenju sa postupkom hidrodestilacije (0,51 g/100 g droge), ugljendioksid u superkričnom stanju je ekstragens kojim se postiže i do 4,7 puta veći prinos ekstrakcije karvakrola iz polazne droge.

Tabela 13. Prinos ekstrakcije karvakrola (g/100 g droge)

Temperatura (°C)	Pritisak (bar)										
	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325	350
40	1,00	1,17	1,12	1,27	1,69	1,65	1,54	1,55	1,78	1,60	1,72
50	0,78	1,37	1,53	1,85	1,72	1,63	2,13	2,09	1,31	1,88	2,29
60	0,57	1,47	1,28	1,66	1,80	1,59	2,04	2,22	2,02	2,40	2,40

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je ekstrakcija superkričnim ugljendioksidom izuzetno efikasna metoda za dobijanje ekstrakata *S. montana* sa poboljšanim kvalitetom, u odnosu na konvencionalne metode. Podešavanjem uslova ekstrakcionog procesa (pritiska i temperature, odnosno gustine ekstragensa) može se menjati selektivnost samog ekstragensa i na taj način „podešavati” sastav ekstrakata.

4.4. Uticaj predtretmana biljnog materijala na proces ekstrakcije *S. montana* superkritičnim ugljendioksidom

4.4.1. Uticaj predtretmana biljnog materijala na prinos ekstrakcije

Predtretman herbalnog materijala može promeniti „pravac ekstrakcionog procesa“, obezbeđujući veći prinos ekstrakcije i/ili proizvodnju ekstrakata sa većom koncentracijom željenih komponenti, kao i unapređenim senzornim i biološkim karakteristikama.

Primena različitih predtretmana neposredno pre ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom i uticaj na sastav i svojstva ekstrakata istraživani su u nekoliko studija. Većina autora (Ivanović i sar., 2013; Crampon i sar., 2013) je primenjivala predtretmane u cilju razaranja strukture biljnih tkiva, kao što su: mehanički predtretman, brza dekompresija gasa, različiti načini sušenja, ultrazvučni predtretman, itd. U nekoliko studija je potvrđen pozitivan uticaj ultrazvučnog predtretmana na efikasnost superkritične ekstrakcije. Riera i sar. (2004) su utvrdili da primena ultrazvuka u predtretmanu može da poveća prinos superkritične ekstrakcije bademovog ulja za 20%. Takođe, autori navode da primena ultrazvuka doprinosi efikasnijoj ekstrakciji estara luteina (Gao i sar., 2009).

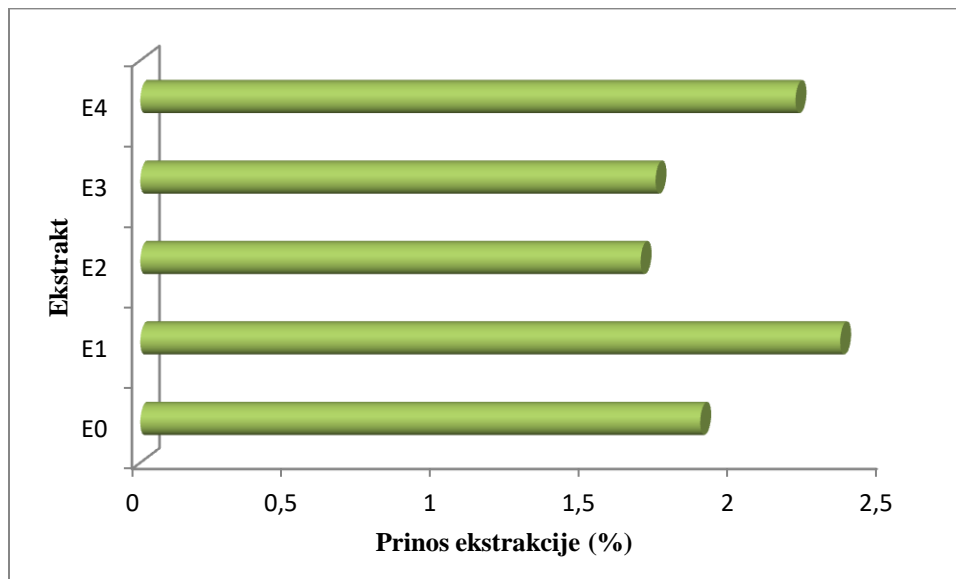
Pozitivan efekat na kinetiku ekstrakcije je zabeležen nakon predtretmana dekompresijom ugljendioksida, za pojedine biljne vrste iz porodice *Lamiaceae*, kao i koren valerijane, đumbira (Gaspar i sar., 2001; Stamenić i sar., 2010) i kantariona (Meyer i sar., 2012).

Dalje, prinos ekstrakcije i selektivnost superkritičnog CO₂ za određene komponente istraživani su u zavisnosti od sadržaja vlage u materijalu. Ustanovljeno je da prisustvo vlage u materijalu koji se ekstrahuje može uticati na ukupni prinos ekstrakcije. U različitim studijama efekat vlage na pomenute parametre znatno se razlikuje, usled različitog hemijskog sastava i/ili strukture herbalnog matriksa. Variranjem količine vlage može da se poboljša transfer mase rastvorka u rastvarač, pa je u nekim slučajevima ustanovljeno značajno poboljšanje ekstrakcije usled modifikacije osobina CO₂, dok neki autori navode negativan uticaj povećanog nivoa vlage na efikasnost ekstrakcije i sadržaj isparljivih komponenti (Goodrum i Kilgo, 1987; Eggers, 1996; Saldana i sar., 2000; Leeke i sar., 2002; He i sar., 2003; Yoda i sar., 2003; Balachandran i sar., 2006; Ivanović i sar., 2011). Navodi se da ukoliko je sadržaj vlage u materijalu između 3 i 12%,

efekat prisustva vlage na prenos mase i rastvorljivost ulja je zanemarljiv (Goodrum i Kilgo, 1996). Međutim, sa povećanjem sadržaja vlage na približno 25%, prinos ekstrakcije se značajno povećava (Balachandran i sar., 2006).

Sadržaj vlage u biljnom materijalu *S. montana*, pre primene predtretmana, iznosio je 11,34%. Nakon tretiranja vodom, povećao se na 42,71% (E1), dok je u materijalu tretiranom etanolom iznosio 16,09% (E4). U uzorcima koji su tretirani ultrazvučnim talasima i ugljendioksidom pod pritiskom, sadržaj vlage je ostao nepromenjen (E2 i E3). Posle odgovarajućeg predtretmana, herbalni materijal je podvrgnut ekstrakciji superkritičnim ugljendioksidom. Ekstrakcija koja je sprovedena pri istim uslovima (100 bar, 40 °C), ali bez primene predtretmana, koristi se kao kontrolna proba (E0).

Utvrđeni prinosi ekstrakcija se nalaze u opsegu 1,68 - 2,35% (m/m). Na slici 14 je dat grafički prikaz prinosa ekstrakcija *S. montana*.



Slika 14. Prinos ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom, uz predtretman biljnog materijala i kontrolne probe

Značajno veći prinos zabeležen je u slučaju ekstrakcija kada su bili primenjeni predtretmani vodom i etanolom (E1, E4) u odnosu na E0. Najveći ostvareni prinos (2,35%) je u korelaciji sa najvećim sadržajem vlage u materijalu. Poboljšana efikasnost ekstrakcije u slučaju predtretmana vodom (za 25%) i etanolom (za približno 17%) u skladu je sa rezultatima istraživanja publikovanim od strane drugih autora (Goodrum i Kilgo, 1987; Eggers, 1996; Balachandran i

sar., 2006) i potvrđuje pozitivnu korelaciju između prisustva vlage u materijalu i prinosa ekstrakcije.

Povećanje prinosa ekstrakcije sa povećanjem sadržaja vlage moguće je objasniti na dva načina: (1) rastvorljivost vode u superkritičnoj fazi doprinosi povećanju rastvorljivosti komponenti i (2) usled natapanja, dolazi do širenja biljnog tkiva čime se smanjuje otpor prenosu mase i posledično olakšava kretanje rastvorka (komponenti) ka površini čestica (Eggers, 1996; Balachandran i sar., 2006). Povećan prinos superkritične ekstrakcije droge koja je tretirana etanolom mogao bi biti objašnjen sinergističkim uticajem većeg sadržaja vlage (u odnosu na netretiranu drogu) i poboljšanom ekstrakcijom pojedinih komponenti usled prisustva etanola, kao što je i potvrđeno u studiji koju su sprovedi Tanaka i sar. (2004).

Voda i etanol spadaju u najprihvatljivije rastvarače za upotrebu u proizvodnji hrane i farmaceutskih proizvoda. Etanol, iako je prihvatljiv za ljudsku upotrebu, zapaljiv je, što limitira njegovu primenu u industrijskoj proizvodnji. S druge strane, voda nije zapaljiva, ne poseduje ukus i miris (Leeke i sar., 2002), u potpunosti je ekološki i fiziološki poželjan rastvarač. Takođe, imajući u vidu njenu dostupnost i cenu, dodavanje vode kao modifikatora ekstrakcionog procesa kojim se obezbeđuje produkcija sa povećanim prinosom, svakako je poželjan postupak.

Manje vrednosti prinosa E2 i E3 u odnosu na kontrolnu probu E0 ukazuju na negativan uticaj predtretmana visokim pritiskom i ultrazvučnim talasima na prinos superkritične ekstrakcije *S. montana*. Razlog ovakvog uticaja može biti potencijalna degradacija pojedinih komponenti izazvana ovim tretmanima.

4.4.2. Uticaj predtretmana biljnog materijala na hemijski sastav superkritičnih ekstrakata

Primenom GC/MS i GC/FID metoda ispitan je kvalitativni i kvantitativni sastav dobijenih ekstrakata. Rezultati GC-MS analize ekstrakata dati su u tabeli 14, dok su hromatogrami prikazani u odeljku Prilog (slike P2.1 - P2.4.).

Tabela 14. Rezultati GC-MS analize *S. montana* ekstrakata (relativni udeo; %)

Komponenta	E0	E1	E2	E3	E4
β -Mircen	0,138	nd	nd	nd	0,123
α -Terpinen	0,400	nd	0,094	nd	0,061
<i>p</i> -Cimen	7,126	nd	1,951	1,887	1,817
Eukaliptol	0,703	nd	0,408	0,342	0,153
γ -Terpinen	0,481	nd	0,082	0,065	0,043
<i>Trans</i> -sabinen hidrat	0,798	0,262	0,410	0,375	0,447
<i>Cis</i> -sabinen hidrat	0,264	0,171	0,199	0,185	nd
Linalool	0,514	0,339	0,385	0,274	0,617
Borneol	2,422	1,345	1,273	1,008	1,419
Terpinen 4-ol	0,695	0,399	0,545	0,416	0,374
α -Terpineol	0,078	nd	0,103	0,080	0,058
α -Terpinolen	nd	nd	nd	0,080	nd
Karvon	0,816	2,761	0,321	0,365	1,672
Karvakrol	67,581	78,950	82,121	86,292	82,279
<i>Trans</i> -kariofilen	2,796	1,924	1,997	1,958	1,818
α -Amorfen	0,554	0,329	0,343	0,335	0,28
β -Bisabolen	0,893	0,528	0,559	0,539	0,579
γ -Kadinen	0,586	0,533	0,403	0,317	0,310
δ -Kadinen	1,016	0,694	0,684	0,648	0,593
Kariofilen oksid	1,575	1,639	1,273	0,945	1,214
Heptakozan	0,594	0,435	0,306	0,246	0,476
Nonakozan	2,739	0,618	0,455	0,283	2,927

Najzastupljenija komponenta u svim ekstraktima je bila karvakrol, sa relativnim udelom od 67,58 do 86,29%. U svim uzorcima koji su tretirani pre ekstrakcije, postignut je veći sadržaj karvakrola u odnosu na sadržaj u netretiranom uzorku (E0). Najveći relativni udeo ovog monoterpenskog fenola je određen u ekstraktu dobijenom ekstrakcijom materijala koji je prethodno bio izložen ultrazvučnim talasima (E3). U ovom ekstraktu je sadržaj karvakrola za 27,69% veći u odnosu na kontrolu (E0), dok je drugim predtretmanima relativni udeo karvakrola uvećan za: 16,82% u E1, 21,51% u E2 i 21,75% u E4.

Iako je utvrđeno da se efikasnost ekstrakcije karvakrola povećava primenom predtretmana, zapaža se da predtretmani ne pogoduju ekstrakciji većini ostalih identifikovanih konstituenata ekstrakata. Sadržaj *p*-cimena u E0 iznosio je 7,13%, a primenom predtretmana vodom njegovo prisustvo nije detektovano, dok je u ostalim ekstraktima (E2, E3 i E4) sadržaj *p*-cimena značajno manji (3,65 - 3,92 puta). Takođe, u odnosu na netretiran uzorak, sadržaji borneola i *trans*-kariofilena su manji u svim ekstraktima (1,71 - 2,40 puta, odnosno 1,40 - 1,54 puta). Tretiranjem materijala pre ekstrakcije dobijeni su ekstrakti sa smanjenim relativnim udelom γ -terpinena, *trans*- i *cis*-sabinen hidrata, borneola, terpinen-4-ola, *trans*-kariofilena, α -amorfenona, β -bisabolena, γ - i δ -kadinena i heptakozana. Iako je predtretmanom vodom obezbeđen najveći prinos ekstrakcije, može se zaključiti da je prema prethodno nabrojanim komponentama ispoljen negativan uticaj, u smislu smanjenja selektivnosti CO₂ za ove komponente.

Nepolarni konstituenti ekstrakata (kao što su *p*-cimen i γ -terpinen) imaju malu rastvorljivost u vodi, stoga interakcijom sa vodom modifikovanim CO₂, nije ni očekivano povećanje selektivnosti za ove komponente. S druge strane, karvakrol važi za komponentu sa znatno nižom hidrofobnošću (na primer u odnosu na *p*-cimen), i čak se smatra da poseduje amfipatičku prirodu (Griffin i sar., 1999; Nostro i sar., 2009; Suntres i Alipour., 2016), pa su predtretmani kojima se povećava vlaga u materijalu uticali pozitivno na ekstrakciju ove komponente.

S obzirom da je u E1 manji broj detektovanih komponenti, može se konstatovati da je tretman vodom najznačajnije modifikovao solvacionu moć CO₂, što je dovelo do povećanja polarnosti rastvarača i komponenti koje nisu ekstrahovane ovim postupkom. Najverovatnije je da se povećanjem polarnosti CO₂ redukuje ekstrakcija nepolarnih komponenti, koje imaju slabu rastvorljivost u vodi, za razliku od oksidovanih komponenti čije funkcionalne grupe lakše stupaju u interakciju, što rezultuje njihovim povećanim prinosom (Leeke i sar., 2002).

Dalje, uzrok nižih sadržaja pojedinih komponenti u E2 i E3 može biti degradacija ovih komponenti uzrokovana ultrazvučnim talasima, kao i izlaganjem visokopritisnom CO₂, s obzirom da je u slučaju ova dva predtretmana ostvaren i manji prinos ekstrakcije u odnosu na prinos ekstrakcije bez predtretmana.

Tabela 15. Kvantitativna analiza i prinos ekstrakcije karvakrola

Ekstrakt	Sadržaj karvakrola (% m/m)	Prinos ekstrakcije (g/100 g droge)
E0	52,97	1,00
E1	57,03	1,34
E2	66,10	1,11
E3	66,46	1,15
E4	64,02	1,41

Za kvantitativnu analizu sadržaja karvakrola u *S. montana* superkritičnim ekstraktima, primenjena je GC/FID metoda i utvrđen je sadržaj u opsegu 52,97 - 66,46% (tabela 15). Kao i u slučaju GC/MS analize, može se zaključiti da su svi predtretmani pogodovali ekstrakciji karvakrola. Najveći sadržaj je bio u uzorku E3, dok je predtretman kojim je ostvareno najmanje povećanje efikasnosti ekstrakcije - predtretman vodom. Izlaganjem materijala ultrazvučnim talasima, kao i ugljendioksidu na visokom pritisku, neposredno pre ekstrakcije, prinos karvakrola je uvećan za približno 25%.

Iako je u ekstraktima E2 i E3 utvrđen najveći sadržaj karvakrola, najveći prinos ekstrakcije karvakrola iz 100 g droge postignut je primenom etanola i vode kao predtretmana. Primenom etanola postignuta je efikasnija ekstrakcija karvakrola za 41,43% u odnosu na E0, dok je u odnosu na predtretmane ugljendioksidom i ultrazvukom pospešena ekstrakcija za 22,50 i 26,83%. U odnosu na prinos karvakrola ostaren hidrodestilacijom (0,51 g/100 g droge), primena predtretmana je poboljšala ekstrakciju karvakrola iz droge 2,16 - 2,74 puta.

U pojedinim istraživanjima je potvrđeno da ultrazvučni talasi deluju povoljno, tj. moguće je na ovaj način povećati koncentraciju pojedinih komponenti u superkritičnim ekstraktima (Riera i sar., 2004; Luo i sar., 2007). Balachandran i sar. (2006) navode povećanje efikasnosti ekstrakcije i do 30%, uz predtretman ultrazvukom.

Povećana koncentracija karvakrola usled izlaganja materijala ugljendioksidu na visokom pritisku može se objasniti pojačanim prodiranjem rastvarača u unutrašnjost ćelija. Tačnije, tokom izlaganja ugljendioksidu pod visokim pritiskom, pored statičke ekstrakcije u okružujuću atmosferu, ugljendioksid prodire u biljni materijal i potencijalno razara ćelijske strukture unutar kojih je smešten karvakrol, omogućavajući efikasniju ekstrakciju (Meyer i sar., 2012).

Potreba za tretiranjem materijala pre ekstrakcije je opravdana zbog lokacije ulja u herbalnom materijalu. Kod većine aromatičnih biljaka iz porodice *Lamiaceae*, ulje je uglavnom smešteno unutar glandularnih struktura koje se razvijaju na površini listova. Prenos mase od i ka glandulama je izrazito ograničen zbog glandularnih zidova, koji bi trebali biti razoreni kako bi se obezbedila veća dostupnost rastvorka rastvaraču i postigao prihvatljiv stepen ekstrakcije (Žižović i sar., 2005; Damjanović-Vratnica i sar., 2016).

Nešto manja efikasnost ekstrakcije karvakrola u odnosu na E2 i E3, ali za oko 20% veća u odnosu na netretiran uzorak, postignuta je primenom predtretmana etanolom. Dodatkom etanola se može modifikovati moć rastvaranja ugljendioksidom i povećati selektivnost ekstrakcije karvakrola iz polaznog biljnog materijala (polazne droge).

Utvrdivanje postupka za povećanje efikasnosti ekstrakcije i produkciju ekstrakata *S. montana* sa povećanim sadržajem karvakrola od izuzetnog i višestrukog je značaja. Primena predtretmana poskupljuje proces, ali s obzirom na značajno povećanje sadržaja karvakrola, čini se ekonomski prihvatljivim. Posmatrano sa farmakološkog aspekta, usled brojnih delovanja koje karvakrol ispoljava, ovim postupcima je moguće povećati kvalitet ekstrakata. Takođe, imajući u vidu rasprostranjenu primenu karvakrola u kozmetičkom, prehrambenom i poljoprivrednom sektoru, ovi rezultati mogu biti izuzetno značajni.

4.4.3. Uticaj predtretmana biljnog materijala na antioksidantnu aktivnost superkritičnih ekstrakata

Antioksidantna aktivnost ekstrakata je izražena kao IC_{50} vrednost i dobijeni rezultati su u opsegu 11,9 - 25,2 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 16). Najmanja IC_{50} vrednost, to jest najveća antioksidantna aktivnost, izmerena je u ekstraktu koji je dobijen bez primene predtretmana. Antioksidantna aktivnost

ekstrakata opada redom $E0 > E3 > E2 > E4 > E1$. S obzirom na rezultate, može se zaključiti da predtretmani biljnog materijala redukuju antioksidantnu aktivnost ekstrakata *S. montana*.

Tabela 16. Antioksidantna aktivnost *S. montana* ekstrakata

Ekstrakt	IC ₅₀ vrednost (µg/mL)
E0	11,9 ± 0,002
E1	25,2 ± 0,001
E2	23,1 ± 0,003
E3	17,7 ± 0,0001
E4	24,5 ± 0,0003

Iako je karvakrol potvrđeni prirodni antioksidant, imajući u vidu rezultate DPPH testa, kao i kvalitativne i kvantitativne analize ispitivanih ekstrakata, može se pretpostaviti da karvakrol nije glavni nosilac antioksidantne aktivnosti u superkričnim ekstraktima *S. montana*. Ovo je potkrepljeno zapažanjem da ekstrakt sa najnižim udelom karvakrola (E0) ispoljava najjaču antioksidantnu aktivnost. Kao što je prikazano u prethodnom poglavlju, E0 sadrži najveći broj komponenti, kao i najveće sadržaje manje dominantnih komponenti, što je u korelaciji sa najvišom antioksidantnom aktivnošću. Ovakvi rezultati DPPH testa ukazuju na relevantnost teorije o sinergističkom delovanju svih komponenti prisutnih u ekstraktima.

Na osnovu raspoloživih podataka, to jest vrednosti IC₅₀ dobro poznatih antioksidanata, može se zaključiti da je antioksidantna aktivnost ekstrakta E0 veća u odnosu na vitamin C (16 µg/mL) i BHT (24 µg/mL) (Khitam i sar., 2013). Stoga, ekstrakti *S. montana* dobijeni superkričnom ekstrakcijom se mogu svrstati u jake prirodne antioksidante i biti razmotreni kao konstituenti različitih prehrambenih i farmaceutskih proizvoda.

Iako je predtretmanima smanjen antioksidantni kapacitet ekstrakata, njihove IC₅₀ vrednosti nisu zanemarljive. U poređenju sa vitaminom C, E3 je ispoljio približno sličnu aktivnost i veću u odnosu na BHT, dok je u preostala tri ekstrakta (E1, E2 i E4) IC₅₀ vrednost približna vrednosti za BHT. Stoga, iako predtretmani nisu adekvatan izbor za unapređenje antioksidantne aktivnosti ekstrakata, svi ekstrakti su pokazali značajan antioksidantni kapacitet i mogućnost za potencijalnu primenu kao prirodnih antioksidanata.

4.5. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Radi dobijanja ekstrakata *S. montana* primenjena je subkritična voda kao ekstragens, uz variranje parametara procesa - temperature (79,15 - 220,5 °C) i vremena ekstrakcije (5,9 - 34,1 min), pri konstatnom pritisku od 30 bar. Dobijeni ekstrakti su ispitani u odnosu na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, kao i antioksidantnu aktivnost. Utvrđeni su optimalni uslovi ekstrakcije kojima se obezbeđuje proizvodnja ekstrakta *S. montana* visokog kvaliteta u pogledu sadržaja polifenolnih komponenti i antioksidantnog delovanja. Takođe, radi utvrđivanja potencijalne prednosti primene ove savremene metode ekstrakcije, isti parametri kvaliteta ekstrakata (ukupni fenoli, flavonoidi i antioksidantna aktivnost) su utvrđeni i u ekstraktima dobijenim klasičnom metodom ekstrakcije smešom etanol-voda. Primenom GC/MS metode je analiziran sastav isparljive frakcije ekstrakata *S. montana* dobijenih subkritičnom vodom.

Rezultati ispitivanih promenljivih (sadržaj ukupnih fenola, sadržaj ukupnih flavonoida i antioksidantna aktivnost) u ekstraktima dobijenim pri različitim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom (temperatura i vreme ekstrakcije) dati su u tabeli 17.

Tabela 17. Centralno-kompozitni eksperimentalni dizajn sa prirodnim i kodiranim parametrima i eksperimentalno određenim vrednostima ispitivanih promenljivih (TP, TF i IC₅₀)

Ekstrakt	Nezavisne promenljive		Ispitivane promenljive		
	T (°C)	t (min)	TP* (g GAE/100 g)	TF** (g CE/100 g)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	100 (-1)	10 (-1)	8,22	5,49	3,61
2	200 (1)	10 (-1)	10,97	6,81	2,54
3	150 (0)	5,9 (-1,41)	10,58	6,82	4,27
4	100 (-1)	30 (1)	8,19	5,44	3,75
5	150 (0)	20 (0)	10,95	7,13	3,93
6	200 (1)	30 (1)	10,59	6,92	2,74
7	79,15 (-1,41)	20 (0)	8,68	5,23	3,26
8	150 (0)	20 (0)	11,45	6,96	3,57
9	220,5 (1,41)	20 (0)	10,44	6,25	2,48
10	150 (0)	34,1 (1,41)	11,41	6,66	3,71
11	150 (0)	20 (0)	11,82	6,69	3,52

*Sadržaj ukupnih fenola; **Sadržaj ukupnih flavonoida

Dobijeni eksperimentalni rezultati su uneti u polinomni model drugog reda i, korišćenjem metode najmanjih kvadrata, generisani su višestruki regresioni koeficijenti za sve zavisne promenljive. Pomoću ove metode dobijaju se najmanji mogući reziduali višestruke linearne regresije. Regresioni koeficijenti za svaku zavisnu promenljivu dati su u tabeli 18, dok su rezultati analize varijanse (ANOVA) dati u tabeli 19.

U modelima sa signifikantnim p -vrednostima ($p < 0,05$), visok regresioni koeficijent ukazuje na značajan uticaj nezavisnih na istraživane promenljive. U cilju potvrde adekvatnosti modela, prikazane su vrednosti nepoklapanja sa modelom (eng. *Lack of Fit*).

Tabela 18. Regresioni koeficijenti fitovanog polinoma drugog reda za TP, TF i IC₅₀ vrednost

Regresioni koeficijent	TP	TF	IC ₅₀
β_0	11,4109	6,9256	3,6731
Linearni			
β_1	0,9579*	0,5315*	-0,3991*
β_2	0,0948	-0,0207	-0,0551
Interakcija			
β_{12}	-0,0870	0,0394	0,0146
Kvadratni			
β_{11}	-1,1267*	-0,6140*	-0,4714*
β_{22}	-0,4065	-0,1113	0,0925

*Značajnost na nivou 0,05

Kod sve tri ispitivane zavisne promenljive utvrđena je statistička značajnost modela ($p < 0,05$), dok je vrednost nepoklapanja sa modelom u sva tri slučaja bila nesignifikantna, čime se potvrđuje adekvatnost slaganja eksperimentalnih podataka sa polinomnim modelom drugog reda. Koeficijent varijacije, koji predstavlja stepen disperzije podataka, u sva tri modela je niži od 10 (7,25; 4,08 i 9,50 za TP, TF i IC₅₀), što implicira dobru pogodnost i ponovljivost modela. Koeficijenti determinacije (R^2) za sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i IC₅₀ vrednost su 0,84, 0,93 i 0,85, što pokazuje da su eksperimentalni rezultati dobro reprezentovani jednačinom modela. Dobijeni podaci su iskorišćeni za dobijanje 3D grafika odzivne površine i eksperimentalnih modela.

Tabela 19. Analiza varijanse (ANOVA) za ispitivane modele, rezidualne i greške merenja

	Suma kvadrata	DF*	MS**	F-vrednost	p-vrednost
Sadržaj ukupnih fenola					
Model	14,57	5	2,91	5,23	0,0468
T	7,32	1	7,32	13,12	0,0152
t	0,07	1	0,07	0,13	0,7346
T × t	0,03	1	0,03	0,05	0,8249
T ²	7,11	1	7,11	12,75	0,0160
t ²	0,93	1	0,93	1,66	0,2540
Rezidual	2,79	5	0,56		
Nepoklapanje sa modelom	2,40	3	0,80	4,14	0,2006
Greška	0,39	2	0,19		
Cor Total	17,36	10			
Sadržaj ukupnih flavonoida					
Model	4,40	5	0,88	12,91	0,0070
T	2,25	1	2,25	33,04	0,0022
t	3,41 10 ⁻³	1	3,41 10 ⁻³	0,05	0,8319
T × t	6,21 10 ⁻³	1	6,21 10 ⁻³	0,09	0,7749
T ²	2,11	1	2,11	30,97	0,0026
t ²	0,07	1	0,07	1,02	0,3595
Rezidual	0,34	5	0,07		
Nepoklapanje sa modelom	0,24	3	0,08	1,67	0,3964
Greška	0,10	2	0,05		
Cor Total	4,74	10			
IC₅₀ vrednost					
Model	2,86	5	0,57	5,50	0,0424
T	1,27	1	1,27	12,20	0,0174
t	0,024	1	0,024	0,23	0,6498
T × t	8,57 10 ⁻⁴	1	8,57 10 ⁻⁴	8,23 10 ⁻³	0,9313
T ²	1,24	1	1,24	11,95	0,0181
t ²	0,048	1	0,048	0,46	0,5274
Rezidual	0,52	5	0,10		
Nepoklapanje sa modelom	0,42	3	0,14	2,83	0,2718
Greška	0,099	2	0,050		
Cor Total	3,38	10			

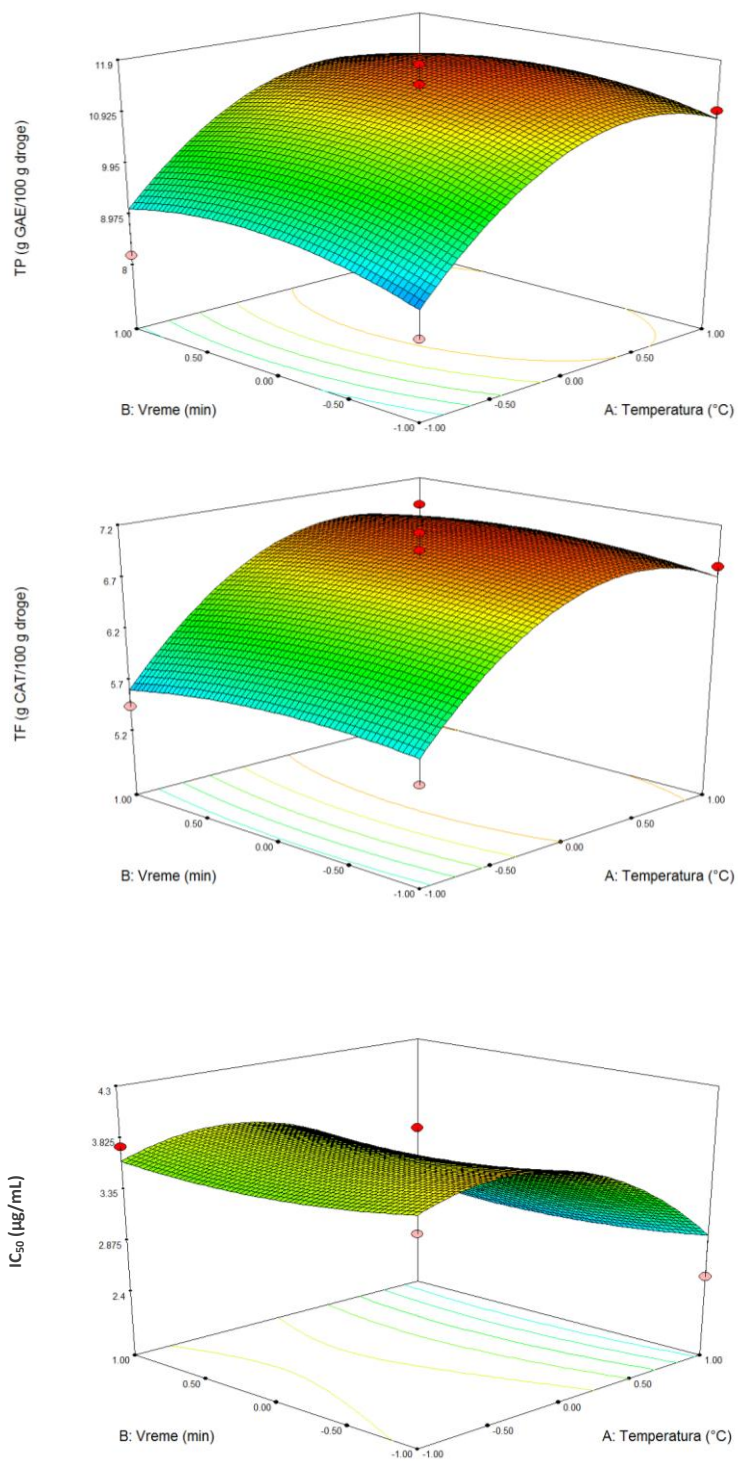
*broj stepeni slobode; **srednja vrednost kvadrata

4.5.1. Uticaj nezavisnih na zavisne promenljive

Vrednosti sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim subkritičnom vodom su u opsegu 8,19 - 11,82 g GAE/100 g droge. Značajan uticaj ($p < 0,05$) na sadržaj fenola ispoljili su linearni i kvadratni članovi temperature, s tim da je linearni pokazao pozitivan, dok je kvadratni član pokazao negativan uticaj na sadržaj fenola. Ostali parametri nisu imali statistički signifikantan efekat na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima. Matematički model koji opisuje ispitivani sistem je prikazan sledećom polinomnom jednačinom drugog reda:

$$TP = 11,4109 + 0,9579 X_1 - 1,1267 X_1^2 \quad (5)$$

Ekstrakcija fenolnih komponenti u velikoj meri zavisi od polarnosti rastvarača i samih komponenti, stoga ekstrakciona moć vode može biti ograničena relativno visokom dielektričnom konstantom na sobnoj temperaturi. Korišćenjem viših temperatura, dielektrična konstanta vode značajno opada. Uticaj temperature na rastvarač ogleda se kroz menjanje njegovih fizičkih osobina, kao što su viskoznost, dielektrična konstanta i površinski napon. Osim toga, temperatura može imati uticaj i na biljni materijal zbog mogućnosti povećanja masenog transfera kroz čvrstu fazu (Prasad i sar., 2011; Zeković i sar., 2014). Na slici 15a je prikazan uticaj temperature i vremena ekstrakcije na sadržaj fenola u ekstraktima, i evidentno je da vreme nema uticaj na istraživanu promenljivu. Dodatno, najveći sadržaj je zabeležen pri temperaturi 150 °C, bez obzira na vreme na ekstrakcije, dok se daljim povećanjem temperature redukuje sadržaj fenola u ekstraktima *S. montana*.



Slika 15. Odzivne površine: a) sadržaja ukupnih fenola, b) sadržaja ukupnih flavonoida i c) IC₅₀ vrednosti u funkciji temperature i vremena ekstrakcije

Eksperimentalno dobijene vrednosti sadržaja flavonoida u ekstraktima *S. montana* nalaze se u intervalu od 5,23 do 7,13 g CE/100 g droge. Na prinos ekstrakcije flavonoida vreme trajanja ekstrakcije nije pokazalo značajan uticaj, dok je temperatura ispoljila signifikantan efekat. Linearni i kvadratni članovi temperature su ispoljili signifikantan pozitivan, odnosno negativan uticaj na sadržaj flavonoida u ekstraktima. Najveći prinos je postignut ekstrakcijom na temperaturi 150 °C, bez obzira na vreme trajanja procesa. Imajući u vidu da su flavonoidi podgrupa fenola, slični uticaji parametara ekstrakcije na njihove sadržaje u ekstraktima nisu iznenađujući. Sadržaj flavonoida u ekstraktima u zavisnosti od parametara ekstrakcije je prikazan na slici 15b. Jednačina kojom je moguće predvideti prinos ekstrakcije flavonoida ima oblik:

$$TF = 6,9256 + 0,5315 X_1 - 0,6141 X_1^2 \quad (6)$$

U pogledu antioksidantne aktivnosti ekstrakata *S. montana*, linearni i kvadratni članovi temperature su, takođe, ispoljili uticaj, dok uticaji drugih članova nisu bili značajni:

$$IC_{50} = 3,67 - 0,3991 X_1 - 0,4714 X_1^2 \quad (7)$$

Uticaj procesnih parametara na antioksidantnu aktivnost ekstrakata je prikazan na slici 15c. Kao i u slučaju fenola i flavonoida, vreme ekstrakcije nije značajno uticalo ni na ovu ispitivanu promenljivu. Antioksidantna aktivnost, izražena kao IC_{50} vrednost, bila je u opsegu od 2,48 do 4,27 $\mu\text{g/mL}$. Najmanja vrednost IC_{50} , pa samim tim najveća antioksidantna aktivnost, izmerena je u ekstraktu dobijenom na temperaturi 220,5 °C. Dobijeni rezultati su u skladu sa publikovanim studijama drugih autora koji navode da je najveća antioksidantna aktivnost ekstrakata lišća origana zapažena upravo kod ekstrakata dobijenih na višim temperaturama ekstrakcije subkritičnom vodom (Rodríguez-Meizoso i sar., 2006). Kao jedna od prednosti primene subkritične vode navodi se da se usled povećanja temperature procesa povećava prisustvo antioksidantnih komponenti u ekstraktima, jer potencijalno dolazi do formiranja novih jedinjenja sa značajnim antioksidantnim kapacitetom (Rodríguez-Meizoso i sar., 2010). Generisanje novih bioaktivnih komponenti/antioksidanata tokom ekstrakcije, posredstvom reakcija karamelizacije, termooksidacije i Maillard-ove reakcije, može biti rezultat visokih temperatura procesa (Mustafa i Turner, 2011). Takođe, antioksidantni kapacitet novoformiranih komponenti tokom procesa ekstrakcije subkritičnom vodom, zavisi i od prirode materijala (Plaza i sar., 2010).

Iako su fenolna i flavonoidna jedinjenja poznati prirodni antioksidanti, nije zapažena korelacija između njihovog sadržaja i antioksidantne aktivnosti ekstrakata. U literaturi se navode različiti

rezultati, u zavisnosti od materijala, parametara ekstrakcije kao i metoda analize, pa u nekoliko studija takođe nije primećena korelacija između ovih promenljivih (Bocco i sar., 1998; Rodríguez-Meizoso i sar., 2006).

Prikazani rezultati ukazuju da je u procesu proizvodnje ekstrakata subkritičnom vodom temperatura glavni parametar za ekstrakciju fenola i flavonoida, kao i antioksidantnu aktivnost ekstrakata *S. montana*. Vreme ekstrakcije ne ispoljava značajan uticaj na ispitivane promenljive. Dominantan uticaj temperature procesa na efikasnost ekstrakcije fenolnih komponenti je zabeležen i u literaturi (Luthria, 2008; Aliakbarian i sar., 2012).

4.5.2. Optimizacija procesa ekstrakcije

Na osnovu prethodno prikazanih rezultata, sproveden je proces optimizacije radi pronalaženja parametara ekstrakcije kojima se obezbeđuje maksimalan kvalitet ekstrakta, u pogledu sva tri odgovora istovremeno. Primenom funkcije poželjnosti (eng. *Desirability Function*), ustanovljeni su optimalni uslovi procesa - temperatura 200 °C i vreme ekstrakcije 20,8 min, uz pritisak 30 bar. Matematički model predviđa da će primenom ovih uslova ekstrakcije, vrednosti ispitivanih promenljivih biti: sadržaj fenola 11,24 g GAE/100 g, sadržaj flavonoida 6,84 g CE/100 g i IC₅₀ vrednost 2,8 µg/mL. Ovi teorijski pretpostavljeni rezultati su eksperimentalno potvrđeni sa odstupanjem ± 5%.

Primenom optimalnih ulaznih parametara proizvodnja ekstrakata *S. montana* sa visokim nivoom polifenolnih komponenti i niskom IC₅₀ vrednošću može biti postignuta za kratko vreme, što značajno povećava ekonomičnost celog procesa.

4.5.3. Hemijski sastav isparljive frakcije ekstrakata *S. montana* dobijenih subkritičnom vodom

Subkritična voda je rastvarač pomoću kog je podešavanjem parametara procesa, to jest njene dielektrične konstante, moguće ekstrahovati osim hidrofilnih i lipofilne komponente. U prethodnom delu je utvrđeno da je ekstrakcija subkritičnom vodom efikasna metoda za dobijanje ekstrakata *S. montana* bogatih polifenolnim komponentama i visoke antioksidantne aktivnosti.

U cilju utvrđivanja hemijskog profila ekstrakata u pogledu lipofilnih komponenti, to jest isparljive frakcije ekstrakata *S. montana* dobijenih subkritičnom vodom, primenjena je GC/MS analiza (tabela 20; Prilog: slike P3.1-P3.10). Dominantna komponenta isparljive frakcije u svim ekstraktima je bila karvakrol, u intervalu 14,68 - 25,49 mg/100 g. Imajući u vidu značajno veći sadržaj karvakrola u ekstraktima dobijenim superkritičnim ugljendioksidom (poglavlje 3.3.2.), može se konstatovati da je ekstrakcija supekritičnim ugljendioksidom znatno efikasnija i adekvatnija metoda za dobijanje ekstrakata *S. montana* bogatih karvakrolom.

Ekstrakt u kom je utvrđen najveći sadržaj karvakrola (25,49 mg/100 g) je dobijen pri uslovima 100 °C/10 min. Sa povećanjem temperature subkritične vode do 150 °C, sličan prinos karvakrola je postignut za 5,9 min (25,27 mg/100 g), dok je sa daljim povećanjem temperature zapaženo da se koncentracija karvakrola u ekstraktima smanjuje.

Ovakav uticaj temperature je u skladu sa studijama u kojima se potvrđuje da se korišćenjem nižih temperatura procesa obezbeđuje veći prinos karvakrola u ekstraktima. U studiji Kubatova i sar. (2001) vršena je ekstrakcija subkritičnom vodom (temperature 100, 150 i 175 °C) biljne vrste *S. hortensis*, koja pripada istom genusu kao i *S. montana*. Utvrđeno je da se najveći sadržaj karvakrola postiže ekstrakcijom pri uslovima 100 °C u vremenu od 40 min. U drugoj studiji, gde su autori ispitivali ekstrakciju biljne vrste bogate karvakrolom - *Thymbra spicata*, takođe je potvrđeno da se sadržaj karvakrola u ekstraktima redukuje sa povećanjem temperature procesa (Ozel i sar., 2003).

U prethodno pomenutoj studiji (Kubatova i sar., 2001) konstatovano je da se korišćenjem subkritične vode na temperaturi 100 °C za 20 min ekstrakcije postiže značajan sadržaj karvakrola u ekstraktima, i da sa daljim produženjem ekstrakcije (na 40 min) dolazi do porasta i dostizanja njegovog maksimalnog sadržaja. Ovo zapažanje nije u skladu sa rezultatima ovog istraživanja, s obzirom da povećanjem vremena ekstrakcije sa 10 na 30 min pri konstatnoj temperaturi 100 °C, sadržaj karvakrola opada za 11,92%. Stoga, može se zaključiti da duže vreme ekstrakcije ne pogoduje ekstrakciji ovog monoterpena, što se može i dodatno podupreti kroz poređenje sadržaja karvakrola u ekstraktima dobijenim na 150 °C, pri trajanju ekstrakcija 5,9 i 20 min. S obzirom da produženo vreme izlaganja visokoj temperaturi smanjuje stabilnost terpena (Yang i sar., 2007), razlog za redukciju sadržaja karvakrola sa produženim vremenom ekstrakcije može biti potencijalna degradacija.

Smanjenje dužine vremena ekstrakcije, osim uštede vremena ima uticaj i na smanjenje utroška energije, što zajedno redukuje troškove celog procesa. Stoga je ovaj rezultat relevantan podatak za proizvodnju ekstrakata *S. montana* na industrijskom nivou. Sličan uticaj parametara ekstrakcije ustanovljen je i za borneol - niži prinos se ostvaruje sa povećanjem temperature i vremena ekstrakcije.

U nekoliko studija koje su za cilj imale ispitivanje hemijskog sastava etarskih ulja i/ili ekstrakata *S. montana*, zabeleženo je prisustvo oksigenovanog monoterpena timokinona (Radonić i Miloš, 2003; Mastelić i Jerković, 2003; Prieto i sar., 2007; Čavar i sar., 2008; Grosso i sar., 2009a; Taborsky i sar., 2012; Čavar i sar., 2013; Damjanović-Vratnica i sar., 2016). U literaturi su prisutne značajne varijacije u pogledu prisustva i sadržaja timokinona u etarskim uljima i ekstraktima *S. montana*. Razlog pomenutih varijacija su različite faze razvoja i geografsko stanište biljne vrste, kao i primenjene ekstrakcione tehnologije (Mastelić i Jerković, 2003).

Na osnovu rezultata prikazanih u okviru poglavlja 3.2, 3.3 i 3.4, evidentno je da u ekstraktima *S. montana* dobijenim superkritičnim ugljendioksidom nije zabeleženo prisustvo timokinona, kao ni u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom superkritičnim ugljendioksidom uz prethodnu primenu predtretmana. Takođe, timokinon nije bio prisutan ni u etarskom ulju dobijenom hidrodestilacijom. Međutim, primenom subkritične vode, u ekstraktima je detektovan timokinon u intervalu 0,648 - 3,327 mg/100 g. Imajući u vidu mnogobrojne zdravstvene benefite timokinona, kao što su: antitumorska, antioksidantna, antiinflamacijska aktivnost, potom neuroprotektivna uloga u Alchajmerovoj bolesti i ishemiji mozga (Gali-Muhtasib i sar., 2006), ovaj rezultat naglašava prednost upotrebe subkritične vode nad superkritičnim ugljendioksidom, u pogledu mogućnosti ekstrakcije ove komponente, odnosno njenim prisustvom u dobijenom ekstraktu.

U studiji Kubatova i sar. (2001) je zaključeno da je ekstrakcija subkritičnom vodom znatno efikasnija tehnika izolacije timokinona, kojom se ostvaruju 20 puta veći sadržaji u ekstraktima, u odnosu na hidrodestilaciju. U istoj studiji, autori navode da je veći sadržaj timokinona utvrđen u ekstraktima dobijenim na nižoj temperaturi i smanjuje se sa povećanjem temperature. Ovo zapažanje je u suprotnosti sa rezultatima ove studije, s obzirom da je najveći sadržaj timokinona utvrđen u ekstraktu dobijenom na temperaturi 220 °C (20 min), dok je drugi najveći sadržaj zabeležen u ekstraktu dobijenom pri uslovima 200 °C/30 min. Takođe, imajući u vidu da se

prinos timokinona povećao 2,4 puta u ekstraktu dobijenom na 200 °C/30 min u poređenju sa ekstraktom dobijenim na istoj temperaturi, ali za vreme od 10 min, može se zaključiti da produženo izlaganje visokim temperaturama pogoduje ekstrakciji timokinona. Stoga, najveći sadržaji timokinona u ekstraktu se postižu korišćenjem više, dok se najveći sadržaji karvakrola postižu korišćenjem niže temperature. Dodatno, vreme ekstrakcije pokazuje pozitivan uticaj na ekstrakciju timokinona, dok na ekstrakciju karvakrola ima negativan.

Uzimajući u obzir da se karvakrol i njegov izomer timol mogu transformisati oksidacionim reakcijama u vrednije produkte (Jukić i Miloš, 2005; Günes i sar., 2006) kao što je timokinon, a imajući u vidu da primenom superkritičnog ugljendioksida timokinon nije detektovan, objašnjenje može biti da timokinon nije bio prisutan u biljnom materijalu i formirao se tokom ekstrakcije subkritičnom vodom.

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da se povećanjem temperature, povećava konverzija karvakrola, što dalje dovodi do porasta sadržaja timokinona. Utvrđeno je da postoji korelacija između sadržaja timokinona i antioksidantne aktivnosti ekstrakata, stoga je moguće da je ova komponenta, koja poseduje značajna potvrđena antioksidantna svojstva, glavni nosilac antioksidantne aktivnosti ekstrakata.

Druge komponente karakteristične za ovu biljnu vrstu koje su detektovane u subkritičnim ekstraktima *S. montana* u malim koncentracijama su eukaliptol, *p*-cimen i kamfor. Linalool, koji je uobičajeno prisutna komponenta, nije detektovan, dok su *cis*- i *trans*-linalool oksidi, koji predstavljaju proizvode oksidativne ciklizacije linaloola na visokim temperaturama, prisutni. Takođe, u ekstraktima je detektovano prisustvo furfurala i metilfurfurala, furanoidnih komponenti koje se formiraju u neenzimskim reakcijama tokom termičkih tretmana (Ramírez-Jiménez i sar., 2000) i često su prisutne u proizvodima biljnog porekla. Lipidni degradacioni proizvod, 1-okten-3-ol, široko je rasprostranjen u gljivama i biljkama, pa se na taj način može objasniti njegovo prisustvo u ekstraktima. Detektovane komponente kao što su alkoholi, aldehidi, aromatična i alifatična jedinjenja, nisu karakteristične za *S. montana*, ali moguće je da su formirane kao degradacioni proizvodi tokom ekstrakcije subkritičnom vodom.

Može se zapaziti da promena temperature dovodi do značajnih varijacija u hemijskom profilu ekstrakata. Veći broj komponenti je ekstrahovan kada je temperatura povećana (200 i 220,1 °C), usled povećanja njihove rastvorljivosti.

Utvrđeno prisustvo timokinona u ekstraktima *S. montana*, zbog njegove mogućnosti upotrebe u medicinske svrhe, predstavlja rezultat od izuzetne važnosti i implicira da vrednost *S. montana* ekstrakata može biti značajno povećana korišćenjem subkritične vode za ekstrakciju. Variranjem parametara ekstrakcije moguće je „podesiti” željeni sastav ekstrakata, to jest proizvoditi ekstrakt *S. montana* sa visokom koncentracijom polifenolnih komponenti, uz prisustvo biološki značajnih lipofilnih komponenti (karvakrola i timokinona), uz istovremeno ispunjavanje koncepta „zelenih” ekstrakcija. Ovakav zaključak jasno ukazuje na potrebu i opravdanost šire implementacije ove tehnologije u proizvodne industrijske procese. Takođe, s obzirom na značajan farmakološki profil karvakrola i timokinona, može se reći da je kroz ovaj deo istraživanja naglašen značaj *S. montana* ekstrakata kao proizvoda sa potencijalnom primenom u formi funkcionalne hrane ili dodataka ishrani.

Tabela 20. GC/MS analiza ekstrakata *S. montana* dobijenih subkritičnom vodom (mg/100 g)

Komponenta	Uzorak										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2-Metilbutanal	-	0,468	-	-	-	0,708	-	-	1,954	-	-
2-Metil-2-butenal	-	0,154	-	-	-	0,281	-	-	0,569	-	-
Ciklopentanon	-	-	-	-	-	-	-	-	0,293	-	-
3-Furaldehid	-	13,257	0,921	-	-	-	-	-	-	4,308	-
Furfural	-	-	-	-	2,226	10,520	-	2,245	5,611	-	3,091
2-Metilciklopentanon	-	-	-	-	-	-	-	-	0,104	-	-
(R)-(+)-3-Metilciklopentanon	-	-	-	-	-	-	-	-	0,135	-	-
3-Heksen-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,692	-	-
2-Acetilfuran	-	0,671	-	-	0,076	0,901	-	0,076	1,131	0,145	0,107
Etilpirazin	-	0,125	-	-	-	0,152	-	-	0,290	-	-
5-Metilfurfural	-	8,576	0,330	-	1,214	7,123	0,084	1,173	4,350	2,660	1,936
Benzaldehid	-	0,198	-	-	-	0,306	-	-	0,497	0,092	-
Fenol	-	0,160	-	-	-	0,365	-	-	0,787	-	-
1-Okten-3-ol	0,854	0,348	0,674	0,190	0,392	0,303	0,772	0,606	0,371	0,556	0,489
2,3-Dimetil-2-ciklopenten-1-on	-	-	-	-	-	-	-	-	0,573	-	-
2-Etil-5-metilpirazin	-	-	-	-	-	0,077	-	-	0,214	-	-
Benzen, 2-etil-1,4-dimetil	-	-	-	0,037	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cimen	0,045	-	-	-	-	-	0,063	-	-	-	-
2-Acetil-5-metilfuran	-	-	-	-	-	0,069	-	-	-	-	-
2,3-Dimetil-2-ciklopenten-1-on	-	0,109	-	-	-	0,212	-	-	0,429	-	-

Eukaliptol	0,272	0,077	0,157	-	0,084	0,096	0,232	0,156	0,105	0,146	0,073
2-Metoksi-6-metilpirazin	-	-	-	-	-	-	-	-	0,314	-	-
<i>cis</i> -Ocimen	-	-	0,263	0,524	-	-	-	0,138	-	0,122	0,089
2-Metilfenol	-	-	-	-	-	0,163	-	-	0,279	-	-
4-Metilfenol	-	0,063	-	-	-	0,114	-	-	0,240	-	-
Acetofenon	-	-	-	-	-	-	-	-	0,044	-	-
<i>cis</i> -Linalool oksid	0,086	0,071	-	0,053	-	0,098	0,054	-	-	-	-
<i>trans</i> -Linalool oksid	0,076	-	-	0,056	0,040	-	-	-	-	0,045	-
2-Metoksifenol	-	0,152	-	-	-	0,577	-	-	1,242	-	-
2-p-Tolil-1-propen	-	-	0,047	0,054	0,035	-	0,041	-	-	-	-
Kamfor	0,052	0,055	-	-	0,032	0,047	-	-	0,086	-	-
Borneol	4,348	1,794	3,389	3,041	2,683	1,767	4,072	3,099	2,085	2,819	2,923
Timokinon	0,651	1,394	0,764	0,648	0,730	3,036	0,953	0,899	3,327	1,404	0,820
Karvakrol	25,487	14,676	25,266	22,450	19,453	14,677	21,276	23,512	19,474	23,116	22,507
Σ Ukupno	35,964	47,894	34,195	29,024	29,394	47,051	31,036	33,892	60,551	37,096	33,649

4.5.4. Poređenje ekstrakcije subkritičnom vodom i konvencionalne ekstrakcije

Da bi se evaluirala prednost upotrebe subkritične vode za ekstrakciju *S. montana*, sprovedena je konvencionalna metoda ekstrakcije sa variranjem temperature ekstrakcije i koncentracije ekstragensa (smeša voda/etanol), pri konstatnom vremenu ekstrakcije od 120 min. U dobijenim ekstraktima su ispitani isti parametri kao i u ekstraktima dobijenim subkritičnom vodom - sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidantna aktivnost. Etanol se smatra adekvatnim ekstragensom polarnih komponenti i veoma je često korišćen rastvarač prilikom klasičnih ekstrakcija. Mešanjem sa vodom u različitim odnosima, dielektrična konstanta se menja omogućavajući primenu ovakvih smeša za ekstrakciju velikog broja supstanci iz biljnog materijala (Lepojević, 2000).

Primenom različitih temperatura i koncentracija ekstragensa dobijeni su ekstrakti, a u njima je određen ukupni sadržaj fenola (3,91 - 7,18 g GAE/100 g), ukupnih flavonoida (3,22 - 6,25 g CE/100 g) i antioksidantna aktivnost (IC_{50} vrednost) u opsegu 13 - 30 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 21).

Tabela 21. Sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i IC_{50} vrednost ekstrakata *S. montana* dobijenih konvencionalnom tehnikom ekstrakcije

Temperatura (°C)	Etanol (%)	TP (g GAE/100 g)	TF (g CE/100 g)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
40	30	6,33	5,31	15,09
40	50	6,34	5,54	16,28
40	70	4,34	3,74	26,45
55	30	6,81	5,80	13,82
55	50	7,00	5,89	14,48
55	70	5,01	4,24	23,50
70	30	7,09	6,10	13,55
70	50	7,18	6,25	13,00
70	70	5,52	4,49	22,34
55	21,7	6,23	5,92	15,00
55	78,3	3,91	3,22	30,00
33,8	50	5,84	5,23	17,90
76,2	50	7,07	5,70	13,52

Upoređujući ove rezultate sa rezultatima ostvarenim ekstrakcijom subkritičnom vodom, može se konstatovati značajna prednost proizvodnje ekstrakata *S. montana* subkritičnom vodom, u smislu postizanja veće efikasnosti ekstrakcije fenola i flavonoida, kao i veće antioksidantne aktivnosti ekstrakata. Osim toga, iako etanol spada u „zelene” ekstragense i njegova upotreba se smatra neškodljivom, zapaljivost mu ograničava primenu i čini ga manje adekvatnim za proizvodnju. Dodatno, cena etanola je znatno veća od cene vode. Stoga, dobijeni rezultati naglašavaju superiornost ekstrakcije subkritičnom vodom u odnosu na konvencionalnu metodu u pogledu efikasnosti ekstrakcije, bezbednosti i cene ekstragensa.

Takođe, imajući u vidu dužinu trajanja konvencionalne ekstrakcije (120 min) u poređenju sa znatno kraćim vremenom ekstrakcije subkritičnom vodom, još jedna prednost je lako uočljiva. Brža produkcija ekstrakata sa boljim osobinama je indikator da je ova inovativna „zelena” tehnologija obećavajuća alternativa za do sada primenjivane ekstrakcione tehnike i opravdava investicione troškove za nabavku opreme.

4.6. Karakterizacija ekstrakata dobijenih *spray drying* tehnologijom sušenja

Biljni proizvodi u praškastoj formi, koji se pripremaju rastvaranjem u vodi, postali su veoma popularni među potrošačima. Takođe, olakšana manipulacija suvim ekstraktima prilikom skladištenja, transporta, produžena stabilnost i druge prednosti nabrojane u Uvodnom delu, svrstale su *spray drying* tehnologiju sušenja u jednu od često primenjivanih savremenih metoda proizvodnje suvih ekstrakata. Problemi koji se mogu javiti u praksi su lepljivost, nedovoljna efikasnost sušenja, proizvodnja ekstrakata neadekvatnog kvaliteta u pogledu fizičko-hemijskih karakteristika ili izostanak farmakološke aktivnosti suvih ekstrakata.

U okviru ovog dela istraživanja, ispitana je mogućnost dobijanja *S. montana* suvih ekstrakata *spray drying* tehnologijom, sa korišćenjem maltodekstrina kao nosača u različitim koncentracijama (10, 30 i 50%). Dobijeni ekstrakti su ispitani u pogledu fizičkih parametara kvaliteta, sadržaja biološki značajnih komponenti, antioksidantne i ACE inhibitorne aktivnosti. Takođe, senzornom analizom je procenjena prihvatljivost ekstrakata od strane potrošača.

4.6.1. Prinos i efikasnost procesa sušenja

Na svim proizvodnim nivoima poželjan je maksimalan prinos i visoka efikasnost procesa sušenja, uz odgovarajući kvalitet završnog proizvoda - suvog ekstrakta. Pod efikasnim procesom se podrazumeva proizvodnja praha uz odsustvo lepljivosti i zaostajanja na zidovima komore za sušenje. Proces sušenja *spray drying* se može smatrati uspešnim i efikasnim ukoliko je prinos 50% ili veći (Bhandari i sar., 1997).

Prinos procesa sušenja suvih ekstrakata *S. montana*, uz dodatak različitih koncentracija maltodekstrina (10, 30 i 50%), dat je u tabeli 22. U sva tri slučaja, postignut je prinos veći od 66%, i evidentno je da se sa povećanjem koncentracije maltodekstrina povećava i prinos sušenja. Ovakav uticaj koncentracije nosača na efikasnost sušenja je u skladu sa studijama drugih autora, koji navode da se povećanjem koncentracije nosača, povećava i sadržaj čvrste materije u napojnoj smeši, što rezultuje većim prinosom (Ameri i Maa, 2006; Nadeem i sar., 2011).

Radi smanjenja troškova procesa i cene proizvoda, poželjna je minimalna količina agenasa za sušenje, kojom se može obezbediti odgovarajući kvalitet proizvoda (Bhandari i sar., 1997), a

imajući u vidu da se efikasnost sa dodatkom 50% maltodekstrina, u odnosu na najmanju dodatu količinu (10%), neznatno povećala, može se konstatovati da je sušenje sa dodatkom 10% u potpunosti zadovoljavajuće, ukoliko prah ispunjava kriterijume kvaliteta (hemijski sastav, sadržaj vlage, higroskopnost i dr.).

Tabela 22. Prinos procesa sušenja, sadržaj vlage i higroskopnost u suvim ekstraktima *S. montana*

Suvi ekstrakt (% maltodekstrina)	Prinos procesa (%)	Sadržaj vlage (%)	Higroskopnost (%)	
			Nakon 48 h	Nakon 7 dana
10	66,42 ± 0,7	4,89 ± 0,01	19,82 ± 0,4	20,06 ± 0,3
30	67,38 ± 0,9	4,69 ± 0,02	15,16 ± 0,4	18,30 ± 0,09
50	68,32 ± 0,9	4,97 ± 0,02	13,64 ± 0,7	15,41 ± 0,3

4.6.2. Sadržaj vlage u prahu

Prisustvo vlage u proizvodu je glavni faktor odgovoran za njegovu stabilnost i reološke i fizičke karakteristike. Čak i male količine vode mogu sniziti Tg dovoljno da se poveća mobilnost matriksa tokom skladištenja (Bhandari i Hartel, 2005), što se odražava negativno na kvalitet praha. U svim dobijenim ekstraktima sadržaj vlage je bio niži od 5% (tabela 22). Ovakav sadržaj vlage osigurava produženo vreme trajanja stabilnosti ekstrakata sa smanjenom mogućnošću mikrobiološke kontaminacije, ukoliko se skladište na adekvatan način (na suvom mestu).

Vrednosti sadržaja vlage u ekstraktima se nalaze u okviru opsega kojima se ispunjava zahtev kvaliteta suvih ekstrakata, 3,9 - 5,9% (Bhandari i Howes, 1999; Saydi i Hatamipour, 2012) i 3-5% (Sinija i sar., 2007). Takođe, dobijeni ekstrakti ispunjavaju i zahteve koji se obično primenjuju u industrijskoj praksi prilikom proizvodnje prahova (Masters, 1991).

Neznatno povećanje u sadržaju vlage zapaža se sa povećanjem količine dodatog maltodekstrina. Sličan fenomen navode i u studiji Goula i Adampoulos (2010), potkrepljujući objašnjenjem da je molekulima vode otežana difuzija pored velikih molekula maltodekstrina (Adhikari i sar., 2004).

4.6.3. Higroskopnost

Higroskopnost se definiše kao kapacitet materijala da upija vlagu iz sredine sa visokom relativnom vlažnošću. U slučaju primene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, povezana je sa poroznošću praha (Nadeau i sar., 1995) ili sa amorfnim staklastim stanjem šećera koji su prisutni u hrani (Roos, 2002). Fizičke promene u prahu sa niskim sadržajem vlage, uključujući higroskopnost, zavise od Tg. Veća vrednost Tg znači nižu higroskopnost. Povećanjem koncentracije maltodekstrina, povećava se vrednost Tg praha, što dalje rezultuje njegovom nižom higroskopnošću (Roos, 1993; Jaya i Dass, 2004). Higroskopnost herbalnih ekstrakata može da se pripiše prisustvu hidrofilnih komponenti u prahu, kao što su ugljeni hidrati, glikozidi, organske kiseline, fenoli, aminokiseline, proteini, itd. (Chang i sar., 2014).

Higroskopnost praha sa 50% maltodekstrina je bila najniža, nakon 48 h je iznosila 13,64%, dok je nakon 7 dana uvećana na 15,41%. Veći stepen apsorpcije vlage je izmeren kod ekstrakta sa 30% maltodekstrina, nakon 48 h vrednost je 15,16% i nakon 7 dana 18,30%. Najveći procenat apsorbovane vlage je izmeren kod ekstrakta sa najnižim sadržajem maltodekstrina (tabela 22). Sam maltodekstrin ima nisku higroskopnost, što je jedna od njegovih glavnih odlika koja ga svrstava u efikasne agense za sušenje, pa su ovakvi rezultati razumljivi i očekivani. Sa konstatacijom da se povećanjem koncentracije maltodekstrina može redukovati higroskopnost, slažu se i autori više sprovedenih studija (Cai i Corke, 2000; Jaya i Das, 2004; Rodriguez-Hernandez i sar., 2005; Tonon i sar. 2008). Ipak, prevelike koncentracije maltodekstrina mogu uticati na neke druge parametre kvaliteta praha, kao što su sadržaj aktivnih komponenti ili senzorne karakteristike (Vladić i sar., 2016).

4.6.4. Nasipna zapremina

Poznavanje nasipne zapremine praha je od fundamentalnog značaja za dalje procesuiranje, skladištenje, pakovanje i distribuciju (Oliveira i sar., 2010). S obzirom da je prah izuzetno zastupljen u proizvodnji različitih farmaceutskih oblika čija je zapremina limitirana (npr. tablete i kapsule), male vrednosti nasipne zapremine nisu poželjne. Osim toga, u prahovima sa manjom vrednošću nasipne zapremine, potencijalno više vazduha se nalazi unutar praha, i veća je

površina koja može doći u kontakt sa vazduhom, pa se povećava mogućnost oksidacije i redukuje stabilnost proizvoda prilikom skladištenja (Kurozawa i sar., 2009; Oliveira i sar., 2010).

U suvim ekstraktima *S. montana* vrednost nasipne zapremine je bila u opsegu 82,4 - 138,0 mg/mL (tabela 23). Zapaža se povećanje nasipne zapremine sa povećanjem količine dodatog maltodekstrina. U literaturi se navode različiti uticaji koncentracije nosača na ovaj parametar, pa u više sprovedenih studija utvrđen je suprotni uticaj (Mahendran, 2010; Caliskan i Dirim, 2013), dok je u nekim zapaženo da koncentracija nosača ne pokazuje značajan uticaj na nasipnu zapreminu (Tewa-Tagne i sar., 2007; Mishra i sar., 2014). Povećanje nasipne zapremine najverovatnije je uzrokovano povećanjem čvrstog dela napojne smeše sa većim dodatkom maltodekstrina (Mosen i sar., 2004; Nadeem i sar., 2011; Caliskan i Dirim, 2016). Takođe, u studiji u kojoj je vršena enkapsulacija etarskog ulja ruzmarina, uz arapsku gumu kao nosač, navodi se da povećanjem koncentracije nosača raste nasipna zapremina, jer teži materijal može lakše da se smesti u prostoru između čestica i na taj način poveća nasipnu zapreminu (Tonon, Brabet, Hubinger, 2010; Fernandes, 2013).

Razlozi oprečnih zaključaka o uticaju količine nosača na nasipnu zapreminu jesu različita priroda materijala koji se suši i parametri procesa sušenja, pa su u literaturi za različite materijale vrednosti nasipne zapremine u opsezima: 340 - 383,6 mg/mL za prah planinskog čaja (*Sideritis strica*) (Nadeem i sar., 2011), 91 - 271 mg/mL za prah soka paradajza (Goula i Adamopoulos, 2008), 592 - 772 mg/mL za *Rhus coriaria* ekstrakt (Caliskan i Dirim, 2013).

Tabela 23. Vrednosti nasipne zapremine, WSI i WAI u suvim ekstraktima *S. montana*

Prah (% maltodekstrina)	Nasipna zapremina (mg/mL)	WSI (%)	WAI (g/g praha)
10	82,40 ± 0,2	87,85 ± 0,3	0,06 ± 0,01
30	106,40 ± 0,2	88,10 ± 0,6	0,04 ± 0,02
50	138,00 ± 0,1	90,55 ± 0,2	0,02 ± 0,01

4.6.5. Indeks rastvorljivosti u vodi i indeks apsorpcije vode

Indeks rastvorljivosti (WSI) u vodi je značajan parametar u karakterizaciji prahova, jer ukazuje na sposobnost praha da se rastvara u vodi. Prema Samahy i sar. (2007), uzrok smanjenja indeksa rastvaranja može biti formiranje komponenti koje su nerastvorljive u vodi, što je nepoželjan proces u slučaju proizvodnje prahova namenjenih za primenu rehidracijom. Veća vrednost indeksa rastvaranja ukazuje na bolju rastvorljivost konstituenata u vodi, i takvi prahovi se mogu okarakterisati kao proizvodi sa željenim osobinama.

U ispitivanim prahovima su izmerene visoke vrednosti ovog indeksa i uočeno je da se sa povećanjem koncentracije maltodekstrina povećava indeks rastvorljivosti (tabela 23). U slučaju prahova sa 10 i 30%, razlika je bila neznatna. Suprotno od indeksa rastvorljivosti, indeks apsorpcije vode (WAI) je bio nizak u svim prahovima i zapaženo je da se povećanjem količine maltodekstrina redukuje kapacitet zadržavanja vode u prahovima. Utvrđeni parametri ekstrakata *S. montana* (velika vrednost indeksa rastvorljivosti i mala indeksa apsorpcije) predstavljaju karakteristike kojima se ispunjavaju uslovi kvaliteta biljnih prahova, i kao takvi mogu biti korišćeni rastvaranjem u vodi (npr. instant čajevi).

Sličan uticaj koncentracije nosača na ova svojstva prahova uočena su i u studiji Phoungchandang i Sertwasana (2010). Osim ispunjavanja ovih uslova u pogledu rastvaranja i apsorpcije vode, prema Hoge Kamp i Schubert (2003), idealan prah bi trebao da se kvasi brzo i potpuno, ne pluta po površini, već tone bez formiranja nerastvorljivih grudvica. Nosači mogu da formiraju spoljašnji sloj na kapima i promene lepljivost površine čestica zbog transformacije u staklasto stanje. Promene u lepljivosti površine redukuju koheziju između čestica rezultujući manjom aglomeracijom i, samim tim, manjim kapacitetom praha da zadrži vodu (Adhikari i sar., 2003; Hoge Kamp i Schubert, 2003; Grabowski i sar., 2006; Phoungchandang i Sertwasana, 2010).

4.6.6. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida

Najveći sadržaj ukupnih fenola je određen u prahu koji je sušen uz dodatak 10% maltodekstrina, dok je najmanji sa najvećom koncentracijom nosača. Isti uticaj udela maltodekstrina je zapažen i u slučaju ukupnih flavonoida (tabela 24).

Tabela 24. Sadržaji ukupnih fenola, flavonoida i antioksidantna aktivnosti (IC₅₀)

Suvi ekstrakt (% maltodekstrina)	Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/100 g)	Sadržaj ukupnih flavonoida (mg CE/100 g)
10	153,61 ± 0,01	118,69 ± 0,02
30	128,23 ± 0,02	96,83 ± 0,03
50	100,94 ± 0,01	84,29 ± 0,02

Razlog smanjenja sadržaja fenola i flavonoida u ekstraktima sa povećanjem koncentracije maltodekstrina može biti „razblažujući“ efekat maltodekstrina, jer se sa dodatkom veće količine nosača smanjuje sadržaj fenola u napojnoj smeši, što je u skladu sa rezultatima više studija (Nadeem i sar., 2011; Mishra i sar., 2013; Caliskan i Dirim, 2013).

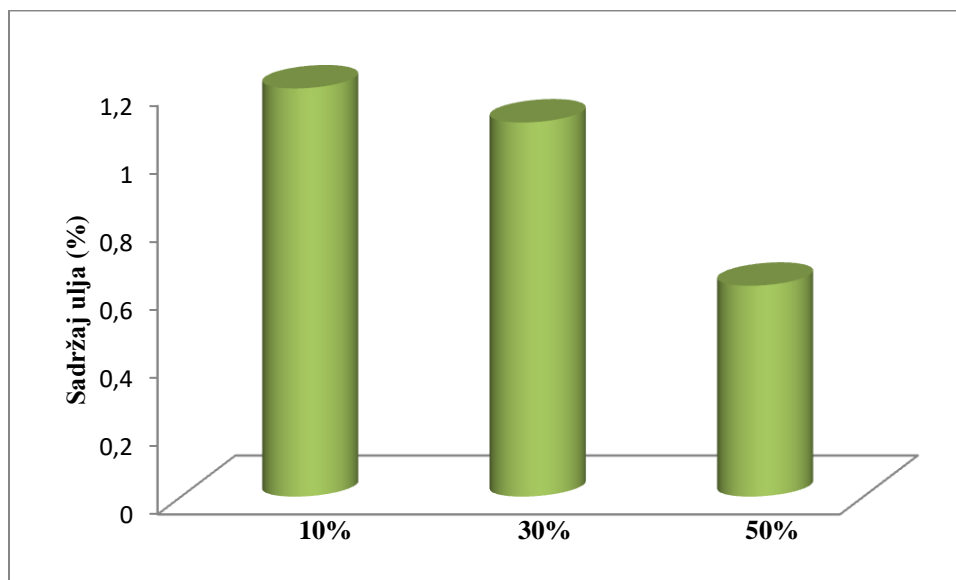
Može se smatrati da je za najveći prinos fenola i flavonoida najadekvatniji minimalni udeo maltodekstrina (10%), koji obezbeđuje efikasno sušenje bez lepljenja i zaostajanja na zidovima uređaja.

Radi ispitivanja stabilnosti, to jest retencije fenola i flavonoida, u suvim ekstraktima je nakon 12 meseci skladištenja na sobnoj temperaturi (u staklenoj ambalaži, u eksikatoru) ponovo određen sadržaj polifenolnih komponenti. Utvrđeno je da je došlo do smanjenja koncentracija fenola za 3,54 ± 0,02%, 2,44 ± 0,02% i 1,75 ± 0,01%, kao i flavonoida za 6,40 ± 0,03%, 3,51 ± 0,03% i 2,87 ± 0,01% u ekstraktima dobijenim sa 10, 30 i 50% maltodekstrina. Dobijeni rezultati ukazuju na to da veća koncentracija maltodekstrina obezbeđuje produženu stabilnost proizvoda, u smislu retencije fenola i flavonoida.

4.6.7. Sadržaj etarskog ulja i njegov hemijski sastav

Postupkom hidrodestilacije, iz suvih ekstrakata rtanjskog čaja je izolovano etarsko ulje. U suvom ekstraktu rtanjskog čaja koji je sušen sa 10% maltodekstrina, utvrđen je najveći prinos etarskog ulja, i iznosio je skoro 2 puta više nego u slučaju ekstrakta sa 50% maltodekstrina (slika 16). Rezultati ukazuju da je dodatak 10% maltodekstrina dovoljan za efikasno oblaganje i zaštitu aromatičnih i termosenzitivnih komponenti zastupljenih u ovoj biljnoj vrsti, to jest etarskom ulju.

Daljim povećanjem koncentracije maltodekstrina postiže se efekat “razblaživanja” ekstrakta i umanjenja sadržaja etarskog ulja.



Slika 16. Sadržaj etarskog ulja u suvim ekstraktima *S. montana*

U etarskim uljima, izolovanim iz suvih ekstrakata *S. montana*, primenom GC/MS metode detektovane su sledeće komponente: cimen, linalool, terpinen-4-ol, α -terpineol, karvakrol, *trans*-kariofilen, β -kadinen, spatulenol i kariofilen (tabela 25). Dominantna komponenta etarskog ulja u sva tri praha je bila karvakrol (70 - 90%). Primenom GC/FID metode, izvršena je kvantitativna analiza i utvrđen je sadržaj karvakrola u suvim ekstraktima (tabela 26). Hromatogrami etarskih ulja su prikazani u poglavlju Prilog (slike P4.1 - P4.3).

Tabela 25. GC-MS analiza etarskih ulja izolovanih iz suvih ekstrakata *S. montana*

Komponenta (%)	Suvi ekstrakt (% maltodekstrina)		
	10	30	50
Cimen	0,359	0,355	0,556
Linalool	0,183	0,17	0,226
Terpinen-4-ol	0,417	0,512	0,54
α -Terpineol	0,214	0,224	0,184
Karvakrol	71,823	85,859	87,868
<i>Trans</i> -kariofilen	0,244	0,284	0,399
α -Kopaen	-	-	0,154

β -Kadinen	0,243	0,392	0,439
Spatulenol	0,207	0,349	0,312
Kariofilen oksid	1,312	1,648	0,981
Udeo identifikovanih komponenti (%)	75,002	89,793	91,659

Tabela 26. GC-FID analiza karvakrola u etarskim uljima izolovanim iz suvih ekstrakata *S. montana*

Suvi ekstrakt (% maltodekstrina)	Karvakrol (mg/100 g)
10	902,52
30	748,22
50	441,81

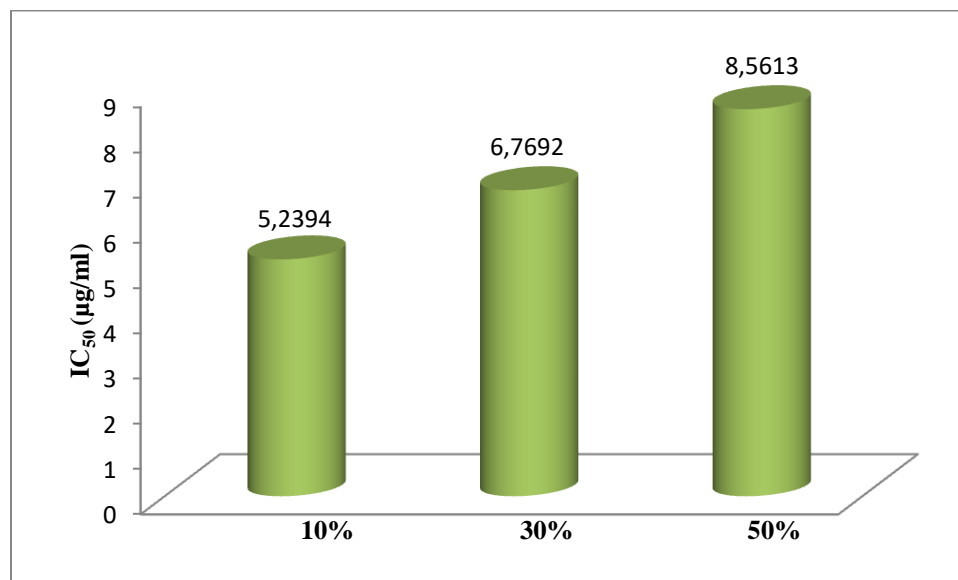
Kao i u slučaju ukupnih polifenolnih komponenti, sadržaji dominantnih komponenti su bili najveći u etarskom ulju izolovanom iz praha sa 10% maltodekstrina. Sadržaj karvakrola u ovom ekstraktu je bio 2 puta veći u poređenju sa etarskim uljem izolovanim iz praha sa 50% maltodekstrina. Na osnovu ovoga, može se zaključiti da je koncentracija od 10% maltodekstrina najadekvatnija za obezbeđivanje praha visokog kvaliteta.

Utvrđeni sadržaji isparljivih komponenti su u skladu sa zapažanjima mnogih istraživača, koji navode da maltodekstrin može smanjiti difuzione koeficijente za rastvorljive isparljive organske komponente (Phoungscandang i Sertwasana, 2010), što vodi zaključku da će povećanje koncentracije maltodekstrina imati uticaj na smanjeno prisustvo isparljivih komponenti u suvim ekstraktima.

4.6.8. Antioksidantna aktivnost

Antioksidantna aktivnost suvih ekstrakata *S. montana* je u korelaciji sa sadržajima ukupnih fenola i flavonoida, kao i najzastupljenije aromatične komponente etarskog ulja, to jest antioksidantna sposobnost ekstrakata raste sa smanjenjem koncentracije nosača dodatog u

napojnu smešu, pa je najmanja vrednost IC_{50} izmerena u ekstraktu sa 10% maltodekstrina (slika 17).



Slika 17. Antioksidantna aktivnost suvih ekstrakata *S. montana* izražena kao IC_{50} vrednost

„Razblažujući“ efekat na antioksidantnu aktivnost ekstrakata, koji se postiže povećanjem koncentracije nosača, zapažen je i u studiji Mishra i sar. (2014). Postojanje korelacije između sadržaja polifenolnih komponenti i antioksidantne aktivnosti ukazuje na mogućnost da su prethodno pomenuti konstituenti prahova potencijalni nosioci antioksidantne aktivnosti *S. montana* suvih ekstrakata.

Za sve suve ekstrakte antioksidantna aktivnost se može okarakterisati kao visoka, s obzirom da je inhibitorni kapacitet za ove prahove postignut na znatno nižoj koncentraciji u odnosu na etarsko ulje *Rosmarinus officinalis* ($IC_{50} = 62,49 \mu\text{g/mL}$) (Gharib i da Silva, 2013), *Origanum onites* ($IC_{50} = 80 \mu\text{g/mL}$) (Özkan i Erdoğan, 2011) ili prah semena grožđa ($IC_{50} = 118 \mu\text{g/mL}$) (Li i sar., 2008).

4.6.9. ACE inhibitorna aktivnost

Angiotenzin konvertujući enzim igra značajnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska kroz produkciju potentnog vazokonstriktora/angiotenzina II i degradaciju vazodilatatora - bradikinina. Kaptopril, lizinopril i drugi sintetski ACE inhibitori se koriste u kliničkim tretmanima hipertenzije, i mogu

ispoljiti neželjene efekte kod ljudi. Prirodne komponente i ekstrakti koji ispoljavaju ovu aktivnost, kao što su peptidi i fenoli, deluju obećavajuće, ukazujući na svoj potencijal i mogućnost razvoja u terapeutska sredstva, kao i funkcionalnu hranu za prevenciju stanja hipertenzije.

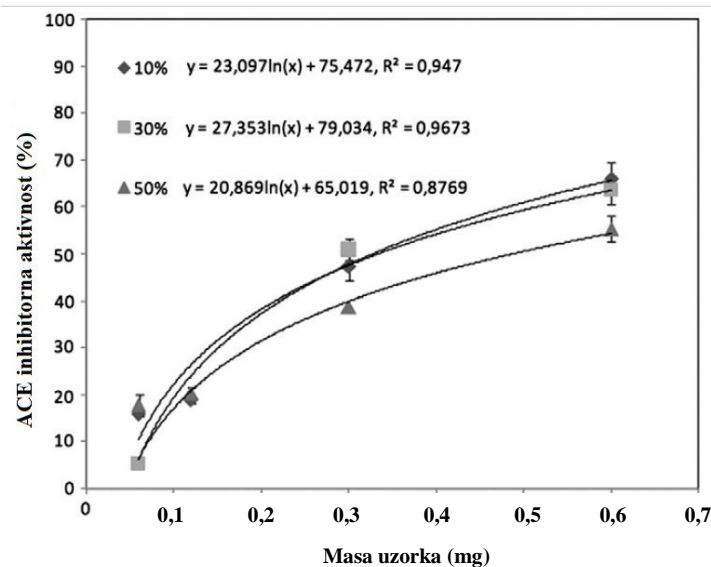
Sva tri suva ekstrakta su ispoljila ACE inhibitornu aktivnost, koja je ispitivana u opsegu od 0,06 do 0,6 mg. Rezultati sugerišu da nema značajne razlike u aktivnosti između ekstrakata sa 10 i 30% maltodekstrina, dok je ekstrakt sa 50% ispoljio manju aktivnost. Logaritamske krive mogu adekvatno da prikažu ACE inhibitornu aktivnost u funkciji mase uzorka (slika 18). IC_{50} vrednosti, određene iz ustanovljenih jednačina, bile su 0,332; 0,334 i 0,487 mg za ekstrakte sa 10, 30 i 50% maltodekstrina.

Mogućnost da se polifenoli koriste kao ACE inhibitori, radi regulacije krvnog pritiska, opsežno je izučavana i utvrđeno je da polifenolna jedinjenja i proizvodi koji ih sadrže u svom sastavu, mogu efikasno da suprimiraju aktivnost ACE (Barbosa-Filho i sar., 2006; Balasuriya i Rupasinghe, 2011).

Ispitivanje ACE inhibitorne aktivnosti za ekstrakte *S. montana* nije prisutno u literaturi, kao ni dominantne komponente zastupljene u ovoj biljnoj vrsti - karvakrola. S druge strane, za karvakrol je ustanovljeno da ispoljava hipotenzivni efekat i može delovati povoljno kod hipertenzije (Aydin i sar., 2007). Takođe, sprovedeno je ispitivanje ACE inhibitorne aktivnosti biljnih vrsta koje pripadaju porodici *Lamiaceae*. U okviru pomenute studije, utvrđen je ACE suprimirajući efekat ekstrakata origana, biljne vrste bogate karvakrolom (Kwon i sar., 2006). Suvi ekstrakti *S. montana* sa manjim udelom maltodekstrina (10 i 30%) su pokazali značajniji efekat inhibicije. S obzirom da je utvrđeno da ovi ekstrakti imaju veći sadržaj fenola, flavonoida, kao i etarskog ulja bogatog karvakrolom, može se konstatovati da ispoljeni inhibitorni uticaj korelira sa prisustvom pomenutih konstituenata ekstrakata *S. montana*. Radi utvrđivanja mehanizma delovanja, kao i koje komponente su odgovorne za ispoljeni uticaj, neophodno je sprovesti dalje istraživanje.

Za ispitivanje inhibitorne aktivnosti se koriste različiti testovi i modeli ispitivanja, pa je poređenje rezultata teško izvodljivo. Ipak, u odnosu na sintetske ACE inhibitore prirodni proizvodi deluju višestruko slabije i može se konstatovati da imaju potencijal da budu korišćeni kao blagi ili umereni ACE inhibitori. S obzirom na rezultate ispitivanja u okviru ove disertacije, suvi ekstrakti

S. montana imaju potencijal da budu upotrebljeni u profilaksi ili kao adjuvantna terapijska sredstva kod hipertenzije.



Slika 18. ACE inhibitorna aktivnost suvih ekstrakata *S. montana*

4.6.10. Senzorna analiza

Senzorna evaluacija proizvoda je veoma značajna jer obezbeđuje preliminarne rezultate o njegovoj prihvatljivosti na tržištu, bilo kao konstituenta u finalnim proizvodima, suplementima ili kao samostalnog proizvoda. Ukoliko je ispitivani proizvod visoko kvalitetan po sadržaju komponenti sa zdravstvenim benefitima, negativne senzorne karakteristike se mogu promeniti adaptacijom procesa proizvodnje. Senzorna evaluacija zavisi od pola i uzrasta. Kroz studije je utvrđeno da su žene značajno senzitivnije na slatke i slane ukuse, kao i mirise, u odnosu na muškarce. Takođe, sa povećanjem broja godina smanjuje se senzorna oštrina za ukuse i arome, što može da utiče na izbor hrane. Iz ovih razloga, žene do 30 godina su izabrane za analizu sensorike suvih ekstrakata. Senzorna evaluacija ukusa i mirisa ekstrakata *S. montana* je formirana na osnovu ocena 50 izabranih volonterki. Rezultati senzorne analize su prikazani na slici 19.

U prvom delu evaluacije, volonterke su ocenjivale prijatnost mirisa ekstrakata *S. montana*. Opis mirisa je bio u opsegu od „ekstremno prijatan” do „ekstremno neprijatan”. Prijatnost mirisa je od velike važnosti i može odrediti da li će proizvod biti prihvaćen od strane konzumenata (Sansone, 2011).

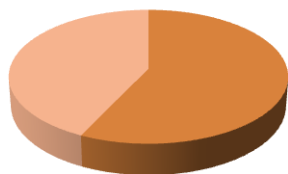
Prah sa 10% maltodekstrina okarakterisan je kao „prijatan” od strane 57,14% volonterki i „neprijatan” od strane 42,86% učesnica evaluacije. Prah sa 30% maltodekstrina ocenjen je kao „ekstremno prijatan” od strane 8,53% učesnica, „prijatan” od strane 52,38% volonterki i „neprijatan” od strane 39,09%. Za prah sušen sa najvećim udelom nosača 23,83% volonterki reklo je da je „ekstremno prijatan”, 47,60% „prijatan” i 28,57% smatralo je ovaj prah „neprijatnim”. Dakle, u svim slučajevima više od 52% volonterki ocenilo je prahove kao prihvatljive za dalju upotrebu kao sastojak prehrambenih proizvoda. Miris ispitivanih ekstrakata uglavnom potiče od etarskog ulja i aromatičnih komponenti u njegovom sastavu. Kao što je objašnjeno u prethodnoj sekciji, sadržaj ulja i aromatičnih konstituenata u ekstraktima se smanjuje sa povećanjem procenta maltodekstrina u ispitivanim prahovima, pa se može konstatovati da prihvatljivost raste zajedno s povećanjem količine dodatog maltodekstrina. Prethodna izjava je u skladu sa konstatacijom da je generalni trend za biljne ekstrakte: što je intezitet mirisa veći, to je niža percepcija prijatnosti (Sansone, 2011). Miris praha bi trebalo poboljšati, jer veća senzorna prihvatljivost (značajno veća od 50%) bi trebalo da bude postignuta kako bi se omogućila upotreba u prehrambenoj industriji i uspešno kreiranje finalnog proizvoda.

Evaluacija ukusa je urađena na osnovu ukusa praha rastvorenog u hladnoj vodi. Hladni rastvor praha *S. montana* sa 10% maltodekstrina procenjen je od strane 71,43% volonterki kao „prijatan”, dok ga je 28,57% njih okarakterisalo kao „neprijatan”. Isti rezultati su dobijeni i za rastvor ekstrakta sa 30%. Prah sa 50% maltodekstrina ocenjen je kao „ekstremno prijatan” od strane 9,75% volonterki, 66,67% njih je reklo da je „prijatan”, dok je 23,81% učesnica evaluacije smatralo ispitivani rastvor ekstrakta „neprijatnim”. Stoga, u svim slučajevima, više od 71% volonterki ocenilo je hladne rastvore ekstrakata *S. montana* kao prihvatljive za upotrebu u formi hladnog rastvora. Visoka ocena ukusa prahova (viša od 70%) ukazuje na potencijal implementiranja praha u prehrambene proizvode ili samostalne upotrebe, kao na primer instant hladni čaj.

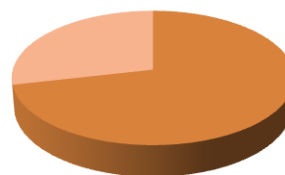
Evaluacija mirisa

Evaluacija ukusa

10%

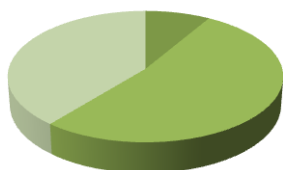


■ prijatan ■ neprijatan

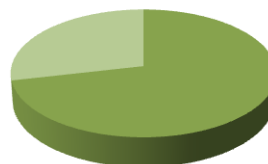


■ prijatan ■ neprijatan

30%

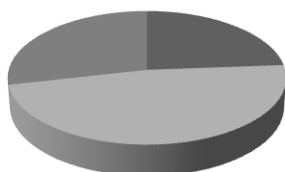


■ ekstremno prijatan ■ prijatan ■ neprijatan

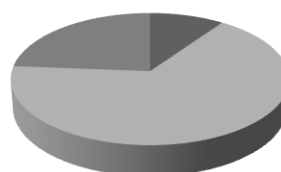


■ prijatan ■ neprijatan

50%



■ ekstremno prijatan ■ prijatan ■ neprijatan



■ ekstremno prijatan ■ prijatan ■ neprijatan

Slika 19. Senzorna evaluacija mirisa i ukusa suvih ekstrakata *S. montana*

4.7. Ispitivanje *in vivo* biološke aktivnosti odabranih ekstrakata

U prvom delu istraživanja, ustanovljeni su postupci „zelenih” ekstrakcija kojima se obezbeđuje dobijanje ekstrakata *S. montana* visokog kvaliteta. Da bi se evaluirala farmakološka potentnost ekstrakata i same vrste *S. montana*, odabrani su ekstrakti dobijeni različitim ekstrakcionim metodama za dalje ispitivanje na *in vivo* modelima. Za najvažniji konstituent ove biljne vrste i njenih ekstrakata - karvakrol, u brojnim studijama je utvrđena izuzetno značajna biološka aktivnost u smislu hepatoprotektivne i antioksidantne zaštite. Stoga je, za dalje ispitivanje u *in vivo* modelima, odabran ekstrakt dobijen superkritičnom ekstrakcijom (350 bar, 50 °C) sa najvećim sadržajem karvakrola (60,82%) (SFE).

Da bi se utvrdila razlika u delovanju na živi organizam, ukoliko se primeni ekstrakt dobijen klasičnom ekstrakcionom metodom, pa samim tim i različita forma ekstrakta, odabran je suvi ekstrakt dobijen *spray drying* postupkom sa 10% maltodekstrina (SDE), koji se ujedno pokazao kao superiorniji u pogledu fizičko-hemijskih osobina.

Oba ekstrakta su ispitana u pogledu antioksidantnog delovanja, primenom DPPH testa. Vrednost IC_{50} za ekstrakt dobijen superkritičnim ugljendioksidom je iznosila 17,40 $\mu\text{g/mL}$, dok je IC_{50} vrednost suvog ekstrakta sa 10% maltodekstrina, kako je navedeno u poglavlju 3.4.8, iznosila 5,24 $\mu\text{g/mL}$. Ustanovljena je značajna antioksidantna aktivnost oba ekstrakta, no značajniju inhibiciju radikala ispoljio je suvi ekstrakt. Međutim, manja antioksidantna aktivnost ekstrakta dobijenog superkritičnim ugljendioksidom, u DPPH testu, može biti objašnjena činjenicom da se ovi ekstrakti uglavnom sastoje od lipofilnih komponenti koje imaju malu rastvorljivost u reakcionom medijumu testa (metanolu). Stoga, za ekstrakt koji u svom sastavu ima monoterpenske i seskviterpenske ugljovodnike, nije iznenađujuća niža izmerena antioksidantna aktivnost primenjenim testom (Mata i sar., 2007; Viuda-Martos i sar., 2010; Andrade i sar., 2013). Osim toga, u jednoj od studija navode jaču antioksidantnu aktivnost etanolnih i vodenih ekstrakata u odnosu na etarsko ulje, smatrajući da je objašnjenje prisustvo većeg sadržaja fenolnih kiselina, kao što su rozmarinska i druge, koje imaju jaku sposobnost „hvatanja” slobodnih radikala, zbog njihove hidroksilne grupe. Takođe, sugeriše se da prisustvo seskviterpena, koji generalno imaju niži antioksidantni kapacitet, doprinosi manjoj antioksidantnoj aktivnosti ulja (Serrano i sar., 2010).

Ipak, delovanje u organizmu zavisi od velikog broja faktora (ćelijske penetracije, lipofilnog i hidrofilnog karaktera, fiksiranja za ćelijske zidove i membrane, distribucije u ćelijama i dr.) i nije ga moguće u potpunosti predvideti laboratorijskim testovima.

4.7.1. Uticaj ekstrakata *S. montana* u sistemu *in vivo* oštećenja jetre

Bolesti jetre predstavljaju jedan od glavnih zdravstvenih problema širom sveta, kao i veoma čest uzrok smrti (Blachier i sar., 2013). Zbog svoje jedinstvene metaboličke funkcije, jetra je najčešća meta prilikom izlaganja različitim vrstama toksičnosti. Različiti agensi su odgovorni za bolesti i oštećenja jetre, uključujući viruse, hepatotoksične hemikalije, kao i zagađenja. Ugljentetrahlorid je visokotoksični hemijski agens, međutim, istovremeno je i najčešće primenjivan za ispitivanje uticaja biljnih lekova na funkciju jetre, to jest hepatoprotektivnog efekta, jer kod životinja izaziva stanje slično akutnom hepatitisu kod ljudi (Weber i sar., 2003; Amat i sar., 2010).

Toksičnost CCl_4 počinje sa promenom u endoplazmatskom retikulumu, što rezultuje gubitkom metaboličkih enzima koji su locirani u intracelularnim strukturama (Recnagal, 1983). Stvara se toksični metabolit trihlormetil koji dalje reaguje sa kiseonikom dajući trihlormetil peroksi radikal. Citohrom P450 je enzim odgovoran za ovu konverziju. Dalje, ovi radikali se vezuju kovalentno za makromolekule i uzrokuju lipidnu peroksidaciju i oštećenja jetre. Kada je plazmalna membrana ćelija jetre oštećena, enzimi koji su normalno locirani u citosolu, bivaju otpušteni u krvni sistem (Thabrew i sar., 1987; Heibatollah i sar., 2008; Merlin i Parthasarathy, 2011). Efikasnost bilo kog hepatoprotektivnog agensa zavisi od njegove sposobnosti da redukuje efekte CCl_4 ili održi normalnu fiziološku funkciju koja je narušena usled primene hepatotoksina. Merenje aktivnosti serumskih marker enzima može da pomogne u proceni funkcije jetre (Venukumar i Latha, 2002; Ulican et al., 2003; Porchezian i Ansari, 2005; Heibatollah i sar., 2008).

U okviru ove disertacije evaluiran je protektivni uticaj ekstrakata *S. montana* na akutno oštećenu jetru hemijskim putem. U tabeli 27 su prikazani rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata *S. montana* na sadržaj hepaticne DNK, hidroksiprolina i bilirubina, kao i aktivnost serumskih parametara AST i ALT, pre i nakon intoksikacije sa CCl_4 .

Tabela 27. Uticaj ekstrakata *S. montana* na biohemijske parametre

Grupa	Biohemijski parametri				
	Hepatična DNK	Hidroksiprolin	Bilirubin	AST	ALT
Kontrola	6,222 ± 0,021	28,300 ± 0,141	0,118 ± 0,053	72,117 ± 0,496	20,667 ± 1,531
Kontrola+CCl₄	4,631 ± 0,015 ^a	91,533 ± 0,979 ^a	2,217 ± 0,306 ^a	590,667 ± 3,777 ^a	327,833 ± 15,250 ^a
SDE1	6,218 ± 0,015 ^b	29,2667 ± 1,593 ^b	0,125 ± 0,019 ^b	67,000 ± 4,026 ^b	20,483 ± 3,596 ^b
SDE1+CCl₄	6,417 ± 0,089 ^{a,b}	62,650 ± 2,054 ^{a,b}	1,100 ± 0,126 ^{a,b}	219,000 ± 12,474 ^{a,b}	115,667 ± 12,832 ^{a,b}
SFE1	6,248 ± 0,091 ^b	30,883 ± 0,483 ^b	0,113 ± 0,016 ^b	70,533 ± 2,925 ^b	19,633 ± 4,361 ^b
SFE1+CCl₄	6,413 ± 0,036 ^{a,b}	64,133 ± 7,156 ^{a,b}	1,028 ± 0,102 ^{a,b}	281,000 ± 19,910 ^{a,b}	106,667 ± 10,801 ^{a,b}

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija od šest miševa; sadržaj hep. DNK je izražena u mg DNK/100 g jetre. Sadržaj bilirubina, AST i ALT je izražen u mg/dL, U/L i U/L.

Koncentracija hidroksiprolina je izražena u mg/100 mg hidrolizata jetre

^aStatistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu

^bStatistički značajna razlika u odnosu na kontrola+CCl₄ grupu

U odnosu na kontrolnu grupu životinja primena ekstrakata nije izazvala promene u količini hep. DNK, dok je nakon tretmana sa CCl₄ došlo do značajnog smanjenja njene količine. Međutim, primenom ekstrakata pre administracije CCl₄, zaustavljen je pad količine hep. DNK uzrokovan tretmanom sa CCl₄.

Vrednosti sadržaja hidroksiprolina u grupama miševa koje su tretirane ekstraktima nisu se promenile u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu. Imajući u vidu da je hidroksiprolin parametar oštećenja hepatičnog tkiva, može se zaključiti da primenom ekstrakata nije narušena celularnost tkiva, što dodatno potvrđuju i nepromenjene vrednosti sadržaja hep. DNK u grupama tretiranim ekstraktima. Administracijom CCl₄ sadržaj hidroksiprolina je višestruko povećan. Ekstrakti su u značajnoj meri uspeli da suprimiraju hepatotoksični efekat CCl₄, bez razlike u međusobnom delovanju. Aktivnošću ekstrakata, sadržaj hidroksiprolina se nije snizio do vrednosti kontrolne grupe, ali je smanjenje sadržaja bilo značajno u odnosu na negativnu kontrolnu grupu.

Intoksikacija sa CCl₄ izazvala je značajno povećanje vrednosti bilirubina. Primenom ekstrakata, ublažen je uticaj hepatotoksina na vrednost ovog serumskog parametra, pa je u odnosu na vrednost nakon primene CCl₄, oko 2 puta snižena. Iako ekstrakti nisu uspeli da suprimiraju u potpunosti toksičnost CCl₄, pokazan je hepatoprotektivni uticaj. Takođe, vrednost bilirubina nije bila promenjena usled primene pojedinačnih ekstrakata.

Transaminaze (AST i ALT) su najčešće korišćeni enzimi u dijagnostici oboljenja jetre. AST je lokalizovan u citosolu hepatocita i drugih ćelija, dok se ALT znatno ređe nalazi u drugim ćelijama, pa je njegova aktivnost u plazmi pre svega znak oštećenja jetre. Aktivnost AST je značajno promenjena nakon primene CCl₄, odnosno povećana je približno 8 puta. Zapaženo je da je korišćenjem ekstrakata došlo do blagog (statistički neznačajnog) pada aktivnosti AST, ali je primenom ekstrakata pre administracije hepatotoksičnog agensa, značajno ublaženo povećanje aktivnosti ovog enzima. SDE ekstrakt je ispoljio jači efekat u odnosu na SFE ekstrakt, pa je aktivnost AST značajnije snižena njegovom primenom.

Administracija CCl₄ uzrokovala je višestruko povećanje aktivnosti enzima ALT (približno 16 puta). Ekstrakti su suprimirali toksični efekat CCl₄ i značajno zaustavili povećanje aktivnosti ALT, bez razlike u međusobnoj aktivnosti.

Kako je prethodno napomenuto, primena hepatotoksičnih agenasa dovodi do oštećenja membrane i izlaska enzima iz citosola. U tom smislu, redukcija nivoa AST i ALT od strane primenjenih

ekstrakata je indicija da je došlo do stabilizacije plazmalne membrane, kao i sprečavanja oštećenja hepatičnih tkiva delovanjem CCl_4 . Ovaj efekat je u skladu sa zastupljenim mišljenjem da se nivoi transaminaza vraćaju u granice fizioloških sa zalečenjem hepatičnog parenhima i regeneracijom hepatocita (Merlin i Parthasarathy, 2011; Heibatollah i sar., 2008; Thabrew i sar., 1987).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da nema značajne razlike u delovanju ekstrakata na ispitivane parametre nakon intoksikacije sa CCl_4 , osim na aktivnost AST gde je SDE ekstrakt značajnije smanjio aktivnost ovog serumskog parametra. S obzirom da je ustanovljeno da su primenom ekstrakata vrednosti merenih parametara, nakon intoksikacije sa CCl_4 , ostale bliske kontrolnoj grupi, može se konstatovati da su ispitivani ekstrakti ispoljili protektivni efekat kod CCl_4 -uzrokovanog oštećenja jetre.

4.7.2. Uticaj ekstrakata *S. montana* na aktivnost antioksidantnih enzima kod oksidativnog stresa indukovano primenom CCl_4

Iako su prevencija i terapija bolesti jetre veoma ograničene, patogeneza oboljenja, kao i patofiziološka uloga slobodnih radikala i oksidativnog stresa u oboljenjima, dobro je dokumentovana. Njihova prekomerna produkcija uzrokuje oksidativno oštećenje značajnih makromolekula dovodeći do smrti ćelije. Pojedini prirodni antioksidanti mogu da preveniraju oksidativno oštećenje ćelijskih komponenti, uzrokovano radikalima, na različitim nivoima patofiziološkog procesa. Značajan broj biljnih ekstrakata, kao i njihovih konstituenata, ispoljio je hepatoprotektivna svojstva poboljšavajući antioksidantni status. Stoga, antioksidanti poreklom iz biljnih izvora mogu biti značajni u redukciji incidence bolesti jetre (Amat i sar., 2010; Zhu i sar., 2012; Vladimir-Knežević i sar., 2015).

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata *S. montana* na parametre oksidativnog stresa indukovano primenom CCl_4 prikazani su u tabeli 28. Analizirana je aktivnost ksantin oksidaze (XOD), katalaze (CAT), peroksidaze (Px), glutation reduktaze (GR), glutation peroksidaze (GSHPx), kao i sadržaj glutationa (GSH) i intezitet lipidne peroksidacije (LPx).

U pogledu aktivnosti XOD nije zapažena promena nakon administracije CCl_4 , kao ni nakon pretretmana sa ekstraktima. Zapažanje da primena CCl_4 ne pokazuje značajan uticaj na aktivnost

XOD, ustanovljeno je i u prethodnim studijama (Ćebović, 2008; Ćebović i Maksimović, 2012). Vrednosti enzima nakon samostalne primene ekstrakata su se snizile, na nivou statističke značajnosti.

Katalaza predstavlja jedan od najefikasnijih enzima i ima ulogu da razlaže vodonik peroksid do vode i kiseonika, vršeći na taj način zaštitu ćelija od oksidativnog oštećenja, indukovano sa H_2O_2 (Blokhina i sar., 2003). Katalaza ne može da bude saturisana supstratom H_2O_2 , bez obzira na koncentraciju, tako da njena enzimaska aktivnost raste sa porastom koncentracije H_2O_2 (Kruidenier i Verspaget, 2002; Dejanović, 2015). Intraperitonealnom administracijom CCl_4 došlo je do evidentnog smanjenja aktivnosti CAT (2,9 puta) u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu. Tretmanom ekstraktima postignuta je značajna redukcija uticaja CCl_4 i aktivnost enzima je povećana do vrednosti bliskih kontrolnoj grupi. Primenom ekstrakata, došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu grupu.

Ispitivani ekstrakti (SDE i SFE) povećali su aktivnost Px u odnosu na kontrolnu grupu, dok je primenom CCl_4 njena aktivnost značajno redukovana, približno dva puta. Kao i u slučaju CAT, tretmanom sa ekstraktima snižen je hepatotoksičan efekat CCl_4 , odnosno, aktivnost enzima je ostala bliska aktivnosti Px zabeleženoj u netretiranoj kontrolnoj grupi, što može da ukazuje na povećanu produkciju H_2O_2 , koji se parcijalno konvertuje u vodu, pomoću enzima CAT i Px.

Glutation peroksidaza (GSHPx) je odgovorna za zaštitu ćelija od štetnog uticaja endogeno formiranih hidroperoksida kroz razgradnju na vodu i kiseonik, i može takođe da direktno detoksikuje lipidne perokside generisane od strane ROS (Castro i Freeman, 2001). Administracijom CCl_4 aktivnost ovog enzima je značajno povećana, ali u grupama koje su prethodno tretirane ekstraktima, signifikantno je smanjena u odnosu na negativnu kontrolnu grupu. Primenom SFE1 ekstrakta smanjena je do bazalnih vrednosti kontrolne grupe. Stoga, ekstrakti su uspeli da suprimiraju toksične efekte prekomerne produkcije slobodnih radikala usled primene CCl_4 .

Glutation (GSH) je neenzimski antioksidant koji deluje na više načina: može direktno da uklanja slobodno-radikalske vrste; kofaktor je pojedinih antioksidantnih enzima; ima sposobnost regeneracije neenzimskih antioksidanata do aktivnih formi i uključuje se u direktnu popravku oksidativnih oštećenja molekula DNK (Kruidenier i Verspaget, 2002; Dejanović, 2015). Nakon tretmana miševa sa ekstraktima SDE i SFE, količina GSH je ostala nepromenjena u odnosu na

netretiranu kontrolnu grupu. Primenom CCl₄ količina GSH je značajno smanjena, što implicira da je došlo do značajnog oštećenja hepatocita. Ekstrakti primenjeni sa CCl₄ izazvali su značajno povećanje količine GSH (u odnosu na negativnu kontrolnu grupu), no statistički značajno niže od vrednosti netretirane grupe, to jest nisu uspeali u potpunosti da elimišu negativan efekat CCl₄.

Glutation reduktaza (GR) katalizuje reakciju veoma značajnu za ćelijski integritet i stabilnost, prevodi oksidovani glutation u redukovani glutation. Ovaj enzim ima ulogu da održava nivo glutaciona uglavnom u redukovanom stanju, stoga je veoma značajan u regulaciji redoks homeostaze u ćeliji (Dickinson i Forman, 2002; Dejanović, 2015). Nisu pronađene značajne razlike u efektu primenjenih ekstrakata koji su uspeali da suprimiraju toksični uticaj CCl₄, održavajući nivo aktivnosti enzima blizak kontrolnoj grupi. To je statistički izuzetno značajno u odnosu na višestruko smanjenu aktivnost enzima administracijom CCl₄. S obzirom na funkciju GR da održava visok nivo aktivnosti GSH, može se konstatovati da je smanjenje nivoa aktivnosti GSH i GR, nakon aplikacije CCl₄, u korelaciji. Stoga, ispoljeni uticaji ekstrakata na nivoe aktivnosti GR i GSH ukazuju na protektivni efekat ekstrakata.

Dejstvom CCl₄ značajno je pojačan intezitet lipidne peroksidacije. Primenjeni ekstrakti su uspeali da spreče oksidativno oštećenje uzrokovano sa CCl₄, bez razlike u međusobnom delovanju. Usled mogućnosti da inhibišu lipidnu peroksidaciju i time zaštite lipide membrana od oksidativnog oštećenja, primenom ekstrakata potencijalno se može prevenirati gubitak integriteta hepatocelularne membrane. Može se konstatovati njihov antioksidantni potencijal, kao i hepatoprotektivni, u slučaju primene induktora oštećenja membrane hepatocita.

U poređenju sa kontrolnom grupom, kod životinja kod kojih je primenjen CCl₄ zabeležena je značajna redukcija aktivnosti CAT, Px i GR i nivoa GSH, kao i povećanje inteziteta LPx i aktivnosti GSHPx. Ekstrakti su, bez značajne razlike u međusobnom delovanju, uspeali da suprimiraju štetne efekte CCl₄, zaštite jetru od oksidativnog oštećenja i održe nivoe enzimskih i neenzimskih antioksidanata.

Tabela 28. Uticaj *S. montana* ekstrakata na aktivnost antioksidantnih enzima

Grupa	Biohemijski parametri						
	XOD	CAT	Px	GSH-Px	GSH	GR	LPx
Kontrola	1,93 ± 0,02	9,56 ± 0,37	10,68 ± 1,38	8,70 ± 0,38	4,98 ± 0,16	6,13 ± 0,07	3,04 ± 0,07
Kontrola+CCl₄	1,89 ± 0,02	3,32 ± 0,05 ^a	4,87 ± 0,28 ^a	21,75 ± 1,35 ^a	0,57 ± 0,28 ^a	1,2 ± 0,10 ^a	9,79 ± 1,46 ^a
SDE1	1,86 ± 0,03 ^a	12,37 ± 0,18 ^{a,b}	14,57 ± 0,80 ^{a,b}	6,67 ± 1,06 ^b	4,92 ± 0,39 ^b	6,53 ± 1,61 ^b	2,21 ± 0,24 ^b
SDE1+ CCl₄	1,92 ± 0,03	8,72 ± 0,29 ^{a,b}	9,30 ± 0,72 ^b	12,42 ± 0,64 ^{a,b}	2,9 ± 0,73 ^{a,b}	5,41 ± 0,40 ^b	3,94 ± 0,98 ^b
SFE1	1,87 ± 0,03 ^a	13,4 ± 0,59 ^{a,b}	14,88 ± 0,38 ^{a,b}	7,54 ± 2,23 ^b	4,99 ± 0,17 ^b	7,03 ± 0,46 ^b	2,62 ± 0,54 ^b
SFE1+CCl₄	1,93 ± 0,01	9,02 ± 0,16 ^b	9,52 ± 1,15 ^b	10,94 ± 1,73 ^b	3,34 ± 0,75 ^{a,b}	5,84 ± 2,11 ^b	3,97 ± 0,11 ^b

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija od šest miševa; aktivnost XOD, CAT, Px, GR i GSHPx su izraženi u nmol/mg proteina/min. Sadržaj GSH je izražen u nmol GSH/mg

proteina. Intezitet LPx je izražen u nmol/MDA/mg proteina

^aStatistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu

^bStatistički značajna razlika u odnosu na kontrola+CCl₄ grupu

Pretraživanjem dostupne literature, nisu nađeni podaci o *in vivo* ispitivanju uticaja ekstrakata *S. montana* na oštećenja jetre izazvana primenom CCl_4 .

Ispitan je uticaj etarskog ulja *S. montana* i njegove četiri dominantne komponente (karvakrol, timol, *p*-cimen i γ -terpinen) na 3-nitrotirozin i malondialdehid, čije formiranje je indukovano peroksinitritom *in vitro*. Zabeležena je značajna antioksidantna aktivnost etarskog ulja, usled inhibicije obrazovanja i smanjenja količine 3-nitrotirozina i malondialdehida, efikasnije nego vitamin C i Trolox. Karvakrol i timol, koji su takođe inhibisali obrazovanje ovih biomarkera oksidativnog stresa, smatraju se bar delimično odgovornim za ispoljenu aktivnost etarskog ulja *S. montana* (Prieto i sar., 2007).

Istraživan je hepatoprotektivni efekat etarskog ulja *S. khuzestanica*, koja je karakteristična za Iran. U okviru te studije je konstatovan hepatoprotektivni uticaj etarskog ulja kod hipertireoidnih pacova, posebno kada se kombinuje sa vitaminom E, i sugeriše se da potencijalni razlog ispoljenog antioksidantnog i hepatoprotektivnog uticaja etarskog ulja može biti prisustvo karvakrola u velikom procentu (Assaei i sar., 2014).

Takođe, kod pacova sa hepatotoksičnošću indukovanom na isti način (D-GalN), ispitan je efekat karvakrola na aktivnost mitohondrijalnih enzima i oštećenje DNK. Aktivnosti hepatskih mitohondrijalnih enzima, kao što su izocitrat dehidrogenaza, α -ketoglutarat dehidrogenaza, sukcinat dehidrogenaza, malat dehidrogenaza, NADPH dehidrogenaza i citohrom *c* oksidaza, signifikantno su se smanjili kod pacova sa indukovanim oštećenjem. Administracijom karvakrola aktivnost hepatskih mitohondrijalnih enzima je vraćena u granice fizioloških i ustanovljeno je da je oštećenje DNK smanjeno. Na osnovu rezultata u okviru ovih studija, konstatovano je da bi karvakrol mogao da obezbedi značajnu hepatoprotektivnu i antioksidantnu zaštitu kod pacova sa oštećenjem indukovanim primenom D-GalN (Aristatile i sar., 2011). Njegov hepatoprotektivni efekat je povezan sa kapacitetom da sačuva integritet hepatocelularne membrane i oksidant/antioksidant balans u jetri (Aristatile i sar., 2009; Aristatile i sar., 2011).

Protektivni uticaj karvakrola je pokazan i kod ishemija/reperfuzija-indukovanom oštećenju jetre (Canbek i sar., 2008). Osim toga, utvrđeno je da karvakrol može da doprinese regenerativnoj funkciji jetre pacova, koji su bili podvrgnuti delimičnoj hepatektomiji (Uyanoglu i sar., 2008).

S obzirom na potvrđeni potencijal karvakrola u očuvanju fiziološke funkcije jetre, ispoljena hepatoprotektivna i antioksidantna aktivnost ekstrakata *S. montana* može biti bar delom

pripisana prisustvu karvakrola. S druge strane, ispitivani ekstrakti su dobijeni različitim ekstrakcionim metodama, i antioksidantna aktivnost ekstrakata izmerena pomoću DPPH testa, kao i sadržaj karvakrola u njima, značajno se razlikuju. Imajući u vidu da nije bilo značajnijih varijacija u njihovom delovanju u okviru *in vivo* istraživanja, verovatnije je da je razlog ovakvog uticaja ekstrakata sinergistička aktivnost komponenti prisutnih u ekstraktima.

4.8. *In vivo* citotoksičnost ekstrakata *S. montana* na ćelije Ehrlich-ovog ascitnog tumora

Dobar hemoprotektivni agens je agens koji može da indukuje apoptozu ćelija kancera bez značajnih neželjenih efekata (Surh, 1999). Sa tom idejom sproveden je veliki broj studija koje su za cilj imale pronalaženje potencijalnih netoksičnih prirodnih proizvoda/komponenti koji pokazuju značajan uticaj, kako u terapiji, tako i u prevenciji kancera (Sarkar i Li, 2004; Yin i sar., 2012).

U okviru ove disertacije je ispitan uticaj ekstrakata *S. montana* na tumorske ćelije Ehrlich-ovog ascitnog tumora (EAC). Ispitivanje se odnosilo na uticaj ekstrakata (SDE1, SDE5, SFE1 i SFE5) na promene pojedinih ćelijskih parametara, kao i promene antioksidantnog statusa EAC ćelija nakon primene ekstrakata kao pretretmana, tretmana i posttretmana.

4.8.1. Uticaj ekstrakata *S. montana* na zapreminu ascitesa, vijabilnost i broj ćelija

Da bi se utvrdilo delovanje ekstrakata *S. montana* na EAC ćelije praćenje su promene ćelijskih parametara - zapremina ascitesa, broj tumorskih ćelija i njihova vijabilnost.

Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata *S. montana* na zapreminu ascitesa Ehrlich-ovog ascitnog tumora dati su u tabeli 29. Ascitna tečnost je izuzetno značajna za razvoj tumora, s obzirom da predstavlja izvor hrane za rast njegovih ćelija, pa je povećanje zapremine ascitesa značajan pokazatelj proliferacije tumorskih ćelija (Agrawal i sar., 2011). Ispitujući uticaj SDE i SFE ekstrakata u dve koncentracije, zapaženo je različito delovanje ekstrakata na zapreminu ascitesa. Primenom ekstrakata u pretretmanu (oba ekstrakta i obe koncentracije) došlo je do signifikantnog smanjenja zapremine ascitesa u odnosu na EAC kontrolnu grupu, s tim da je najznačajnije smanjenje utvrđeno u grupi koja je pretretirana sa SFE5. U tretmanu, takođe je došlo do značajnog smanjenja zapremine ascitesa prilikom primene svih ekstrakata, s tim da je kod tretiranih najefikasnije smanjenje zabeleženo u grupi kojoj je apliciran SDE5. U posttretmanu, redukovana zapremina je utvrđena samo kod grupe kojoj je primenjivan SDE1, dok je u ostalim grupama zabeleženo povećanje zapremine ascitesa u odnosu na EAC grupu.

Tabela 29. Uticaj ekstrakata *S. montana* na zapreminu ascitesa

	Zapremina ascitesa (mL)			
EAC kontrola	7,117 ± 0,458			
Aplikacija	SDE1	SDE5	SFE1	SFE5
Pretretman	2,267 ± 1,178 ^a	3,283 ± 1,301 ^a	2,267 ± 0,674 ^a	1,000 ± 0,469 ^a
Tretman	2,167 ± 0,288 ^a	0,817 ± 0,147 ^a	2,933 ± 1,147 ^a	2,267 ± 1,065 ^a
Posttretman	3,083 ± 0,382 ^a	9,657 ± 0,359 ^a	9,851 ± 0,932 ^a	9,622 ± 0,954 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest miševa. a- statistički značajna razlika u odnosu na EAC kontrolnu grupu

U grupama koje su pretretirane i posttretirane ekstraktima nije zabeležena signifikantna promena vijabilnosti (tabela 30). U grupama životinja koje su tretirane, statistički značajno smanjenje ćelijske vijabilnosti primećeno je samo nakon tretmana sa SDE1 ekstraktom, dok je u ostalim tretiranim grupama životinja, došlo do statistički neznačajnog smanjenja vijabilnosti.

Tabela 30. Uticaj ekstrakata *S. montana* na vijabilnost ćelija EAC

	Vijabilnost (%)			
EAC kontrola	7,243 ± 1,425			
Aplikacija	SDE1	SDE5	SFE1	SFE5
Pretretman	7,183 ± 1,705	6,267 ± 0,965	5,967 ± 0,339	6,250 ± 1,205
Tretman	4,817 ± 1,042 ^a	6,550 ± 0,509	6,733 ± 0,857	6,200 ± 1,131
Posttretman	6,533 ± 0,476	7,650 ± 0,874	7,499 ± 0,356	7,586 ± 1,023

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest miševa. a- statistički značajna razlika u odnosu na EAC kontrolnu grupu

Uticaj na broj ćelija u odnosu na EAC kontrolnu grupu statistički je značajan samo u grupama životinja koje su pretretirane sa SDE i ustanovljeno je povećanje broja ćelija. Tretmanom sa SDE1 zabeležen je isti efekat - značajno povećanje broja ćelija, dok je administracija SFE ekstrakata dovela do blage redukcije (statistički neznačajne) broja malignih ćelija. U posttretiranim grupama je zabeleženo povećanje nakon primene svih ekstrakata (tabela 31).

Tabela 31. Uticaj ekstrakata *S. montana* na broj ćelija EAC

	Broj ćelija/mm ³			
EAC kontrola	119.583,333 ± 6.755,862			
Aplikacija	SDE1	SDE5	SFE1	SFE5
Pre tretman	196.583,333 ± 17.133,058 ^a	158.833,333 ± 9.739,952 ^a	147.000,000 ± 22.858,259	125.583,333 ± 21.731,122
Tretman	247.000,000 ± 44.340,73 ^a	114.333,300 ± 1.505,545	112.166,700 ± 16.898,720	108.000,000 ± 17.378,150
Post tretman	141.833,333 ± 24.717,740 ^a	346.569,58 ± 34.156,81 ^a	374.511,22 ± 11.568,13 ^a	361.581,47 ± 8455,36 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest miševa. a- statistički značajna razlika u odnosu na EAC kontrolnu grupu

S obzirom da je utvrđeno da primenom ekstrakata dolazi do smanjenja zapremine ascitesa u grupama miševa, ali ne i broja ćelija, može se pretpostaviti da je u smanjenoj zapremini ascitesa skoncentrisan veći broj ćelija i da ekstrakti ne ispoljavaju efekat u tom smislu, to jest ne dovode do smrti ćelija, niti inhibicije ćelijskog rasta, stoga ne pokazuju cistotoksičnu, niti citostatsku aktivnost u pogledu broja malignih ćelija. Potencijalni onkostatski efekat (statistički neznačajan) su ispoljili jedino ekstrakti SFE (SFE1 i SFE5) i SDE 5 primenjeni kao tretman.

4.8.2. Uticaj ekstrakata *S. montana* na antioksidantni status ćelija Ehrlich-ovog ascitnog tumora

U okviru ovog poglavlja prikazani su rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata *S. montana* na antioksidantni status malignih ćelija EAC. Promene antioksidantnog statusa EAC ćelija praćene su merenjem aktivnosti antioksidantnih enzima (XOD, CAT, Px, GSHPx, GR) kao i količine GSH i inteziteta LPx u EAC ćelijama. Dobijeni rezultati su poređeni sa kontrolnom grupom, to jest rezultatima merenja istih parametara u EAC ćelijama (tabela 32).

U kontrolnoj grupi aktivnost XOD u ćelijama EAC je bila mala, i primenom ekstrakata SFE u pretretmanima, došlo je do signifikantnog povećanja aktivnosti XOD u malignim ćelijama, bez njihove međusobne razlike u uticaju na ovaj parametar (SFE1 i SFE5), dok primena SDE ekstrakata nije izazvala značajnu promenu inteziteta XOD. U grupama tretiranim ekstraktima, utvrđene su značajne izmene u aktivnosti enzima, pa su SFE ekstrakti pojačali aktivnost XOD u ćelijama EAC, kao i tretman sa SDE5, dok je tretman sa manjom koncentracijom SDE signifikantno smanjio aktivnost XOD. Primena ekstrakata u posttretmanima, u svim grupama

(osim kod postretmana sa SDE1) je izazvala značajne promene - smanjenje XOD aktivnosti u odnosu na EAC grupu, dok je posttretman sa SDE1 uticao na povećanje aktivnosti XOD.

U odnosu na aktivnost CAT u EAC kontrolnoj grupi, primenom ekstrakata ispoljen je različit uticaj na aktivnost ovog enzima. U grupama pretretiranim ekstraktima aktivnost CAT u EAC ćelijama je značajno povećana aplikacijom SDE1, dok je značajno smanjena u ostalim pretretiranim grupama i najveće smanjenje je postignuto primenom SFE5 u pretretmanu. Tretmanom ekstraktima u svim grupama životinja je došlo do signifikantnih izmena aktivnosti CAT, pa je, kao i u pretretmanu, sa SDE1 povećana, dok je sa ostalima smanjena aktivnost CAT u malignim ćelijama. Primena ekstrakata u posttretmanima, u svim grupama je izazvala značajne promene u odnosu na EAC kontrolnu grupu, u smislu smanjenja CAT aktivnosti posttretiranjem sa SDE1, i povećanjem u ostale tri grupe posttretiranih miševa.

Aktivnost Px u malignim ćelijama u odnosu na kontrolnu EAC grupu se povećala nakon primene SFE ekstrakata u pretretmanima, kao i SDE5. Tretiranjem sa SDE1, ustanovljeno je smanjenje aktivnosti Px, kao i povećanje tretmanom sa SDE5, SFE1 i SFE5. U postretiranim grupama, SDE1 ekstrakt je uticao na promene intenziteta kroz povećanje aktivnosti Px, dok su SDE5 i SFE smanjili aktivnost Px u EAC ćelijama.

Tabela 32. Uticaj ekstrakta *S. montana* na bihemijske parametre u ćelijama EAC

	Aplikacija ekstrakta	EAC kontrola	SDE1	SDE5	SFE1	SFE5
XOD	Pretretman	0,156±0,009	0,142±0,004	0,151±0,005	0,807±0,138 ^a	0,822±0,057 ^a
	Tretman		0,104±0,011 ^a	0,836±0,069 ^a	1,035±0,064 ^a	1,012±0,014 ^a
	Posttretman		0,220±0,014 ^a	0,102±0,005 ^a	0,097±0,123 ^a	0,101±0,841 ^a
CAT	Pretretman	0,503±0,013	0,585±0,019 ^a	0,429±0,002 ^a	0,233±0,016 ^a	0,136±0,002 ^a
	Tretman		0,636±0,027 ^a	0,138±0,002 ^a	0,194±0,006 ^a	0,191±0,003 ^a
	Posttretman		0,316±0,008 ^a	0,698±0,052 ^a	0,713±0,002 ^a	0,742±0,041 ^a
Px	Pretretman	0,325±0,023	0,302±0,016	0,432±0,010 ^a	0,618±0,003 ^a	0,881±0,019 ^a
	Tretman		0,120±0,006 ^a	0,875±0,035 ^a	0,715±0,004 ^a	0,710±0,002 ^a
	Posttretman		0,474±0,035 ^a	0,100±0,008 ^a	0,114±0,023 ^a	0,118±0,007 ^a
GR	Pretretman	2,187±0,107	2,115±0,165	3,012±0,105 ^a	4,957±0,135 ^a	5,707±0,667 ^a
	Tretman		1,202±0,095 ^a	5,627±0,363 ^a	5,172±0,111 ^a	5,195±0,024 ^a
	Posttretman		3,930±0,217 ^a	1,195±0,002 ^a	1,254±0,028 ^a	1,284±0,185 ^a
GSHPx	Pretretman	0,779±0,048	0,796±0,024	0,933±0,022 ^a	1,302±0,049 ^a	1,697±0,038 ^a
	Tretman		0,474±0,034 ^a	1,91±0,345 ^a	2,043±0,020 ^a	2,007±0,031 ^a
	Posttretman		1,131±0,151 ^a	0,395±0,065 ^a	0,401±0,068 ^a	0,421±0,005 ^a
GSH	Pretretman	1,603±0,110	1,417±0,056 ^a	1,358±0,029 ^a	0,871±0,033 ^a	0,884±0,043 ^a
	Tretman		1,513±0,058 ^a	0,926±0,069 ^a	0,621±0,011 ^a	0,635±0,005 ^a
	Posttretman		1,105±0,063 ^a	1,801±0,045 ^a	1,799±0,029 ^a	1,842±0,003 ^a
LPx	Pretretman	0,032±0,008	0,030±0,009	0,041±0,003	0,100±0,007 ^a	0,080±0,005 ^a
	Tretman		0,022±0,005	0,419±0,521	0,077±0,005	0,083±0,005
	Posttretman		0,056±0,018 ^a	0,011±0,065 ^a	0,019±0,058 ^a	0,014±0,001 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od šest miševa. a- statistički značajna razlika u odnosu na EAC kontrolnu grupu

Aktivnost enzima GR u ćelijama tumora je bila signifikantno različita nakon primene ekstrakata. SFE ekstrakti i SDE5 su u pretretiranim grupama doveli do povećanja aktivnosti GR, pa je najveće povećanje zabeleženo u grupi miševa pretretiranih sa SFE5. Započinjanjem terapije u momentu implantacije tumora takođe je došlo do značajnih izmena u aktivnosti enzima u EAC ćelijama. Tretmani sa SFE i SDE5 su rezultirali povećanjem, dok je tretiranje miševa sa SDE1 dovelo do smanjenja aktivnosti GR u ćelijama EAC. U posttretiranim grupama životinja, primenom ekstrakta SDE1, zabeleženo je povećanje, dok je postretiranjem sa ostalim ekstraktima, došlo do smanjenja.

Aktivnost GSHPx u EAC ćelijama, kada su ekstrakti SDE5 i SFE aplicirani pre implantacije tumora, povećana je u odnosu na kontrolnu grupu. Uticaj ekstrakata apliciranih kao tretman, takođe je bio signifikantan. Ustanovljeno je povećanje aktivnosti u svim tretiranim grupama (SFE1, SFE5 i SDE5), osim grupe tretirane sa SDE1, gde je značajno smanjena aktivnost GSHPx. Posttretman životinja sa ekstraktima SFE1, SFE5 i SDE5 je uslovio smanjenje i sa SDE1 povećanje aktivnosti GSHPx.

U odnosu na kontrolnu EAC grupu, količina GSH se redukovala u svim grupama koje su pretretirane, s tim da je značajnija redukcija postignuta sa SFE ekstraktima. Dalje, tretiranjem životinja sa ekstraktima, takođe je zabeleženo smanjenje količine GSH, i SFE ekstrakti su i u tretmanu značajnije redukovali količinu GSH u odnosu na SDE ekstrakte. U posttretmanima, smanjenje je zabeleženo samo u slučaju SDE1, dok je sa SFE ekstraktima i SDE5 ustanovljeno povećanje količine GSH.

Intenzitet lipidne peroksidacije je u grupi sa EAC bio mali. Primenom ekstrakata u pretretmanu, samo su SFE ekstrakti doveli do značajnih povećanja intenziteta lipidne peroksidacije. Tretman ekstraktima nije uticao na statistički značajne promene u intenzitetu LPx. Postretiranjem miševa ekstraktima, promene intenziteta LPx su bile značajne, pa je posttretman sa SDE1 rezultirao povećanjem, dok su ostali izazvali smanjenje intenziteta LPx.

U literaturi nije pronađena nijedna studija u kojoj je sprovedeno *in vivo* ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakata *S. montana*, ali je sprovedeno ispitivanje antiproliferativne aktivnosti različitih ekstrakata *S. montana* na HeLa (humani epidermoidni karcinom cerviksa), HT-29 (humani adenokarcinom kolona) i MCF-7 (humani adenokarcinom dojke) ćelijskim linijama. U okviru iste studije potvrđen je jak antioksidantni kapacitet *S. montana* ekstrakata i njihova

antiproliferativna svojstva, koja su bila različita u zavisnosti od vrste ekstrakta. Autori su izneli pretpostavku da *S. montana*, kao jak antioksidant, može da utiče na redoks stanje ćelije što vodi smanjenoj ćelijskoj proliferaciji. Nizak nivo slobodnih kiseoničnih vrsta je neophodan za promociju ćelijske proliferacije i redoks promene igraju značajnu ulogu u signalnom transdukcionom putu, koji je važan za regulaciju rasta ćelija (Četojević-Simin i sar., 2004).

Takođe, sprovedeno je ispitivanje drugih vrsta iz genusa *Satureja*. Za etarsko ulje *S. bakhtiarica* utvrđeno je da pokazuje visoku antitumorsku aktivnost na kancerskim ćelijskim linijama (humani kancer grudi (MDA-MB-231) i ovarijuma (SKOV3)) (Tahmasbpour i sar., 2015), dok etarsko ulje izolovano iz *S. khuzistanica* značajno redukuje ćelijsku vijabilnost i/ili povećava citotoksičnost MCF7 (adenokarcinom dojke), SW480 (humani adenokarcinom kolona) i Vero (izolat iz bubrega majmuna) ćelijskih linija (Yousefzadi i sar., 2014).

U studiji u okviru koje je poređen antiproliferativni i antioksidantni efekat etarskih ulja dve vrste iz genusa *Satureja* (*S. thymbra* i *S. parnassica*) i njihovih pojedinačnih komponenti (karvakrol, timol, *p*-cimen i γ -terpinen), ustanovljeno je karvakrol i timol ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost na A549 (adenokarcinom pluća), HepG2 i Hep3B (hepatocelularni karcinomi), dok *p*-cimen i γ -terpinen nisu ispoljili značajnu antiproliferativnu potentnost. Autori su sugerisali da antiproliferativna potentnost etarskih ulja može biti pripisana njihovim glavnim komponentama - karvakrolu i timolu (Fitsiou i sar., 2016).

Kroz mnogobrojne sprovedene studije dokazano je da karvakrol može da ispolji jaku antitumorsku aktivnost. Ustanovljeno je da može da suprimira rast B16 melanoma (He i sar., 1997) i humanog karcinoma larinksa Hep-2 ćelija (Stammati i sar., 1999), a bio je aktivan i kod tumora pluća pacova indukovano sa 7,12-dimetilbenz- α -antracenom (Zeytinoglu i sar., 1998). Dodatni dokazi o njegovoj antitumorskoj aktivnosti *in vivo* su dobijeni u studijama u kojima je ustanovljeno da inhibiše DNK sintezu kod miševa sa mioblastomom humanog N-ras onkogenom (neuroblastom RAS viral (v-ras) onkogen homolog) (Zeytinoglu i sar., 2003). Nadalje, studije su pokazale dozno-zavisno smanjenje broja ćelija, sadržaja ukupnih proteina i povećanu degeneraciju morfologije kod humanih ćelija plućnog kancera (A549) (Koparal i Zeytinoglu 2003). Eksperimenti su potvrdili sličan uticaj karvakrola na lejomiosarkom ćelije (Karkabounas i sar., 2006) i ćelije hronične mijeloidne leukemije, K562 (Horvathova i sar. 2007).

Mehanizam odgovoran za ispoljavanje antitumorske aktivnosti nije ustanovljen i razjašnjen u potpunosti. Kroz studije se sugerije da za ispoljavanje antitumorske aktivnosti nije odgovorna samo citotoksičnost, već i moguća prenilacija nekoliko proteina uključujući ras (Zeytinoglu i sar. 2003), kao i antioksidantna priroda karvakrola (Ipek i sar. 2003).

Pokazano je da suplementacija karvakrolom ispoljava antitumorski učinak na rak jetre indukovan dietilnitrozaminom, kod Wistar albino pacova, najverovatnije štiteći antioksidantni odbrambeni sistem i prevenirajući lipidnu peroksidaciju i oštećenje jetrinih ćelija (Jayakumar i sar., 2012). Skorija istraživanja su pokazala da je antiproliferativni efekat karvakrola na metastatske ćelije kancera grudi (MDA-MB 231) baziran na aktivaciji klasičnih odgovora koji pripadaju mitohondrijalnom putu apoptoze (Arunasree, 2010). Takođe, ustanovljeno je da karvakrol može da indukuje apoptozu u ćelijskim linijama hepatocelularnog karcinoma i rezultati sugerišu da bi indukcija apoptoze mogla da se vrši direktnom aktivacijom mitohondrijalnog puta, i mitogenom-aktivirana proteinska kinaza može igrati značajnu ulogu u antitumorskom efektu karvakrola (Yin i sar., 2012).

U jednoj od studija upoređen je citotoksični efekat šest monoterpena (karvakrol, timol, eugenol, karveol, karvon i izopulegol). *In vitro* antitumorska aktivnost testiranih monoterpena je evaluirana na pet ćelijskih linija kancera i utvrđeno je da je karvakrol ispoljio najjači citotoksični efekat među ispitanim monoterpenima. U istoj studiji je ispitan i potencijalni sinergistički efekat monoterpena sa dva konvencionalna leka (metotreksat i cisplatin). Zabeleženo je da se interakcijom monoterpena sa konvencionalnim lekovima ispoljava značajan sinergistički efekat (Jaafari i sar., 2012).

Potencijalna antitumorska aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta bogatih karvakrolom i njegovim izomerom timolom, kao i pojedinačnih komponenti - karvakrola i timola, evaluiran je u jednoj od studija *in vitro* testovima na pet ćelijskih linija. Utvrđen je dominantniji citotoksičan efekat karvakrola i ulja biljne vrste bogate karvakrolom. Usled dominantnijeg citotoksičnog efekta karvakrola, ova komponenta je odabrana i za ispitivanje antitumorskog efekta *in vivo*, u okviru iste studije. Utvrđeno je da je davanjem karvakrola životinjama (sa prethodno implantiranim p815 tumorskim ćelijama) u toku sedam dana, došlo do redukcije zapremine tumora, smanjenog gubitka mase i povećanja stope preživljavanja, to jest odlaganja uginuća (Jaafari i sar., 2009).

Tokom razvoja tumora, ćelije usled konstatne izloženosti oksidativnom stresu postaju rezistentne i razvijaju jake mehanizme antioksidantne zaštite. Stoga je zabeleženo da je intenzitet LPx, kao i aktivnost XOD i CAT u ćelijama EAC mala (Ćebović, 2008; Vulić i sar., 2013). Međutim, nakon primene pojedinih ekstrakata ispitivanih u okviru ove disertacije, uočeno je povećanje aktivnosti XOD, sniženje aktivnosti CAT i povećanje intenziteta LPx. Zapaženo je smanjenje vrednosti GSH u ćelijama EAC u svim grupama ispitivanih životinja (osim posttretiranih sa SDE5, SFE1 i SFE5), kao i povećanje GR i GSHPx u malignim ćelijama, nakon primene ekstrakata *S. montana*. S obzirom da ovi enzimi predstavljaju markere oksidativnog stresa (povećanje aktivnosti GR i GSHPx), potencijalno objašnjenje može biti da su usled primene pojedinih ekstrakata, maligne ćelije bile izložene oksidativnom stresu.

Može se uočiti da su SFE ekstrakti primenjeni kao pretretman i tretman ispoljili dominantniji efekat od SDE. Sadržaj karvakrola u SFE ekstraktima je znatno veći u odnosu na SDE, pa to može biti razlog većeg uticaja na antioksidantni status EAC ćelija. Takođe, kada su bili primenjeni kao tretman, SFE ekstrakti su doveli do redukcije zapremine ascitesa i (statistički neznačajnog) smanjenja broja malignih ćelija. S druge strane, SFE ekstrakti primenjeni kao pretretman nisu uticali na smanjenje broja malignih ćelija, pa se ne mogu razmatrati kao citotoksični ili citostatski agensi.

U grupama životinja koje su posttretirane sa SFE1, SFE5 i SDE5, moguće je da je došlo do većeg stepena razvoja implantiranog tumora pre početka primene ekstrakata. Tome u prilog idu i utvrđene vrednosti parametara u prethodnom poglavlju - povećana zapremina ascitesa i povećan broj ćelija. Na osnovu rezultata aktivnosti enzima (XOD, CAT, Px, GSHPx, GR), količine GSH i intenziteta LPx, kao i rezultata zapremine ascitesa i broja ćelija, u pomenutim grupama životinja, može se konstatovati da posttretiranje životinja nije odgovarajući terapijski pristup za EAC. Nameće se zaključak da je od velike važnosti kada se ekstrakt aplicira eksperimentalnim životinjama.

Imajući u vidu prethodno navedene literaturne podatke o utvrđenim antitumorskim delovanjima, posebno karvakrola (*in vitro* i *in vivo*) i etarskog ulja *S. montana* (*in vitro*), i rezultate dobijene u okviru ovog poglavlja, može se konstatovati neophodnost i značaj sprovođenja ispitivanja na *in vivo* modelima, radi potpunije evaluacije potencijalne citotoksične aktivnosti biljnih proizvoda.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ove disertacije sprovedena su ispitivanja primene savremenih metoda za ekstrakciju *S. montana* (rtanjskog čaja), fizičko-hemijskih osobina dobijenih ekstrakata, kao i biološke aktivnosti odabranih ekstrakata u *in vivo* modelima. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ✓ Postupkom hidrodestilacije je izdvojeno etarsko ulje rtanjskog čaja, koje je analizirano u pogledu hemijskog sastava primenom gasne hromatografije. Identifikovano je 20 komponenti među kojima su najzastupljeniji oksidovani monoterpeni i njihov predstavnik karvakrol sa relativnim udelom 74,93% (GC/MS), odnosno 54,08% (m/m) (GC/FID), i prinosom destilacije 0,51 g/100 g droge. U izolovanom etarskom ulju, koje pripada fenolnom hemotipu, komponente koje su prisutne u većem procentu od 1% su: *p*-cimen (9,99%), γ -terpinen (4,66%), borneol (1,68%) i *trans*-kariofilen (1,69%).
- ✓ Ekstrakcijom superkritičnim ugljendioksidom pri pritiscima 100 - 350 bar (sa korakom od 25 bar) i na temperaturama 40, 50 i 60 °C, pri konstantnom vremenu ekstrakcije (4,5 h) i protoku ugljendioksida (0,194 kg/h), ostvareni su prinosi: 1,88 - 3,09; 1,54 - 4,04 i 0,97 - 4,30% (m/m) za ekstrakte *S. montana* dobijene pri različitim pritiscima i temperaturama 40, 50 i 60 °C, redom. Zapaženo je da se sa povećanjem gustine CO₂ povećava prinos ekstrakcije (pri konstantnoj temperaturi), usled povećanja rastvorne moći ekstragensa, pa je najveći prinos zabeležen pri uslovima 350 bar (60 °C), dok je najmanji pri 100 bar (60 °C). Poređenjem sa prinosom ostvarenim prilikom klasične metode (hidrodestilacije) izdvajanja ulja (0,95%), evidentna je prednost upotrebe superkritične ekstrakcije ugljendioksidom.
- ✓ Superkritični ekstrakti su ispitani u pogledu hemijskog sastava primenom GC/MS analize. Utvrđeno je prisustvo 22 komponente koje pripadaju grupama: monoterpenski ugljovodonici, oksidovani monoterpeni, seskviterpeni i alifatični ugljovodonici. Oksidovani monoterpeni su zastupljeni sa najvećim relativnim udelom: 59,98 - 83,46%, 61,61 - 82,23 i 62,77 - 83,33% u ekstraktima dobijenim pri različitim pritiscima i na temperaturama 40, 50 i 60 °C. Najzastupljeniji konstituent ekstrakata je karvakrol čiji je relativni udeo u opsegu 54,30 - 79,61%. Sledeća najzastupljenija komponenta superkritičnih ekstrakata je *p*-cimen (3,64 -

10,24%). Druge komponente koje su prisutne u ekstraktima sa niskim relativnim udelom su: borneol, *trans*-kariofilen, kariofilen-oksidi, γ -terpinen i linalool.

- ✓ Primenom GC/FID metode analize utvrđen je kvantitativni sadržaj najdominantnijeg konstituenta u ekstraktima. Ekstrakt sa najvećim sadržajem karvakrola je dobijen pri uslovima 350 bar i 50 °C (60,82%), dok je najveći prinos karvakrola ostvaren pri pritiscima 325 i 350 bar i temperaturi 60 °C i iznosio je 2,4 g/100 g droge. Primenom ugljendioksida na većim pritiscima se ostvaruje efikasnija ekstrakcija karvakrola iz droge, kao i proizvodnja ekstrakata sa većim sadržajima karvakrola.
- ✓ Radi ispitivanja mogućnosti poboljšanja prinosa ekstrakcije, dobijanja ekstrakata sa većom koncentracijom željenih komponenti, kao i sa unapređenom antioksidantnom aktivnošću, primenjeni su različiti predtretmani biljnog materijala neposredno pre ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom. Biljni materijal je predtretiran: (1) vodom, (2) etanolom, (3) ultrazvukom i (4) ugljendioksidom pod pritiskom. Vršeno je poređenje sa kontrolnom probom, koja je dobijena pri istim uslovima ekstrakcije (100 bar, 40 °C), ali bez primene predtretmana.
- ✓ Prinosi ekstrakcija *S. montana* kada su primenjeni različiti predtretmani su bili u intervalu 1,68 - 2,35% (m/m). Predtretmani vodom i etanolom su uticali na povećanje prinosa ekstrakcije za 25 i 17% u odnosu na kontrolnu probu, dok su predtretmani ultrazvukom i ugljendioksidom pri visokom pritisku, doveli do smanjenja prinosa ekstrakcije. Dodatno, imajući u vidu fiziološku bezbednost i nisku cenu vode, povećanje sadržaja vlage u materijalu (predtretman vodom) pre ekstrakcije se čini izuzetno adekvatnim postupkom za povećanje prinosa ekstrakcije *S. montana*.
- ✓ Hemijski sastav ekstrakata je ispitan pomoću GC/MS analize. Najzastupljenija komponenta je bila karvakrol sa relativnim udelom 67,58 - 86,29%. Ustanovljeno je da se primenom svih predtretmana obezbeđuje veći relativni udeo karvakrola u ekstraktima. Najpovoljniji uticaj na sadržaj karvakrola u ekstraktima je zabeležen kod predtretmana ultrazvukom - sadržaj karvakrola je uvećan za 27,69% u odnosu na kontrolnu probu.
- ✓ Primenom GC/FID analize je potvrđeno da je ultrazvučni predtretman najadekvatniji izbor za dobijanje ekstrakata sa najvećim sadržajem karvakrola (66,46%) (GC/FID), dok je približan sadržaj utvrđen kod ekstrakta predtretiranog ugljendioksidom pod pritiskom (66,10%)

(GC/FID). Međutim, najveći prinos ekstrakcije karvakrola iz 100 g droge postignut je primenom etanola i vode kao predtretmana. Primenom etanola postignuta je efikasnija ekstrakcija karvakrola za 41,43% u odnosu na E0, dok je u odnosu na predtretmane ugljendioksidom i ultrazvukom ekstrakcija pospešena za 22,50 i 26,83%.

- ✓ Uticaj predtretmana na ostale komponente prisutne u ekstraktima (*p*-cimen, borneol, *trans*-kariofilen) je bio suprotan od uticaja na karvakrol, pa je primenom predtretmana značajno smanjen njihov sadržaj. Predtretman vodom kojim se obezbeđuje najveći prinos ekstrakcije, kao i relativni udeo karvakrola u ekstraktu, najnepovoljnije je uticao na pomenute komponente, pa je u ovom ekstraktu i izostalo prisustvo pojedinih lipofilnih komponenti. Imajući u vidu znatno veću hidrofobnost ovih komponenti u odnosu na karvakrol, jasno je zašto povećanje vlage u materijalu utiče pozitivno na karvakrol, dok za ostale lipofilne komponente nije odgovarajuće.
- ✓ U ekstraktima je određena antioksidantna aktivnost (izražena kao IC₅₀ vrednost). Utvrđeno je da predtretmani utiču negativno na antioksidantnu aktivnost ekstrakata, pa je najniža IC₅₀ vrednost zabeležena u kontrolnoj probi (11,9 µg/mL). S obzirom da je sadržaj karvakrola najniži u kontrolnoj probi, može se zaključiti da ovaj monoterpen nije ključni nosilac dejstva ekstrakata, već da je za to odgovorno i prisustvo manje zastupljenih komponenti (koje su u najvećem relativnom udelu prisutne u kontrolnoj probi). Stoga, sinergističko delovanje konstituenata ekstrakata je zaduženo za ispoljavanje antioksidantne ekstrakata *S. montana*. Poređenjem sa IC₅₀ vrednostima poznatih antioksidanata, može se konstatovati da ekstrakti *S. montana* imaju potencijal primene kao prirodni antioksidanti.
- ✓ Primenom subkritične vode uz variranje temperature (79,15 - 220,5 °C) i vremena ekstrakcije (5,9 - 34,1 min) pri konstantnom pritisku 30 bar, dobijeni su ekstrakti *S. montana*. Ekstrakti su ispitani u pogledu sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, kao i antioksidantne aktivnosti. Primenom metode odzivne površine izvršena je optimizacija parametara ekstrakcionog procesa, radi utvrđivanja uslova ekstrakcije kojima se obezbeđuje dobijanje ekstrakta *S. montana* sa visokim sadržajem fenola, flavonoida i visokim antioksidantnim kapacitetom. Utvrđeno je da se ekstrakcijom subkritičnom vodom temperature 200 °C i vremena ekstrakcije 20,8 min, obezbeđuje proizvodnja ekstrakta *S. montana* sa sadržajem fenola 11,24 g GAE/100 g, sadržajem flavonoida 6,84 g CE/100 g i IC₅₀ vrednošću 2,8 µg/mL.

- ✓ Primenom GC/MS metode, ispitan je hemijski sastav isparljive frakcije ekstrakata *S. montana* dobijenih subkritičnom vodom. Utvrđeno je prisustvo karvakrola u opsegu 14,677 - 25,487 mg/100 g). Najveći sadržaj je ostvaren primenom subkritične vode pri uslovima 100 °C/10min. Utvrđeno je da se sa povećanjem temperature procesa smanjuje sadržaj karvakrola u ekstraktima, kao i sa povećanjem vremena ekstrakcije. Poređenjem sa prinosom karvakrola u ekstraktima dobijenim superkritičnim ugljendioksidom, evidentno je da je ugljendioksid u superkritičnom stanju adekvatniji ekstragens za proizvodnju ekstrakata bogatih karvakrolom u odnosu na subkritičnu vodu.
- ✓ Osim karvakrola, utvrđeno je prisustvo timokinona, konstituenta za koji su utvrđene veoma značajne farmakološke aktivnosti. Utvrđeni sadržaj timokinona u ekstraktima je bio 0,648 - 3,327 mg/100 g droge. Zapaženo je da se sa povećanjem temperature procesa i vremena ekstrakcije njegov sadržaj povećava u ekstraktima, pa je najveći zabeležen u ekstraktu dobijenom na 220 °C i 20 min. Imajući u vidu da: (1) timokinon nije bio prisutan u etarskom ulju (izolovanom procesom hidroddestilacije), kao ni u ekstraktima dobijenim superkritičnim ugljendioksidom; (2) konverzija karvakrola u timokinon je naučno potvrđena; (3) uticaji parametara procesa na sadržaje karvakrola i timokinona su suprotni, to jest niže temperature i vreme ekstrakcije pogoduju karvakrolu, dok više temperature i duže vreme ekstrakcije pogoduju timokinonu; i (4) prilikom ekstrakcije subkritičnom vodom može doći do stvaranja novih antioksidanata, pretpostavka je da timokinon nije bio prisutan u početnom biljnom materijalu, već je generisan tokom ekstrakcije subkritičnom vodom, konverzijom iz karvakrola. Stoga je ustanovljeno da je odabirom parametara ekstrakcije subkritičnom vodom moguće proizvoditi ekstrakte *S. montana* željenog sastava, to jest sa visokim sadržajem polifenolnih komponenti, uz prisustvo lipofilnih farmakološki izuzetno značajnih konstituenata (karvakrola i timokinona).
- ✓ Radi evaluacije potencijalne prednosti primene subkritične vode u odnosu na klasičnu metodu ekstrakcije, dobijeni su ekstrakti *S. montana* uz variranje koncentracije ekstragensa (etanol/voda) i temperature procesa (vreme ekstrakcije 120 min). U dobijenim ekstraktima su utvrđeni sadržaj ukupnih fenola (3,91 - 7,18 g GAE/100 g), flavonoida (3,22 - 6,25 g CE/100 g) i antioksidantna aktivnost ekstrakata (IC₅₀ vrednost 13 - 30 µg/mL). Ustanovljena je prednost primene subkritične vode u pogledu sadržaja polifenolnih komponenti, kao i

antioksidantne aktivnosti. Dodatno, kraće vreme ekstrakcije, uz nisku cenu vode i bezbednost primene u odnosu na etanol (koji je skuplji i zapaljiv rastvarač) jasno ukazuju na prednost primene subkritične vode i potrebu za implementacijom ove tehnologije u proizvodne procese, kao adekvatne zamene postojećih konvencionalnih metoda ekstrakcije.

- ✓ Primenom klasične metode ekstrakcije (smešom etanol-voda) dobijen je tečni ekstrakt rtanjskog čaja. Radi dobijanja suvog ekstrakta (praha) rtanjskog čaja, tečni ekstrakt je sušen *spray drying* tehnologijom sušenja. Ispitan je uticaj različitih koncentracija nosača (maltodekstrina) (10, 30 i 50%) na karakteristike dobijenih suvih ekstrakata.
- ✓ Sušenje je sa sve tri koncentracije maltodekstrina bilo uspešno, sa prinosom većim od 66% i zapaženo je da se dodatkom maltodekstrina povećava prinos procesa, usled povećanja sadržaja čvrste materije u napojnoj smeši. Ekstrakti dobijeni procesom *spray drying* okarakterisani su fizičko-hemijski u pogledu sadržaja vlage, higroskopnosti, nasipne zapremine, indeksa rastvorljivosti u vodi i indeksa apsorpcije vode. U svim ekstraktima je sadržaj vlage bio manji od 5%, čime je ispunjen zahtev kvaliteta suvih ekstrakata. Higroskopnost suvih ekstrakata je merena nakon 48 h i 7 dana izlaganja ekstrakata sredini sa visokom relativnom vlažnošću. Najveći procenat apsorbovane vlage je zabeležen u suvom ekstraktu sa najnižim sadržajem maltodekstrina. S obzirom da je niska higroskopnost osobina zbog koje se maltodekstrin smatra efikasnim nosačem, očekivano je da se povećanjem njegove koncentracije smanjuje higroskopnost suvih ekstrakata. Nasipna zapremina prahova *S. montana* je bila u opsegu 82,4 - 138,0 mg/mL i zapaženo je da se povećava sa količinom dodatog maltodekstrina. WSI i WAI su parametri kojima je potvrđena mogućnost primene suvih ekstrakata *S. montana* rastvaranjem u vodi, jer su obe vrednosti bile odgovarajuće za uspešnu primenu ispitivanih ekstrakata. Zabeleženo je da se povećanjem količine nosača povećava vrednost WSI i smanjuje WAI, što je opravdano povećanim prisustvom maltodekstrina koji se lako rastvara u vodi.
- ✓ U dobijenim suvim ekstraktima je određen sadržaj ukupnih fenola (100,94 - 153,61 mg GAE/100 g) i ukupnih flavonoida (84,29 - 118,69 mg CE/100 g). Zapaženo je da se dodatkom najmanje koncentracije maltodekstrina u napojnu smešu obezbeđuje prah sa najvećim sadržajem polifenolnih komponenti. Postupkom hidrodestilacije je iz suvih ekstrakata izolovano etarsko ulje, koje je ispitano primenom gasne hromatografije. Najzastupljenija

komponenta etarskog ulja je bila karvakrol, sa najvećim udelom u ekstraktu sušenim sa 10% maltodekstrina, što upućuje na zaključak da sa povećanjem koncentracije nosača dolazi do „razblaženja“ i smanjenja sadržaja kako polifenolnih komponenti, tako i karvakrola u izolovanom etarskom ulju.

- ✓ U pogledu bioloških aktivnosti, ispitane su antioksidantna i ACE inhibitorna aktivnost suvih ekstrakata. Utvrđeno je da ekstrakt sa 10% maltodekstrina ispoljava najjaču antioksidantnu aktivnost, što je u korelaciji sa najvećim sadržajem polifenolnih komponenti, kao i sadržajem ulja bogatog karvakrolom. Takođe, isti ekstrakt, kao i ekstrakt sa 30% maltodekstrina ispoljavaju približno istu ACE inhibitornu aktivnost, u odnosu na ekstrakt sa 50% maltodekstrina, stoga se mogu razmatrati kao pomoćna sredstva kod hipertenzije.
- ✓ Izvršena je senzorna evaluacija suvih ekstrakata kroz ocenjivanje mirisa i ukusa, od strane 50 volonterki. Više od 52% volonterki je ocenilo prahove kao prihvatljive za dalju upotrebu kao sastojka prehrambenih proizvoda, to jest kao prijatnog mirisa. Hladni rastvor ekstrakata je ocenjen kao prihvatljiv za primenu od strane više od 71% volonterki. Analizom rezultata je ustanovljeno da prihvatljivost ekstrakata za upotrebu raste sa povećanjem procenta maltodekstrina u njima.
- ✓ Za ispitivanje *in vivo* aktivnosti ekstrakata odabrana su dva ekstrakta *S. montana*: (1) ekstrakt dobijen ekstrakcijom superkritičnim ugljendioksidom (uslovi ekstrakcije: 350 bar, 50 °C) u kom je ustanovljen najveći sadržaj karvakrola i (2) suvi ekstrakt dobijen *spray drying* tehnologijom sušenja sa najnižom koncentracijom maltodekstrina (10%) za koju je utvrđeno da je najadekvatniji za dobijanje suvog ekstrakta *S. montana* sa najvećim sadržajem polifenolnih komponenti, sadržajem etarskog ulja i u pogledu antioksidantne i ACE inhibitorne aktivnosti. Osim toga, ovaj ekstrakt ispunjava i ostale fizičko-hemijske parametre, kojima se osigurava kvalitet (prinos sušenja, sadržaj vlage, WAI, WSI). Oba ekstrakta su ispitana u pogledu antioksidantne aktivnosti u *in vitro* modelu pomoću DPPH testa, i ustanovljen je značajniji antioksidantni učinak suvog ekstrakta u odnosu na superkritični ekstrakt.
- ✓ Ispitan je uticaj ekstrakata *S. montana* u sistemu oštećenja jetre indukovano primenom ugljentetrahlorida. U cilju utvrđivanja potencijalnog protektivnog uticaja ekstrakata ispitani su sadržaj hepatične DNK, hidroksiprolina i bilirubina, kao i aktivnost serumskih parametara

AST i ALT, pre i nakon intoksikacije sa ugljentetrahloridom. Takođe, ispitan je uticaj ekstrakata *S. montana* na aktivnost antioksidantnih enzima kod oksidativnog stresa indukovano primenom ugljentetrahlorida, kroz analizu aktivnosti XOD, CAT, Px, GR, GSHPx, kao i sadržaj GSH i intenzitet LPx. U poređenju sa kontrolnom grupom ekstrakti su bez značajne razlike u međusobnom delovanju uspeli da suprimiraju štetne efekte primenjenog hepatotoksina, zaštite jetru od oksidativnog oštećenja i održe nivoe antioksidantne zaštite (enzimske i neenzimske). S obzirom da nije uočena korelacija sa antioksidantnom aktivnošću u *in vitro* uslovima, kao ni sa sadržajem karvakrola u ekstraktima, može se pretpostaviti da je hepatoprotektivni učinak rezultat sinergističkog delovanja konstituenata ekstrakata.

- ✓ Ispitan je uticaj ekstrakata *S. montana* na ćelije Ehrlich-ovog ascitnog tumora, primenjenih kao pretretman, tretman i posttretman. Analiziran je uticaj na pojedine ćelijske parametre (zapremina ascitesa, broj i vijabilnost malignih ćelija) i na antioksidantni status ćelija Ehrlich-ovog ascitnog tumora. Antioksidantni status je praćen merenjem aktivnosti antioksidantnih enzima (XOD, CAT, Px, GR i GSHPx), kao i sadržaja GSH i intenziteta LPx u EAC ćelijama. Ustanovljeno je da primenjeni ekstrakti ne pokazuju citotoksičnu, niti citostatsku aktivnost, s obzirom da se uprkos smanjenju zapremine ascitesa broj malignih ćelija uvećava. Samo SFE ekstrakti su, primenjeni kao tretman, doveli do blage redukcije (statistički neznačajne) broja ćelija, ukazujući na svoj potencijalni onkostatski efekat. Kroz analizu uticaja ekstrakata na antioksidantni status malignih ćelija može se pretpostaviti da su ćelije bile izložene jačem ili slabijem oksidativnom stresu usled primene ekstrakata, i da je vreme aplikacije ekstrakata izuzetno značajno. Međutim, uzimajući u obzir uticaj ispitivanih ekstrakata na broj malignih ćelija, samo SFE ekstraktima primenjenim u tretmanu se može pripisati onkostatska aktivnost, dok se ostali ne mogu razmatrati kao antitumorski agensi.

6. LITERATURA

1. Adamović D., Zeković Z., Vladić J., Vidović S., Radojković M. (2013) *Satureja montana* L. (rtanjski čaj) - mogućnosti dobijanja prirodnih proizvoda za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Saopštenje sa *Tesla Fest*, Novi Sad, Srbija.
2. Adhikari B., Howes T., Bhandari B.R., Troung V. (2004) Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modelling. *Journal of Food Engineering*, 62, 53-68.
3. Adhikari B., Howes T., Bhandari B.R., Truong V. (2003) Characterization of the surface stickiness of fructose-maltodextrin solutions during drying. *Drying Technology*, 21, 17-34.
4. Aeschbach R., Löliker J., Scott B.C., Murcia A., Butler J., Halliwell B., Aruoma O.I. (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 31-36.
5. Agrawal S. S., Saraswati S., Mathur R., Pandey M. (2011) Antitumor properties of Boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1924-1934.
6. Akhondian J., Kianifar H., Raoofziaee M., Moayedpour A., Toosi M.B., Khajedaluae M. (2011) The effect of thymoquinone on intractable pediatric seizures (pilot study) *Epilepsy Research*, 93, 39-43.
7. Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., Dehghani, F. (2012) Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 65, 18-24.
8. Amat N., Upur H., Blažeković B. (2010) *In vivo* hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 478-484.
9. Ameri M., Maa Y.F. (2006) Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. *Drying Technology*, 24, 763-768.
Andrade M.A., Graças Cardoso M., Andrade J., Silva L.F., Teixeira M.L., Valério Resende J.M., Silva Figueiredo A.C., Barroso J.G. (2013) Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. *Antioxidants*, 2, 384-397.
11. Angel R.C.M., Espinosa-Muñoz L.C., Aviles-Aviles C., González-García R., Moscosa-Santillán M., Grajales-Lagunes A., Abud-Archila M. (2009) Spray-drying of passion fruit juice using lactose-maltodextrin blends as the support material. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 1011-1018.
12. Aristatile B., Al-Numair K.S., AlAssaf A., Veeramani C., Pugalendi K.V. (2015) Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripheral lymphocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 29, 497-507.
13. Aristatile B., Al-Numair K.S., Al-Assaf A.H., Pugalendi K.V. (2011) Pharmacological effect of carvacrol on D-galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single-cell gel electrophoresis. *Journal of Natural Medicines*, 65, 568-577.
14. Aristatile B., Al-Numair K.S., Veeramani C., Pugalendi K.V. (2009) Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in d-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23, 757-765.

15. Arunasree K.M. (2010) Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17, 581-588.
16. Aruoma O.I. (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 199-212.
17. Assaei R., Zal F., Mostafavi-Pour Z., Dabbaghmanesh M.H., Geramizadeh B., Omrani G.H.R., Pajouhi N. (2014) Hepatoprotective effect of *Satureja khuzestanica* essential oil and vitamin E in experimental hyperthyroid rats: evidence for role of antioxidant effect. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 39, 459.
18. Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014.
19. Ayala R.S., De Castro M.L. (2001) Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry*, 75, 109-113.
20. Aydin E., Taşdemir Ş., Hacımüftüoğlu F., Türkez H. (2016) Anticancer, antioxidant and cytotoxic potential of thymol *in vitro* brain tumor cell model. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. DOI: [10.2174/1871524916666160823121854](https://doi.org/10.2174/1871524916666160823121854)
21. Aydin Y., Kutlay Ö., Ari S., Duman S., Uzuner K., Aydin S. (2007) Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta medica*, 73, 1365-1371.
22. Badary O.A., Taha R.A., Gamal El-Din A.M., Abdel-Wahab M.H. (2003) Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and Chemical Toxicology*, 26, 87-98.
23. Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J. (2004) Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21, 33-42.
24. Baker C. (Ed.) (1997) *Industrial Drying of Foods*. Springer Science & Business Media.
25. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
26. Balachandran S., Kentish S.E., Mawson R. (2006) The effects of both preparation method and season on the supercritical extraction of ginger. *Separation and Purification Technology*, 48, 94-105.
27. Balasuriya B.N., Rupasinghe H.V. (2011) Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *Functional Foods in Health and Disease*, 1, 172-188.
28. Banerjee S., Padhye S., Azmi A., Wang Z., Philip P. A., Kucuk O., Sarkar F. H., Mohammad R.M. (2010) Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer. *Nutrition and Cancer*, 62, 938-946.
29. Bankar S.K., Chaudhari A.V., Mahale N.B. Chaudhari S.R. (2014) A review on orodispersible tablets prepared using spray dried sustained release microparticles. *Journal of Advanced Drug Delivery*, 1, 82-95.
30. Baraldi M. (2011). *U.S. Patent No. 7,976,878*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
31. Barbosa-Filho J.M., Martins V.K., Rabelo L.A., Moura M.D., Silva M.S., Cunha E.V., Souza M., Almeida R, Medeiros I.A. (2006) Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE): A review between 1980-2000. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 421-446.

32. Bartosz G., Kołakowska A. (2010) Lipid oxidation in food systems. *Chemical, biological, and functional aspects of food lipids*. Eds. Z. Sikorski, A. Kolakowska. CRC Press, New York, USA, 163-184.
33. Beers R.F.J., Sizer I.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195,133-40.
34. Bergmayer U.H. Methods of enzymatic analysis. Weinheim: Verlag Chemie; 1970.
35. Beuthler E., Duron O., Kelly B. (1983) Improved methods for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-889.
36. Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.
37. Bezić N., Šamanić I., Dunkić V., Besendorfer V., Puizina J. (2009) Essential oil composition and internal transcribed spacer (ITS) sequence variability of four South-Croatian *Satureja* species (*Lamiaceae*). *Molecules*, 14, 925-938.
38. Bezić N., Skočibušić M., Dunkić V. (2005) Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica*, 64, 313-322.
39. Bhandari B. R., Datta N., Crooks R., Howes T., Rigby S. (1997b) A semi-empirical approach to optimise the quantity of drying aids required to spray dry sugar-rich foods. *Drying Technology*, 15, 2509-2525.
40. Bhandari B. R., Datta N., Howes T. (1997a) Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying Technology*, 15, 671-684.
41. Bhandari B. R., Hartel R. W. (2005) Phase transitions during food powder production and powder stability. in: C. Onwulata (Ed.), *Encapsulated and powdered foods*, Taylor and Francis, Boca Raton, USA, 261-292.
42. Bhandari B. R., Howes T. (1999) Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, 40, 71-79.
43. Bhandari B. R., Senoussi A., Dumoulin E. D., Lebert A. (1993) Spray drying of concentrated fruit juices. *Drying Technology*, 11, 1081-1092.
44. Bhattacharya S. (2015) Reactive oxygen species and cellular defense system. In: *Free Radicals in Human Health and Disease*, Rani V., Yadav U.C.S. (eds) (pp. 17-29). Springer India.
45. Blachier M., Leleu H., Peck-Radosavljevic M., Valla D. C., Roudot-Thoraval F. (2013) The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology*, 58, 593-608.
46. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91, 179-194.
47. Bocco A., Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. (1998) Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123-2129.
48. Boskabady M.H., Jafari Z., Pouraboli I. (2011) The effect of carvacrol on muscarinic receptors of guinea pig tracheal chains. *Phytotherapy Research*, 25, 530-535.
49. Broadhead J., Edmond Rouan S. K., Rhodes C. T. (1992) The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18, 1169-1206.

50. Buege J. A., Aust S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.
51. Cai, Y. Z., & Corke, H. (2000) Production and properties of spray-dried *Amaranthus betacyanin* pigments. *Journal of Food Science*, 65, 1248-1252.
52. Cal K., Sollohub K. (2010) Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 575-586.
53. Caliskan G., Dirim S.N. (2013) The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food and Bioprocess Processing*, 91, 539-548.
54. Caliskan G., Dirim S.N. (2016) The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder Technology*, 287, 308-314.
55. Canbek M., Uyanoglu M., Bayramoglu G., Senturk H., Erkasap N., Koken T., Uslu S., Demirustu C., Aral E., Baser K. H. C. (2008) Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine*, 15, 447-452.
56. Ćavar S., Maksimović M., Šolić M. E., Jerković-Mujkić A., Bešta R. (2008) Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111, 648-653.
57. Ćavar S., Šolić M. E., Maksimović M. (2013) Chemical composition and antioxidant activity of two *Satureja* species from Mt. Biokovo. *Botanica Serbica*, 37, 159-165.
58. Ćebović T. (2008) Uticaj ekstrakata imele (*Viscum album* L.) sa različitih domaćina na stvaranje slobodnih radikala kiseonika i aktivnost antioksidantnih enzima. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet.
59. Ćebović T., Maksimović Z. (2012) Hepatoprotective effect of *Filipendula hexapetala* Gilib. (*Rosaceae*) in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Phytotherapy Research*, 26, 1088-1091.
60. Ćetković G. S., Mandić A. I., Čanadanović-Brunet J. M., Djilas S. M., Tumbas V. T. (2007) HPLC screening of phenolic compounds in winter savory (*Satureja montana* L.) extracts. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30, 293-306.
61. Četojević-Simin D. D., Čanadanović-Brunet J. M., Bogdanović G. N., Ćetković, G. S., Tumbas, V. T., Djilas, S. M. (2004) Antioxidative and antiproliferative effects of *Satureja montana* L. extracts. *Journal of BUON*, 9, 443-449.
62. Chang Y. X., Yang J. J., Pan R. L., Chang Q., Liao Y. H. (2014) Anti-hygroscopic effect of leucine on spray-dried herbal extract powders. *Powder Technology*, 266, 388-395.
63. Chavez B. E., Ledebor A. M. (2007) Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*, 25, 1193-1201.
64. Chemat, F., & Strube, J. (Eds.) (2015) *Green extraction of natural products: theory and practice*. John Wiley & Sons.
65. Chen C. R., Lee Y. N., Chang C. M. J., Lee M. R., Wei I. C. (2007) Hot-pressurized fluid extraction of flavonoids and phenolic acids from Brazilian propolis and their cytotoxic assay *in vitro*. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 38, 191-196.
66. Cheuyglintase K. (2009) Spray drying of fruit juice with vegetable fibre as a carrier. University of Canterbury, Christchurch, New Zealand, URI: <http://hdl.handle.net/10092/3101>.

67. Chiu D. T., Stults F. H., Tappel A. L. (1976) Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 445, 558-566.
68. Cho S., Choi Y., Park S., Park T. (2012) Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 192-201.
69. Coelho J. P., Cristino A. F., Matos P. G., Rauter A. P., Nobre B. P., Mendes R. L., Barroso J. G., Mainar A., Urieta J. S., Fareleira J. M. N. A., Sovová H., Palavra A. F. (2012) Extraction of volatile oil from aromatic plants with supercritical carbon dioxide: experiments and modeling. *Molecules*, 17, 10550-10573.
70. Corrigan O. I. (1995) Thermal analysis of spray dried products. *Thermochimica Acta*, 248, 245-258.
71. Crampon C., Mouahid A., Toudji S. A. A., Lépine O., Badens E. (2013) Influence of pretreatment on supercritical CO₂ extraction from *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Supercritical Fluids*, 79, 337-344.
72. Daba M. H., Abdel-Rahman M. S. (1998) Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicology Letters*, 95, 23-29.
73. Dai Q., Borenstein A.R., Wu Y., Jackson J.C., Larson E.B. (2006) Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. *The American Journal of Medicine*, 119, 751-759.
74. Damjanović-Vratnica B., Perović S., Lu T., Santos R. (2016) Effect of matrix pretreatment on the supercritical CO₂ extraction of *Satureja montana* essential oil. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 34-34.
75. De Stefani E., Ronco A. L., Mendilaharsu M., Deneo-Pellegrini H. (1999) Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract—II. Nutrients. *Oral Oncology*, 35, 22-26.
76. Dejanović B. (2015) Protektivno dejstvo agmantina od toksičnih efekata izazvanih hlorpromazinom kod pacova. Doktorska disertacija, Vojnomedicinska akademija - Medicinski fakultet, Beograd.
77. Denery J. R., Dragull K., Tang C. S., Li Q. X. (2004) Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Analytica Chimica Acta*, 501, 175-181.
78. Dickinson D. A., Forman H. J. (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1019-1026.
79. Dos Santos Freitas L., Jacques R.A., Richter M.F., da Silva A.L., Caramão E.B. (2008) Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. *Journal of Chromatography A*, 1200, 80-83.
80. Dunkić V., Kremer D., Dragojević Müller I., Stabentheiner E., Kuzmić S., Jurišić Grubešić R., Vujić L., Kosalec I., Randić M., Srećec S., Bezić N. (2012) Chemotaxonomic and micromorphological traits of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis. (*Lamiaceae*). *Chemistry & Biodiversity*, 9, 2825-2842.
81. Eggers R. (1996) Supercritical fluid extraction (SFE) of oilseeds/lipids in natural products. *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*, 35-64.
82. Eikani M. H., Golmohammad F., Rowshanzamir S. (2007) Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Food Engineering*, 80, 735-740.

83. El Tawab A.M.A., Shahin N.N., AbdelMohsen M.M. (2014) Protective effect of *Satureja montana* extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Chemico-biological Interactions*, 224, 196-205.
84. El-Samahy S.K., El-Hady E.A., Habiba R.A., Moussa-Ayoub T.E. (2007) Some functional, chemical, and sensory characteristics of cactus pear rice-based extrudates. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 9, 136-147.
85. Espín, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers H.J. (2000) Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 648-656.
86. Esposito E., Rotilio D., Di Matteo V., Di Giulio C., Cacchio M., Algeri S. (2002) A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging*, 23, 719-735.
87. Fernandes R.V.B., Borges S.V., Botrel D.A. (2013) Influence of spray drying operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33, 171-178.
88. Fernández-Martínez E., Bobadilla R.A., Morales-Ríos M.S., Muriel P., Pérez-Álvarez V.M. (2007) Trans-3-phenyl-2-propenoic acid (cinnamic acid) derivatives: structure-activity relationship as hepatoprotective agents. *Medicinal Chemistry*, 3, 475-479.
89. Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D.W., Anderson D., Baker J., Kerr D.J. (1996) Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clinical Cancer Research*, 2, 659-668.
90. Filkova I., Huang L.X., Mujumdar A.S. (2006) Industrial spray drying systems. In A. S. Mujumdar (Ed.), *Handbook of Industrial Drying*, 3rd ed. CRC Press, pp. 215-256.
91. Fitsiou E., Anastopoulos I., Chlichlia K., Galanis A., Kourkoutas I., Panayiotidis M.I., Pappa A. (2016) Antioxidant and antiproliferative properties of the essential oils of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica* and their major constituents. *Anticancer Research*, 36, 5757-5763.
92. Fogler B.B., Kleninschmidt R.V. (1938) Spray drying. *Industrial & Engineering Chemistry*, 30, 1372-1384.
93. Fraga C.G., Galleano M., Verstraeten S.V., Oteiza P.I. (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects Of Medicine*, 31, 435-445.
94. Fraternali D., Giamperi L., Bucchini A., Ricci D., Epifano F., Genovese S., Curini M. (2007) Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Satureja montana* from central Italy. *Chemistry of Natural Compounds*, 43, 622-624.
95. Gali-Muhtasib H., Roessner A., Schneider-Stock R. (2006) Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, 1249-1253.
96. Gamiz-Gracia L., De Castro M.L. (2000) Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*, 51, 1179-1185.
97. Gao Y., Nagy B., Liu X., Simándi B., Wang Q. (2009) Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound. *Journal of Supercritical Fluids*, 49(3), 345-350.

98. Gaspar F., Santos R., King M.B. (2001) Disruption of glandular trichomes with compressed CO₂: alternative matrix pre-treatment for CO₂ extraction of essential oils. *Journal of Supercritical Fluids*, 21, 11-22.
99. Gharib, F.A., Silva, J.T. (2013) Composition, total phenolic content and antioxidant activity of the essential oil of four Lamiaceae herbs. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 7, 19-27.
100. Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121.
101. Goldberg D.M., Spooner R.J. Glutathione reductase. U: Bergmayer HU, urednik. *Methods of Enzymatic Analysis*. Basel: Weinheim; 1983.
102. González-Gómez, D., Lozano, M., Fernández-León, M.F., Bernalte, M.J., Ayuso, M.C., Rodríguez, A.B. (2010) Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 533-539.
103. Goodrum J.W., Kilgo M.B. (1987) Peanut oil extraction with SC-CO₂: solubility and kinetic functions. *Transactions of the ASAE*, 30, 1865-1868.
104. Goula A.M., Adamopoulos K.G. (2003) Influence of spray drying conditions on tomato powder moisture. In: *Proceedings of the third international symposium of food rheology and structure*, Zurich, Switzerland.
105. Goula A.M., Adamopoulos K.G. (2008) Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. Powder properties. *Drying Technology*, 26, 726-737.
106. Goula A.M., Adamopoulos K.G. (2010) A new technique for spray drying orange juice concentrate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 342-351.
107. Grabowski J.A., Truong V.D., Daubert C.R. (2006) Spray drying of amylase hydrolyzed sweetpotato puree and physicochemical properties of powder. *Journal of Food Science*, 71, E209-E217.
108. Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N. (1999) The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 322-332.
109. Grosso C., Figueiredo A.C., Burillo J., Mainar A.M., Urieta J.S., Barroso J.G., Coelho J.A., Palavra A.M. (2009a) Enrichment of the thymoquinone content in volatile oil from *Satureja montana* using supercritical fluid extraction. *Journal of Separation Science*, 32, 328-334.
110. Grosso C., Oliveira A.C., Mainar A.M., Urieta J.S., Barroso J.G., Palavra A.M.F. (2009b) Antioxidant activities of the supercritical and conventional *Satureja montana* extracts. *Journal of Food Science*, 74, C713-C717.
111. Guimarães A.G., Oliveira G.F., Melo M.S., Cavalcanti S.C., Antonioli A.R., Bonjardim L.R., Silva F.A., Santos J.P., Rocha R.F., Moreira J.C., Araújo A.A., Gelain D.P., Quintans-Júnior L.J. (2010) Bioassay guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107, 949-957.
112. Guimarães A.G., Xavier M.A., de Santana M.T., Camargo E.A., Santos C.A., Brito F.A., Barreto E.O., Cavalcanti S.C., Antonioli A.R., Oliveira R.C., Quintans-Júnior L.J. (2012) Carvacrol

- attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385, 253-263.
113. Gupta A., Naraniwal M., Kothari V. (2012) Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 1, 8-26.
114. Haghighi Asl i M. Khajenoori (2013) Subcritical water extraction, mass transfer - advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling, Dr. Hironori Nakajima (Ed.), *InTech*, DOI: 10.5772/54993.
115. Haloc E., Toska V., Baldisserotto A., Goci E., Vertuani S., Manfredini S. (2014) Evaluation of antifungal activity of *Satureja montana* essential oil before and after inclusion in β -cyclodextrine. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 189-191.
116. Hamad K.J., Kaskoos R.A., Ahamad J., Jameel M., Mir S.R. (2013) Essential oil composition and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* from Iraq. *International Research Journal of Pharmacy*, 4, 117-20.
117. Haque M.A., Timilsena Y.P., Adhikari B. (2015) Spray Drying. *Drying Technologies for Foods: Fundamentals & Applications*. Nema PK, Kaur, BP & Mujumdar, AS (Eds) New India Publishing Agency, India, 374.
118. Hartonen K., Parshintsev J., Sandberg K., Bergelin E., Nisula L., Riekkola M.L. (2007) Isolation of flavonoids from aspen knotwood by pressurized hot water extraction and comparison with other extraction techniques. *Talanta*, 74, 32-38.
119. Hata S., Wiboonsirikul J., Maeda A., Kimura Y., Adachi S. (2008) Extraction of defatted rice bran by subcritical water treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 40(1), 44-53.
120. He H.P., Corke H., Cai J.G. (2003) Supercritical carbon dioxide extraction of oil and squalene from *Amaranthus* grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7921-7925.
121. He L., Mo H., Hadisusilo S., Qureshi A.A., Elson C.E. (1997) Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Nutrition*, 127, 668-674.
122. Heibatollah S., Reza N.M., Izadpanah G., Sohaila S. (2008) Hepatoprotective effect of *Cichorium intybus* on CCl₄-induced liver damage in rats. *African Journal of Biochemistry research*, 2, 141-144.
123. Herrero M., Mendiola J. A., Cifuentes A., Ibáñez E. (2010) Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495-2511.
124. Ho C.H., Cacace J.E., Mazza G. (2007) Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1637-1647.
125. Ho C.H., Cacace J.E., Mazza G. (2008) Mass transfer during pressurized low polarity water extraction of lignans from flaxseed meal. *Journal of Food Engineering*, 89, 64-71.
126. Hogekamp S., Schubert H. (2003) Rehydration of food powders. *Food Science and Technology International*, 9, 223-235.
127. Horvathova E., Turcaniova V., Slamenova D. (2006). Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. *Neoplasma*, 54, 478-483.
128. Hotta M., Nakata R., Katsukawa M., Hori K., Takahashi S., Inoue H. (2010). Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *Journal of Lipid Research*, 51, 132-139.

129. Hussain A.I., Anwar F., Sherazi S.T.H., Przybylski R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108, 986-995.
130. Ibraliu A., Mi X., Elezi F. (2011). Variation in essential oils to study the biodiversity in *Satureja montana* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 2978-2989.
131. Ipek E., Tüylü B.A., Zeytinoglu H. (2003). Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. In: *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (pp. 471-474). Springer Netherlands.
132. Ivanović J., Meyer F., Misic D., Asanin J., Jaeger P., Zizović I., Eggers R. (2013). Influence of different pre-treatment methods on isolation of extracts with strong antibacterial activity from lichen *Usnea barbata* using carbon dioxide as a solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 76, 1-9.
133. Ivanović J., Ristić M., Skala D. (2011). Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: influence of CO₂ density and moisture content of plant material. *Journal of Supercritical Fluids*, 57, 129-136.
134. Jaafari A., Mouse H.A., M'Bark L.A., Tilaoui M., Elhansali M., Lepoivre M., Aboufatima R., Melhaoui A., Chait A., Ziad A. (2009). Differential antitumor effect of essential oils and their major components of *Thymus broussonettii*: relationship to cell cycle and apoptosis induction. *Herba Polonica*, 55, 36-50.
135. Jaafari A., Tilaoui M., Mouse H.A., M'bark L.A., Aboufatima R., Chait A., Lepoivre M., Ziad A. (2012). Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 534-540.
136. Jafari S.M., Assadpoor E., Bhandari B., He Y. (2008). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International*, 41, 172-183.
137. Jančić R. (2004) Botanika farmaceutika, Beograd.
138. Jaya S., Das H. (2004). Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties. *Journal of Food Engineering*, 63, 125-134.
139. Jayakumar S., Madankumar A., Asokkumar S., Raghunandhakumar S., Kamaraj S., Divya M.G.J., Devaki T. (2012). Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 360, 51-60.
140. Jayasundera M., Adhikari B.P., Adhikari R., Aldred P. (2010) The effect of food-grade low-molecular-weight surfactants and sodium caseinate on spray drying of sugar-rich foods. *Food Biophysics*, 5, 128-137.
141. Johari G.P., Hallbrucker A., Mayer E. (1987) The glass-liquid transition of hyperquenched water. *Nature*, 330, 552-553.
142. Jokić S., Horvat G., Aladić K. (2014). Design of SFE system using a holistic approach-problems and challenges. In: *Supercritical Fluid Extraction: Technology, Applications and Limitations*. Nova Publishers.
143. Jukić M., Politeo O., Maksimović M., Miloš M., Miloš M. (2007). *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21, 259-261.

144. Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
145. Kang S.H., Kim Y.S., Kim E.K., Hwang J.W., Jeong J.H., Dong X., Lee J.W., Moon S.H., Jeon B.T., Park P.J. (2016) Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 28-37.
146. Karkabounas S., Kostoula O.K., Daskalou T., Veltsistas P., Karamouzis M., Zelovitis I., Metsios A., Lekkas P., Evangelou A.M., Kotsis N., Skoufos I. (2006). Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Experimental Oncology*, 28, 121-125.
147. Kaufmann B., Christen P., Veuthey J.L. (2001). Study of factors influencing pressurised solvent extraction of polar steroids from plant material. Application to the recovery of withanolides. *Chromatographia*, 54, 394-398.
148. Kaufmann D., Dogra A.K., Wink M. (2011). Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 1368-1371.
149. Knekt P., Kumpulainen J., Järvinen R., Rissanen H., Heliövaara M., Reunanen A., Hakulinen T., Aromaa A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560-568.
150. Koparal A.T., Zeytinoğlu M. (2003) Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. In: *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (207-211). Springer Netherlands.
151. Kovačević Z. (1994) Praktična biohemija i molekularna biologija. Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet.
152. Kruidenier L.A., Verspaget H.W. (2002) Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous?. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16, 1997-2015.
153. Kruidenier L.A., Verspaget H.W. (2002) Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous?. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16, 1997-2015.
154. Kubátová A., Lagadec A.J., Miller D.J., Hawthorne S.B. (2001) Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 64-73.
155. Kurozawa L.E., Morassi A.G., Vanzo A.A., Park K.J., Hubinger M.D. (2009) Influence of spray drying conditions on physicochemical properties of chicken meat powder. *Drying Technology*, 27, 1248-1257
156. Kustrak D., Kuftinec J., Blazevic N., Maffei M. (1996) Comparison of the essential oil composition of two subspecies of *Satureja montana*. *Journal of Essential Oil Research*, 8, 7-13.
157. Kwon Y.I.I., Vatterem D.A., Shetty K. (2006) Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia pacific journal of clinical nutrition*, 15, 107-118.
158. Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.
159. Lang Q., Wai C.M. (2001) Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 53, 771-782.

160. Leeke G., Gaspar F., Santos R. (2002) Influence of water on the extraction of essential oils from a model herb using supercritical carbon dioxide. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41, 2033-2039.
161. Lepojević Ž. (2000) Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda. Univerzitet u Novom Sadu, Zmaj, Novi Sad.
162. Li, H., Wang, X., Li, P., Li, Y., Wang, H. (2008) Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16.
163. Loranty A., Rembiałkowska E., Rosa E. A., Bennett R.N. (2010) Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 432-441.
164. Luo D., Qiu T., Lu Q. (2007) Ultrasound-assisted extraction of ginsenosides in supercritical CO₂ reverse microemulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 431-436.
165. Luthria, D.L. (2008) Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*, 107, 745-752.
166. Mahendran T. (2011). Physico-chemical properties and sensory characteristics of dehydrated guava concentrate: effect of drying method and maltodextrin concentration. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 13.
167. Mani S., Jaya S., Das H. (2002, September) Sticky issues on spray drying of fruit juices. In *ASAE/CSAE North-Central Intersectional Meeting*.
168. Markham K.R. (1989) In: J.B. Harborne, P.M. Dey (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, 193–237.
169. Martinelli L., Gabas A.L., Telis-Romero J. (2007). Thermodynamic and quality properties of lemon juice powder as affected by maltodextrin and arabic gum. *Drying Technology*, 25, 2035-2045.
170. Mastelić J., Jerković I. (2003). Gas chromatography–mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. *Food Chemistry*, 80, 135-140.
171. Masters K. (1991) Applications in the food industry. *Spray drying handbook*, Fifth ed., Longman Scientific and Technical, New York, 587-638.
172. Masters K. (1997) Spray Dryers. In C. G. J. Baker (Ed.), *Industrial drying of foods*. London, UK: Blackie Academic and Professional.
173. Mathela C.S., Singh K.K., Gupta V.K. (2010) Synthesis and *in vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67, 375-380.
174. Medina-Remón A., Zamora-Ros R., Rothés-Ribalta M., Andres-Lacueva C., Martínez González M.A., Covas M.I., Corella D.; Salas-Salvadó J., Gómez-Garsia E., Ruiz Gutiérrez, V., García de la Corte, F.J., Fiol, M., Pena M.A., Saez, G.T., Ros, E., Serra Majem, L., Pinto X., Warnberg J., Estruch R., Lamuela-Raventos R.M. (2011) Total polyphenol excretion and blood pressure in subjects at high cardiovascular risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21, 323-331.
175. Melo F.H., Moura B.A., de Sousa D.P., de Vasconcelos S.M., Macedo D.S., Fonteles M.M., Viana G.S., de Sousa, F.C. (2011). Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 25, 362-367.

176. Merlin N.J., Parthasarathy V. (2011) Antioxidant and hepatoprotective activity of chloroform and ethanol extracts of *Gmelinaasiatica* aerial parts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 533-538.
177. Meyer F., Jaeger P., Eggers R., Stamenic M., Milovanovic S., Zizovic I. (2012) Effect of CO₂ pre-treatment on scCO₂ extraction of natural material. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 56, 37-45.
178. Mihajilov-Krstev T. (2009) Hemijski sastav i antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta roda *Satureja* L. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.
179. Mihajilov-Krstev T., Radnović D., Kitić D., Jovanović V., Mitić V., Stojanović-Radić Z., Zlatković B. (2014) Chemical composition, antimicrobial, antioxidative and anticholinesterase activity of *Satureja montana* L. ssp *montana* essential oil. *Open Life Sciences*, 9, 668-677.
180. Miloš M., Radonić A., Bežić N., Dunkić V. (2001) Localities and seasonal variations in the chemical composition of essential oils of *Satureja montana* L. and *S. cuneifolia* Ten. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 157-160.
181. Mishra P., Mishra S., Mahanta C.L. (2014) Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Embllica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, 92, 252-258.
182. Miyazawa M., Yamafuji C. (2006) Inhibition of acetylcholinesterase activity by tea tree oil and constituent terpenoids. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 198-201.
183. Mortensen A., Sorensen I.K., Wilde C., Dragoni S., Mullerová D., Toussaint O., Zloch Z., Sgaragli G., Ovesná J. (2008) Biological models for phytochemical research: from cell to human organism. *British Journal of Nutrition*, 99, ES118-ES126.
184. Mosén K., Bäckström K., Thalberg K., Schaefer T., Kristensen H.G., Axelsson A. (2005) Particle formation and capture during spray drying of inhalable particles. *Pharmaceutical Development and Technology*, 9, 409-417.
185. Murugesan R., Orsat V. (2012) Spray drying for the production of nutraceutical ingredients—a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 3-14.
186. Mustafa A., Turner C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703, 8-18.
187. Nabavi S.M., Marchese A., Izadi M., Curti V., Daglia M., Nabavi S.F. (2015) Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*, 173, 339-347.
188. Nadeau J.P., Puiggali J.R. (1995) Séchage: des processus physiques aux procédés industriels. 1st ed., Technique et Documentation Lavoisier, Paris Cedex, 307,
189. Nadeem H.S., Torun M., Özdemir F. (2011) Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1626-1635.
190. Niketić V. (2007) Uputstva za vežbe iz biohemije za studente hemije smera istraživanje i razvoj. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet.
191. Nostro A., Marino A., Blanco A.R., Cellini L., Di Giulio M., Pizzimenti F., Sudano Roccaro A., Bisignano G. (2009) *In vitro* activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 791-797.
192. Oliveira W.P., Souza C.R.F., Kurozawa L.E., Park K.J. (2010) Spray drying of food and herbal products. *Spray Drying Technology*, 5, 113-156.

193. Orhan I., Kartal M., Kan Y., Şener B. (2008) Activity of essential oils and individual components against acetylcholinesterase. *Zeitschrift fuer Naturforschung C*, 63, 547-553.
194. Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. (2007) Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 414-420.
195. Ozel M.Z., Gogus F., Lewis A.C. (2003) Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry*, 82, 381-386.
196. Özkan A., Erdoğan A. (2011) A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (*Lamiaceae*) and its two major phenolic components. *Turkish Journal of Biology*, 35, 735-742.
197. Pandey K.B., Rizvi S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 270-278.
198. Pasquali I., Bettini R., Giordano F. (2008) Supercritical fluid technologies: an innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 399-410.
199. Patel R.P., Patel M.P., Suthar A.M. (2009) Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*, 2, 44-47.
200. Pereira C.G., Meireles M.A.A. (2010) Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 340-372.
201. Perron N.R., Brumaghim J.L. (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53, 75-100.
202. Phoungchandang S., Sertwasana A. (2010) Spray-drying of ginger juice and physicochemical properties of ginger powders. *Science Asia*, 36, 40-45.
203. Pietta P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
204. Plaza M., Amigo-Benavent M., Del Castillo M.D., Ibáñez E., Herrero M. (2010) Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, 43, 2341-2348.
205. Politeo O., Jukic M., Milos M. (2007) Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, 101, 379-385.
206. Porchezian E., Ansari S.H. (2005) Hepatoprotective activity of *Abutilon indicum* on experimental liver damage in rats. *Phytomedicine*, 12, 62-64.
207. Pourali O., Asghari F.S., Yoshida H. (2010) Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. *Chemical Engineering Journal*, 160, 259-266.
208. Prasad K.N., Hassan F.A., Yang B., Kong K.W., Ramanan R.N., Azlan A., Ismail A. (2011) Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry*, 128, 1121-1127.
209. Prieto J.M., Iacopini P., Cioni P., Chericoni S. (2007) *In vitro* activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. *Food Chemistry*, 104, 889-895.

210. Radonić A., Miloš M. (2003) Chemical composition and antioxidant test of free and glycosidically bound volatile compounds of savory (*Satureja montana* L. subsp. *montana*) from Croatia. *Food/Nahrung*, 47, 236-237.
211. Ramírez-Jiménez A., García-Villanova B., Guerra-Hernández E. (2000). Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of selected bakery products. *Food Research International*, 33(10), 833-838.
212. Ratnam D.V., Ankola D.D., Bhardwaj V., Sahana D.K., Kumar M.R. (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113, 189-207.
213. Rattanachaikunsopon P., Phumkhachorn P. (2010) Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 614-619.
214. Ravishankar S., Zhu L., Law B., Joens L., Friedman M. (2008) Plant-derived compounds inactivate antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni* strains. *Journal of Food Protection*®, 71, 1145-1149.
215. Ravishankar S., Zhu L., Reyna-Granados J., Law B., Joens L., Friedman M. (2010) Carvacrol and cinnamaldehyde inactivate antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in buffer and on celery and oysters. *Journal of Food Protection*®, 73, 234-240.
216. Ré M.I. (1998) Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16, 1195-1236.
217. Recknagel R.O. (1983) A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sciences*, 33, 401-408.
218. Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 1603-1616.
219. Reverchon E., De Marco I. (2006) Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 146-166.
220. Riera E., Golas Y., Blanco A., Gallego J.A., Blasco M., Mulet A. (2004) Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 241-244.
221. Rodríguez-Hernandez G.R., González-García R., Grajales-Lagunes A., Ruiz-Cabrera M.A., Abud-Archila M. (2005) Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technology*, 23, 955-973.
222. Rodríguez-Meizoso I., Jaime L., Santoyo S., Señorans F.J., Cifuentes A., Ibáñez E. (2010) Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 456-463.
223. Rodríguez-Meizoso I., Marin F.R., Herrero M., Señorans F.J., Reglero G., Cifuentes A., Ibáñez E. (2006) Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1560-1565.
224. Roos Y., Karel M. (1991). Applying state diagrams to food processing and development. *Food Technology*, 45(12), 66-68.
225. Roos Y., Karel M. (1991a) Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnology Progress*, 7, 49-53.
226. Roos Y., Karel M. (1991b) Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. *Journal of Food Science*, 56, 38-43.

227. Roos Y.H. (1993) Water activity and physical state effects on amorphous food stability. *Journal of Food Processing and Preservation*, 16, 433-447.
228. Roos Y.H. (2002) Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders. *Le Lait*, 82, 475-484.
229. Rosenberg M., Kopelman I.J., Talmon Y. (1990) Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1288-1294.
230. Rossi L., Mazzitelli S., Arciello M., Capo C.R., Rotilio G. (2008) Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 33, 2390-2400.
231. Ruberto G., Baratta M.T. (2000) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69, 167-174.
232. Saldana M.D.A., Mohamed R.S., Mazzafera P. (2000) Supercritical carbon dioxide extraction of methylxanthines from mate tea leaves. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17, 251-260.
233. Sansone F., Mencherini T., Picerno P., d'Amore M., Aquino R.P., Lauro M.R. (2011) Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *Journal of Food Engineering*, 105, 468-476.
234. Sarkar F.H., Li Y. (2004) Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555, 53-64.
235. Savelev S.U., Okello E.J., Perry E.K. (2004) Butyryl- and acetylcholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research*, 18, 315-324.
236. Saydi D., Hatamipour M.S. (2012) Analysis of the effective parameters on potato powder quality produced by a spray dryer. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 9, 55-62.
237. Schulte-Hermann R., Ochs H., Bursch W., Parzefall W. (1988) Quantitative structure-activity studies on effects of sixteen different steroids on growth and monooxygenases of rat liver. *Cancer Research*, 48, 2462-2468.
238. Sen S., Chakraborty R. (2011) The role of antioxidants in human health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, 1083, 1-37.
239. Serrano C., Matos O., Teixeira B., Ramos C., Neng N., Nogueira J., Nunes M.L., Marques A. (2011) Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1554-1560.
240. Silva F.V., Martins A., Salta J., Neng N.R., Nogueira J.M., Mira D., Gaspar N., Justino J., Grosso C., Urieta J.S., Palavra A.M., Rauter A.P. (2009) Phytochemical profile and anticholinesterase and antimicrobial activities of supercritical versus conventional extracts of *Satureja montana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11557-11563.
241. Silva, F.V., Guimarães, A.G., Silva, E.R., Sousa-Neto, B.P., Machado, F.D., Quintans-Júnior, L.J., Arcanjo D., Oliveira F., Oliveira, R.C. (2012) Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *Journal of Medicinal Food*, 15, 984-991.
242. Simon L. M., Fatrai Z., Jonas D. J., Matkovics B. (1974). Study of metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*. 166, 389-393.
243. Singh S., Dixit D. (2014) A review on spray drying: emerging technology in food industry. *International Journal of Applied Engineering and Technology*, 4, 1-8.

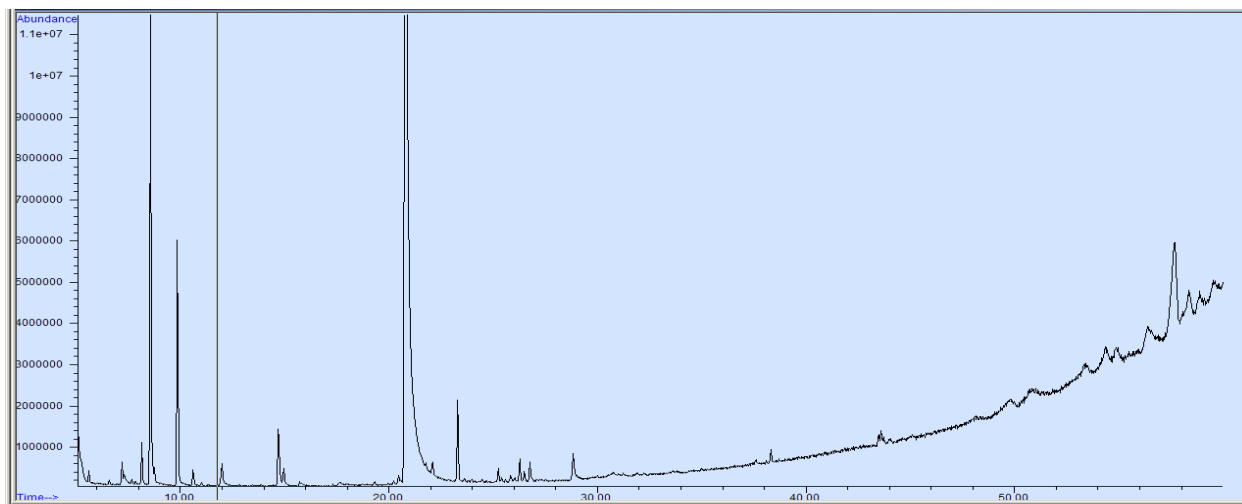
244. Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
245. Sinija V.R., Mishra H.N., Bal S. (2007) Process technology for production of soluble tea powder. *Journal of Food Engineering*, 82, 276-283.
246. Skočibušić M., Bezić N. (2004) Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 967-970.
247. Slamenova D., Horvathova E., Chalupa I., Wsolova L., Navarova J. (2010) Ex vivo assessment of protective effects of carvacrol against DNA lesions induced in primary rat cells by visible light excited methylene blue (VL+ MB). *Neoplasma*, 58, 14-19.
248. Slavkowska V., Jancic R., Bojovic S., Milosavljevic S., Djokovic D. (2001) Variability of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja kitaibelii* wierzb. ex Heuff. from the central part of the balkan peninsula. *Phytochemistry*, 57, 71-76.
249. Smith R.M. (2006) Superheated water: the ultimate green solvent for separation science. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 419-421.
250. Snyder H.E., Lechuga-Ballesteros D. (2008) Spray drying: theory and pharmaceutical applications. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, 1*, 227-260.
251. Spasić S., Jelić-Ivanović Z., Spasojević-Kalimanovska V. (2000) Upustva za vežbe iz medicinske biohemije za studente farmaceutskog fakulteta. Beograd, 147-57.
252. Stadtman E.R. (1990) Covalent modification reactions are marking steps in protein turnover. *Biochemistry*, 29, 6323-6331.
253. Stamenić M., Zizović I., Eggers R., Jaeger P., Heinrich H., Rój E., Ivanović J., Skala D. (2010) Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 52, 125-133.
254. Stamatii A., Bonsi P., Zucco F., Moezelaar R., Alakomi H.L., Von Wright A. (1999) Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 813-823.
255. Stanić G., Blažeković B., Knežević S.V. (2004) Anatomical and phytochemical characterization of *Satureja montana* L. subsp. *montana* and *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis. subsp. *liburnica*. *Farmaceutski glasnik: glasilo Hrvatskog farmaceutskog društva*, 60, 593-602.
256. Stanić G., Samaržija I. (1993) Diuretic Activity of *Satureja montana* subsp. *montana* extracts and oil in rats. *Phytotherapy Research*, 7, 363-366.
257. Suganthi R.U., Manpal S. (2013) Biological and pharmacological of actions carvacrol and its effects on poultry: An updated review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 2, 3581-95.
258. Suntres Z.E., Coccimiglio J., Alipour M. (2015) The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 304-318.
259. Surh Y.J. (1999) Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428, 305-327.
260. Taborsky J., Kunt M., Kloucek P., Lachman J., Zeleny V., Kokoska L. (2012) Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Lamiaceae*, and *Ranunculaceae* families. *Central European Journal of Chemistry*, 10, 1899-1906.

261. Tahmasbpour E., Mohammadpour G., Tahmasbpour R., Noureini S., Bagherpour G. (2015) *In vitro* Antimicrobial and cytotoxicity assays of *Satureja bakhtiarica* and *Zataria multiflora* essential oils. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 3, 502-511.
262. Tanaka Y., Sakaki I., Ohkubo T. (2004) Extraction of phospholipids from salmon roe with supercritical carbon dioxide and an entrainer. *Journal of Oleo Science*, 53, 417-424.
263. Teo C.C., Tan S.N., Yong J.W.H., Hew C.S., Ong E.S. (2010) Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217, 2484-2494.
264. Tewa-Tagne P., Briançon S., Fessi H. (2007) Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterisation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 124-135.
265. Thabrew M.I., Joice P.D.T.M., Rajatissa W. (1987) A comparative study of the efficacy of *Pavetta indica* and *Osbeckia octandra* in the treatment of liver dysfunction. *Planta Medica*, 53, 239-241.
266. Tonon R.V., Brabet C., Hubinger M.D. (2008) Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88, 411-418.
267. Tonon R.V., Brabet C., Hubinger M.D. (2010) Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43, 907-914.
268. Tonon R.V., Freitas S.S., Hubinger M.D. (2011) Spray drying of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) juice: Effect of inlet air temperature and type of carrier agent. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35, 691-700.
269. Tonthubthimthong P., Chuaprasert S., Douglas P., Luewisutthichat W. (2001) Supercritical CO₂ extraction of nimbin from neem seeds—an experimental study. *Journal of Food Engineering*, 47, 289-293.
270. Truong V., Bhandari B.R., Howes T. (2005a) Optimization of cocurrent spray drying process for sugar-rich foods. Part II—Optimization of spray drying process based on glass transition concept. *Journal of Food Engineering*, 71, 66-72.
271. Truong V., Bhandari B.R., Howes T. (2005b) Optimization of co-current spray drying process of sugar-rich foods. Part I—Moisture and glass transition temperature profile during drying. *Journal of Food Engineering*, 71, 55-65.
272. Ulican O., Greksak M., Vancova O., Zlatos L., Galbavy S., Bozek P., Nakano M. (2003) Hepatoprotective effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Physiological Research*, 52, 461-466.
273. Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561-1568.
274. Ultee A., Slump R. A., Steging G., Smid E. J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 63 (5): 620-624.
275. Ultee A., Smid E.J. (2001) Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 373-378.
276. Uyanoglu M., Canbek M., Aral E., Baser K.H.C. (2008) Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. *Phytomedicine*, 15, 226-229.

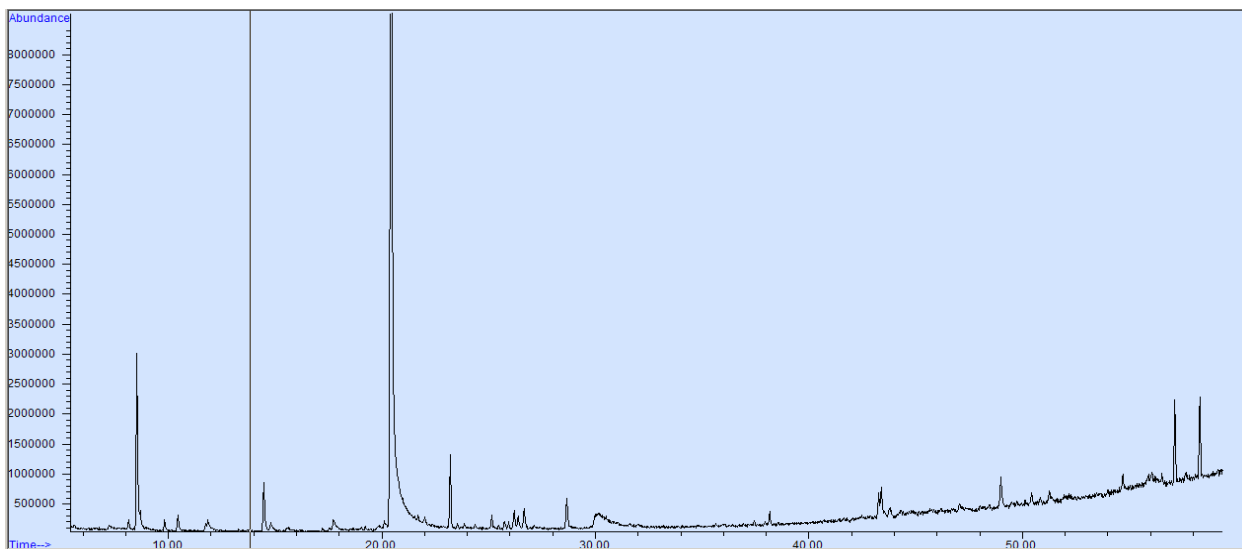
277. Valero M., Giner M.J. (2006) Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 90-94.
278. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
279. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M.M., Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions*, 160, 1-40.
280. Vardar-Ünlü G., Candan F., Sökmen A., Daferera D., Polissiou M., Sökmen M., Donmez E., Tepe B. (2003) Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 63-67.
281. Venukumar M.R., Latha M.S. (2002) Hepatoprotective effect of the methanolic extract of *Curculigo orchoides* in CCl₄. *Indian Journal of Pharmacology*, 34, 269-275.
282. Vitas J.S., Malbaša R.V., Lončar E.S., Kravić S.Ž., Milanović S.D. (2011) Fatty acids in milk products obtained by kombucha cultivated on winter savory tea. *Prehrambena Industrija*, 22, 25-28.
283. Vladić J., Ambrus R., Szabó-Révész P., Vasić A., Cvejic A., Pavlić B., Vidović S. (2016) Recycling of filter tea industry by-products: Production of *A. millefolium* powder using spray drying technique. *Industrial Crops and Products*, 80, 197-206.
284. Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Bival Štefan M., Babac M. (2012) Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. *Phytochemicals as Nutraceuticals—Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, 155-180.
285. Vladimir-Knežević S., Cvijanović O., Blažeković B., Kindl M., Štefan M.B., Domitrović R. (2015) Hepatoprotective effects of *Micromeria croatica* ethanolic extract against CCl₄-induced liver injury in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 233.
286. Vulić J.J., Čebović T.N., Čanadanović V.M., Četković G.S., Djilas S.M., Čanadanović-Brunet J.M., Velićanski A., Cvetković D., Tumbas V.T. (2013). Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food & Function*, 4, 713-721.
287. Wang S., Langrish T. (2009) A review of process simulations and the use of additives in spray drying. *Food Research International*, 42, 13-25.
288. Weber L.W., Boll M., Stampfl A. (2003) Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33, 105-136.
289. Wiboonsirikul J., Adachi S. (2008) Extraction of functional substances from agricultural products or by-products by subcritical water treatment. *Food Science and Technology research*, 14, 319-328.
290. Woo C.C., Kumar A.P., Sethi G., Tan K.H.B. (2012) Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 83, 443-451.
291. Wood, E.J. (Ed.). (2012). *Practical biochemistry for colleges*. Elsevier.
292. Xu L., Zhan X., Zeng Z., Chen R., Li H., Xie T., Wang S. (2011) Recent advances on supercritical fluid extraction of essential oils. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 1196-1211.
293. Yamasaki K., Nakano M., Kawahata T., Mori H., Otake T., Ueba N., Oishi I., Inami R., Yamane M., Nakamura M., Murata H., Nakanishi T. (1998) Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21, 829-833.

294. Yang Y., Kayan B., Bozer N., Pate B., Baker C., Gizir A.M. (2007) Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. *Journal of Chromatography A*, 1152, 262-267.
295. Yanishlieva N.V., Marinova E.M., Gordon M.H., Raneva V.G. (1999) Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64, 59-66.
296. Yin Q.H., Yan F.X., Zu X.Y., Wu Y.H., Wu X.P., Liao M.C., Deng S.W., Yin L.L., Zhuang Y.Z. (2012) Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64, 43-51.
297. Yoda S.K., Marques M.O., Petenate A.J., Meireles M.A.A. (2003) Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂ + water: extraction kinetics and identification of extracted components. *Journal of Food Engineering*, 57, 125-134.
298. Yoshie-Stark, Y., Wada, Y., Wäsche, A. (2008) Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chemistry*, 107, 32-39.
299. Yousefzadi M., Riahi-Madvar A., Hadian J., Rezaee F., Rafiee R., Biniiaz M. (2014) Toxicity of essential oil of *Satureja khuzistanica*: *In vitro* cytotoxicity and anti-microbial activity. *Journal of Immunotoxicology*, 11, 50-55.
300. Zavatti M., Zanolì P., Benelli A., Rivasi M., Baraldi C., Baraldi M. (2011) Experimental study on *Satureja montana* as a treatment for premature ejaculation. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 629-633.
301. Zeković Z., Vidović S., Vladić J., Radosavljević R., Cvejcin A., Elgndi M.A., Pavlić B. (2014) Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *Journal of Supercritical Fluids*, 95, 560-566.
302. Zeković Z.P., Filip S.Đ., Vidović S.S., Adamović D.S., Elgndi A.M. (2015) Basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil and extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Acta Periodica Technologica*, 46, 259-269.
303. Zeytinoglu H., Incesu Z., Baser K.H.C. (2003) Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. *Phytomedicine*, 10, 292-299.
304. Zeytinoglu M., Aydin S., Oztürk Y., Baser K. (1998) Inhibitory effects of carvacrol on DMBA induced pulmonary tumorigenesis in rats. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 2, 93-98.
305. Zhu R., Wang Y., Zhang L., Guo Q. (2012) Oxidative stress and liver disease. *Hepatology Research*, 42, 741-749.
306. Zizović I., Stamenić M., Orlović A., Skala D. (2005) Supercritical carbon dioxide essential oil extraction of Lamiaceae family species: Mathematical modelling on the micro-scale and process optimization. *Chemical Engineering Science*, 60, 6747-6756.

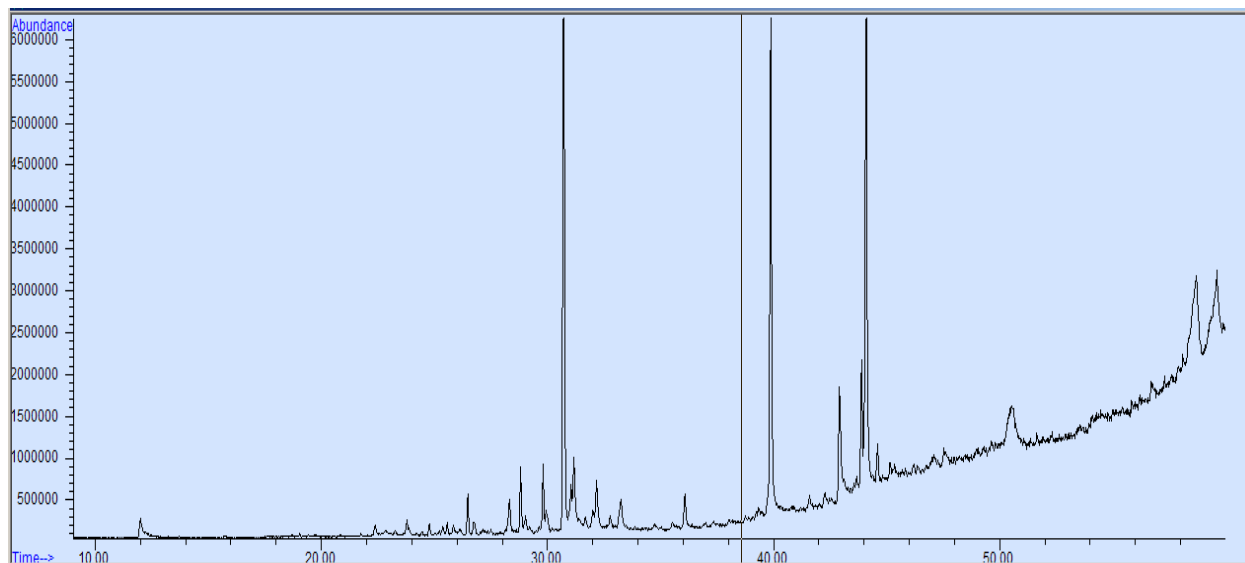
7. PRILOG



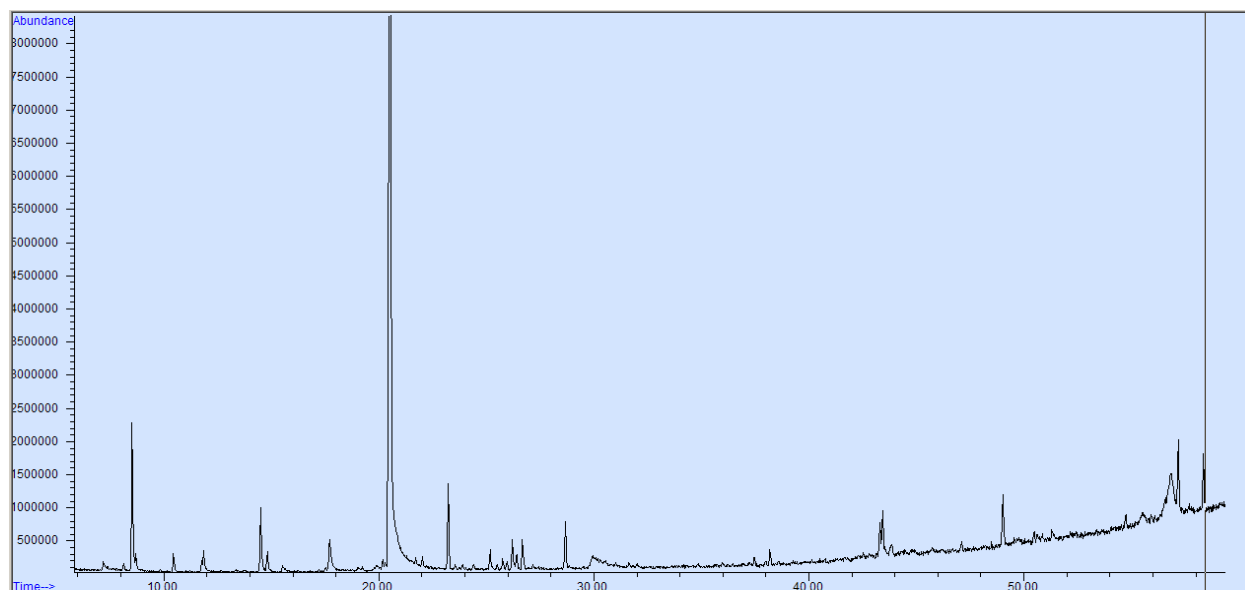
Slika P1.1. GC hromatogram etraskog ulja



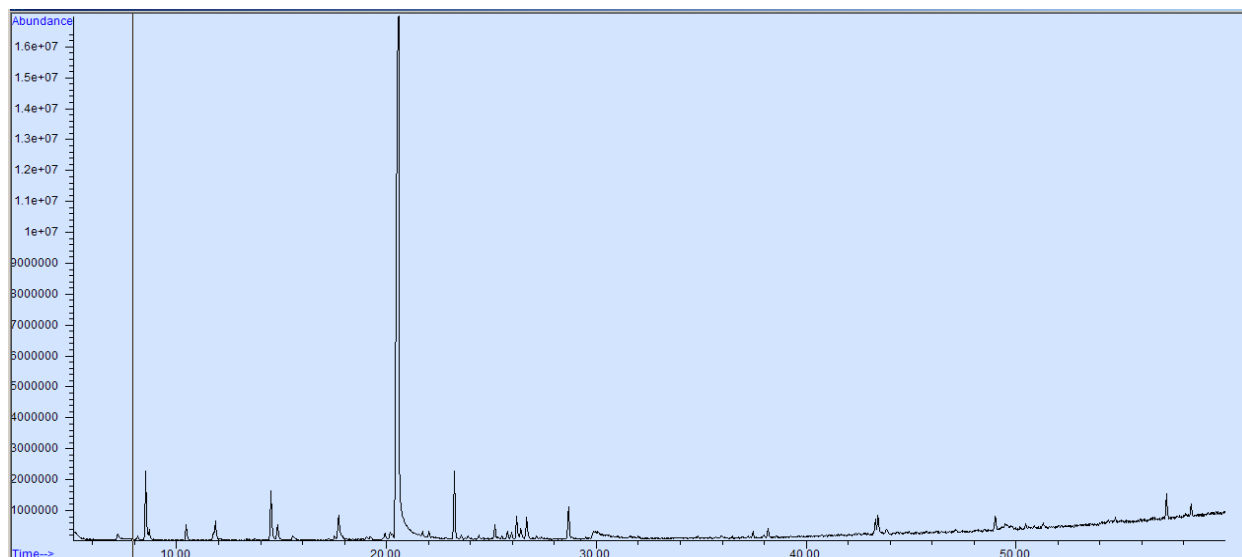
Slika P1.2. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom
(100 bar; 40 °C)



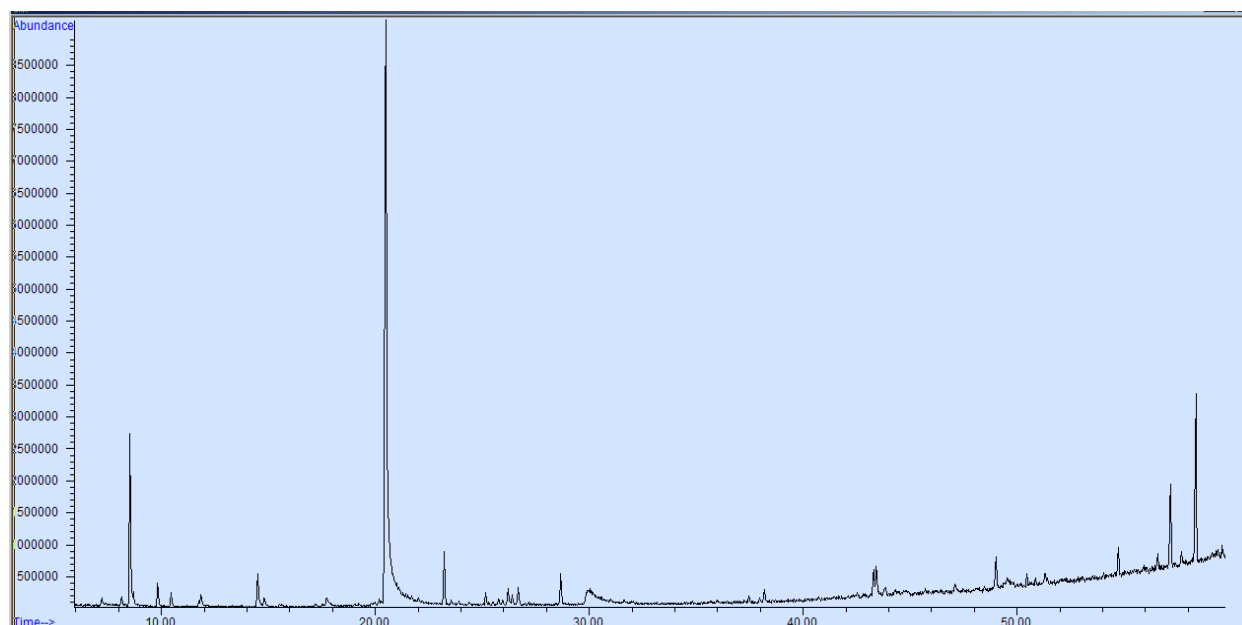
Slika P1.3. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (100 bar; 50 °C)



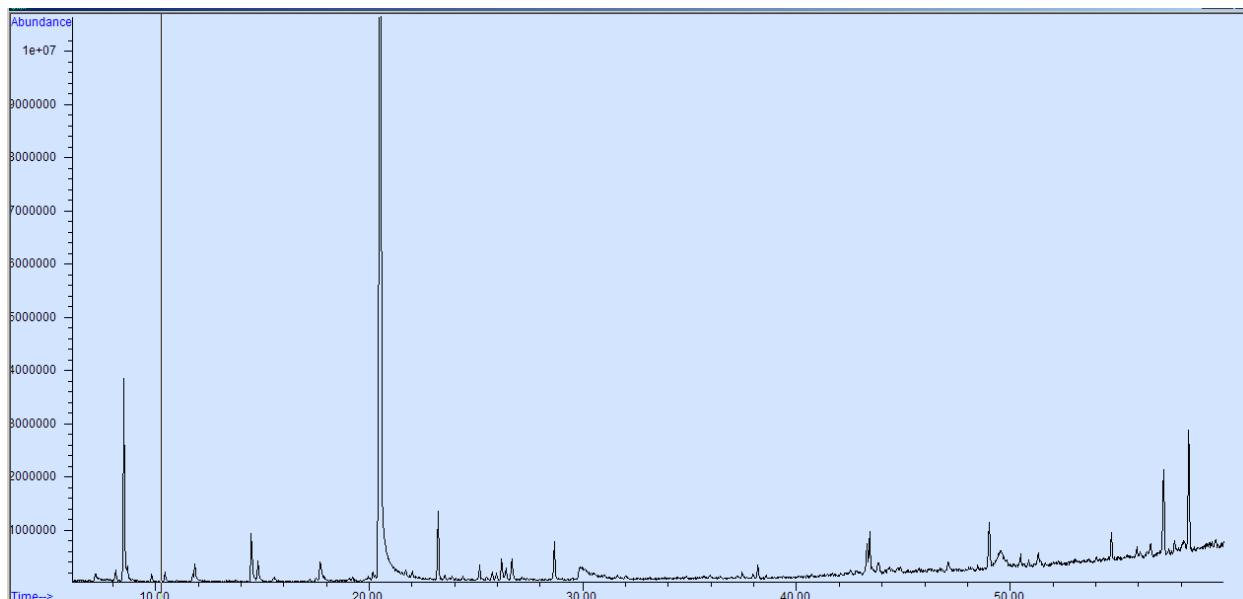
Slika P1.4. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (100 bar; 60 °C)



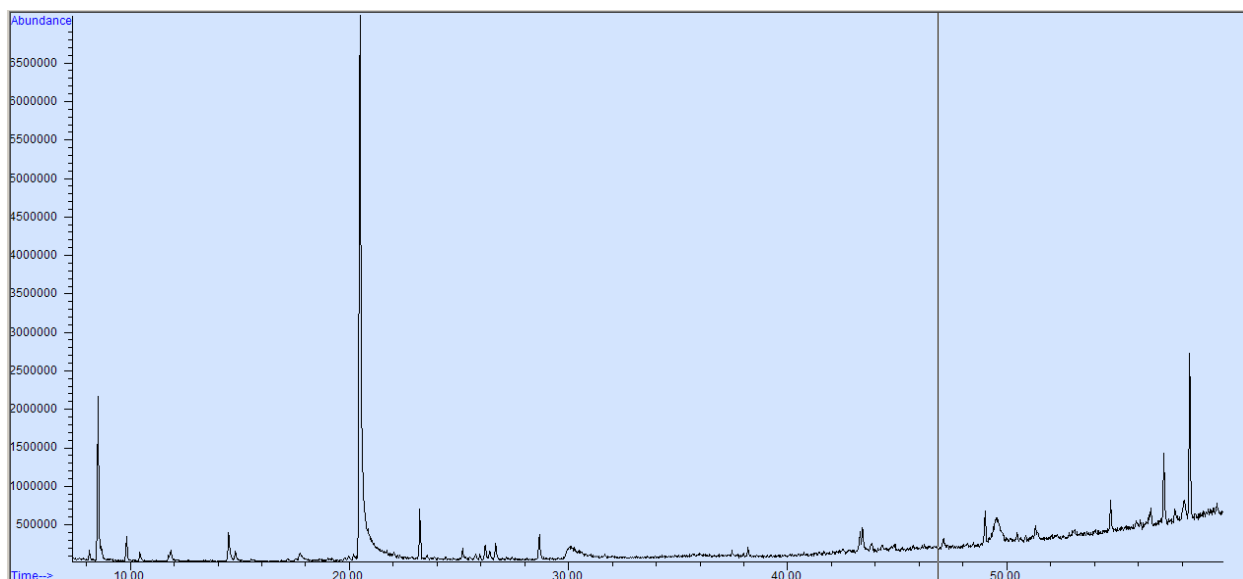
Slika P1.5. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (125 bar; 40 °C)



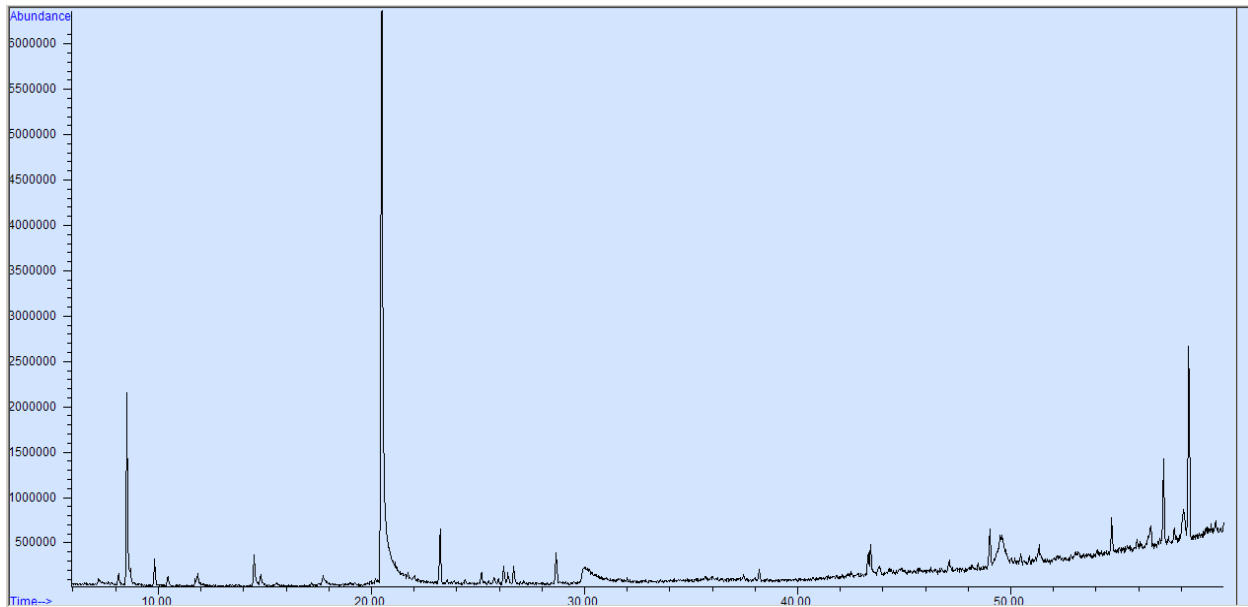
Slika P1.6. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (125 bar; 50 °C)



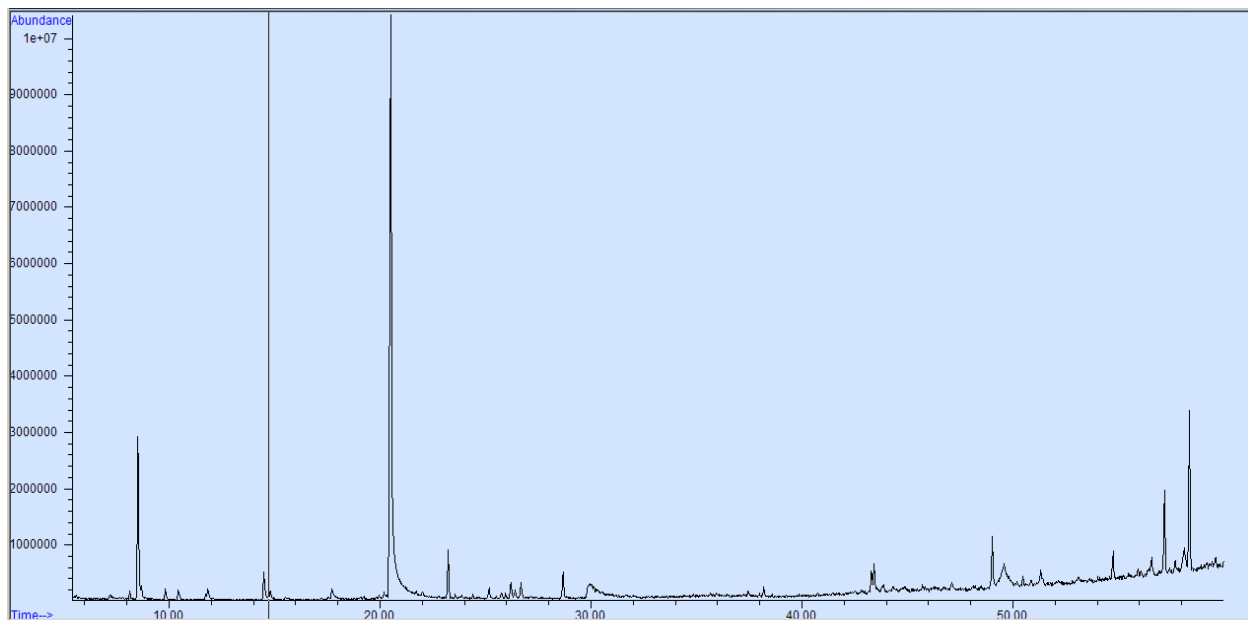
Slika P1.7. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (125 bar; 60 °C)



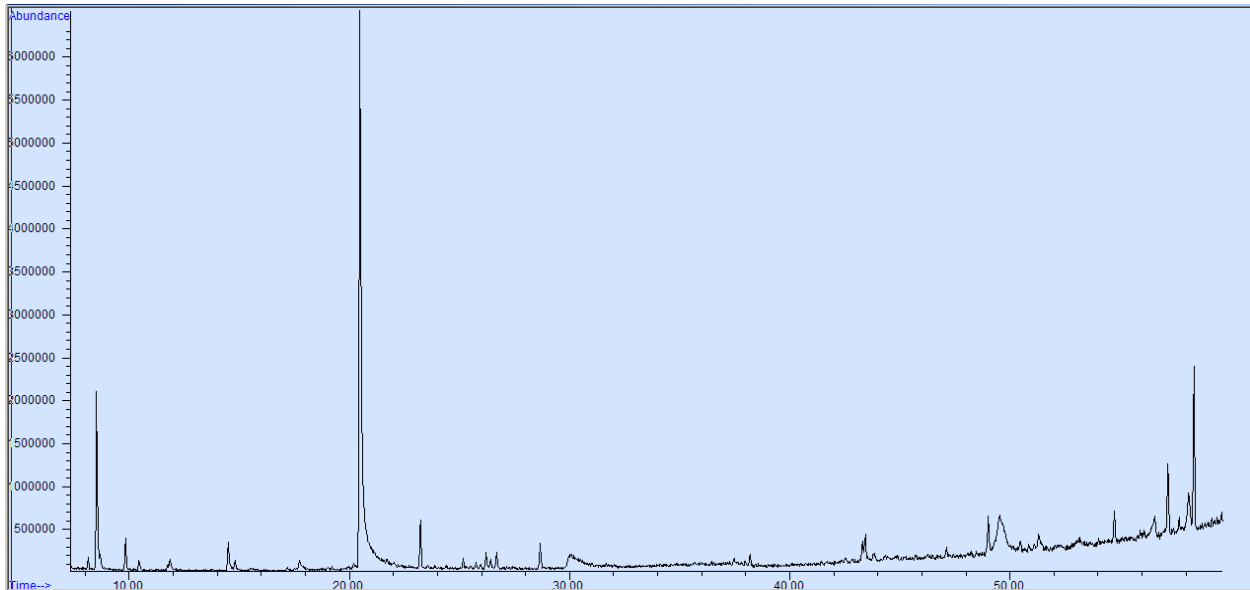
Slika P1.8. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (150 bar; 40 °C)



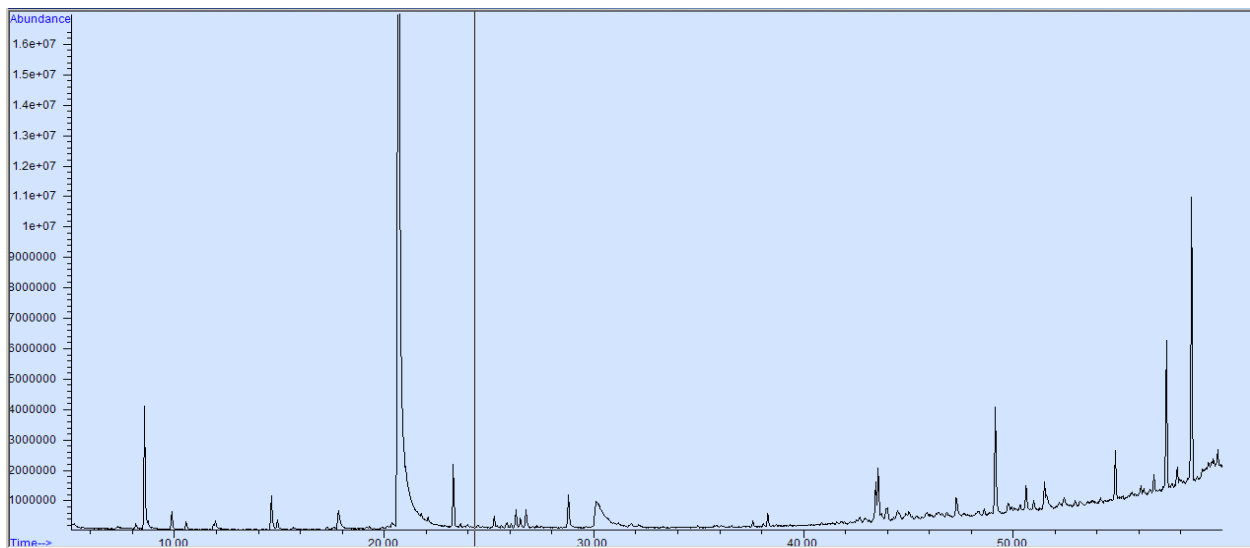
Slika P1.9. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (150 bar; 50 °C)



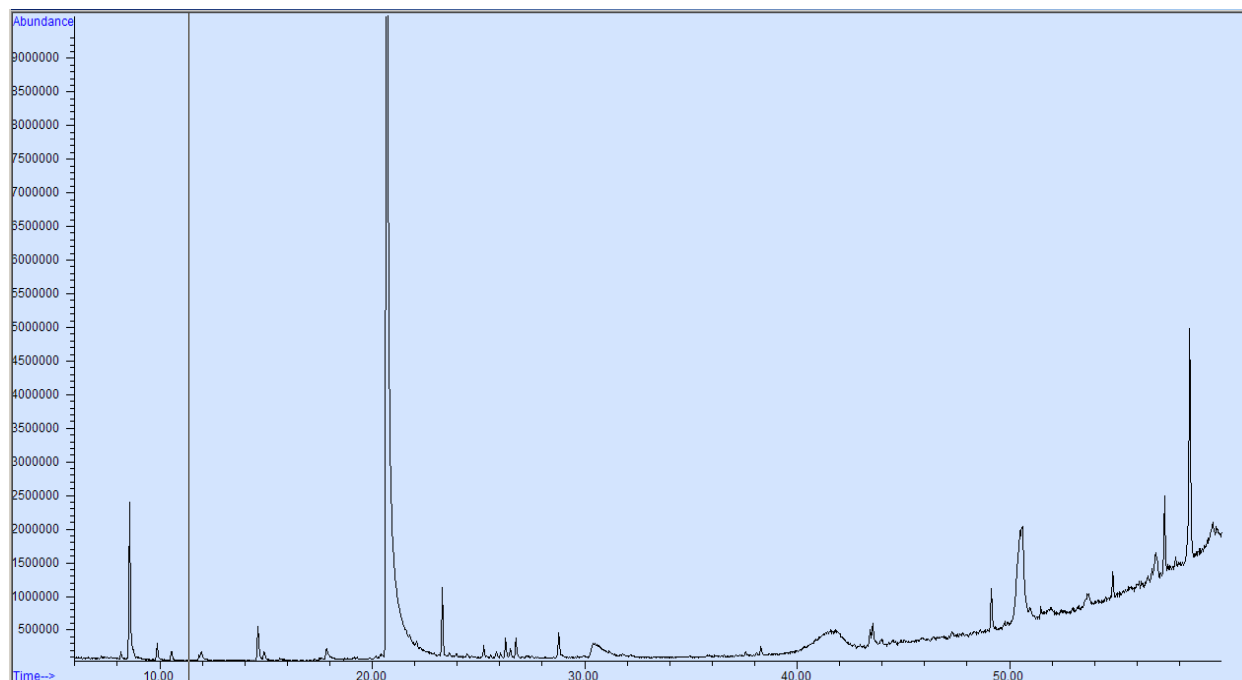
Slika P1.10. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (150 bar; 60 °C)



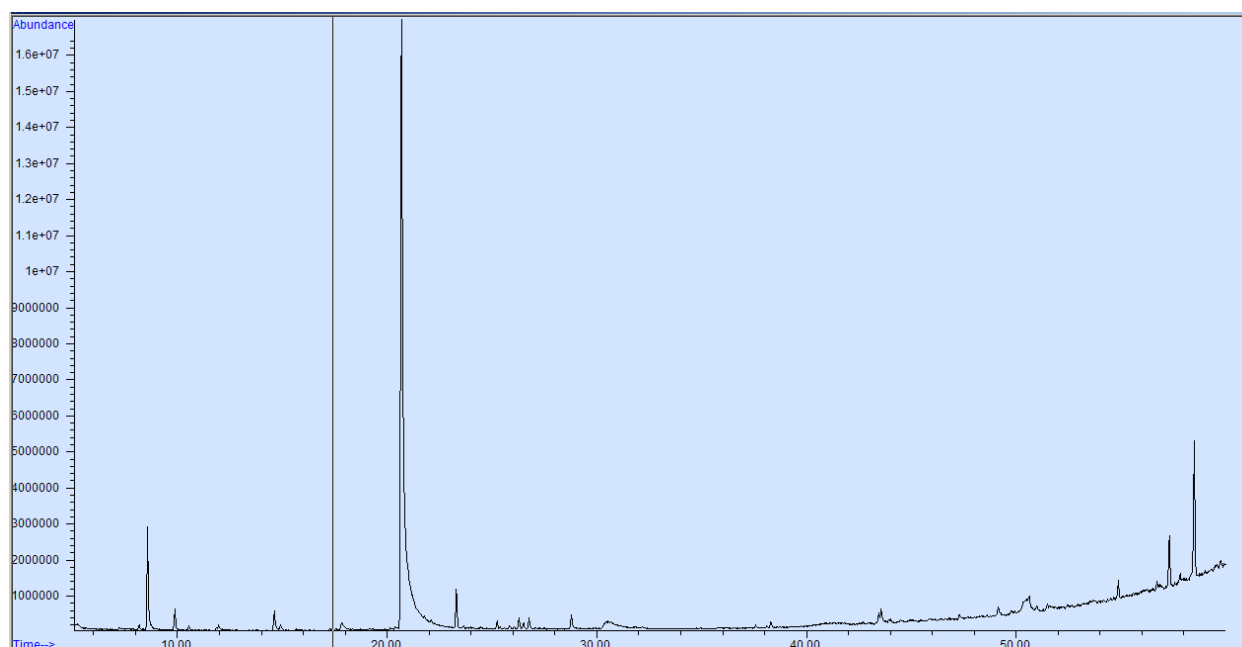
Slika P1.11. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (175 bar; 40 °C)



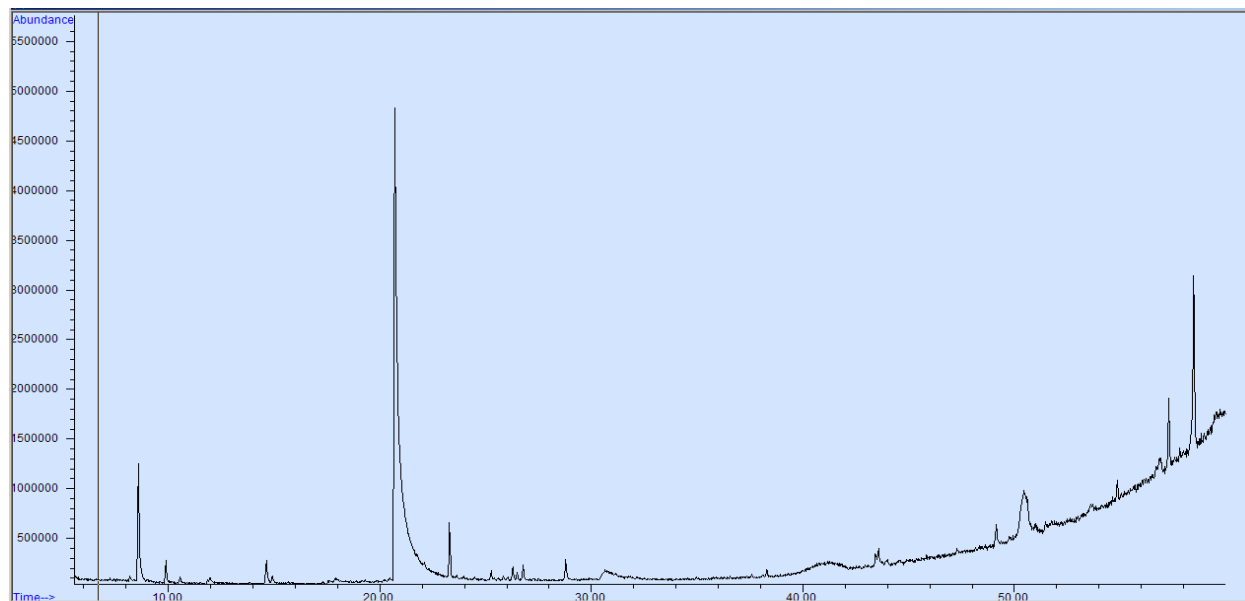
Slika P1.12. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (175 bar; 50 °C)



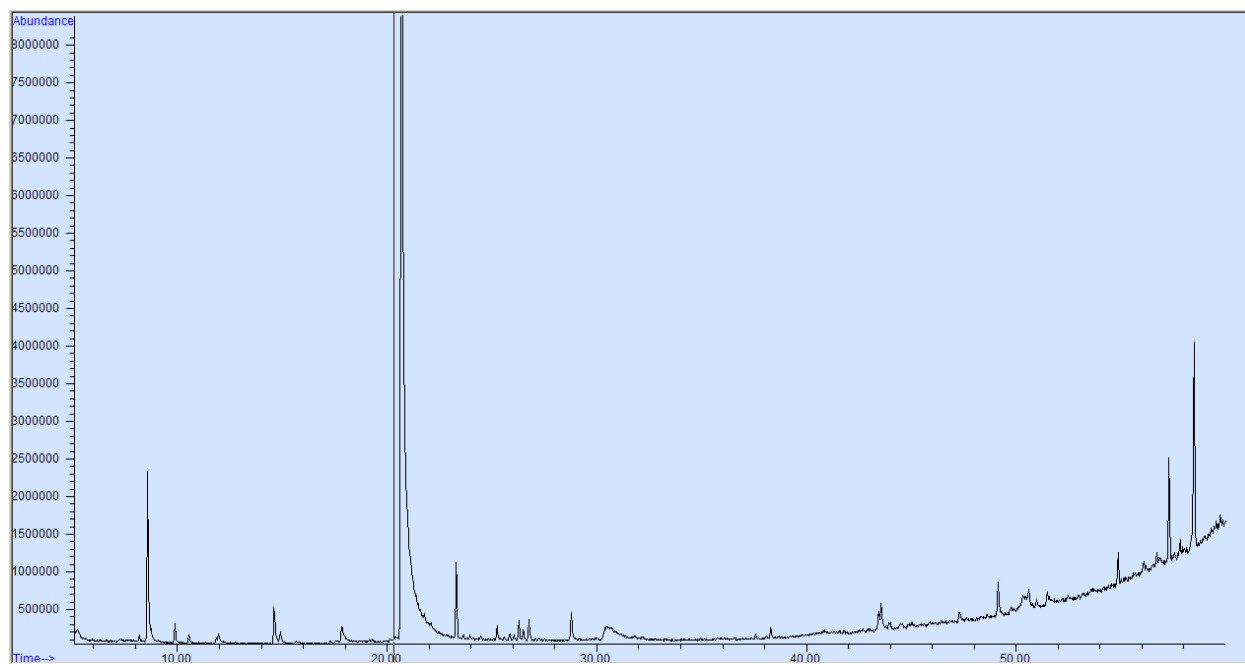
Slika P1.13. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (175 bar; 60 °C)



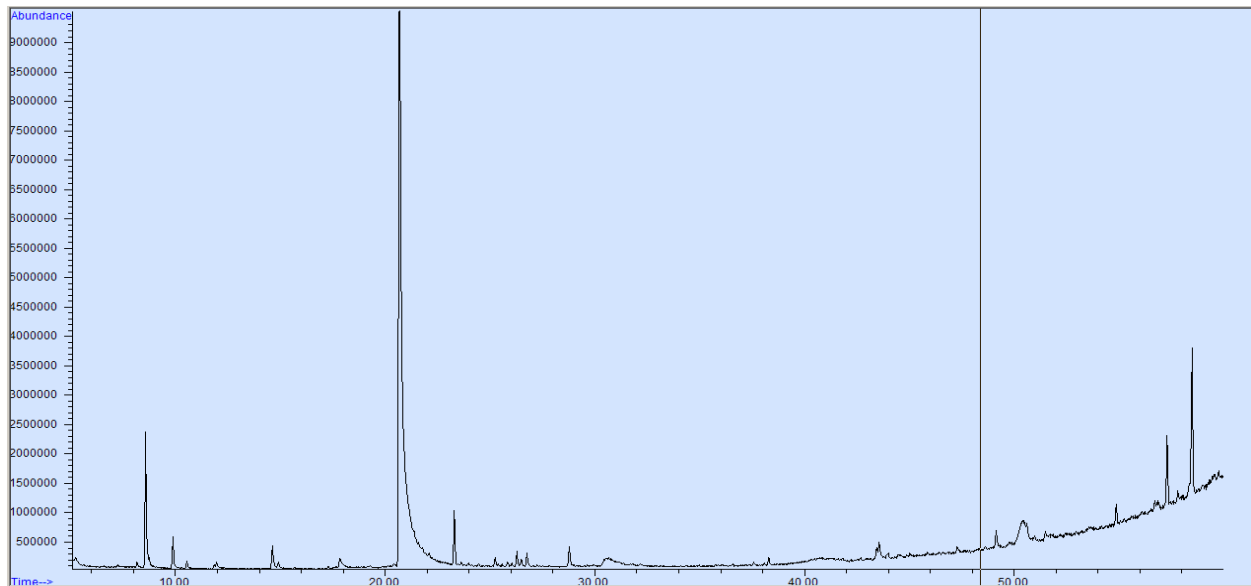
Slika P1.14. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (200 bar; 40 °C)



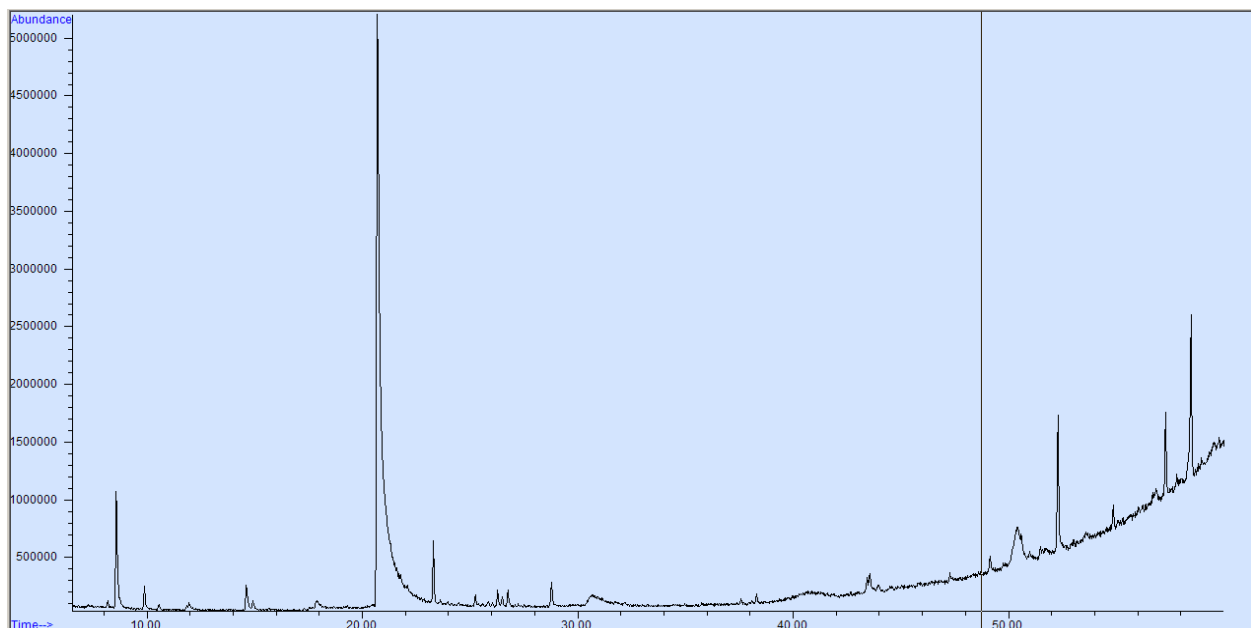
Slika P1.15. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (200 bar; 50 °C)



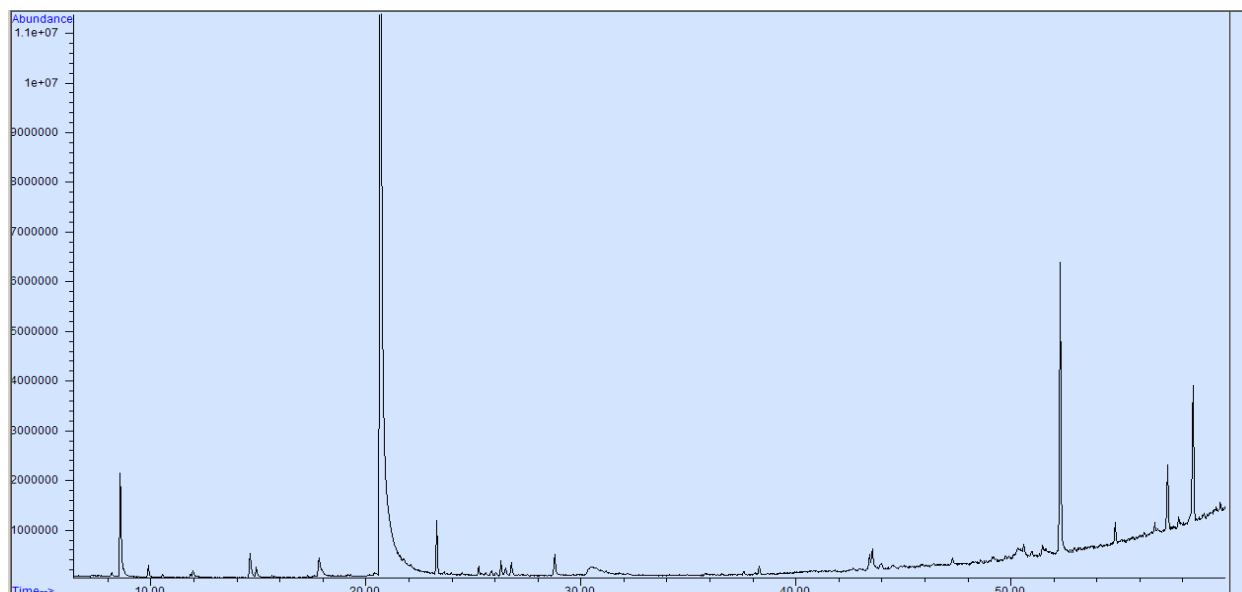
Slika P1.16. GC/MS hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (200 bar; 60°C)



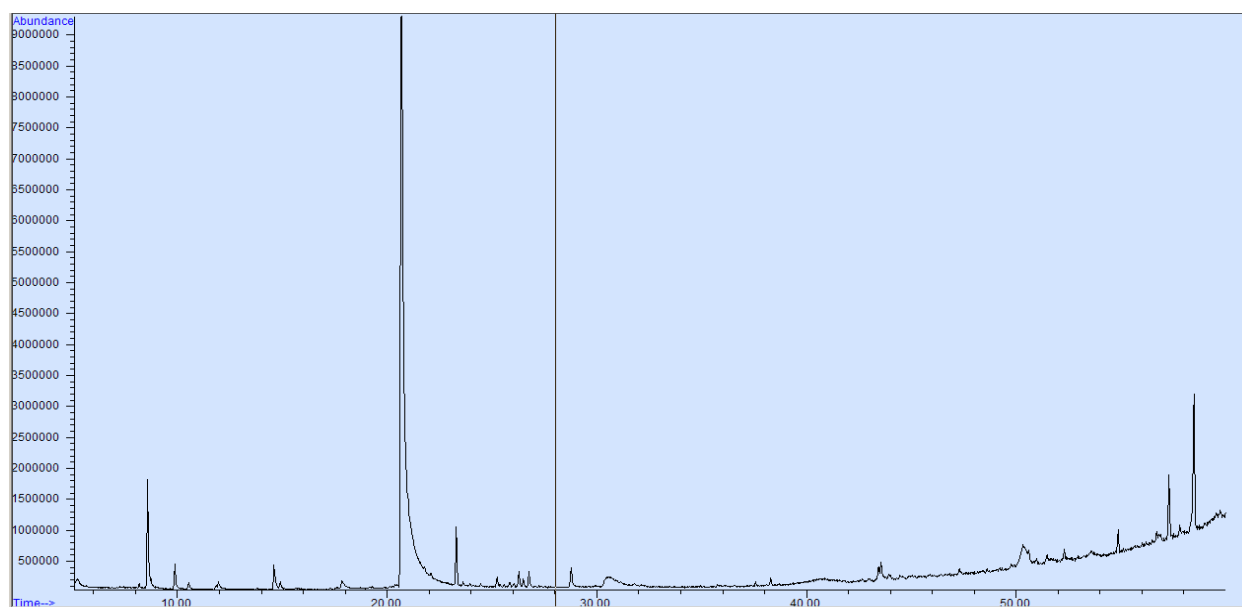
Slika P1.17. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (225 bar; 40 °C)



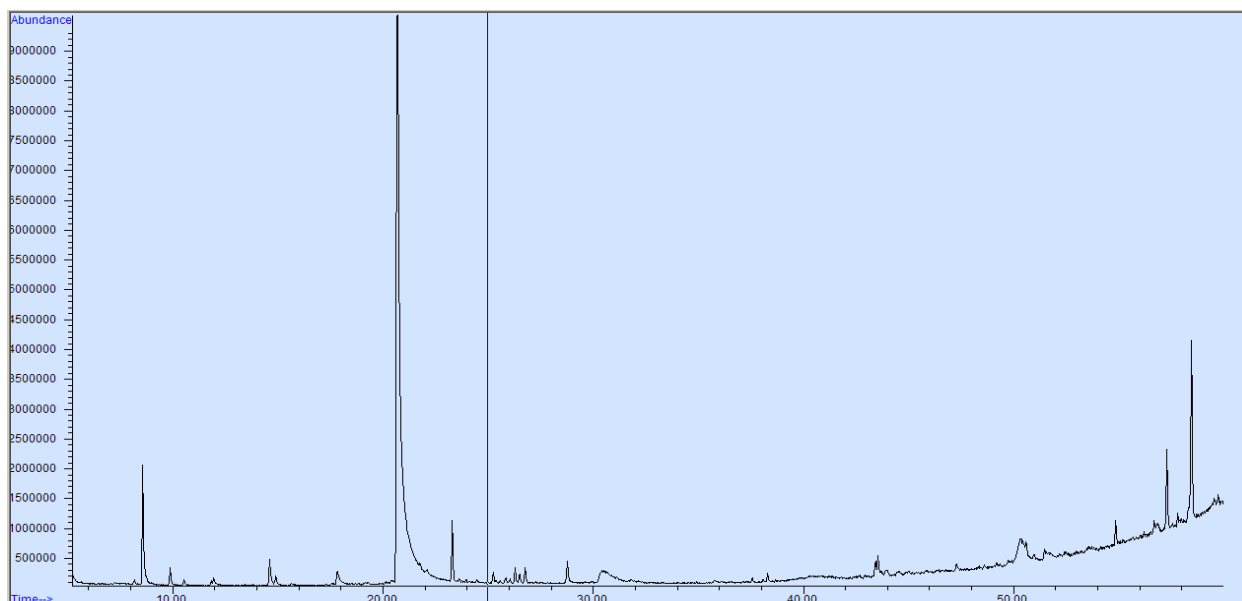
Slika P1.18. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (225 bar; 50 °C)



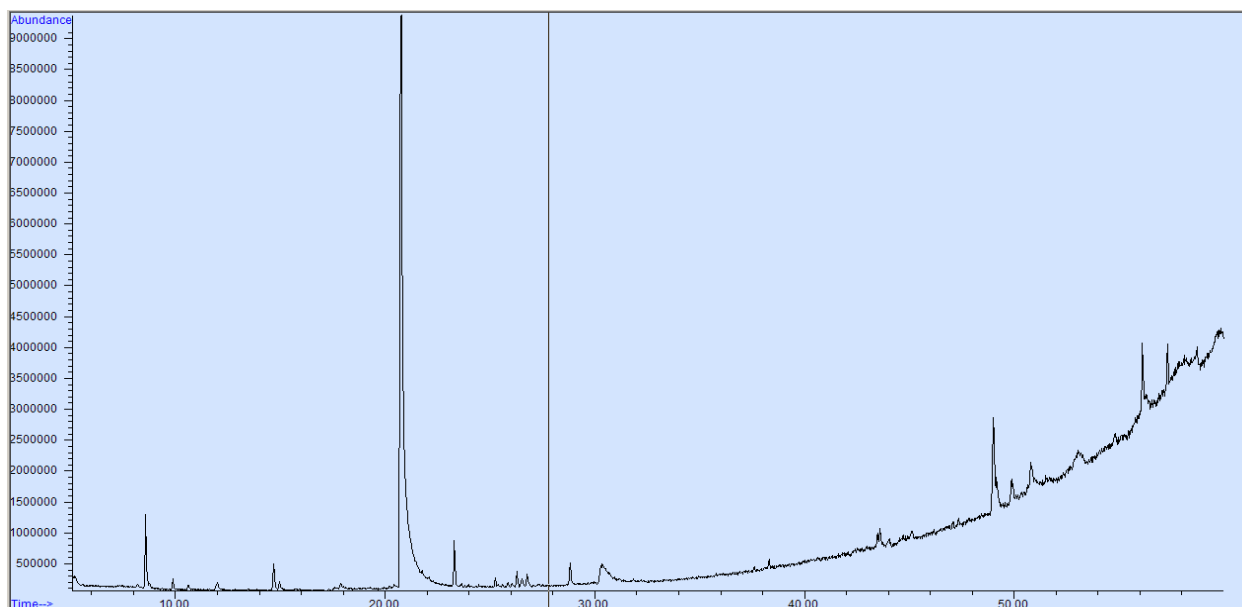
Slika P1.19. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (225 bar; 60 °C)



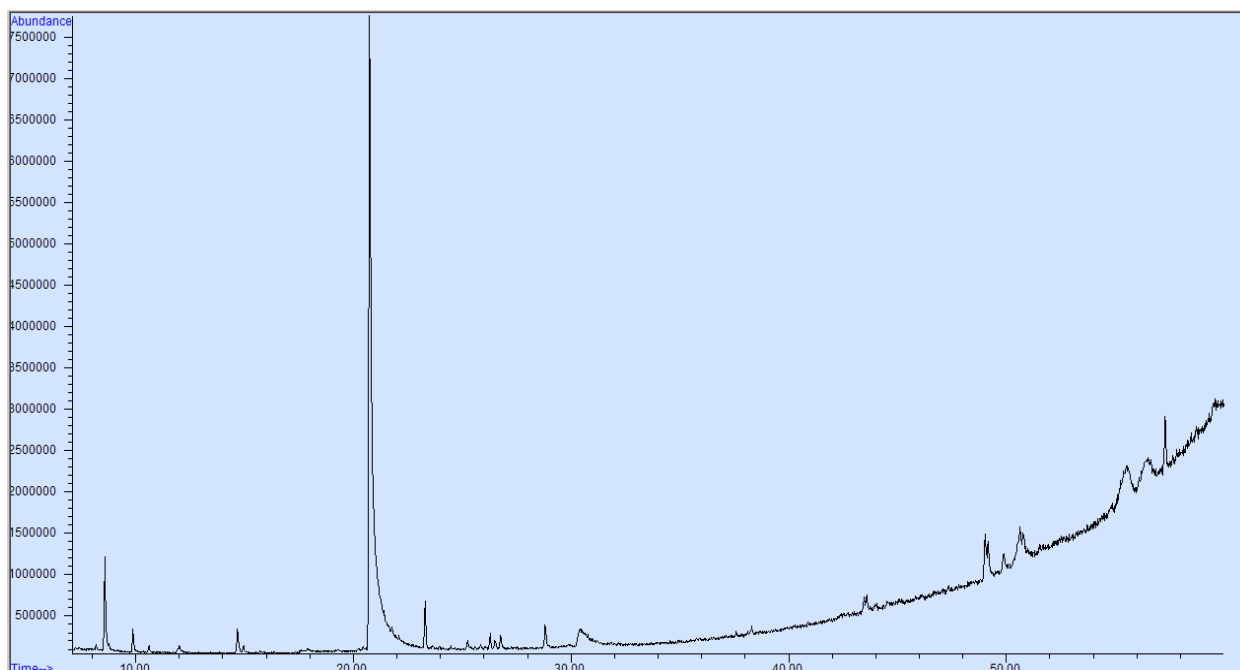
Slika P1.20. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (250 bar; 40 °C)



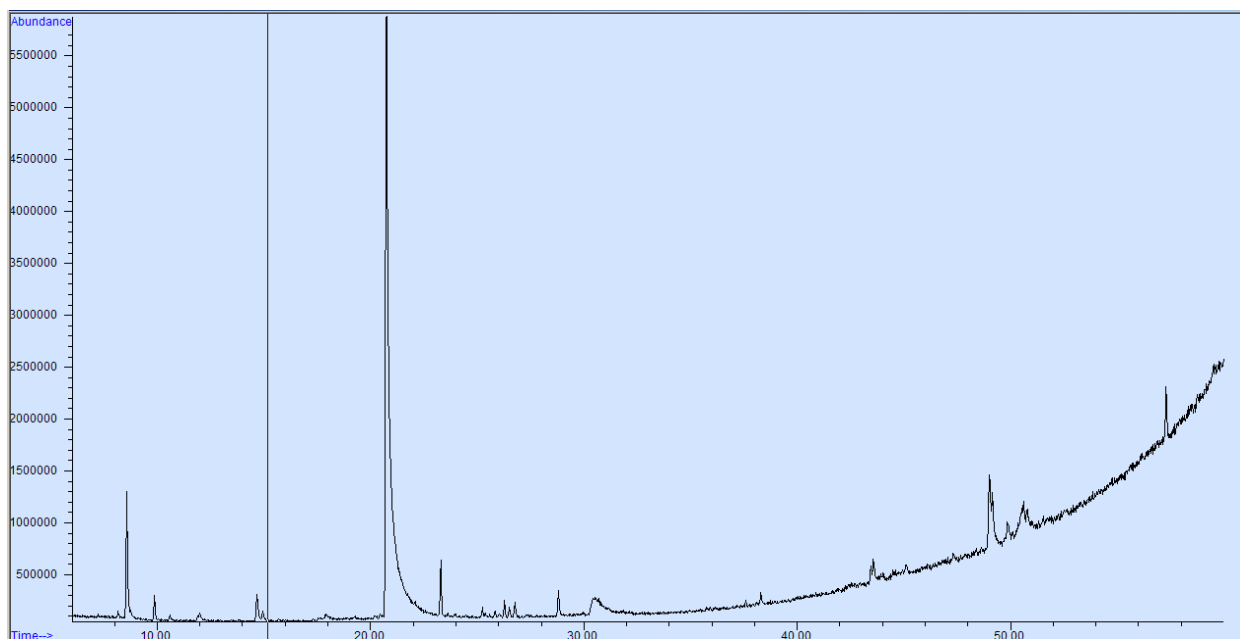
Slika P1.21. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (250 bar; 50 °C)



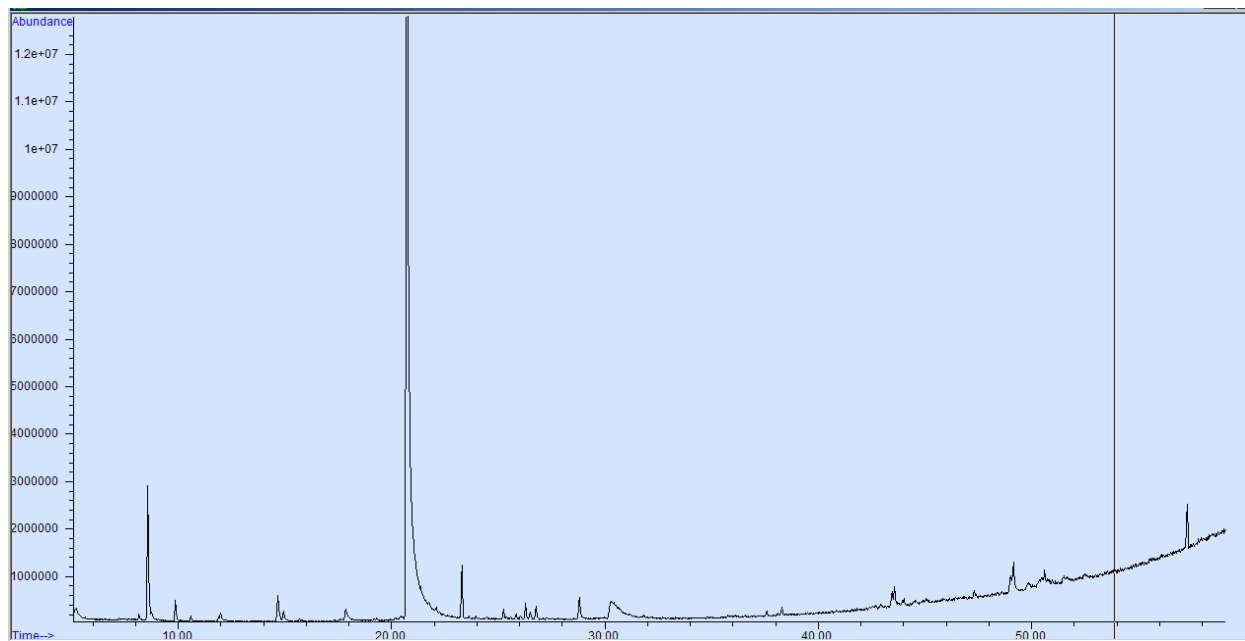
Slika P1.22. GC/MS hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (250 bar; 60°C)



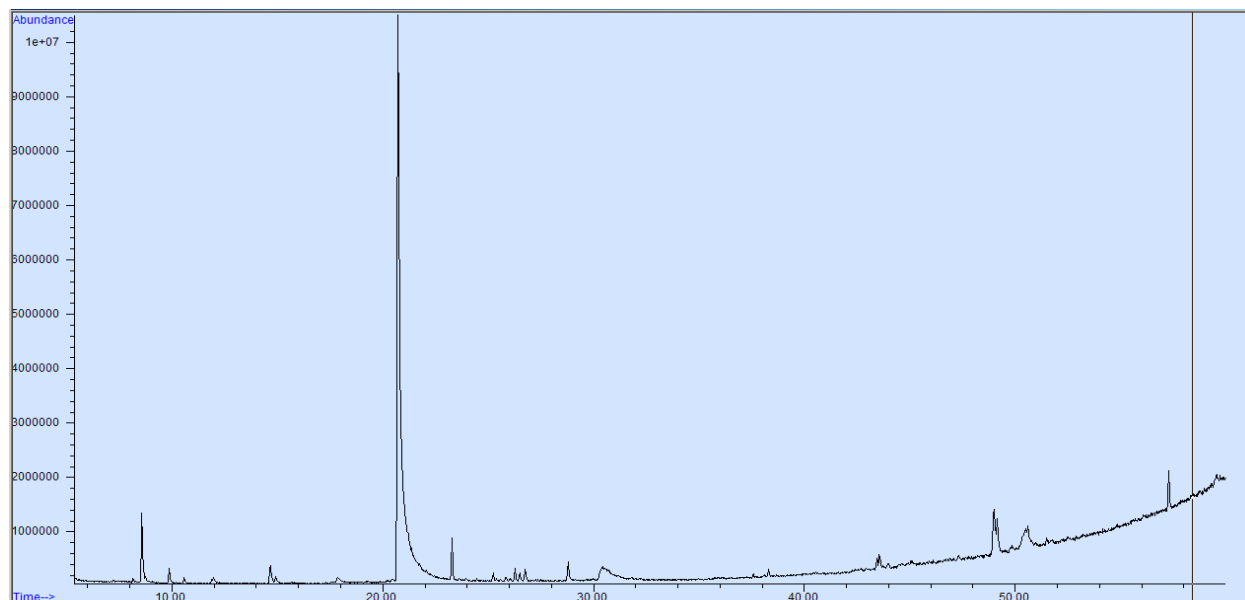
Slika P1.23. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (275 bar; 40 °C)



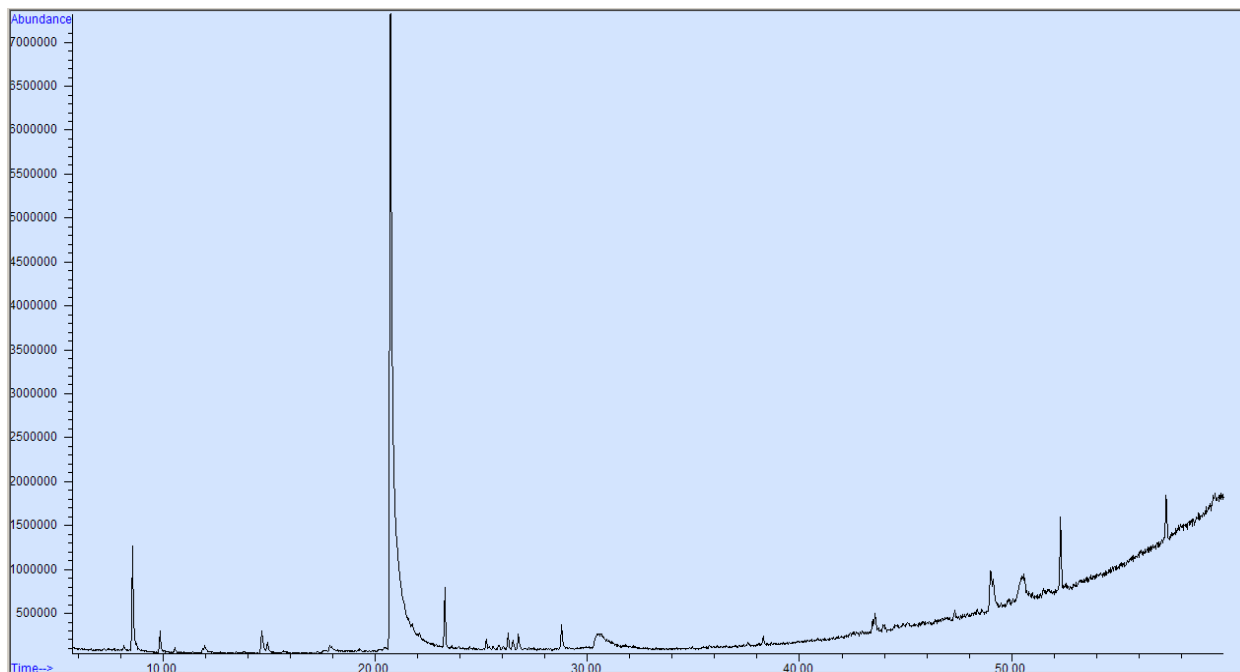
Slika P1.24. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (275 bar; 50 °C)



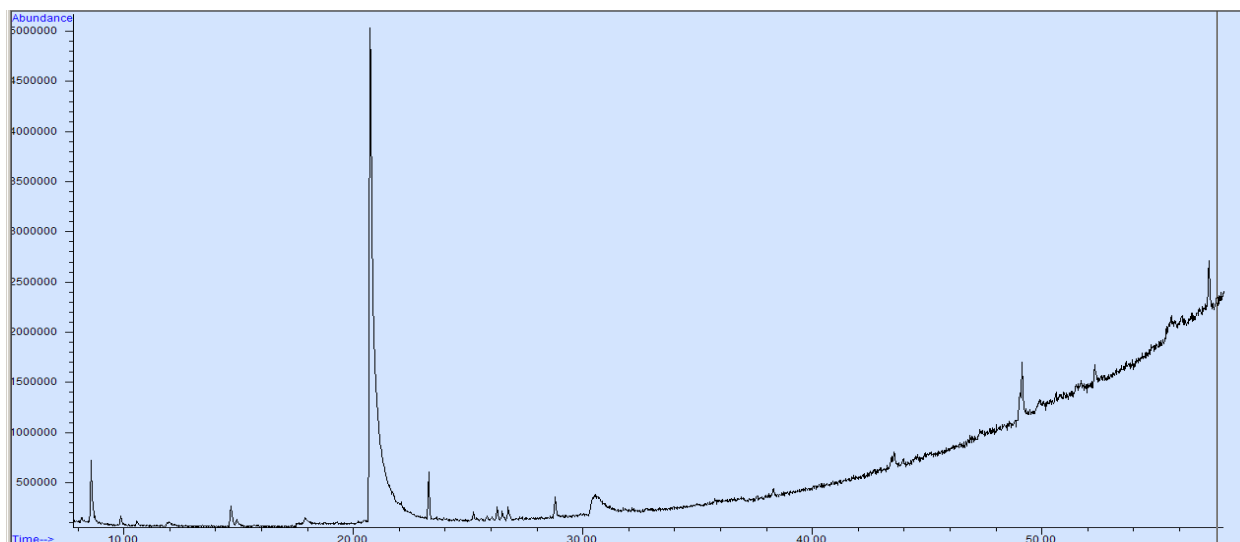
Slika P1.25. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (275 bar; 60 °C)



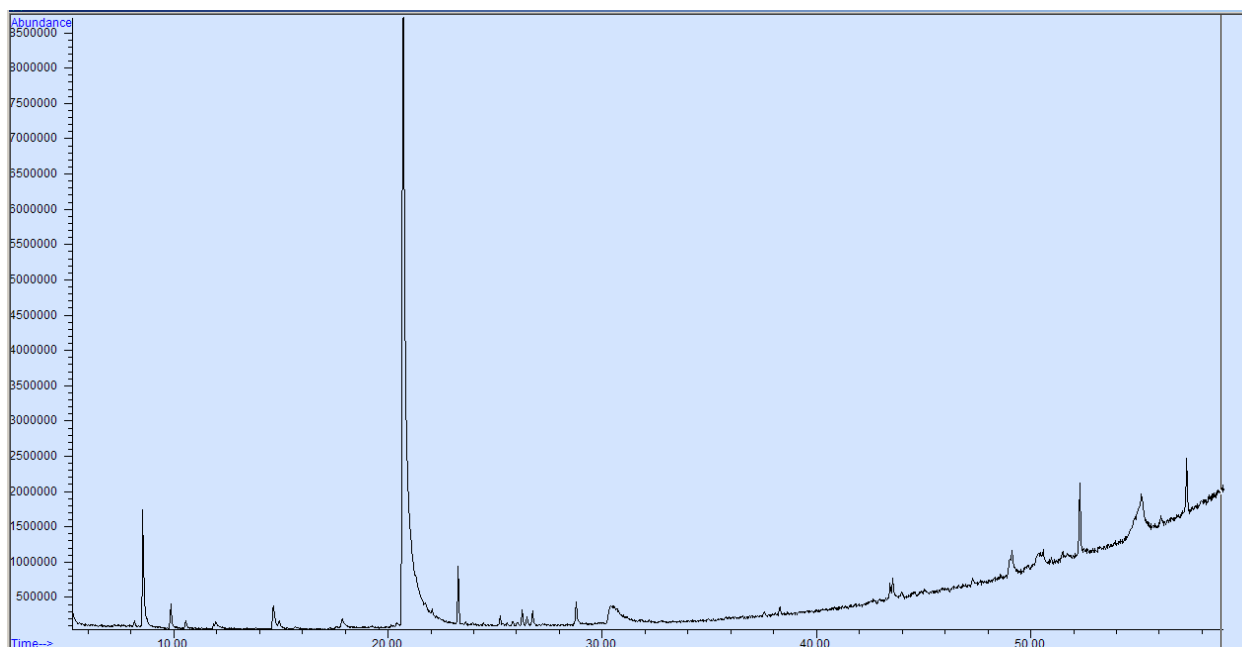
Slika P1.26. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (300 bar; 40 °C)



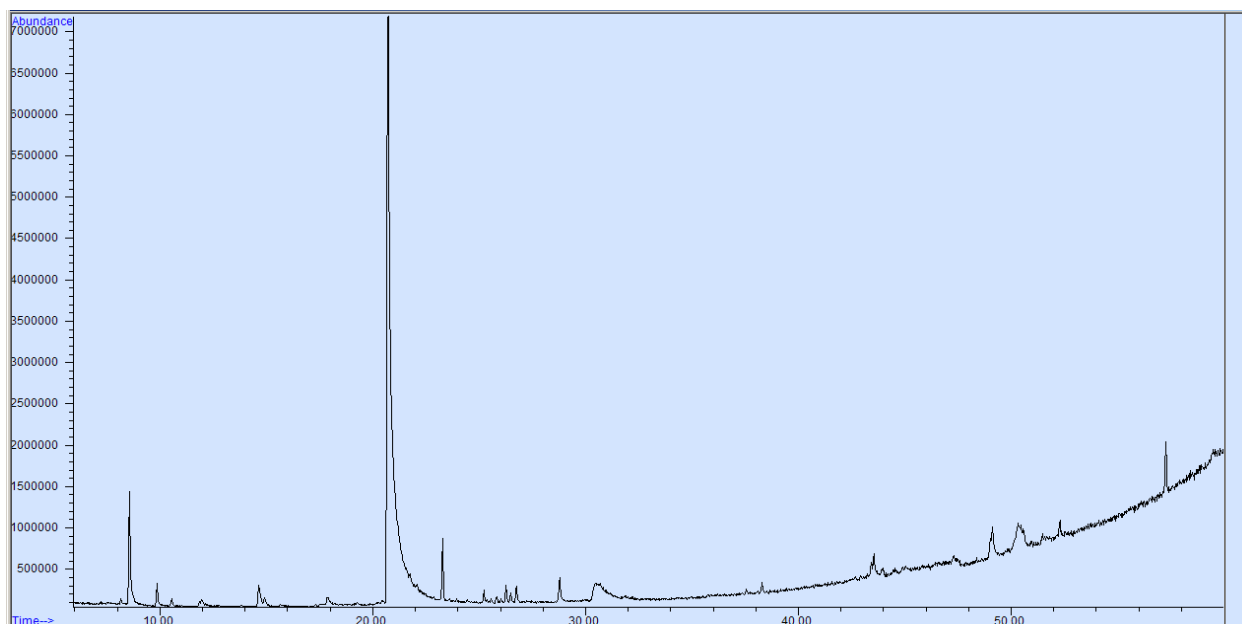
Slika P1.27. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (300 bar; 50 °C)



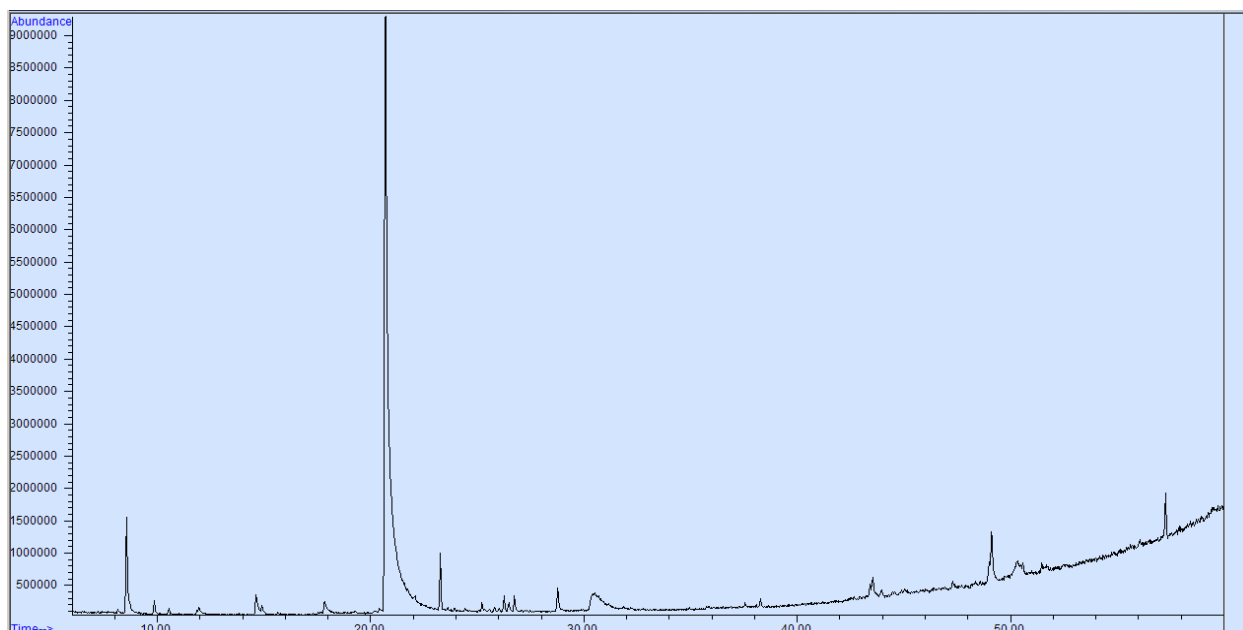
Slika P1.28. GC/MS hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (300 bar; 60°C)



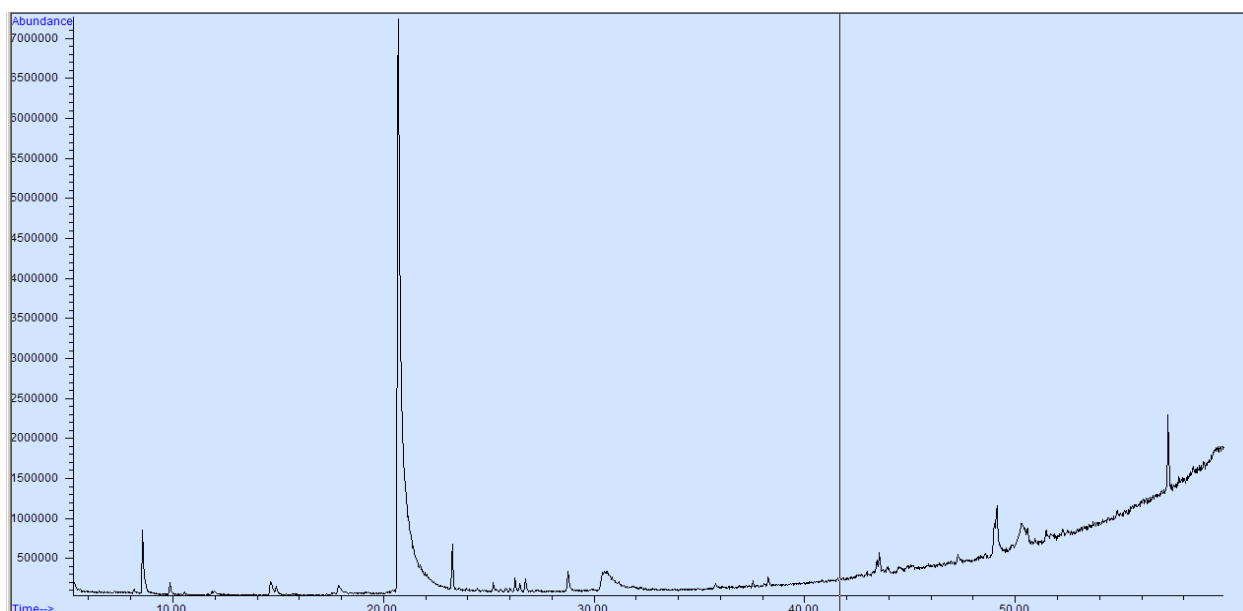
Slika P1.29. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (325 bar; 40 °C)



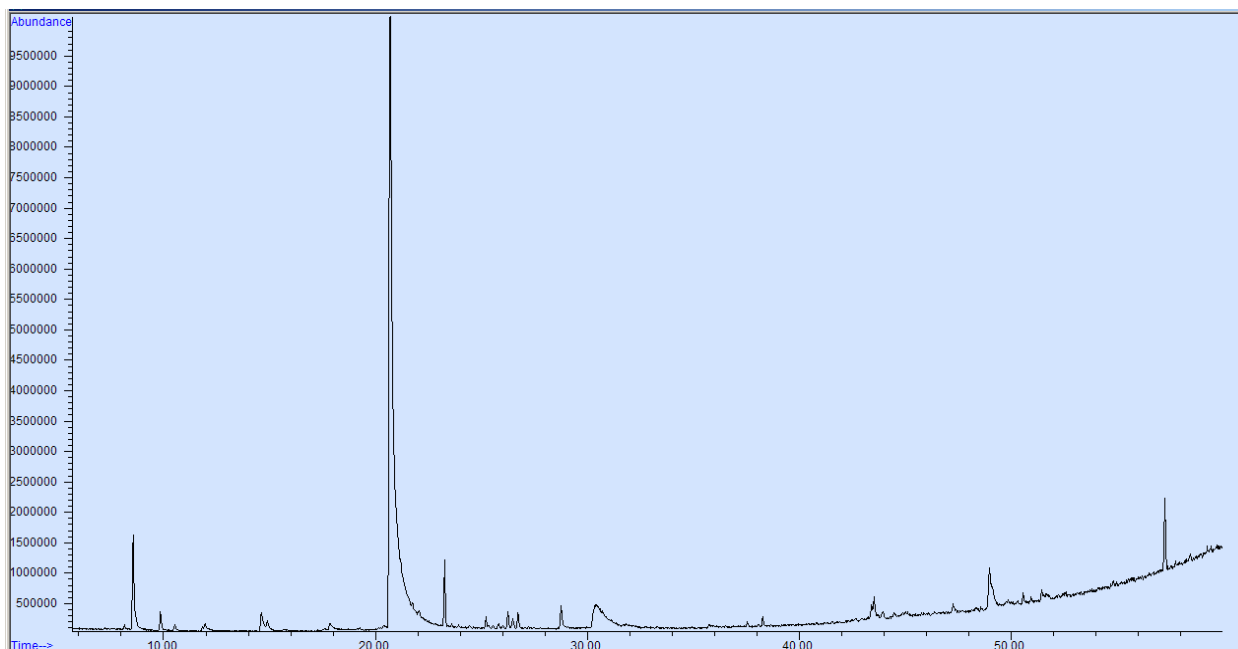
Slika P1.30. GC/MS hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (325 bar; 50°C)



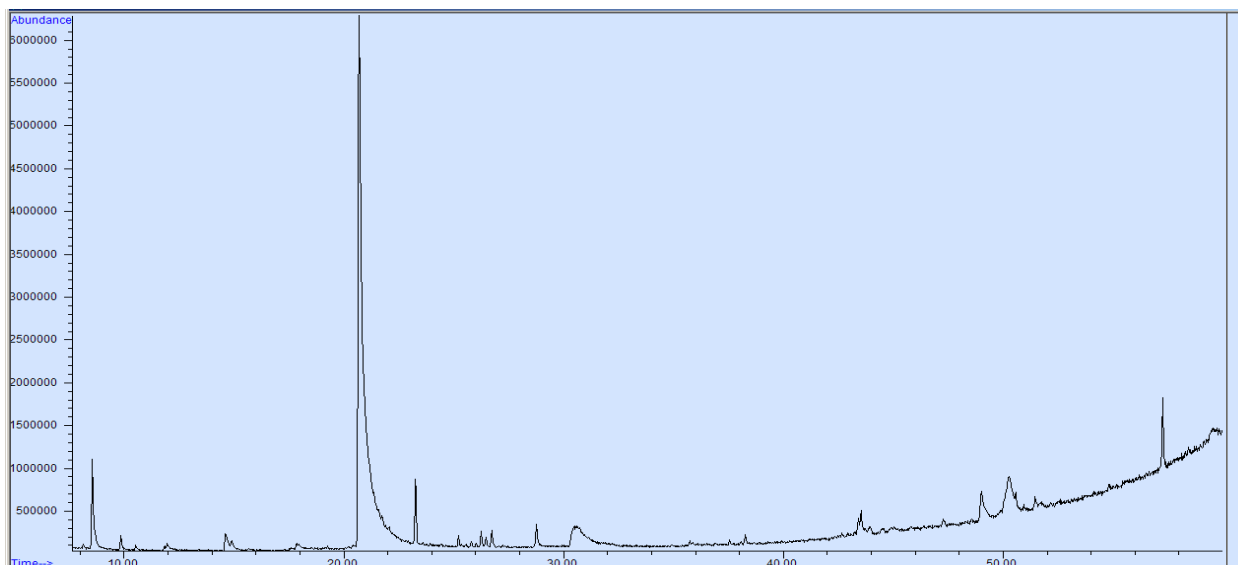
Slika P1.31. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (325 bar; 60 °C)



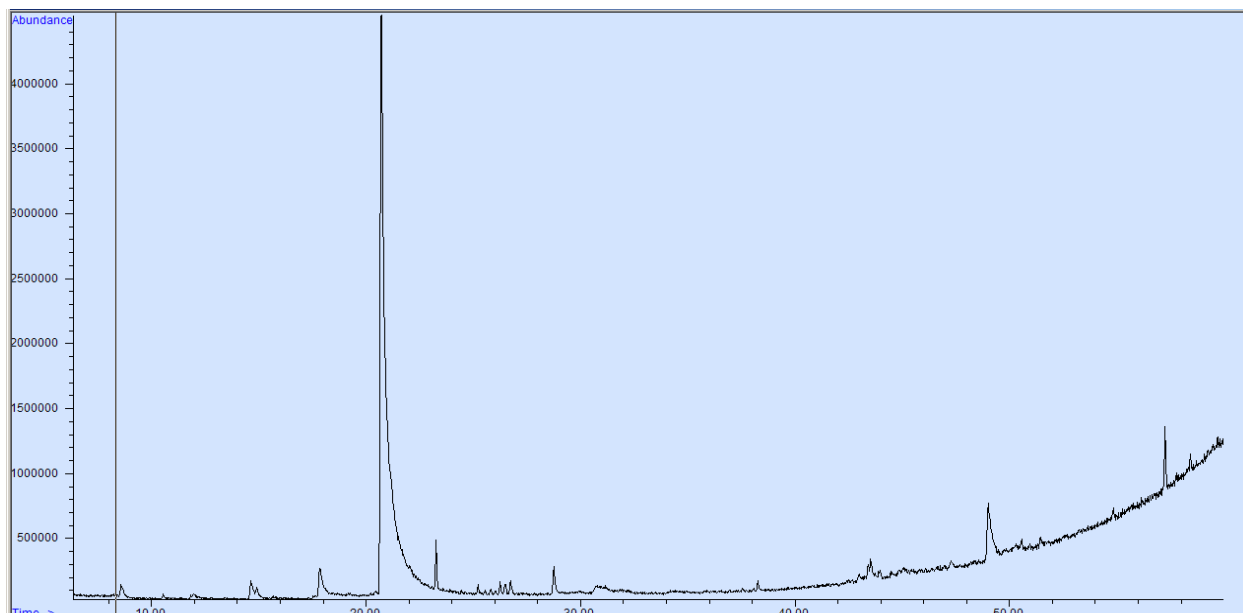
Slika P1.32. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (350 bar; 40 °C)



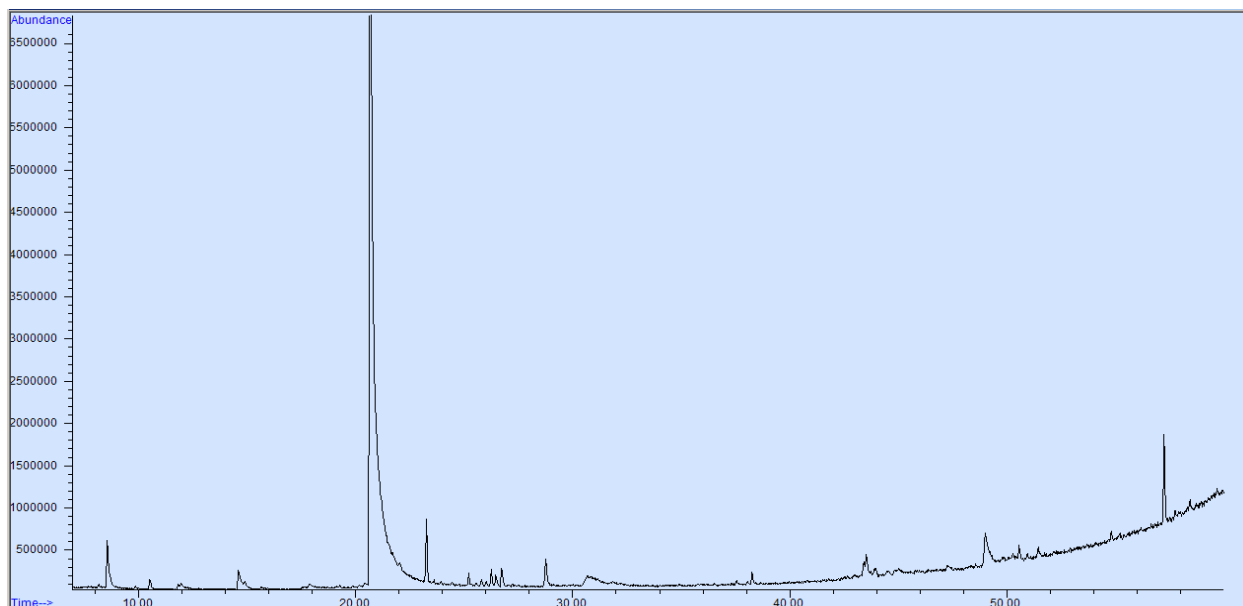
Slika P1.33. GC/MS hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (350 bar; 50°C)



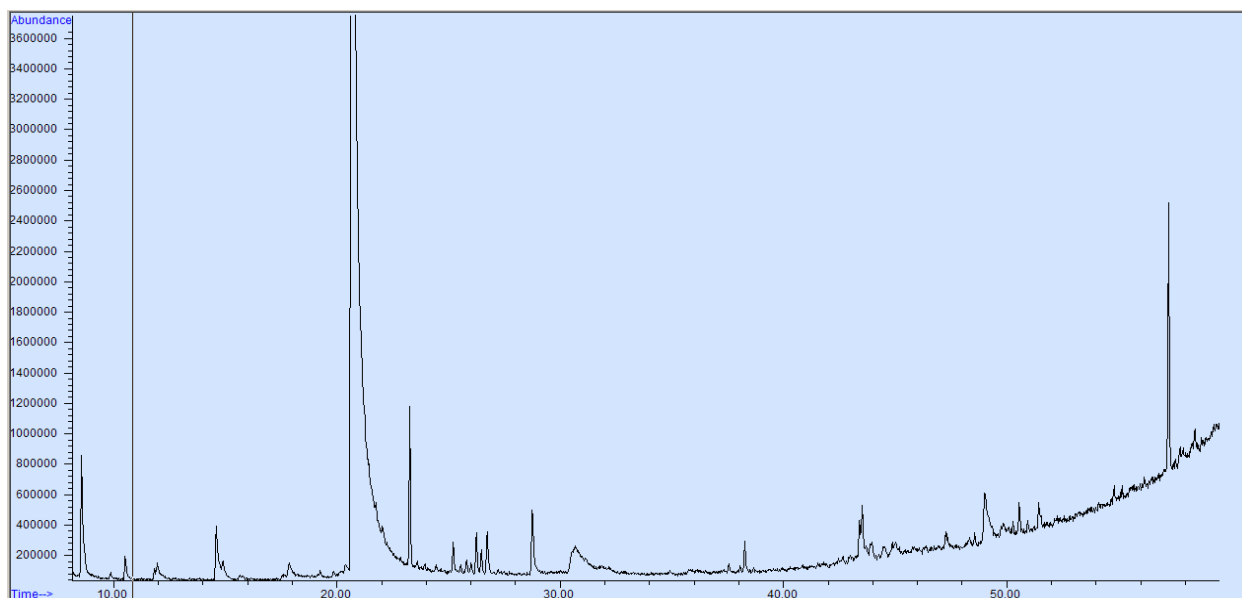
Slika P1.34. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (350 bar; 60 °C)



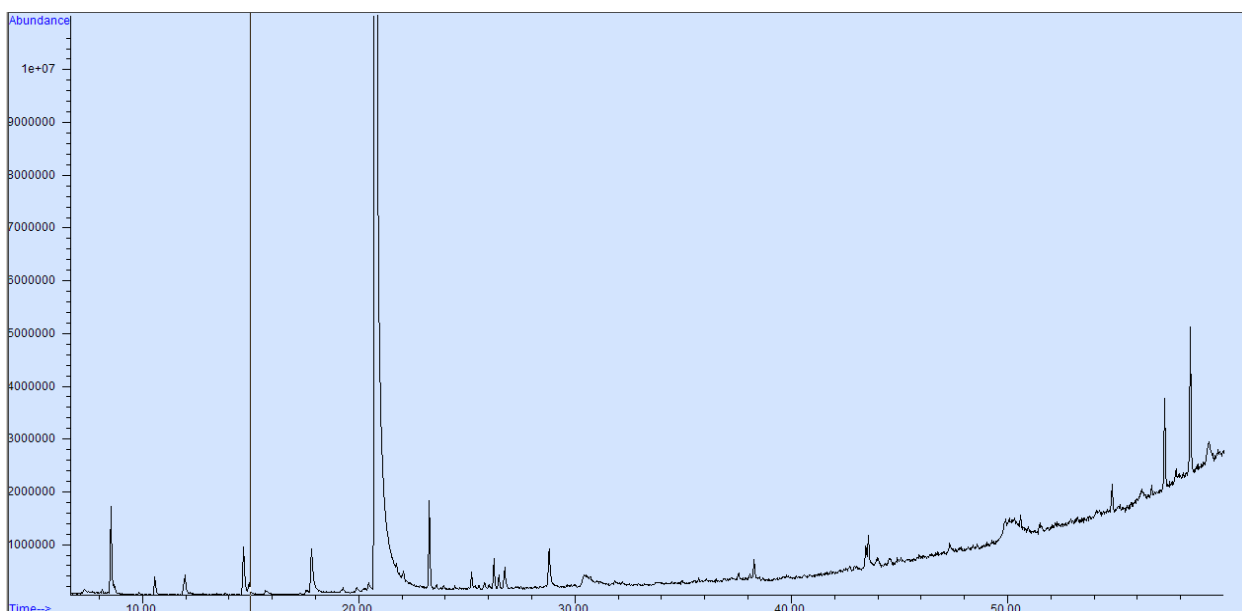
Slika P2.1. GC/MS hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (100 bar; 40 °C), uz predtretman vodom (E1).



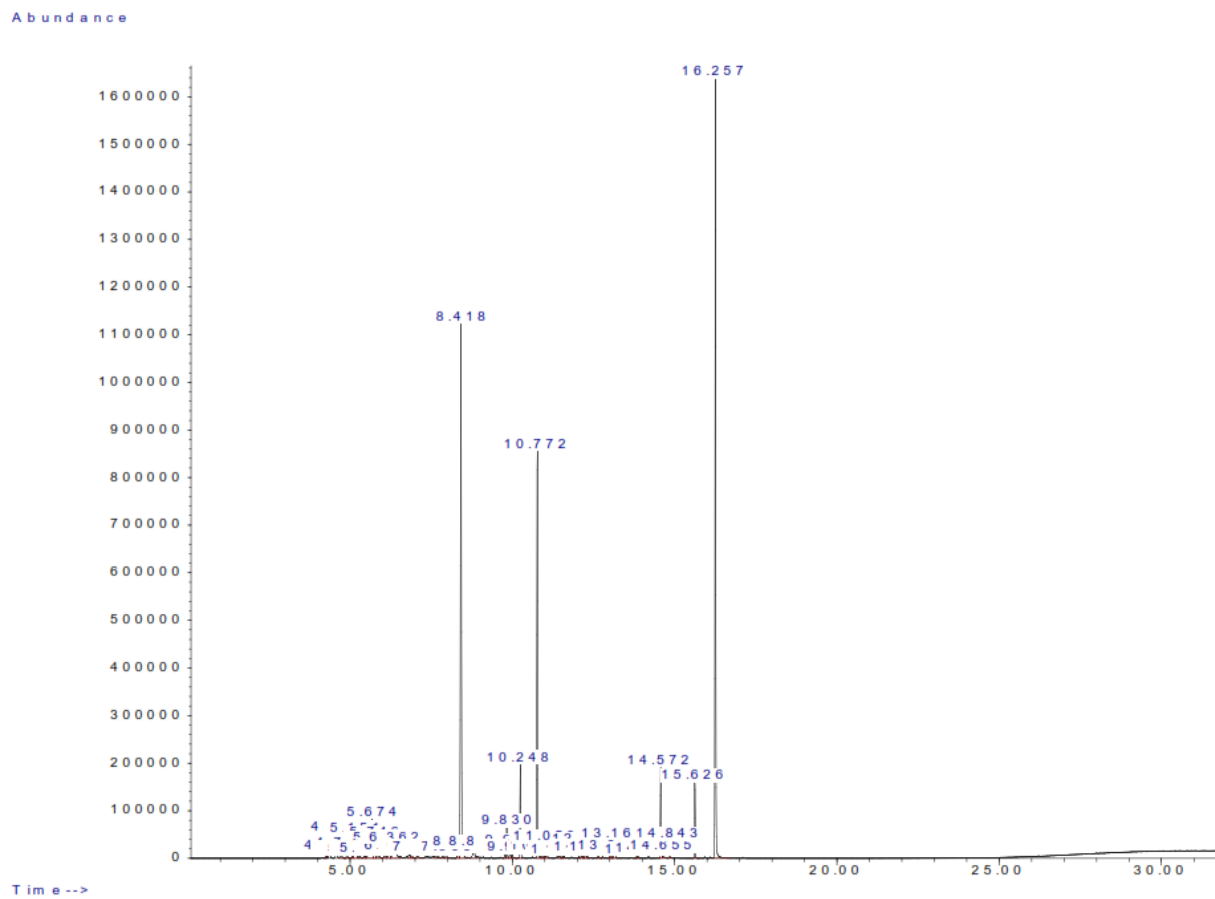
Slika P2.2. GC hromatogram uzorka dobijenog superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom (100 bar; 40°C), uz predtretman izlaganjem CO₂ (E2).



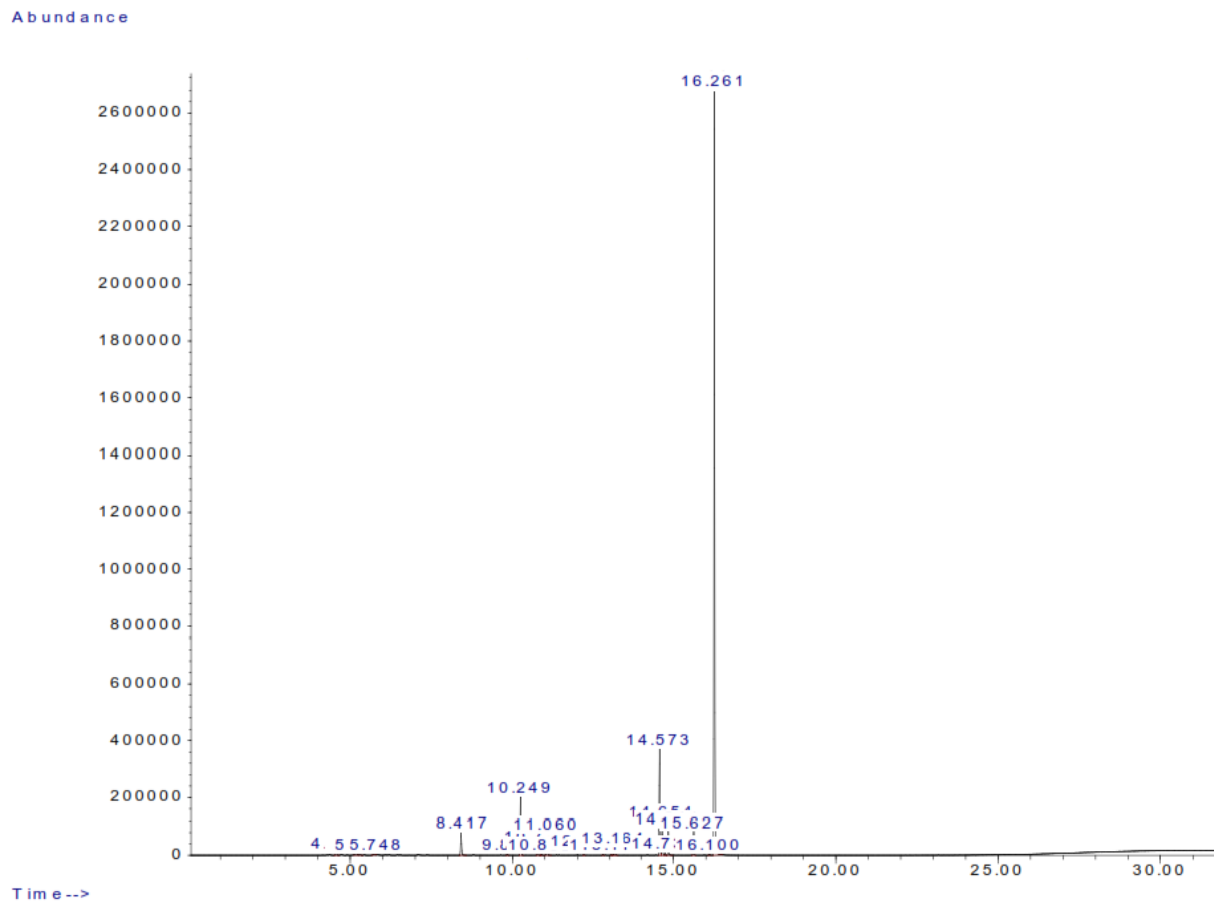
Slika P2.3. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (100 bar; 40 °C), uz predtretman ultrazvukom (E3).



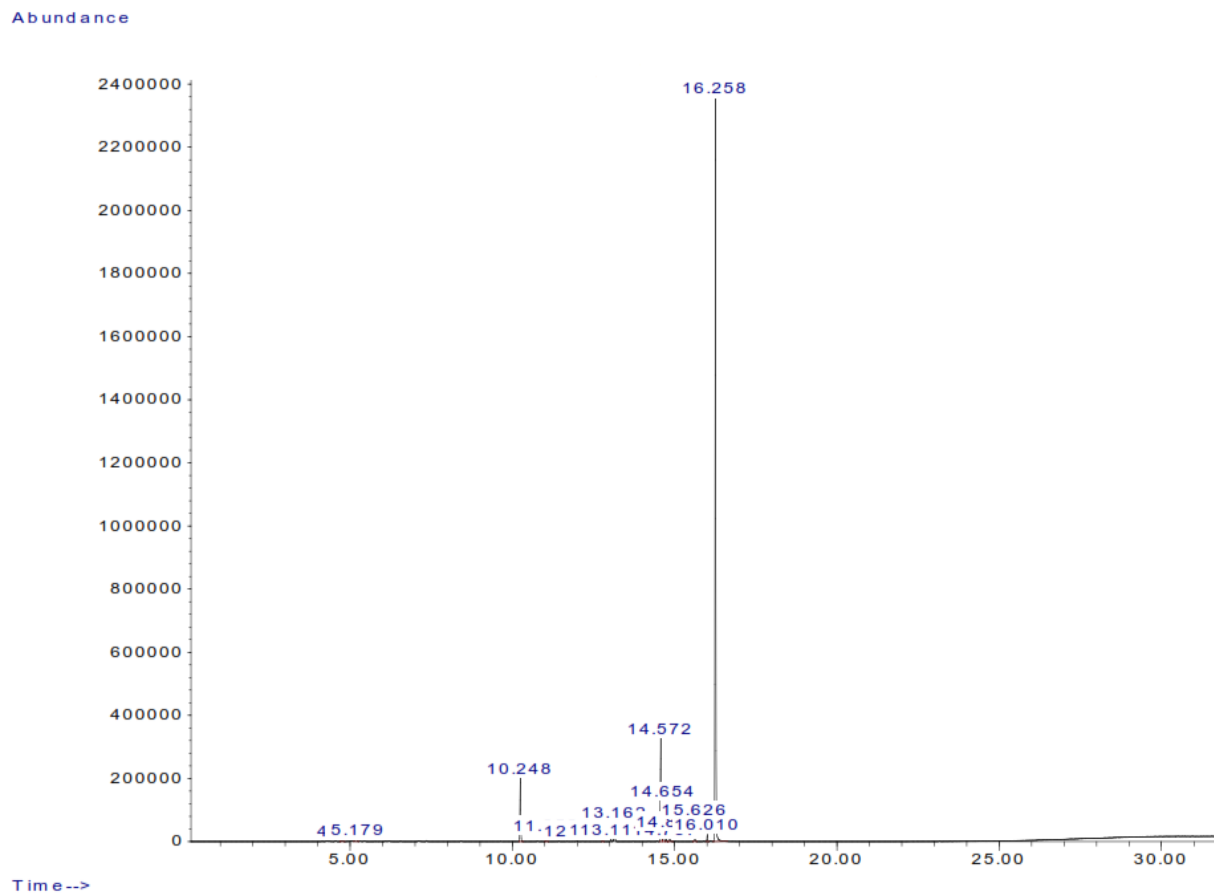
Slika P2.4. GC hromatogram uzorka dobijenog superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom (100 bar; 40 °C), uz predtretman etanolom (E4).



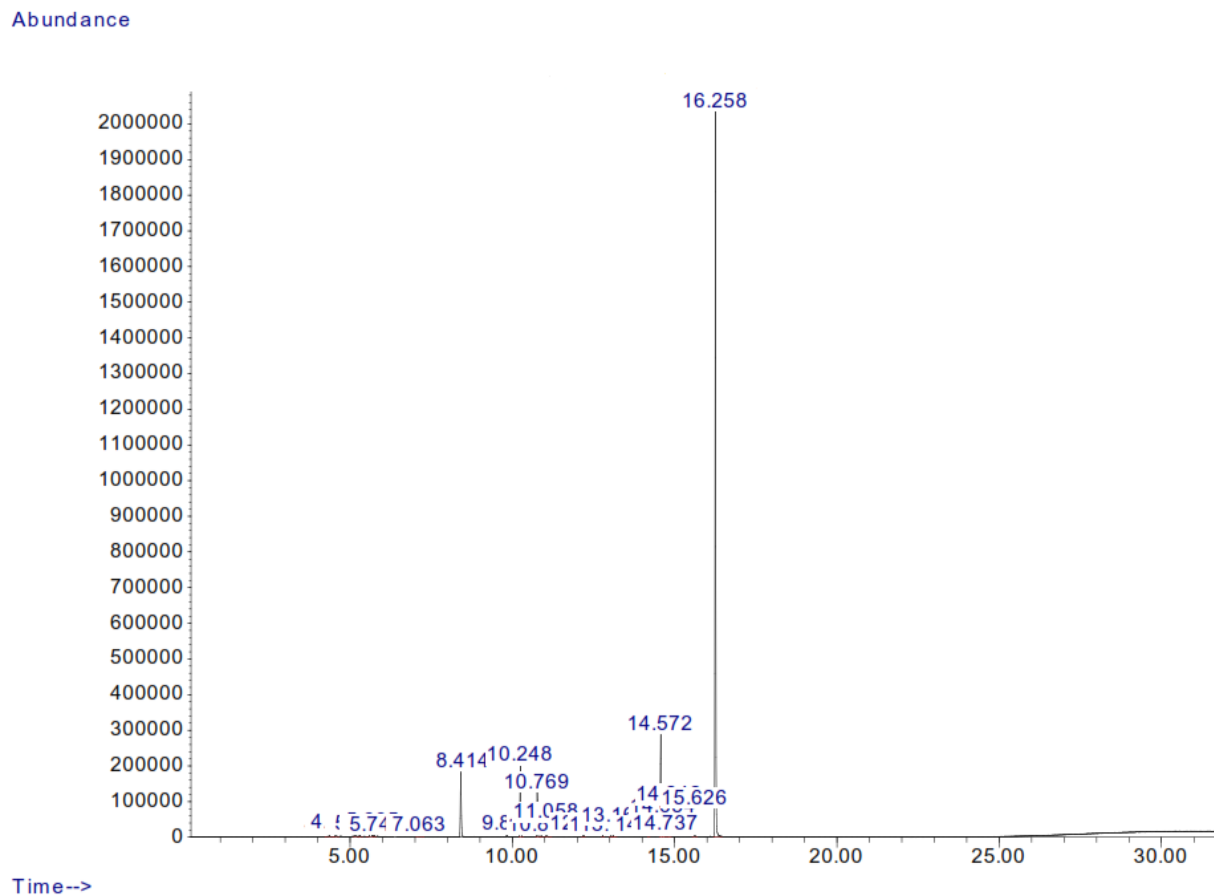
Slika P3.1. GC hromatogram uzorka dobijenog ekstrakcijom subkritičnom vodom (200 °C; 10 min)



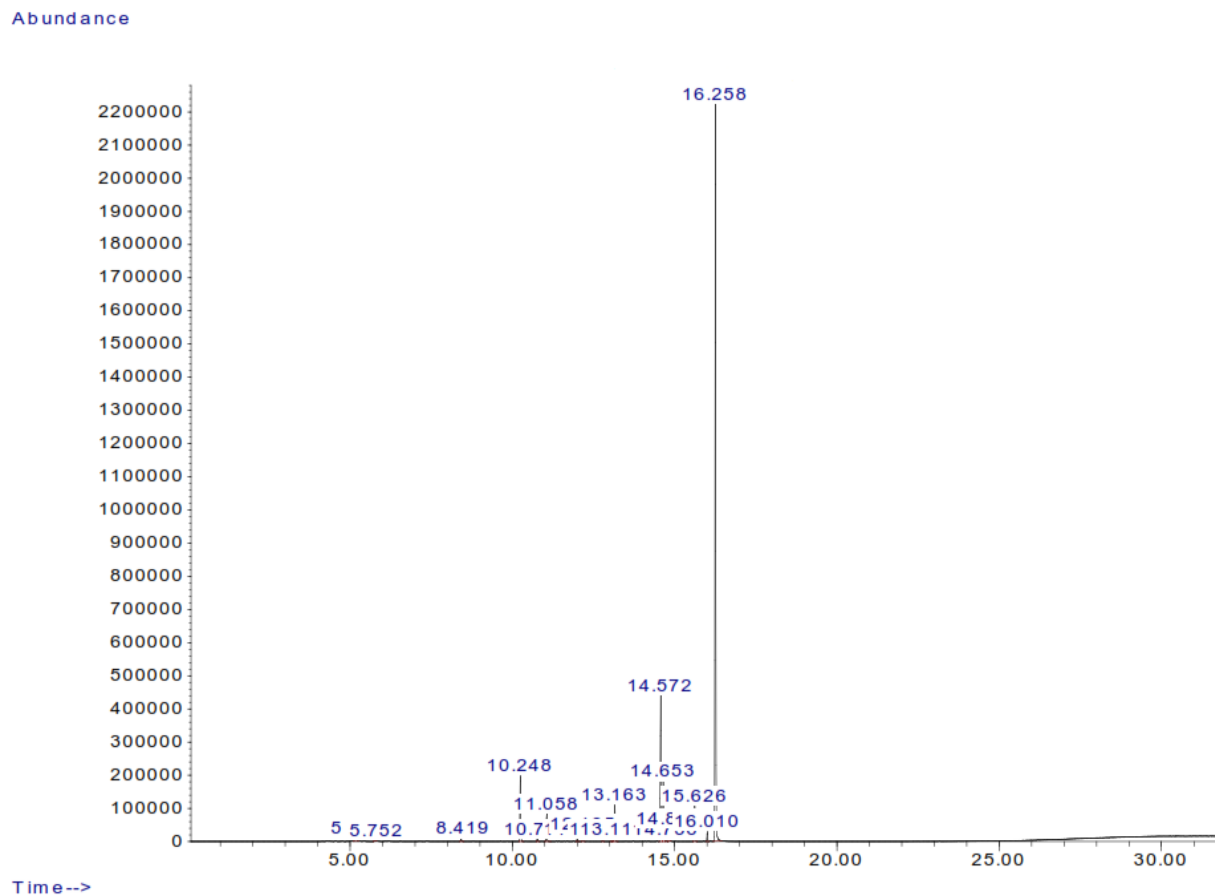
Slika P3.2. GC hromatogram uzorka dobijenog ekstrakcijom subkritičnom vodom (150 °C; 5,9 min)



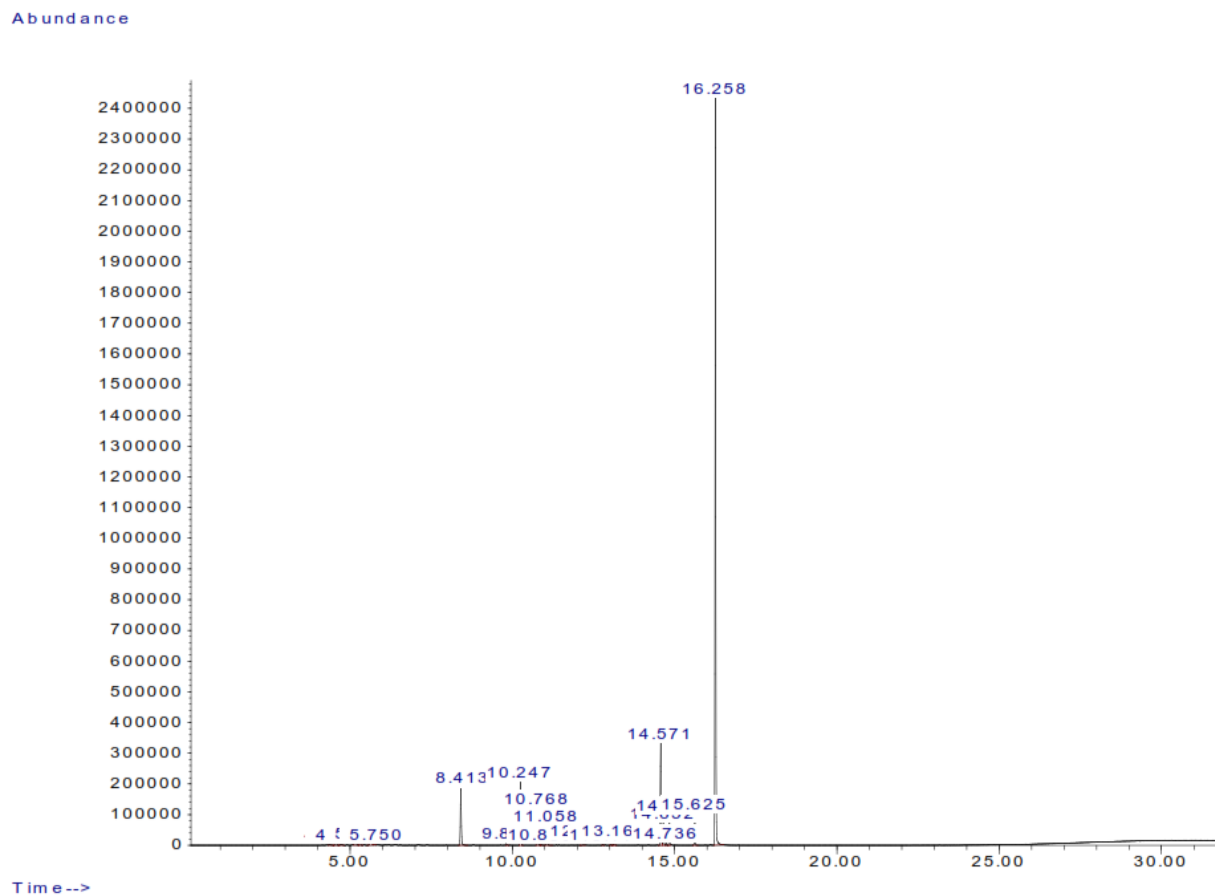
Slika P3.3. GC hromatogram uzorka dobijenog ekstrakcijom subkritičnom vodom (100 °C; 30 min)



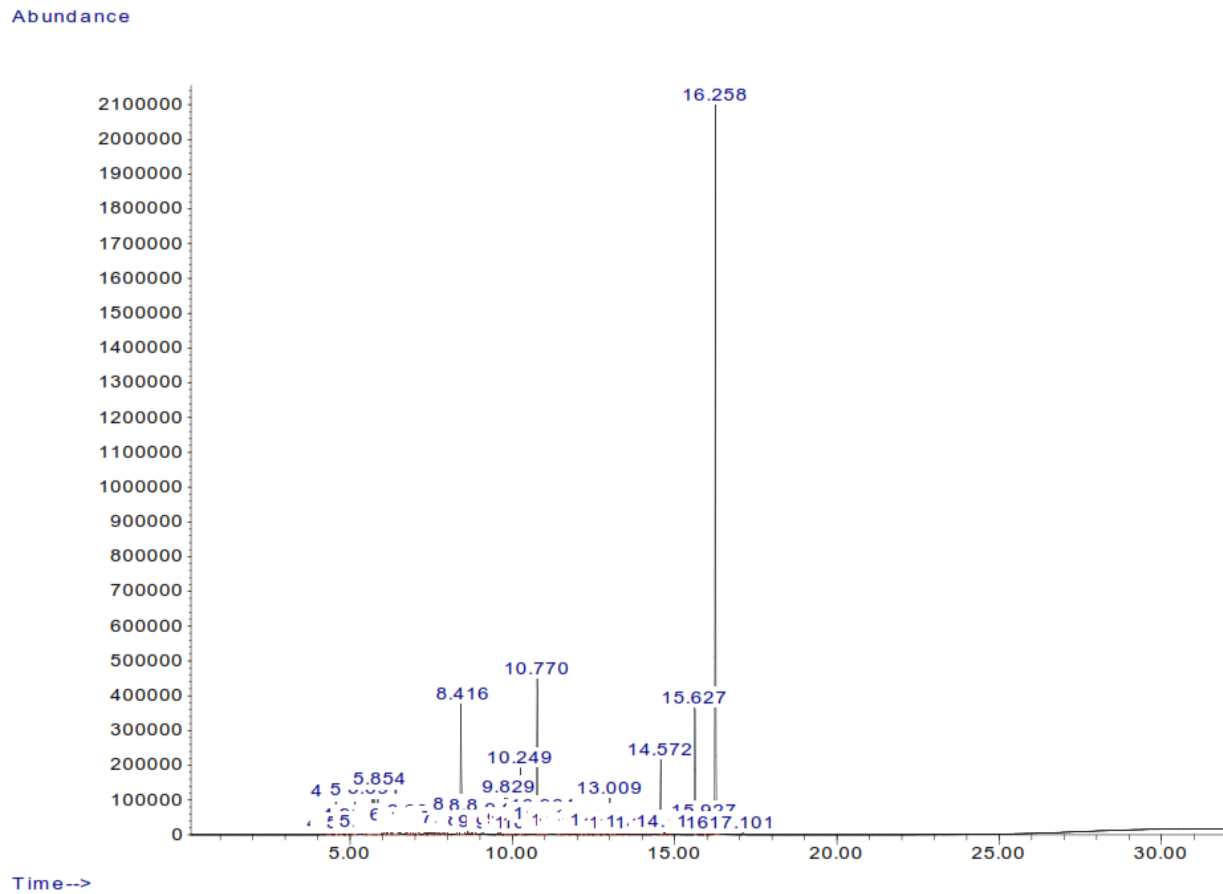
Slika P3.4. GC hromatogram uzorka dobijenog ekstrakcijom subkritičnom vodom (150 °C; 20 min)



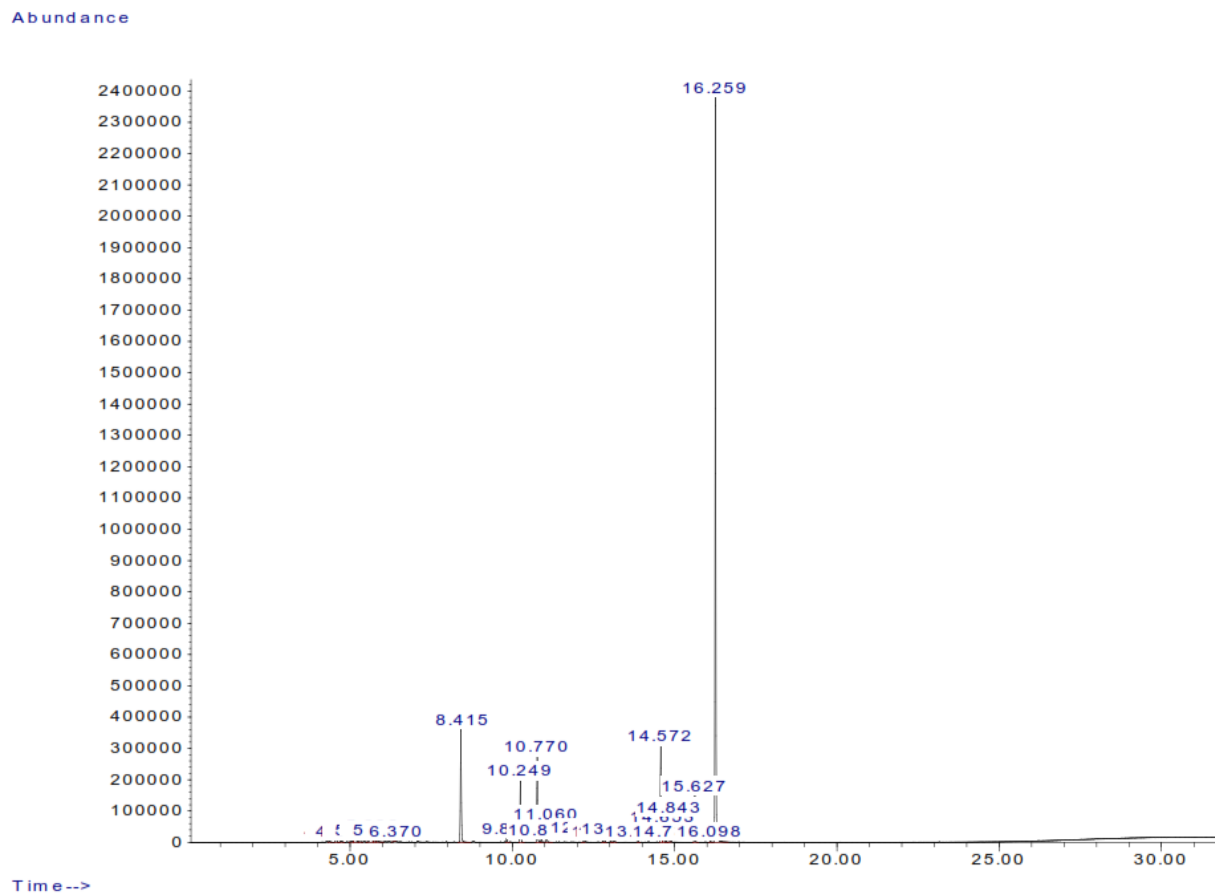
Slika P3.6. GC hromatogram uzorka dobijenog ekstrakcijom subkritičnom vodom (79,15 °C; 20 min)



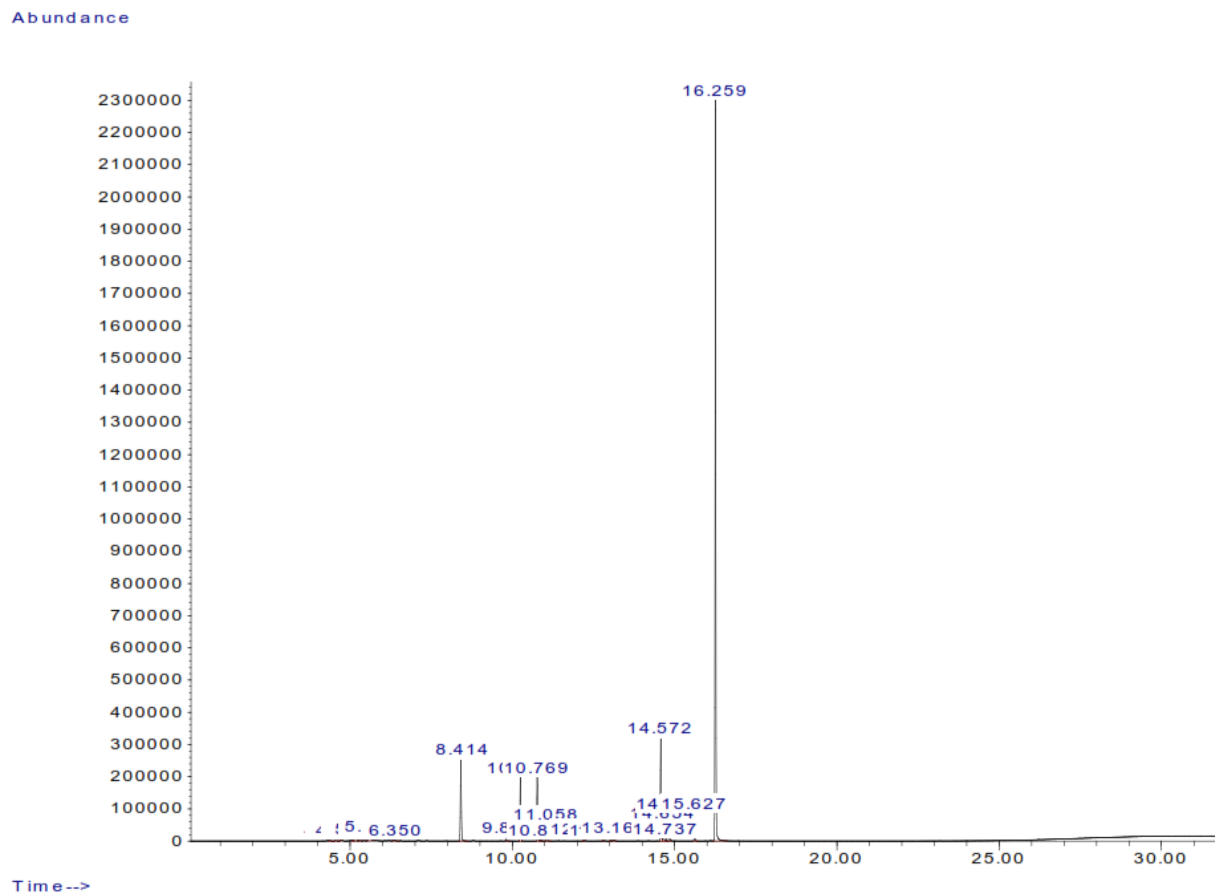
Slika P3.7. GC hromatogram uzorka dobijenog ekstrakcijom subkritičnom vodom (150 °C; 20 min)



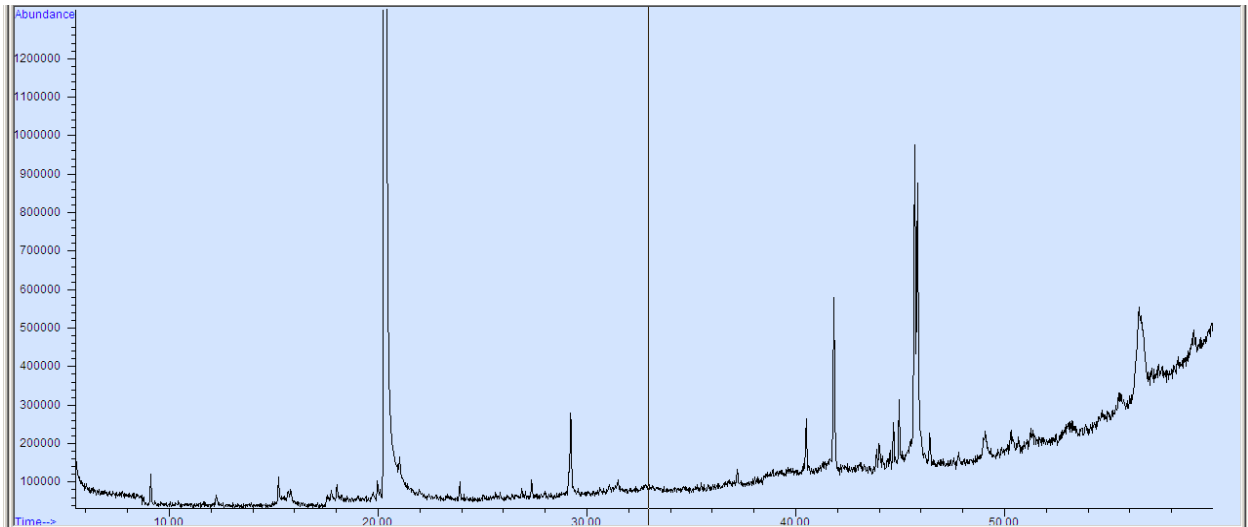
Slika P3.8. GC hromatogram uzorka dobijenog ekstrakcijom subkritičnom vodom (220,5 °C; 20 min)



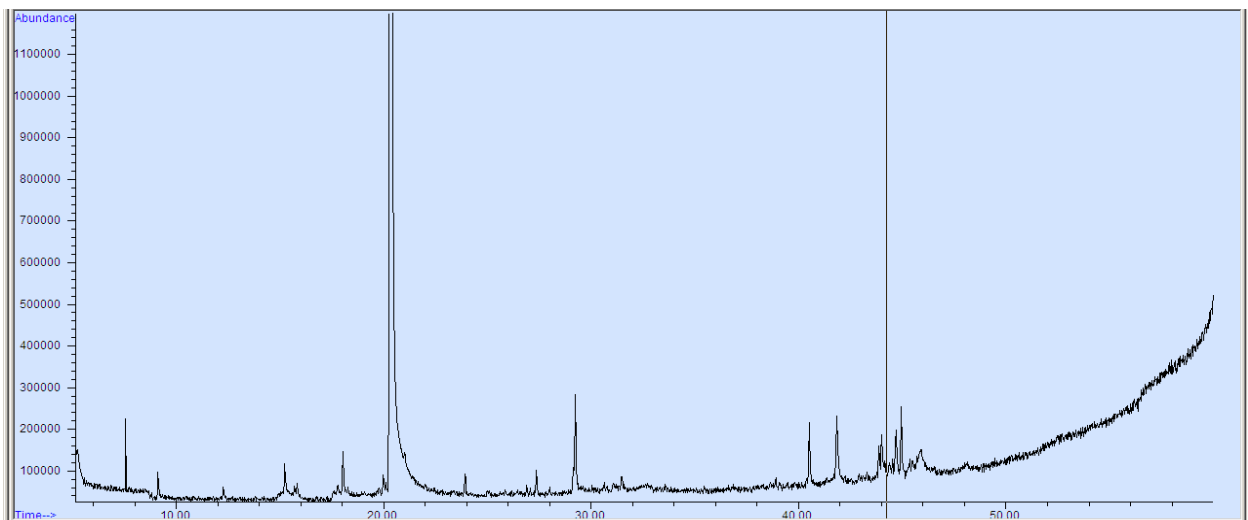
Slika P3.9. GC hromatogram uzorka dobijenog ekstrakcijom subkritičnom vodom (150 °C, 34,1 min)



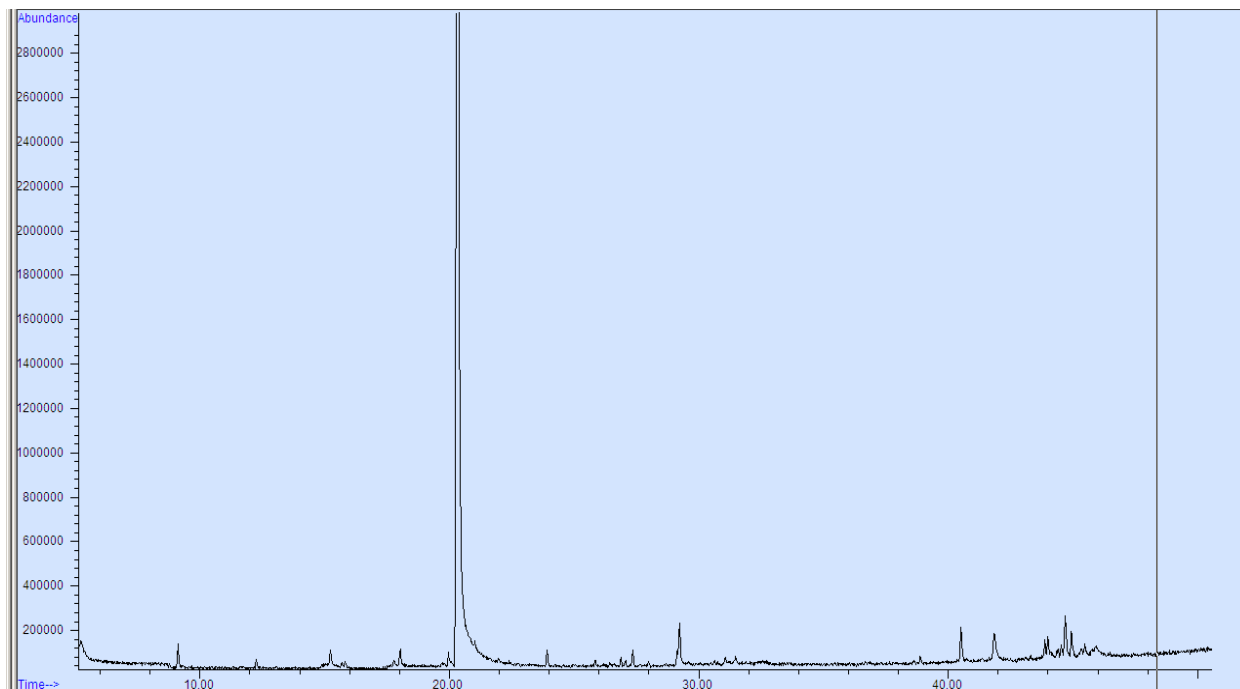
Slika P3.10. GC hromatogram uzorka dobijenog ekstrakcijom subkritičnom vodom (150 °C; 20 min)



Slika P4.1. GC hromatogram etarskog ulja izolovanog iz suvog ekstrakta sušenog sa 10% maltodekstrina



Slika P4.2. GC hromatogram etarskog ulja izolovanog iz suvog ekstrakta sušenog sa 30% maltodekstrina



Slika P4.3. GC hromatogram etarskog ulja izolovanog iz suvog ekstrakta sušenog sa 50% maltodekstrina