

**УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ У ЛЕСКОВЦУ**

Мр Слободан С. Петровић, дипл. инж.

**УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ ТЕХНИКА ЕКСТРАКЦИЈЕ И
ДЕСТИЛАЦИЈЕ НА ХЕМИЈСКИ САСТАВ ЕТАРСКОГ УЉА
И ЕКСТРАКТА ИЗ БИЉНИХ ВРСТА РОДА *THYMUS L.***

- Докторска дисертација -

Лесковац, 2014.

УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ У ЛЕСКОВЦУ

Ментор:

др **Миодраг Лазих**, редован професор
Технолошки факултет у Лесковцу

Чланови комисије:

др **Нада Николић**, редован професор
Технолошки факултет у Лесковцу

др **Слободан Д. Петровић**, редован професор
Технолошко-металуршки факултет, Београд

Датум одбране: _____

Велику захвалност дугујем ментору проф. др **Миодрагу Лазићу** који је омогућио да резултати, до којих смо дошли током истраживања, буду публиковани као део пројекта **ОИ 172047** који је финансирало Министарство просвете науке и технолошког развоја Републике Србије, члановима комисије и сарадницима на давању смерница, пружању сугестија и помоћи око израде, обраде и презентовању резултата дисертације.

Изузетно се захваљујем:

проф. др **Слободану Д. Петровићу**, ТМФ Београд, Катедра за органску хемију,

др **Михаилу Ристићу**, Институт "Јосиф Панчић", Београд,

проф. др **Ирени Жижовић**, др **Марку Стаменићу**, дипл. инж. **Стоји Миловановић**, др **Јасни Ивановић**, ТМФ Београд, Катедра за органску хемијску технологију,

проф. др **Неди-Мимици Ђукић**, дипл. хем. **Марини Францишковић**, доц. др **Дејану Орчићу**, мр **Наташи Симин**, ПМФ Нови Сад, Катедра за биохемију и хемију природних производа,

доц. др **Ани Цамић**, др **Ани Ђирић**, др **Марини Соковић**, Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", Београд

Посебну и изузетну захвалност упућујем својој супрузи доц. др **Нади Петровић** на помоћи, стрпљењу и разумевању током израде дисертације.

УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ ТЕХНИКА ЕКСТРАКЦИЈЕ И ДЕСТИЛАЦИЈЕ НА ХЕМИЈСКИ САСТАВ, ЕТАРСКОГ УЉА И ЕКСТРАКАТА ИЗ БИЉНИХ ВРСТА РОДА *THYMUS L.*

Извод

Циљ ове докторске дисертације је истраживање утицаја различитих техника екстракције и дестилације на хемијски састав етарског уља и екстраката из биљне врсте рода *Thymus L.*, математичко моделовање процеса надкритичне екстракције са угљеник(IV)-оксидом и испитивање хемијског састава, антиоксидативног и антимикуробног дејства добијеног етарског уља и екстраката.

За издвајање етарских уља и екстраката коришћене су технике: хидродестилација (водом и воденом паром) уређајем СП-130, хидродестилација по Clevenger поступку (Ph. Jug. IV i V, Ph. Eur. 6.0), екстракција са надкритичним угљеник(IV)-оксидом и екстракција по Soxhlet поступку користећи 70% етанол и n-хексан.

Математичко моделовање кинетике надкритичне екстракције са угљеник(IV)-оксидом на условима различитих притисака и температура, испитано је на примеру две биљне врсте рода *Thymus sp.* (*Thymus serpyllum* i *Thymus vulgaris*) применом математичких модела заснованих на диференцијалном билансу масе. С обзиром да у литератури нема података о примени, кинетици и условима надкритичне екстракције за добијање екстраката из мајкине душице састав, антиоксидативна и антимикуробна активност одређивана је само за ову биљну врсту.

Екстракција са надкритичним угљеник(IV)-оксидом реализована је на притисцима 10 и 30 МПа и температури 40 °С. Хемијски састав етарског уља и екстраката одређиван је применом гасне хроматографије (GC/FID) и гасне хроматографије са масеном спектрометријом (GC/MS). Антиоксидативна активност етарског уља и екстраката одређивана је спектрофотометријском методом са DPPH радикалом. Антимикуробна активност добијеног уља и екстраката одређивана је стандардним микробиолошким методама.

Резултати су показали да етарско уље мајкине душице добијено у СП-130 и етарско уље добијено у Clevenger-у има највећи садржај сесквитерпенских компоненти, док је

њихов садржај у екстрактима добијеним помоћу екстракције по Soxhlet-у и надкритичном екстракцијом био знатно нижи. Гаснохроматографском анализом одређене су најзаступљеније компоненте код етарског уља мајкине душице: *trans*-неролидол, гермакрен Д, тимол, δ -кадинен и β -бисаболен. Резултати хемијског састава надкритичних екстраката се значајно разликују од литературних у квалитативном и квантитативном смислу. Од свих екстраката и етарских уља, надкритични екстракт FR1 је садржао највише монотерпенских једињења (30,36%) пре свега из групе оксидованих монотерпена (30,24%), са тимолом као доминантном компонентом (29,36%).

Етарско уље мајкине душице је испољило значајно антиоксидативно дејство, снажније од ВНТ и ВНА и може се користити као антиоксидантна компонента у саставу дијететских препарата за спречавање или успоравање оксидативног стреса проузрокованог слободним радикалима или као потенцијални природни антиоксиданс у прехранбеној индустрији уместо синтетских антиоксиданаса ВНТ и ВНА.

На основу DPPH радикал методе редослед од најјаче до најслабије антиоксидативне активности етарског уља и екстраката мајкине душице био је: етарско уље добијено уређајем СП-130, етарско уље добијено у апаратури по Clevenger-у, ВНА, етанолни екстракт, етанолни екстракт/претретман са *n*-хексаном, ВНТ, надкритични екстракт на 30 МПа, *n*-хексан екстракт, надкритични екстракт FR1 и надкритични екстракт FR2.

Етарско уље и екстракти мајкине душице показују изражену антибактеријску и антифунгалну активност на све тестиране бактеријске сојеве, Грам (+) и Грам (–), и гљиве а у односу на комерцијалне антибиотике стрептомицин и ампицилин и комерцијалне фунгициде бифоназол и кетоконазол коришћене као контрола. Такође, антибактеријска и антифунгална активност етарског уља и екстраката мајкине душице је упоредива са тимолом (чистоће $\geq 99\%$).

Надкритични екстракти су деловали на све бактеријске сојеве инхибиторно у интервалу 0,038–0,2 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,075–0,3 mg/ml. Етанолни екстракт је деловао на све бактеријске сојеве инхибиторно у интервалу 0,038–0,2 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,15–0,3 mg/ml. Етанолни екстракт/претретман са *n*-хексаном је деловао на све бактеријске сојеве инхибиторно у интервалу 0,075–0,15 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,15–0,3 mg/ml. Етарско уље је деловало на све бактеријске сојеве инхибиторно у интервалу 0,019–0,15 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,039–0,3 mg/ml.

Референтни антибиотик стрептомицин је деловао инхибиторно у интервалу 0,05–0,3 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,1–0,5 mg/ml, ампицилин инхибиторно у опсегу 0,3–0,8 mg/ml и бактерицино у опсегу 0,5–1,25 mg/ml, и стандард тимол инхибиторно у опсегу 0,025–0,1 mg/ml и бактерицино у опсегу 0,05–0,1 mg/ml.

Надкритични екстракти су испољили и антифунгалну активност на све тестиране гљиве и деловали су инхибиторно у интервалу 0,017–0,15 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,075–0,3 mg/ml. Етанолни екстракт је испољио и антифунгалну активност на све тестиране гљиве и деловао је инхибиторно у интервалу 0,075–0,15 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,15–0,3 mg/ml. Етанолни екстракт/претретман са n-хексаном је деловао на све бактеријске сојеве инхибиторно у интервалу 0,075–0,3 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,15–0,7 mg/ml. Етарско уље је деловало на све тестиране гљиве инхибиторно у интервалу 0,0195–0,039 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,039–0,078 mg/ml. Референтни антимицотик кетоконазол је деловао инхибиторно у интервалу 0,2–2,5 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,5–3 mg/ml, бифоназол инхибиторно 0,1–0,2 mg/ml и фунгицидно 0,2–0,3 mg/ml, и стандард тимол инхибиторно у опсегу 0,01–0,025 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,01–0,5 mg/ml.

Кључне речи: *Thymus serpyllum* L., *Thymus vulgaris* L., хидродестилација, надкритична екстракција, етарско уље, хемијски састав, антиоксидативна активност, антимицробна активност, кинетика екстракције, математичко моделовање.

EFFECT OF DIFFERENT TECHNIQUES OF EXTRACTION AND DISTILLATION ON CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL AND EXTRACTS FROM SPECIES OF THE GENUS *THYMUS L.*

Abstract

The objective of this dissertation is to obtain essential oils and extracts from plants of the genus *Thymus L.* primarily from wild thyme by different techniques of distillation and extraction, mathematical modeling of the process of supercritical carbon dioxide extraction and investigation of chemical composition, antioxidant and antimicrobial effects of obtained extracts and essential oils. For the isolation of essential oils and extracts it will be used hydrodistillation of essential oil by water and steam in the original device SP -130, hydrodistillation of essential oils in Clevenger apparatus according to the procedure prescribed by the Ph. Jug. IV and Euro Ph. 6.0, supercritical extraction with carbon dioxide and the Soxhlet extraction using 70 % of ethanol and n - hexane.

Mathematical modeling of the kinetics of supercritical carbon dioxide extraction at different conditions of pressure and temperature, will be tested on the example of two plant species of the genus *Thymus sp.* (*Thymus serpyllum* and *Thymus vulgaris*) using mathematical models based on differential mass balance. Since there is no data in the literature about application, kinetics and conditions of supercritical extraction for obtaining extracts from wild thyme chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity has been determined only for this plant species.

The results showed that the essential oil of wild thyme obtained in the SP -130 and the essential oil obtained in Clevenger apparatus have the highest content of sesquiterpene components, while their content in extracts obtained by extraction by Soxhlet and supercritical fluid extraction was much lower. Gas chromatographic analysis of some the most common components in the essential oil of wild thyme: trans- nerolidol, germacrene D, thymol, δ -cadinene and β -bisabolene. Results of the chemical composition of supercritical extracts differ significantly from the literature in qualitative and quantitative terms. Among all of investigated extracts and essential oils, supercritical extract FR1 contained most monoterpenes (30.36%), primarily from the group oxidized monoterpenes (30.24 %), with thymol as the dominant component (29.36%).

The essential oil of wild thyme showed significant antioxidant activity, more potent than BHT and BHA, and can be used as an antioxidant component in the form of a nutritional

supplements for the prevention or slowing down of the oxidative stress caused by free radicals, or as potential natural antioxidants in the food industry instead synthetic antioxidants, BHT and BHA.

It was shown that in DPPH radical assay the order from the strongest to the weakest antioxidant activity of essential oils and extracts of wild thyme was: essential oil obtained in the SP-130, essential oil obtained in the apparatus by Clevenger, BHA, ethanol extract, ethanol extract/pretreatment with n-hexane, BHT, supercritical extract 30 MPa, n-hexane extract, supercritical extract FR1 and the supercritical extract FR2.

The essential oil and extracts of wild thyme exhibit a pronounced antibacterial and antifungal activity on all of the tested bacterial strains, the Gram (+) and Gram (-), and fungi in comparison to commercial antibiotics, ampicillin and streptomycin and commercial fungicides bifonazole, ketoconazole used as controls. Also, antibacterial and antifungal activity of essential oils and extracts of wild thyme is comparable with thymol ($\geq 99\%$ purity).

Supercritical extracts of wild thyme exhibited a significant antimicrobial activity against all tested bacteria (MIC 0.038-0.2 mg/ml, MBC 0.075-0.3 mg/ml). Inhibition values for ethanolic extract ranged MIC 0.038 - 0.2 mg/ml, MBC 0.15-0.3 mg/ml. Inhibition values for ethanol extract/pretreatment with n-hexane ranges MIC 0.075-0.15 mg/ml, MBC 0.15-0.3 mg/ml. Also, the essential oil exhibited a significant antimicrobial activity against all tested bacteria (MIC 0.019-0.15 mg/ml, MBC 0.039-0.3 mg/ml). Reference antibiotics: Streptomycin (MIC 0.05-0.3 mg/ml, MBC 0.1-0.5 mg/ml) and Ampicillin (MIC 0.3-0.8 mg/ml, MBC 0.5 -1.25 mg/ml), and standard thymol (MIC 0.025 - 0.1 mg/ml, MBC 0.05-0.1 mg/ml).

Supercritical extracts exhibited a significant antifungal activity against all tested fungi, (MIC 0.017 to 0.15 mg/ml, MBC 0.075 to 0.3 mg/ml). Ethanol extract exhibited antifungal activity in the range MIC 0.075-0.15 mg/ml, MBC 0.15-0.3 mg/ml). Ethanol extract/pretreatment with n-hexane is (MIC 0.075 to 0.3 mg/ml, MBC 0.15 to 0.7 mg/ml). The essential oil has affected all tested fungi inhibitory in the range MIC 0.0195 - 0.039 mg/ml and MBC 0.039 to 0.078 mg/ml. Reference antifungals Ketoconazole (MIC 0.2-2.5 mg/ml, MBC 0.5-3 mg/ml), and Bifonazole (MIC 0.1-0.2 mg/ml, MBC 0.2-0.3 mg/ml), and standard thymol (MIC 0.01 - 0.025 mg/ml, MBC 0.01-0.5 mg/ml).

Keywords: *Thymus serpyllum L.*, *Thymus vulgaris L.*, hydrodistillation, supercritical extraction, essential oil, chemical composition, antioxidant activity, antimicrobial activity, extraction kinetics, mathematical modeling

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО	6
2.1. Етарска уља	6
2.1.1. Дефиниција етарских уља	6
2.1.2. Извори етарских уља	6
2.1.3. Физичка својства етарских уља	7
2.1.4. Хемијска својства етарских уља	8
2.1.5. Карактеризација етарских уља	11
2.1.6. Употреба етарских уља	12
2.1.7. Методе добијања етарских уља	14
2.2. Техника дестилације	18
2.2.1. Историјат дестилације етарских уља	18
2.2.2. Апаратура по Clevenger –у	31
2.2.3. Полуиндустриски дестилациони уређај СП-130	32
2.3. Техника екстракцијом органским растварачима	38
2.3.1. Екстракција органским растварачима	38
2.3.2. Апаратура по Soxhlet-у	41
2.4. Техника надкритичном екстракцијом	43
2.4.1. Надкритична екстракција и особине надкритичних флуида	43
2.4.2. Предности и недостаци надкритичне екстракције	48
2.5. Моделовање процеса	49
2.5.1. Механизам и кинетика процеса хидродестилације	49
2.5.2. Механизам и кинетика екстракције са органским растварачима	54
2.5.3. Механизам и кинетика процеса надкритичне екстракције	57
2.6. Мајкина душица (<i>Thymus serpyllum L.</i>)	64
2.6.1. Традиционална употреба мајкине душице	64
2.6.2. Хемијски састав етарског уља и екстракта мајкине душице	66
2.6.3. Антиоксидативна активност етарског уља и екстракта мајкине душице	67
2.6.4. Антимикробна активност етарског уља и екстракта мајкине душице	68
2.7. Тимијан (<i>Thymus vulgaris L.</i>)	70
2.7.1. Традиционална употреба тимејана	70
2.7.2. Хемијски састав етарског уља и екстракта тимејана	71
2.7.3. Антиоксидативна активност етарског уља и екстракта тимејана	72
2.7.4. Антимикробна активност етарског уља и екстракта тимејана	75
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	76
3.1. Биљни материјал и хемикалије	76
3.2. Технике добијања етарских уља и екстракта из мајкине душице	77
3.2.1. Хидродестилација по Clevenger –у	77
3.2.2. Хидродестилација уређајем СП-130	77
3.2.3. Екстракција по Soxhlet-у	79
3.2.4. Надкритична екстракција угљеник(IV)-оксидом	80
3.3. Хемијски састав етарских уља и екстракта мајкине душице	83
3.3.1. Гаснохроматографска карактеризација етарског уља	83
3.4. Антиоксидативни потенцијал етарских уља и екстракта мајкине душице	85
3.4.1. DPPH метода	85

3.5. Антимикробна активност етарских уља и екстраката мајкине душице	86
3.5.1. Третирани микроорганизми	86
3.5.2. Макродилуциона метода	87
3.7. Математичко моделовање процеса НКЕ из мајкине душице и тимидана	89
3.7.1. Модели коришћени за симулацију процеса надкритичне екстракције.....	89
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	93
4.1. Приноси етарских уља и екстраката мајкине душице	93
4.2. Хемијски састав етарских уља и екстраката мајкине душице	96
4.2.1. Процес хидродестилације.....	96
4.2.2. Екстракција по Soxhlet-у	104
4.2.3. Надкритична екстракција	112
4.2.4. Упоредна анализа хемијског састава.....	121
4.3. Антиоксидативни потенцијал етарских уља и екстраката мајкине душице	127
4.4. Антимикробна активност етарских уља и екстраката мајкине душице	132
4.5. Математичко моделовање процеса НКЕ из мајкине душице и тимидана	141
4.5.1. Кинетика и математичко моделовање НКЕ мајкине душице и тимидана.....	142
5. ЗАКЉУЧАК	145
6. ЛИТЕРАТУРА	152
7. ПРИЛОЗИ.....	162
7.1. Прилог 1	162
7.2. Прилог 2	164
7.3. Прилог 3	167
КОРИШЋЕНЕ СКРАЋЕНИЦЕ	172
8. БИОГРАФИЈА.....	173

1. УВОД

Ароматичне и лековите биљке су одувек за човека биле најприступачнија храна и лек а за данашњу индустрију најјефтинија и готово незаменљива сировина. Њихово фармаколошко дејство и медицинска употреба зависи од присуства најчешће већег броја састојака који делују у облику биолошког комплекса.

Сва једињења која улазе у хемијски састав биљке су подељена на примарне и секундарне метаболите. Примарни метаболити служе за исхрану и развој биљке и то су угљени хидрати, аминокиселине и нуклеинске киселине и пигменти. Секундарни метаболити су сва остала присутна једињења, од алкалоида до фенола. Етарска уља спадају у секундарне продукте метаболитичких процеса који се одвијају у биљкама. То су бистре, лако покретљиве, безбојне или жућкасте течности карактеристичног и интензивног мириса. У води су практично нерастворна, али се растварају у етанолу, масним уљима и органским растварачима (хлороформ, етар и др.). Стајањем на ваздуху постају смоласта, тамна и реагују кисело. Под утицајем светлости долази до оксидације као и полимеризације појединих компоненти које улазе у састав етарског уља. Због тога се за чување етарских уља користе стаклене, затамњене боце, напуњене до поклопца и добро затворене (Svoboda K. P. и Svoboda T. G., 2000).

Најзагонетније и истовремено најважније својство етарских уља и биљних екстраката лежи у њиховом изузетно сложеном хемијском саставу јер већина њих садржи више од сто компоненти. Упркос значајном напретку савремене фармације не постоји готово ниједно етарско уље и биљни екстракти за које би се могло рећи да је његов састав до краја познат, а истраживачи стално проналазе нове компоненте. Управо тај сложени састав објашњава њихова разноврсна потенцијална терапијска дејства на човека. Права и потпуна својства имају само природно произведена етарска уља и биљни екстракти, који се у процесу производње не подвргавају хемијским или физичким поступцима који могу да их оштете и умање њихово дејство.

Процењује се да постоји око 3000 етарских уља од којих је скоро 300 комерцијалне важности (Van de Braak и Leijten, G., 1999). Познато је да нека етарска уља имају антимикробне особине (Guenther, E. 1948 ; Boyle, W., 1955). Поред антибактеријских

особина (Deans, G. и Ritchie, G., 1987; Carson, F. и сар., 1995, 1995a, 1995b ; Mourey, A. и Canillac, N., 2002), етарска уља или њихове компоненте су показали *антивирусне* (Bishop, D., 1995), *антимикотичке* (Azzouz, M. и Bullerman, B., 1982; Akgül, A. и Kivanç, M., 1988; Mari, M. и сар., 2003), *антиоксидантне* (Akgül, A. и сар., 1991 ; Ultee, A. и Smid, J., 2001; Juglal, S. и сар., 2002), *антипаразитске* (Pandey, R. и сар., 2000) и *инсектицидне* (Konstntopoulou, I. и сар., 1992 ; Karpouhtsis, I. и сар., 1998) особине. Ове карактеристике су у вези са функцијом биоактивних конституената код ароматичних биљака (Guenther, E. 1948; Mahmoud, S. и Corteau, B., 2002). Међутим и поред доказаних фармаколошких својстава етарска уља најширу примену налазе у производњи мириса, козметичких средстава и кондиторских производа.

Постоји велики број различитих метода којима је могуће изоловати етарска уља и биљне екстракте. Најзаступљенији поступци добијања етарских уља су: хидродестилација, цеђење, ферментација, анфлераж поступак, екстракција са органским растварачима и екстракција са надкритичним угљеник(IV)-оксидом. Метода дестилације воденом паром се најчешће користи у производњи етарских уља (Van de Braak и Leijten, G., 1999). Екстракција са конвенционалним растварачима је понекад окарактерисана ниском селективношћу и потребом за високим температурама, што може довести до деградације жељених једињења.

Надкритична екстракција (НКЕ) је много селективнија од конвенционалних начина екстракције што се постиже подешавањем услова екстракције (температуре и притиска). Екстракција надкритичним угљеник(IV)-оксидом (НК-СО₂) на ниској температури и под високим притиском даје природнији органолептички профил али је скупља. (Moyler, D., 1998). Разлика у органолептичком профилу указује на разлику у хемијском саставу етарских уља и биљних екстраката који су добијени коришћењем НК-СО₂ као растварача на супрот дестилацији воденом паром и то такође може да утиче на биолошке функције (антимикробне, антиоксидативне, антигенотоксичне особине итд).

Циљеви истраживања ове докторске дисертације били су:

- добијање етарског уља и екстраката из мајкине душице различитим техникама дестилације и екстракције,

- испитивање хемијског састава, антиоксидативног и антимикуробног дејства добијеног етарског уља и екстраката, и
- математичко моделовање процеса надкритичне екстракције са угљеник(IV)-оксидом на примеру две биљне врсте рода *Thymus* sp. (*Thymus serpyllum* и *Thymus vulgaris*).

За добијање етарског уља и екстраката мајкине душице коришћено је:

- лабораторијско постројење Autoclave Engineers SCE Screening System за екстракцију са надкритичним угљеник(IV)-оксидом,
- оригинални дестилациони суд типа СП-130 који користи принцип воде и водене паре,
- апаратура по Soxhlet-у користећи 70 % етанол и n-хексан и
- апаратура по Clevenger –у (Ph. Jug. IV и V, Ph. Eur. 6.0).

Екстракција са надкритичним угљеник(IV)-оксидом, екстракција по Soxhlet-у и хидродестилација по Clevenger-у реализовано је на лабораторијском нивоу, док је дестилација применом воде и водене паре реализована у оригиналном полуиндустријском дестилационом суду типа СП-130.

Математичко моделовање кинетике надкритичне екстракције са угљеник(IV)-оксидом на условима различитих притисака и температура, испитано је на примеру две биљне врсте рода *Thymus* sp. (*Thymus serpyllum* и *Thymus vulgaris*) применом математичких модела заснованих на диференцијалном билансу масе. С обзиром да у литератури нема података о примени, кинетици и условима надкритичне екстракције за добијање екстраката из мајкине душице састав, антиоксидативна и антимикуробна активност је одређивана само за ову биљну врсту.

Екстракција са надкритичним угљеник(IV)-оксидом реализована је на одсеку Хемијско инжењерство ТМФ Универзитета у Београду. Хемијски састав етарског уља и екстраката одређиван је применом гасне хроматографије (GC/FID) и гасне хроматографије са масеном спектрометријом (GC/MS) на Институту за проучавање лековитог биља "Др Јосиф Панчић" у Београду. Антиоксидативна активност етарског уља и екстраката одређивана је спектрофотометријском методом са DPPH радикалом на одсеку Биохемија

ПМФ Универзитета у Новом Саду. Антимикробна активност добијеног уља и екстраката одређивана је стандардним микробиолошким методама у Институту за биолошка истраживања “Синиша Станковић“ у Београду.

За успешно остварив циљ ове докторске дисертације реализована је оригинална методологија испитивања *Thymus serpyllum* L. приказана у табели:

Врста	Метод/Поступак	Растварач	Облик
<i>Thymus serpyllum</i> L.	Soxhlet, t=69 °C	n-хексан	екстракт
<i>Thymus serpyllum</i> L.	Soxhlet, t=80,5 °C	70% етанол након третмана n-хексаном	екстракт
<i>Thymus serpyllum</i> L.	Soxhlet, t=80,5 °C	70 % етанол	екстракт
<i>Thymus serpyllum</i> L.	НКЕ FR1, t=40 °C, P=10 МПа	CO ₂	екстракт
<i>Thymus serpyllum</i> L.	НКЕ FR2, t=40°C, P=30 МПа	CO ₂	екстракт
<i>Thymus serpyllum</i> L.	НКЕ t=40 °C P=30 МПа	CO ₂	екстракт
<i>Thymus serpyllum</i> L.	Clevenger, Ph Eur 6.0	вода	етарско уље
<i>Thymus serpyllum</i> L.	SP-130, t=100 °C	вода и водена пара	етарско уље

Хемијски састав, антимикробна и антиоксидативна активност етарског уља *Thymus serpyllum* L. већ су раније били проучавани у студијама. Међутим у научној литератури нема података о хемијском саставу, антимикробној и антиоксидативној активности екстраката *Thymus serpyllum* L. добијених помоћу надкритичне екстракције са угљеник(IV)-оксидом и екстракцијом по Soxhlet-у. Такође не постоје подаци о хемијском саставу, антимикробном и антиоксидативном потенцијалу етарског уља *Thymus serpyllum* L. добијеног у полуиндустријском дестилационом уређају СП-130 који користи принцип воде и водене паре. Осим тога, резултати предложене дисертације су потврдили утицај различитих техника дестилације и екстракције на хемијски састав, антиоксидативно и антимикробно дејство добијених етарских уља и екстраката, са посебним нагласком на екстракте добијене надкритичном екстракцијом угљеник(IV)-оксидом и њихов хемијски састав, антиоксидативно и антимикробно дејство који до сада у научној литератури нису објављивани.

У досад објављиваној научној литератури могу се пронаћи подаци о антимикробној активности екстраката добијених помоћу Soxhlet-а, међутим подаци о антиоксидативној

активности екстраката *Thymus serpyllum* L. добијених помоћу Soxhlet-a предложеним начином нису позната, што такође у овој дисертацији представља изванредан допринос. Резултати предложене дисертације доприносе новим сазнањима о биоактивним конституентима, хемијском саставу, антиоксидативној и антимикробној активности екстраката *Thymus serpyllum* L. добијених помоћу надкритичне екстракције угљеник(IV)-оксидом. За математичко моделовање процеса помоћу надкритичне екстракције угљеник(IV)-оксидом коришћени су постојећи математички модели засновани на диференцијалном билансу масе. Успешна реализација предложене дисертације омогућава потенцијалну практичну примену екстраката и етарског уља из *Thymus serpyllum* L.

2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1. Етарска уља

2.1.1. Дефиниција етарских уља

Етарска уља су лако испарљиве течности које се добијају из различитих делова биљака (цвећа, пупољака, семења, лишћа, гранчица, коре, хербе, дрвета, воћа, корења и других биљних делова). Термин „етарско уље“ потиче од стране швајцарског реформисте медицине, Paracelsus von Hohenheim из 16. века. Он је ефективну компоненту лека назвао *quinta essentia* (Guenther, E., 1948).

Сва једињења која улазе у хемијски састав биљке могу бити подељена на примарне и секундарне метаболите. Примарни метаболити служе за исхрану и развој биљке а то су угљени хидрати, аминокиселине и нуклеинске киселине и пигменти. Секундарни метаболити су сва остала присутна једињења, од алкалоида до фенола. Етарска уља спадају у секундарне продукте метаболитичких процеса који се одигравају у биљкама.

Етарска уља се добијају искључиво из биљака које их стварају у специјализованим ткивима. Иако већина тих једињења од којих су сачињена етарска уља не учествује директно у примарном метаболизму биљке установљено је да су етарска уља као "секундарни метаболити" веома важни за опстанак биљке. Она помажу биљци у прилагођавању околина а биљке их користе за следеће намене: привлачење инсеката који помажу у опрашивању, заштита од микроорганизама и болести, одбијање грабљиваца, а најновија истраживања испитују њихову важност у међусобној комуникацији између самих биљака.

2.1.2. Извори етарских уља

Етарска уља су у биљкама заступљена у врло малим количинама. У неким биљкама количина етарског уља износи свега 0,01 % што добијено уље чини веома скупим. Има их у целом биљном царству, међутим посебно су заступљена у биљкама извесних фамилија:

Lamiaceae (Labiatae), Asteraceae (Compositae), Apiaceae (Umbelliferae), Rutaceae, Lauraceae, Myrtaceae. Садрже их готово сви биљни органи, нарочито лист (нана, матичњак), али се налазе и у корењу (одољен, анђелика, першун) и у ризомима (перуника, одољен или валериана), корама (цимет), цвету (камилица, липа, смиље, зова), плодовима (клека, морач, анис). Треба истаћи да је за једну исту врсту, квантитативни и квалитативни састав етарских уља варијабилан, што зависи од услова средине.

Осим великог утицаја климе и својстава тла (еколошки фактори), на количину и састав етарског уља утичу:

- генотип биљке
- фаза развоја биљке тј. време прикупљања биљног материјала (нпр. оптимално време за брање мајкине душице је у току непосредног цветања биљке)
- начин обраде биљног материјала (сушење и уситњавање условљавају делимичан губитак етарског уља)
- начин издвајања тј. метода добијања етарског уља (свеж или осушен биљни материјал, поступак екстракције или поступак дестилације и сл.) (Ковачевић, Н., 2000).

2.1.3. Физичка својства етарских уља

На собној температури етарска уља су најчешће течности већином безбојне, али има и етарских уља која су жуте, црвене, плаве или зелене боје. Етарска уља су липофилна, растварају се у неполарним органским растварачима (нпр. у n-хексану), етанолу, мастима и масним уљима. Генерално, етарска уља се не растварају у води. У ствари, само мали број састојака уља је растворљив у води и овакви производи називају се ароматичне воде (хидролати). Она су испарљива са воденом паром јер подлежу Далтоновом закону, по коме ће смеша две течности које се не мешају и не реагују хемијски међусобно, у овом случају вода и етарско уље, прокључати кад збир парцијалних притисака паре обе течности буде једнак атмосферском притиску ($760 \text{ mmHg} = 101325 \text{ Pa} = 1013 \text{ mbar}$). Ретко имају вискозну или получврсту конзистенцију. Имају специфичан мирис, и за разлику од масних уља,

етарска уља потпуно испаравају и на папиру не остављају никакву мрљу. До данас је познато око 3000 разних етарских уља, од којих око 150 има практичну примену (Пилетић, В. и сар., 1993; Горуновић М. и Лукић, П. 2001).

Густина етарских уља је много чешће испод густине воде. Већу густину од воде имају нпр. циметово и каранфилићево уље. Етарска уља имају повећан индекс рефракције и веома често су оптички активна једињења.

Специфичност ове групе биљних продуката је да немају тачно дефинисану температуру кључања. Пошто су то смеше различитих једињења, свако од њих испарава на својој температури кључања. Тако, етарска уља фракционо кључају у интервалу од 150-350°C (нпр. β -пинен кључа на 155-157°C, камфен на 159-160°C, α -пинен на 163-166°C, лимонен на 176-178°C, гераниол на 227-230°C, карвон на 230-238°C, еугенол на 248-252°C итд.).

Етарска уља немају дуг век трајања, јер су природни антиоксиданси и приликом издвајања уља се веома брзо разграђују. Морају се складиштити на сувом и тамном месту у тамним стакленим или порцеланским боцама са стакленим или силиконским поклопцем (Горуновић М. и Лукић, П., 2001; Ковачевић, Н. 2000).

2.1.4. Хемијска својства етарских уља

Најважније својство етарских уља и биљних екстраката је њихов изузетно сложен хемијски састав јер већина њих садржи више стотина различитих испарљивих ароматичних једињења. Упркос значајном напретку инструменталних техника испитивања ни за једно етарско уље или биљни екстракт се не може рећи да је састав до краја познат, а резултати истраживања су откривање нових компоненти. Управо тај сложени састав објашњава њихова разноврсна потенцијална терапијска дејства на човека.

Етарска уља као производи ароматичних биљака су мирисне испарљиве смеше разних хемијских једињења. Њихова испарљивост чини да се разликују од масних уља. Главне компоненте етарских уља су терпеноиди (монотерпени и сесквитерпени) а у мањој мери присутна су нека природна ароматична једињења (феноли, деривати фенилпропана, кумарини и др.). Нека етарска уља садрже и једињења са азотом и једињења са сумпором,

липидне материје, шећере и алифатичне киселине тј. једињења која немају терапијску примену.

Због сложености њиховог хемијског састава немогуће их је строго класификовати према хемијском саставу. Садрже велики број различитих једињења (киселине, кетоне, алдехиде, угљоводонике, алкоhole, естре, етре, феноле, оксиде, пероксида итд.). Многа од ових једињења се могу синтетизовати, а нека су и даље непознаница за хемичаре. Отуда, и разлика између чистих етарских уља и уља која су хемијски синтетизована.

Терпени, терпеноиди, изопрени, изопреноиди или полиизопреноиди су различити називи за исту класу природних органских једињења, која имају заједничко биосинтетско порекло и која уопштено припадају липидима тј. простим липидима (који не подлежу сапонификацији).

Табела 2.1.4.1; Подела природних терпена (Петровић, С. и сар., 2009)

Врста терпена	Број С атома	Број изопренских јединица
<ul style="list-style-type: none"> • Монотерпени <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Регуларни</i> (испарљиви монотерпени су састојци етарског уља и олеорезина, а неиспарљиви монотерпени су иридоиди, агликони горких хетерозида (гликозида) и валеопријати), ○ <i>Ирегуларни</i> (јављају се у пиретринима) 	10	2
<ul style="list-style-type: none"> • Сесквитерпени (испарљиви сесквитерпени су састојци етарских уља, а неиспарљиви се најчешће јављају у облику сесквитерпенских лактона) 	15	3
<ul style="list-style-type: none"> • Дитерпени (састојци су смола, а јављају се и као слободни, као сапогенини сапонозида и агликони гликозида) 	20	4
<ul style="list-style-type: none"> • Тритерпени (састојци су смола, а јављају се и као слободни, као сапогенини сапонозида и агликони гликозида) 	30	6
<ul style="list-style-type: none"> • Тетратерпени (каротеноиди) 	40	8
<ul style="list-style-type: none"> • Политерпени (праве гуме, каучук) 	5n	n

Терпени су структурно најразноврснија класа природних продуката. Данас је познато више од 25.000 природних изопреноида. Најчешће су биљног порекла и представљају најбројнију групу секундарних метаболита биљака. Спорадично се јављају и у анималним ткивима: феромони и неки други хормони инсеката су сесквитерпенске природе; из морских организама последњих деценија, изолована су бројна једињења дитерпенске и тритерпенске структуре. Терпени су класификовани на основу "емпиријског изопренског правила", по коме се структура свих терпена заснива на повезивању

различитог броја изопренских јединица (изопрен; C_5H_8 ; 2-метил-1,3-бутадиен; изопентадиен) које је предложио (Wallach, O.,1887), а допунио (Ružička, L., 1953). На основу броја изопренских јединица у молекулу, односно на основу основног линеарног угљоводоника из кога настају, могућа је подела на: хемитерпене (C_5), монотерпене (C_{10}), сесквитерпене (C_{15}), дитерпене (C_{20}), тритерпене (C_{30}), тетратерпене (C_{40}) и политерпене (C_{5n}). Терпени су добили име отуда што представљају основни састојак терпентинског уља (екстракт разних врста борова). Терпени се дефинишу као деривати изопрена, мада изопрен није интермедијер ни у једној фази у биосинтези (Горуновић, М. и Лукић, П., 2001; Ковачевић, Н., 2000).

Монотерпени су најједноставнија једињења међу терпенима, изузимајући ретке хемитерпене. Настају повезивањем две "изопренске" јединице. Обухватају велики број једињења, преко хиљаду, чије се структуре могу свести на око 40 основних скелета. Монотерпени се могу сврстати у три групе, зависно од тога да ли су ациклични (нпр.линалол), моноциклични (нпр. лимонен) или бициклични (нпр. α - и β -пинен). У оквиру сваке од ових група, монотерпени могу бити незасићени угљоводоници (нпр. лимонен), или могу имати различите функционалне групе тј. могу бити алкохоли (нпр.ментол), алдехиди или кетони (нпр.цитрал, ментон, карвон), естри (нпр. цитронелал ацетат), оксиди (нпр. линалол оксид), феноли, етри, пероксиди, епоксиди. Последњих година је утврђено да су монотерпени који улазе у састав етарских уља некада повезани са шећерима (код матичњака и изопа).

На основу биосинтетског порекла могу се разликовати:

- регуларни монотерпени
- испарљиви монотерпени-састојци етарских уља
- неиспарљиви монотерпени-иридоиди
- ирегуларни монотерпени

Највећи број испарљивих **сесквитерпенских** једињења су састојци етарских уља. И ова група терпена јавља се у облику угљоводоника, оксида, алкохола, кетона и естара. Они доприносе фармаколошком деловању уља и дроге која га садржи (нпр. антифлогистичко дејство бисабола и његових деривата присутних у етарском уљу камилице). Поред тога, неки сесквитерпени делују као фитоалексини, антибиотска једињења која производе биљке

и која су одговорна за њихову одбрану од микроорганизама, док неки имају значајну улогу у регулисању односа биљке и инсеката: неки делују атрактантно (гермакрен Д и α -копаен), док други имају антифидантно деловање. Феромони и неки други хормони инсеката су сесквитерпенске структуре. Сесквитерпенски лактони представљају један тип сесквитерпенских једињења. Често се јављају у биљкама које садрже етарско уље. Лактони су горки и доприносе горком укусу неких ароматичних дрога. У биљном ткиву се сесквитерпенски лактони јављају слободни или повезани са шећерима. Најбогатије овим једињењима су биљке фамилија *Asteraceae*, *Apiaceae* и *Lauraceae*. Изразита и разноврсна фармаколошка активност је повезана с присуством α , β -незасићеног γ -лактонског прстена. Нпр. смиље припада фамилији *Asteraceae* и садржи сесквитерпенске лактоне (ксантанолите и гвајанолите).

2.1.5. Карактеризација етарских уља

Резултати органолептичких, физичких и хемијских карактеристика етарских уља највише зависе од порекла, старости и начина обраде биљног материјала, као и од начина добијања и старости самог етарског уља. У поступцима карактеризације етарских уља тј. при одређивању физичких и хемијских карактеристика етарских уља потребно је поштовати стандарде који су усклађени са међународним стандардима које одобрава Међународна организација за стандардизацију (ISO).

Табела 2.1.5.1; Технике и методе карактеризације етарских уља

Стандард	Испитивање физичких и физичко-хемијских особина етарских уља
<i>а) Испитивање базних карактеристика етарских уља</i>	
ИСО 212:2007	Узорковање и припрема узорка за анализу
Без стандарда	Органолептичке карактеристике (боја, мирис, укус,...)
ИСО 279:1998	Релативна густина
ИСО 280:1998	Индекс преламања и специфична рефракција
ИСО 592:1998	Оптичка ротација
ИСО 875:1999	Мешљивост са етанолом

ИСО 4715:1978	Остатак након упаравања
ИСО 5991:1979	Остатак након дестилације под смањеним притиском
ИСО 1041:1973	Тачка мржњења
ИСО/ТП 11018:1997	Тачка паљења
б) Хемијско испитивање етарских уља	
ИСО 1242:1999	Киселински број
ИСО 7660:1983	Естарски број
ИСО 1241:1996	Естарски број након ацетиловања
ИСО 1279:1996	Карбонилни број (за одређивање етарских уља где се алдехиди, метилкетони и др кетони лако преводе у оксиме)
ИСО 1271:1983	Карбонилни број (за одређивање етарских уља која садрже карбонилна једињења, нарочито кетоне, искључујући метилкетоне)
ИСО 1272:2000	Садржај фенола
в) Инструменталне технике анализе етарских уља	
<ul style="list-style-type: none"> • танкослојна хроматографија • гасна хроматографија • високперформансна течна хроматографија 	
г) Спектроскопске и спектрометријске технике	
<ul style="list-style-type: none"> • ултраљубичаста и визуелна спектрофотометрија • инфрацрвена и раманска спектроскопија • нуклеарномагнетска резонантна спектроскопија • масена спектрометрија 	

2.1.6. Употреба етарских уља

Етарска уља се користе вековима. Коришћена су и пре нове ере у Риму, Грчкој и Египту, као и широм Средњег и Далеког Истока у козметици, медицини, као зачини, за пречишћавање ваздуха и у процесу балзамовања.

Данас је познато око 18000 ароматичних и 60000 лековитих биљака. Етарска уља имају разноврсну примену у медицини, фармацији, прехранбеној и козметичкој индустрији, посебно у индустрији алкохолних и безалкохолних напитака, у индустрији боја и лакова, а нарочито су значајна у ароматерапији. Многа етарска уља се користе у традиционалној медицини за различите намене јер је доказано да показују антимицробну, антиоксидативну и антиканцерогену активност (Martin, W., и Ernst, E., 2004 ; Bakkali, F. и сар., 2008).

Светска годишња производња етарских уља се процењује на отприлике 50.000 тона, од тога 50% чине цитрус уља (поморанца, лимун, мандарина, грејпфрут), 20% уља биљних врста рода *Mentha*. Остатак се, махом, добија из ароматичних биљака фамилија *Rutaceae* (*Citrus* врсте), *Lamiaceae* (*Labiates*), *Apiaceae* (*Umbelliferes*), *Asteraceae* (*Composites*) и *Myrtaceae* (*Eucalyptus* врсте). Према расположивим подацима за израду лековитих препарата, фармацеутска индустрија користи у Немачкој 12.500 активних супстанци из биљних дрога, Италији 9.000, Француској 8.000, а у Великој Британији 5.500. Од свих препарата који се користе у Русији 50% су биљног порекла (Влатковски, С. и сар., 1996; Китић, Д., 2006).

Етарска уља су нашла најразличитије видове индустријске примене. Већина етарских уља троши прехранбена индустрија до 50% од укупне производње, затим индустрија парфема (30 %), лекова (15 %), козметике (5 %) и медицинска примена кроз ароматерапију (око 1 %). Како се откривају корисна својства етарских уља, обим њихове примене шири се све време, а потражња расте из године у годину.

Најчешћа данашња употреба и примена етарских уља:

- Прехрамбена индустрија
- Индустрија алкохолних и безалкохолних пића
- Дуванска индустрија
- Фармацеутска индустрија
- Ветерина
- Парфимеријска индустрија
- Индустрија козметике и хигијене
- Ароматерапија
- Хемикалије
- Производња ароматичних материја
- Индустрија боја и лакова
- Производња производа од гуме и пластике

2.1.7. Методе добијања етарских уља

Постоје различите технике добијања етарских уља. Неке од њих се примењују од памтивека. Предност се даје савременим оптимизованим линијама у циљу очувања “осетљивих“ и лако испарљивих етарских уља. Веома је важно поседовати знање, технологију и одговарајућу високо квалитетну опрему за производњу етарских уља одличног квалитета. Ако су етарска уља садржана у облику гликозида неопходно их је ослободити претходном ферментацијом. Обично се користе ферменти који се налазе у самој биљци.

У циљу добијања корисних природних једињења из биљног материјала за комерцијалну примену у прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији, у последње време се истражују и примењују различити поступци дестилације и екстракције.

Данас су познате и на располагању следеће технике добијања етарских уља:

- а. Механичка метода – добијање етарских уља цеђењем (пресовањем)
- б. Дестилација
 - б.1 - водом
 - б.2 - водом и воденом паром
 - б.3 - воденом паром
 - б.4 - хидродифузија
- в. Екстракција – коришћењем одговарајућих растварача
- г. Динамичка апсорпција – анфлераж техника
- д. Надкритична екстракција са угљеник (IV)-оксидом

Механичка метода се примењује код агрума (бергамот, лимун, мандарине, поморанце, грејпфрут и др.) код којих се етарско уље налази у кори. Метод се спроводи на два начина: или стругањем коре целог плода, или претходним истискивањем пулпе из плода па након тога примена притиска. Ова маса се центрифугира и одваја од чврстих остатака ткива, затим се раздваја од воде и оставља да процесом ензимске ферментације

дође до потпуне разградње ткива и уклањања воде. Код савремених линија за прераду агрума истовремено се добија сок, етарско уље и целулоза као и производи од прераде пулпе: пектин, лимунска киселина, биофлавоноиди, масно уље, сточна храна, итд. Етарска уља добијена механичком методом задржавају природну арому јер не трпе топлотно и хемијско дејство. Међутим у саставу цитрусних уља налази се до 90 % угљоводоника који ограничавају њихову растворљивост у алкохолу, што је посебно важно за примену у индустрији парфема. Због тога се цитрусна уља подвргавају детерпенизацији примењујући вакуум дестилацију или течну екстракцију поларним растварачима. Етарска уља од цитрусног воћа се широко користе у парфимеријској и козметичкој индустрији и у различитим секторима прехранбене индустрије.

Дестилација са воденом паром је прикладна техника за изоловање испарљивих компоненти из биљног материјала, као што су етарска уља, као и других, релативно испарљивих једињења, нерастворљивих у води. Пошто се дестилација са воденом паром одвија на повишеној температури, она захтева значајну потрошњу енергије и може да изазове термичко разлагање компоненти етарског уља. Дестилацијом се данас производи већина етарских уља. Упркос привидној једноставности метода, за производњу једног килограма етарског уља неопходно је стотине, а понекад и хиљаде килограма биљног материјала. Дестилација је умешност која се преноси са генерације на генерацију и стално усавршава. Својство сваке биљке је јединствено. Да би спречили губитак ових јединствених особина, правилан избор технике и технолошких параметара у циљу добијања етарског уља је један од најважнијих задатака. Избор треба веома пажљиво извршити у складу са специфичним особинама биљне сировине од које желимо добити етарско уље. Примена неодговарајућих техника у производњи етарских уља може условити и немогућност да се добију очекивана (жељена) једињења. Утицај на пример водене паре може резултирати да нека једињења испаре или се разграде. Међутим, деловањем водене паре могу се појавити и нека нова једињења која нису саставни део биљке (пример хамазулена добијеног дестилацијом *Achillea millefolium* L.).

Хидродифузија (или парна перколација) је специфичан савремени начин добијања екстракта и етарских уља. Процес је знатно бржи него када се примењује дестилациона

техника. Опрема је једноставнија у односу на надкритичну екстракцију. Распршени таласи паре (слично спреју) пропуштају се кроз биљни материјал који је одвојен ситом, одозго на доле. На крају се добија течност (ликвид) који се састоји од мешавине кондезованих честица и етарског уља. Као и код класичне дестилације етарско уље и мирисна вода (хидролат, хидросол) се раздвајају у флорентинској посуди. Иако је ова техника обећавајућа, предстоје додатна истраживања да се одреде почетни услови хидродифузије за сваку биљну врсту понаособ у циљу оптимизације тј. добијања врхунских изолата.

Екстракција са органским растварачима се користи за изоловање термолабилних супстанци из биљног материјала. Након екстракције, органски растварачи се уклањају из екстракта упаравањем помоћу ротационог вакуум упаривача, и на тај начин се добијају конкрети који се пошто садрже воскове додатно подвргавају процесу одмашћивања како би се добила етарска уља за примену у козметичкој и индустрији парфема (Петровић, С. и сар., 2012). Екстракција са конвенционалним растварачима је понекад окарактерисана ниском селективношћу и потребом за високим температурама, што може довести до деградације жељених једињења.

"Enfleurage" метода екстракције етарског уља - често се користила у индустрији парфема како би се изоловала етарска уља и мириси руже и јасмина. Принцип је да се биљни материјал урони у биљну или животињску маст и остави да стоји. Мирисне супстанце издвајају се затим из масти помоћу селективних растварача.

Надкритична екстракција је много селективнији поступак у односу на конвенционалне начине екстракције и представља оптимално решење када се захтевају производи без трагова растварача (нпр. за прехранбене, козметичке и фармацеутске производе). Екстракција надкритичним угљеник(IV)-оксидом на ниској температури и под високим притиском не изазива термичку деградацију и загађење екстракта органским растварачем. Екстракти добијени овом методом задржавају природнији органолептички профил и арому саме биљке али је ова техника знатно скупља од конвенционалних начина екстракције (Moyler, D., 1998). Екстракција надкритичним угљеник(IV)-оксидом у односу на друге методе има следеће предности:

- максимално су сачувани сви биолошки активни принципи,
- екстракти и производи добијени овим начином су стерилни и бактерицидно делују на микрофлору самог производа,
- укус и арома производа остају непромењени – одражавају изворни материјал,
- екстракти су дуговечни јер садрже много природних конзерванаса и антиоксиданаса који га чувају и ако су одговарајуће упаковани минимално трају 2-3 године
- производи добијени овим поступком могу се директно користити без додатне прераде јер није неопходно одстрањивање остатака растварача

Екстракцијом надкритичним угљеник(IV)-оксидом могуће је добити два облика екстраката:

- Комплексни или тотални екстракт (смеша биолошки активних материја). Комплексни екстракт представља сложен комплекс различитих материја (етарских уља, масних киселина, пигмената, алкалоида, стероида и других растворних материја у CO_2 . Комплексни екстракт је практично копија полазног биљног материјала, при чему се биолошки активне материје налазе у пропорцијама својственим полазном биљном материјалу,
- Селективни екстракт (екстракт са максималним садржајем одабране групе материје која се екстрахује).

2.2. Техника дестилације

2.2.1. Историјат дестилације етарских уља

Историја писаних докумената о алхемичном развоју дестилације као и начина добијања “мирисних вода” и етарских уља није претерано богата. Први примитивни апарати (направе) били су такозвани "Cucurbita", "Alambic" и "Berchile" и представљају претходницу данашњих апарата који користе принцип водене паре за добијање етарских уља из лековитих и ароматичних биљака (Schelenz, H., 1911 ; Петровић, С., 1998).

У почетку људске историје ватра као један од основних елемената свега живог важила је као нешто натприродно тј. као светлост богова коју је *Прометеј* донео из света богова на земљу. Људи тога времена су ватру користили у религијске сврхе.



Слика бр. 2.2.1

У Персији ватра је коришћена као божји елемент а у старој Кини у најранијем добу за развој примитивне индустрије вредне сваког поштовања. Поједини списи упућују да је и *Курбал Кан* био мајстор за употребу ватре у рудницима и железарама (Књига Мојсија). Вавилонска кула била је изграђена од печене цигле (Књига Мојсија). У Вединим списима и изворима стари Индуси су одавно користили пећи за топлење и искоришћавање топлоте али и за дестилацију. Стари Египћани имали су још различитију употребу ватре.



Слика бр. 2.2.2

Од времена Арабљана па кроз цео средњи век у моди је било докучивање тајни земаљских материја а нарочито биљних и животињских творевина уз коришћење ватре. Крајња тежња ових напора, кроз скоро 10 векова, била је *откривање "камена мудрости"*. Истраживачки напор није био само претварање неплементитих метала у злато већ добијање и "Quinta essentia" у циљу одржавања и обнављања здравља а у

крајњем исходу продужавање живота до крајњих граница. У те сврхе користе се најразличитије пећи, судови, апарати и ко зна какви уређаји.

Ипак се све сводило на херметичке вештине уз коришћење алхемије (тајног поступка) као методе за остваривање циљева. Средњи век биће запамћен у тежњи за "растварањем и продирањем" у суштину природних и других тела путем непосредног и посредног коришћења топлоте (ватре).

Први литературни подаци старог века из којих се може поуздано извести закључак да се ради о процесу дестилације, говоре о начину добијања терпентинског уља ([Plinius, 15](#)). Уље се добијало кувањем смоле у води у обичном отвореном суду на чијем врху су постављени дрвени штапови и вуна да "ухвати" водену пару /слика бр. 2.2.1/. Вуна се повремено скидала и цедила, јер је пара у себи носила и честице уља. Цеђење вуне обављало се ручно.

Судови намењени искључиво за дестилацију Арабљани су значајно побољшали. Најстарији списи о дестилацији припадају грчком лекару ([Dioscorides, 80. п.н.е.](#)) а нешто касније, у петом веку после Христа, грчком научнику *Зосимосу*. Већ се у арапском преводу



Слика бр. 2.2.3



Слика бр. 2.2.4

"*Liber de materia medica*" а и грчким подтекстовима говори о пећима за дестилацију и апаратима под називом "Cucurbita" и "Alambic".

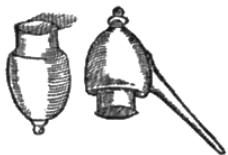
У старом веку при конструисању апарата и/или уређаја најчешћи узор су били различити облици животиња ([Wiedemann, E., 1878](#)). То је важило и код обликовања судова за најелементарнију дестилацију ([Joannis, R. 1613](#)). Према тврдњи Зосимоса такав начин пренет је и на Арабљане. Исти утицај захватио је и западне алхемичаре у коришћењу форми сличних животињама у покушају да нађу најбољи начин дестилације. Узор најједноставније реторте био је облик ноја, гуске или пеликана /слика 2.2. - 2, 3, 4/. За процес кондезовања (куполе за кондезацију) послужила је фигура медведа /слика 2.2.5/. Најјаснији приказ ове једноставне справе



Слика бр. 2.2.5

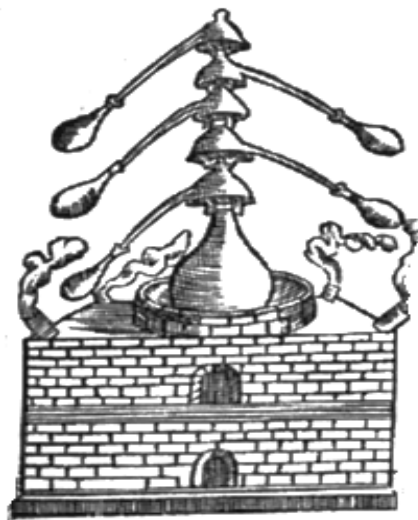
налази се у списима Геберса и Абулцасиса. Судове за дестилацију од стакла и глазиране глине описао је Абулцасис. Приказао је и једну врсту фракционе дестилације у циљу бољег хлађења и раздвајања "суптилних душа" постављањем више купола за дестилацију. Из сачуваних дела Геберса и Абулцасиса као и багдадског лекара и писца Разеса ([Gebri, A. 1682.](#)) знамо да Арабљани већ у осмом веку праве разлику између дестилације са отвореним пламеном и водене или пепеоне каде.

Болоњски лекар и алхемичар Costaseus von Lodi препоручивао је "Alambic" и водено-пешчано корито за хлађење и побољшање дестилата ([Mesue, L. 1602.](#)). У делу Абулцасиса сачувано је искуство Арапа, са описом тадашњег начина дестилације и апарата за дестилацију. Абулцасис је описао и сачувао од заборавља судове за дестилацију направљене од глазиране глине, /слика 2.2.6./. На слици бр. 2.2.7 је представљен један систем дестилације. Уочљив је покушај да се у циљу бољег хлађења и раздвајања користи више нивоа од глазираних судова. Доњи део је изидан печеном циглом а ложило се дрвима.



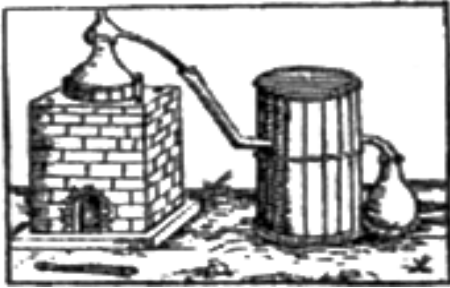
Слика бр. 2.2.6

У 14 веку број радионица за дестилацију расте. Појављују се значајнија побољшања, нарочито код делова за хлађење паре. Најчешћи облици су праве цеви, спирале, змијасте цеви провучене кроз буре које се хладило водом /слика 2.2.8./. Исти или сличан начин користили су Арапи за дестилацију вина и преврелих сокова од лековитих и ароматичних биљака. Као примери, апарати се налазе у књигама које су у 16 веку описали Брунхвингс, Улстраде, Рулс и Лонцерс. Наведени аутори су веома сликовито и прецизно описали постојеће дестилационе апарате. Делови као балон, купола (шлем) и спољашњи зид за хлађење конструисани су од бакра. Облик главичастог проширења куполе повезан је са доњим отвореним ивицама балона. Брунхвингс је овај облик назвао



Слика бр. 2.2.7

"Morgenkopf" /глава са тканином која се прелива/. Хлађење се обављало хладном текућом водом. Метод хлађења је преузет од Арапа и описан у другом тому књиге Брунхвингса објављеној 1507. год.



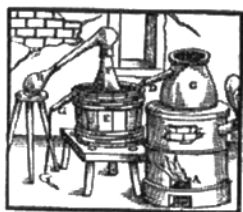
Слика бр. 2.2.8

Знатно тежи напор изискивало је усавршавање и напредовање у конструисању судова и апарата за издвајање "горућих вода". С обзиром на непознавање суштине процеса израђивани су и конструисани чудесни апарати и извори топлоте за издвајање температурно нестабилних једињења и етарских уља.

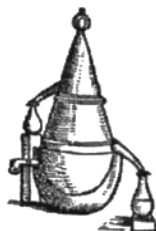
Проток флуида, паре и есенција није важио само као појам већ суштински део процеса дестилације. Из тих разлога веровало се да дестилисане делове биљних и животињских материја треба припремити за оплемењивање "духовног бића" за лакше и боље "дељење и чишћење". Из наведених разлога употребљавани су различито обликовани судови са препознатљивим симболичким елементима. Једноставни циркулатори су били најобичнији стаклени клипови са савијеним кљуном у различитим смеровима и облицима.



Слика бр. 2.2.9



Слика бр. 2.2.10



За најбољи начин циркулације важио је "пеликан" који омогућава повратни ток. Исту функцију омогућавали су двоструки или близначки циркулатори /слика 2.2.9./.

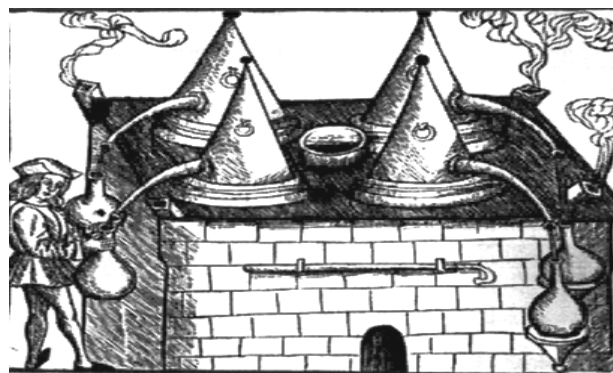


Слика бр. 2.2.11

Доста пажње поклањало се и циркулаторима који су омогућавали процес превирања и труљења уз довођење топлоте. За исту сврху употребљаване су водене или пепеоне купке. Судови су потапани у преврело хлебно тесто и заједно се грејали у пећи или стављани у корито са коњском балегом /слика 2.2.10./ Кондезовање пара у судовима није било

задовољавајуће. На дну суда лако је долазило до загоревања биљне сировине, при чему је дестилат имао непријатан мирис и укус. Непостојање контроле растуће температуре доводио је до прегревања судова, поклопаца и доводних цеви који су најчешће израђивани од олова или калаја. Степен искоришћења судова био је изузетно мали. Да се постигне издвајање уља без загоревања, било је покушаја да се користи сунчева енергија /слика 2.2.11./.

У циљу превазилажења набројаних недостатака у 15. веку конструисан је познати поклопац у облику "ружиног шешира" /слика 2.2.12./.



Слика бр. 2.2.12

У основи то је изидана пећ са ложиштем на дну и купастим поклопцима у облику кљуна. Процес се одвијао на следећи начин: на горњим зидовима поклопца доспеле честице дестилата згушњавале су се и сливале до кљуна у продужетку. Међутим знатна количина кондезата се сливала низ



Слика бр. 2.2.14

велику површину ружиног шешира што је чист губитак. Први покушај ка бољем хлађењу састојао се у прекривању поклопца говеђим мехуром са дрвеним чепом на дну.



Слика бр. 2.2.13

Кроз мехур је протицала хладна вода омогућавајући знатно бољу кондезацију /слика 2.2.13./.

На сличан начин израђиване су хаубе од метала или легура са проточном хладном водом /слика 2.2.14./.

Овако конструисани поклопци са жлебовима омогућавали су бољу кондезацију и сакупљање течне фазе.

Први апарат има две одводне цеви спроведене кроз буре са водом /слика 2.2.15./.

Већ тада Риф објашњава да и овај начин хлађења није довољан и препоручује хлађење са цевима у облику змије /слика 2.2.16./.

Сличан суд за дестилацију коришћен је у истом

периоду. Једина значајнија разлика била је у облику цеви за хлађење и суда за кување сировине /слика 2.2.17./.



Слика бр. 2.2.15

време повратка вештини дестилације уља од различитих врста дрвећа, кора и зачина. Пре свих тада су дестилисани смрека, а касније и француско дрво, цимет, каранфилић.



Слика бр. 2.2.17

налази завршетак (сливник). Доњи део суда укопаван је у земљу, где се и завршавао процес дестилације. Горњи део суда загревао се отвореним пламеном. Између горњег и доњег дела постављена је мрежа од жице. Остале лако дестилујуће материје издвајане су сунчевим зрацима /слика 2.2.19-20/. Све до данас fine врсте чајева као и етарска уља смештана су у посудама цилиндричног облика ливеним од порцелана. Књиге о дестилацији из 16. века дају текстуалне и графичке потврде. Осим до тада употребљаваних и од заборављених апарата за дестилацију,

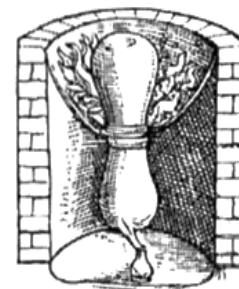
(Лоницер Адам, 1573) у књизи о биљкама и дестилацији препоручује један специфичан апарат за дестилацију ароматичних вода и уља /слика 2.2.22./.

Реч је о такозваној сувој дестилацији која по деловању припада "опадајућој дестилацији" /*destilatio per descensum*/. Овај начин је вероватно примењен у



Слика бр. 2.2.16

За "destilato per descensum" у мањим размерама стаклени судови су загревани ватром са стране /слика 2.2.18/. Пећ садржи у средини преграду са централним отвором у који се навлачио или узиђивао суд на чијем дну се



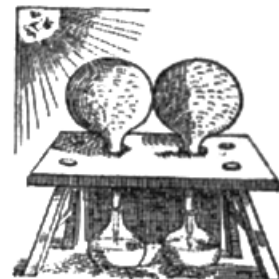
Слика бр. 2.2.18

приказаних на сликама, појавили су се крајем 16 и током 17 века такозвани "лењи Хајнц" или "Athamor" (непролазно) /слика 2.2.21/.

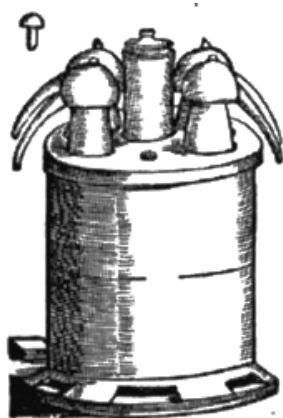
Лењи Хајнц" изнад заједничког пламена садржи четири клипа који се завршавају ружиним шеширом у облику кљуна. Пламен је допирао до централне гвоздене, бакарне или полупорцеланске цеви чији се горњи слив могао затворити поклопцем. Највећи напредак био је уграђени шибер који представља претечу данашњим давачима топлоте. Шибер је контролисао притицање топлоте испод сваког балона а самим тим и динамику дестилације.



Слика бр. 2.2.19



Слика бр. 2.2.20

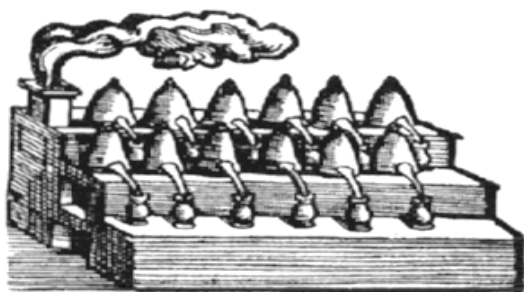


Слика бр. 2.2.21

За већу производњу етарских уља у употреби су биле такозване галијске а или веће капелске пећи. Међутим њихов опис у књигама 16 века више је представљао могућност него стварност реализације /слика 2.2.23/. Пресликавање ових пећи ишло је од једне до друге књиге а у пракси није било помака. Између осталог, пећи су пресликаване или описиване у форми терасе или пчелиње корпе. Матиолус је описао терасасту форму дестилације која баш не обилује реалним чињеницама. Ако су књиге из 16. века узете као пример за утирање путева онда је разумљиво што у дужем периоду није савладан проблем.

Наведене књиге више дају опис практичне спремности и оригиналност идеја.

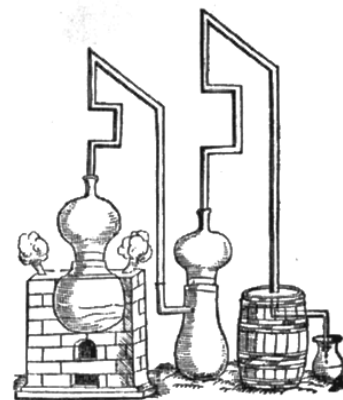
С обзиром на ограничену могућност међусобног комуницирања у том периоду деловали су и истраживали независно једни од других лаборанти са мало литературних извора и ретким списима из прошлости. Данас се може тачно оценити како су употребљавали своје знање и умеће код издвајања ароматичних вода и етарских уља. Њихови погледи о суштини дестилације, врсти и начину дестилације и апарата за дестилацију не подударају се са Брауншвигом. Мало је практичног искуства записано у



Слика бр. 2.2.23

стручној литератури оног времена а из постојећих списа недовољно се може разлучити на основу евидентираних конструкција. Тако на пример Валериус Цордус ([Valerii C., 1540.](#)) користи и предлаже апарат за дестилацију у облику крушке са куполом неправилног облика затопљеној на врху. /слика 2.2.24/. Насупрот Кордусу, његов савременик Conard Genser за исту сврху користи пећ /слика 2.2.25/ ([Tezaurus E. Philiatri, 1583.](#))

стручној литератури оног времена а из постојећих списа недовољно се може разлучити на основу евидентираних конструкција.



Слика бр. 2.2.22

Књига Брауншвинга о дестилацији нуди практична и теоретска знања али и заблуде и неспремност лабораната 16. века. Истакнути практичар 17. века Рудолф Глаубер ([Johanni R. Glauberi, 1648.](#)) објашњава начин дестилације и апарате из друге половине 17. века. Он се бавио дестилацијом ароматичних биљака, зачина и "лекарија". Из списка се може закључити да су Глаубер и његови савременици нарочито



Слика бр. 2.2.25

пазили на побољшање начина дестилације и већи степен искоришћења. Ради повећања тачке

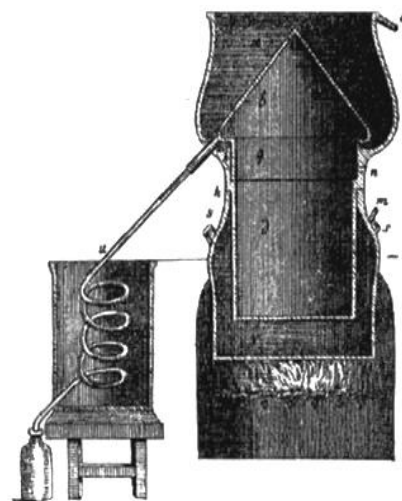


Слика бр. 2.2.24

кључања додавала се кухињска со као помоћно средство. Коришћење соли трајало је до средине 18. века.

У току 18. века почиње примена стакла или глазиране глине уместо металних судова јер је накнадним посматрањем уочено присуство метала у издвојеним ароматичним водама и уљу, нарочито при дестилацији са киселинама. Многи лаборанти су већ у 15. веку упозоравали да метални мехурови и хладњаци садрже значајно присуство штетних елемената. То је нарочито било изражено при коришћењу бакарних судова, оловних шлемова и цеви за хлађење. Болоњски лекар Ветори, објашњавао је да вода која пролази кроз оловне цеви садржи олово и да је отровна. Запажања и упозорења нису озбиљно узета јер су и даље израђивани уређаји и елементи од олова, калаја, бакарних и других легура.

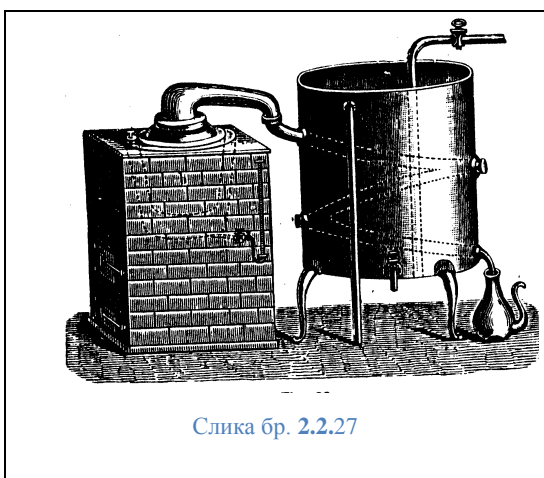
Потражња за етарским уљима расте. Пооштрава се надзор приликом производње у лабораторијама и апотекама. Апотеке су биле до првих деценија 19 века места за припрему "лекарских и занатских дестилованих уља". Одређене врсте етарских уља производе се у већим количинама, пре свих, уља од рузмарина, лаванде и руже. Етарска уља се користе у индустрији парфема и сапуна а издвајана су током целог 16. века у једноставним судовима (Demachy J., 1773.). Исти или слични уређаји се користе у Француској, Италији, Шпанији и Бугарској.



Слика бр. 2.2.26

Један од бољих апарата /слика 2.2.26/ за добијање етарских уља у 18. веку описао је директор апотекарске лабораторије париске цивилне болнице 1784. год. У воденој купки налазио се viseћи калајни и бакарни мехур са главом у облику шаргарепе, ружиног шешира и цеви за хлађење у облику змије. Уочљива је намера конструктора да се размена топлоте са окружењем сведе на минимум. Овај апарат представља претечу данашњих дупликатора.

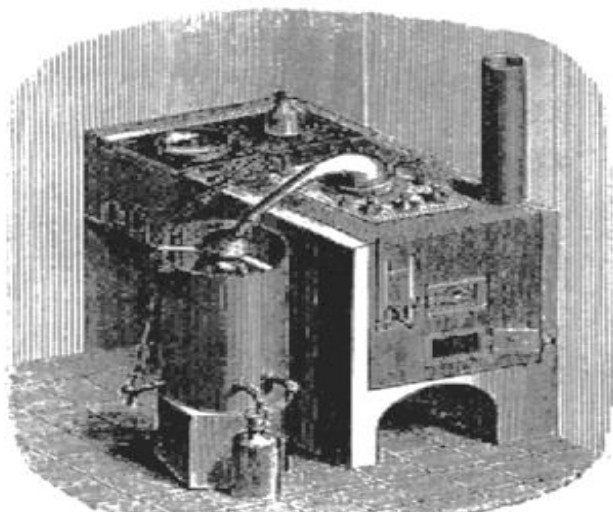
Од почетка 19. века велики напор се улагао у поједностављењу конструкције апарата, нарочито елемената за хлађење и елиминисање загревања биљне сировине. То је успело апотекару Динглеру из Аузбурга и енглезу С. Тенанту и Х. Тритону између 1815-20. Тритон је покушао да процес дестилације изведе при ниској температури коришћењем ваздушне пумпе у доводној цеви /слика бр. 2.2.27/. Основна идеја аутора је стварање разређеног ваздуха у којем би вода кључала на нижој температури.



Слика бр. 2.2.27

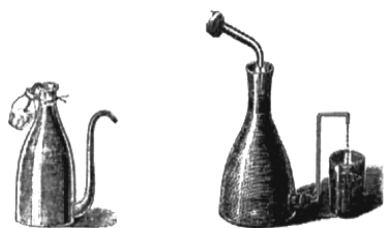
Дестилација воденом паром је 1826. год. препоручена од (Zeise H., 1828.). За добијање етарских уља исти принцип користио је ван Дук у Утрехту и битно побољшао квалитет добијених уља. Дук је практично доказао, да се етарска уља добијена овим поступком знатно разликују у односу на уља добијена изнад отворене ватре. Та предност се односи на чистији мирис, боју и изглед етарских уља. Уље од каранфилића дестиловано паром скоро је безбојно, уље од цимета светло сламнатожута, уље од поморанце водено светло .

Прва парна дестилација у већим количинама у фармацеутској лабораторији изведена је у Лондону. У Немачкој парну дестилацију примењивао је механичар и ливац (Bajrdorf J. 1826). год. Апаратом са напрегнутим парама за дестилацију било је изводљиво добијање етарских уља. Апарат је побољшан у смислу лаке демонтаже хладњака и чишћења унутрашњости суда. Мањи дестилациони апарати нису издржали утакмицу са великим погонима јер је потражња за етарским уљима стално расла.



Слика бр. 2.2.28

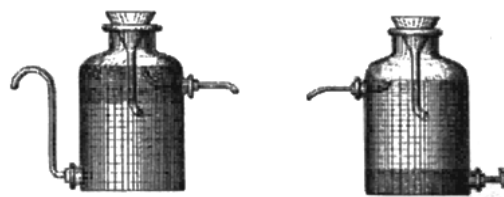
Из тог времена задржала се и такозвана "флорентинска боца" која је служила за раздвајање етарског уља од воде. У средњем веку је почела њена употреба. На слици бр. 2.2.29 приказани су првобитни типови флорентинске боце. Дестилат се сливао у прихватну боцу и за одређено време се пунио до нивоа преливне цевчице кроз коју је истицала вода а при врху боце изнад воде одвајао се прстен етарског уља.



Слика бр. 2.2.29

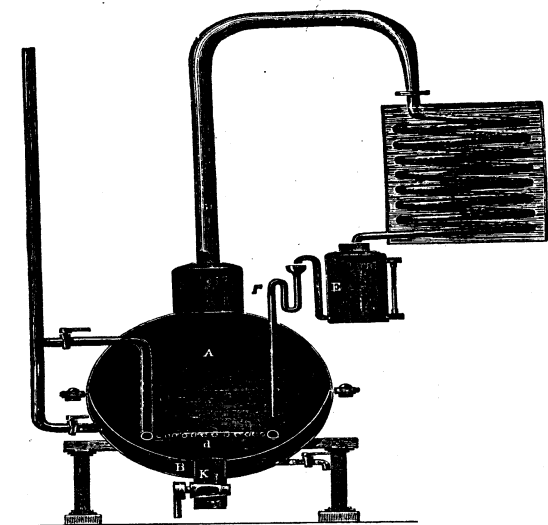
Недостатак ове боце састојао се у накнадном раздвајању уља и воде. При индустријској производњи употребљавала се само већа боца а принцип је остао исти. Делови улаза и излаза код боце су различито постављани у

зависности од добијеног уља, тј. да ли је уље лакше или теже од воде. У посматраном периоду предложени су различити прихватни судови за издвајање етарских уља као на пример судови из 1825. год представљени у Паризу /слика бр 2.2.30/.



Слика бр. 2.2.30

На слици су две варијанте флорентинске боце. Лево је боца која служи за раздвајање етарског уља које је лакше од воде и десно, боце за тежа уља. Без икакве значајније промене и данас су у употреби ове боце.



Слика бр. 2.2.31

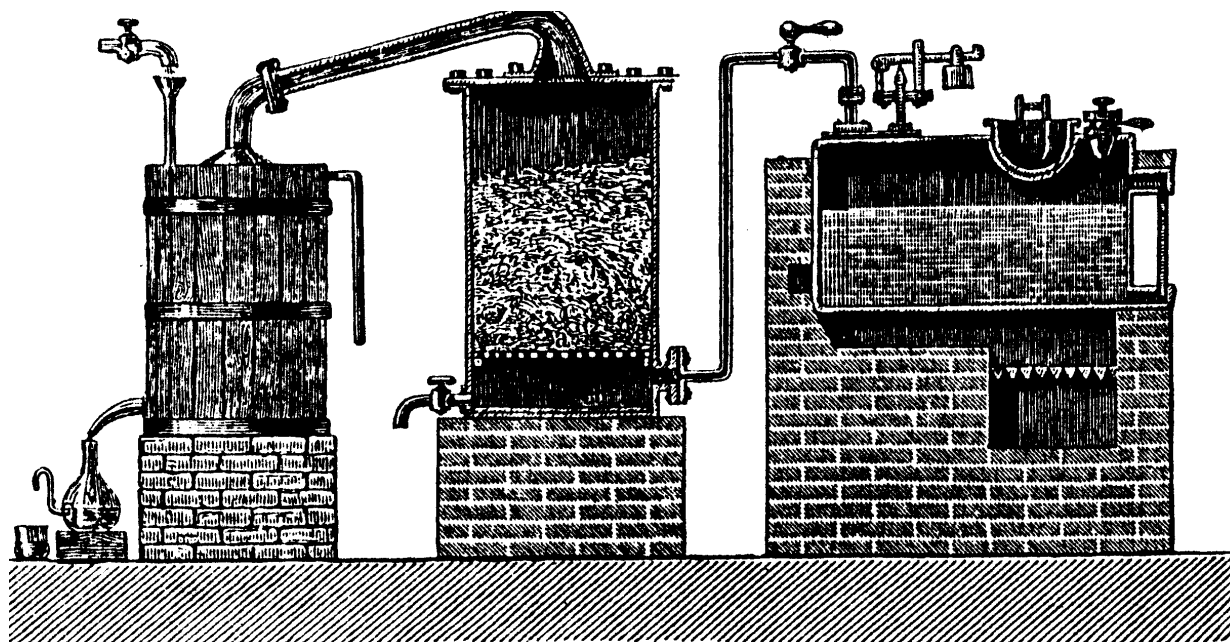
Етарска уља се употребљавају све више у Француској, нарочито у индустрији парфема. Издвајање се у првој четвртини 19. века обавља у примитивним дестилационим судовима са накнадним пречишћавањем. У Немачкој за те сврхе употребљавају апарате приказане на сликама број /2.2.27 и 2.2.28/. У Француској су се највише издвајала етарска уља из лаванде, рузмарина и поморанциног цвета. У Турској је претежно издвајано уље из ружа.

У Немачкој и Мађарској највише су издвајали етарска уља из кима, дивље мирођије, аниса, коријандера, цаламуса, нане, валеријане, камилице и других лековитих и ароматичних биљака. У јужној Француској, нарочито у језерским Алпима развила се велика индустрија етарских уља. Раније коришћени дестилациони апарати у великим фабрикама попримали су другачији облик. Ти апарати средином прошлог века користили су пару за дестилацију у такозваним мехуровима (судови у облику лопте). Мехур за дестилацију код првих апарата /слика бр. 2.2.31/ је једноставан уређај за дестилацију биља у води као и ректификацију добијеног сировог уља путем паре. Мехур се грејао путем прстена са отворима /д/. Прстен се налазио на дну суда кроз који је струјала пара под притиском. Омогућено је и директно убризгавање паре у доњем дуплом омотачу /Б/. У простору /А/ налазила се припремљена сировина за напаравање. Када би збир парцијалних притисака досегао вредност једнаку или нешто већу од атмосферског притиска смеше које се налазе у суду су кључале и честице би кренуле на горе према куполи кроз уску цев која води до хладњака у облику змије. Вишак дестиловане воде из процеса би се враћао у мехур (балон) преко цеви /Ф/. На дну мехура када би се процес окончао отварао би се славина /К/ ради испуштања заостале пулпе од кувања биљне сировине.

Од тренутка успешног добијања етарског уља дестилацијом помоћу водене паре овај метод се данас користи као најјефтинији. Прецизније, користи се у случајевима када биљна сировина садржи повећан проценат етарског уља а његове компоненте су стабилне на температури дестилације.

Код дестилације са сувом воденом паром /слика бр. 2.2.32/ суд се пунио биљном сировином без додатка воде. Пара се производила у посебном уређају са контролисаним притисцима а затим убацивала одоздо у суд са припремљеном сировином. Овај принцип данас се користи уз различите облике и/или модификације.

Наравно, данашњи дестилатори се не узиђују циглама или другим материјалима, већ се економично реализују од квалитетних прохромских материјала. Челици не смеју да садрже оксидативне, лако рђајуће и реагујуће елементе.



Слика бр. 2.2.32

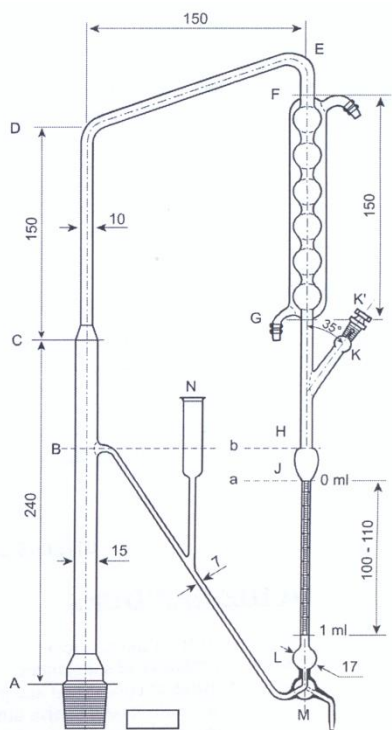
Од почетка 20 века до данас иновације, у области конструкције и коришћења дестилационих апарата и уређаја су експоненцијално порасле, и веома тешко их пописати. За такав покушај су потребне године истраживања.

У циљу прегледности и избегавања инвентаризације свих и/или најважнијих апарата али и окончања историјата у даљем тексту изложиће се само технике које су се користиле у овом раду.

2.2.2. Апаратура по Clevenger –у

За одређивање садржаја етарског уља у дрогама помоћу водене паре користи се апаратура по Clevenger–у, ређе по Унгеру. Фармакопеја прописује три поступка;

- први, служи за одређивање процената етарских уља лакших од воде, што је био случај у овом раду,
- други, прописује начин етарских уља тежих од воде,
- трећи, примењује се за етарска уља са стеароптенима који се задржавају на хладним деловима апарата током дестилације.



Слика бр. 2.2.2.1: Наставак (без балона и грејног тела) по Clevenger поступку који прописује Euro Ph. 6.0.

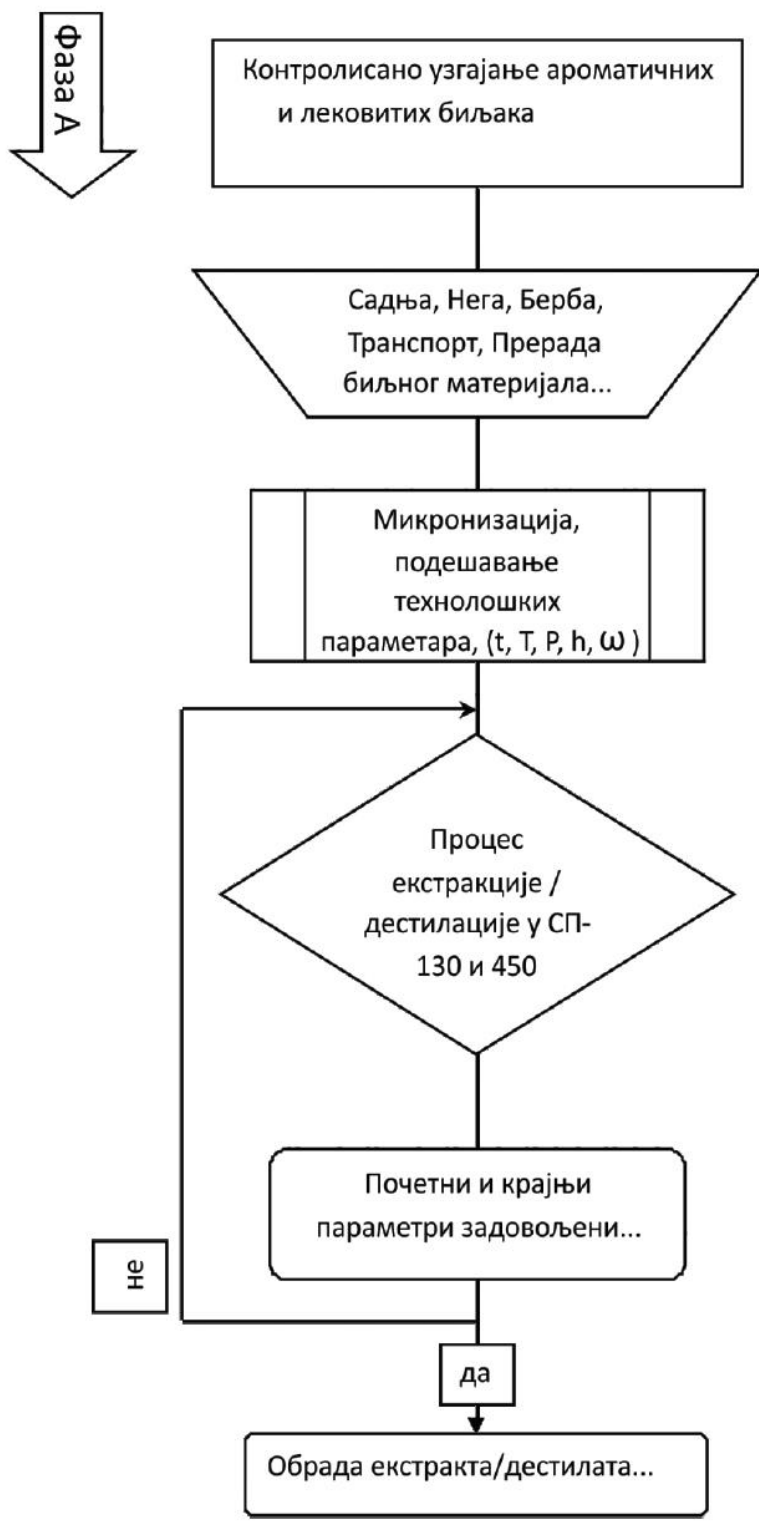
Одређивање садржаја етарског уља је веома важно код процене квалитета лековитих и ароматичних биљака. Ово одређивање може се лако вршити у посебној апаратури коју је осмислио Clevenger и којом је могуће прецизно одређивање садржаја етарског уља у биљним дрогама користећи веома мале количине биљног материјала. При хидродестилацији по Clevenger-у биљни материјал се доводи у контакт са водом, тако што се прописана количина уситњене биљне дроге убаци у балон за дестилацију и прелије водом. Балон се прикључује на хладњак апаратуре за дестилацију по Clevenger-у (слика бр. 2.2.2.1) и смеша се загрева до кључања. Процес дестилације траје 2-3 сата, при чему са етарско уље сакупља у горњем градуисаном делу цеви за мерење добијеног етарског уља, јер је лакше од воде. Запремина добијеног етарског уља се очита, етарско уље се испусти у одмерени стаклени суд и мери се принос етарског уља на аналитичкој ваги. Пошто је добијено етарско уље влажно, неопходно је осушити га помоћу анхидрованог натријум-сулфата. Након сушења узорак је спреман за даља испитивања.

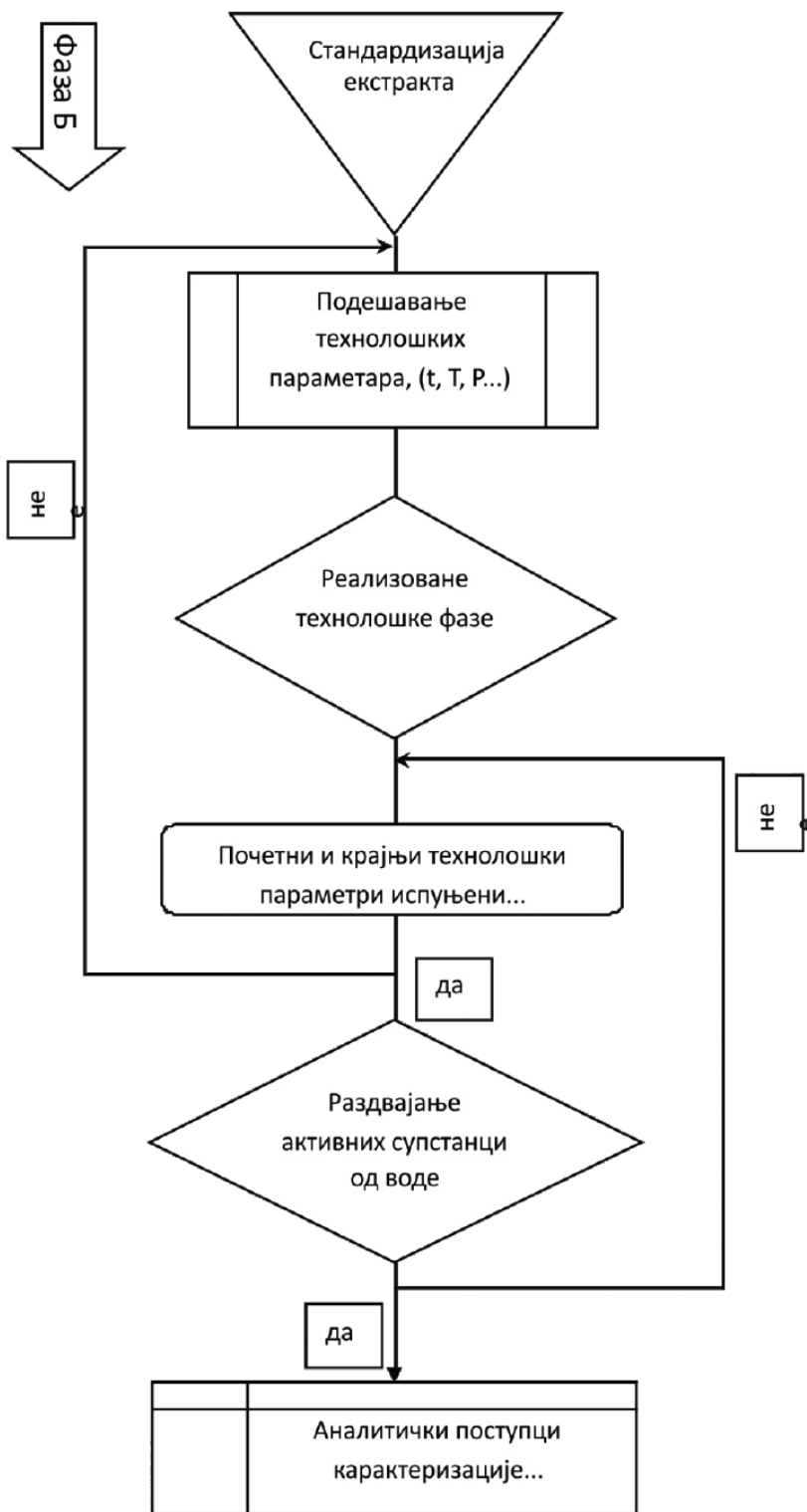
2.2.3. Полуиндустријски дестилациони уређај СП-130

У циљу избегавања сувишних описа и технолошких детаља, генерално у три фазе је графички представљено коришћење оригиналних технологија у производњи и добијања фармаколошки биоактивних конституената - етарских уља рода *Thymus* искључиво у сопствено развијеним дестилационим уређајима типа СП-130 и СП-450_{вп}.

Полуиндустријски дестилациони уређај СП-130 користи принцип воде и водене паре а дестилациони уређај СП-450_{вп} има одвојен генератор паре (снаге 50 KW) од колоне у којој се налази биљна сировина.

Уређаји типа СП-130 врше раздвајање уља и воде истовремено са процесом кондезације, без посебног додатног уређаја. Рад са СП-130 је са аспекта сигурности потпуно поуздан. Уређај типа СП-130 представља отворен систем без притисака а урађен је од најбољих нерђајућих челика Ч.4578 и киселоотпорних нерђајућих челика типа Ч. 4580. Хладњак и раздвајач урађени су најквалитетнијих прохромских челика и од лабораторијског ватроотпорног и киселоотпорног стакла. Уређаји тог типа користе све видове енергије (чврсто гориво, течна, гасовита и ел. енергију). Најбољи радни режим постиже се гасовитим горивом ([Бабовић, Н. и сар., 2013а](#)).





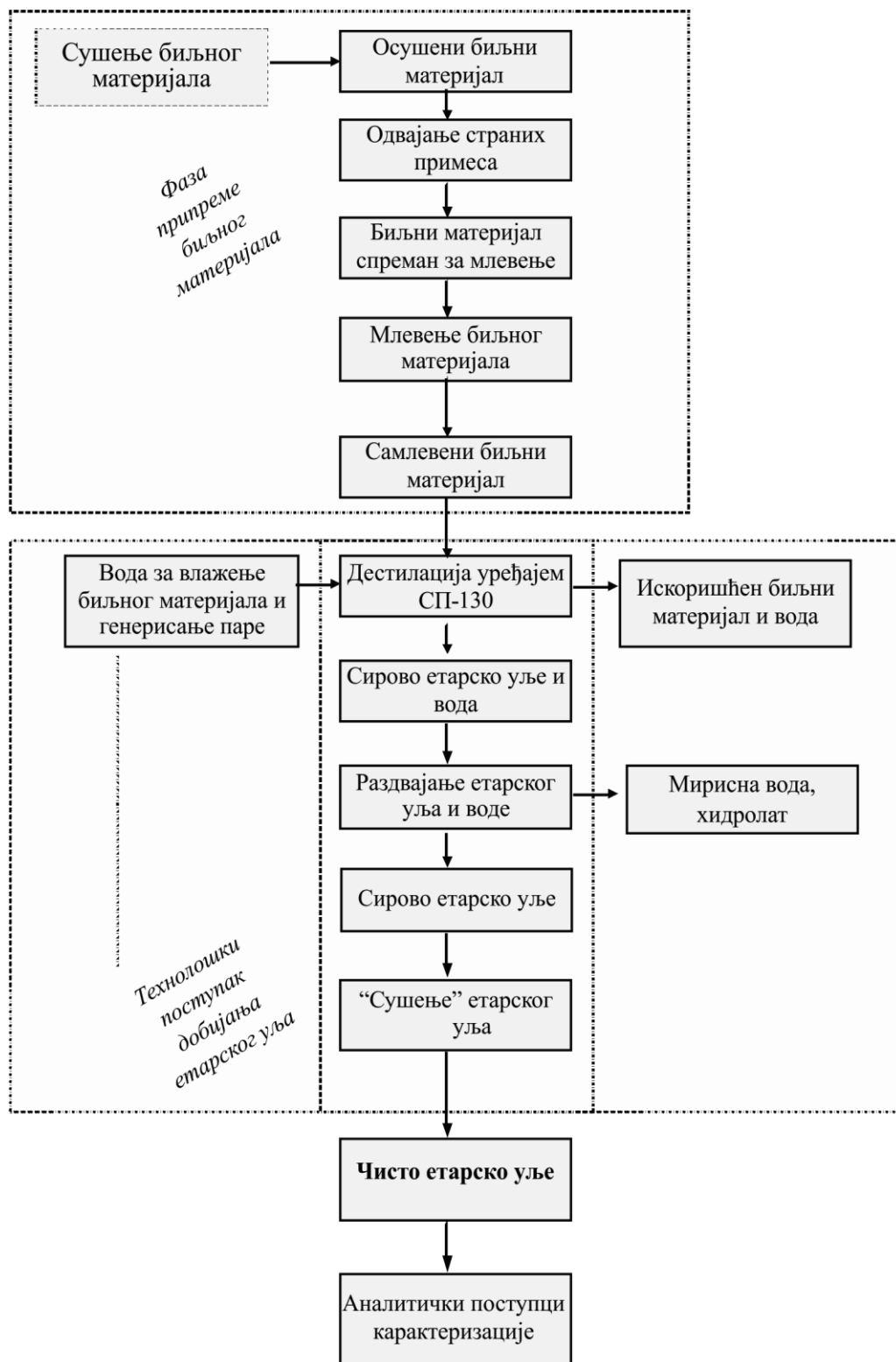


Схема процеса добијања етарског уља техником воде и водене паре дестилационим уређајем СП-130 за *Thymus serpyllum* и *Thymus vulgaris*.

У пракси су најчешће заступљени дестилатори великих капацитета, тј. прерадити што већу количину сировине у јединици времена. Међутим, користити метод дестилације помоћу водене паре за велике запремине има недостатака. Основни се састоји у немогућности контролисања понашања паре са повећањем висине и ширине сировине коју је неопходно да “нападне и савлада” водена пара а да при томе не уништи есенцијално својство етарског уља у третираној сировини (нарочито у доњим слојевима). Етарска уља добијена на овај начин имају низ недостатака:

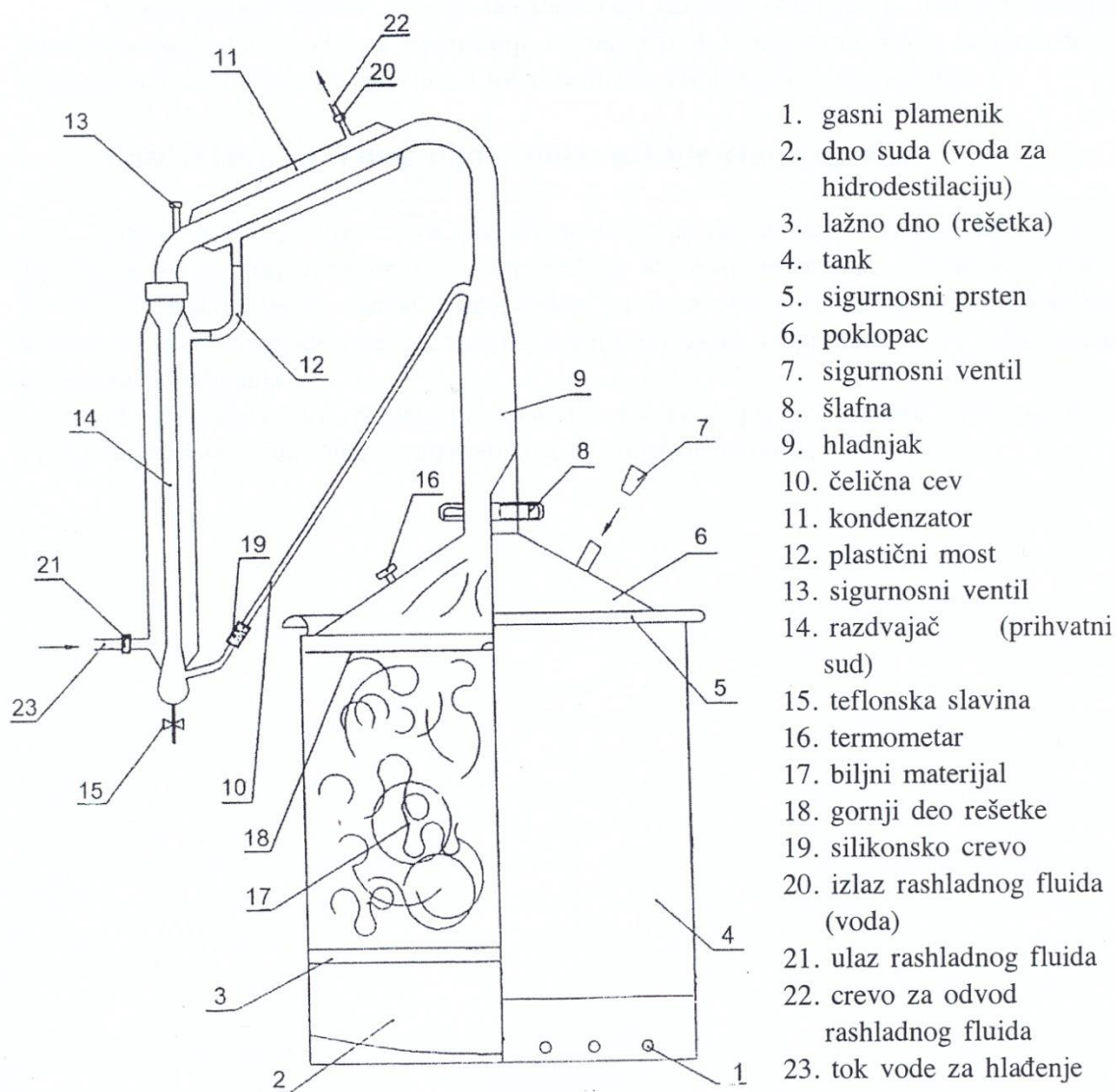
- мањи принос етарског уља,
- заостатак примеса од разлагања биљних ћелија услед немогућности паре да савлада висину препреке,
- мања растворљивост добијеног етарског уља,
- губитак лако испарљивих једињења због повишене температуре.

Конструкционе карактеристике пријемника етарских уља код уређаја типа СП-130 су реализоване заједно са хладњаком. Предност дестилационих уређаја типа СП-130 је:

- боље раздвајање смеше етарског уља и воде,
- избегнито испаравање лако испарљивих компоненти,
- лакша контрола брзине процеса дестилације
- могућност сталне контроле температуре и дестилата
- нема отпада (цео процес је затворен)
- могућност добијања само хидролата и дестиловане воде
- веома висок степен искоришћења
- инсталирање више уређаја (паралелно издвајање етарских уља од различитих биљака)
- могућност агрегације - комбиновања уређаја
- погодност лаког транспорта до сировинске базе (смањење транспортних трошкова превоза сировине, складиштења...)
- изузетно користан за рад у природи

Принцип воде и водене паре коју користи суд СП-130 има предност у односу на обичну дестилацију јер производњом паре у самом суду убрзава се издвајање етарског

уља, скраћује време дестилације и остварује већи принос. Дестилациони полуиндустријски уређај СП-130 конструкционо, у суштини представља “гигантски Клевенцер“.



Слика бр. 2.2.3.1 Полуиндустријски дестилатор СП-130

2.3. Техника екстракцијом органским растварачима

2.3.1. Екстракција органским растварачима

Код технике добијања етарских уља (биљних екстраката) коришћењем органских растварача неопходно је водити рачуна о поступцима и факторима који значајно утичу на сам процес. У фармацеутској индустрији постоји специфична подела; мацерација, ремацерација, перколација, реперколација, брза реперколација, континуална екстракција и циркулација.

Једна другачија подела би била на: статичке и динамичке поступке екстракције. Друга подела на периодичне и континуалне поступке екстракције. У периодичним поступцима разликују се једностепена, проста вишестепена и противструјна вишестепена екстракција. Можемо поделу извршити на равнотежне и неравнотежне (према могућности постизања равнотеже), истосмерне и противструјне (у односу тока растварача и сировине).

На пренос масе при екстракцији делује већи број фактора које можемо груписати као: факторе који су одређени физичким својствима биљне сировине и факторе који утичу на процес преноса масе унутар честица сировина и растварачу. На брзину преноса масе највише утичу:

- хидродинамички услови процеса
- утицај растварача
- утицај температуре
- утицај густине паковања третираног биљног материјала
- утицај присуства ваздуха на површини и унутар третираног биљног материјала
- утицај смера (пута) увођења екстрагента у третирани биљни материјал
- утицај пресовања набубреле биљне сировине
- утицај електричног поља

За потребе овог рада примењена је континуална чврсто-течна екстракција помоћу органских растварача у апаратури по Soxhlet-у.

Растварачи се деле на *неполарне*, *поларне - протонске* (дисоцијацијом дају протон) и *поларне - апротонске* (немају протон који дисоцира). Растварачи у табели су поређани у односу на диелектричну константу, од најмање према највећој вредности.

Табела 2.3.1.1 Преглед најчешће коришћених растварача и њихове основне особине

Растварач	Хемијска формула	Тачка кључања	Диелектрична константа	Густина
Неполарни растварачи				
Хексан	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	69 °C	2,0	0,655 g/ml
Бензен	C ₆ H ₆	80 °C	2,3	0,879 g/ml
Толуен	C ₆ H ₅ -CH ₃	111 °C	2,4	0,867 g/ml
Диетил етер	CH ₃ CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₃	35 °C	4,3	0,713 g/ml
Хлороформ	CHCl ₃	61 °C	4,8	1,498 g/ml
Етил ацетат	CH ₃ -C(=O)-O-CH ₂ -CH ₃	77 °C	6,0	0,894 g/ml
Поларни апротонски растварачи				
1,4-диоксан	$\frac{/-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-}{CH_2-O-}$	101 °C	2,3	1,033 g/ml
Тетрахидрофуран (THF)	$\frac{/-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-}{CH_2-}$	66 °C	7,5	0,886 g/ml
Дихлорметан (DCM)	CH ₂ Cl ₂	40 °C	9,1	1,326 g/ml
Ацетон	CH ₃ -C(=O)-CH ₃	56 °C	21	0,786 g/ml
Ацетонитрил (MeCN)	CH ₃ -C≡N	82 °C	37	0,786 g/ml
Диметилформамид (DMF)	H-C(=O)N(CH ₃) ₂	153 °C	38	0,944 g/ml
Диметилсулфоксид (DMSO)	CH ₃ -S(=O)-CH ₃	189 °C	47	1,092 g/ml
Поларни протонски растварачи				
Сирћетна киселина	CH ₃ -C(=O)OH	118 °C	6,2	1,049 g/ml
<i>n</i> -Бутанол	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	118 °C	18	0,810 g/ml
Изопропанол (IPA)	CH ₃ -CH(-OH)-CH ₃	82 °C	18	0,785 g/ml
<i>n</i> -Пропанол	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -OH	97 °C	20	0,803 g/ml
Етанол	CH ₃ -CH ₂ -OH	79 °C	24	0,789 g/ml
Метанол	CH ₃ -OH	65 °C	33	0,791 g/ml
Мравља киселина	H-C(=O)OH	100 °C	58	1,21 g/ml
Вода	H-O-H	100 °C	80	1,000 g/ml

Најповољнијим растварачима сматрају се они који се лако дестилишу у уском температурном интервалу. У овом раду су коришћени етанол и n-хексан. Генерално, приликом избора растварача неопходно је водити рачуна о следећем:

- да је селективан
- да има повољне термодинамичке карактеристике
- да је хемијски неутралан за производ, уређај и људе
- да није високо запаљив, експлозиван и штетан за здравље
- да је стабилан
- да је јефтин

Табела 2.3.1.2 Физичка својства етанола и n-хексана

Растварач	Етанол	n-хексан
Температура кључања	78,37 °C	67-69 °C
Растворљивост у води	Добра	0,007 %
Густина	0,7894 g/cm ³	0,664 g/cm ³
Топлота испаравања	838 kJ/kg	332 kJ/kg
Топлота сагоревања	29693 kJ/kg	48500 kJ/kg

У циљу добијања корисних природних једињења из биљног материјала за комерцијалну примену у прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији, у последње време се истражују и примењују различити поступци екстракције (Wang, L. и Weller, L. 2006).

Дестилација са воденом паром је прикладна техника за изоловање испарљивих компоненти из биљног материјала, као што су етарска уља, неки амини и органске киселина, као и других, релативно испарљивих једињења, нерастворљивих у води. Пошто се дестилација са воденом паром одвија на повишеној температури, она захтева значајну потрошњу енергије и може да изазове термичко разлагање компоненти етарског уља, што доводи до промене мириса добијеног уља (Ammann, A. и сар., 1999 ; Петровић С. и сар., 2012).

Екстракција са органским растварачима или са водом се користи за изоловање термолабилних супстанци из биљног материјала. Након екстракције, органски растварачи се уклањају из екстраката упаравањем помоћу ротационог вакуум упаривача, и на тај

начин се добијају конкрети који се (пошто садрже воскове ...) додатно подвргавају процесу одмашћивања етанолом како би се добила етарска уља за примену у козметичкој и индустрији парфема. Процеси екстракције са органским растварачима су ограничени (зависе од) растворљивости једињења у коришћеном растварачу, а самим тим и квалитет и квантитет извојеног екстракта су одређени примењеним екстрактантом (растварачем) (Wang, L. и Weller, L. 2006). Екстракција органским растварачима у Soxhlet апаратури примењује се када биљни материјал садржи термолабилна једињења и омогућава изолацију и обогаћивање једињења средње и ниске волатилности (испарљивости) и термичке стабилности. Она омогућава висок принос, али има велики број недостатака, као што су дуго време екстракције, велика потрошња растварача, воде за хлађење и електричне енергије и често незадовољавајућу репродуктивност (Romanik, G. и сар. 2007).

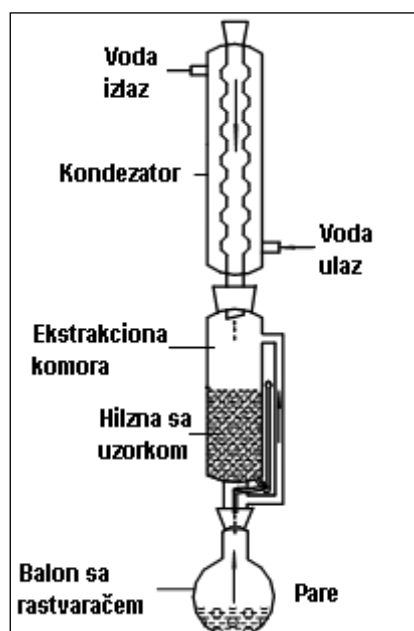
Ови недостаци довели су до разматрања употребе нових такозваних “зелених” техника екстракције са краћим временом екстракције, мањом потрошњом органског растварача, па тиме и већом заштитом животне средине, као што су: микроталасна екстракција, надкритична екстракција, ултразвучна екстракција, ултрафилтрација, брза (флеш) дестилација, процес контролисаног пада притиска и екстракција субкритичком водом. У последње време, процеси за екстракцију фитохемикалија у екстремним или неklasичним условима се стално развијају у примењеним истраживањима и индустрији (Kenig, Y. 2008 ; Chemat, Z. и сар., 2011; Петровић, С. и сар., 2012).

2.3.2. Апаратура по Soxhlet-у

Екстрактор је изумео Franz Von Soxhlet 1897. Првобитно је дизајниран за екстракцију липида из чврстог материјала.

За екстракцију лековитог и ароматичног биља користи се читав низ лако испарљивих органских растварача, као што су петролетар, n-хексан, хлороформ, ацетон и др. Процес се обавља у различитим типовима екстрактора (непокретним или ротирајућим, Soxhlet екстракторима и сл.). Користи се за потребе парфимеријске и козметичке индустрије. Растварач треба да буде селективан, стабилан и хемијски инертан, да има ниску температуру кључања, да буде сигуран за руковање и што јефтинији. Примењује се када биљни материјал садржи температурно непостојана једињења (термолабилна

једињења). Органски растварачи нису довољно селективни, јер растварају високомолекулске, тешко испарљиве састојке као што су смоле, масна уља, пигменте и друге пратеће компоненте. Из екстраката се коришћени органски растварачи уклањају упаравањем под сниженим притиском, али у крајњем производу ипак заостају у мањим и/или већим траговима.



Слика бр. 2.3.2.1 Soxhlet

За екстракцију ароматичног и лековитог биља у фармацији се најчешће користи смеша етанол – вода као екстрагенс, јер етанол у малим количинама не делује штетно на људски организам. Смеша етанол – вода је претежно поларан екстрагенс, те се из биљног материјала могу екстраховати поларне компоненте у које спадају феноли, флавоноиди, кумарини, стилбени, антрахинони и др.

Континуална чврсто-течна екстракција, односно екстракција биљног материјала помоћу органских растварача врши се у апаратури по Soxhlet-у (слика бр. 2.3.2.1). Порозна чаура (хилзна) у којој се налази биљни материјал стави се у екстракциону комору Soxhlet-овог

екстрактора. Soxhlet-ов екстрактор се поставља на балон у који је претходно додат органски растварач. Растварач у балону се загрева да благо кључа а његове паре пролазе кроз бочну цев апарата до кондензатора где се кондензују и загрејана течност се враћа на порозну чауру, растварајући, односно екстрахујући компоненте из биљног материјала. Када ниво растварача у унутрашњој цеви Soxhlet-овог екстрактора достигне превојну тачку на бочној цеви за одвајање раствора, тада се према принципу спојених судова растварач са раствореном супстанцом прелива и враћа у балон. Процес се аутоматски понавља све дотле док се не изврши потпуна екстракција супстанце. Након екстракције, растварач се одваја од екстракта упаравањем помоћу ротационог вакуум упаривача. Soxhlet-ову апаратуру је пожељно користити када жељено једињење има ограничену растворљивост у растварачу а нечистоћа је нерастворљива у том растварачу. Уколико жељено једињење има високу растворљивост у растварачу, онда се једноставном филтрацијом једињење може раздвојити од нерастворљиве супстанце. Предност ове

методе је што се само једна запремина растварача изнова користи, уместо већег броја запремина топлог растварача који пролази кроз узорак.

2.4. Техника надкритичном екстракцијом

2.4.1. Надкритична екстракција и особине надкритичних флуида

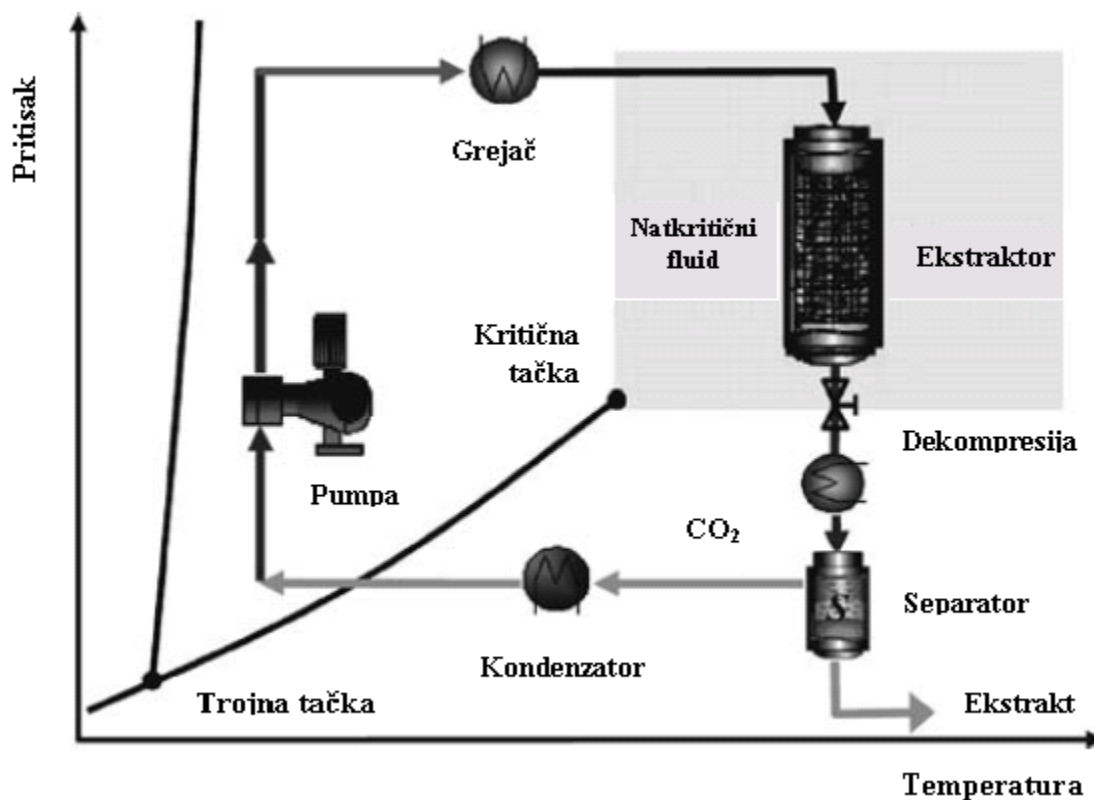
Надкритични флуиди су флуиди који се налазе у надкритичном стању – на температури и притиску изнад критичних вредности притиска и температуре за дати флуид (изнад тзв. критичне тачке). Физичке особина надкритичних флуида налазе се између особина гасова и течности. Релативно велике вредности густине надкритичних флуида погодују њиховој моћи растварања, док вредности вискозности и дифузивности надкритичних флуида указују на могућност лаког продирања у растворак. У надкритичним условима постоји само једна тзв. надкритична фаза, при чему се флуид налази у стању угушћеног гаса. Изнад критичне тачке, даљим повећањем температуре, дато једињење се не може превести у гас, нити се даљим повећањем притиска превести у течност. Као надкритични флуид, највећу примену налази угљеник(IV)-оксид, а поред њега користе се и вода, фреон, азот, азот(II)-оксид, амонијак, етен, метан, етан, пропан, пропен, метиламин итд.

Надкритична екстракција (НКЕ) је поступак екстракције флуидом који се налази у надкритичном стању тј. у стању угушћеног гаса. НКЕ се заснива на растворљивости датих једињења (растворка) у угушћеном флуиду која се мења у зависности од притиска и температуре. Густина флуида у надкритичном стању је релативно висока па је због тога велика и растворљивост компоненти у надкритичном флуиду. Такође, густина надкритичног флуида се може лако мењати са малим променама притиска и температура, углавном у области близу критичне тачке.

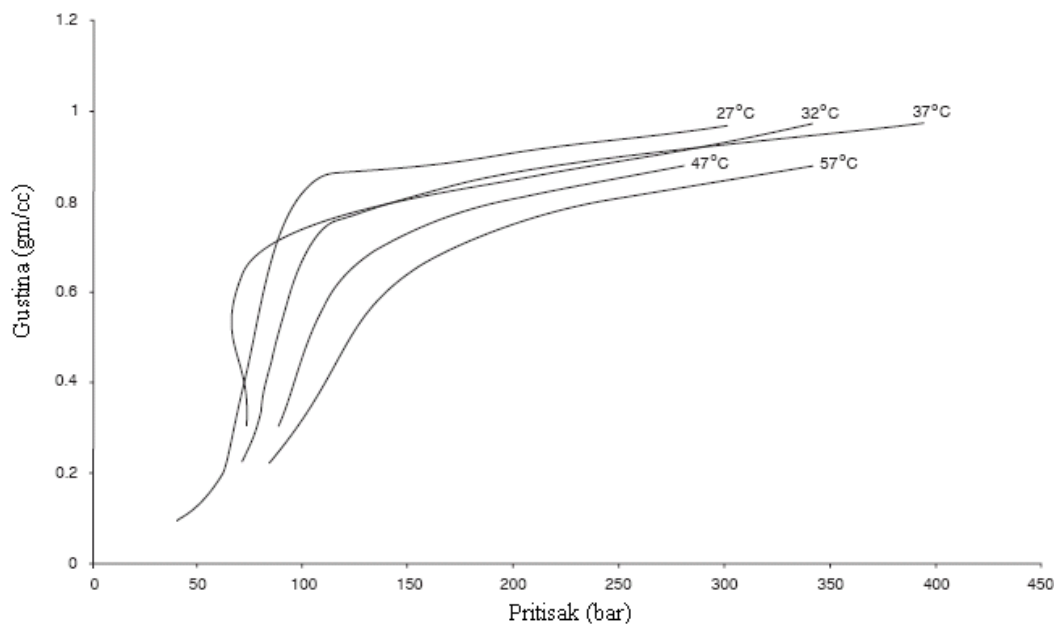
Као најпогоднији растварач у процесима НКЕ показао се угљеник(IV)-оксид због тога што је GRAS (*Generally Recognized As Safe*), због нетоксичности, незапаљивости, лаке доступности, ниске цене и ниских вредности критичних параметара (31°C и 7,38 МПа) који омогућују екстракцију на релативно ниским температурама и његово лако одвајање од супстанце која је растворена у угљеник(IV)-оксиду снижавањем притиска или температуре

испод његових критичних вредности, што је од великог значаја за екстракцију термички деградибилних супстанци.

Надкритични угљеник(IV)-оксид (NK-CO_2) је добар растварач за неполарне супстанце, док је његов афинитет према поларним супстанцама слаб. У пракси се често користе смеше NK-CO_2 и других растварача (косолвената) у циљу побољшања његове моћи растварања поларних супстанци. Обично се користи течни косолвент (на пример, етанол) који се у малим количинама додаје NK-CO_2 и повећава његову моћ растварања поларних супстанци. Са друге стране, повећана моћ растварања има за последицу смањење селективности NK-CO_2 , што доводи до коекстракције компоненти које смањују чистоћу екстракту. Етанол, етил-ацетат и вода су најбољи косолвенти за добијање екстраката у прехранбеној индустрији.

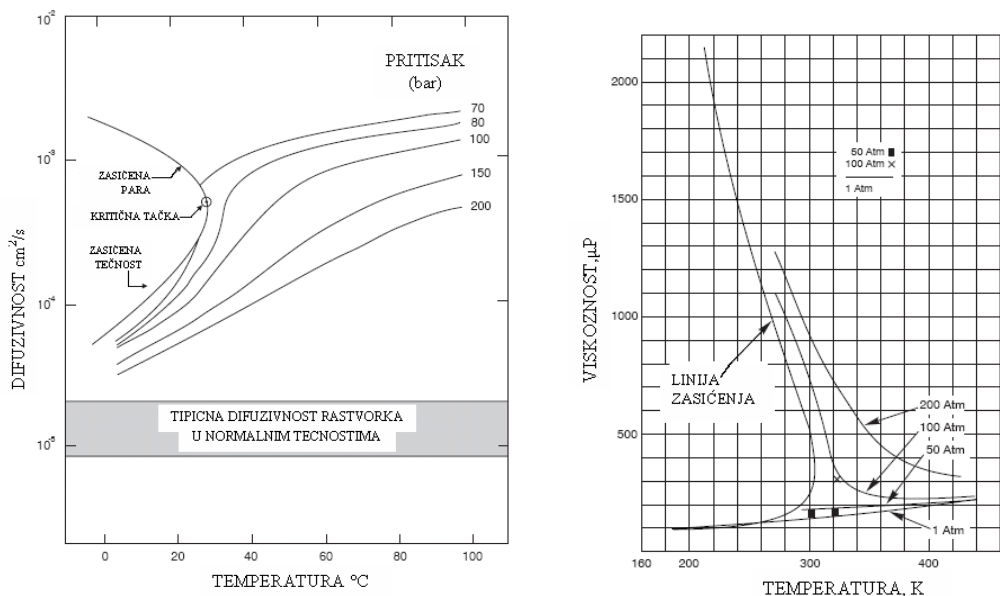


Слика бр. 2.4.1.1 Дијаграм процеса НКЕ



Слика бр. 2.4.1.2 Зависност густине CO_2 од притиска на датим изотермама

Карактеристике као што су густина, дифузивност, диелектрична константа, вискозност и растворљивост су најважније за пројектовање процеса НКЕ. Са повећањем притиска расте густина флуида у надкритичном стању и растворљивост жељених компоненти (растворка), као и интеракције између флуида и чврстог супстрата, што омогућава већи принос екстракције. Растворљивост компоненти (растворка) у надкритичном флуиду зависи од његове густине и масеног транспорта који је јачи када флуид има велику дифузивности и ниску вискозност због лакшег продирања флуида у порозну структуру биљног материјала (Shi, J. i King, W. 2006). Промена дифузивности и вискозности CO_2 у зависности од притиска и температуре приказана је на слици 2.4.3.



Слика бр. 2.4.1.3 Дифузивност CO_2 и вискозност CO_2

Особине угљеник(IV)-оксида у надкритичном стању, које се налазе између оних које поседује гас и оних које поседује течност (табела 2.4.1), омогућавају извођење процеса селективне екстракције специфичних компонената из сложених смеша. Главни оперативни параметри који утичу на НКЕ (притисак, температура, проток растварача, однос масе растварача и масе чврстог материјала, врста и концентрација косолвента) морају бити оптимизовани пре процеса. Притисци у опсегу 8-15 МПа се препоручују за екстракцију етарских уља, док се притисци у опсегу 15-40 МПа најчешће користе за екстракцију фенолних једињења и терпеноида (Meireles, A. 2009).

Табела бр. 2.4.1 Физичке карактеристике надкритичног угљен(IV)-оксида

Флуид	p/T (MPa)/(K)	Густина ρ (kg/m ³)	Дифузивност D_{ij} (m ² /s)	Вискозност η (kg/ms)
Гас	0,1/298	0,6 – 2	0,1 – 0,4	$(1 - 3) \cdot 10^{-4}$
НКЕ	P_c/T_c	200 – 500	$0,7 \cdot 10^{-3}$	$(1 - 3) \cdot 10^{-4}$
Течност	0,1/298	600 – 1600	$(0,2 - 2) \cdot 10^{-5}$	$(0,2 - 3) \cdot 10^{-2}$

Поред оперативних услова, растворљивост неке супстанце у НК- CO_2 зависи од њене молекулске масе, поларности и присуства појединих функционалних група у њеном молекулу. У табели бр. 2.4.2 класификоване су неке од компонената природног порекла

као веома растворљиве, умерено растворљиве и скоро нерастворљиве у НК-СО₂. Екстракција са НК-СО₂ показала се као погодна метода за изоловање једињења средњих моларних маса и релативно мале поларности из биљног материјала.

На пример, угљоводоници и остала органска једињења ниске молекулске мале или релативно слабе поларности као што су: естри, етри, алдехиди, кетони, лактони и епоксиди се могу лако екстраховати помоћу НК-СО₂ на ниским притисцима у опсегу 7,5-10 МПа, док умерено поларна једињења као што су деривати бензена са једном карбоксилном и две хидроксилне групе су умерено растворљива у НК-СО₂. Јако поларна једињења као што су она са једном карбоксилном и две или више хидроксилне групе су једва растворљива у НК-СО₂.

Табела бр. 2.4.2 *Растворљивост биљних компоненти у НК-СО₂*

Веома растворљиве	Умерено растворљиве	Скоро нерастворљиве
Неполарна и слабо поларна једињења; Молекулске масе (<250); Нпр. монотерпени, сесквитерпени, тиоли, пир-азини, тиазоли, сирћетна киселина, ацетати, бензалдехид, хексанол, глицерол	Молекулске масе (<400); Нпр. супституисани терпени и сесквитерпени, вода, олеинска киселина, глицерол, деканол, засићени липиди до С ₁₂	Молекулске масе(>400); Нпр. шећери, протеини, танини, смоле, неорганске соли, хлорофил, каротеноиди, лимунска кис., јабучна кис., аминокис., нитрати, пестициди, инсектициди, глицин итд.

2.4.2. Предности и недостаци надкритичне екстракције

НКЕ се показала као један од најбољих поступака за издвајање активних компоненти из биљног материјала важних за људску исхрану и фармацеутску индустрију, пре свега што се овим поступком добијају екстракти без трагова растварача, што није случај са конвенционалним начинима екстракције.

Екстракција органским растварачама има низ мана које се односе на негативан утицај на животну средину и здравље људи (емисија летљивих органских једињења, емисија супстанци које оштећују озонски омотач). Поред нежељеног остатка органског растварача у екстракту, ту је и недовољна селективност органских растварача. Растворљивост компоненти (растворка) у надкритичном флуиду је слична растворљивости растворка у органским растварачима, међутим надкритични флуиди имају већу дифузивност, мању вискозност и мањи површински напон од органских растварача што утиче на краће време процеса и мању потрошња растварача (Бабовић, Н. 2010 ; Wang L. и сар., 2001).

С друге стране, технологије које се заснивају на примени надкритичних флуида су, због релативно великих инвестиционих улагања у поређењу са процесима који се изводе на ниским притисцима, и поред чињенице да се њиховом применом добијају производи са изузетним карактеристикама у погледу квалитета, све више ограничене на оне процесе који дају производе високе додатне вредности. Изузетак су индустријска постројења за НКЕ кафе, чаја или хмеља у којима се обрађују велике количине материјала. У пракси се показало да се капитална инвестициона улагања могу значајно смањити изградњом постројења већих производних капацитета, код којих ће се производити различити финални производи, наравно само у случајевима када не постоје превише строги захтеви у погледу финалног производа (као код производње фармацеутских препарата) (Скала, Д. и сар., 2002).

2.5. Моделовање процеса

2.5.1. Механизам и кинетика процеса хидродестилације

Када се користи принцип воде и водене паре препорука је да се дестилишу супстанце које :

- се не растварају у води,
- имају до 15 или максимално 20 угљеникових атома,
- довољно су стабилне да издрже температуру ≥ 100 °С,
- хемијски не реагују са водом.

Поступак дестилације биљке рода *Thymus* није само обичан пренос једињења из биљног материјала у етарско уље. Исто важи и за остале биљне врсте. Током дестилационог процеса долази до хемијских реакција, од којих су хидролиза и оксидација две најчешће реакције.

Раулов закон се примењује код течних немешљивих смеша компоненти, док се за парну смешу примењује Далтонов закон. У случају немешљивости, компоненте у смеси увек испољавају сопствене напоне пара изнад течне фазе, за одређену температуру система пара-течност.

Парцијални притисак компоненте у парној фази према Рауловом закону изражава се једначином:

$$p_k = P_k^{\dot{}} x_k \quad (2.5.1)$$

Где су: p_k - парцијални притисак k -те компоненте, $P_k^{\dot{}}$ - напон паре чисте k -те компоненте, x_k - молски удео k -те компоненте у течној фази.

На атмосферском притиску код смеша важи :

$$P_z = P_{atm} = \sum p_k = \sum_{k=1}^n P_k^{\dot{}} x_k \quad (2.5.2)$$

За случај немешљивих компоненти важи:

$$p_k = P_k^{\dot{}} x_k = P_k^{\dot{}} \mathbf{1} = P_k^{\dot{}} \quad (2.5.3)$$

Из једначине (2.5.3) проистиче да је укупни притисак изнад течне смеше једнак збиру напона пара немешљивих компоненти:

$$P_{atm} = \sum_{k=1}^n P_k^{\dot{}} \quad (2.5.4)$$

Збирно за воду и етарско уље као n-компонентну смешу имамо:

$$P_{atm} = \sum_{k=1}^n P_k^{\dot{}} + P_v^{\dot{}} \quad (2.5.5)$$

Где је ; $P_v^{\dot{}}$ – напон паре воде ; Како је етарско уље вишекомпонентна смеша, можемо је представити са његовим напоном паре који је једнак збиру напона садржаних компоненти, једначина (2.5.5) добија облик:

$$P_{atm} = P_{eu}^{\dot{}} + P_v^{\dot{}} \quad (2.5.6)$$

Парцијални притисак компоненте k у пари према Далтоновом закону једнак је : $p_k = y_k P$; где је y_k - молски удео k -те компоненте у парној фази, а збирни (укупни) притисак за отворени систем је:

$$P_{atm} = \sum_{k=1}^n p_k = P \sum_{i=1}^n y_k \quad (2.5.7)$$

За етарско уље посматрано као псеудокомпоненту и воду имамо:

$$P_{atm} = P y_{eu} + P y_v = P(y_{eu} + y_v) \quad (2.5.8)$$

Далтонов-Раулов закон за етарско уље и воду можемо сада приказати као:

$$P(y_{eu} + y_{H_2O}) = P_{eu}^{\ddot{}} + P_v^{\ddot{}} \quad (2.5.9)$$

Односно као : $P_{eu}^{\ddot{}} = P y_{eu}$ и $P_v^{\ddot{}} = P y_v$ (2.5.10)

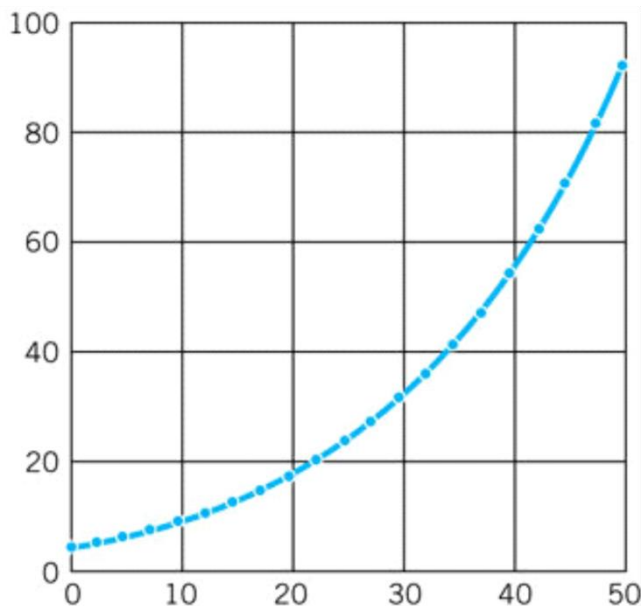
Из једначина следи да у процесу дестилације две немешљиве течности које су међусобно нерастворне и не реагују хемијски, њихов удео у смеси паре се израчунава као производ њихових парцијалних притисака и молекулске тежине :

$$\frac{n_{eu} (u\ part)}{n_v (u\ part)} = \frac{P_{eu}^{\ddot{}}}{P_v^{\ddot{}}} \text{ односно ; } \frac{\frac{m_{eu}}{M_{eu}}}{\frac{m_v}{M_v}} = \frac{P_{eu}^{\ddot{}}}{P_v^{\ddot{}}} \text{ односно ; } \frac{m_{eu}}{m_v} = \frac{M_{eu}}{M_v} \frac{P_{eu}^{\ddot{}}}{P_v^{\ddot{}}} = \mathbf{const.} \quad (2.5.11)$$

где су n – број молова, M – моларна маса, m – маса

Крива напона паре воде дата је на слици 2.5.1.1.

Експериментално је доказано да однос $\left(\frac{m_{eu}}{m_v}\right)$ нагло опада у току дестилације, што упућује да се састав етарског уља мења и да претпоставку о етарском уљу као псеудо-компоненти треба узети са великим опрезом. Претпоставка да компоненте етарског уља нису мешљиве или су слабо мешљиве са водом је тачна. Претпоставља се да се компоненте



Слика бр. 2.5.1.1 Крива напона паре воде

етарског уља понашају по Рауловом закону, а да је парцијални притисак (напон паре) етарског уља једнак збиру парцијалних притисака компоненти које га чине. Због тога је напон паре етарског уља променљив, јер са протоком времена смањује се концентрација лако испарљивих компоненти, али и део “заробљеног“ етарског уља заосталог у неразореним секретационим структурама споро дифундује из унутрашњости биљног материјала ка површини и на тај

начин утиче на расподелу компоненти између фаза чврсто-течно и течно-пара.

Међутим на дифузију и испаравање етарског уља утичу и други параметри процеса хидро дестилације (температура, притисци, време дестилације, конструкциона геометрија уређаја и др.) и због тога, количина и састав издвојеног етарског уља из одређене биљне сировине (врсте) зависе од комплексног технолошког поступка.

Поједини истраживачи су користили модел заснован на другом Фиковом закону усвајајући да је дифузија кроз честицу ограничавајући ниво, за познате геометријске форме (плоча, цилиндар и/или сфера) у циљу описа кинетике хидродестилације етарског уља из разних биљних материјала, као што су: надземни део цитронела (Cassel, E. и Vargas, F., 2006) и рузмарина (Boutekedjiret, C. и cap., 2005), семе кориандера (Benyoussef, H. и cap., 2002). Ови физички модели засновани су на нестационарној дифузији кроз биљни материјал. Узета је претпоставка да је етарско уље хомогено и истог састава за све биљне материје, и да се етарско уље “скида“ са површине честица паром, тако да је његова концентрација на површини честица готово занемарљива. Benyoussef, H. и cap., 2002 су користили нумерички приступ и друге граничне услове у циљу решавања парцијалне диференцијалне једначине другог Фиковог закона за случајеве сферног облика честица. Остали истраживачи (Boutekedjiret, C. и cap., 2005; Cassel, E. и Vargas, F. 2006) су користили аналитичка решења ове парцијалне диференцијалне једначине. Ослањајући се на други Фиков закон, изведена је једначина (2.5.12) за претпостављени модел (Boutekedjiret, C. и cap., 2005):

$$\frac{q}{q_{\infty}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} e^{-(2n+1)^2 \pi^2 \frac{D_{ekd}}{L^2} t} \quad (2.5.12)$$

где су ; q и q_{∞} - приноси етарског уља у било ком тренутку t ; L – дебљина равне плоче; D_{ekd} - ефективни коефицијент дифузије етарског уља. Однос $\frac{D_{ekd}}{L^2}$ се рачуна минимизирањем суме квадрата одступања од експериментално добијених података и вредности израчунатих путем модела. За минималне вредности $\frac{q}{q_{\infty}}$ може се једначина (2.5.12) написати у облику :

$$\frac{q}{q_{\infty}} = \frac{4}{\pi^{1/2}} \frac{D_{ekd}^{1/2}}{L} t^{1/2} \quad (2.5.13)$$

Када $\frac{q}{q_{\infty}}$ достигне у каснијем периоду граничну вредност $\frac{q}{q_{\infty}} = 1$, једначина (2.5.12) се своди на члан за $n=0$:

$$\frac{q}{q_{\infty}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} e^{-\pi^2 \frac{D_{ekd}}{L^2} t} \quad (2.5.14)$$

Коришћењем једначина (2.5.13) и (2.5.14) уместо једначине (2.5.12) могу се релативно поуздано израчунати приноси етарског уља. Релативна грешка израчунавања $\frac{q}{q_{\infty}}$ не прелази 0,1 % за $\frac{q}{q_{\infty}} \leq 0,5$ и $\frac{q}{q_{\infty}} \geq 0,5$ респективно (Boutekedjiret, С. и сар., 2005).

Осим наведеног модела коришћени су и:

Упрошћени модели засновани на нестационарној дифузији. Пример модела за водену дестилацију (Morin, Р. и сар., 1985) а за парну дестилацију (Hanci и сар., 2003). Ови модели узимају у обзир низ претпоставки. Принос етарског уља се посматра као аналогича логаритамског закона, $-\frac{dq_t}{dt} = k_v q_t$ (2.5.15) што подразумева да екстракција следи псеудо кинетику првог реда у односу на заостало етарско уље у биљном материјалу; где су q_t – садржај уља у биљном материјалу у било ком тренутку t , а k_v – константа брзине. Иначе константа брзине се може израчунати као нагиб зависности $-\ln \frac{q_{\infty}-q}{q_{\infty}}$ од времена t . Модел су успешно примењивали (Koul, К. и Babu, D. 2007), (Sowbhagya, В. и сар., 2008),

Модел заснован на дифузији етарског уља (Benyoussef, Н. и сар., 2002),

Модел заснован на линеарној погонској сили преноса масе (Romdhane, М. и Tizaoui, С. 2005),

Модел са неразореним и разореним биљним ћелијама (Sovova, Н. и Aleksovski, А. 2006). Једначина коришћена за овај модел садржи две временске константе од којих већа по вредности одговара унутрашњој дифузији кроз биљни материјал:

$$\frac{q}{q_{\infty}} = 1 - f \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) - (1-f) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (2.5.16)$$

Параметри модела f , T_1 и T_2 се рачунају фитовањем једначине (2.5.16) са експериментално добијеним односом $\frac{q}{q_\infty}$ и минимизацијом суме квадрата одступања од експериментално добијених и израчунатих вредности. Овај модел су користили (Sovova, H. и Aleksovski, A. 2006) приликом издвајања етарског уља из тимијана.

Модел заснован на термичком излуживању уља и преносу масе уља у парној фази (Серга и сар., 2008).

2.5.2. Механизам и кинетика екстракције са органским растварачима

Процес екстракције са органским растварачима одвија се у више фаза: (а) квашење биљног материјала, спирање и растварања екстрактивних материја са површине разорених ћелија и судова, (б) продирање растварача у неразорене ћелије и секреторне судове уз истовремено растварање материја, (ц) преношење екстрактивних материја кроз мембрану ћелија из унутрашњости неразорених ћелија и секреторијских судова до површине честица биљног материјала и (д) преношење екстрактивних материја са површине честица биљне сировине у масу растварача.

Материјал ћелијских зидова одликује се дифилним својствима, при чему је хидрофилност изражена у много вишем степену него хидрофобност. Растварач продира у капиларе биљног ткива и попуњава ћелије и друге шупљине. Услед присуства ваздуха у капиларама и ћелијама биљног материјала, време продирања може бити веома велико. Истовремено се продирањем растварача у биљна ткива, одиграва и процес квашења, који зависи од хемијске сличности екстрактивних материја и растварача. Површински активне супстанце побољшавају процес квашења и продирања растварача у биљним ткивима (Ponomarev, D. 1976).

Пренос масе унутар биљне матрице укључује дифузију екстрактивних материја кроз ћелијски раствор и омотач, а брзина преноса масе зависи од броја и величина пора у ћелијском омотачу (састоји се од мембране ћелије и ћелијског зида). Дебљина ћелијског омотача зависи, пре свега, од врсте биљке и биљног органа. Поре, по правилу, раздвајају

ћелију једну од друге или их одвајају од околине. Процес дифузије кроз поре зида је одређен дебљином и бројем пора у зиду. Узимајући у обзир малу величину микропора и капилара у ћелијском зиду, пренос масе може се поредити са преносом масе кроз полупропустљиве мембране. Брзина екстракције чврсто-течно је обично лимитирана дифузијом екстрактивних материја кроз унутрашњост честица биљног материјала (чврста фаза), док је растварање екстрактивних материја у растварачу брз процес, који не утиче на брзину укупног процеса.

Дифузиони процеси екстракције се описују једначинама преноса масе (Beloborodov, B. 1960):

$$\frac{dm}{dP d\tau} = kdc ;$$

где су m – количина биљне масе која се екстрахује, P – површина, τ – време, c – концентрација материје која се екстрахује и k – коефицијент преноса масе.

На повећање дифузије у чврстој фази може се утицати уситњавањем биљне сировине у циљу повећања степена разарања биљних ћелија и скраћивања пута екстрактивних материја кроз честице. Ако је пак, дифузија екстрактивних материја са површине честице ка маси раствора лимитирајући фактор, онда је потребно обезбедити довољно интензивно мешање суспензије (Величковић, Д. 2007).

Математички опис процеса преноса масе екстрактивних материја из унутрашњости честица биљног материјала у екстракт код екстракције чврсто-течно је изузетно сложен. Математички опис и анализа екстракције чврсто-течно значајно се поједностављује применом упрошћених физичких модела. У пракси се у циљу поједностављена математичког описа и анализе екстракције чврсто-течно користи математички модел заснован на нестационарној дифузији екстрактивних супстанци у биљном материјалу који је детаљно описали (Treybal, E. 1968) и (Crank, J. 1975) а који су касније користили бројни аутори (Škerget и сар. 2010; Hojnik, M. и сар., 2008; Şaşmaz, A. 1996). У току екстракције чврсто-течно, дакле, долази до промене градијента концентрације екстрактивних материја са временом. Брзина промене концентрације екстрактивних материја при нестационарној дифузији, под условом да се не одиграва хемијска реакција,

описује се коришћењем другог Фиковог закона који је изражен општим и развијеним обликом следећих једначина:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (2.5.2.1)$$

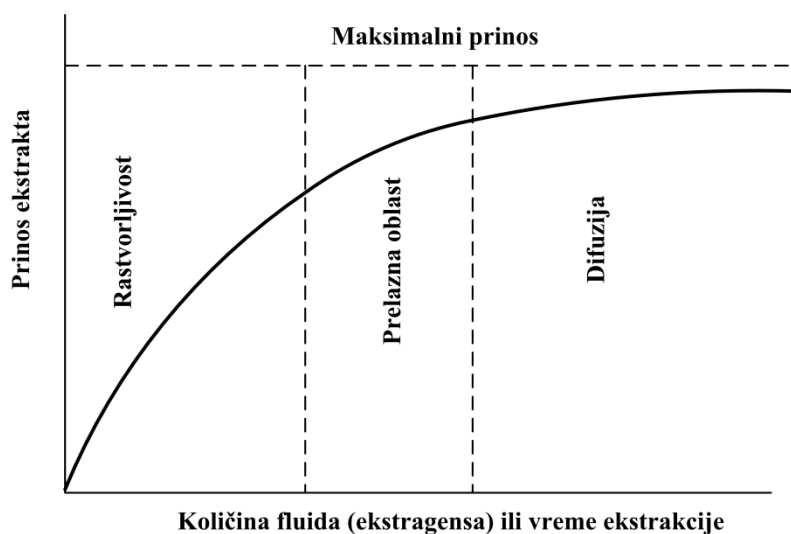
$$\frac{\partial c}{\partial t} + V_x \frac{\partial c}{\partial x} + V_y \frac{\partial c}{\partial y} + V_z \frac{\partial c}{\partial z} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \quad (2.5.2.2)$$

где је: D - дифузиони коефицијент, а $x \equiv r$ - радијус биљне честице (уз апроксимацију да су честице биљног материјала сфере), c – концентрација материје, t – време, V – брзина тока течности, x, y, z – правци x, y, z .

У литератури се, такође, могу наћи подаци о примени модела заснованог на теорији филма који узима у обзир и пренос масе у фази испирања екстрактивних материја са површине разорених биљних ћелија, као и модел Пономарјева који нема физичку основу и представља само математички опис промене количине екстрактивних материја у биљној сировини у периоду споре екстракције (Величковић, Д. 2007 ; Вељковић, В. и Миленовић, Д. 2002; Пономарјев, Д. 1976).

2.5.3. Механизам и кинетика процеса надкритичне екстракције

Брзина НКЕ у почетној фази екстракције зависи од равнотеже фаза (растворљивост датих компоненти) на датом притиску и температури (екстракциона крива је линеарна) (слика бр. 2.5.3.1). Након одређеног времена, екстракциона крива добија конвексни облик услед промене отпора преносу масе (услед повећања утицаја дифузије кроз чврсту фазу). На крају процеса екстракције, брзина зависи само од дифузије кроз чврсту порозну фазу. Механизми дифузије могу, у неким случајевима, бити веома сложени у зависности од супстрата који се екстрахује (Lee, M. и Mafkides, K. 1990).



Слика бр. 2.5.3.1 Типична зависност приноса екстракта у функцији времена екстракције или количине утрошеног растварача (адаптирано према Lee, M. и Mafkides, K. 1990)

Уколико је контролишући степен процеса спољашњи пренос масе или равнотежа фаза, брзина екстракције подешава се правилним избором протока НК CO_2 . У већини случајева, кад је дифузија у порозној структури биљног материјала, односно дифузија кроз чврсто, најспорији степен, степен уситњености и бубрење биљног материјала има кључну улогу (Reverchon i De Marco, 2006; Стаменић и сар., 2010; Жижовић и сар., 2008).

Заједно са истраживањима у области НКЕ, развијани су и математички модели за описивање ових процеса. Према приступу процесу НКЕ, модели могу бити емпиријски

(Kandiah, M. и Spiro, M. 1990), засновани на аналогiji преноса топлоте и преноса масе (Hong и сар., 1990; Reverchon, E. и сар., 1994, 1993) или на интеграцији диференцијалног биланса масе за екстрактор (Reverchon, E. 1996; Roy, C. и сар., 1996; Sovova, H. и сар., 1994a,b,c).

Последњих година је развијено више математичких модела за процесе НКЕ како етарских, тако и биљних уља уопште. Сви они се заснивају на решавању диференцијалног материјалног биланса за екстрактор, а највећи број модела као наспорији степен екстракционог процеса узима дифузију у унутрашњости честице. Bartle, D. и сар. (1990) су увели модел екстракције 1,8-цинеола из листа рузмарина који је заснован на аналогiji са преносом топлоте. По овом моделу, све честице биљног материјала се сматрају сферама и једначине којима се описује хлађење "вреле кугле" користе се да би се описао профил концентрација унутар честица током времена. Сличан приступ су усвојили Reverchon, E. и сар. (1993, 1994). Модел који су предложили Reverchon, E. и сар. (1993), примењен на НКЕ из листа рузмарина, босиљка и мајорана, укључивао је претпоставку да је етарско уље смештено у унутрашњем делу листа, а да се воскови налазе на површини листа. Након млевења, честице биљног материјала се посматрају као сфере. Модел описује пренос масе између једне сферичне и порозне честице и надкритичног растварача. Екстракциони процес је описан следећим узастопним процесима: дифузија надкритичног растварача кроз филм око чврсте честице, продирање и дифузија кроз честицу, растварање растворка у надкритичном флуиду, дифузија растворка и растварача кроз честицу и затим кроз филм око честице до масе флуида.

Reverchon, E. (1996) је развио модел и за НКЕ етарског уља из листа жалфије. Претпостављено је да је етарско уље смештено у вакуолама унутар ћелија, тако да је фракција слободно доступног уља на површини честица занемарљива. Сходно томе, коефицијент спољног преноса масе је занемарен. Goto, M. и сар. (1993) су развили модел заснован на локалној адсорпционој равнотежи етарског уља на липидима биљног листа и применили га на НКЕ листа менте.

У литератури се код моделовања процеса НКЕ етарских и масних уља често користи модел који је предложила Sovova, H. (1994a). Овај модел подразумева клипно протицање флуида кроз паковани слој биљног материјала, при чему је претпостављено да

су честице истих димензија и да је растворак подједнако распоређен у биљном материјалу у биљним ћелијама чији је садржај заштићен зидовима. На основу овог модела процес екстракције обухвата три периода екстракције; период брзе екстракције у коме се екстрахује лако доступна фракција уља ослобођена из млевењем разорених биљних ћелија (брзина екстракције лимитирана је растворљивошћу датих компоненти на датим условима притиска и температуре), прелазни период у коме брзина екстракције поред растворљивости почиње да бива лимитирана и дифузијом у чврстој фази, и период споре екстракције у коме је брзина одређена само дифузијом раствора у чврстој фази (екстракција теже доступне фракције уља из неразорених ћелија).

[Sovova, H. \(2005\)](#) је увела нови модел за НКЕ природних производа, заснован, такође, на концепту нетакнутих и разорених уљних ћелија, са два екстракциона периода; у току првог периода брзина екстракције је лимитирана растворљивошћу лако доступног раствора у надкритичном растварачу, док у другом периоду, укупну брзину процеса одређује дифузија унутар честице. Модел даје детаљан приказ првог периода за различите типове фазне равнотеже и различите протоке растварача. Број параметара модела је од 4 до 7 у зависности од сложености процеса. [Goodarznia, I. и Eikani, M. \(1998\)](#) су развили тропараметарски модел. Параметри су коефицијенти преноса масе, аксијалне дисперзије и дифузије унутар честице. Последњи коефицијент је параметар за „фитовање“ модела, док се прва два предсказују применом експерименталних корелација. Модел је примењен на експерименталне податке надкритичних екстраката босиљка, рузмарина и мајорана ([Reverchon, E. и сар. 1993](#)). [Reis-Vasco и сар. \(2000\)](#) су развили два модела за НКЕ етарских уља из метвице (*Mentha pulegium L.*). Аутори су претпоставили да се део етарског уља налази у glandularним трихомима на површини листа, а део у унутарњој структури листа. Модел узима у обзир десорпцију етарског уља лоцираног близу површине листа и отпор преносу масе при екстракцији уља из унутрашње структуре листа. Други модел је укључио и аксијалну дисперзију. Симулације су извршене за различите односе количина уља смештеног у трихомима и у унутрашњости листа. [Gaspar, F. и сар. \(2003a\)](#) су развили модел, који је укључио плочасту геометрију биљног материјала и локацију етарског уља у glandularним трихомима. Међутим, само понашање трихома током екстракције и пренос масе из конкретне секреторне структуре није узето у обзир. [Gaspar, F. и сар. \(2003b\)](#) су увели метод за разарање трихома брзом CO₂ декомпресијом као врсту предтретмана за

НКЕ. Недостатак ове методе је то што брза декомпресије, због свог утицаја на опрему и велике потрошње енергије, није пожељна операција у индустријским условима. Развој физиологије биљака, као и експерименталних техника за изоловање секреторних структура и њиховог садржаја, омогућио је прецизнији увид у структуру биљног материјала, тј. у врсту, облик и димензије секреторних структура у којима се налазе етарска уља.

Захваљујући томе, данас, се отишло корак даље у моделовању и оптимизацији, као и опису феномена, пре свега преноса масе, који се дешавају током процеса НКЕ (Стаменић, М. и сар., 2008, 2010; Жижовић, И. и сар., 2005, 2007а,б). Концепт моделовања на нивоу секреторних структура, који је детаљно описан у литератури новијег датума (Стаменић, М. и сар., 2008; Жижовић, И. и сар. 2005), узима у обзир изотермне и изобарне услове, константни проток CO_2 , као и постојање аксијалне дисперзије НК CO_2 у екстрактору. У овом моделу, као и код модела Sovove, Н. (1994а), екстракт који се налази у одговарајућим секреторним структурама (гландуларни трихоми, секреторне цевчице, канали и ћелије) апроксимиран је псеудокомпонентом. У новијој литератури је, такође, на основу понашања одговарајућих секреторних структура током процеса НКЕ и резултата моделовања, извршена класификација биљног материјала на основу доминирајућег отпора преносу масе током екстракционог процеса (Стаменић, М. и сар., 2008; Жижовић, И. и сар. 2006). С тим у вези, показало се да је брзина НКЕ код биљака са секреторним каналима и шупљинама (Жижовић, И. и сар., 2007б), лимитирана брзином спољашњег преноса масе, док је код биљних врста чији су секундарни метаболити складиштени у секреторним ћелијама укупна брзина НКЕ процеса лимитирана дифузијом у чврстој фази (Жижовић, И. и сар., 2007а). Код НКЕ биљака *Lamiaceae* у којима се етарско уље налази у гландуларним трихомима, на укупну брзину процеса екстракције утичу спољашњи пренос масе у периоду брзе екстракције, односно дифузија у чврстој фази у периоду споре екстракције (Стаменић, М. и сар., 2008, 2010; Жижовић, И. и сар., 2005).

Емпиријско моделовање

Емпиријски модели настају из експерименталних података и могу бити корисни уколико подаци о механизму преноса масе и равнотежи нису доступни. Њихов значај је

мали за процесне услове који превазилазе оквире експерименталних, јер ови модели практично представљају само интерполацију експерименталних резултата (Reverchon, E. и De Marco, 2006). При емпиријском моделовању процеса НКЕ коришћене су две врсте емпиријских формула, прва, Лангмуир-овог типа која је дата једначином (2.5.3.1):

$$Y = \frac{Y_{\infty}t}{B+t} \quad (2.5.3.1)$$

и друга, типа кинетике првог реда дата једначином (2.5.3.2):

$$\frac{dq_{rs}}{dt} = -kq_{rs} \quad (2.5.3.2)$$

где је t - време, Y - принос, k - кинетичка константа, B - константа, и q_{rs} - преостала количина екстракта у честици биљног материјала (Жижовић, И. 2009).

Моделовање засновано на аналозији са преносом топлоте

У овом случају, процес надкритичне екстракције се посматра кроз феномене преноса топлоте, при чему се свака честица биљног материјала посматра као загрејана сфера која се хлади у медијуму униформног састава. Претпоставке су да је материја која се екстрахује равномерно распоређена у честици и да се све честице у истом тренутку налазе на истим условима екстракције (Bartle, D. и сар., 1990 ; Hong и сар., 1990 ; Reverchon, E. и сар., 1993, 1994).

Применом другог Фиковог закона дифузије (једначина 2.5.2.1), масени биланс за једну честицу сферног облика може се написати на следећи начин:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{D}{r^2} \frac{\partial (r^2 \frac{\partial q}{\partial r})}{\partial r} \quad (2.5.3.3)$$

Коришћењем аналогije између преноса топлоте и масе, и након Фуријеових трансформација, (Жижовић, И. 2009), може се дефинисати материјални биланс за честицу биљног материјала:

$$\frac{q}{q_0} = \left(\frac{6}{\pi^2} \right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D t}{r^2} \right) \quad (2.5.3.4)$$

где је: n - цео број, r - пречник сфере, D - коефицијент дифузије у сфери или унутрашњи ефективни коефицијент дифузије, t - време екстракције, q - преостала концентрација раствора у сфери и q_0 , почетна концентрација материје која се екстрахује.

Главни недостатак модела по аналогiji са преносом топлоте је претпоставка о истим условима екстракције кроз цео слој биљног материјала. Концепт емпиријског и моделовања заснованог на аналогiji са преносом топлоте је напуштен релативно брзо, да би се скоро у потпуности прешло на концепт решавања диференцијалног масеног биланса за екстрактор.

Моделовање засновано на интеграцији диференцијалног масеног биланса

Концепт моделовања базираног на решавању диференцијалног масеног биланса за екстрактор је, данас, најшире примењен облик моделовања процеса НКЕ из биљног материјала. Заснован је на постављању диференцијалног масеног биланса за део екстрактора и његовој интеграцији за цео екстрактор. Основне претпоставке модела заснованих на интеграцији диференцијалног масеног биланса су константна густина растварача и проток надкритичног флуида кроз слој честица, занемарљива аксијална дисперзија, као и апроксимација којом се етарско уље може окарактерисати особинама једне, изабране псеудокомпоненте (Жижовић И. и сар. 2005).

Узимајући у обзир ове претпоставке могуће је написати једначине материјалног биланса за диференцијални део екстрактора (2.5.3.5) и чврсту фазу (2.5.3.6):

$$uV \frac{\partial c}{\partial h} + \varepsilon V \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \varepsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad (2.5.3.5)$$

$$(1 - \varepsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = -A_p K (q - q^*) \quad (2.5.3.6)$$

где је ε - порозност слоја, V - запремина екстрактора, c - концентрација екстракта у надкритичном флуиду, q - концентрација екстракта у чврстој фази, u - привидна брзина струјања флуида, A_p - укупна површина честица, q^* -равнотежна концентрација на граници фаза чврсто-флуид, K - коефицијент преноса масе кроз честицу, t - време и h - просторна координата екстрактора.

Имајући у виду и масени биланс за једну честицу сферног облика (једначине 2.5.3.3 и 2.5.3.4), могуће је добити и профил концентрација унутар честица. Познавајући почетне и граничне услове, као и услове равнотеже, једначине (2.5.3.5) и (2.5.3.6) се могу решити погодном нумеричком методом.

2.6. Мајкина душица (*Thymus serpyllum* L.)

2.6.1. Традиционална употреба мајкине душице

Мајкина душица (*Thymus serpyllum* L.) је вишегодишна зељаста биљка грмоликог облика, врло јаког ароматичног мириса. Припада породици уснатица (лат. Lamiaceae). Расте као пузећи грм на сушној подлози, најчешће поред путева, по пашњацима, ливадама и шумама. Стабљика је висине од 20 до 30 cm. Листови су ситни, од 0,5 до 1,5 cm, јајасте, округли, по ободу цели, са кратком дршком и длакави (то су жлездане длаке богате етарским уљем). Биљка цвета током целог лета, цветови су скупљени у густе округласте цвасти и слични су цветовима тимејана, белоружичасте или љубичастоцрвене боје, ситни и двоуснати, јаког и угодног мириса.



Thymus serpyllum L.

Као дрога се користи надземни део биљке - *Serpylli herba*. Свежа херба се користи за екстракцију етарског уља, а сува се користи сама или као саставни део чајних мешавина и има велику употребу у народној медицини. Дрога садржи око 1% етарског уља које, као и уље тимејана, садржи феноле али више карвакрола, монотерпен цимен, затим 5% танина, извесну количину горких материја, соли, киселина и мало сапонозида (Туцаков, Ј. 1990).

Мајкина душица припада роду *Thymus* који у свету обухвата око 300-400 врста, са великим бројем подврста, варијетета, субваријетета и форми, а у флори Србије заступљена је 31 врста овог рода (Сарић, М. 1989). Представља омиљени лек не само у народној него и научној медицини. Улази у састав великог броја биљних препарата који се израђују било у апотекама било у фармацеутској индустрији због својих фармаколошких својстава.

Лековити састојци налазе се једино и искључиво у листу и цвету мајкине душице, врло су непостојана једињења која се нестручним брањем, сушењем и чувањем могу потпуно изгубити. Назива се још бабја душица, бабина душица, врисак, дивљи босиљак, тамјаника, материнка, паприц, буковица, ливадски или пољски тимијан. Мајкина душица је врло добра паша за пчеле, а повремено се у плитку зделицу ставља пред пчелињак чај од мајкине душице, заслађен медом. Ова биљка је од велике помоћи у хладним и влажним јесењим данима, када владају прехладе и вирусна грипа. Управо зато понекад се назива “сиротињским антибиотиком”. Мајкина душица је била позната још код старих Египћана; користили су је као компоненту у средству за балзмовање због њених својстава конзерванса. Има разноврсну примену у медицини, фармацији, прехранбеној и козметичкој индустрији, затим у индустрији алкохолних и безалкохолних напитака, индустрији боја и лакова (Бабовић и сар., 2013б). Садржи етарско уље које показује фунгицидно, антисептичко и антиоксидативно дејство. Мајкина душица улази у састав лековитих препарата за лечење дисајних и пробавних органа, као и уринарног тракта. Користи се као зачин, конзерванс и антисептичко средство. Ставља се често у зачинску мешавину провансалске траве. Етарско уље из хербе се користи у парфемима, сапунима и пастама за зубе.

Мајкина душица има својства аналгетика, антхелминтика, антиреуматика, антисептика, антиспазмолитика, антитоксика, антивирала, бактерицида, карминатива, диафоретика, диуретика, експекторанса, фунгицидала, рубефациента, стимуланта, тоника, ароматика и седатива. Код нас се мајкина душица вековима употребљава, пре свега као лек за лечење пробавних органа. Употребљава се против цревних паразита, а нарочито против дечјих глиста. Служи за растварање и излучивање слузи, као дезинфекцијско средство, против кашља, хрипавца, бронхијалног катара, за јачање желуца и живаца, као врло делотворан напитака код обољења желуца и црева, нарочито смањује желудачне грчеве, код несанице одраслих (и деце, у мањој количини), код неурастеничне вртоглавице, код шкрофулозе, бледоће и слабокрвности. За масажу код реуме, уганућа, згњеченог ткива, код отеклина, код псоријазе у облику купки, зацељује ране, за болести очију, за инхалацију, код лечење алкохолизма, болести плућа и дисајних органа, цревних паразита, дијареје, надимања, неуредне менструације.

Савремена наука је доказала присутност низа лековитих једињења које оправдавају употребу мајкине душице. Међу њима су најважнија етарска уља, тимол, карвакрол, горке твари, флавоноиди. Британска хербална фармакопеја (*енгл. British herbal pharmacopoeia*) уврстила је мајкину душицу у лековите биљке и у индикацијама за употребу навела обољења у којима се та биљка препоручује: бронхитис, бронхијални катар, упала грла, а посебно истакнула да је корисна за лечење великог кашља (Wichtl, M. 1994).

2.6.2. Хемијски састав етарског уља и екстракта мајкине душице

Садржај етарског уља мајкине душице варира у великој мери у зависности од порекла и начина добијања и креће се у распону приближно од 0,1 до 0,6% (Wichtl, 1994), или између 0,1 и 1% (Evans, C. 2000). На хемијски састав и принос етарског уља хербе мајкине душице утиче географско порекло, фаза развоја биљке, време бербе, станиште и климатски услови где врста расте. Хемијски полиморфизам је карактеристичан за биљке које припадају роду *Thymus*, и могу се разликовати гераниолни, гермакрен-Д, цитрални, линалоолни, (Е)-кариофиленски, α -терпинилацетатни, карвакролни, тимолни и многи други хемотипови.

Постоји много објављених радова о хемијском саставу етарског уља из биљака које припадају роду *Thymus*, међутим само неколико студија се бавило испитивањем хемијског састава етарског уља мајкине душице (Станисављевић, М. и сар., 2012; Ahmad, M. и сар., 2006; Raal, A. и сар., 2004; Ummihan, U. и сар., 2008; Hussain, I. и сар., 2013; Kulisić, T. и сар., 2005; Банаева, А. и сар., 1999; Петровић, С. и сар., 2013).

Одређивање садржаја етарског уља мајкине душице пореклом из Србије са падина Копаника, показало је да етарско уље садржи висок проценат сесквитерпена (60,5%), док је садржај монотерпенских компоненти био знатно нижи (37,9%). Доминантна компонента из класе сесквитерпена био је *trans*-кариофилен (27,7%), а затим и γ -муролен (10,5%), α -хумулен (7,5%), β -бисаболол (2,6%) и *trans*-неролидол (2,4%) (Станисављевић, М. и сар., 2012).

2.6.3. Антиоксидативна активност етарског уља и екстракта мајкине душице

Према литературним подацима постоје два објављена рада о испитивању антиоксидативне активности етарског уља мајкине душице пореклом из Пакистана (Hussain, I. и сар., 2013) и пореклом из Хрватске (Кулишић, Т. и сар., 2005). Етарско уље *T. serpyllum* пореклом из Хрватске (Кулишић, Т. и сар., 2005) показало је слабију способност да неутралише ДРНН радикале од ВНА, ВНТ, токоферола, аскорбинске киселине и етарског уља *T. vulgaris*. Такође, етарско уље *T. serpyllum* пореклом из Пакистана (Hussain, I и сар., 2013) показало је слабију способност да неутралише ДРРН радикале од ВНТ и тимола.

У прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији најчешће се користе следећи синтетски антиоксиданси:

1) Бутиловани хидроксианизол (ВНА, Е 320) представља смешу изомера 2-*tert*-бутил-4-хидроксианизола (15%) и 3-*tert*-бутил-4-хидроксианизола (85%). ВНА је бела кристална супстанца, липофилан и нерастворан у води користи се у житарицама, животињским мастима, биљним уљима, кромпирима, сувим квасцима, жвакаћим гумама, пекарским и месним производима.

2) Бутиловани хидрокситолуен (ВНТ, Е 321) је бела кристална супстанца, слична ВНА с којим показује добар синергизам. Мање је термички отпоран од ВНА.

3) *Tert*-бутилхидрохинон (ТВНҚ, Е 319) је смеђи пудер, најделотворнији је за већину масти и уља, користи се за стабилизацију високо незасићених биљних уља, и

4) Естри галне киселине, галати (Е 310 - Е 312), на пример пропилгалат (РГ, Е 310) - бела кристална супстанца, користи се за стабилизацију животињских масти и биљних уља, али није препоручљив код пржења при температурма већим од 190 °С јер веже јоне гвожђа.

Синтетски антиоксиданси су присутни у многим производима и имају улогу адитива јер штите производ од оксидације. Након појаве синтетских антиоксиданаса у прехранбеној индустрији често се наметало питање њихове сигурности по здравље човека. Због токсиколошких разлога прекомерна употреба синтетских антиоксиданаса је доведена у питање, а захтеви потрошача су усмерени ка коришћењу природних (Бабовић, Н. и Петровић, С. 2011; Yanishlieva, V. 2001; Орчић, Д. и сар., 2011). Фенолни монотерпеноид у

етарском уљу мајкине душице, тимол и карвакрол највише доприносе пријатном мирису његовог етарског уља, а познато је и да инхибирају липидну пероксидацију и испољавају веома снажно антимикуробно дејство на различите врсте микроорганизама.

2.6.4. Антимикуробна активност етарског уља и екстракта мајкине душице

Деловање ароматичних дрога засновано је на активности њених састојака (етарских уља и других фармаколошки активних састојака). С друге стране, активност етарских уља представља "мешавину" активности његових састојака. Међутим, тешко је испитати активност појединачних компоненти уља и већином се дефинише фармаколошка активност укупног уља (Ковачевић, Н. 2000). Тачан механизам дејства етарских уља није познат. Да би неко етарско уље поседовало антимикуробну активност, потребно је да у његовом саставу доминирају једињења која имају снажно антимикуробно дејство. Од једињења која улазе у састав етарских уља најјаче антимикуробно дејство имају тимол, еугенол и карвакрол из групе фенола, затим ароматични алдехид цимет-алдехид и терпенски алдехиди: цитрал, цитронелал и др. Што је већи проценат заступљености ових једињења у етарском уљу, то је њихово антимикуробно дејство јаче. Етарска уља која претежно садрже терпенске алкоhole (гераниол, линалол, фарнезол и др.) имају нешто слабије антимикуробно дејство. Најслабије дејство имају она која садрже кетоне и естре, а нарочито терпенске угљоводонике као доминантне компоненте.

Мајкина душица садржи тимол и каркварал, фенолна једињења, која јој дају и антисептичка својства; има својство да зауставља развој низа патогених микроорганизама, а према неким ауторима је и микробицидна.

У раду Kloucek, P. и сар. (2012) етарско уље мајкине душице показало је јако антимикуробно дејство MIC = 250 µg/ml против *Alternaria alternata* 8326, *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Penicillium digitatum* F-382, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, док је *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 био резистентан на дејство етарског уља. Овај резултат није неочекиван јер је *Pseudomonas aeruginosa* добро познат по својој отпорности на антимикуробне лекове, укључујући и етарска уља. Главне компоненте у испитиваном етарском уљу биле су карвакрол (15,8%), р-цимене (14,7%), тимол (12,6%) и гераниол (10,5%) (Longbottom, J. и сар., 2004).

Антибактеријска активност етарског уља *Thymus serpyllum* Linn. непознатог хемијског састава (Rahman, M. и Gul, S. 2003) била је $90 \mu\text{g/ml} < \text{MIC} < 170 \mu\text{g/ml}$: *Bacillus megaterium* (MIC = $115 \mu\text{g/ml}$), *B. subtilis* (MIC = $150 \mu\text{g/ml}$), *Lactobacillus acidophilus* (MIC = $155 \mu\text{g/ml}$), *Micrococcus luteus* (MIC = $90 \mu\text{g/ml}$), *Staphylococcus albus* (MIC = $110 \mu\text{g/ml}$), *S. aureus* (MIC = $170 \mu\text{g/ml}$), *Vibrio cholera* (MIC = $115 \mu\text{g/ml}$), *Escherichia coli* (MIC = $90 \mu\text{g/ml}$), *Salmonella typhi* (MIC = $135 \mu\text{g/ml}$), *Shigella ferrarie* (MIC = $170 \mu\text{g/ml}$). Антибактеријска активност је била упоредива са стандардним антибиотицима Amoksil, Streptomycin и Kanamicin.

У раду Alzoreky, S. и Nakahara, K. (2003) метанолни екстракт мајкине душице показао је јаку антимикуробну активност (MIC = $660 \mu\text{g/ml}$) против *Bacillus cereus* 5020024 умерено јаку антимикуробну активност (MIC = $1320 \mu\text{g/ml}$) против *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria monocytogenes* Tottori и *Staphylococcus aureus* KR-103 и слабу антимикуробну активност (MIC > $2640 \mu\text{g/ml}$) против *Escherichia coli* B-1030 и *Salmonella infantis* L-164. Сличне вредности антимикуробне активности ($1560 \mu\text{g/ml} < \text{MIC} < 12560 \mu\text{g/ml}$) добијене су у раду Wani, A. и cap. (2013) за метанолни екстракт мајкине душице против *Staphylococcus aureus* (MIC = $1560 \mu\text{g/ml}$), *Staphylococcus epidermidis* MTCC-435 (MIC = $1560 \mu\text{g/ml}$), *Klebsiella pneumonia* (MIC = $3120 \mu\text{g/ml}$), *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-1688 (MIC = $3120 \mu\text{g/ml}$), *Proteus vulgaris* MTCC-321 (MIC = $3120 \mu\text{g/ml}$), *Bacillus subtilis* MTCC-441 (MIC = $6250 \mu\text{g/ml}$), *Shigella dysenteriae* (MIC = $6250 \mu\text{g/ml}$), *Salmonella typhi* (MIC = $12560 \mu\text{g/ml}$) и *Escherichia coli* (MIC = $12560 \mu\text{g/ml}$).

2.7. Тимијан (*Thymus vulgaris* L.)

2.7.1. Традиционална употреба тимијана

Тимијан је полужбунаста, вишегодишња, зељаста биљка. Доњи делови стабљике су дрвенасти, горњи зељасти дужине око 20-30 cm. Листови су на кратким лисним дршкама,



Thymus vulgaris L.

наспрамно постављени, равног, уназад повијеног обода, сиводлакави са доње стране. Дуги 5-10 mm, 2-3 mm широки, кожасти, тамно зелене боје на лицу. Цвасти се налазе на врху изданака и издужене су. Чашаца је цеваста, трбушасто проширена са троугластим зупцима. Круница је розе до љубичаста. Сви делови цвета прекривени механичким длакама и жлездама.

Као дрога се користи осушени лист тимијана-*Thymi folium* и етарско уље *Thymi aetheroleum*. Лист се сакупља у фази пред цветање гајених биљака. Одсецају се вршни делови биљке, пречисте и суше. Листови се одвајају од стабљика

и сортирају просијавањем. Укуса је нагорког и љутог а мириса специфичног ароматичног, помало оштрог. Етарско уље тимијана *Thymi aetheroleum*, добија се из свежих листова и хербе тимијана, дестилацијом воденом паром. То је лако покретљива жутоцрвена течност и специфичног, ароматног, фенолног мириса. (Ковачевић, Н. 1999).

Тимијан и мајкина душица су омиљени лекови и у народној и у научној медицини. Вековима се употребљавају за лечење органа за дисање и варење. Након сазнања да су главне активне компоненте ових биљака карвакрол и тимол, научна медицина је истраживала особине и механизам њиховог дејства. Данас се зна да ове супстанце имају вишеструко деловање, што је потврђено клиничким студијама.

Тимијан (*Thymus vulgaris*) и мајкина душица (*Thymus serpyllum*) имају иста својства, с тим да су она у тимијана нешто израженија. Тимијан (*Thymus vulgaris* L.) је вишегодишња биљка (жбун) пореклом из јужне Европе, широко узгајана због свог јаког

мириса (укуса, ароме), који потиче од високог садржаја тимола. Због своје антимицробне, антиоксидативне и антифунгалне активности, ароматичног укуса и активних супстанци (тимол, карвакрол, р-цимен, лимонен и γ -терпинен), етарско уље и екстракти тимијана се широко примењују као адитиви у прехранбеној и козметичкој индустрији, чиме се повећава економска вредност овог усева широм света (Петровић, С. и сар., 2012).

2.7.2. Хемијски састав етарског уља и екстракта тимијана

Лист тимијана садржи до 3 % етарског уља. Главни састојци уља су монотерпенски феноли, тимол и карвакрол. У уљу има до 50 % укупних фенола рачунато као тимол. Неки прописи захтевају 0,5 % укупних фенола у дроги. Поред њих, у уљу су заступљени и други монотерпени: метилетар тимола, цинеол и линалол, гераниол, trans-тујанол, гама-терпинеол, алфа-терпинеол. Поред етарског уља, ова дрога садржи значајну количину хетерозида флавоноида, фенолкарбонске киселине и њихове деривате као и танине. (Ковачевић, Н.1999).

Хемијским испитивањима тимијана у свету потврђено је постојање шест хемотипова: гераниол, линалол, γ -терпинеол, карвакрол, тимол и trans-тујон-4-ол-терпинен-4-ол. Доказано је да генетска предиспозиција и еколошки услови утичу на принос и састав етарских уља тимијана (Imelouane, В и сар., 2009).

У раду Станковић, С. и сар. (2011) на основу GC i GC/MS анализе етарског уља тимијана пореклом из Србије (огледно поље Института за проучавање лековитог биља „Др. Јосиф Панчић“, Панчево), добијеном помоћу Clavenger апарата идентификовано је 7 компонената, које представљају 100% укупно детектованих компонената. Аутори су компоненте етарског уља *T. vulgaris* поделили на четири групе: 1) угљоводонични монотерпени, 2) оксидовани монотерпени, 3) угљоводонични сесквитерпени и 4) фенолна једињења. Фенолна једињења представљају доминантну групу једињења етарског уља *T. vulgaris* (63,88%), са тимолом као основном компонентом (59,95%). Представник угљоводоничних монотерпена етарског уља тимијана је р-цимен (18,34%), док је β -кариофилен (3,24%) једини сесквитерпен овог уља. Подаци у литератури указују да је сличан хемијски састав етарског уља утврђен за ову биљну врсту из Србије р-цимен

(19,0%) и тимол (64,5%). (Соковић, М. и сар., 2010) и из Бразила р-цимен (18,6%), γ-терпинен (16,0%) и тимол (44,7%) (Porte, A. и Godoy, R. 2008).

2.7.3. Антиоксидативна активност етарског уља и екстракта тимијана

Тимијан се највише користи због својих антисептичких и антиоксидативних особина, дезодорансног дејства и као антикоагуланс. Тимијан је богат етарским уљем и због тога поседује фунгицидно, антисептичко и антиоксидативно дејство.

Фенолни монотерпени у тимијану, тимол и карвакрол највише доприносе пријатном мирису његовог етарског уља, а познато је и да инхибирају липидну пероксидацију. Истраживања су показала да главне компоненте у екстракту тимијана, посебно еугенол, тимол и карвакрол имају већу антиоксидативну активност од синтетских антиоксиданаса ВНТ, ВНА и витамина Е.

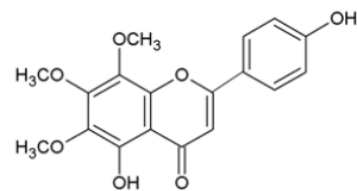
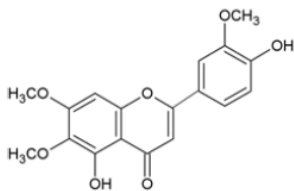
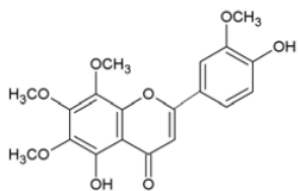
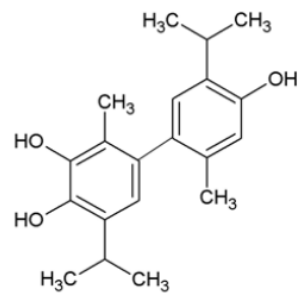
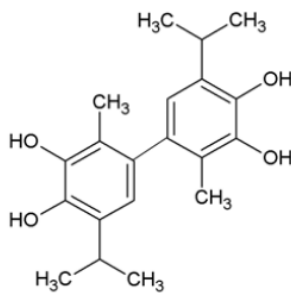
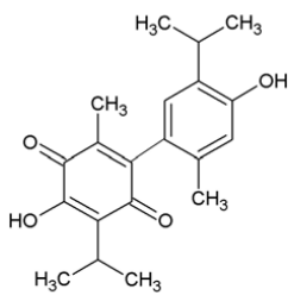
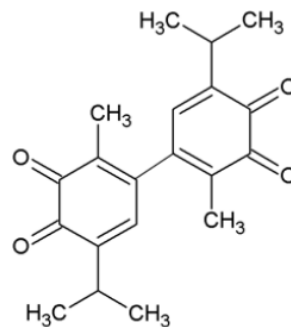
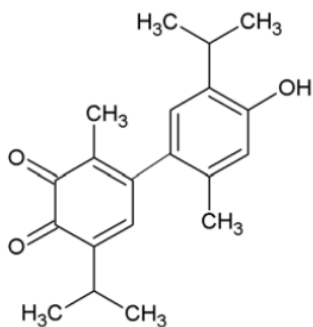
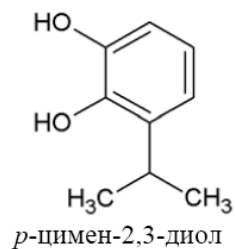
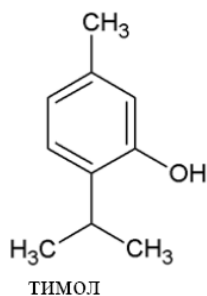
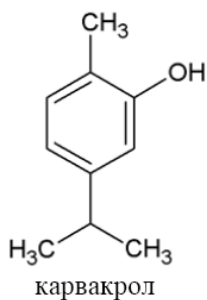
Тимол је главна компонента етарског уља *Thymus vulgaris* и посвећена му је знатна пажња због његове анти-инфламаторне и антиоксидативне активности. Тимол има класичну фенолну структуру и ова открића не слажу се са податком који приписује само антиинфламаторно дејство оваквим структурама већ и показују по први пут да оне контролишу ослобађање еластазе која може да повеже са познатим снажним антиоксидантским дејством (Miura, K. и сар., 2002; Schwartz, K. и сар., 1996).

Табела 2.7.3.1 Литературни преглед способности неутралисања DPPH радикала коришћењем етарског уља *Thymus serpyllum* и *Thymus vulgaris*

Етарско уље и порекло	Метода добијања	Антиоксидативна активност	Литература
<i>T. serpyllum</i> <i>T. vulgaris</i> Хрватска	Дестилација водом -Clevenger	Аскорбинска киселина > токоферол > ВНТ > ВНА > етарско уље <i>T. serpyllum</i> > етарско уље <i>T. vulgaris</i>	(Кулишић, Т. и сар., 2005)
<i>T. serpyllum</i> <i>T. linearis</i> Пакистан	Дестилација водом -Clevenger	ВНТ > тимол > етарско уље <i>T. serpyllum</i> > етарско уље <i>T. linearis</i> > карвакрол	(Hussain и сар., 2013)
<i>T. vulgaris</i> Јемен	Дестилација водом -Clevenger	ВНТ > етарско уље <i>T. vulgaris</i>	(Maher, M. и сар., 2011)
<i>T. vulgaris</i> Словачка	Комерцијално етарско уље	ВНТ > аскорбинска киселина > етарско уље <i>T. vulgaris</i>	(Kačániová, M. и сар., 2012)

У раду Lee, J. и сар. (2005) показано је да главне компоненте екстракта *T. vulgaris*, посебно еугенол, тимол и карвакрол, имају јачу антиоксидативну активност од синтетских антиоксиданаса као што су бутиловани хидрокситолуен (ВНТ) и α -токоферол. У раду Youdim, A и сар. (1999) етарско уље *T. vulgaris* је показало боље антиоксидативно дејство на успоравање липидне пероксидације уља жутог ноћурка од аскорбилпалмитата и сличну активност као α -токоферол.

Поред тимола, карвакрола и *p*-цимен-2,3-диол-а од осталих једињења изолованих из тимијана јаку антиоксидативну активност имају кафеинска киселина, бифенилна једињења, флавоноиди супституисани са метокси групама, ериодиктол, рузмаринска киселина, метил-росмаринат и 7-*o*-метил-лутеолин (Fecka, I. и Turek, S. 2008 ; Dapkevicius, A и сар., 2002 ; Miura, K. и сар., 1989). На слици 2.7.3.1 приказана су најважнија антиоксидативна једињења из *Thymus vulgaris*.



Слика бр. 2.7.3.1. Антиоксидативна једињења из *Thymus vulgaris* (Yanishlieva, V. и сар., 2006)

2.7.4. Антимикробна активност етарског уља и екстракта тимидјана

Механизам деловања тимола, главне компоненте етарског уља тимидјана, и карвакрола заснива се на повећању пермеабилности ћелијске мембране. Оба молекула су способна да разоре спољашњу мембрану Грам-негативних бактерија, ослобађајући липополисахариде и повећавајући пропустљивост ћелијске мембране (Burt, S. 2004). Студије са бактеријом *Bacillus cereus* су показале да карвакрол интерагује са ћелијском мембраном, при чему се смешта у фосфолипидном двослоју између ланаца масних киселина. Истраживања су показала да биолошки прекурсор карвакрола, р-цимен, интензивније утиче на повећање пермеабилности ћелијске мембране и бубрење ћелије за разлику од самог карвакрола (Ultee, A. и сар., 2002).

У раду Станковић, С. и сар. (2011) етарско уље тимидјана показало је антимикробну активност на све тестиране бактерије са МИС вредностима у опсегу 0,025–0,10 µl/ml и МВС вредностима 0,05–0,78 µl/ml. Резултати ових испитивања указују на снажан утицај етарског уља тимидјана на Грам-позитивне бактерије *Bacillus cereus* ATCC 8739 (МИС = 0,025 µl/ml, МВС = 0,025 µl/ml) и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (МИС = 0,050 µl/ml, МВС = 0,1 µl/ml). Ова чињеница је посебно потврђена на основу МВС вредности. За разлику од Грам-позитивних бактерија, Грам-негативне бактерије се одликују већом резистентношћу према антисептицима и дезинфекционим средствима управо због спољашње мембране која делује као баријера за улазак антибактеријских агенаса. Експериментално утврђене вредности МИС и МВС за све тестиране бактерије биле су ниже у односу на литературне податке (Станковић, С. и сар., 2011).

У раду Соковић, М. и сар. (2010) етарско уље *T. vulgaris* (МИС 0,25–1,0 µg/ml и МВС 0,5–1,5 µg/ml) показало је јаче антимикробно дејство од стрептомицина и етарских уља *M. chamomilla*, *S. officinalis*, *C. aurantium*, *C. limon*, *L. angustifolia*, *O. basilicum*, *M. piperita* и *M. spicata*. Главне компоненте у етарском уљу *T. vulgaris* биле су тимол (64,5%) и р-цимен (19,0%).

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Биљни материјал и хемикалије

Биљни материјал *Thymus serpyllum* L. је прикупљен у фази цветања током јуна 2012. године у централној Србији, на планини Пасјача, у близини насеља Житорађе. Прикупљени биљни материјал (надземни део) је сушен у хладу и самлевен до гранулације 0,5 mm. Биљни материјал *Thymus vulgaris* L. је плантажно гајен, пореклом из Баваништа (Војводина, Србија) прикупљен 2009.

За надкритичну екстракцију је коришћен комерцијални угљеник(IV)-оксид (чистоће 99%, Messer, Београд, Србија). За екстракцију по Soxhlet-у коришћени су n-хексан и етанол (Бета Хем, Београд). За испитивање антиоксидативне активности коришћени су 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикал (DPPH), бутиловани хидрокситолуен (BHT) и бутиловани хидроксиназол (BHA) произвођача Sigma Chemical Co. (St. Louis, SAD). За испитивање антимицробне активности коришћени су: бифоназол је у виду лосиона који садржи 1 g активне супстанце у 100 ml 70% етанола уз додатак солубизатора и глицерола (Срболек, Београд, Србија 10 mg/ml) и кетоконазол садржи 1 mg/активне супстанце по ml 5% DMSO (Хемофарм концерн А.Д., Вршац, Србија 1 mg/ml). Стрептомицин и ампицилин су комерцијални антибиотици коришћени као позитивне контроле и садрже 1mg активне супстанце у 1 mL 5% DMSO (Sigma P7794). Као контрола коришћен је и стандард тимол произвођача Sigma Chemical Co. (St. Louis, SAD).

3.2. Технике добијања етарских уља и екстраката из мајкине душице

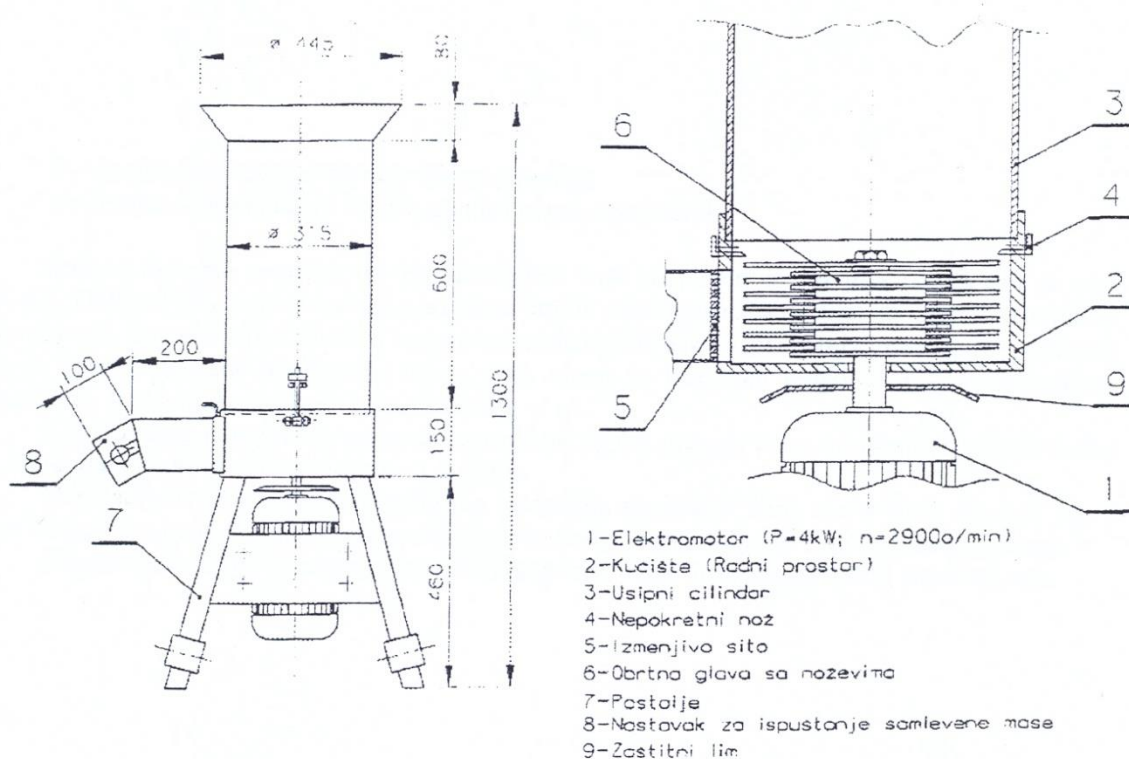
3.2.1. Хидродестилација по Clevenger –у

За лабораторијско добијање етарског уља мајкине душице коришћен је поступак хидродестилације у апаратури по Clevenger поступку који прописује Ph. Jug. V. Биљни материјал подвргнут је хидродестилацији при односу биљни материјал:вода 1:10 (m/v) у трајању од 2,5 сата. За процес хидродестилације је коришћено 50 g осушеног и уситњеног биљног материјала и 500 ml дестиловане воде. На балон (1000 ml), који је загреван помоћу електричне облоге, постављен је наставак по Clevenger-у (слика бр. 2.2.2.1). Етарско уље сакупљано је у градуисаном делу цеви за мерење предестилисаног уља. Након сушења са анхидрованим Na₂SO₄, узорак је чуван у фрижидеру на +4°C до анализе. Изоловано етарско уље *Thymus serpyllum* L. је течност светло жуте боје, мириса карактеристичног за род *Thymus*.

3.2.2. Хидродестилација уређајем СП-130

Припрема биљног материјала има велики значај у процесу добијања етарских уља. Такође, неодговарајуће сушење биљног материјала може довести до губитка у приносу и погоршању квалитета исто као и неодговарајућа обрада материјала. Пре дестилације у уређају СП-130, биљни материјал мора бити ослобођен свих баласта и страних примеса. Осушени материјал се подвргава мљењу у циљу отварања уљних канала и повећању контактне површине водене паре и разорених биљних ћелија, како би се пренос етарског уља поспешео из биљног материјала у парну струју.

За мљење се користио оригинални уређај приказан на слици бр. 3.2.2.1



Слика бр. 3.2.2.1 Уређај за млевење биомасе

За дестилацију етарских уља коришћен је дестилациони уређај СП-130. Уређај користи принцип воде и водене паре. То је оригинални уређај радне запремине 130 литара. Пренос топлотне енергије на зид дестилатора врши се путем термо уља (Galax therm 70), које се налази у лавиринту дуплих зидова данцета дестилатора. На овај начин се спречавају температурни скокови и загоревање материјала услед испаравања вишка воде. Поклопац суда је готово савршено аутоматски решен, а на њему је инсталиран термометар који омогућава континуалну контролу температуре током процеса. Водена пара се генерисала коришћењем пропан-бутан гасом. Хлађење је вршено водом протока 2,7 l/min.

Конструкционе карактеристике пријемника етарских уља реализоване су заједно са хладњаком. Како је у већини случајева специфична тежина уља мања од специфичне тежине воде то и ефикасност одвајања зависи од односа:

$$E = V_1/V_2$$

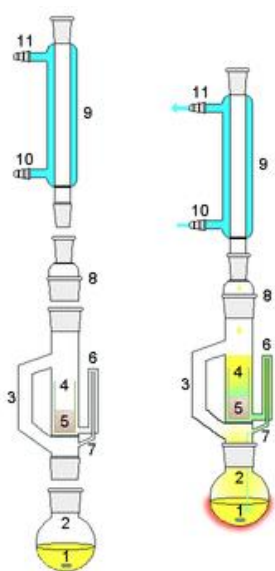
V_1 - брзина испливавања честица уља на површину

V_2 - брзина којом падају честице уља при улазу у пријемник

За процес дестилације етарског уља мајкине душице помоћу воде и водене паре у уређају СП-130 је коришћено 5,5 kg осушеног и уситњеног биљног материјала (гранулације 4-5 mm) и 12 l воде. Температура у току дестилације у уређају СП-130 је била 100°C, на атмосферском притиску, а цео процес дестилације је трајао 5 сати.

Одвајање етарског уља од воде, врши се тако што се смеша из прихватног суда (етарско уље и вода), преручи у левак за одвајање. Доњи водени слој (мирисна водица) се испушта, а горњи слој етарског уља се преручи у шлифовани ерленмајер запремине 100 ml и одмах се дода 10-20 мас % анхидрованога натријум-сулфата у односу на количину добијеног етарског уља. Након обезводњавања етарско уље се чувало у тамним стакленим бочицама на тамном месту заштићеном од топлоте, светлости, влаге и кисеоника.

3.2.3. Екстракција по Soxhlet-у



За екстракције у апаратури по Soxhlet-у (слика 3.2.3.1) коришћени су n- хексан и 70 % водени раствор етанола. Екстракција је вршена по поступку који прописује Ph. Jug. V. Биљни материјал је стављан у филтер врећицу за чај која се поставља у Soxhlet-ов екстрактор. Soxhlet-ов екстрактор је постављен на балон у који је претходно додато 250 ml одговарајућег растварача који је загреван до температуре кључања. Екстракција n-хексаном је трајала 1 сат ($m_{bm} = 16,017$ г), са 70 % воденим раствором етанола 3 сата ($m_{bm} = 12,014$ г) и са 70 % воденим раствором етанола уз претходни претретман са n-хексаном 4 сата ($m_{bm} = 15,411$ г). Након завршене екстракције, растварач је одвојен од екстракта упаравањем помоћу ротационог вакуум упаривача. Масени принос екстракта рачунат је по формули:

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

m_e - маса издвојеног екстракта

m_{bm} - маса биљног материјала

Станојевић и сар. (2007) су за моделовање процеса екстракције у апаратури по Soxhlet-у из *Hieracium pilosella* L. користили емпиријску једначину Пономарева. Иначе, овај модел се користи у инжењерској пракси за одређивање коефицијента испирања (мера масе екстрактивних материја које се растворе након потапања биљног материјала у растварач) и коефицијента споре екстракције (брзина растварања екстрактивних материја у односу на њихову почетну масу у периоду споре екстракције). Моделовање процеса екстракције једначином Пономарева нема физичку основу, јер даје само математички опис промене количине материја које се екстрахују у биљној сировини у фази споре екстракције (Пonomарев, Д. 1976; Вељковић, В. и Миленовић, Д. 2002; Станојевић, Љ. и сар., 2007). Међутим, постојећи модели нису погодни за прецизније утврђивање коефицијената дифузије у чврстој фази коришћењем Soxhlet екстракције због постојања различитих начина извођења овог поступка.

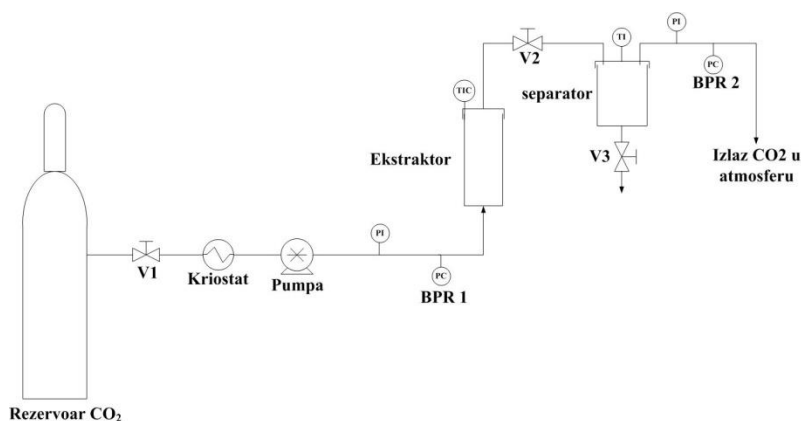
3.2.4. Надкритична екстракција угљеник(IV)-оксидом

Екстракције са надкритичним угљеник (IV)-оксидом су извршене на лабораторијском постројењу за надкритичну екстракцију (Autoclave Engineers Screening System). Шема овог постројења приказана је на слици 3.2.4.1. Овај систем предвиђен је за лабораторијска испитивања са шаржама биљног материјала, уз коришћење угљеник (IV)-



Слика 3.2.4.1 : Лабораторијско постројење за НКЕ

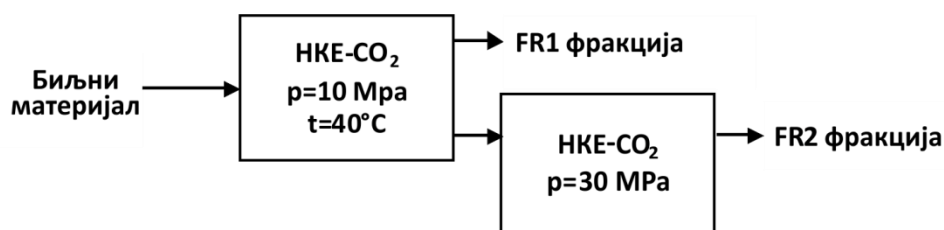
оксида као медијума уз највећи дозвољени радни притисак од 41,3 МПа на 138 °С. Течни угљеник(IV)-оксид притиче из боце са сифоном. Између излаза из боце и пумпе високог притиска за течности, течни угљеник(IV)-оксид се хлади у криостату како би се спречило његово испаравање. Пумпа високог притиска (Milton Roy, Француска) је пумпа са максималним излазним притиском 48 МПа при протоку од 0,5 l/h. Глава пумпе се додатно хлади ради обезбеђења равномерног рада и константног протока течне фазе. Регулација притиска у екстрактору и сепаратору врши се помоћу два повратна регулатора притиска (BPR1 и BPR2). Радна запремина екстрактора износи 150 cm³. Екстрактор је израђен од нерђајућег челика 316СС и опремљен је са два грејача ради одржавања неопходне температуре. Надкритични угљеник (IV)-оксид напушта екстрактор и улази у сепаратор где се променом притиска врши одвајање растварача од раствора. Запремина сепаратора износи 500 cm³. Узорци екстракта могу се узети отварањем вентила на дну сепаратора. За индикацију протока угљеник(IV)-оксида кроз систем предвиђен је мерач протока. Угљеник(IV)-оксид који напушта сепаратор, након проласка кроз мерач протока, одлази у атмосферу.



Слика 2.3.4.2 : Шема лабораторијског постројења за НКЕ

Биљни материјал је уситњен и пропуштен кроз сита гранулације 0,4 mm. Издвојена су три надкритична екстракта мајкине душице.

У првом експерименту коришћена је фракциона екстракција са постепеним повећањем притиска на константној температури. После прве фазе при ниским притисцима (10 МПа) у којој се издвајају неполарна једињења (етарско уље и воскови), чврсти остатак (резиду) се даље подвргава НК-СО₂ на повишеном притиску (30 МПа) да би се издвојиле поларне компоненте. Први надкритични екстракт (FR1 фракција) мајкине душице је изолован из биљног материјала на притиску од 10 МПа и температури од 40 °С у току 1 сата и 9 минута. Затим је настављена екстракција на притиску од 30 МПа и на истој температури од 40 °С и издвојен је други надкритични екстракт мајкине душице (FR2 фракција) у току 1 сата и 35 минута. Почетна маса биљног материјала у овом експерименту била је 50,117 g мајкине душице.



Слика 3.2.4.3: Шематски приказ фракционе екстракције са надкритичним СО₂

У другом експерименту коришћена је једноступена (обична) екстракција и надкритични екстракт мајкине душице изолован је на притиску од 30 МПа и температури од 40 °С. Почетна маса биљног материјала у овом експерименту била је 51,316 g мајкине душице. Време екстракције било је 2 сата и 1 минут. У току НКЕ мерена је маса издвојеног екстракта и рачунат масени принос екстракта и специфична количину утрошеног НК СО₂ (kg_{CO2}/kg_{bm}):

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

где су ; m_e - маса издвојеног екстракта, m_{bm} - маса биљног материјала

На истом постројењу (Autoclave Engineers Screening System) за потребе математичког моделовања кинетике НКЕ, изолован је надкритични екстракт тимијана на притиску 10 МПа и температури од 40 °С. За екстракцију је коришћен самлевен биљни материјал *Thymus vulgaris* L.. (са средњим пречником 0,4 mm).

3.3. Хемијски састав етарских уља и екстраката мајкине душице

3.3.1. Гаснохроматографска карактеризација етарског уља

Испитивање хемијског састава етарског уља изведено је применом гасне хроматографије уз пламено-јонизујућу детекцију (GC/FID) и комбинацијом гасне хроматографије и масене спектрометрије (GC/MS).

Класична аналитичка гаснохроматографска анализа (GC/FID) урађена је на Hewlett-Packard гасном хроматографу, модел HP-5890 Series II, опремљеном split-splitless инјектором повезаним са HP-5 колоном (25 m x 0,32 mm, дебљине филма 0,25 μ m) и пламено-јонизујућим детектором (FID). Као носећи гас коришћен је водоник (1 ml/мин). Етанолни раствор узорка етарског уља (1 μ l, 1% раствор) ињектиран је у сплит-режиму (1:30). Температура ињектора износила је 250 $^{\circ}$ C, а детектора (FID) 300 $^{\circ}$ C, док је температура колоне мењана у линеарном режиму температурског програмирања од 40–260 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C/мин), а потом држана константном на 260 $^{\circ}$ C 15 мин. За квантификационе сврхе проценти површина пикова добијени интеграцијом са одговарајућег хроматограма (GC/FID) узети су као основа.

Исти аналитички услови коришћени су и за потребе GC/MS анализе рађене на HP G 1800C Series II GCD аналитичком систему [Hewlett-Packard, Palo Alto, CA (USA)], с тим што је ту рађено са HP-5MS колоном (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) и што је као носећи гас коришћен хелијум. Температура трансфер линије износила је 260 $^{\circ}$ C. Масени спектри снимани су у EI режиму (70 eV), у опсегу m/z 40-450. Узорак 1% EtOH раствора етарског уља (0,2 μ l) ињектиран је у сплит-режиму (1:30).

Идентификација појединачних компонената вршена је масеноспектрометријски и преко Ковачевих индекса, уз коришћење различитих база масених спектра (NIST/Wiley), различитих начина претраге (PBM/NIST/AMDIS вер 2.1) и расположивих литературних података (Adams, P. 2007).

На основу гасно-хроматографске анализе идентификована су ретенциона времена (t_R), стандардних једињења и једињења из етарског уља мајкине душице. Из разлога што није могуће идентификовати све компоненте етарских уља на основу ретенционих времена

стандарда, извршено је одређивање ретенционих индекса према Ковачу (Kovats) и на основу њих су одређене компоненте етарских уља. Добијени резултати су упоређени са подацима за Ковачеве индексе из литературе (Милосављевић, С. 1994).

Ретенциони индекс неке компоненте је релативна величина добијена интерполацијом (најчешће логаритамском), повезујући вредности подешених ретенционих времена t'_R (или елуиране запремине V_R) дате компоненте, са подешеним ретенционим временима два стандарда елуирана пре и после сигнала компоненте узорка.

Као стандарди користе се хомологе серије n-алкана којима се као вредности ретенционих индекса приписује вредност $n \times 100$, (где n представља број C атома) и тиме се добија да, без обзира на услове хроматографије, два узастопна n-алкана су раздвојена за 100 јединица.

Ретенциони индекси за изотремне услове се рачунају на следећи начин:

$$RI = 100 \frac{\log t'_R(X) - \log t'_R(C_n)}{\log t'_R(C_{n+1}) - \log t'_R(C_n)} + 100 n$$

где су: RI - ретенциони индекс једињења X ,

$t'_R(X)$ - подешено ретенционо време једињења X ,

$t'_R(C_n)$ - подешено ретенционо време n-алкана са n угљеникових атома који елуира пре једињења X ,

$t'_R(C_{n+1})$ - подешено ретенционо време n-алкана са $n + 1$ угљеникових атома који елуира после једињења X .

За услове линеарног програмирања температуре, вредност ретенционог индекса може да се израчуна директним коришћењем вредности ретенционих индекса уместо њихових логаритама. Понекад се ова вредност зове линеарни ретенциони индекс и рачуна се према једнакости:

$$RI = 100 \frac{t'_R(X) - t'_R(C_n)}{t'_R(C_{n+1}) - t'_R(C_n)} + 100 n$$

3.4. Антиоксидативни потенцијал етарских уља и екстраката мајкине душице

3.4.1. DPPH метода

Релативна антирадикалска активност етарског уља испитивана је помоћу стабилног слободног радикала DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) који се често користи у процени антиоксидантне активности. DPPH радикал апсорбује на 517 nm (љубичасте је боје) при чему се апсорбанција знатно смањује када је овај радикал изложен скевинџерима слободних радикала јер долази до трансфера атома водоника антиоксиданса на DPPH. При том, смањена апсорбанција на 517 nm указује на антиоксидантни потенцијал екстракта/етарског уља (Sanchez-Moreno, C., 2002).

При процени антиоксидантне способности етарског уља мајкине душице коришћене су радне концентрације раствора уља у опсегу 0,052 – 3,333 $\mu\text{L/mL}$. По 10 μL раствора одређене концентрације етарског уља је мешано са 190 μL метанола и 100 μL метанолног раствора DPPH (67,2 $\mu\text{mol/L}$). Све пробе припремљене су у микроплочама. За сваку концентрацију припремљене су радне пробе у три понављања и једна корекција (слепа проба тј. апсорбанца екстракта без DPPH реагенса), док је за целу плочу рађена једна контрола (максимална количина DPPH тј. није додат екстракт).

Након 60 мин инкубације на собној температури, у мраку, апсорбанције добијених раствора очитаване су спектрофотометријски на 517 nm (читаач микроплоча Multiscan Spectrum, Thermo Corporation). Капацитет хватања DPPH· радикала (DPPH-RSC) рачунат је на основу следеће једначине:

$$\% \text{DPPH} - \text{RSC} = 100 - \frac{(A_{sr} - A_{kor})}{A_{kontrola}} \cdot 100$$

где је A_{sr} - средња вредност апсорбанција три радне пробе, A_{kor} - апсорбанција самог екстракта (без реагенаса) и $A_{kontrola}$ - апсорбанција DPPH. За добијене вредности за RSC (инхибиције) нацртане је крива зависности инхибиције од концентрације етарског уља у програму Origin 8 (Origin Lab Corporation), из којих је одређена IC_{50} вредност (концентрација испитиваног уља при којој је неутралисано 50% радикала).

3.5. Антимикробна активност етарских уља и екстраката мајкине душице

3.5.1. Третирани микроорганизми

У раду су коришћене бактерије и гљиве из микотеке Миколошке лабораторије, Института за Биолошка истраживања “Синиша Станковић” Универзитета у Београду. У испитивању је коришћено 8 бактеријских сојева и 8 микромицета (гљива).

Тестирани су следећи бактеријски сојеви:

Грам-негативне бактерије *Escherichia coli* (АТСС 35210), *Pseudomonas aeruginosa* (АТСС 27853), *Salmonella typhimurium* (АТСС 13311), *Enterobacter cloacae* (клинички изолат, human isolate).

Грам-позитивне бактерије *Bacillus cereus* (клинички изолат, human isolate), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Staphylococcus aureus* (АТСС 6538), *Micrococcus flavus* (АТСС 10240).

Тестиране су следеће микромицете:

Aspergillus fumigatus (АТСС 9197), *A. niger* (АТСС 6275), *A. ochraceus* (АТСС 12066), *A. versicolor* (АТСС 11730), *Penicillium ochrochloron* (АТСС 9112), *P. funiculosum* (АТСС 10509), *P. verrucosum* var. *cyclopium* (food isolate), *Trichoderma viride* (IAM 5061). За узгој бактеријских култура коришћена је Müller–Hinton чврста подлога. Микромицете су гајене на малт-агар (МА) подлози и пресејаване су сваког месеца. Културе су складиштене на 4 °С и пресејаване једном месечно.

3.5.2. Макродилуциона метода

Методом микродилуције на микротитрационим плочама, 96-систем (Hanel, H. и Raether, W. 1988; Daouk, D. i sar., 1995 ; Соковић, М. 2001) одређиване су минималне инхибиторне и фунгицидне концентрације (MIC и MFC) серијским разређивањем етарских уља.

Микромицете су гајене на МА подлози, на собној температури, 21 дан (Booth, C. 1971). Инокулуми су прављени тако што су спиране споре стерилним 0,85% раствором NaCl. Коришћени су инокулуми са суспензијом спора 10^6 CFU/ml медијума. Након инкубације од 72 h на 28 °C утврђиване су MIC. Минималне фунгицидне концентрације (MFC) одређиване су реинокулисањем 10 µl/ml у чист медијум и инкубирањем на истој температури, 24 h. Концентрације на којима није било раста мицелије, су узимане као MFC.

Као контрола коришћени су комерцијални фунгициди бифоназол и кетоконазол. Бифоназол је у виду лосиона који садржи 1 g активне супстанце у 100 ml 70% етанола уз додатак солубизатора и глицерола (Срболек, Београд, Србија 10 mg/ml) и кетоконазол садржи 1 mg/активне супстанце по ml 5% DMSO. (Хемофарм концерн А.Д., Вршац, Србија 1 mg/ml). Као контрола коришћен је и тимол (Sigma).

Бактеријски сојеви су гајени на Tryptic Soy Broth (TSB) подлози. Културе су засејане у дупликату и заједно са контролним TSB епруветама инкубиране су у термостату 24 h на 37 °C. Из преконоћне културе која садржи приближно 1.0×10^9 ћелија/mL, узето је 100 µL и пренето у епендорф који садржи 900 µL храњиве подлоге. Тако са добија концентрација 1.0×10^8 ћелија/mL. Даљим серијским разређењима добијају се жељене концентрације. Одређивање минималних инхибиторних концентрација (MIC) вршено је серијским разређењем испитиваних компоненти растворених у ДМСО. Тако припремљена једињења додавана су у течни медијум са инокулумом. Микроплоче су инкубиране на 37 °C у трајању од 24 сата. Најнижа концентрација при којој није било видљивог раста узета је за минималну инхибиторну концентрацију (MIC). Минималне бактерицидне концентрације (MBC) одређиване су реинокулирањем у чист течни медијум и инкубирањем следећих 24 h на 37 °C. Уколико није било раста, те концентрације узимане су за MBC. Стрептомицин и ампицилин су комерцијални антибиотици коришћени као

позитивне контроле и садрже 1mg активне супстанце у 1 mL 5% DMSO (Sigma P7794). Као контрола коришћен је и стандард тимола (Sigma).

Поред реинокулације, резултати су читани на микротитрационом читачу на 450 и 650 nm таласне дужине. На крају је додато 2 ml боје p-IODONITROTETRAZOLIUM VIOLET, (3 mg/ml H₂O) у све бунарчиће и остављено још 24 h. Бунарчићи који се нису обојили су резултат микробицидног дејства, а места са блеђом бојом у односу на контролу (која је љубичасте боје) су резултат микробистатичког дејства.

3.7. Математичко моделовање процеса НКЕ из мајкине душице и тимидијана

Експериментално добијени подаци су анализирани помоћу математичког модела заснованог на другом Фиковом закону у циљу одређивања и поређења коефицијената дифузије у периоду константне и опадајуће брзине екстракције. Анализираће се период брзе екстракције и одређивати вредности коефицијената дифузије у односу на вредности коефицијената дифузије за период споре екстракције. Покушаће да се одреди највећа вредност коефицијента дифузије за период брзе екстракције код процеса надкритичне екстракције.

3.7.1. Модели коришћени за симулацију процеса надкритичне екстракције

Највише примењиван модел у литератури за НКЕ из биљног материјала је предложила Сорова (Sovova, H. 1994). Универзалност модела Сорове је у његовој применљивости за НКЕ из било ког биљног материјала и на екстракцију како лакших, тако и тежих фракција. Такође, уз одређене услове, овај модел пружа и аналитичка решења, што је свакако допринело његовој широкој употреби.

Модел посматра клипно протицање надкритичног растварача кроз фиксисан слој млевеног биљног материјала. Масени биланс за део цевног реактора се може представити следећим једначинама:

$$-\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (3.7.1.1)$$

$$\rho\varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + \rho U \frac{\partial y}{\partial h} = J(x, y) \quad (3.7.1.2)$$

где је: t - време екстракције,

U - брзина струјања угљеник(IV)-оксида кроз слој биљног материјала,

ε - порозност биљног слоја,

ρ - густина надкритичног флуида, растварача,

ρ_s - густина биљног материјала,

x – (kg) растворљивих супстанци по (kg) нерастворљиве чврсте фазе,

y – (kg) растворљивих супстанци по (kg) растварача,

h - аксијална координата екстрактора,

J - брзина преноса масе

Први члан у билансу за надкритичну фазу (једначина 3.7.1.2) је одраз нестационарности процеса преноса масе и може се занемарити, па је поједностављен сет једначина:

$$-\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (3.7.1.3)$$

$$\rho U \frac{\partial y}{\partial h} = J(x, y)$$

Сет једначина решава се за граничне услове :

$$x(h, t=0) = x_0 \quad (3.7.1.4)$$

$$y(h=0, t) = 0 \quad (3.7.1.5)$$

Основна поставка модела је да део ћелија (хипотетичких јединица у којима је садржана растворљива супстанца, тј. уље) отворен или разорен процесом млевења. На почетку процеса екстракције укупна количина уља у биљном материјалу O , може се поделити на лако доступну количину уља P , и количину теже доступног уља која се налази унутар нетакнутих ћелија, K :

$$O = P + K \quad (3.7.1.6)$$

Количина уља на почетку процеса екстракције се може представити као:

$$x(t = 0) = x_0 = \frac{O}{N} = x_p + x_k = \frac{P}{N} + \frac{K}{N} \quad (3.7.1.7)$$

где је: N - маса нерастворне чврсте биљне материје у надкритичном флуиду.

Да би се представила аналитичка решења система једначина (3.7.1.3), потребно је увести бездимензионе променљиве ;

r, Y, z, τ :

$$r = \frac{x}{x_k}, Y = 1 - \frac{y}{y_r}, z = \frac{k_f a_0}{U} h, \tau = \frac{k_f a_0 \rho y_r}{(1-\varepsilon) \rho_s x_k} t \quad (3.7.1.8)$$

где је: κ_f - коефицијент преноса масе за растварач - надкритични угљеник(IV)-оксид (m/s),
 a_0 - специфична површина биљних честица (m^{-1}),
 y_r - равнотежна растворљивост уља у угљеник(IV)-оксиду (kg уља/ kg CO₂),
 x_k - гранична вредност (kg) растворљивих супстанци по (kg) нерастворљиве чврсте фазе.

Величина x_k се може објаснити и на следећи начин: када при исцрпљивању биљног материјала лако доступним уљем, маса растворљивих супстанци по маси нерастворљиве чврсте фазе опадне на вредност x_k , мења се механизам преноса масе, а једначина за брзину преноса масе J има облик:

$$J(x > x_k, y) > J(x \leq x_k, y) \quad (3.7.1.9)$$

$$J(x > x_k, y) = k_f a_0 \rho (y_r - y) \quad (3.7.1.10)$$

$$J(x \leq x_k, y) = k_s a_0 \rho_s x \quad (3.7.1.11)$$

Једначине (3.7.1.3) и гранични услови (3.7.1.4) и (3.7.1.5), увођењем бездимензионих променљивих, добијају нову форму:

$$\frac{\partial r}{\partial \tau} = \frac{\partial Y}{\partial z} = -J^*(r, Y) \quad (3.7.1.12)$$

$$r(z, \tau = 0) = r_0 \quad (3.7.1.13)$$

$$Y(z = 0, \tau) = 1 \quad (3.7.1.14)$$

где је :

$$J^*(r, Y) = J(x, y)/(k_f a_0 \rho y_r) \quad (3.7.1.15)$$

Лако доступно уље из разорених биљних ћелија се прво екстрахује, а затим следи спорија екстракција уља из млевењем нетакнутих ћелија. Процес екстракције се може поделити на три периода: брз период, прелазни период и спор период. У току првог - брзог периода брзина екстракције је лимитирана растворљивошћу лако доступног уља. На крају овог периода честице биљног материјала на улазу у реактор су ослобођене лако доступним уљем и почиње екстракција теже доступног уља. Међутим, честице на крају пакованог слоја су још увек богате лако доступним уљем и тада се одвија екстракција у тзв. "прелазном периоду". Када је целокупна количина доступног уља исцрпљена из пакованог, биљног слоја наступа трећи период екстракције. У трећем, спором периоду, укупну брзину процеса одређује дифузија унутар честице.

Удео екстракта укупне масе биљне сировине који се екстрахује током првог, другог и трећег екстракционог периода је представљен као:

$$e = \left\{ \begin{array}{ll} \left(x_k \frac{\tau}{Z} \right) [1 - \exp(-Z)] & \text{za } \tau < \tau_m \\ (x_k/Z) [\tau - \tau_m \exp(z_w - Z)] & \text{za } \tau_m \leq \tau < \tau_n \\ x_0 - \left(\frac{x_k}{kZ} \right) \ln \{ 1 + [\exp(r_0 k Z) - 1] \exp[k(\tau_m - \tau)] / r_0 \} & \text{za } \tau \geq \tau_n \end{array} \right\} \quad (3.7.1.16)$$

где је :

$$Z = k_f a_0 H / U \quad (3.7.1.17)$$

$$k = k_s \rho_s x_k / (k_f \rho y_r) \quad (3.7.1.18)$$

$$\tau_m = r_0 - 1 \quad (3.7.1.19)$$

$$\tau_n = \tau_m + \frac{1}{k} \ln \frac{1 + \tau_m \exp(r_0 k Z)}{1 + \tau_m} \quad (3.7.1.20)$$

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Приноси етарских уља и екстраката мајкине душице

За хидродестилацију етарског уља *T. serpyllum L.* коришћена су два технолошка поступка: 1) полуиндустријски дестилациони уређај СП-130 који ради на принципу дестилације водом и воденом паром; 2) апаратура по Clevenger-у по поступку који прописује Ph. Jug. V.

Изоловано етарско уље *Thymus serpyllum L.* је течност светло жуте боје, мириса карактеристичног за род *Thymus L.*. Тежина осушене биљне масе која је третирана у уређају СП-130 износила је 5,5 kg. Након обезводњавања са анхидрованим Na₂SO₄ добијено је 4,1 g чистог етарског уља. Остварен принос етарског уља применом дестилационог уређаја СП-130 износио је 0,08 %, док је применом апаратуре по Clevenger-у добијени принос етарског уља износио 0,1 %. У истраживањима *T. serpyllum L.* пореклом из Србије са падина Копаоника, садржај етарског уља је износио 3 ml/kg осушене биљке (~0,3%) (Станисављевић, М. и сар., 2012). У раду Raal, А. и сар. (2004) принос етарског уља *T. serpyllum L.* пореклом из Естоније са 20 различитих локалитета кретао се у опсегу 0,6-4,4 ml/kg, при чему је само принос добијен са једног локалитета био у складу са стандардима Европске фармакопеје (3 ml/kg). Дестилацијом помоћу водене паре из хербе *T. serpyllum L.* пореклом из Пакистана остварен је принос од 0,48% (Ahmad, М. и сар., 2006) и од 29,0 g/kg (Hyssain, I. и сар., 2013). Варијације у приносима етарског уља *T. serpyllum L.* могу се објаснити различитим агроклиматским условима региона.

Остварени приноси екстраката мајкине душице добијених екстракцијом по Soxhlet-у приказани су у табели 4.1.1

Табела 4.1.1: Остварени приноси екстраката мајкине душице добијених екстракцијом по Soxhlet-у

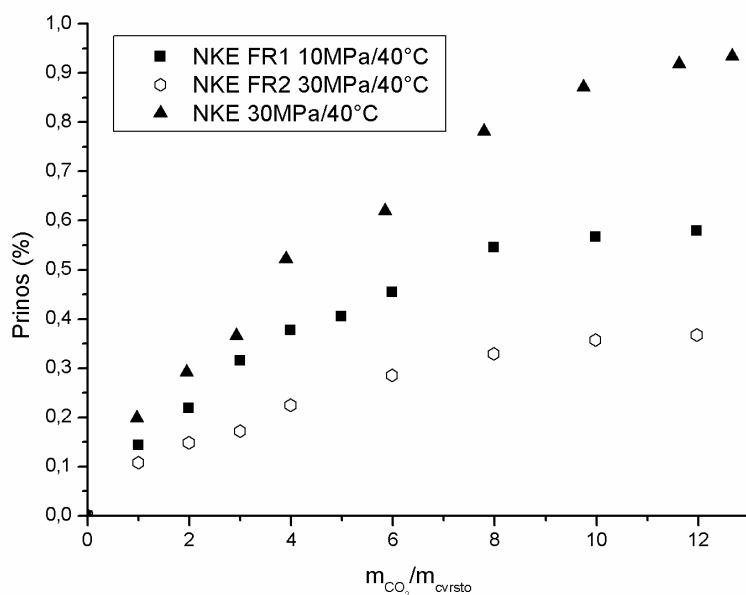
Растварач	Принос, мас. %
Етанол	17,74
п-хексан	1,84
Предтретман п-хексаном па након тога екстракција са етанолом	17,60

Значајно мањи принос екстракта добијеног коришћењем n-хексана условљен је особиним растварача који је неполаран. Остварени приноси надкритичних екстраката мајкине душице и тимијана у односу на експерименталне услове приказани су у табели 4.1.2.

Табела 4.1.2 Остварени приноси надкритичних екстраката

Биљни материјал	Ознака екстракта	Притисак, МПа	Температура, °С	Принос, мас. %
<i>Thymus serpyllum</i>	FR1	10	40	0,579
	FR2	30	40	0,367
<i>Thymus serpyllum</i>	НКЕ 30	30	40	0,934
<i>Thymus vulgaris</i>	НКЕ тимијан	10	40	0,916

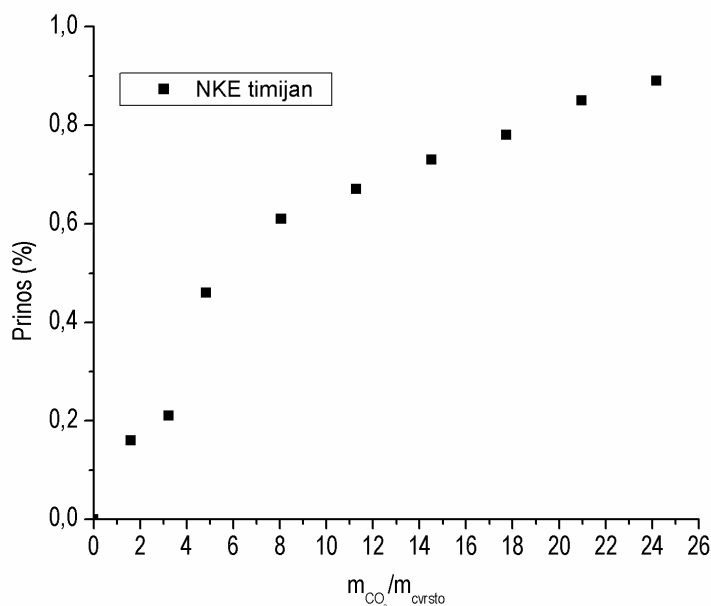
FR1 - екстракција са CO₂ под условима; (P=10 МПа и T=40 °С) у трајању од 69 мин; FR2 – наставак екстракције са CO₂ под условима; (P=30 МПа и T=40 °С) и завршетком након 145 мин; НКЕ 30 - екстракција са CO₂ под условима ; (P=30 МПа и T=40 °С) без прекида и завршетком након 161 мин.



Слика бр 4.1.1 Принос надкритичних екстраката мајкине душице као функција специфичне количине растварача m_{CO_2}/m_{crysto} (кг CO₂/кг биљног материјала)

Као што се може видети на слици 4.1.1 и у табели 4.1.2 остварени приноси надкритичних екстраката мајкине душице на 30 МПа и 40 °С су већи у односу на приносе надкритичних екстраката изолованих на 10 МПа и 40 °С. Већи принос екстракције је постигнут на већем притиску јер са повећањем притиска расте густина надкритичног флуида и растворљивост растварача у НК-CO₂.

Принос надкритичног екстракта мајкине душице на 10 МПа и 40 °С био је нешто нижи у односу на постојеће литературне податке (0,8-0,9 мас. %) (Жижовић и сар., 2006) услед разлике у погледу екстракционих услова. У раду (Жижовић и сар., 2006) примењен је оптималан претретман биљног материјала који се састојао у излагању млевеног биљног материјала као шарже надкритичном НК-СО₂ на радним условима пре почетка екстракције у трајању од једног сата.



Слика бр 4.1.2 Принос надкритичног екстракта тиммијана као функција специфичне количине растварача $m_{CO_2}/m_{\text{суво}}$ (кг СО₂/кг биљног материјала)

Принос надкритичног екстракта тиммијана био је у складу са претодно публикованим (0,75-2,0 мас. %) (Grosso, J. и сар., 2010; Зековић, Р. и сар., 2000).

Разлике у оствареним приносима надкритичних екстраката могу се објаснити на основу различитог квалитета биљног материјала, географског порекла, времена жетве, климатских услова и различитих оперативних услова екстракције.

4.2. Хемијски састав етарских уља и екстраката мајкине душице

4.2.1. Процес хидродестилације

Хемијски састав етарског уља *Thymus serpyllum L.* добијеног методом воде и водене паре уређајем СП-130 приказан је у табели 4.2.1.1.

Табела бр. 4.2.1.1 : Приказ хемијског састава етарског уља *Thymus serpyllum L.* добијеног методом воде и водене паре уређајем СП-130, уређен по класама једињења

Рк	Једињења	KIE	KIL	% m/m	RRT	CI	Класа
Оксидовани монотерпени 19,45 %							
12	1,8-Cineole	1022,7	1026	1,38	0,471	57	Мо
15	cis-Thujone	1099,8	1101	1,89	0,609	78	Мо
16	Linalool	1102,6	1095	0,72	0,615	30	Мо
17	trans-Thujone	1115,0	1112	0,21	0,619	9	Мо
18	α -Campholenal	1124,9	1122	0,24	0,638	10	Мо
19	Camphor	1134,1	1141	0,99	0,690	41	Мо
20	Borneol	1159,6	1165	0,56	0,734	23	Мо
21	Menthol	1170,3	1167	0,26	0,752	11	Мо
22	Terpinen-4-ol	1172,4	1174	0,40	0,760	16	Мо
23	α -Terpineol	1187,9	1186	0,52	0,788	21	Мо
24	Thymol methyl ether	1232,9	1232	0,29	0,869	12	Мо
25	Carvacrol methyl ether	1242,8	1241	0,49	0,882	20	Мо
26	Thymoquinone	1246,7	1248	0,43	0,894	18	Мо
28	Geraniol	1263,0	1257	1,42	0,923	59	Мо
29	Geranial	1274,7	1264	0,50	0,954	21	Мо
30	Bornyl acetate	1279,1	1287	0,27	0,981	11	Мо
31	Thymol	1303,9	1289	7,26	1,000	300	Мо
32	Carvacrol	1313,3	1298	0,61	1,017	25	Мо
34	Terpinyl acetate	1343,9	1346	1,01	1,107	42	Мо
Монотерпенски угљоводоници 9,76 %							
1	α -Pinene	924,9	932	0,51	0,304	21	Му
2	Camphene	938,0	946	0,35	0,326	15	Му
3	Sabinene	973,1	969	0,21	0,372	9	Му
4	β -Pinene	974,0	974	0,67	0,384	28	Му
6	Myrcene	989,8	988	1,64	0,403	68	Му
9	α -Terpinene	1011,1	1014	0,21	0,444	9	Му
10	p-Cymene	1018,8	1020	2,11	0,459	87	Му
11	Limonene	1021,8	1024	1,03	0,466	43	Му

13	trans- β -Ocimene	1047,1	1044	1,55	0,509	64	Mu
14	γ -Terpinene	1052,4	1054	1,48	0,525	61	Mu
Остало 0,48 %							
5	1-Octen-3-ol	985,7	974	0,24	0,397	10	O
7	3-Octanol	1002,1	988	0,24	0,413	10	O
Није идентификовано 0,43 %							
72	n.i.=not identified	1615,7		0,22	1,609	9	
73	n.i.=not identified	1619,3		0,21	1,614	9	
Оксидовани сексвитерпени 34,77 %							
61	cis-Sesquisabinene hydrate	1536,9	1542	0,29	1,466	12	So
62	Elemol	1543,1	1548	0,29	1,474	12	So
64	trans-Nerolidol	1560,5	1561	24,20	1,505	1000	So
65	Caryophyllene oxide	1569,6	1582	1,12	1,528	46	So
66	Thujopsan-2- α -ol	1575,0	1586	0,34	1,544	14	So
67	Viridiflorol	1577,8	1592	0,61	1,547	25	So
68	β -Copaen-4- α -ol	1583,4	1590	0,24	1,564	10	So
69	Humulene epoxide II	1594,7	1608	0,46	1,574	19	So
70	β -Oplophenone	1596,5	1607	0,39	1,581	16	So
71	1,10-di-epi-Cubenol	1602,2	1618	0,43	1,586	18	So
74	epi- α -Cadinol (τ -Cadinol)	1630,0	1638	1,47	1,632	61	So
75	α -Muurolol (Torreyol)	1636,1	1644	0,57	1,640	23	So
77	α -Cadinol	1643,6	1652	2,45	1,653	101	So
78	Helifolenol A	1674,7	1674	0,37	1,693	15	So
79	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1681,3	1685	1,54	1,704	64	So
Сексвитерпенски угљоводоници 35,07 %							
36	α -Copaene	1363,8	1374	0,27	1,153	11	Su
37	β -Bourbonene	1371,4	1387	0,87	1,169	36	Su
38	β -Cubebene	1379,2	1387	0,64	1,179	26	Su
39	β -Elemene	1382,0	1389	0,71	1,186	29	Su
40	β -Caryophyllene	1408,3	1417	2,76	1,233	114	Su
41	β -Copaene	1415,5	1430	0,42	1,253	18	Su
46	α -Humulene	1439,8	1452	0,40	1,297	17	Su
47	allo-Aromadendrene	1453,6	1458	0,34	1,310	14	Su
48	(E)- β -Farnesene	1457,7	1454	2,28	1,314	94	Su
49	γ -Muurolene	1466,0	1478	0,54	1,343	22	Su
50	Germacrene D	1472,0	1484	16,02	1,349	662	Su
53	epi-Bicyclosesquiphellandrene	1481,2	1493	0,22	1,367	9	Su
54	Bicyclogermacrene	1487,1	1500	0,63	1,377	26	Su
55	α -Muurolene	1489,8	1500	0,52	1,387	22	Su
56	β -Bisabolene	1501,0	1505	3,33	1,405	138	Su
57	trans-Calamenene	1510,4	1521	0,97	1,410	40	Su

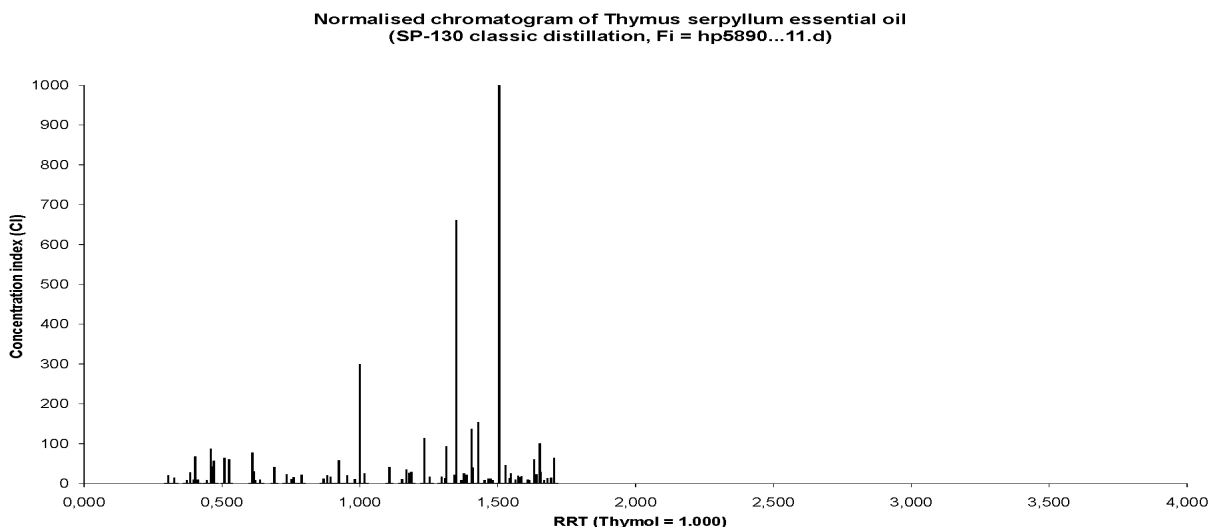
58	δ -Cadinene	1512,9	1522	3,73	1,429	154	Su
60	α -Cadinene	1525,8	1537	0,21	1,452	9	Su
63	α -Calacorene	1552,5	1544	0,21	1,481	9	Su
Збирно =>				99,96			
Број једињења =>				67			

Ознаке : KIE = Коватс (ретенциони) индекс, експериментално одређен (AMDIS)
 KIL = Коватс (ретенциони) индекс - литературни подаци
 RRT = релативно време задржавања на изабраном конституенту, (Тимол = 1.000)
 CI = индекс концентрације

Најзаступљеније компоненте у етарском уљу су: trans-неролидол (24,2%), гермакрен Д (16,0%), тимол (7,3%), δ -кадинен (3,7%) и β -бисаболен (3,3%) што чини 54,5% од укупно 65 идентификованих компоненти. Компоненте етарског уља су груписане у пет група: монотерпенски угљоводоници, оксидовани монотерпени, сесквитерпенски угљоводоници, оксидовани сесквитерпени и остала једињења. Сесквитерпенски угљоводоници (19 једињења, 35,1%) и оксидовани сесквитерпени (15 једињења, 34,8%) представљају најзаступљенију групу хемијских једињења. Оксидовани сесквитерпен trans-неролидол са 24,2% и сесквитерпенски угљоводоник гермакрен-Д са 16,0% су најзаступљеније компоненте у испитиваном етарском уљу. Класа монотерпенских угљоводоника садржи 10 једињења (9,8%) од којих су п-цимен (2,1%), мирцен (1,6%), trans- β -оцимен (1,5%) и γ -терпинен (1,5%) најзаступљенији. Етарско уље такође садржи значајну количину оксидованих монотерпена (19,4%) од којих су тимол (7,3%), cis-тујон (1,9%), гераниол (1,4%), 1,8-цинеол (1,4%) и терпинил-ацетат (1,0%) најзаступљенији. Остала једињења међу којима се налазе и два једињења која нису идентификована су заступљена са 0,9 %. У херби мајкине душице укупно је идентификовано 65 компоненти што представља 99,57 % испитиваног етарског уља (Петровић, С. и сар., 2013) На слици 4.2.1.1 приказан је нормализовани хроматограм испитиваног етарског уља.

У раду који се бавио анализом етарског уља *T. serpyllum L.* са подручја Копаоника идентификовано је укупно 26 компоненти што је представљало 98,4 % етарског уља (Станисављевић, М. и сар. 2012). У поменутом раду садржај сесквитерпенских компоненти износио је 60,5% (доминантно једињење је био trans-кариофилен са 27,7%), док је садржај монотерпенских компоненти износио 37,9% (доминантно једињење је био α -пинен са 6,9%). У овом раду садржај сесквитерпенских компоненти износио је 69,84% (доминантна једињења су trans-неролидол са 24,20% и сесквитерпенски угљоводоник гермакрен-Д са

16,02%), док је садржај монотерпенских компоненти износио 29,21% (доминантно једињење је био тимол 7,26%).



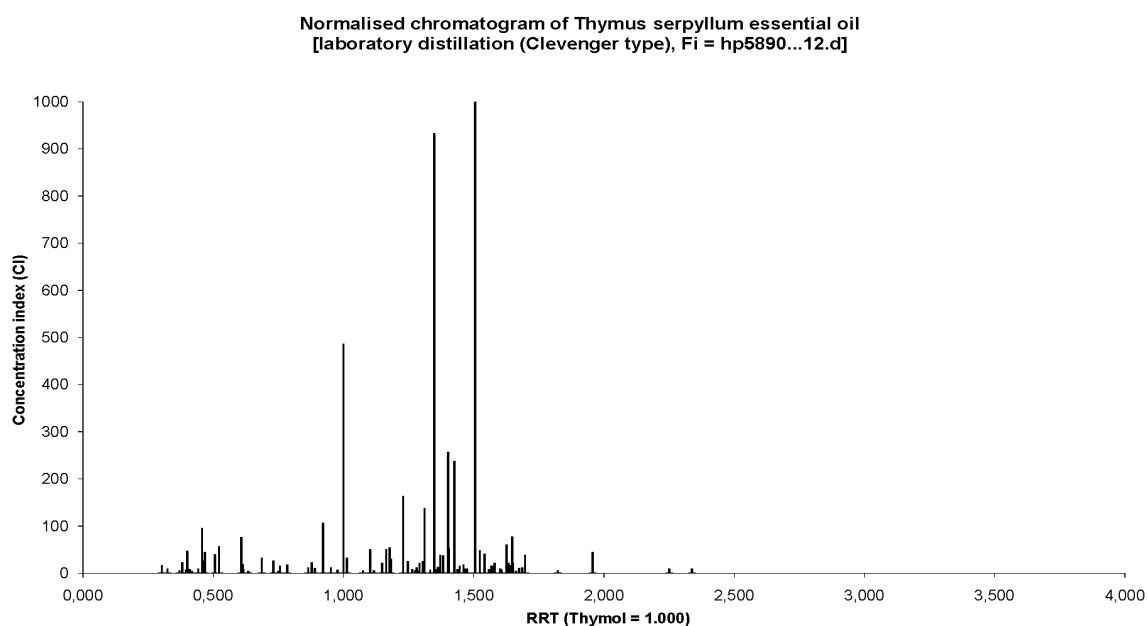
Слика бр. 4.2.1.1 Нормализовани хроматограм етарског уља мајкине душице добијеног уређајем СП-130

Упоредна анализа резултата хемијског састава етарског уља *T. serpyllum* добијених у оквиру испитивања у овом раду са резултатима из литературних података (Николић, М. и сар., 2014 ; Hussain, I. и сар., 2013; Станисављевић, М. и сар., 2012; Ummihan, U. и сар., 2008 ; Ahmad, M. и сар., 2006 ; Kulisić, T. и сар., 2005 ; Банаева, А. и сар., 1999;) указују на велике супротности и разлике када се говори о доминантним једињењима у етарском уљу, што је највероватније последица утицаја различитих климатских и земљишних фактора на биосинтезу ових секундарних метаболита. Интересантно је да је највећа подударност са нашим етарским уљем по питању доминантне компоненте, нађена у етарском уљу *T. serpyllum* пореклом из Русије, са подручја Алтаја (Banaeva, A. и сар., 1999) ; (планина Коливан, 150 м.н.в.), код кога су главни састојци уља били trans-неролидол (29,8%), 1,8-цинеол (14,0%), cis- β -терпинеол (8,2%), β -мирцен (4,0%), камфор (4,0%) и п-цимен (3,8%).

Табела 4.2.1.2 ; Упоредна анализа хемијског састава етарског уља *Thymus serpyllum* L.

Литература	Резултати истраживања	Резултати истраживања	Банаева, А. и сар., 1999	Ahmad, M. и сар., 2006	Ummihan, U. и сар., 2008	Станисављевић, М. и сар., 2012	Кулишић, Т. и сар., 2005	Hussain, I. и сар., 2013	Николић и сар., 2014
Метода издвајања етарског уља	Дестилација водом и воденом паром SP-130	Дестилација водом - Clevenger	Дестилација водом	Дестилација воденом паром	Дестилација водом - Clevenger	Дестилација водом - Clevenger	Дестилација водом - Clevenger	Дестилација водом - Clevenger	Дестилација водом - Clevenger
Порекло	Србија	Србија	Русија	Пакистан	Турска	Србија	Хрватска	Пакистан	Србија
Монотерпенски угљоводоници	9,76%	6,7%	9,5%	93,69%	81,9%	37,9%	12,2%	22,5%	26,3
Оксидовани монотерпени	19,45%	19,49%	41,8%				79,4%	63,0%	54,3
Сексвитерпенски и угљоводоници	35,07%	43,51%	5,9%	/	10,86%	60,5%	3,5%	8,17%	3,1
Оксидовани сексвитерпени	34,77%	28,92	40,6%				2,37%	1,1	
Остало + неидентификована једињења	0,91%	1,19%	1,9%	/	6,7%	/	/	/	14,7
Доминантна једињења	trans-неролидол (24,2%), гермакрен Д (16,02%), тимол (7,26%), δ-кадинен (3,73%), β-бисаболен (3,33%)	trans-неролидол (19,79%), гермакрен Д (18,48%), тимол (9,62%), β-бисаболен (5,1%), δ-кадинен (4,72%), β-кариофилен (3,25%)	trans-неролидол (29,8 %), 1,8-цинеол (14,0 %), cis-β-терпинеол (8,2 %), β-мирцен (4,0 %), камфор (4,0 %), п-цимол (3,8 %)	тимол (53,3%), карвакрол (10,4%), п-цимен (8,8%), карен (5,1%), камфор (4,9%)	2,4,6-триметиланизол (73,41%), 3,5-диметилбензоева киселина (5,38%), β-бисаболен (3,67%).	trans-кариофилен (27,7%), γ-муролен (10,5%), α-хумулен (7,5%), α-пинен (6,9%), 3-октанон (6,6%), тимол (5,6%), камфор (3,6%)	тимол (30%), карвакрол (49,4%), γ-терпинен (5,3%) п-цимен (5,2%), кариофилен (3,5%)	карвакрол (44,4%), о-цимен (14,0%), α-терпинеол (6,47%), α-пинен (6,06%), β-кариофилен (5,25%), 1,8-цинеол (3,44%)	ТИМОЛ (38,5), p-cimene (8,9%), γ-терпинен (7,2%), борнил ацетат (7%), борнеол (6%), карвакрол (4,7%)
Број укупно идентификованих једињења	65	79	42	20	35	26	8	35	45
Укупно	99,96%	100%	96,6%	93,69%	99,47%	98,4%	95,1%	96,0%	99,64%

Хемијски састав етарског уља *Thymus serpyllum* L. добијеног у апаратури по Clevenger-у приказан је у табели 4.2.1.3.



Слика бр. 4.2.1.2 ; Нормализовани хроматограм етарског уља мајкине душице добијеног Clevenger апаратуром

Табела бр. 4.2.1.3: Приказ хемијског састава етарског уља *Thymus serpyllum* L. добијеног у лабораторијским условима са Clevenger апаратом, уређен по класама једињења

Рб	Једињења	KIE	KIL	% m/m	RRT	CI	Класа
Оксидовани монотерпени 19,49 %							
12	1,8-Cineole	1022,7	1026	0,89	0,468	45	Мо
15	cis-Thujone	1099,8	1101	1,51	0,607	76	Мо
16	Linalool	1102,6	1095	0,38	0,612	19	Мо
17	trans-Thujone	1115,0	1112	0,17	0,616	9	Мо
18	α -Campholenal	1124,9	1122	0,10	0,634	5	Мо
19	Camphor	1134,1	1141	0,64	0,686	32	Мо
20	Borneol	1159,6	1165	0,53	0,730	27	Мо
21	Menthol	1170,3	1167	0,09	0,750	5	Мо
22	Terpinen-4-ol	1172,4	1174	0,30	0,756	15	Мо
23	α -Terpineol	1187,9	1186	0,37	0,784	19	Мо
24	Thymol methyl ether	1232,9	1232	0,24	0,865	12	Мо
25	Carvacrol methyl ether	1242,8	1241	0,46	0,878	23	Мо
26	Thymoquinone	1246,7	1248	0,21	0,890	11	Мо
28	Geraniol	1263,0	1257	2,11	0,922	106	Мо
29	Geranial	1274,7	1264	0,24	0,951	12	Мо
30	Bornyl acetate	1279,1	1287	0,14	0,977	7	Мо
31	Thymol	1303,9	1289	9,62	1,000	486	Мо

32	Carvacrol	1313,3	1298	0,66	1,014	33	Mo
34	Terpinyl acetate	1343,9	1346	1,00	1,103	51	Mo
Монотерпенски угљоводоници 6,70 %							
1	α -Pinene	924,9	932	0,33	0,302	17	Mu
2	Camphene	938,0	946	0,21	0,324	10	Mu
3	Sabinene	973,1	969	0,13	0,370	7	Mu
4	β -Pinene	974,0	974	0,46	0,381	23	Mu
6	Myrcene	989,8	988	0,94	0,401	47	Mu
8	α -Phellandrene	1009,1	1002	0,09	0,418	4	Mu
9	α -Terpinene	1011,1	1014	0,20	0,442	10	Mu
10	p-Cymene	1018,8	1020	1,89	0,457	96	Mu
11	Limonene	1021,8	1024	0,53	0,464	27	Mu
13	trans- β -Ocimene	1047,1	1044	0,80	0,506	40	Mu
14	γ -Terpinene	1052,4	1054	1,13	0,522	57	Mu
Остало 0,66 %							
5	1-Octen-3-ol	985,7	974	0,14	0,394	7	O
7	3-Octanol	1002,1	988	0,17	0,409	9	O
59	Methyl dodecanoate	1523,8	1524	0,16	1,437	8	O
94	Oleic acid	2108,1	2112	0,19	2,338	10	O
Оксидовани дитерпени 0,19 %							
91	Manool	2044,1	2056	0,19	2,250	10	Do
Није идентификовано 0,34 %							
72	n.i.=not identified	1615,7		0,19	1,602	9	
73	n.i.=not identified	1619,3		0,15	1,608	8	
Оксидовани сесквитерпени 28,92 %							
61	cis-Sesquisabinene hydrate	1536,9	1542	0,36	1,460	18	So
62	Elemol	1543,1	1548	0,20	1,468	10	So
64	trans-Nerolidol	1560,5	1561	19,79	1,506	1000	So
65	Caryophyllene oxide	1569,6	1582	0,97	1,523	49	So
67	Viridiflorol	1577,8	1592	0,81	1,541	41	So
68	β -Copaen-4- α -ol	1583,4	1590	0,17	1,558	9	So
69	Humulene epoxide II	1594,7	1608	0,32	1,568	16	So
70	β -Oplopenone	1596,5	1607	0,32	1,575	16	So
71	1,10-di-epi-Cubenol	1602,2	1618	0,44	1,580	22	So
74	epi- α -Cadinol (τ -Cadinol)	1630,0	1638	1,20	1,626	61	So
75	α -Muurolol (Torreyol)	1636,1	1644	0,43	1,634	22	So
76	Ledene oxide II*	1640,7	n/a	0,34	1,643	17	So
77	α -Cadinol	1643,6	1652	1,53	1,647	77	So
78	Helifolenol A	1674,7	1674	0,25	1,687	13	So
79	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1681,3	1685	0,76	1,697	38	So
81	(2E,6E)-Farnesol	1751,7	1742	0,11	1,823	6	So
85	Hexahydrofarnesyl acetone	1848,3	1848	0,90	1,956	45	So
Сесквитерпенски угљоводоници 43,51 %							
33	α -Cubebene	1341,2	1345	0,12	1,074	6	Su
35	α -Ylangene	1360,5	1373	0,11	1,116	6	Su

36	α -Copaene	1363,8	1374	0,43	1,148	22	Su
37	β -Bourbonene	1371,4	1387	1,02	1,164	52	Su
38	β -Cubebene	1379,2	1387	1,05	1,177	55	Su
39	β -Elemene	1382,0	1389	0,61	1,181	31	Su
40	β -Caryophyllene	1408,3	1417	3,25	1,229	164	Su
41	β -Copaene	1415,5	1430	0,50	1,247	25	Su
42	β -Gurjunene	1426,4	1431	0,16	1,264	8	Su
43	6,9-Guaiadiene	1432,2	1442	0,11	1,276	6	Su
44	cis-Muuroala-3,5-diene	1434,0	1448	0,24	1,280	12	Su
45	trans-Muuroala-3,5-diene	1437,0	1451	0,10	1,287	5	Su
46	α -Humulene	1439,8	1452	0,44	1,291	22	Su
47	allo-Aromadendrene	1453,6	1458	0,51	1,305	26	Su
48	(E)- β -Farnesene	1457,7	1454	2,74	1,311	139	Su
49	γ -Muurolene	1466,0	1478	0,14	1,333	7	Su
50	Germacrene D	1472,0	1484	18,48	1,349	934	Su
51	β -Selinene	1478,5	1489	0,17	1,353	9	Su
52	ar-Curcumene	1480,6	1484	0,16	1,357	8	Su
53	epi-Bicyclosesquiphellandrene	1481,2	1493	0,28	1,363	14	Su
54	Bicyclogermacrene	1487,1	1500	0,77	1,371	39	Su
55	α -Muurolene	1489,8	1500	0,74	1,381	37	Su
56	β -Bisabolene	1501,0	1505	5,10	1,402	257	Su
57	trans-Calamenene	1510,4	1521	1,07	1,405	54	Su
58	δ -Cadinene	1512,9	1522	4,72	1,425	238	Su
60	α -Cadinene	1525,8	1537	0,30	1,447	15	Su
63	α -Calacorene	1552,5	1544	0,19	1,475	9	Su

Zbirno =>			100,00				
Broj jedinjenja =>			81				

4.2.2. Екстракција по Soxhlet-у

Хемијски састав етарског уља *Thymus serpyllum L.* добијеног екстракцијом по Soxlet -у приказан је у табели 4.2.2.1.

Табела бр 4.2.2.1: Приказ хемијског састава екстракта *Thymus serpyllum L.* добијеног у лабораторијским условима са Soxlet апаратом (екстракција етанолом 70%), уређен по класама једињења

РБ	Једињења	КІЕ	КІЛ	% m/m	СІ	Класа
Оксидовани дитерпени 2,34 %						
95	trans-Phytol	2119,6	2122	2,34	115	Do
Дитерпенски угљоводоници 0,6 %						
84	Neophytadiene, Isomer III	1840,4	1849	0,52	26	Du
87	Neophytadiene isomer*	1865,4	n/a	0,08	4	Du
Оксидовани монотерпени 8,13 %						
18	α -Campholenal	1124,9	1122	0,87	43	Mo
20	Borneol	1159,6	1165	0,26	13	Mo
22	Terpinen-4-ol	1172,4	1174	1,68	83	Mo
23	α -Terpineol	1187,9	1186	0,86	42	Mo
24	Thymol methyl ether	1232,9	1232	1,70	83	Mo
26	Thymoquinone	1246,7	1248	0,36	17	Mo
27	Linalool acetate	1255,4	1254	0,22	11	Mo
31	Thymol	1303,9	1289	0,49	24	Mo
32	Carvacrol	1313,3	1298	0,69	34	Mo
34	Terpinyl acetate	1343,9	1346	1,01	50	Mo
Монотерпенски угљоводоници 0,31 %						
14	γ -Terpinene	1052,4	1054	0,31	15	Mu
Нису идентификована 0,64 %						
105	n.i.=not identified	2680,1		0,30	15	
106	n.i.=not identified	2688,1		0,20	10	
116	n.i.=not identified	2940,3		0,14	7	
Остало 79,52 %						
86	Hexadecanol	1853,5	1874	0,07	3	O
88	1-Nonadecene	1878,9	1875	0,13	7	O
90	Ethyl hexadecanoate	1999,1	1992	4,12	203	O
93	Methyl oleate	2103,1	2107	0,04	2	O
94	Oleic acid	2108,1	2112	0,65	32	O
96	Tricosane	2302,7	2300	0,04	2	O
97	Tetracosane	2402,2	2400	6,67	328	O
99	3-Methyltetracosane	2466,3	2474	0,29	14	O
100	Pentacosane	2504,8	2500	0,06	3	O

101	3-Ethyltetracosane	2578,6	n/a	0,88	43	O
103	Tetracosanal	2637,4	2614	20,34	1000	O
107	Heptacosane	2714,4	2700	0,82	40	O
109	3-Methylheptacosane	2785,9	2773	0,19	9	O
110	Octacosane	2812,5	2800	0,90	44	O
112	1-Hexacosanol	2847,6	2859	0,48	23	O
113	3-Methyloctacosane	2873,1	n/a	0,33	16	O
114	2-Methyloctacosane	2883,3	n/a	0,29	14	O
115	Nonacosane	2922,8	2900	15,46	760	O
118	3-Methylnonacosane	2981,7	2972	0,24	12	O
119	Triacotane	3005,6	3000	3,80	187	O
120	1-Heptacosanol	3041,2	3016	0,10	5	O
121	3-Methyltriacotane	3061,8	3078	0,29	14	O
122	2-Methyltriacotane*	3071,3	n/a	0,32	16	O
123	Untriacotane	3104,4	3100	17,55	863	O
124	α -Tocopherol (vitamin E)	3117,5	3130	0,15	8	O
125	α -Tocopherolquinone	3131,7	n/a	1,94	96	O
126	3-Methylhentriacotane	3171,3	3173	0,63	31	O
127	Dotriacotane	3202,3	3200	0,51	25	O
130	Tritriacotane	3332,2	3300	2,23	109	O
Оксидовани сексвитерпени 2,53 %						
61	cis-Sesquisabinene hydrate	1536,9	1542	0,12	6	So
64	trans-Nerolidol	1560,5	1561	1,15	57	So
65	Caryophyllene oxide	1569,6	1582	0,10	5	So
66	Thujopsan-2- α -ol	1575,0	1586	0,02	1	So
67	Viridiflorol	1577,8	1592	0,03	2	So
70	β -Oplophenone	1596,5	1607	0,08	4	So
76	Ledene oxide II*	1640,7	n/a	0,08	4	So
77	α -Cadinol	1643,6	1652	0,10	5	So
78	Helifolenol A	1674,7	1674	0,04	2	So
79	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1681,3	1685	0,07	4	So
80	Oplopanone	1733,1	1739	0,67	33	So
81	(2E,6E)-Farnesol	1751,7	1742	0,20	10	So
82	8 α -11-Elemodiol	1754,7	1746	0,17	8	So
83	2- α -Acetoxy-amorpha-4,7(11)-diene	1817,5	1805	0,15	7	So
85	Hexahydrofarnesyl acetone	1848,3	1848	0,20	10	So
Сексвитерпенски угљоводоници 4,53 %						
35	α -Ylangene	1360,5	1373	0,55	27	Su
36	α -Copaene	1363,8	1374	1,03	51	Su
37	β -Bourbonene	1371,4	1387	0,23	11	Su
38	β -Cubebene	1379,2	1387	0,25	12	Su
40	β -Caryophyllene	1408,3	1417	0,18	9	Su
42	β -Gurjunene	1426,4	1431	0,25	12	Su

50	Germacrene D	1472,0	1484	0,27	13	Su
51	β -Selinene	1478,5	1489	0,30	15	Su
52	ar-Curcumene	1480,6	1484	0,28	14	Su
56	β -Bisabolene	1501,0	1505	0,06	3	Su
57	trans-Calamenene	1510,4	1521	0,84	41	Su
58	δ -Cadinene	1512,9	1522	0,19	9	Su
60	α -Cadinene	1525,8	1537	0,07	4	Su
Тритерпенски угљоводоници 0,21 %						
111	Squalene	2835,5	2847	0,21	10	Tu
Оксидовани тритерпени %						
129	β -Sitosterol	3296,4	n/a	0,57	28	To
Збирно =>				99,38%		
Број једињења =>				76		

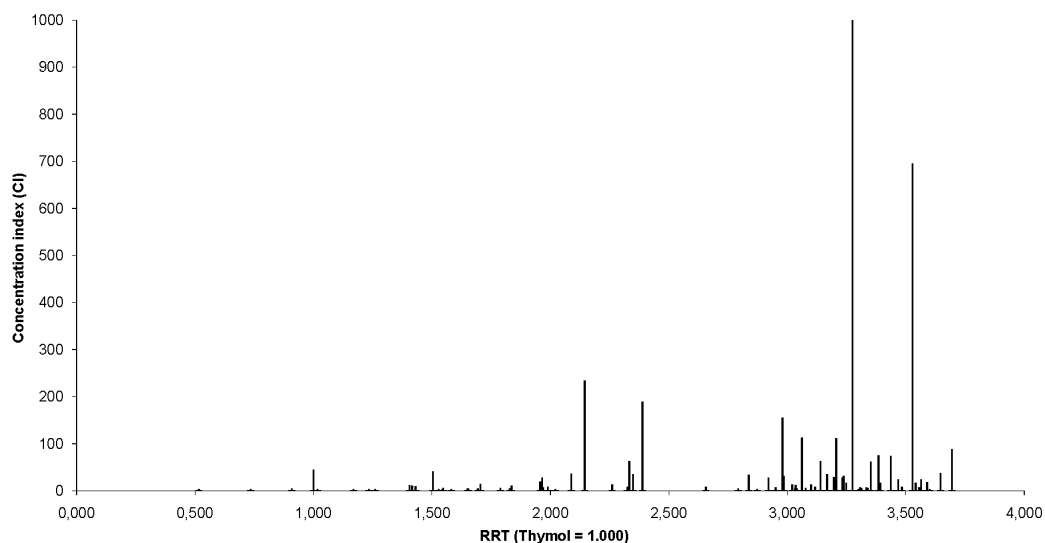
Табела 4.2.2.2: Приказ хемијског састава екстракта *Thymus serpyllum* L. добијеног у лабораторијским условима са Soxhlet апаратом (екстракција n-heksanom), уређен по класама једињења

РБ	Једињења	KIE	KIL	% m/m	CI	Класа
Оксидовани дитерпени 4,39 %						
91	Manool	2044,1	2056	0,36	13	Do
95	trans-Phytol	2119,6	2122	4,03	189	Do
Дитерпенски угљоводоници 0,77 %						
84	Neophytadiene, Isomer III	1840,4	1849	0,54	20	Du
87	Neophytadiene isomer*	1865,4	n/a	0,23	8	Du
Оксидовани монотерпени 1,65 %						
20	Borneol	1159,6	1165	0,09	3	Mo
27	Linalool acetate	1255,4	1254	0,12	5	Mo
31	Thymol	1303,9	1289	1,23	45	Mo
32	Carvacrol	1313,3	1298	0,11	4	Mo
Монотерпенски угљоводоници 0,09 %						
14	γ -Terpinene	1052,4	1054	0,09	3	Mu
Нису идентификована 0,92 %						
105	n.i.=not identified	2680,1		0,34	12	
106	n.i.=not identified	2688,1		0,12	4	
108	n.i.=not identified	2724,5		0,16	6	
116	n.i.=not identified	2940,3		0,11	4	
117	n.i.=not identified	2948,4		0,20	7	
Остало 77,81 %						
86	Hexadecanol	1853,5	1874	0,20	7	O
88	1-Nonadecene	1878,9	1875	0,11	4	O

89	Methyl palmitate	1930,4	1921	0,99	36	O
90	Ethyl hexadecanoate	1999,1	1992	6,38	235	O
92	Methyl linoleate	2095,6	2095	0,24	9	O
93	Methyl oleate	2103,1	2107	1,71	63	O
94	Oleic acid	2108,1	2112	0,97	36	O
96	Tricosane	2302,7	2300	0,22	8	O
98	Docosanal	2430,6	2434	0,14	5	O
99	3-Methyltetracosane	2466,3	2474	0,92	34	O
100	Pentacosane	2504,8	2500	0,11	4	O
101	3-Ethyltetracosane	2578,6	n/a	0,74	27	O
102	Hexacosane	2603,7	2600	0,19	7	O
103	Tetracosanal	2637,4	2614	5,09	188	O
104	3-Methylhexacosane	2670,5	2672	0,37	14	O
107	Heptacosane	2714,4	2700	3,07	113	O
109	3-Methylheptacosane	2785,9	2773	1,71	63	O
110	Octacosane	2812,5	2800	0,96	35	O
112	1-Hexacosanol	2847,6	2859	3,04	112	O
113	3-Methyloctacosane	2873,1	n/a	0,86	32	O
114	2-Methyloctacosane	2883,3	n/a	0,45	16	O
115	Nonacosane	2922,8	2900	27,17	1000	O
119	Triacontane	3005,6	3000	2,06	76	O
120	1-Heptacosanol	3041,2	3016	2,00	74	O
121	3-Methyltriacontane	3061,8	3078	0,66	24	O
122	2-Methyltriacontane*	3071,3	n/a	0,25	9	O
123	Untriacontane	3104,4	3100	18,88	695	O
124	α -Tocopherol (vitamin E)	3117,5	3130	0,46	17	O
125	α -Tocopherolquinone	3131,7	n/a	0,20	8	O
126	3-Methylhentriacontane	3171,3	3173	0,66	24	O
127	Dotriacontane	3202,3	3200	0,47	18	O
130	Tritriacontane	3332,2	3300	2,42	89	O
Оксидовани сесквитерпени 3,74 %						
64	trans-Nerolidol	1560,5	1561	1,12	41	So
65	Caryophyllene oxide	1569,6	1582	0,11	4	So
66	Thujopsan-2- α -ol	1575,0	1586	0,10	4	So
67	Viridiflorol	1577,8	1592	0,16	6	So
70	β -Oplophenone	1596,5	1607	0,10	4	So
76	Ledene oxide II*	1640,7	n/a	0,13	5	So
77	α -Cadinol	1643,6	1652	0,12	4	So
78	Helifolenol A	1674,7	1674	0,15	5	So
79	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1681,3	1685	0,40	15	So
80	Oplopanone	1733,1	1739	0,16	6	So
81	(2E,6E)-Farnesol	1751,7	1742	0,13	5	So
82	8 α -11-Elemodiol	1754,7	1746	0,30	11	So

85	Hexahydrofarnesyl acetone	1848,3	1848	0,77	28	So
Сесквитерпенски угљоводоници 1,22 %						
37	β -Bourbonene	1371,4	1387	0,10	4	Su
40	β -Caryophyllene	1408,3	1417	0,09	3	Su
42	β -Gurjunene	1426,4	1431	0,10	4	Su
56	β -Bisabolene	1501,0	1505	0,35	13	Su
57	trans-Calamenene	1510,4	1521	0,30	11	Su
58	δ -Cadinene	1512,9	1522	0,28	10	Su
Тритерпенски угљоводоници 2,46 %						
111	Squalene	2835,5	2847	0,79	29	Tu
118	3-Methylnonacosane	2981,7	2972	1,67	62	Tu
Оксидовани тритерпени 1,13 %						
128	Stigmasterol	3223,8	3248	0,11	4	To
129	β -Sitosterol	3296,4	n/a	1,02	38	To
Збирно =>				100,00		
Број једињења =>				69		

Normalised chromatogram of *Thymus serpyllum* extract obtained by classic extraction (Soxhlet extraction with n-hexane, Fi = hp5890...17.d)



Слика бр. 4.2.2.1; Нормализовани хроматограм екстракта мајкине душице добијеног Soxlet апаратом са n-хексаном

Табела бр. 4.2.2.3: Приказ хемијског састава екстракта *Thymus serpyllum* L. добијеног у лабораторијским условима са Soxlet апаратом (екстракција n-хексаном па затим етанолом), уређен по класама једињења

РБ	Једињења	KIE	KIL	% m/m	RRT	CI	Класа
Оксидовани дитерпени 7,88 %							
91	Manool	2044,1	2056	0,14	2,240	7	Do
95	trans-Phytol	2119,6	2122	7,74	2,364	386	Do
Дитерпенски угљоводоници 1,35 %							

84	Neophytadiene, Isomer III	1840,4	1849	0,93	1,938	46	Du
87	Neophytadiene isomer*	1865,4	n/a	0,42	1,972	21	Du
Нису идентификована 1,52 %							
105	n.i.=not identified	2680,1		0,39	3,005	20	
106	n.i.=not identified	2688,1		0,74	3,010	37	
108	n.i.=not identified	2724,5		0,14	3,045	7	
116	n.i.=not identified	2940,3		0,18	3,268	9	
117	n.i.=not identified	2948,4		0,07	3,274	3	
Остало 64,21 %							
59	Methyl dodecanoate	1523,8	1524	0,05	1,422	2	O
86	Hexadecanol	1853,5	1874	0,19	1,953	10	O
88	1-Nonadecene	1878,9	1875	0,24	2,002	12	O
89	Methyl palmitate	1930,4	1921	0,01	2,068	1	O
90	Ethyl hexadecanoate	1999,1	1992	10,82	2,123	539	O
92	Methyl linoleate	2095,6	2095	0,03	2,303	1	O
93	Methyl oleate	2103,1	2107	0,07	2,311	3	O
94	Oleic acid	2108,1	2112	1,81	2,326	90	O
96	Tricosane	2302,7	2300	0,07	2,630	4	O
98	Docosanal	2430,6	2434	0,05	2,765	2	O
99	3-Methyltetracosane	2466,3	2474	0,32	2,809	16	O
100	Pentacosane	2504,8	2500	0,04	2,843	2	O
101	3-Ethyltetracosane	2578,6	n/a	0,30	2,891	15	O
102	Hexacosane	2603,7	2600	0,12	2,921	6	O
103	Tetracosanal	2637,4	2614	0,09	2,963	5	O
104	3-Methylhexacosane	2670,5	2672	0,10	2,990	5	O
107	Heptacosane	2714,4	2700	2,06	3,031	103	O
109	3-Methylheptacosane	2785,9	2773	0,56	3,108	28	O
110	Octacosane	2812,5	2800	1,29	3,136	64	O
112	1-Hexacosanol	2847,6	2859	0,02	3,173	1	O
113	3-Methyloctacosane	2873,1	n/a	0,82	3,205	41	O
114	2-Methyloctacosane	2883,3	n/a	0,79	3,216	40	O
115	Nonacosane	2922,8	2900	20,05	3,240	1000	O
118	3-Methylnonacosane	2981,7	2972	0,99	3,318	50	O
119	Triacontane	3005,6	3000	1,68	3,351	84	O
120	1-Heptacosanol	3041,2	3016	0,17	3,409	9	O
121	3-Methyltriacontane	3061,8	3078	0,59	3,433	29	O
122	2-Methyltriacontane*	3071,3	n/a	0,32	3,448	16	O
123	Untriacontane	3104,4	3100	16,36	3,490	816	O
124	α -Tocopherol (vitamin E)	3117,5	3130	0,62	3,508	31	O
125	α -Tocopherolquinone	3131,7	n/a	0,16	3,521	8	O
126	3-Methylhentriacontane	3171,3	3173	0,56	3,528	28	O
127	Dotriacontane	3202,3	3200	0,07	3,556	3	O
130	Tritriacontane	3332,2	3300	2,76	3,658	137	O
Оксидовани сексвитерпени 5,68 %							
61	cis-Sesquisabinene hydrate	1536,9	1542	0,18	1,451	9	So
64	trans-Nerolidol	1560,5	1561	1,94	1,493	97	So
65	Caryophyllene oxide	1569,6	1582	0,13	1,514	7	So

66	Thujopsan-2- α -ol	1575,0	1586	0,04	1,533	2	So
67	Viridiflorol	1577,8	1592	0,08	1,537	4	So
70	β -Oplophenone	1596,5	1607	0,03	1,570	1	So
75	α -Muurolol (Torreyol)	1636,1	1644	0,18	1,617	9	So
76	Ledene oxide II*	1640,7	n/a	0,05	1,636	3	So
77	α -Cadinol	1643,6	1652	0,22	1,640	11	So
78	Helifolenol A	1674,7	1674	0,04	1,679	2	So
79	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1681,3	1685	0,27	1,691	13	So
80	Oplopanone	1733,1	1739	0,88	1,773	44	So
81	(2E,6E)-Farnesol	1751,7	1742	0,30	1,815	15	So
82	8 α -11-Elementol	1754,7	1746	0,33	1,820	17	So
83	2- α -Acetoxy-amorpha-4,7(11)-diene	1817,5	1805	0,54	1,900	27	So
85	Hexahydrofarnesyl acetone	1848,3	1848	0,47	1,947	23	So
Сесквитерпенски угљоводоници 5,48 %							
35	α -Ylangene	1360,5	1373	0,54	1,106	27	Su
36	α -Copaene	1363,8	1374	1,40	1,141	70	Su
37	β -Bourbonene	1371,4	1387	0,27	1,158	13	Su
38	β -Cubebene	1379,2	1387	0,14	1,169	7	Su
39	β -Elemene	1382,0	1389	0,12	1,176	6	Su
40	β -Caryophyllene	1408,3	1417	0,12	1,225	6	Su
42	β -Gurjunene	1426,4	1431	0,30	1,254	15	Su
50	Germacrene D	1472,0	1484	0,64	1,338	32	Su
51	β -Selinene	1478,5	1489	0,13	1,345	6	Su
52	ar-Curcumene	1480,6	1484	0,22	1,350	11	Su
53	epi-Bicyclosesequiphellandrene	1481,2	1493	0,11	1,356	5	Su
54	Bicyclogermacrene	1487,1	1500	0,03	1,361	1	Su
56	β -Bisabolene	1501,0	1505	0,21	1,393	10	Su
57	trans-Calamenene	1510,4	1521	0,95	1,409	47	Su
58	δ -Cadinene	1512,9	1522	0,13	1,418	7	Su
60	α -Cadinene	1525,8	1537	0,03	1,429	1	Su
63	α -Calacorene	1552,5	1544	0,04	1,471	2	Su
Тритерпенски угљоводоници 0,42 %							
111	Squalene	2835,5	2847	0,42	3,164	21	Tu
Оксидовани тритерпени 0,95 %							
128	Stigmasterol	3223,8	3248	0,05	3,564	3	To
129	β -Sitosterol	3296,4	n/a	0,90	3,610	45	To
Оксидовани монотерпени 12,62 %							
18	α -Campholenal	1124,9	1122	0,83	0,635	41	Mo
19	Camphor	1134,1	1141	1,92	0,697	96	Mo
20	Borneol	1159,6	1165	0,64	0,724	32	Mo
22	Terpinen-4-ol	1172,4	1174	2,53	0,765	126	Mo
23	α -Terpineol	1187,9	1186	1,07	0,797	53	Mo
24	Thymol methyl ether	1232,9	1232	1,84	0,879	92	Mo
26	Thymoquinone	1246,7	1248	0,41	0,893	20	Mo
27	Linalool acetate	1255,4	1254	0,55	0,914	27	Mo
31	Thymol	1303,9	1289	0,44	1,000	22	Mo
32	Carvacrol	1313,3	1298	1,13	1,017	56	Mo

34	Terpinyl acetate	1343,9	1346	1,26	1,099	63	Mo
	Збирно =>			100			
	Број једињења =>			90			

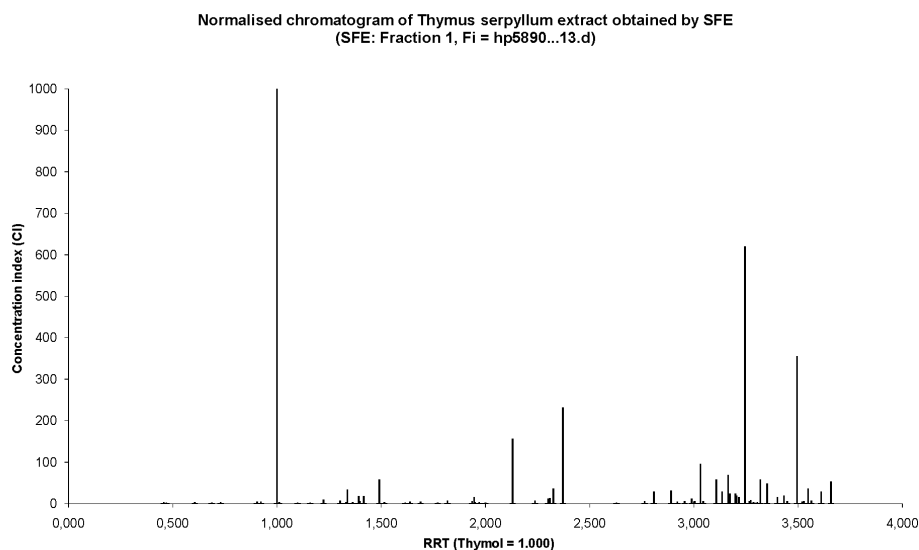
4.2.3. Надкритична екстракција

Хемијски састав екстраката *Thymus serpyllum L.* добијених на лабораторијском постројењу за НКЕ приказан је у табелама 4.2.3.1.- 4.2.3.3.

Табела бр. 4.2.3.1: Приказ хемијског састава екстракта *Thymus serpyllum L.* добијеног надкритичном екстракцијом са CO₂ FR1 (P=10 МПа и T=40 °C), уређен по класама једињења

Рк	Једињења	KIE	KIL	% m/m	RRT	CI	Класа
Оксидовани дитерпени 7,02 %							
91	Manool	2044,1	2056	0,21	2,238	7	Do
95	trans-Phytol	2119,6	2122	6,81	2,372	232	Do
Дитерпенски угљоводоници 0,29 %							
84	Neophytadiene, Isomer III	1840,4	1849	0,18	1,936	6	Du
87	Neophytadiene isomer*	1865,4	n/a	0,11	1,970	4	Du
Оксидовани монотерпени 30,24 %							
12	1,8-Cineole	1022,7	1026	0,08	0,468	3	Mo
15	cis-Thujone	1099,8	1101	0,12	0,606	4	Mo
19	Camphor	1134,1	1141	0,08	0,687	3	Mo
20	Borneol	1159,6	1165	0,09	0,730	3	Mo
27	Linalool acetate	1255,4	1254	0,14	0,904	5	Mo
28	Geraniol	1263,0	1257	0,16	0,922	5	Mo
31	Thymol	1303,9	1289	29,36	1,000	1000	Mo
32	Carvacrol	1313,3	1298	0,12	1,011	4	Mo
34	Terpinyl acetate	1343,9	1346	0,09	1,098	3	Mo
Монотерпенски угљоводоници 0,12 %							
10	p-Cymene	1018,8	1020	0,12	0,457	4	Mu
Нису идентификована 0,79 %							
105	n.i.=not identified	2680,1		0,17	3,004	6	
108	n.i.=not identified	2724,5		0,19	3,045	6	
116	n.i.=not identified	2940,3		0,18	3,266	6	
117	n.i.=not identified	2948,4		0,25	3,273	9	
Остало 52,43 %							
86	Hexadecanol	1853,5	1874	0,10	1,950	3	O
88	1-Nonadecene	1878,9	1875	0,09	2,000	3	O
90	Ethyl hexadecanoate	1999,1	1992	4,61	2,130	157	O
92	Methyl linoleate	2095,6	2095	0,35	2,300	12	O
93	Methyl oleate	2103,1	2107	0,40	2,309	14	O
94	Oleic acid	2108,1	2112	1,08	2,325	37	O
96	Tricosane	2302,7	2300	0,08	2,628	3	O
98	Docosanal	2430,6	2434	0,16	2,764	6	O
99	3-Methyltetracosane	2466,3	2474	0,85	2,807	29	O
101	3-Ethyltetracosane	2578,6	n/a	0,91	2,890	31	O

102	Hexacosane	2603,7	2600	0,15	2,920	5	O
103	Tetracosanal	2637,4	2614	0,20	2,955	7	O
104	3-Methylhexacosane	2670,5	2672	0,36	2,989	12	O
107	Heptacosane	2714,4	2700	2,80	3,031	95	O
109	3-Methylheptacosane	2785,9	2773	1,70	3,108	58	O
110	Octacosane	2812,5	2800	0,84	3,135	29	O
112	1-Hexacosanol	2847,6	2859	0,70	3,172	24	O
113	3-Methyloctacosane	2873,1	n/a	0,58	3,204	20	O
114	2-Methyloctacosane	2883,3	n/a	0,46	3,215	16	O
115	Nonacosane	2922,8	2900	18,21	3,244	620	O
118	3-Methylnonacosane	2981,7	2972	1,70	3,318	58	O
119	Triacontane	3005,6	3000	1,42	3,350	48	O
120	1-Heptacosanol	3041,2	3016	0,46	3,400	16	O
121	3-Methyltriacontane	3061,8	3078	0,59	3,432	20	O
122	2-Methyltriacontane*	3071,3	n/a	0,19	3,447	7	O
123	Untriacontane	3104,4	3100	10,45	3,495	356	O
125	α -Tocopherolquinone	3131,7	n/a	0,14	3,520	5	O
126	3-Methylhentriacontane	3171,3	3173	0,19	3,527	6	O
127	Dotriacontane	3202,3	3200	1,09	3,547	37	O
130	Tritriacontane	3332,2	3300	1,57	3,657	53	O
Оксидовани сексвитерпени 2,95 %							
64	trans-Nerolidol	1560,5	1561	1,72	1,491	59	So
65	Caryophyllene oxide	1569,6	1582	0,09	1,514	3	So
74	epi- α -Cadinol (τ -Cadinol)	1630,0	1638	0,09	1,615	3	So
77	α -Cadinol	1643,6	1652	0,16	1,637	5	So
79	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1681,3	1685	0,15	1,688	5	So
80	Oplopanone	1733,1	1739	0,08	1,771	3	So
82	8 α -11-Elemodiol	1754,7	1746	0,20	1,818	7	So
85	Hexahydrofarnesyl acetone	1848,3	1848	0,45	1,945	15	So
Сексвитерпенски угљоводоници 3,05 %							
37	β -Bourbonene	1371,4	1387	0,08	1,159	3	Su
40	β -Caryophyllene	1408,3	1417	0,28	1,223	9	Su
48	(E)- β -Farnesene	1457,7	1454	0,22	1,302	7	Su
49	γ -Muurolene	1466,0	1478	0,12	1,331	4	Su
50	Germacrene D	1472,0	1484	1,01	1,337	35	Su
54	Bicyclogermacrene	1487,1	1500	0,12	1,363	4	Su
56	β -Bisabolene	1501,0	1505	0,53	1,392	18	Su
57	trans-Calamenene	1510,4	1521	0,19	1,397	6	Su
58	δ -Cadinene	1512,9	1522	0,52	1,416	18	Su
Тритерпенски угљоводоници 2,04 %							
111	Squalene	2835,5	2847	2,04	3,164	69	Tu
Оксидовани тритерпени 1,07 %							
128	Stigmasterol	3223,8	3248	0,20	3,563	7	To
129	β -Sitosterol	3296,4	n/a	0,87	3,610	30	To
Збирно =>					100,00		



Слика бр. 4.2.3.1 ; Нормализовани хроматограм екстракта мајкине душице добијеног НКЕ са CO₂ FR1 (P=10 МПа и T=40 °C)

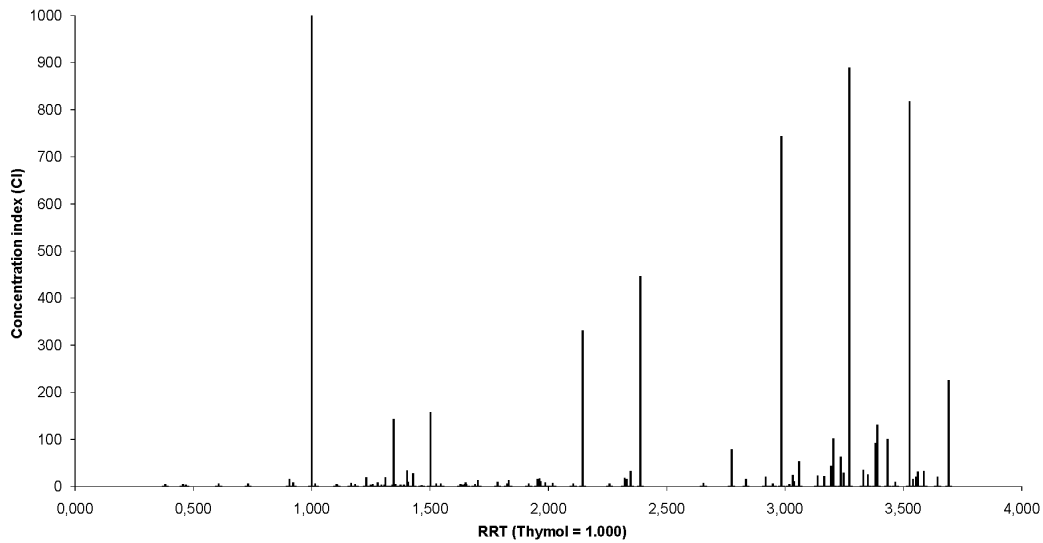
Табела бр. 4.2.3.2 : Приказ хемијског састава екстракта *Thymus serpyllum L.* добијеног надкритичном екстракцијом са CO₂ FR2 (P=30 МПа и T=40 °C), уређен по класама једињења

Рк	Једињења	KIE	KIL	% m/m	RRT	CI	Класа
Оксидовани дитерпени 7,44 %							
91	Manool	2044,1	2056	0,09	2,258	6	Do
95	trans-Phytol	2119,6	2122	7,35	2,389	446	Do
Дитерпенски угљоводоници 0,39 %							
84	Neophytadiene, Isomer III	1840,4	1849	0,25	1,953	15	Du
87	Neophytadiene isomer*	1865,4	n/a	0,14	1,986	8	Du
Оксидовани монотерпени 17,29 %							
12	1,8-Cineole	1022,7	1026	0,05	0,468	3	Mo
15	cis-Thujone	1099,8	1101	0,10	0,606	6	Mo
20	Borneol	1159,6	1165	0,10	0,731	6	Mo
27	Linalool acetate	1255,4	1254	0,26	0,906	16	Mo
28	Geraniol	1263,0	1257	0,15	0,921	9	Mo
31	Thymol	1303,9	1289	16,46	1,000	1000	Mo
32	Carvacrol	1313,3	1298	0,11	1,014	7	Mo
34	Terpinyl acetate	1343,9	1346	0,07	1,108	4	Mo
Монотерпенски угљоводоници 0,15 %							
4	β-Pinene	974,0	974	0,07	0,381	5	Mu
10	p-Cymene	1018,8	1020	0,08	0,456	5	Mu
Нису идентификована 0,58 %							
105	n.i.=not identified	2680,1		0,40	3,033	24	

106	n.i.=not identified	2688,1		0,18	3,038	11	
Остало 63,68 %							
86	Hexadecanol	1853,5	1874	0,19	1,967	12	O
88	1-Nonadecene	1878,9	1875	0,12	2,018	7	Su
89	Methyl palmitate	1930,4	1921	0,10	2,104	6	O
90	Ethyl hexadecanoate	1999,1	1992	5,45	2,144	331	O
92	Methyl linoleate	2095,6	2095	0,30	2,321	18	O
93	Methyl oleate	2103,1	2107	0,26	2,331	16	O
94	Oleic acid	2108,1	2112	0,53	2,347	32	O
96	Tricosane	2302,7	2300	0,11	2,654	7	O
97	Tetracosane	2402,2	2400	1,30	2,774	79	O
99	3-Methyltetracosane	2466,3	2474	0,26	2,834	16	O
101	3-Ethyltetracosane	2578,6	n/a	0,34	2,918	20	O
102	Hexacosane	2603,7	2600	0,09	2,949	6	O
103	Tetracosanal	2637,4	2614	12,25	2,985	744	O
104	3-Methylhexacosane	2670,5	2672	0,09	3,018	5	O
107	Heptacosane	2714,4	2700	0,87	3,059	53	O
109	3-Methylheptacosane	2785,9	2773	0,39	3,137	23	O
110	Octacosane	2812,5	2800	0,37	3,166	22	O
112	1-Hexacosanol	2847,6	2859	1,69	3,203	103	O
113	3-Methyloctacosane	2873,1	n/a	1,05	3,236	64	O
114	2-Methyloctacosane	2883,3	n/a	0,48	3,247	29	O
115	Nonacosane	2922,8	2900	14,64	3,272	890	O
118	3-Methylnonacosane	2981,7	2972	0,43	3,349	26	O
119	Triacotane	3005,6	3000	1,52	3,382	93	O
120	1-Heptacosanol	3041,2	3016	1,66	3,433	101	O
121	3-Methyltriacotane	3061,8	3078	0,16	3,465	10	O
123	Untriacotane	3104,4	3100	13,47	3,526	818	O
124	α -Tocopherol (vitamin E)	3117,5	3130	0,26	3,540	16	O
125	α -Tocopherolquinone	3131,7	n/a	0,34	3,553	21	O
126	3-Methylhentriacotane	3171,3	3173	0,52	3,560	31	O
127	Dotriacotane	3202,3	3200	0,72	3,586	33	O
130	Tritriacotane	3332,2	3300	3,72	3,691	226	O
Оксидовани сексвитерпени 4,28 %							
61	cis-Sesquisabinene hydrate	1536,9	1542	0,05	1,464	3	So
64	trans-Nerolidol	1560,5	1561	2,59	1,502	157	So
65	Caryophyllene oxide	1569,6	1582	0,11	1,526	7	So
67	Viridiflorol	1577,8	1592	0,11	1,545	7	So
74	epi- α -Cadinol (τ -Cadinol)	1630,0	1638	0,08	1,628	5	So
75	α -Muurolol (Torreyol)	1636,1	1644	0,05	1,638	3	So
76	Ledene oxide II*	1640,7	n/a	0,08	1,647	5	So
77	α -Cadinol	1643,6	1652	0,13	1,650	8	So
78	Helifolenol A	1674,7	1674	0,08	1,690	5	So
79	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1681,3	1685	0,22	1,702	14	So
80	Oplopanone	1733,1	1739	0,16	1,785	10	So

81	(2E,6E)-Farnesol	1751,7	1742	0,11	1,826	6	So
82	8 α -11-Elemodiol	1754,7	1746	0,22	1,832	13	So
85	Hexahydrofarnesyl acetone	1848,3	1848	0,28	1,962	17	So
Сексвитерпенски угљоводоници 5,16 %							
33	α -Cubebene	1341,2	1345	0,07	1,104	5	Su
37	β -Bourbonene	1371,4	1387	0,11	1,166	7	Su
39	β -Elemene	1382,0	1389	0,07	1,183	4	Su
40	β -Caryophyllene	1408,3	1417	0,33	1,230	20	Su
41	β -Copaene	1415,5	1430	0,05	1,250	3	Su
42	β -Gurjunene	1426,4	1431	0,08	1,257	5	Su
43	6,9-Guaiadiene	1432,2	1442	0,13	1,279	8	Su
46	α -Humulene	1439,8	1452	0,06	1,294	4	Su
47	allo-Aromadendrene	1453,6	1458	0,06	1,307	3	Su
48	(E)- β -Farnesene	1457,7	1454	0,32	1,311	19	Su
49	γ -Muurolene	1466,0	1478	0,05	1,340	3	Su
50	Germacrene D	1472,0	1484	2,35	1,346	143	Su
51	β -Selinene	1478,5	1489	0,08	1,353	5	Su
54	Bicyclogermacrene	1487,1	1500	0,05	1,375	3	Su
55	α -Muurolene	1489,8	1500	0,05	1,389	3	Su
56	β -Bisabolene	1501,0	1505	0,57	1,402	34	Su
57	trans-Calamenene	1510,4	1521	0,17	1,407	10	Su
58	δ -Cadinene	1512,9	1522	0,45	1,428	27	Su
83	2- α -Acetoxy-amorpha-4,7(11)-diene	1817,5	1805	0,10	1,917	6	Su
Тритерпенски угљоводоници 0,73 %							
111	Squalene	2835,5	2847	0,73	3,194	44	Tu
Оксидовани тритерпени 0,33 %							
129	β -Sitosterol	3296,4	n/a	0,33	3,644	20	To
Збирно =>				100,00			
Број једињења =>				82			

Normalised chromatogram of *Thymus serpyllum* extract obtained by SFE
(SFE: Fraction 2, Fi = hp5890...14.d)



Слика бр. 4.2.3.2 ; Нормализовани хроматограм екстракта мајкине душице добијеног НКЕ са CO₂ FR2 (P=30 МПа и T=40 °C)

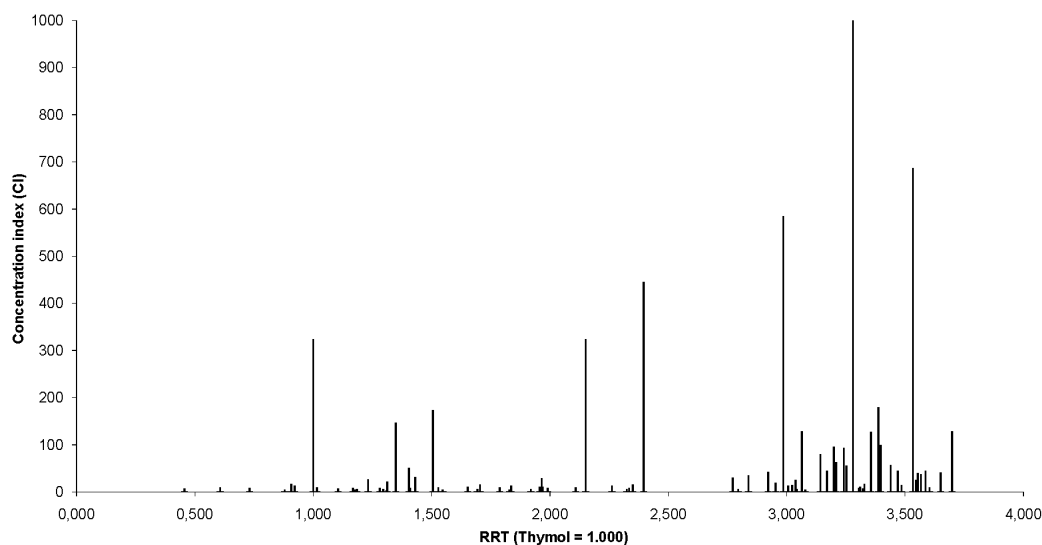
Табела бр. 4.2.3.3: Приказ хемијског састава екстракта *Thymus serpyllum* L. добијеног надкритичном екстракцијом са CO₂ (P=30 МПа и T=40 °C), уређен по класама једињења

Рк	Једињења	KIE	KIL	% m/m	RRT	CI	Класа
Оксидовани дитерпени 8,06 %							
91	Manool	2044,1	2056	0,24	2,261	13	Do
95	trans-Phytol	2119,6	2122	7,82	2,395	445	Do
Дитерпенски угљоводоници 0,35 %							
84	Neophytadiene, Isomer III	1840,4	1849	0,20	1,956	11	Du
87	Neophytadiene isomer*	1865,4	n/a	0,15	1,990	9	Du
Оксидовани монотерпени 6,93 %							
15	cis-Thujone	1099,8	1101	0,16	0,606	9	Mo
20	Borneol	1159,6	1165	0,16	0,731	9	Mo
25	Carvacrol methyl ether	1242,8	1241	0,09	0,879	5	Mo
27	Linalool acetate	1255,4	1254	0,30	0,906	17	Mo
28	Geraniol	1263,0	1257	0,24	0,921	14	Mo
31	Thymol	1303,9	1289	5,69	1,000	324	Mo
32	Carvacrol	1313,3	1298	0,16	1,015	9	Mo
34	Terpinyl acetate	1343,9	1346	0,12	1,105	7	Mo
Угљоводонични монотерпени 0,14 %							
10	p-Cymene	1018,8	1020	0,14	0,456	8	Mu
Нису идентификована 0,99 %							
105	n.i.=not identified	2680,1		0,44	3,037	25	
106	n.i.=not identified	2688,1		0,11	3,042	6	
108	n.i.=not identified	2724,5		0,09	3,079	5	
116	n.i.=not identified	2940,3		0,16	3,303	9	

117	n.i.=not identified	2948,4		0,19	3,309	11	
Остало %							
86	Hexadecanol	1853,5	1874	0,19	1,970	11	O
89	Methyl palmitate	1930,4	1921	0,17	2,108	10	O
90	Ethyl hexadecanoate	1999,1	1992	5,70	2,151	324	O
92	Methyl linoleate	2095,6	2095	0,12	2,324	7	O
93	Methyl oleate	2103,1	2107	0,15	2,334	9	O
94	Oleic acid	2108,1	2112	0,63	2,350	16	O
97	Tetracosane	2402,2	2400	0,52	2,771	30	O
98	Docosanal	2430,6	2434	0,12	2,794	7	O
99	3-Methyltetracosane	2466,3	2474	0,63	2,838	36	O
101	3-Ethyltetracosane	2578,6	n/a	0,75	2,922	43	O
102	Hexacosane	2603,7	2600	0,33	2,953	19	O
103	Tetracosanal	2637,4	2614	10,52	2,985	599	O
104	3-Methylhexacosane	2670,5	2672	0,26	3,022	15	O
107	Heptacosane	2714,4	2700	2,26	3,064	128	O
109	3-Methylheptacosane	2785,9	2773	1,41	3,142	80	O
110	Octacosane	2812,5	2800	0,79	3,170	45	O
112	1-Hexacosanol	2847,6	2859	1,10	3,208	63	O
113	3-Methyloctacosane	2873,1	n/a	1,65	3,241	94	O
114	2-Methyloctacosane	2883,3	n/a	0,99	3,252	56	O
115	Nonacosane	2922,8	2900	17,58	3,279	1000	O
118	3-Methylnonacosane	2981,7	2972	2,23	3,355	127	O
119	Triacotane	3005,6	3000	3,15	3,387	179	O
120	1-Heptacosanol	3041,2	3016	1,01	3,439	57	O
121	3-Methyltriacotane	3061,8	3078	0,80	3,470	46	O
122	2-Methyltriacotane*	3071,3	n/a	0,26	3,485	15	O
123	Untriacotane	3104,4	3100	12,07	3,533	687	O
124	α -Tocopherol (vitamin E)	3117,5	3130	0,45	3,545	26	O
125	α -Tocopherolquinone	3131,7	n/a	0,71	3,553	41	O
126	3-Methylhentriacotane	3171,3	3173	0,65	3,566	37	O
127	Dotriacotane	3202,3	3200	0,79	3,586	45	O
130	Tritriacotane	3332,2	3300	2,26	3,699	129	O
Оксидовани сесквитерпени 5,52 %							
64	trans-Nerolidol	1560,5	1561	3,04	1,505	173	So
65	Caryophyllene oxide	1569,6	1582	0,16	1,528	9	So
67	Viridiflorol	1577,8	1592	0,09	1,547	5	So
77	α -Cadinol	1643,6	1652	0,19	1,653	11	So
78	Helifolenol A	1674,7	1674	0,11	1,693	6	So
79	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1681,3	1685	0,28	1,704	16	So
80	Oplopanone	1733,1	1739	0,17	1,788	10	So
81	(2E,6E)-Farnesol	1751,7	1742	0,09	1,828	5	So
82	8 α -11-Elemodiol	1754,7	1746	0,24	1,836	14	So
85	Hexahydrofarnesyl acetone	1848,3	1848	0,51	1,965	29	So
Сесквитерпенски угљоводоници 5,80 %							
37	β -Bourbonene	1371,4	1387	0,15	1,167	9	Su
38	β -Cubebene	1379,2	1387	0,08	1,177	5	Su

39	β -Elemene	1382,0	1389	0,11	1,185	6	Su
40	β -Caryophyllene	1408,3	1417	0,47	1,232	27	Su
44	cis-Muurola-3,5-diene	1434,0	1448	0,15	1,281	9	Su
46	α -Humulene	1439,8	1452	0,10	1,295	6	Su
47	allo-Aromadendrene	1453,6	1458	0,07	1,309	4	Su
48	(E)- β -Farnesene	1457,7	1454	0,38	1,313	22	Su
50	Germacrene D	1472,0	1484	2,58	1,348	147	Su
56	β -Bisabolene	1501,0	1505	0,89	1,404	51	Su
57	trans-Calamenene	1510,4	1521	0,14	1,409	8	Su
58	δ -Cadinene	1512,9	1522	0,56	1,430	32	Su
83	2- α -Acetoxy-amorpha-4,7(11)-diene	1817,5	1805	0,10	1,919	6	Su
Тритерпенски угљоводоници 1,7 %							
111	Squalene	2835,5	2847	1,70	3,199	97	Tu
Оксидовани тритерпени 0,88%							
128	Stigmasterol	3223,8	3248	0,16	3,603	9	To
129	β -Sitosterol	3296,4	n/a	0,72	3,650	41	To
Збирно =>				100,00			
Број једињења =>				75			

Normalised chromatogram of *Thymus serpyllum* extract obtained by SFE (SFE-30, Fi = hp5890...15.d)



Слика бр. 4.2.3.2 ; Нормализовани хроматограм екстракта мајкине душице добијеног непрекидном НКЕ са CO₂ (P=30 МПа и T=40 °C)

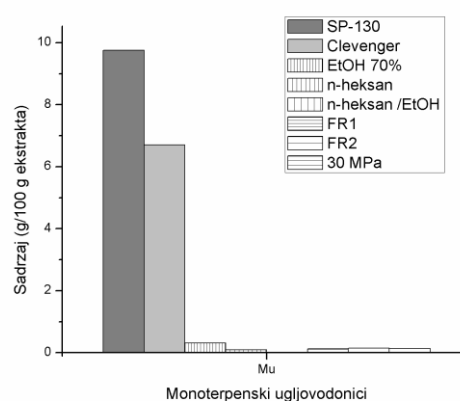
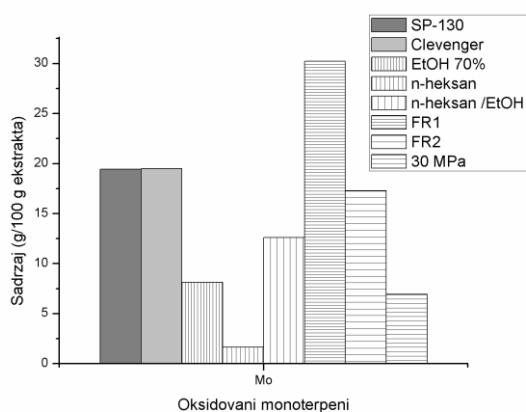
Резултати хемијског састава надкритичних екстраката се значајно разликују од литературних [Topal, U. и сар., 2008](#) ; [Oszagyań, M. и сар., 1996](#), у квалитативном и квантитативном смислу. Одступања се могу објаснити разликама у квалитету биљне сировине и различитог географског порекла.

У раду [Oszagyán, M. и сар. \(1996\)](#) хемијски састав етарског уља и надкритичног екстракта мајкине душице био је приближно исти у квалитативном смислу, с тим што је концентрација р-цимена, борнеола, нерола и карвакрола била је већа у етарском уљу мајкине душице добијеном дестилацијом него у надкритичном екстракту.

У раду [Topal, U. и сар. \(2008\)](#) хемијски састав етарског уља и надкритичног екстракта мајкине душице разликовао се и квалитативно и квантитативно. Надкритични екстракт је добијен на условима притиска 20-30 МПа и температуре 40-60 °С. Доминантна једињења овог екстракта су били: карвакрол (46,53%) и 2,4,6-триметил анизол (24,95%), док је садржај тимола био 1,53%. Доминантно једињење у етарском уљу добијеног хидродестилацијом био је 2,4,6-триметил анизол (73,4%).

4.2.4. Упоредна анализа хемијског састава

Од свих етарских уља и екстраката мајкине душице, надкритични екстракт FR1 је садржао највише монотерпенских једињења (30,36%) пре свега из групе оксидованих монотерпена (30,24%), са тимолом као доминантном компонентом (29,36%). Најзаступљеније једињење у надкритичном екстракту FR2 је такође био монотерпенски алкохол – тимол (16,46%). Садржај тимола у етарском уљу добијеном у СП-130 био је 7,26%, у етарском уљу добијеном у Clevenger-у 9,62%, у етанолном екстракту 0,46%, у n-хексан екстракту 1,23%, у етанолном екстракту/претретман са n-хексаном 0,44%, и у надкритичном екстракту 30 МПа 5,69%.



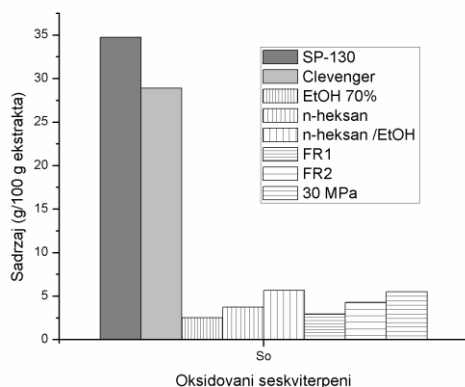
Слика бр. 4.2.4.1; Оксидовани монотерпени

Слика бр. 4.2.4.2; Монотерпенски угљоводоници

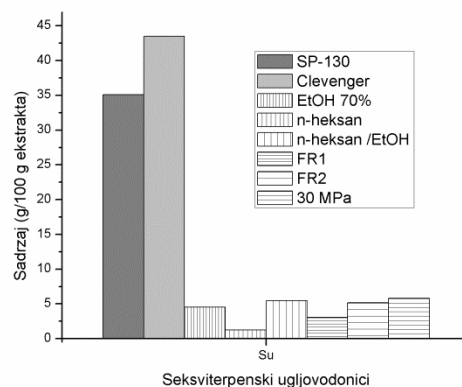
Класа монотерпенских угљоводоника је била најзаступљенија у етарском уљу добијеном у СП-130 (9,76%) и у етарском уљу добијеном у Clevenger-у (6,7%), док је њихов садржај у екстрактима добијеним помоћу екстракције по Soxhlet-у и надкритичном екстракцијом био занемарљив.

Сесквитерпени представљају доминантну групу једињења етарског уља мајкине душице добијеном у СП-130 и у етарском уљу добијеном у Clevenger-у, док је њихов садржај у екстрактима добијеним помоћу екстракције по Soxhlet-у и надкритичном екстракцијом био знатно нижи. Оксидовани сесквитерпен trans-неролидол са 24,2% и сесквитерпенски угљоводоник гермакрен-Д са 16,02% су најзаступљеније компоненте у испитиваном етарском уљу добијеном у СП-130, док је њихов садржај у етарском уљу добијеном у Clevenger-у износио 19,79% и 18,48%, респективно. Садржај trans-

неролидола у испитиваним екстрактима је износио 1,12-2,04%, док је гермакрен-Д био у опсегу 0-2,58%.

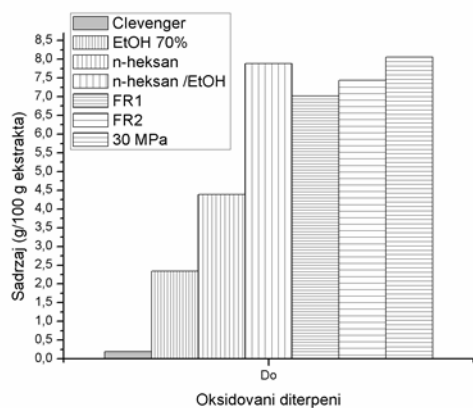


Слика бр. 4.2.4.3; Оксидовани сесквитерпени

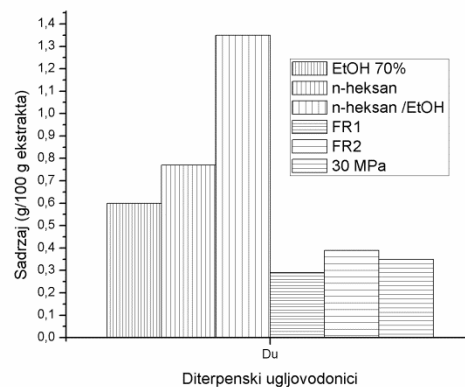


Слика бр. 4.2.4.4; Сексвитерпенски угљоводоници

Класа дитерпена није била присутна у етарском уљу добијеном у СП-130, у етарском уљу добијеном у Clevenger-у садржај је био занемарљив (0,19%), док је садржај у екстрактима добијеним помоћу екстракције по Soxhlet-у и надкритичном екстракцијом био у опсегу 2,94-9,23%. Доминантно једињење из групе дитерпена био је *trans*-фитол (2,34-7,82%).

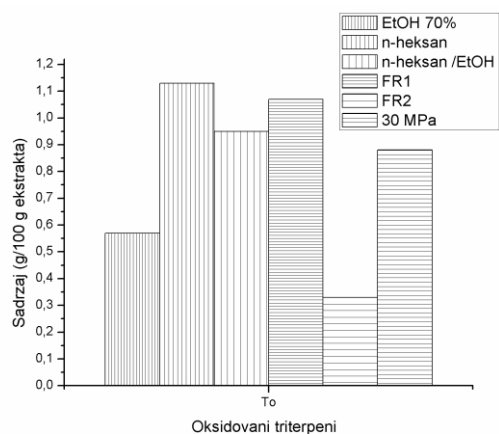


Слика бр. 4.2.4.5; Оксидовани дитерпени

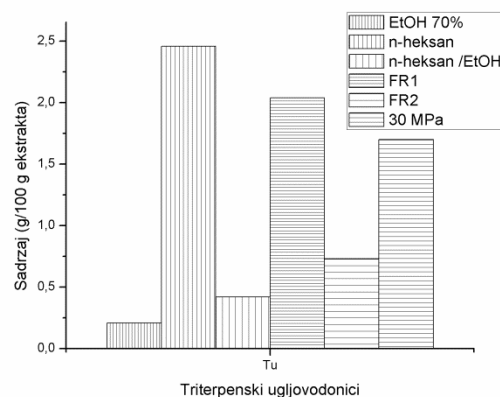


Слика бр. 4.2.4.6; Дитерпенски угљоводоници

Класа тритерпена није била присутна у етарском уљу мајкине душице, док је садржај у екстрактима добијеним помоћу екстракције по Soxhlet-у и надкритичном екстракцијом био у опсегу 0,77-3,59%.

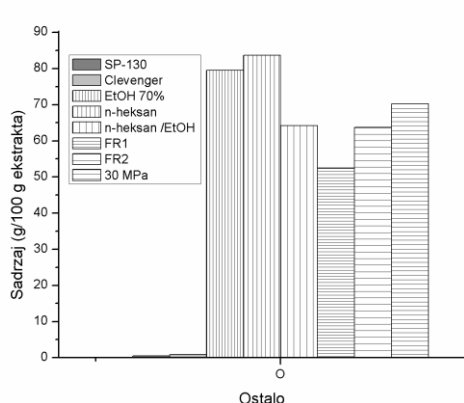


Слика бр. 4.2.4.7; Оксидовани тритерпени

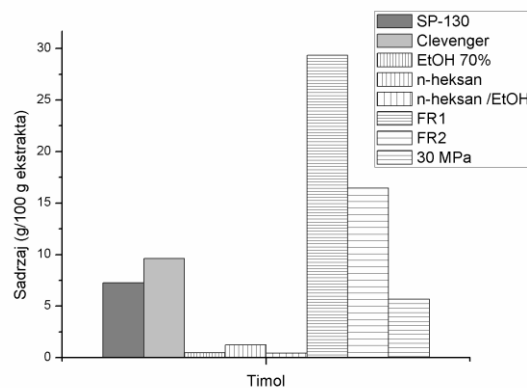


Слика бр. 4.2.4.8; Тритерпенски угљоводоници

Главна карактеристика екстраката добијених помоћу екстракције по Soxhlet-у и помоћу надкритичне екстракције је претежна заступљеност (више од 50%) нетерпенских алифатичних једињења (претежно n-алкани): нонакосан ($C_{29}H_{60}$), утриаконтан ($C_{31}H_{64}$), тетракосан ($C_{24}H_{50}$), и нетерпенских оксигенованих алифатичних једињења (кратколанчани алкохоли, њихови естри, и карбонилна једињења): тетракосанал ($C_{24}H_{48}O$), етил-хексадеканоат ($C_{18}H_{36}O_2$) и друга. У већини екстраката присутни су нетерпенски алифатични угљоводоници (претежно n-алкани), при чему су најзаступљенији нонакосан (15,46-27,17%) и утриаконтан (10,45-18,88%).



Слика бр. 4.2.4.9 ; Остало



Слика бр. 4.2.4.10 ; Тимол

Табела бр. 4.2.4.1. Расподела различитих класа једињења и доминантна једињења у етарском уљу и екстрактима мајкине душице

Класа	Мајкина душица							
	дестилација		екстракција					
			Soxhlet			NKE CO ₂		
	СП-130	Clevenger	EtOH 70%	n-hexsan	n-hexsan /EtOH	FR1	FR2	30 MPa
Mo	19,45	19,49	8,13	1,65	12,62	30,24	17,29	6,93
Mu	9,76	6,7	0,31	0,09	-	0,12	0,15	0,14
So	34,77	28,92	2,53	3,74	5,68	2,95	4,28	5,52
Su	35,07	43,51	4,53	1,22	5,48	3,05	5,16	5,8
Do	-	0,19	2,34	4,39	7,88	7,02	7,44	8,06
Du	-	-	0,6	0,77	1,35	0,29	0,39	0,35
Tu	-	-	0,21	2,46	0,42	2,04	0,73	1,7
To	-	-	0,57	1,13	0,95	1,07	0,33	0,88
O	0,48	0,85	79,52	83,7	64,16	52,43	63,68	70,25
n.i.	0,34	0,43	0,64	0,92	1,52	0,79	0,58	0,99
Идент Једињ	65	79	73	64	85	64	80	70
Σ (%)	99,96	99,66	100	100	100	100	100	100
Укуп. једињ.	67	81	76	69	90	68	82	75
Тимол , %	7,26	9,62	0,49	1,23	0,44	29,36	16,46	5,69
Доминантна једињења	trans-неролидол (24,2%), гермакрен Д (16,02%), тимол (7,26%), δ-кадинен (3,73%), β-бисаболен (3,33%)	trans-неролидол (19,79%), гермакрен Д (18,48%), тимол (9,62%), β-бисаболен (5,1%), δ-кадинен (4,72%), β-карнофилон (3,25%)	тетракосанал (20,34%), утриаконтан (17,55%), наонакосан (15,46%), тетракосан (6,67%), етил-хексадеканоат (4,1%), trans-фитол (2,34%)	нонакосан (27,17%), утриаконтан (18,88%), етил-хексадеканоат (6,38%), тетракосанал (5,09%), trans-фитол (4,03%)	нонакосан (20,05%), утриаконтан (16,36%), етил-хексадеканоат (10,82%), trans-фитол (7,74%)	тимол (29,36%), наонакосан (18,21%), утриаконтан (10,45%), trans-фитол (6,81%), етил-хексадеканоат (4,61%)	тимол (16,46%), наонакосан (14,64%), утриаконтан (13,47%), тетракосанал (12,25%), trans-фитол (7,35%), етил-хексадеканоат (5,45%),	нонакосан (17,58%), утриаконтан (12,07%), тетракосанал (10,52%), trans-фитол (7,82%), етил-хексадеканоат (5,7%), тимол (5,69%)

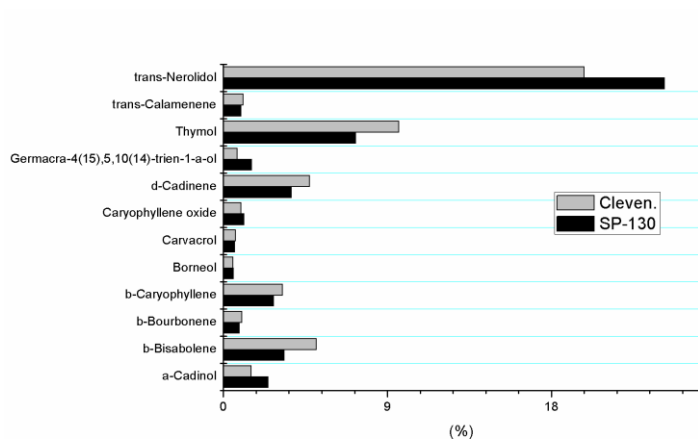
Ознаке / скраћенице:

Mo – оксидовани монотерпени ; **Mu** – монотерпенски угљоводоници ; **So** – оксидовани сесквитерпени ; **Su** – сесквитерпенски угљоводоници ; **Do** – оксидовани дитерпени ; **Du** – дитерпенски угљоводоници ; **Tu** - тритерпенски угљоводоници ; **To** – оксидовни тритерпени ; **O** – остало (нетерпенска алифатична једињења /претежно n-алкани/, нетерпенска оксигенована алифатична једињења /кратколанчани алкохоли, њихови естри, и карбонилна једињења/ и др.)

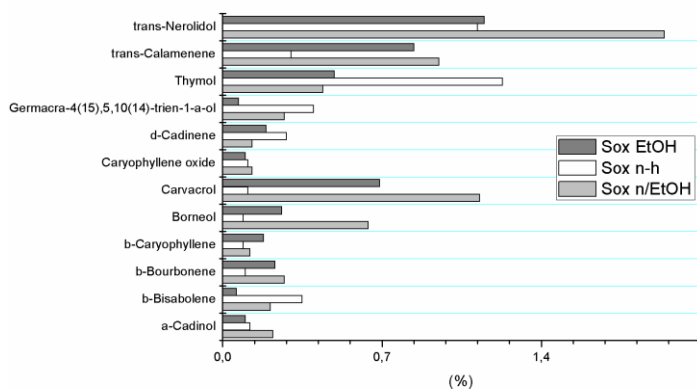
n.i. – неидентификована једињења

Идент. Једињ. – Једињења која су идентификована и именована

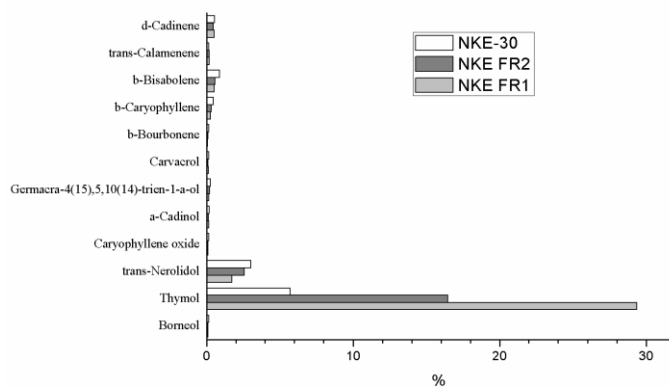
Укуп. Једињ. – Збирно (Идентификована једињења плус n.i.)



а) хидродестилација по Clevenger-у и дестилација применом воде и водене паре у СП-130



б) екстракција по Soxhlet-у



ц) Екстракција са надкритичним угљеник(IV)-оксидом

Слика 4.2.4.11. Дванаест једињења која су била заступљена у свим узорцима етарских уља и екстраката мајкине душице добијених у свим примењеним техникама дестилације и екстракције;

У циљу јасније прегледности у табели 4.2.4.2 приказан је удео дванаест једињења (појединачно и по класама), која су била заступљена у свим узорцима етарских уља и

екстрактима мајкине душице, добијених применом наведених техника дестилације и екстракције.

Табела 4.2.4.2: Дванаест једињења добијених и заступљених применом свих коришћених техника екстракције и дестилације мајкине душице

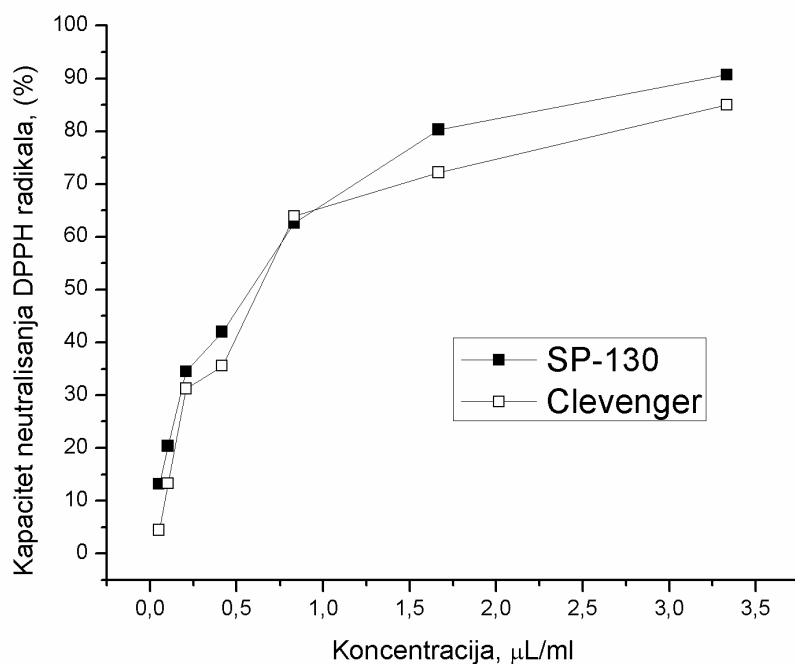
Једињења	Дестилација		НКЕ Екстракција			Soxhlet екстракција		
	SP-130	Cleven.	NKE FR1	NKE FR2	NKE-30	Sox n/EtOH	Sox n-h	Sox EtOH
	% m/m	% m/m	% m/m	% m/m	% m/m	% m/m	% m/m	% m/m
Borneol	0,56	0,53	0,09	0,1	0,16	0,64	0,09	0,26
Thymol	7,26	9,62	29,36	16,46	5,69	0,44	1,23	0,49
Збирно за Мо	7,82	10,15	29,45	16,56	5,85	1,08	1,32	0,75
trans-Nerolidol	24,2	19,79	1,72	2,59	3,04	1,94	1,12	1,15
Caryophyllene oxide	1,12	0,97	0,09	0,11	0,16	0,13	0,11	0,1
α -Cadinol	2,45	1,53	0,16	0,13	0,19	0,22	0,12	0,1
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1,54	0,76	0,15	0,22	0,28	0,27	0,4	0,07
Збирно за Со	29,31	23,05	2,12	3,05	3,67	2,56	1,75	1,42
Carvacrol	0,61	0,66	0,12	0,11	0,16	1,13	0,11	0,69
β -Bourbonene	0,87	1,02	0,08	0,11	0,15	0,27	0,1	0,23
β -Caryophyllene	2,76	3,25	0,28	0,33	0,47	0,12	0,09	0,18
β -Bisabolene	3,33	5,1	0,53	0,57	0,89	0,21	0,35	0,06
trans-Calamenene	0,97	1,07	0,19	0,17	0,14	0,95	0,3	0,84
δ -Cadinene	3,73	4,72	0,52	0,45	0,56	0,13	0,28	0,19
Збирно за Су	12,27	15,82	1,72	1,74	2,37	2,81	1,23	2,19
Укупно (%)	49,4	49,02	33,29	21,35	11,89	6,45	4,3	4,36

Процентуално и са аспекта коришћених техника посматрано, на примеру дванаест добијених једињења, уочава се значајна разлика. Ако би изузели тимол у посматрању, пожељније је коришћење дестилације као технике за добијање осталих једињења из табеле.

С обзиром да истраживачи сматрају тимол једним од најважнијих саставних компоненти етарског уља рода *Thymus L.* значајно виши проценат добијеног тимола коришћењем НКЕ екстракције на нижим притисцима (до 10 МПа) ову технику чини супериорнијом.

4.3. Антиоксидативни потенцијал етарских уља и екстраката мајкине душице

Антиоксидантна способност етарских уља и екстраката мајкине душице је одређивана њиховом способношћу да неутралишу DPPH, тј. колико су компоненте етарског уља и екстраката способне да донирају атом водоника и преведу DPPH радикал у његову редуковану форму DPPH-H. Ефективна концентрација, IC₅₀ вредност (концентрација антиоксиданаса потребна да смањи концентрацију радикала 50%) је параметар који се широко користи као мера способности екстраката за "хватање" радикала (Cuvelier, M. и сар., 1992). Ниже вредности IC₅₀ указују на јачу антиоксидативну активност. IC₅₀ вредности су дате у табели 4.3.1 и из њих можемо закључити да је етарско уље мајкине душице испољило знатно бољу активност у односу на екстракте и синтетске антиоксидансе ВНА и ВНТ. Надкритични екстракти су показали знатно слабију антиоксидативну активност у поређењу са осталим екстрактима и етарским уљем.



Слика бр. 4.3.1; Антиоксидативна активност етарског уља мајкине душице добијеног помоћу SP-130 и етарског уља мајкине душице добијеног помоћу Clevenger-a на DPPH радикале

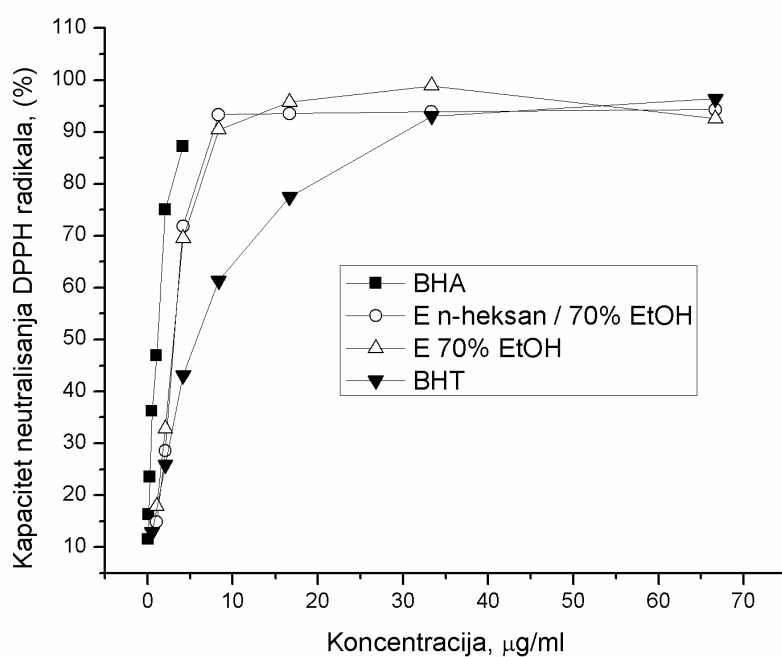
Очигледно је да интеракција испитиваних екстраката са DPPH радикалом зависи од типа и концентрације испитиваних етарских уља и екстраката (слика бр. 4.3.1).

У постојећој научној литератури постоје два објављена рада о испитивању антиоксидативне активности етарског уља *T. serpyllum*. Етарско уље *T. serpyllum* L. пореклом из Хрватске (Kulišić, T. и сар., 2005) показало је слабију способност да неутралише DPPH радикале од ВНА, ВНТ, токоферола, аскорбинске киселине и етарског уља *T. vulgaris*. Такође, етарско уље *T. serpyllum* L. пореклом из Пакистана (Hussain, I. и сар., 2013) показало је слабију способност да неутралише DPPH радикале од ВНТ и тимола.

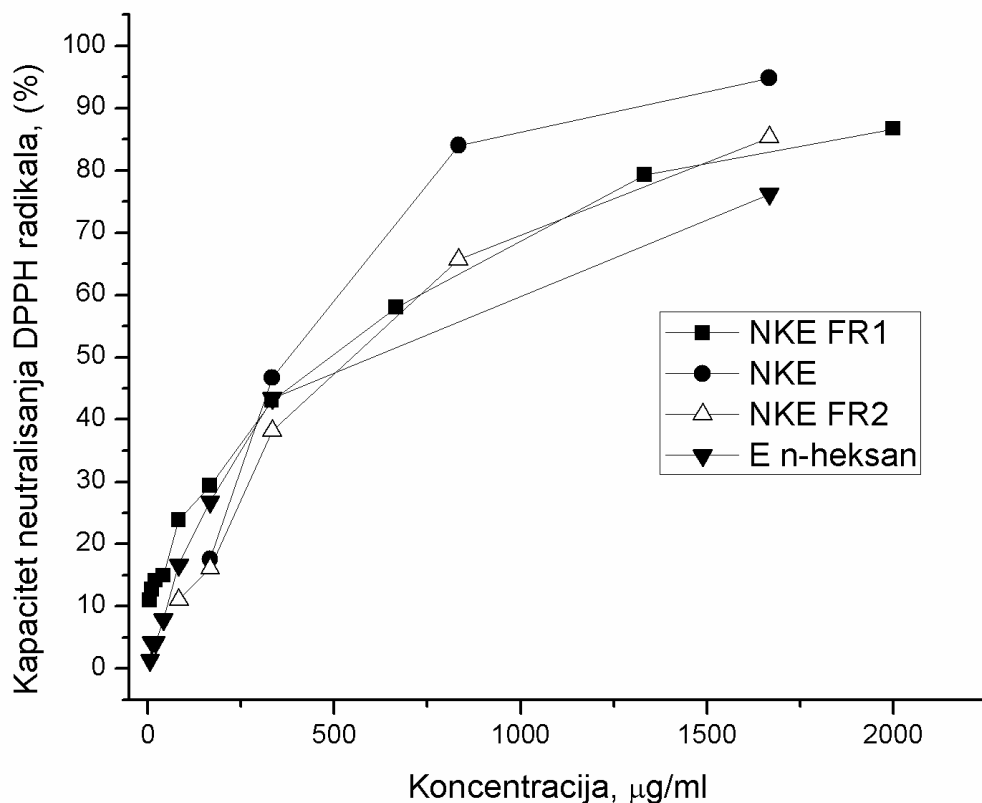
Како је приказано у табели 4.3.1 резултати испитивања антиоксидативне активности етарског уља *T. serpyllum* L. добијеног поступком воде и водене паре уређајем СП-130 је показало бољу способност неутралисања DPPH радикала од синтетских антиоксиданаса ВНТ и ВНА, што није подударно са резултатима других истраживача (Петровић, С. и сар., 2013).

Табела 4.3.2; Емпиријско истраживање и литературни преглед способности неутралисања DPPH радикала коришћењем етарског уља рода *Thymus*

Порекло етарског уља	Метода добијања	Антиоксидативна активност	Литература
<i>T. serpyllum</i> Србија	Дестилација водом и воденом паром уређајем СП-130 и Clevenger поступком	етарско уље <i>T. serpyllum</i> > ВНА > ВНТ	Резултати истраживања
<i>T. serpyllum</i> <i>T. vulgaris</i> Хрватска	Дестилација водом -Clevenger	аскорбинска киселина > токоферол > ВНТ > ВНА > етарско уље <i>T. serpyllum</i> > етарско уље <i>T. vulgaris</i>	Kulišić, T. и сар., 2005
<i>T. serpyllum</i> <i>T. linearis</i> Пакистан	Дестилација водом -Clevenger	ВНТ > тимол > етарско уље <i>T. serpyllum</i> > етарско уље <i>T. linearis</i> > карвакрол	Hussain I. и сар., 2013
<i>T. vulgaris</i> Јемен	Дестилација водом -Clevenger	ВНТ > етарско уље <i>T. vulgaris</i>	Maher, M. и сар., 2011
<i>T. vulgaris</i> Словачка	Комерцијално етарско уље	ВНТ > аскорбинска киселина > етарско уље <i>T. vulgaris</i>	Kačániová, M. и сар., 2012



Слика бр. 4.3.2; Антиоксидативна активност етанолног екстракта мајкине душице, етанолног екстракта мајкине душице са претретманом *n*-хексаном, BHA и BHT на DPPH радикале



Слика бр. 4.3.3; Антиоксидативна активност екстракта мајкине душице на DPPH радикале

На основу вредности IC_{50} DPPH може се закључити да надкритични екстракти мајкине душице показују знатно слабију антиоксидативну активност од етарског уља и синтетских антиоксиданаса ВНА и ВНТ.

Фенолна једињења показују антиоксидативну активност због својих редокс особина, симултаног одвијања реакција у којима учествују као доноси водониковог атома, трансфери електрона и хелати метала (Calliste, A. и сар., 2001). Испитивани екстракти и етарско уље мајкине душице поседују антиоксидативну активност према DPPH радикалима првенствено због способности фенолних једињења да се понашају као доноси водониковог атома DPPH радикалу.

Као што се може видети у табели 4.3.1 редослед од најјаче до најслабије антиоксидативне активности је следећи: етарско уље добијено уређајем СП-130 >

етарско уље добијено у апаратури по Clevenger-у > ВНА > етанолни екстракт > етанолни екстракт/претретман са n-хексаном > ВНТ > надкритични екстракт 30 МПа > n-хексан-екстракт > надкритични екстракт FR1 > надкритични екстракт FR2.

Табела бр. 4.3.1 : IC_{50 DPPH} вредност екстраката добијених различитим техникама

Редни број	Метод добијања узорка - поступак	Врста узорка	IC _{50 DPPH}
1	SP-130 - дестилација водом и воденом паром	течан	* ¹ 0,503 µL/ml
2	Clevenger – дестилација H ₂ O	течан	* ¹ 0,6355 µL/ml
9	ВНА	чврст	0,9777 µg/ml
3	Soxlet – 70% етанолом	чврст	2,941 µg/ml
4	Soxlet – n-хексан па 96% етанолом	чврст	3,000 µg/ml
10	ВНТ	чврст	5,582 µg/ml
5	Soxlet – n-хексан	чврст	439,4 µg/ml
8	НКЕ 30 МПа	чврст	417,3 µg/ml
6	НКЕ FR1	чврст	459,4 µg/ml
7	НКЕ FR2	чврст	506,8 µg/ml

*¹ Густина етарског уља мајкине душице $\rho=0.988 \text{ g/cm}^3$

4.4. Антимикробна активност етарских уља и екстраката мајкине душице

Антимикробна активност етарских уља и екстраката мајкине душице је одређивана методом микродилуције на микротитрационим плочама, 96-систем (Hanel, H. и Raether, W. 1988; Daouk, D. и sar., 1995). У испитивању је коришћено 8 бактеријских сојева и 8 микромицета (гљива). Одређиване су минималне инхибиторне (МИС), минималне микробицидне (МВС) и минималне фунгицидне (МФС) концентрације серијским разређивањем етарских уља и екстраката.

Резултати одређивања антибактеријске и антифунгалне активности етарског уља и екстраката мајкине душице дати су у табелама (4.4.1 и 4.4.2). Гљиве су показале већу осетљивост на етарско уље и екстракте у односу на бактерије. Из табела (4.4.1 и 4.4.2) се може закључити да етарско уље и екстракти мајкине душице показују изражену антибактеријску и антифунгалну активност на све тестиране бактеријске сојеве, Грам (+) и Грам (-), и гљиве а и у односу на комерцијалне антибиотике стрептомицин и ампицилин и комерцијалне фунгициде бифоназол и кетоконазол коришћене као контрола. Такође, антибактеријска и антифунгална активност етарског уља и екстраката мајкине душице је упоредива са тимолом (чистоће $\geq 99\%$).

Надкритични екстракти су деловали на све бактеријске сојеве инхибиторно у интервалу 0,038–0,2 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,075–0,3 mg/ml. Бактерије *Salmonella typhimurium* и *Bacillus cereus* су показале већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ FR1 (МВС = 0,075 mg/ml) у односу на надкритични екстракт НКЕ FR2 (МВС = 0,15 mg/ml). Бактерије *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus flavus* су показале већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ 30 МПа (МВС = 0,09 mg/ml) у односу на надкритичне екстракте НКЕ FR1 и НКЕ FR2 (МВС = 0,15 mg/ml). *Listeria monocytogenes* и *Pseudomonas aeruginosa* (МВС = 0,3 mg/ml), показале су највећу резистентност на испитиване надкритичне екстракте.

Референтни антибиотик стрептомицин је деловао инхибиторно у интервалу 0,05–0,3 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,1–0,5 mg/ml, ампицилин инхибиторно у опсегу 0,3–0,8 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,5–1,25 mg/ml, и тимол инхибиторно у опсегу 0,025–0,1 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,05–0,1 mg/ml.

Табела 4.4.1: Минимална инхибиторна (МИС mg/ml) и бактерицидна концентрација (МВС mg/ml) екстраката и етарских уља *Thymus serpyllum* на сојеве бактерија

Сојеви		Грам позитивне бактерије				Грам негативне бактерије			
		<i>Bacillus cereus</i> (klinički izolat)	<i>Micrococcus flavus</i> (ATCC 10240)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	<i>Listeria monocytogenes</i> (NCTC 7973)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35210)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Enterobacter cloacae</i> (klinički izolat)	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 13311)
НКЕ FR1	МИС	0,038	0,075	0,075	0,2	0,075	0,2	0,075	0,05
	МВС	0,075	0,15	0,15	0,3	0,15	0,3	0,15	0,075
НКЕ 30 МПа	МИС	0,045	0,045	0,045	0,18	0,0675	-	-	-
	МВС	0,09	0,09	0,09	0,36	0,09	-	-	-
НКЕ FR2	МИС	0,1	0,1	0,075	0,15	0,1	0,2	0,075	0,075
	МВС	0,15	0,15	0,15	0,3	0,15	0,3	0,15	0,15
Soxhlet EtOH 70 %	МИС	0,075	0,1	0,038	0,2	0,038	0,2	0,075	0,1
	МВС	0,15	0,15	0,15	0,3	0,15	0,3	0,15	0,15
Soxhlet n-хексан па EtOH 70 %	МИС	0,075	0,1	0,075	0,15	0,1	0,15	0,1	0,075
	МВС	0,15	0,15	0,15	0,3	0,15	0,3	0,15	0,15
СП-130 (μl) етарско уље ρ=0.988 g/cm ³	МИС	0,028	0,15	0,019	0,1	0,028	0,078	0,019	0,019
	МВС	0,039	0,3	0,039	0,15	0,039	0,15	0,039	0,039
Тимол (≥ 99 % чистоће)	МИС	0,025	0,025	0,025	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05
	МВС	0,05	0,05	0,05	0,1	0,15	0,15	0,1	0,1
Стрептомицин (ici)	МИС	0,1	0,2	0,05	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
	МВС	0,2	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3
Ампицилин (ici)	МИС	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,8	0,4	0,3
	МВС	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	1,25	0,8	0,5

Надкритични екстракти су испољили и антифунгалну активност на све тестиране гљиве и деловали су инхибиторно у интервалу 0,017–0,15 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,075–0,3 mg/ml. Најосетљивије гљиве су *Aspergillus ochraceus*, *Trichoderma viride* док је најрезистентнија гљива на испитиване надкритичне екстракте *Aspergillus fumigatus* (MFC = 0,3 mg/ml). Бољу антифунгалну активност је показао надкритични екстракт НКЕ FR1. Гљиве *Aspergillus ochraceus* и *Trichoderma viride* су показале већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ FR1 (MFC = 0,035 mg/ml) у односу на надкритични екстракт НКЕ FR2 (MFC = 0,15 и 0,075 mg/ml респективно). Гљиве *Penicillium ochrochloron* и *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* су показале већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ FR1 (MFC = 0,075 mg/ml) у односу на надкритични екстракт НКЕ FR2 (MFC = 0,3 mg/ml).

Референтни антимицотик кетоконазол је деловао инхибиторно у интервалу 0,2–2,5 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,5–3 mg/ml, бифоназол инхибиторно 0,1–0,2 mg/ml и

фунгицидно 0,2-0,3 mg/ml, и тимол инхибиторно у опсегу 0,01–0,025 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,01–0,5 mg/ml.

Табела 4.4.2 : Минимална инхибиторна (MIC mg/ml) и фунгицидна концентрација (MFC mg/ml) екстраката и етарских уља *Thymus serpyllum* на микромицете

Сојеви		Тестиране микромицете							
		<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC 9197)	<i>A. versicolor</i> (ATCC 11730)	<i>A. ochraceus</i> (ATCC 12066)	<i>A. niger</i> (ATCC 6275)	<i>Trichoderma viride</i> (IAM 5061)	<i>Penicillium funiculosum</i> (ATCC 10509)	<i>Penicillium ochrochloron</i> (ATCC 9112)	<i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (food isolate)
Поступак техника	-								
НКЕ FR1	MIC	0,15	0,035	0,017	0,075	0,017	0,035	0,035	0,04
	MFC	0,30	0,075	0,035	0,15	0,035	0,15	0,075	0,075
НКЕ 30 МПа	MIC	-	-	-	-	-	-	-	-
	MFC	-	-	-	-	-	-	-	-
НКЕ FR2	MIC	0,15	0,075	0,075	0,075	0,035	0,075	0,15	0,15
	MFC	0,30	0,15	0,15	0,15	0,075	0,15	0,3	0,3
Soxhlet EtOH 70 %	MIC	0,15	0,075	0,075	0,15	0,075	0,15	0,15	0,15
	MFC	0,3	0,15	0,15	0,3	0,15	0,3	0,3	0,3
Soxhlet n-хексан па EtOH 70 %	MIC	0,15	0,15	0,15	0,15	0,075	0,075	0,3	0,3
	MFC	0,7	0,3	0,3	0,3	0,15	0,3	0,7	0,7
СП-130 етарско уље $\rho=0.988 \text{ g/cm}^3$	MIC	0,0195	0,0195	0,0195	0,039	0,039	0,039	0,039	0,0195
	MFC	0,039	0,039	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,039
Тимол чистоће ≥ 99 %	MIC	0,025	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0125	0,025	0,0125
	MFC	0,50	0,01	0,02	0,02	0,01	0,025	0,025	0,025
Бифоназол	MIC	0,15	0,1	0,15	0,15	0,15	0,2	0,2	0,2
	MFC	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,25	0,25	0,3
Кетоконазол	MIC	0,2	0,5	2,5	0,2	2,5	0,2	1,5	1,5
	MFC	0,5	1,0	3,0	0,5	2,5	0,5	2,0	2,0

Етанолни екстракт је деловао на све бактеријске сојеве инхибиторно у интервалу 0,038–0,2 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,15–0,3 mg/ml. Етанолни екстракт/претретман са n-хексаном је деловао на све бактеријске сојеве инхибиторно у интервалу 0,075–0,15 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,15–0,3 mg/ml. Бактерије су показале исту осетљивост на ова два екстракта добијена у апаратура по Soxhlet-у. Најосетљивије бактерије су биле *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *Enterobacter cloacae* (MBC = 0,15 mg/ml), а најрезистентније бактерије су биле *Listeria monocytogenes* и *Pseudomonas aeruginosa* (MBC = 0,3 mg/ml).

Етанолни екстракт је испољио и антифунгалну активност на све тестиране гљиве и деловао је инхибиторно у интервалу 0,075–0,15 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,15–0,3 mg/ml. Етанолни екстракт/претретман са n-хексаном је деловао на све тестиране гљиве инхибиторно у интервалу 0,075–0,3 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,15–0,7 mg/ml. Бољу антифунгалну активност је показао етанолни екстракт. Гљиве *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium ochrochloron* и *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* су показале већу осетљивост на етанолни екстракт (MFC = 0,15–0,3 mg/ml) у односу на етанолни екстракт/претретман са n-хексаном (MFC = 0,3–0,7 mg/ml).

Етарско уље је деловало на све бактеријске сојеве инхибиторно у интервалу 0,019–0,15 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,039–0,3 mg/ml. Забележена је већа антибактеријска активност на Грам-негативне бактерије, најосетљивији бактеријски сојеви су *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *Enterobacter cloacae* (MBC = 0,039 mg/ml), а најрезистентнија бактерија на испитивано етарско уље била је *Micrococcus flavus* (MBC = 0,3 mg/ml).

Етарско уље је деловало на све тестиране гљиве инхибиторно у интервалу 0,0195–0,039 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,039–0,078 mg/ml. Референтни антимицотик кетоназол је деловао инхибиторно у интервалу 0,2–2,5 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,5–3 mg/ml, а бифоназол инхибиторно 0,1–0,2 mg/ml и фунгицидно 0,2–0,3 mg/ml. Референтни тимол чистоће $\geq 99\%$ је деловао инхибиторно у интервалу 0,01–0,025 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,01–0,5 mg/ml. Резултати показују изражену антифунгалну активност етарског уља на све тестиране гљиве у односу на комерцијалне антимицотике кетоконазол и бифоназол. Најосетљивије гљиве су *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor* и *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (MFC = 0,039 mg/ml), а затим *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum* и *Penicillium ochrochloron* (MFC = 0,078 mg/ml).

Испитивано етарско уље и екстракти мајкине душице су показали бољу антимицробну активност у односу на комерцијалне антибиотике стрептомицин и ампицилин и комерцијалне фунгициде бифоназол и кетоконазол коришћене као контрола на скоро све тестиране бактеријске сојеве, Грам (+) и Грам (–), и гљиве. Такође испитивано етарско уље је показало бољу антимицробну активност од тимола

коришћеног као контрола, док су екстракти имали слабију антимикуробну активност од тимола.

Табела 4.4.3; Минимална бактерицидна концентрација (МВС mg/ml) екстраката и етарских уља *Thymus serpyllum* на сојеве бактерија

Сојеви бактерија	Поступак - техника						Контрола		
	НКЕ FR1	НКЕ 30 МПа	НКЕ FR2	Soxhlet EtOH 70 %	Soxhlet n-hexs. pa EtOH 70 %	СП-130 етарско уље	Тимол чистоте $\geq 99\%$	Стрептомицин	Ампицилин
<i>Bacillus cereus</i>	0,075	0,09	0,15	0,15	0,15	0,039	0,05	0,2	0,4
<i>Micrococcus flavus</i>	0,15	0,09	0,15	0,15	0,15	0,3	0,05	0,3	0,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,15	0,09	0,15	0,15	0,15	0,039	0,05	0,1	0,4
<i>Listeria monocytogene</i>	0,3	0,36	0,3	0,3	0,3	0,15	0,1	0,3	0,5
<i>Escherichia coli</i>	0,15	0,09	0,15	0,15	0,15	0,039	0,15	0,3	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,15	0,15	0,3	1,25
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,15	-	0,15	0,15	0,15	0,039	0,1	0,5	0,8
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,075	-	0,15	0,15	0,15	0,039	0,1	0,3	0,5

Етарско уље је деловало на све тестиране бактерије микробицидно у опсегу 0,039–0,3 mg/ml. Најосетљивије бактерије су *Bacillus cereus* и *Salmonella typhimurium*. Потпуна инхибиција раста ових бактерија постигнута је на 0,039 mg/ml етарског уља мајкине душице и 0,075 mg/ml надкритичног екстракта НКЕ FR1.

Етарско уље је деловало на све тестиране гљиве фунгицидно у опсегу 0,039–0,078 mg/ml. То показује да је етарско уље мајкине душице имало већи ефекат на испитиване микромицете у односу на бактерије. Најосетљивије микромицете су *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor* и *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*. Потпуна инхибиција раста ових гљива постигнута је на 0,039 mg/ml етарског уља мајкине душице и 0,075–0,3 mg/ml надкритичног екстракта НКЕ FR1. Микромицете

Aspergillus ochraceus и *Trichoderma viride* су показале већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ FR1 (MFC = 0,035 mg/ml) у односу на етарско уље (MFC = 0,078 mg/ml).

Табела 4.4.4; Минимална фунгицидна концентрација (MFC mg/ml) екстраката и етарских уља *Thymus serpyllum* на микромицете

Сојеви микромицета	Поступак - техника						Контрола		
	НКЕ FR1	НКЕ 30 МПа	НКЕ FR2	Soxhlet EtOH 70 %	Soxhlet n- heks. pa EtOH 70 %	СП-130 етарско уље	Тимол чистоће ≥ 99 %	Бифоназол	Кетоконазол
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,3	-	0,3	0,3	0,7	0,039	0,5	0,2	0,5
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,075	-	0,15	0,15	0,3	0,039	0,01	0,2	1,0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,035	-	0,15	0,15	0,3	0,078	0,02	0,2	3,0
<i>Aspergillus niger</i>	0,15	-	0,15	0,3	0,3	0,078	0,02	0,2	0,5
<i>Trichoderma viride</i>	0,035	-	0,075	0,15	0,15	0,078	0,01	0,2	2,5
<i>Penicillium funiculosum</i>	0,15	-	0,15	0,3	0,3	0,078	0,025	0,25	0,5
<i>P.ochrochloron</i>	0,075	-	0,3	0,3	0,7	0,078	0,025	0,25	2,0
<i>P.verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	0,075	-	0,3	0,3	0,7	0,039	0,025	0,3	2,0

У литератури је објављен већи број радова о антимикуробној активности етарског уља мајкине душице, док у научној литератури не постоје подаци о антимикуробној активности екстраката мајкине душице добијених методом НК-CO₂. Такође не постоје објављени резултати о антимикуробној активности етанолног екстракта и n-хексан екстракта мајкине душице.

Добијени резултати су у сагласности са литературним подацима о антимикуробној активности етарског уља и екстраката мајкине душице (Табела 4.4.5 и Табела 4.4.6). Етарско уље је испољило боље бактерицидно дејство на све тестиране бактерије изузев на бактерију *Micrococcus flavus* која је показала већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ 30 МПа (Табела 4.4.6). Најснажнију антифунгалну активност на гљиве *Aspergillus ochraceus*, *Trichoderma viride* и *P.ochrochloron* од свих

екстраката и етарских уља је испољио надкритични екстракт НКЕ FR1. Етарско уље је испољило боље фунгицидно дејство на све остале тестиране гљиве (Табела 4.4.6).

Досадашња истраживања су показала да је главни носилац антибактеријске активности у етарском уљу мајкине душице тимол. Ово нам сугерише да главне компоненте етарских уља прилично добро рефлектују биофизичке и биолошке карактеристике уља и да интензитет антимикуробног деловања уља зависи од концентрација главних компонената.

Од свих екстраката и етарских уља, надкритични екстракт FR1 је садржао највише тимола (29,36%). Најзаступљеније једињење у надкритичном екстракту FR2 је такође био тимол (16,46%). Садржај тимола у етарском уљу добијеном у СП-130 био је 7,26%, у етарском уљу добијеном у Clevenger-у 9,62%, у етанолном екстракту 0,46%, у п-хексан екстракту 1,23%, у етанолном екстракту/претретман са п-хексаном 0,44%, и у надкритичном екстракту 30 МПа 5,69%.

Табела 4.4.5; Емпиријско истраживање и литературни преглед антимикуробне активности етарског уља *Thymus serpyllum*

Етарско уље и порекло	Метода добијања	Антимикуробна активност, (MIC mg/ml, MBC, mg/ml)	Главне компоненте у етарском уљу	Литература
<i>T. serpyllum</i> Србија	Дестилација водом и воденом паром уређајем СП-130	MIC: 0,019–0,15 MBC: 0,039–0,3 <i>Bacillus subtilis</i> (MIC = 0,028 mg/ml), <i>Micrococcus flavus</i> (MIC = 0,15 mg/ml), <i>Staphylococcus aureus</i> (MIC = 0,019 mg/ml), <i>Listeria monocytogenes</i> (MIC = 0,1 mg/ml), <i>Escherichia coli</i> (MIC = 0,028 mg/ml), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MIC = 0,078 mg/ml), <i>Enterobacter cloacae</i> (MIC = 0,019 mg/ml), <i>Salmonella typhimurium</i> (MIC = 0,019 mg/ml) Гљиве: MIC: 0,0195–0,039 MFC: 0,039–0,078 <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. ochraceus</i> и <i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (MIC = 0,0195 mg/ml), <i>A. niger</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>P. funiculosum</i> и <i>P. ochrochloron</i> (MIC = 0,039 mg/ml),	trans-nerolidol (24,2%), germakren D (16,02%), timol (7,26%), δ -kadinen (3,73%), β -bisabolen (3,33%)	Резултати истраживања
<i>T. serpyllum</i> Пакистан	Дестилација водом -Dean-Stark апаратура	MIC: 0,09–0,17 MBC: 0,09–0,17 <i>Bacillus megaterium</i> (MIC = 0,115 mg/ml), <i>B. subtilis</i> (MIC = 0,15 mg/ml), <i>Lactobacillus acidophilus</i> (MIC = 0,155 mg/ml), <i>Micrococcus leuteus</i> (MIC = 0,09 mg/ml), <i>Staphylococcus albus</i> (MIC = 0,11 mg/ml), <i>S. aureus</i> (MIC = 0,17	Непознат хемијски састав	Rahman, M. и Gyl, S., 2003.

		mg/ml), <i>Vibrio cholera</i> (MIC = 0,115 mg/ml), <i>Escherichia coli</i> (MIC = 0,09 mg/ml), <i>Salmonella typhi</i> (MIC = 0,135 mg/ml), <i>Shigella ferrarie</i> (MIC = 0,17 mg/ml)		
<i>T. serpyllum</i> Essential Oil University (Charlestown, IN, USA)	Дестилација водом - Clevenger	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Salmonella enteritidis</i> (MIC = 0,25 mg/ml), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (био резистентан на дејство етарског уља)	карвакрол (15,8%), р-цимене (14,7%), тимол (12,6%) и гераниол (10,5%)	Клоусек, Р. и сар., 2012
<i>T. serpyllum</i> Хрватска	Комерцијално етарско уље Kemika (Хрватска)	<i>Aspergillus ochraceus</i> (MIC = 0,000625 mg/ml), <i>A. carbonarius</i> (MIC = 0,00125 mg/ml), <i>A. niger</i> (MIC = 0,0025 mg/ml)	Непознат хемијски састав	Соколић- Михалак, Д. и сар., 2013.

Табела 4.4.5 (наставак); Емпиријско истраживање и литературни преглед антимикробне активности етарског уља *Thymus serpyllum*

Етарско уље и порекло	Метода добијања	Антимикробна активност, (MIC mg/ml, MBC, mg/ml)	Главне компоненте у етарском уљу	Литература
<i>T. serpyllum</i> Србија	Дестилација водом - Clevenger	MIC: 0,00156–0,00625 MBC: 0,003125–0,0125 <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i> и <i>Salmonella choleraesuis</i> (MIC = 0, 00156 mg/ml), <i>Staphylococcus aureus</i> (MIC = 0, 003125 mg/ml), <i>Enterococcus faecalis</i> (MIC = 0, 00625 mg/ml)	Непознат хемијски састав	Левић, Ј. и сар., 2011.
<i>T. serpyllum</i> Србија	Дестилација водом - Clevenger	MIC: 0,0025–0,005 MBC: 0,005–0,01 <i>Streptococcus mutans</i> (MIC = 0, 005 mg/ml), <i>Streptococcus salivarius</i> (MIC = 0, 0025 mg/ml), <i>Streptococcus sanguinis</i> (MIC = 0, 00625 mg/ml), <i>Streptococcus pyogenes</i> (MIC = 0, 0025 mg/ml), <i>Enterococcus faecalis</i> (MIC = 0, 0025 mg/ml), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MIC = 0, 005 mg/ml), <i>Lactobacillus acidophilus</i> (MIC = 0, 005 mg/ml), <i>Staphylococcus aureus</i> (MIC = 0, 0025 mg/ml) MIC: 0,001–0,002 MFC: 0,002–0,004 <i>Candida albicans</i> ATCC10231 (MIC = 0, 002 mg/ml), <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 (MIC = 0, 001 mg/ml)	тимол (56,02%), карвакрол (14,00%) и р-цимен (6,2%)	Николић, М. и сар., 2014.

Табела 4.4.6; Емпиријско истраживање и литературни преглед антимикробне активности екстракта *Thymus serpyllum*

Екстракт и порекло	Метода добијања	Антимикробна активност, (MIC mg/ml, MBC, mg/ml)	Главне компоненте у старском уљу	Литература
<i>T. serpyllum</i> Надкритични и екстракти НКЕ FR1, НКЕ FR2, НКЕ 30 МПа Србија	Надкритична екстракција помоћу CO ₂	MIC: 0,038–0,2; MBC: 0,075–0,3 <i>Bacillus subtilis</i> (MIC = 0,038 –0,1 mg/ml), <i>Micrococcus flavus</i> (MIC = 0,045–0,1 mg/ml), <i>Staphylococcus aureus</i> (MIC = 0,045–0,075 mg/ml), <i>Listeria monocytogenes</i> (MIC = 0,15–0,2 mg/ml), <i>Escherichia coli</i> (MIC = 0,0675–0,1 mg/ml), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MIC = 0,2 mg/ml), <i>Enterobacter cloacae</i> (MIC = 0,075 mg/ml), <i>Salmonella typhimurium</i> (MIC = 0,05–0,075 mg/ml) Гљиве: MIC: 0,017–0,15; MFC: 0,075–0,3 <i>Aspergillus fumigatus</i> (MIC = 0,15 mg/ml), <i>A. Versicolor</i> (MIC = 0,035 –0,075 mg/ml), <i>A. Ochraceus</i> (MIC = 0,017 –0,075 mg/ml), <i>A. Niger</i> (MIC = 0,075 mg/ml), <i>Trichoderma viride</i> (MIC = 0,017 –0,035 mg/ml), <i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>Cyclopium</i> (MIC = 0,04 –0,15 mg/ml), <i>P. Funiculosum</i> (MIC = 0,035 –0,075 mg/ml), <i>P. ochrochloron</i> (MIC = 0,035 –0,15 mg/ml)	тимол (5,69–29,36%), нонакосан (14,64–18,21%), утриаконтан (10,45–13,47%), trans-фитол (6,81–7,82%), етил- хексадеcanoат (4,61–5,7%)	Резултати истраживања
<i>T. serpyllum</i> Етанолни екстракт и Етанолни екстракт/претретман са п-хексаном Србија	Апаратура по Soxhlet-у	MIC: 0,038–0,2; MBC: 0,15–0,3 <i>Bacillus subtilis</i> (MIC = 0,075 mg/ml), <i>Micrococcus flavus</i> (MIC = 0,1 mg/ml), <i>Staphylococcus aureus</i> (MIC = 0,038–0,075 mg/ml), <i>Listeria monocytogenes</i> (MIC = 0,15–0,2 mg/ml), <i>Escherichia coli</i> (MIC = 0,038–0,1 mg/ml), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MIC = 0,15–0,2 mg/ml), <i>Enterobacter cloacae</i> (MIC = 0,075–0,1 mg/ml), <i>Salmonella typhimurium</i> (MIC = 0,075–0,1 mg/ml) Гљиве: MIC: 0,075–0,3 MFC: 0,15–0,7 <i>Aspergillus fumigatus</i> (MIC = 0,15 mg/ml), <i>A. Versicolor</i> (MIC = 0,075 –0,15 mg/ml), <i>A. Ochraceus</i> (MIC = 0,075 –0,15 mg/ml), <i>A. Niger</i> (MIC = 0,15 mg/ml), <i>Trichoderma viride</i> (MIC = 0,075 mg/ml), <i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>Cyclopium</i> (MIC = 0,15 –0,3 mg/ml), <i>P. Funiculosum</i> (MIC = 0,075 –0,15 mg/ml), <i>P. ochrochloron</i> (MIC = 0,15 –0,3 mg/ml),	нонакосан (15,46–20,05%), утриаконтан (16,36–17,55%), транс-фитол (2,34–7,74%), етил- хексадеcanoат (4,12–10,82%), тетракосанал (0,09–20,34%)	Резултати истраживања
<i>T. serpyllum</i> Метанолни екстракт	Апаратура по Soxhlet-у	MIC: 1,56–12,56 <i>Staphylococcus aureus</i> (MIC = 1,56 mg/ml), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (MIC = 1,56 mg/ml), <i>Klebsiella pneumonia</i> (MIC = 3,120 mg/ml), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MIC = 3,12 mg/ml), <i>Proteus vulgaris</i> (MIC = 3,12 mg/ml), <i>Bacillus subtilis</i> (MIC = 6,25 mg/ml), <i>Shigella dysenteriae</i> (MIC = 6,250 mg/ml), <i>Salmonella typhi</i> (MIC = 12,56 mg/ml), <i>Escherichia coli</i> (MIC = 12,560 mg/ml)	Непознат хемијски састав	Wani, A. и сар., 2013.

4.5. Математичко моделовање процеса НКЕ из мајкине душице и тимџана

Математички модели су се развијали упоредо са процесима надкритичних екстракција. Најчешће коришћени модел (Sovova, H. 1994a) се заснива на концепту разорених и нетакнутих ћелија са два периода екстракције - први зависи од фазне равнотеже, а други од дифузије унутар честица. Предност овог модела на *макро* нивоу представља чињеница да је применљив на било коју врсту биљног материјала, као и на надкритичну екстракцију и етарских и масних уља. На *микро* нивоу је представљен модел заснован на хипотези да би процес екстракције активних компонената (етарског уља) требало да зависи од врсте дате секретационе структуре (Жижовић, И. и сар., 2005).

Да би се процес надкритичне екстракције могао описати математичким једначинама, неопходно је усвојити неколико претпоставки, од којих су неке карактеристичне за већину постојећих модела:

- систем је изотерман, изобаран и особине угљеник(IV)-оксида су константне,
- проток угљеник(IV)-оксида је константан уз аксијално мешање у екстрактору,
- активне компоненте (етарско уље) се налази у секретационим каналима и апроксимиране су једном псеудокомпонентом, нпр. тимолом,
- секретациони канали су отворени са обе стране предтретманом (млевењем), па се угљеник(IV)-оксид раствара у уљу повећавајући му запремину, што доводи до цурења уља (уља са раствореним угљеник(IV)-оксидом) из канала и спољног квашења честица,
- све честице су сферичне и подједнако поквашене,
- пролазак угљеник(IV)-оксида и његово растварање у уљаној фази унутар канала су тренутни процеси који се дешавају у току постизања радног притиска у систему пре саме екстракције,
- у првом периоду долази до екстракције уља које обавија честице, тако да је процес лимитиран дифузијом кроз филм око уљане фазе.

4.5.1. Кинетика и математичко моделовање НКЕ мајкине душице и тимијана

На слици 4.5.1.1 приказане су екстракционе криве за НКЕ мајкине душице и тимијана, као и криве добијене применом математичког модела (Sovova, H. 1994a) на експерименталне резултате, док су вредности параметара модела: оптимизоване вредности коефицијента преноса масе кроз чврсту фазу (k_s), коефицијента преноса масе (k_f), равнотежне растворљивости екстракта у НК CO_2 (y_r) и удела фракција теже доступног раствора у млевењем неразореном ткиву (x_k) добијене математичким моделовањем по моделу Совове приказане су у табели 4.5.1.1.

Примена математичког модела Совове дала је очекивано добре резултате при симулацији експерименталних резултата, док су вредности параметара модела у очекиваним оквирима у односу на вредности истих параметара присутне у научној литератури.

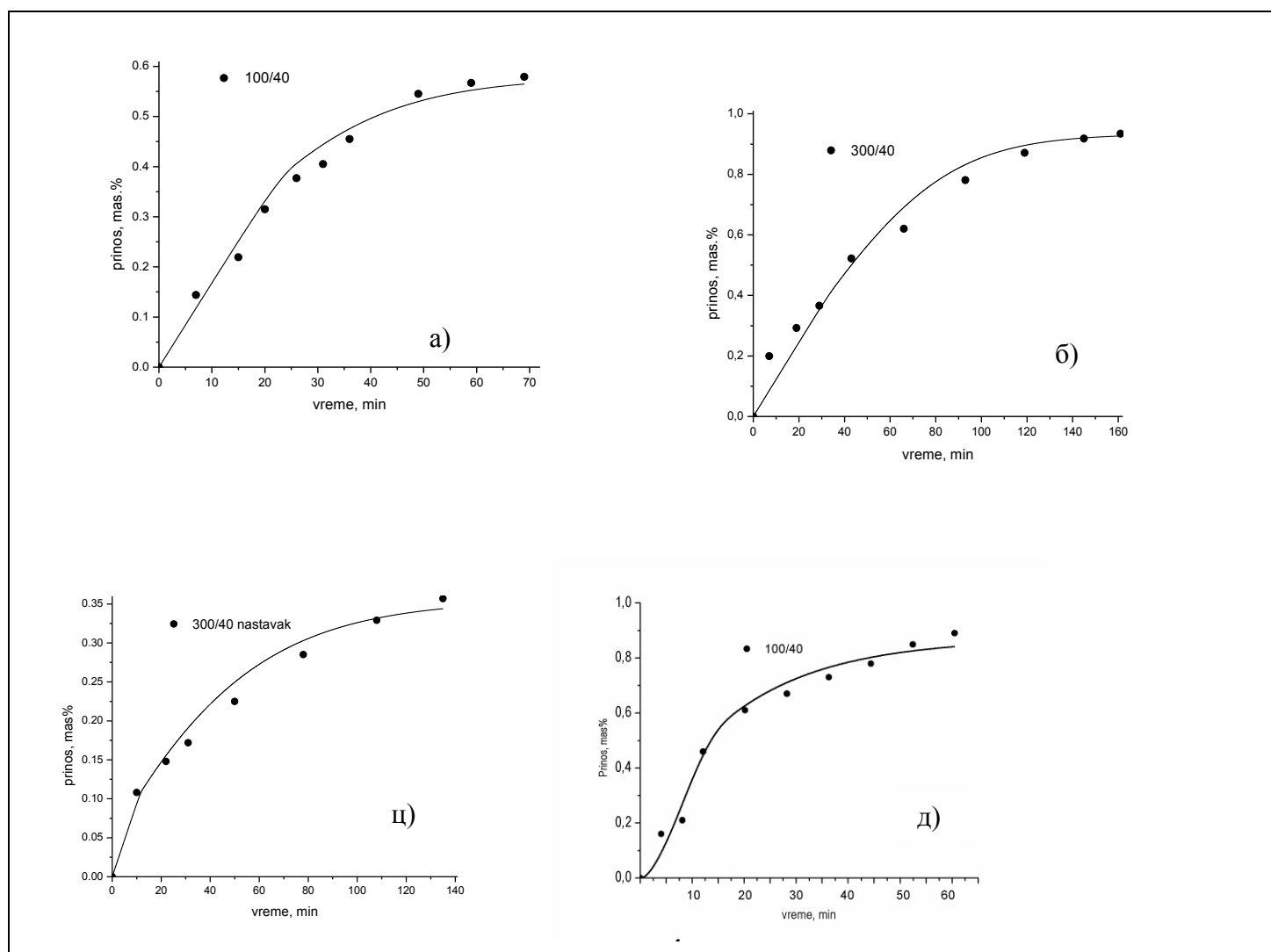
Табела 4.5.1.1 ; Вредности параметара модела Совове

Екстракти	Притисак МПа	Температура °C	Проток, $q_{\text{CO}_2} \cdot 10^4$ (kg/s)	$y_r \cdot 10^4$	$k_f \cdot 10^5$ m/s	$k_s \cdot 10^8$ m/s	$x_k \cdot 10^3$
FR1	10	40	1,45	2.5	2.4	25.5	3.2
FR2	30		0,67	3.0	0.36	3.0	2.8
НКЕ-30	30		0,67	4.0		4.5	8.0
Тимијан	30		1,14	1.05	5.96	1.4	7.0

Уочљиво је да експерименти FR2 и НКЕ-30 имају изражено различите крајње приносе, иако су изведени под истим условима притиска и температуре. Разлог за ово је у томе што је биљни материјал за експеримент FR2 већ прошао екстракцију на 10 МПа при чему су из њега екстраховане ”лакше” компоненте које чине етарско уље.

Вредности растворљивости екстракта у надкритичном угљен диоксиду (y_r) су релативно блиске иако су експерименти FR2 и НКЕ-30 изведени на притиску од 30 МПа, а FR1 на 10 МПа. Овакав резултат ипак није неочекиван с обзиром да екстракт на 30 МПа чине углавном ”теже” компоненте, тј. оне са већом молекулском масом, чија је растворљивост доста мања у односу на растворљивост ”лакших” компоненти које су у већини присутне у екстракту добијеном на 10 МПа. Такође, нешто већа вредност растворљивости за експеримент НКЕ-30 у односу на FR2 може се објаснити

присутвом “лакших” компоненти у екстракту НКЕ-30, док “лакше” компоненте изостају из екстракта FR2 с обзиром да су претходно исцрпљене у експерименту FR1.



Слика 4.5.1.1; Резултати примене математичког модела Совове (●- експеримент; — модел [Sovove,1994a](#)) надкритичне екстракције мајкине душице а) FR1; б) FR2; ц) НКЕ-30 и д) тимидјана

Разлика код вредности коефицијента преноса масе κ_f потиче мањим делом из разлике у саставу екстракта, што утиче на вредности бинарног коефицијента дифузије за систем екстракт/НК- CO_2 , а већим делом из разлике у масеном протоку НК- CO_2 кроз екстрактор. Већи проток у експерименту FR1 утиче на већу брзину струјања НК- CO_2 , што утиче на већу вредност коефицијента преноса масе κ_f .

Коефицијент преноса масе кроз честицу биљног материјала κ , очекивано је већи за екстракцију извршену на притиску од 10 МПа, с обзиром да на том притиску екстракт чине у највећој мери “лакше” компоненте чије “протицање” кроз биљни материјал тече са много мање отпора у односу на “теже” компоненте које већим делом сачињавају екстракт на притиску од 30МПа.

Вредности удела теже доступне фазе, x_k такође имају реалне односе за примењене услове. Највећа вредност добијена је за експеримент НКЕ-30 и тиммијан, док су за остала два експеримента добијене знатно мање вредности. Разлог је у томе што се у експерименту FR1, на 10 МПа, екстрахују компоненте етарског уља које се налазе на површини биљног материјала у секретационим структурама које “пуцају“ при предтретману биљног материјала и при излагању високим притисцима, а паралелно се екстрахује и део “тежих“ компоненти чији удео је, последично, мањи и у експерименту FR2.

5. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата истраживања закључци се односе на добијање етарског уља и екстраката из мајкине душице различитим техникама дестилације и екстракције, математичког моделовања процеса надкритичне екстракције мајкине душице и тиммијана са угљеник(IV)-оксидом и упоредну анализу хемијског састава, антиоксидативног и антимикробног дејства етарског уља и екстраката из мајкине душице:

5.1. Хемијски састав етарских уља и екстраката

- 5.1.1 Остварен принос етарског уља применом дестилационог уређаја СП-130 износио је 0,08 мас. %, док је применом апаратуре по Clevenger-у добијени принос етарског уља износио 0,1 мас. %.
- 5.1.2 Приноси екстраката мајкине душице добијених екстракцијом по Soxhlet-у били су 17,74 мас. % (користећи 70% етанол), 1,84 мас. % (користећи n-хексан) и 17,6 мас. % (предтретман n-хексаном па након тога екстракција са 70% етанолом).
- 5.1.3 Приноси надкритичних екстраката мајкине душице били су: 0,579 мас. % (фракција 1 изолована на 10 МПа и 40 °С), 0,367 мас. % (фракција 2 изолована на 30 МПа и 40 °С), 0,934 мас. % (изолован на 30 МПа и 40 °С). Принос надкритичног екстракта тиммијана (изолован на 10 МПа и 40 °С) био је 0,916 мас. %.
- 5.1.4 Најзаступљеније компоненте у етарском уљу мајкине душице добијеном у СП-130 биле су: trans-неролидол (24,2%), гермакрен Д (16,0%), тимол (7,3%), δ-кадинен (3,7%) и β-бисаболен (3,3%) што чини збирно 54,5% од укупно 65 идентификованих компоненти.
- 5.1.5 Најзаступљеније компоненте у етарском уљу мајкине душице добијеном у Clevenger-у биле су: trans-неролидол (19,79%), гермакрен Д (18,48%), тимол (9,62%), β-бисаболен (5,1%), δ-кадинен (4,72%) и β-кариофилен (3,25%) што чини збирно 60,96% од укупно 79 идентификованих компоненти.

- 5.1.6 Најзаступљеније компоненте у EtOH 70% екстракту мајкине душице биле су: тетракосанал (20,34%), утриаконтан (17,55%), нонакосан (15,46%), тетракосан (6,67%), етил-хексадеканат (4,1%) и транс-фитол (2,34%) што чини збирно 66,46% од укупно 73 идентификоване компоненте.
- 5.1.7 Најзаступљеније компоненте у n-хексан екстракту мајкине душице биле су: нонакосан (27,17%), утриаконтан (18,88%), етил-хексадеканат (6,38%), тетракосанал (5,09%) и транс-фитол (4,03%) што чини збирно 61,55% од укупно 64 идентификоване компоненте.
- 5.1.8 Најзаступљеније компоненте у n-хексан /EtOH екстракту мајкине душице биле су: нонакосан (20,05%), утриаконтан (16,36%), етил-хексадеканат (10,82%) и транс-фитол (7,74%) што чини збирно 54,97% од укупно 85 идентификованих компоненти.
- 5.1.9 Најзаступљеније компоненте у надкритичном екстракту FR1 мајкине душице биле су: тимол (29,36%), нонакосан (18,21%), утриаконтан (10,45%), транс-фитол (6,81%) и етил-хексадеканат (4,61%) што чини збирно 69,44% од укупно 64 идентификоване компоненте.
- 5.1.10 Најзаступљеније компоненте у надкритичном екстракту FR2 мајкине душице биле су: тимол (16,46%), нонакосан (14,64%), утриаконтан (13,47%), тетракосанал (12,25%), транс-фитол (7,35%) и етил-хексадеканат (5,45%), што чини збирно 69,62% од укупно 80 идентификованих компоненти.
- 5.1.11 Најзаступљеније компоненте у надкритичном екстракту НКЕ 30 мајкине душице биле су: нонакосан (17,58%), утриаконтан (12,07%), тетракосанал (10,52%), транс-фитол (7,82%), етил-хексадеканат (5,7%) и тимол (5,69%), што чини збирно 59,38% од укупно 70 идентификованих компоненти.
- 5.1.12 Од свих екстраката и етарских уља, надкритични екстракт FR1 је садржао највише монотерпенских једињења (30,36%) пре свега из групе оксидованих монотерпена (30,24%), са тимолом као доминантном компонентом (29,36%). Најзаступљеније једињење у надкритичном екстракту FR2 је такође био монотерпенски алкохол – тимол (16,46%).
- 5.1.13 Садржај тимола у етарском уљу добијеном у СП-130 био је 7,26%, у етарском уљу добијеном у Clevenger-у 9,62%, у етанолном екстракту 0,46%, у n-хексан екстракту 1,23%, у етанолном екстракту/претретман са n-хексаном 0,44%, и у надкритичном екстракту 30 МПа 5,69%.

- 5.1.14 Резултати су показали да етарско уље мајкине душице добијено у СП-130 и етарско уље добијено у Clevenger-у имају највећи садржај сесквитерпенских компоненти, док је њихов садржај у екстрактима добијеним помоћу екстракције по Soxhlet-у и надкритичном екстракцијом био знатно нижи.
- 5.1.15 Класа монотерпенских угљоводоника је била најзаступљенија у етарском уљу добијеном у СП-130 (9,76%) и у етарском уљу добијеном у Clevenger-у (6,7%), док је њихов садржај у екстрактима добијеним помоћу екстракције по Soxhlet-у и надкритичном екстракцијом био занемарљив.
- 5.1.16 Класа дитерпена није била присутна у етарском уљу добијеном у СП-130, у етарском уљу добијеном у Clevenger-у садржај је био занемарљив (0,19%), док је садржај у екстрактима добијеним помоћу екстракције по Soxhlet-у и надкритичном екстракцијом био у опсегу 2,94-9,23%.
- 5.1.17 Класа тритерпена није била присутна у етарском уљу мајкине душице, док је садржај у екстрактима добијеним помоћу екстракције по Soxhlet-у и надкритичном екстракцијом био у опсегу 0,77-3,59%.
- 5.1.18 Главна карактеристика екстраката добијених помоћу екстракције по Soxhlet-у и помоћу надкритичне екстракције је претежна заступљеност (више од 50%) нетерпенских алифатичних једињења (претежно п-алкани): нонакосан, утриаконтан и тетракосан.
- 5.1.19 Дванаест једињења је било заступљено у свим узорцима етарских уља и екстраката мајкине душице добијених различитим техникама дестилације и екстракције: борнеол и тимол из групе оксидованих монотерпена; *trans*-неролидол, кариофилен оксид, α -кадинол и гермакра-4(15),5,10(14)-триен-1- α -ол из групе оксидованих сесквитерпена; карвакрол, β -боурбонен, β -кариофилен, β -бисаболен, *trans*-каламенен и δ -кадинен из групе сесквитерпенских угљоводоника.

5.6. Антиоксидативни потенцијал етарских уља и екстраката

- 5.6.1. Етарско уље мајкине душице је испољило значајно антиоксидативно дејство, снажније од од синтетских антиоксиданаса ВНТ и ВНА.

- 5.6.2. На основу DPPH радикал методе редослед од најјаче до најслабије антиоксидативне активности етарског уља и екстраката мајкине душице био је: етарско уље добијено уређајем СП-130 > етарско уље добијено у апаратури по Clevenger-у > ВНА > етанолни екстракт > етанолни екстракт/претретман са n-хексаном > ВНТ > надкритични екстракт 30 МРа > n-хексан-екстракт > надкритични екстракт FR1 > надкритични екстракт FR2.
- 5.6.3. За све екстракте и етарска уља одређен је *in vitro* антиоксидантни капацитет у односу на DPPH радикал. IC₅₀ вредности биле су: 0,503 µL/ml за етарско уље добијено уређајем СП-130; 0,6355 µL/ml за етарско уље добијено у апаратури по Clevenger-у; 0,9777 µg/ml за ВНА; 2,941 µg/ml за етанолни екстракт; 3,000 µg/ml за етанолни екстракт/претретман са n-хексаном; 5,582 µg/ml за ВНТ; 417,3 µg/ml за надкритични екстракт 30 МРа; 439,4 µg/ml за n-хексан-екстракт; 459,4 µg/ml за надкритични екстракт FR1 и 506,8 µg/ml за надкритични екстракт FR2.
- 5.6.4. Обзиром на добијене резултате вероватно антиоксидативна активност етарског уља мајкине душице се не може приписати само доминантним компонентама тимолу и карвакролу као што истичу други истраживачи. У нашем случају се вероватно ради о синергизму између већег броја компоненти присутних у етарском уљу у мањим количинама (65 компоненти).
- 5.6.5. Главне компоненте у испитиваном етарском уљу биле су trans-неролидол и гермакрен Д. Будућа истраживања би требало усмерити на испитивање антиоксидативне активности trans-неролидола и гермакрена Д како би се утврдио њихов допринос изузетно јакој антиоксидативној способности етарског уља добијеног поступком воде и водене паре уређајем СП-130.

5.7. Антимикробно дејство етарских уља и екстраката

- 5.7.1. Етарско уље и екстракти мајкине душице су показали бољу антимикробну активност у односу на комерцијалне антибиотике стрептомицин и ампицилин и комерцијалне фунгициде бифоназол и кетоконазол коришћене као контрола на скоро све тестиране бактеријске

сојење, Грам (+) и Грам (-), и гљиве. Етарско уље је показало бољу антимикробну активност од тимола коришћеног као контрола, док су екстракти имали слабију антимикробну активност од тимола.

- 5.7.2. Етарско уље је деловало на све бактеријске сојење инхибиторно у интервалу 0,019–0,15 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,039–0,3 mg/ml. Забележена је већа антибактеријска активност на Грам-негативне бактерије, најјосетљивији бактеријски сојењи су *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *Enterobacter cloacae* (MBC = 0,039 mg/ml), а најрезистентнија бактерија на испитивано етарско уље била је *Micrococcus flavus* (MBC = 0,3 mg/ml). Етарско уље је испољило боље бактерицидно дејство на све тестиране бактерије изузев на бактерију *Micrococcus flavus* која је показала већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ 30 МПа.
- 5.7.3. Надкритични екстракти су деловали на све бактеријске сојење инхибиторно у интервалу 0,038–0,2 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,075–0,3 mg/ml. Бактерије *Salmonella typhimurium* и *Bacillus cereus* су показале већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ FR1 (MBC = 0,075 mg/ml) у односу на надкритични екстракт НКЕ FR2 (MBC = 0,15 mg/ml). Бактерије *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus flavus* су показале већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ 30 МПа (MBC = 0,09 mg/ml) у односу на надкритичне екстракте НКЕ FR1 и НКЕ FR2 (MBC = 0,15 mg/ml). *Listeria monocytogenes* и *Pseudomonas aeruginosa* (MBC = 0,3 mg/ml), показале су највећу резистентност на испитиване надкритичне екстракте.
- 5.7.4. Етанолни екстракт је деловао на све бактеријске сојење инхибиторно у интервалу 0,038–0,2 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,15–0,3 mg/ml. Етанолни екстракт/претретман са п-хексаном је деловао на све бактеријске сојење инхибиторно у интервалу 0,075–0,15 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,15–0,3 mg/ml. Најосетљивије бактерије су биле *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *Enterobacter cloacae* (MBC = 0,15 mg/ml), а најрезистентније бактерије су биле *Listeria monocytogenes* и *Pseudomonas aeruginosa* (MBC = 0,3 mg/ml).

- 5.7.5. Референтни антибиотик стрептомицин је деловао инхибиторно у интервалу 0,05–0,3 mg/ml и бактерицидно у опсегу 0,1–0,5 mg/ml, ампицилин инхибиторно у опсегу 0,3–0,8 mg/ml и бактерицино у опсегу 0,5–1,25 mg/ml, и тимол инхибиторно у опсегу 0,025–0,1 mg/ml и бактерицино у опсегу 0,05–0,1 mg/ml.
- 5.7.6. Етарско уље је деловало на све тестиране гљиве инхибиторно у интервалу 0,0195–0,039 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,039–0,078 mg/ml. Резултати показују изражену антифунгалну активност етарског уља на све тестиране гљиве у односу на комерцијалне антимицотике кетоконазол и бифоназол. Најосетљивије гљиве су *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor* и *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (MFC = 0,039 mg/ml), а затим *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum* и *Penicillium ochrochloron* (MFC = 0,078 mg/ml).
- 5.7.7. Надкритични екстракти су испољили антифунгалну активност на све тестиране гљиве и деловали су инхибиторно у интервалу 0,017–0,15 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,075–0,3 mg/ml. Бољу антифунгалну активност је показао надкритични екстракт НКЕ FR1. Најосетљивије гљиве су *Aspergillus ochraceus*, *Trichoderma viride* док је најрезистентнија гљива на испитиване надкритичне екстракте *Aspergillus fumigatus* (MFC = 0,3 mg/ml). Гљиве *Aspergillus ochraceus* и *Trichoderma viride* су показале већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ FR1 (MFC = 0,035 mg/ml) у односу на надкритични екстракт НКЕ FR2 (MFC = 0,15 и 0,075 mg/ml респективно). Такође, микромицете *Aspergillus ochraceus* и *Trichoderma viride* су показале већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ FR1 (MFC = 0,035 mg/ml) у односу на етарско уље (MFC = 0,078 mg/ml). Гљиве *Penicillium ochrochloron* и *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* су показале већу осетљивост на надкритични екстракт НКЕ FR1 (MFC = 0,075 mg/ml) у односу на надкритични екстракт НКЕ FR2 (MFC = 0,3 mg/ml).
- 5.7.8. Етанолни екстракт је испољио антифунгалну активност на све тестиране гљиве и деловао је инхибиторно у интервалу 0,075–0,15 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,15–0,3 mg/ml. Етанолни екстракт/претретман са п-хексаном је деловао на све тестиране гљиве инхибиторно у

интервалу 0,075–0,3 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,15–0,7 mg/ml. Гљиве *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium ochrochloron* и *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* су показале већу осетљивост на етанолни екстракт (MFC = 0,15–0,3 mg/ml) у односу на етанолни екстракт/претретман са n-хексаном (MFC = 0,3–0,7 mg/ml).

5.7.9. Референтни антимицотик кетоназол је деловао инхибиторно у интервалу 0,2–2,5 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,5–3 mg/ml, а бифоназол инхибиторно 0,1–0,2 mg/ml и фунгицидно 0,2–0,3 mg/ml. Референтни тимол чистоће $\geq 99\%$ је деловао инхибиторно у интервалу 0,01–0,025 mg/ml и фунгицидно у опсегу 0,01–0,5 mg/ml.

5.7.10. Најснажнију антифунгалну активност на гљиве *Aspergillus ochraceus*, *Trichoderma viride* и *P.ochrochloron* од свих екстраката и етарских уља је испољио надкритични екстракт НКЕ FR1. Етарско уље је испољило боље фунгицидно дејство на све остале тестиране гљиве.

5.8. Модел Совове који је коришћен у анализи кинетике надкритичне екстракције мајкине душице и тимијана, добро описује експерименталне резултате. Поменути математички модел може се успешно користити за одређивање параметара којима се описује растворљивост екстраката и пренос масе у надкритичном флуиду и чврстој фази на различитим условима (притисак, температуре, густина угљеник(IV)-оксида, величина честица, проток надкритичног угљеник(IV)-оксида, итд.). Примена математичког модела Совове дала је очекивано добре резултате при симулацији експерименталних резултата, док су вредности параметара модела у очекиваним оквирима у односу на вредности истих параметара присутне у научној литератури.

6. ЛИТЕРАТУРА

Ammann, A., Hinz, D.C., Addleman, R.S., Wai, C. M., Wenclawiak, B.W. (1999). Superheated water extraction, steam distillation and SFE of peppermint oil. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 364, 650-653

Adams, R.P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / *Mass Spectrometry*, 4th Ed., Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois, 69-351.

Ahmad, A.M., Khokhar, I., Ahmad, I., Kashmiri, M.A., Adnan, A., Ahmad, M. (2006). Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*. *Internet Journal of Food Safety*, 5, 56-60.

Akgul, A., Kivanc, M. (1988). Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. *International Journal of Food Microbiology* 6, 263– 268.

Akgul, A., Kivanc, M., Sert, S. (1991), Effect of carvacrol on growth and toxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *Sciences des Aliments* 11, 361–370.

Alzoreky, N.S., Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 223– 230.

Azzouz, M.A., Bullerman, L.B. (1982), Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection* 45 (14), 1298–1301.

Vajrdorf J. (1826). *Geigers' Journal of Pharmacy*, 11.

Банаева, Ю.А., Покровский, Л.М., Ткачев, А.В. (1999). Исследование химического состава эфирного масла представителей рода *Thymus L.*, произрастающих на Алтае, *Химия растительного сырья*, 3, 41-48.

Бабовић Н. (2010). Антиоксидативне особине фракција добијених из одабраних биљака фамилије *Lamiaceae* поступком надкритичне екстракције, *Докторска дисертација*, Технолошко-металуршки факултет у Београду, 51-61.

Бабовић, Н., Петровић, Д. С. (2011). Obtaining of the antioxidants by supercritical fluid extraction, *Хемијска индустрија*, 65, 79–86.

Бабовић, Н., Дражић, Г., Петровић, С.С. (2013а). Добијање активних материја у преради ароматичног биља на примеру мајкине душице (*Thymus serpyllum L.*), *Часопис за процесну технику и енергетику у пољопривреди*, Vol. 17, 2013, p. 89-92.

Бабовић, Н., Петровић, С. С., Петровић, С. Д., Јовичић, Д. (2013б). Антиоксидативна активност етарског уља мајкине душице (*Thymus serpyllum L.*), б. Међународни конгрес "Екологија, здравље, рад, спорт" 05-08. септембар, Бања Лука, Зборник радова, стр. 155-159.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.

Bartle, K. D., Clifford, A. A., Hawthorne, S. B., Langeenfeld, J. J., Miller, D. J., Robinson, R. (1990). A model for dynamic extraction using a supercritical carbon dioxide : experiments and modeling. *Journal of Supercritical Fluids* 3, 143-149.

Bayoub, K., T. Baibai, Mountassif D., Retmane, A., Soukri, A. (2010), *African Journal of Biotechnology*, 9(27), 4251–4258.

Belborodov, V.V. (1960) *Metodi rasčjeta procesa ekstrahirivanja rastiteljnih masel.* Moskva: Piščepromizdat

Benyoussef E. H., Hasni S., Belabbes R., Bessiere M. (2002). Modelisation du transfert de matiere lors de extraction de huile essentielle des fruits de coriandre, *Chemical Engineering Journal*, 85, 1-5

Bishop, C.D., (1995), Antiviral activity of the essential oil of Melaleuca alternifolia (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research* 7, 641– 644.

Booth, C. (1971). Fungal Culture Media. In: Norris, J. R., Ribbons, D. W. (Eds.), *Methods in Microbiology*, Academic Press, London and New York, 49-94.

Boutekdjiret C., Bentahar F., Belabbes R., Bessiere J.M. (2005). Comparative study of the kinetics extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hidrodistillation, *10^{ème} Congrès Francophone de Génie des Procédés : GP 2005. Toulouse, France, 19-22 Septembre 2005.*

Bouvier, N.J.M., Parent, F., Forget, M., French Patent NO 9309720, International Extension PCT FR 94/00975, 1994.

Божин, Б., Мимица-Дукиц, Н., Симин, Н., Анацков, Г., (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 1822-1828.

Boyle, W., (1955), Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review* 66, 25– 28.

Breitmaier, E. (2006), Terpenes, wiley-VCH, Verlag, GmbH/Co. KgaA, Wein., ISBN 3-527-31786-4.

Brunner, G. (1994). Gas extraction : an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes New York, Steinkopff.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review, *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.

Calliste, C. A., Trouillas, P., Allais, D. P., Simon, A., Duroux, J. L. (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3321-3327.

Carson, C.F., Riley, T.V., (1995), Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of Melaleuca alternifolia. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 264–269.

Carson, C.F., Cookson, B.D., Farrelly, H.D., Riley, T.V., (1995a), Susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to the essential oil of Melaleuca alternifolia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 35, 421–424.

Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., (1995b), Broth microdilution method for determining the susceptibility of Escherichia coli and Staphylococcus aureus to the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *Microbios* 82, 181– 185.

Cassel E., Vargas R.M.F. (2006), Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential oil Extraction by Steam Distillation, *Journal of the Mexican Chemical Society*, 50, 126-129.

Cerpa M.G., Mato R.B., Copcero M.J. (2008), Modeling steam distillation of essential oils: application to lavandin super oil, *AIChE* 1 54, 909-917.

Chemat, F., Huma, Z. and Khan, M.K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chemat S., Lagha, A. AitAmar, H. Bartels, P.V. Chemat, F. (2004). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds, *The Flavour and Fragrance Journal*, 19, 188.

Crank J., (1975). The mathematics of diffusion, Oxford University Press, Oxford.

Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56, 324-327.

Daouk, K.D., Dagher, M.S., Sattout, J.E. (1995). Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L, *Journal of Food Protection*, 58, 1147-1149.

Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Lelyveld, G. P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linssen, J. P. H., Venskutonis, R. (2002). Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves, *Journal of Natural Products*, 65, 892-896.

Deans, S.G., Ritchie, G., (1987), Antibacterial properties of plant essential oils, *International Journal of Food Microbiology* 5, 165- 180.

Demachy J., (1773). L-art du distillateur des eaux fortes, Paris

Díaz-Maroto, M.C., Díaz-Maroto Hidalgo, I.J., Sánchez-Palomo, E., PérezCoello, M.S., (2005). Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5385-5389.

Dioscorides, (80 p.n.e), De materia medica, I, 34, 39, 80

Evans, W.C. (2000). Trease and Evans' Pharmacognosy. 15th ed., Saunders, Edinburgh.

Fecka, I., Turek, S. (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 108, 1039-1053.

Gaspar, F., Lu, T., Santos, R., Al-Duri, B., (2003a). Modelling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 25, 247-260

Gaspar, F., Leeke, G.A., Al-Duri, B., Santos, R., (2003b). Modelling the disruption of essential oils glandular trichomes with compressed CO₂, *Journal of Supercritical Fluids* 25 233-245.

Gebri, A. (1682). Summa perfectionis magisteri, Gedani.

Горуновић М.С., Лукић П. (2001). Фармакогнозија-уџбеник, Београд, 429-438, 472-474.

Goodarznia I., M., Eikani, H. (1998). Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils: modelling and simulation, *Chemical Engineering Science*, 53, 1387-1395.

Goto, M., Sato, M. Hirose, T. (1993). Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 26(4), 401-407.

Grosso, C. J., Coelho, P., Pessoa, F.L.P., Fareleira, J.M.N.A., Barroso, J.G., Urieta, J.S., Palavra, A.F., Sovová, H., (2010). Mathematical modelling of supercritical CO₂ extraction of volatile oils from aromatic plants, *Chemical Engineering Science* 11, 3579-3590.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., (2008a). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients, *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91-97.

Gutierrez, J., Rodriguez, G., Barry-Ryan, C., Bourke, P., (2008b). Efficacy of plant essential oils against food borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: antimicrobial and sensory screening, *Journal of Food Protection*, 71, 1846-1854.

Guenther, E. (1948). *The Essential Oils*. D. Van Nostrand, New York, 85-187.

Hanci S., Sahin, S. Yilmaz, L. (2003). Isolation of volatile oil from thyme (*Thymbra spicata*) by steam distillation, *Molecular Nutrition & Food Research*, 47, Issue 4, 252-255.

Hanel, H., Raether, W. (1988). A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses*, 31, 148-154.

Herodež, Š. S., Hadolin, M., Škerget, M. and Knez, Ž. (2003). Solvent extraction study of antioxidants from *Melissa officinalis* L. leaves, *Food Chemistry*, 80, 275-282.

Herodot, (400 p.n.e) *Historiae*, II.

Hojnik, M., Škerget, M., Knez, Ž., (2008). Extraction of lutein from Marigold flower petals e Experimental kinetics and modelling, *Food Science and Technology*, 41, 2008-2016.

Hong, I.K., Rho, S.W., Lee, K.S, W.H. Lee, Yoo, K.P., (1990). Modeling of soybean oil bed extraction with supercritical carbon dioxide, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 7 40-46.

Hussain, A.I., Anwar, F., Chatha, S.S.A.S., Latif, S., Sherazi, S.T.H., Ahmad, A., Worthington, J., Sarker, S.D. (2013). Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two Thymys species from the Pakistani flora, *LWT - Food Science and Technology*. 50, 185-192.

Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathélet, J.P., Ankit, M., Khedid, K., Bachiri, A.E. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thyme (Thymus vulgaris)* from eastern Morocco, *International Journal of Agriculture and Biology*, 11, 205–208.

Ivanović J., Mišić, D. Žižović, I. Ristić, M. (2012), In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates, *Food Control*, 25, 110-116.

Ivanović, J., Zizovic, I., Ristic, M., Stamenić, M., Skala, D., (2011). The analysis of simultaneous clove/oregano and clove/thyme supercritical extraction, *Journal of Supercritical Fluids*, 55(3): 983-991.

Joannis R., (1613). *Medici*, Part 1. Theorem chemical techniques, Frankfurt.

Johanni R., (1648). *Description found new ways distillation*, Amsterdam.

Juglal, S., Govinden, R., Odhav, B., (2002), Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi, *Journal of Food Protection*, 65(4), 683–687.

Jugoslovenska Farmakopeja, (2000). Ph. Jug.V. Knjiga 1 i 3. Savezni zavod za zastitu i unapredjenje zdravlja, Beograd.

Kandiah, M., Spiro, M., (1990). Extraction of ginger rhizomes studies with supercritical carbon dioxide, *International Journal of Food Sciences and Technology*, 25, 328-338.

Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z.G., Mavragani-Tsipidou, P., (1998), Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1111–1115.

Kačaniová, M., Vuković, N., Hleba, L., Bobková, A., Pavelková, A., Rovná, K., Arpášová, H., (2012). Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* essential oils, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2, 263-271.

Kenig E.Y., (2008). Complementary modelling of fluid separation processes, *Chemical Engineering Research and Design*, 86, 1059–1072.

Китић, Д. (2006). Дивљи босиљак, хемијско и микробиолошко испитивање, Задужбина Андрејевић, Београд.

Kloucek, P., Smid J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I., Pavela, R. (2012). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International*, 47, 161–165.

Ковачевић, Н. (2000). *Основи фармакогнозије-уџбеник*. Београд, с. 250-265.

Ковачевић, Н. (1999). Ароматичне дроге у терапији респираторног тракта; *Основи фармакогнозије*; Српска школска књига Београд 3. издање 269-273.

Konstantopoulou, I., Vassilopoulou, L., Mavragani-Tsipidou, P., Scouras, Z.G., (1992), Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*, *Experientia* 48 (6), 616– 619.

Koul, V.K., Babu, G.D, (2007), Variations in quantitative and qualitative characteristics of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) oils distilled under vacuum and at NTP, *Industrial Crops and Products* 26, 241-251.

Kulišić, T., Radonić, A., Miloš, M. (2005). Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils, *Italian Journal of Food Science*, 3, 315-324.

Левић, Ј., Чабаркапа, И., Тодоровић, Г., Павков, С., Средановић, С., Coghil-Galonja, T., Костадиновић, Љ., (2011). In vitro antibacterial activity of essential oils from plant family *Lamiaceae*, *Romanian Biotechnological Letters*, 16, 6034-6041.

Lee, M. L., Mafkides, K. E. (1990). Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, Department of Chemistry, Brigham Young University, Provo, Utah 8460, p. 326.

Lee, S.J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee., K.G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91, 131–137.

Longbottom, C. J., Carson, C. F., Hammer, K. A., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2004). Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), 386–392.

Lonicer, A. (1573). Distilling herbs, An Apothecary's Garden, Kreuterbuch, Frankfurt.

Maher Ali Al Maqtari, A., Saeed Alghalibi, M., Ebtessam Alhamzy, H. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris* from Yemen, *Turkish Journal of Biochemistry*, 36, 342–349.

Mahmoud, S.S., Croteau, R.B., (2002), Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7(8), 366–373.

Mari, M., Bertolini, P., Pratella, G.C., (2003), Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 761–766.

Martin K.W., Ernst E., (2004). Herbal medicines for treatment of fungal infections: a systematic review of controlled clinical trials, *Mycoses*, 47, 87-92.

Meireles, M. A. A., (2009). *Extracting bioactive compounds for Food Products: Theory and Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, 272-306.

Mesue, L. (1602). *Simplicita et composite, et antidotarii novem posterioris sections adiotiones*, Venetiae.

Милосављевић М. С., (1994), Структурне инструменталне методе, Хемијски факултет, Београд

Miura, K., Inagaki, T., Nakatani, N. (1989). Structure and activity of new deodorant biphenyl compounds from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1816-1819.

Miura, K., Kikuzaki, H., Nakatani, N. (2002). Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1845–1851.

Moore W. (1975). Физичка хемија, Научна књига, Београд.

Morin, P. Gunther, C. Peyron, L. Richard, H. (1985). Etude des phenomenes physicochimiques intervant lors du procede d'hydrodillation, *Bull. Soc. Chirn. Fr.* 5, 921-930.

Mourey, A., Canillac, N., (2002), Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13, 289–292.

Moyler, D. A. (1994). Oleoresins, tinctures and extracts, *Food Flavourings*, Ashryrst, P. R., Ed., Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall, Glasgow.

Moyler, D. (1998). International Federation of Essential Oils and Aroma Trades—21st International Conference on Essential Oils and Aroma's. IFEAT, London, 33–39.

Mykhopadhyay, M. (2000). *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*. CRC Press, Boca Raton, FL, 5.

Николић, М., Гламочлија, Ј., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Fernandes, Â., Марковић, Т., Марковић, Д., Giweli, A., Соковић, М. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumoractivity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils, *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.

Orčić, D. Z., Neda Mimica-Dukić, S. S. Petrović, Marina M Francišković, Emilija Đ Jovin, (2011). Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L., *Chemistry Central Journal*, 5:34.

Osborn. J.O.. & Katz. D.L. (1944). Structure as a variable in the application of diffusion theories to extraction. Transactions of the American Institute of Chemical Engineers, 5, 511-531

Oszagyán, M., Simándi, B., Sawinsky, J. & Kéry, Á. (1996): A comparison between the oil and supercritical carbon dioxide extract of Hungarian Wild Thyme (*Thymus serpyllum* L.), *Journal of essential oil research*, 8, 333–335.

Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H.N., Kumar, S., (2000). Essential oil compounds as potent source of nematocidal compounds. *Journal of Phytopathology* 148 (7–8), 501–502.

Петровић Д. С., Мијин Ж. Д., Стојановић, Д. Н. (2009), Хемија природних једињења - уџбеник, ТМФ Београд, Универзитет у Београду, 2 изд, 358-380.

Петровић С.С. (1998). Историја дестилације, *Лековите сировине*, 17, с. 125-135.

Петровић С.С., Ивановић Ј., Миловановић С., Жижовић И. (2012). Comparative analyses of diffysion coefficients for different extraction processes from thyme, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77, 799–813.

Петровић, С.С., Ристић, М.С., Бабовић, Н.В., Лазић, М.Л., Францишковић, М., Петровић, С.Д. (2013): Хемијски састав и антиоксидативна активност етарског уља *Thymus serpyllum* L., *Хемијска индустрија* DOI:10.2298/HEMIND130513051P.

Пилетић В., Милић Б.Љ., Ђилас С.М. (1993). Органска хемија II део, Нови Сад, 347-357.

Plinius, (15). *Historia naturalis*, I, 16.

Пономарев, В.Д. (1976), Экстрагирование лекарственного сырья, Медицина, с.274.

Porte A., Godoy R.L.O. (2008). Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (Thyme) essential oil from the Rio de Janeiro state, Brazil. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73, 307-310.

Raal, A., Paaver, U., Arak, E., Orav, A. (2004). Content and composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia, *Medicina (Kaunas)*, 40, 795-800.

Rahman, M., Gyl, S. (2003). Antibacterial activities of *Thymus serpyllum* essential oil. Pakistan, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 46, 135-138.

Reis-Vasco, E.M., Coelho, A.M.F. Palavra, C. Marrone, Reverchon, E., (2000). Mathematical modelling and simulation of pennuroyal essential oil supercritical extraction, *Chemical Engineering Science*, 55, 2917-2922.

Reverchon, E., G. Donsi, L. S. Osseo, (1993). Modeling of Supercritical Fluid Extraction from Herbaceous Matrices, *Industrial Engineering Chemical Research*, 32, 2721-2726.

Reverchon, E., L.S. Osseo, (1994). Supercritical CO₂ Extraction of Basil Oil: Characterization of Products and Process Modeling, *Journal of Supercritical Fluids*, 7, 185-190.

Reverchon, E., M. Poletto, (1996). Mathematical modelling of supercritical CO₂ fractionation of flower concretes, *Chemical Engineering Science*, 51, 3741-3748.

Reverchon, E., De Marco, I., (2006), Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 146-166.

Romanik G, Gilgenast E, Przyjazny A, Kamiński M., (2007). Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal Biochem Biophys Methods*, 70(2), 53-61.

Romdhane M., Tizaoui C. (2005). The kinetic modeling of a steam distillation unit for the extraction of aniseed (*Pimpinella anisum*) essential oil, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 759-766.

Roy, B.C., M. Goto, T. Hirose, (1996). Extraction of ginger oil with supercritical carbon dioxide: experiments and modeling, *Industrial Engineering Chemical Research*, 35, 607-612.

Ružička L. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9(10), 57-67.

Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121-137.

Сарић, М. (1989). Лековите биљке Србије, књига 65, САНУ, Одељење природно-математичких наука, Београд, с.553.

Şaşmaz, D. A., (1996). Evaluation of the Diffusion coefficient of Rapeseed Oil During Solvent Extraction with Hexane, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 669-671.

Schelenz H. (1911). History pharmaceutical-chemical apparatus for distilling, report Schimmel&Co, Julius Springer, Berlin

Schwarz, K., Ernst, H., Ternes, W. (1996). Evaluation of antioxidative constituents from thyme. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 217-223.

Скала, Д., Жижовић, И., Гавранчић, С. (2002). Примена надкритичне екстракције у прехранбеној индустрији, *Хемијска индустрија*, 56, 179-190.

Соколић-Михалак, Д., Фреце, Ј., Славица, А., Делаш, Ф., Павловић, Х., Марков, К., (2013). The effects of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oil components against ochratoxin-producing aspergilli, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63, 457-462.

Соковић, М, Гламочлија, Ј., Марин, П.Д., Бркић, Д., van Griensven, L. D., (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15, 7532-7546.

Sovova, H., Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I. Modelling of extraction curves, *Chemical Engineering Science*, 49 (3) (1994a), 409-414.

Sovova, H., J. Kucera, J. Jez., (1994b). Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – II. Extraction of grape oil, *Chemical Engineering Science*, 49, 415-420.

Sovova, H., R. Komers, J. Kucera, J. Jez., (1994c). Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil, *Chemical Engineering Science*, 49, 2499-2505.

Sovova, H., (2005), Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation, *Journal of Supercritical Fluids*, 33, 35-52.

Sovova H., Aleksovski S.A. (2006). Mathematical model for hidrodistillation of essential oils, *The Flavour and Fragrance Journal*, 21, 881-889.

Sowbhagya H.B., Sathiendra Rao B.V., Krishnamurthy N. (2008). Evaluation of size reduction and expansion on yield and quality of cumin (*cuminum cyminum*) seed oil. *Journal of Food Engineering*, 84, 595-600.

Stamenić, M., (2006). Ekstrakcija etarskih ulja natkritičnim ugljen dioksidom iz korena odoljena i ploda šargarepe – matematičko modelovanje na nivou sekrecionih struktura, Magistarska teza, TMF, Beograd

Stamenić, M., Žižović, I., Orlović, A., Skala, D., (2008). Mathematical modelling of essential oil SFE on the micro-scale-classification of plant material, *Journal of Supercritical Fluids*, 46, 285–292.

Stamenić, M., Žižović, I., Eggers, R., Jaeger, P., Heinrich, H., Róž, E., Ivanović, J., Skala, D., (2010). Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids*, 52, 125-133.

Станисављевић, Д.М., Златковић, Б.П., Ристић, М.С., Величковић, Д.Т., Ђорђевић, С.М., Лазић, М.Л. (2012). Хемијски састав етарског уља (*Thymus serpyllum* Л.) са подручја Копаоника, *Савремене технологије*, 1, 25-29.

Станковић, Н.С., Чомић, Љ.Р., Коцић, Б.Д., Николић, Д.М., Михајилов-Крстев, Т.М., Илић, Б.С., Миладиновић, Д.Л. (2011). Однос антибактеријске активности и хемијског састава етарских уља гајених биљака из Србије, *Хемијска индустрија*, 65, 583–589.

Stanojević, Lj., Stanković, M., Nikolić, Lj., Nikolić, V., (2007). The influence of the operation conditions and the extraction techniques on the yield, kinetics and the composition of ethanol extracts of *Hieracium pilosella* L., *CI&CEQ* 13, 199-204.

Svoboda, P., Svoboda, T. G., (2000). Secretory Structures of Aromatic and Medicinal Plants, *Miroscopix Publications*, United Kingdom, p. 9-11.

Škerget, M., Bezjak, M., Makovšeg, K., Knez, Ž., (2010). Extraction of Lutein Diesters from *Tagetes Erecta* using Supercritical CO₂ and Liquid Propane, *Acta Chimica Slovenica* 57, 60-65.

Tezaurus E., (1583). How the oil is separated and extracted from food, flowers and seeds, Cirih

Topal U., Sasaki M., Goto M., Otles S. (2008). Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59, 619-634.

Treybal R.E., (1968), Mass Transfer Operations, 2nd ed. MacGraw-Hill New York, 408-488.

Туцаков, Ј. (1990). Лечење биљем; Рад Београд, с. 452.

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.

Ultee, A., Bennink, 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.

Ummihan, U., Mitsuru, S., Motonobu, G., Semih, O. (2008). Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59, 619-634.

Valerii, C. (1540). Annotationes in Pedacci Dioscoridis de Materia medica libros quinque. Liber de artificiosis extractionibus, 206.

Veljković, V., Milenović, D., (2002). Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.) II. Poređenje modela kinetike ekstrakcije, *Hemijska Industrija* 56, 60-67.

Van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J., (1999). Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.

Velčković, D., (2007), Ultrazvučna ekstrakcija žalfije (*Salvia* L.), *Monografija*, Zadužbina Andrejević, Beograd.

Velčković, D.T., Milenović, D.M., Ristić, M.S., Veljković, V.B., (2008). Ultrasonic extraction of waste solid residues from the *Salvia* sp. Essential oil hydrodistillation, *Biochemical Engineering Journal*, 42, 97–104.

Veljković Vlada B., Milenović Dragan M. (2002). Extraction of resinoids from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L): II. Modeling of extraction kinetics. *Hemijska industrija*, 56, 60-67.

Vinatoru M., (2001), An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303-313.

Влатковски С., Лазарев В., Обрадов Д. (1996). Могућност коришћења лековитих биљака у ЈП Србија шуме. *Лековите сировине*, 15, 113-120.

Wallach O., (1887), Zur Kenntniss der Terpene und ätherischen Oele.

Wang, L., and Weller, C.L., (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Science Technology*, 17, 300–312

Wang, H. C., Chen, C. R., Chang, C. J. (2001). Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides, *Food Chemistry*, 72, 505-509.

Wani B.A., Ramamoorthy, D., Khaleefa, A., Malik, A.H., Ganai, B.A. (2013). Antibacterial activity of aerial parts of *Thymus serpyllum* Linn. against clinically important bacterial strains, *International Journal of Science Inventions Today*, 2, 78-85

Wichtl, M. (1994). Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, p. 470.

Wiedemann E. (1878). Excerpts from the writings of Arab Rhasesa

Yanishlieva, N.V. in: Pokorny, J., Yanishlieva, H., Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food: Practical Applications*, CRC Press, Cambridge, 23—56.

Yanishlieva, N. V., Marinova, E., Pokorny, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 776–793.

Youdim, K.A., Dormanand, H.J.D., Deans, S.G. (1999). The antioxidant effectiveness of thyme oil, α -tocopherol and ascorbyl palmitate on evening primrose oil oxidation. *Journal of Essential Oil Research*, 11, 643-648.

Zeise H., (1828). Contributions for the useful application of water vapor, an archive of Pharmacy 16.

Zeković, Z., Lepojević, Ž., Vujić, D., (2000). Supercritical extraction of thyme (*Thymus vulgaris* L.), *Chromatographia*, 51 175–179.

Zeković Z.P., Lepojević Ž.D., Markov S.L., Milošević S.G. (2002): “Tablets with thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts, *Acta Periodica Technologica* 33, 159-165.

Zhang, Z.S., Wang, L.J., Li, D., Jiao, S.S., Chen, X. D., Ma, Z.H. (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed, *Separation and Purification Technology*, 62, 192-198.

Žižović, 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.

Žižović, I.; Stamenić, M.; Orlović, A.; Skala, D. (2006). Energy saving in supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from Lamiaceae family species, *CI&CEQ*, 12, 164-167.

Žižović, Z., Stamenić, M., Ivanović, J., Orlović, A., Ristić, M., Djordjević, S., Petrović, S. D., Skala, D., (2007a). Supercritical carbon dioxide extraction of sesquiterpenes from valerian root, *Journal of Supercritical Fluids* 43, 249-258.

Žižović, I., Stamenić, M., Orlović, A., Skala, D., (2007b). Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale, *Journal of Supercritical Fluids*, 39, 338-346.

Žižović I., (2009). Ekstrakcija etarskih ulja natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom– Matematičko modelovanje na nivou sekrecione strukture, Beograd, *Monografija*, Tehnološko-metalurški fakultet Beograd.

7. ПРИЛОЗИ

7.1. Прилог 1

Табела бр. 7.1.1: Експериментални подаци (време екстракције, потрошња растварача и принос екстракта) добијени уређајем за НКЕ – *Thymus serpyllum L.* под условима НКЕ FR1 *Thymus serpyllum*

t (min)	Δt	$\Sigma \Delta t$	Δm_{CO_2} (g)	m (g)	Δm	$\Delta m/mbm$ (%)	$\Delta m_{CO_2}/mbm$
11.35-11.42	7	7	50	134,03	0,072	0,144	0,998
11.44-11.52	8	15	100	134,06 8	0,110	0,219	1,995
11.54-11.59	5	20	150	134,11 6	0,158	0,315	2,993
12.01-12.07	6	26	200	134,14 7	0,189	0,377	3,991
12.09-12.14	5	31	250	134,16 1	0,203	0,405	4,988
12.15-12.20	5	36	300	134,18 6	0,228	0,455	5,986
12.21-12.34	13	49	400	134,23 1	0,273	0,545	7,981
12.36-12.46	10	59	500	134,24 2	0,284	0,567	9,977
12.54-13.04	10	69	600	134,24 8	0,290	0,579	11,972
mbm =50,117 g		P=10 MPa		ma=133,958 g		me=69 mg	
mCO ₂ =76,400 kg		t=40 °C		d~0,4 mm			

Табела бр. 7.1.2: Експериментални подаци (време екстракције, потрошња растварача и принос екстракта) добијени уређајем за НКЕ – *Thymus serpyllum L.* под условима НКЕ FR2 *Thymus serpyllum*

t (min)	Δt	$\Sigma \Delta t$	Δm_{CO_2} (g)	m (g)	Δm	$\Delta m/mbm$ (%)	$\Delta m_{CO_2}/mbm$
13.18-13.28	10	10	50	78,630	0,054	0,108	0,998
13.30-13.42	12	22	100	78,650	0,074	0,148	1,995
13.45-13.54	9	31	150	78,662	0,086	0,172	2,993
13.55-14.14	19	50	200	78,689	0,113	0,225	3,991
14.15-14.43	28	78	300	78,719	0,143	0,285	5,986
14.46-15.16	30	108	400	78,741	0,165	0,329	7,981
15.17-15.44	27	135	500	78,755	0,178	0,357	9,977
15.45-15.55	10	145	600	78,760	0,184	0,367	11,972
me=72 mg							

Табела бр. 7.1.3: Експериментални подаци (време екстракције, потрошња растварача и принос екстракта) добијени уређајем за НКЕ – *Thymus serpyllum* L. под условима НКЕ 30 МПа (непрекидна) *Thymus serpyllum*

t (min)	Δt	$\Sigma \Delta t$	Δm_{CO_2} (g)	m (g)	Δm	$\Delta m/mbm$ (%)	$\Delta m_{CO_2}/mbm$
10.44-10.51	7	7	50	134,05 2	0,102	0,199	0,974
10.55-11.07	12	19	100	134,10 0	0,150	0,292	1,949
11.11-11.21	10	29	150	134,13 8	0,188	0,366	2,923
11.21-11.35	14	43	200	134,21 8	0,268	0,522	3,898
11.39-12.02	23	66	300	134,26 8	0,318	0,620	5,847
12.03-12.30	27	93	400	134,35 1	0,401	0,781	7,796
12.32-12.58	26	119	500	134,39 7	0,447	0,871	9,744
13.00-13.26	26	145	600	134,42 1	0,471	0,918	11,694
13.27-13.43	16	161	650	134,42 9	0,479	0,934	12,668
mbm =51,316 g mCO ₂ =74,600 kg		P=30 МПа t=40 °C		ma=133,95 g d~0,4 mm		me=716 mg	

7.2. Прилог 2

Табела 7.2.1: Збирна табела хемијског састава етарског уља и екстракта *Thymus serpyllum L.*

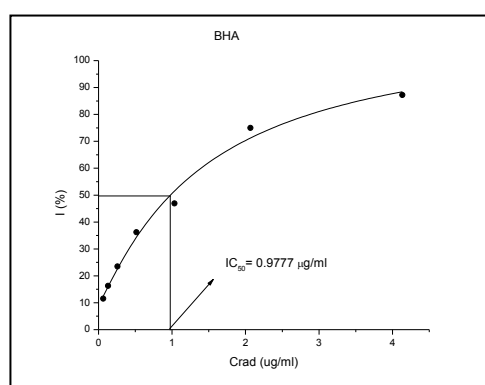
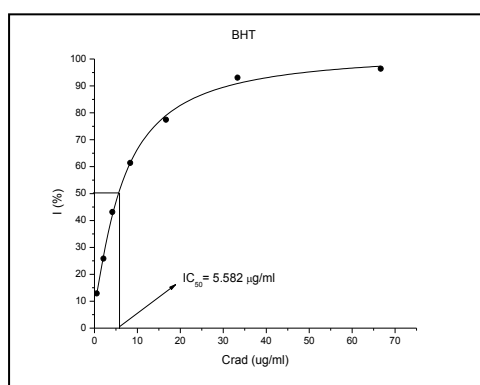
Pk	Једињења	SP-130	Cleven.	NKE FR1	NKE FR2	NKE-30	Sox n/EtOH	Sox n-h	Sox EtOH	KIE
		% m/m	% m/m	% m/m	% m/m	% m/m	% m/m	% m/m	% m/m	KIE
20	Borneol	0,56	0,53	0,09	0,10	0,16	0,64	0,09	0,26	1159,6
31	Thymol	7,26	9,62	29,36	16,46	5,69	0,44	1,23	0,49	1303,9
32	Carvacrol	0,61	0,66	0,12	0,11	0,16	1,13	0,11	0,69	1313,3
37	β -Bourbonene	0,87	1,02	0,08	0,11	0,15	0,27	0,10	0,23	1371,4
40	β -Caryophyllene	2,76	3,25	0,28	0,33	0,47	0,12	0,09	0,18	1408,3
56	β -Bisabolene	3,33	5,10	0,53	0,57	0,89	0,21	0,35	0,06	1501,0
57	trans-Calamenene	0,97	1,07	0,19	0,17	0,14	0,95	0,30	0,84	1510,4
58	δ -Cadinene	3,73	4,72	0,52	0,45	0,56	0,13	0,28	0,19	1512,9
64	trans-Nerolidol	24,20	19,79	1,72	2,59	3,04	1,94	1,12	1,15	1560,5
65	Caryophyllene oxide	1,12	0,97	0,09	0,11	0,16	0,13	0,11	0,10	1569,6
77	α -Cadinol	2,45	1,53	0,16	0,13	0,19	0,22	0,12	0,10	1643,6
79	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1,54	0,76	0,15	0,22	0,28	0,27	0,40	0,07	1681,3
34	Terpinyl acetate	1,01	1,00	0,09	0,07	0,12	1,26		1,01	1343,9
50	Germacrene D	16,02	18,48	1,01	2,35	2,58	0,64		0,27	1472,0
67	Viridiflorol	0,61	0,81		0,11	0,09	0,08	0,16	0,03	1577,8
78	Helifolenol A	0,37	0,25		0,08	0,11	0,04	0,15	0,04	1674,7
85	Hexahydrofarnesyl acetone		0,90	0,45	0,28	0,51	0,47	0,77	0,20	1848,3
94	Oleic acid		0,19	1,08	0,53	0,63	1,81	0,97	0,65	2108,1
27	Linalool acetate			0,14	0,26	0,30	0,55	0,12	0,22	1255,4
80	Oplopanone			0,08	0,16	0,17	0,88	0,16	0,67	1733,1
81	(2E,6E)-Farnesol		0,11		0,11	0,09	0,30	0,13	0,20	1751,7
82	8 α -11-Elemodiol			0,20	0,22	0,24	0,33	0,30	0,17	1754,7
84	Neophytadiene, Isomer III			0,18	0,25	0,20	0,93	0,54	0,52	1840,4
86	Hexadecanol			0,10	0,19	0,19	0,19	0,20	0,07	1853,5
87	Neophytadiene isomer*			0,11	0,14	0,15	0,42	0,23	0,08	1865,4
90	Ethyl hexadecanoate			4,61	5,45	5,70	10,82	6,38	4,12	1999,1
91	Manool		0,19	0,21	0,09	0,24	0,14	0,36		2044,1
93	Methyl oleate			0,40	0,26	0,15	0,07	1,71	0,04	2103,1
95	trans-Phytol			6,81	7,35	7,82	7,74	4,03	2,34	2119,6
99	3-Methyltetracosane			0,85	0,26	0,63	0,32	0,92	0,29	2466,3
101	3-Ethyltetracosane			0,91	0,34	0,75	0,30	0,74	0,88	2578,6
103	Tetracosanal			0,20	12,25	10,52	0,09	5,09	20,34	2637,4
105	n.i.=not identified			0,17	0,40	0,44	0,39	0,34	0,30	2680,1
107	Heptacosane			2,80	0,87	2,26	2,06	3,07	0,82	2714,4
109	3-Methylheptacosane			1,70	0,39	1,41	0,56	1,71	0,19	2785,9
110	Octacosane			0,84	0,37	0,79	1,29	0,96	0,90	2812,5
111	Squalene			2,04	0,73	1,70	0,42	0,79	0,21	2835,5
112	1-Hexacosanol			0,70	1,69	1,10	0,02	3,04	0,48	2847,6
113	3-Methyloctacosane			0,58	1,05	1,65	0,82	0,86	0,33	2873,1
114	2-Methyloctacosane			0,46	0,48	0,99	0,79	0,45	0,29	2883,3
115	Nonacosane			18,21	14,64	17,58	20,05	27,17	15,46	2922,8
118	3-Methylnonacosane			1,70	0,43	2,23	0,99	1,67	0,24	2981,7
119	Triacotane			1,42	1,52	3,15	1,68	2,06	3,80	3005,6
120	1-Heptacosanol			0,46	1,66	1,01	0,17	2,00	0,10	3041,2
121	3-Methyltriacotane			0,59	0,16	0,80	0,59	0,66	0,29	3061,8
123	Untriacotane			10,45	13,47	12,07	16,36	18,88	17,55	3104,4

125	α -Tocopherolquinone			0,14	0,34	0,71	0,16	0,20	1,94	3131,7
126	3-Methylhentriacontane			0,19	0,52	0,65	0,56	0,66	0,63	3171,3
127	Dotriacontane			1,09	0,72	0,79	0,07	0,47	0,51	3202,3
129	β -Sitosterol			0,87	0,33	0,72	0,90	1,02	0,57	3296,4
130	Tritriacontane			1,57	3,72	2,26	2,76	2,42	2,23	3332,2
10	p-Cymene	2,11	1,89	0,12	0,08	0,14				1018,8
15	cis-Thujone	1,89	1,51	0,12	0,10	0,16				1099,8
28	Geraniol	1,42	2,11	0,16	0,15	0,24				1263,0
38	β -Cubebene	0,64	1,05			0,08	0,14		0,25	1379,2
39	β -Elemene	0,71	0,61		0,07	0,11	0,12			1382,0
42	β -Gurjunene		0,16		0,08		0,30	0,10	0,25	1426,4
48	(E)- β -Farnesene	2,28	2,74	0,22	0,32	0,38				1457,7
54	Bicyclogermacrene	0,63	0,77	0,12	0,05		0,03			1487,1
61	cis-Sesquisabinene hydrate	0,29	0,36		0,05		0,18		0,12	1536,9
70	β -Oplophenone	0,39	0,32				0,03	0,10	0,08	1596,5
76	Ledene oxide II*		0,34		0,08		0,05	0,13	0,08	1640,7
88	1-Nonadecene			0,09	0,12		0,24	0,11	0,13	1878,9
92	Methyl linoleate			0,35	0,30	0,12	0,03	0,24		2095,6
96	Tricosane			0,08	0,11		0,07	0,22	0,04	2302,7
102	Hexacosane			0,15	0,09	0,33	0,12	0,19		2603,7
104	3-Methylhexacosane			0,36	0,09	0,26	0,10	0,37		2670,5
106	n.i.=not identified				0,18	0,11	0,74	0,12	0,20	2688,1
116	n.i.=not identified			0,18		0,16	0,18	0,11	0,14	2940,3
122	2-Methyltriacontane*			0,19		0,26	0,32	0,25	0,32	3071,3
124	α -Tocopherol (vitamin E)				0,26	0,45	0,62	0,46	0,15	3117,5
12	1,8-Cineole	1,38	0,89	0,08	0,05					1022,7
14	γ -Terpinene	1,48	1,13					0,09	0,31	1052,4
18	α -Campholenal	0,24	0,10				0,83		0,87	1124,9
19	Camphor	0,99	0,64	0,08			1,92			1134,1
22	Terpinen-4-ol	0,40	0,30				2,53		1,68	1172,4
23	α -Terpineol	0,52	0,37				1,07		0,86	1187,9
24	Thymol methyl ether	0,29	0,24				1,84		1,70	1232,9
26	Thymoquinone	0,43	0,21				0,41		0,36	1246,7
36	α -Copaene	0,27	0,43				1,40		1,03	1363,8
46	α -Humulene	0,40	0,44		0,06	0,10				1439,8
47	allo-Aromadendrene	0,34	0,51		0,06	0,07				1453,6
49	γ -Muurolene	0,54	0,14	0,12	0,05					1466,0
51	β -Selinene		0,17		0,08		0,13		0,30	1478,5
60	α -Cadinene	0,21	0,30				0,03		0,07	1525,8
66	Thujopsan-2- α -ol	0,34					0,04	0,10	0,02	1575,0
74	epi- α -Cadinol (τ -Cadinol)	1,47	1,20	0,09	0,08					1630,0
75	α -Muurolol (Torreyol)	0,57	0,43		0,05		0,18			1636,1
83	2- α -Acetoxy-amorpha-4,7(11)-diene				0,10	0,10	0,54		0,15	1817,5
89	Methyl palmitate				0,10	0,17	0,01	0,99		1930,4
98	Docosanal			0,16		0,12	0,05	0,14		2430,6
108	n.i.=not identified			0,19		0,09	0,14	0,16		2724,5
117	n.i.=not identified			0,25		0,19	0,07	0,20		2948,4
128	Stigmasterol			0,20		0,16	0,05	0,11		3223,8
4	β -Pinene	0,67	0,46		0,07					974,0
25	Carvacrol methyl ether	0,49	0,46			0,09				1242,8
35	α -Ylangene		0,11				0,54		0,55	1360,5
41	β -Copaene	0,42	0,50		0,05					1415,5

52	ar-Curcumene		0,16				0,22		0,28	1480,6
53	epi-Bicyclosiquiphellandrene	0,22	0,28				0,11			1481,2
55	α -Muurolene	0,52	0,74		0,05					1489,8
63	α -Calacorene	0,21	0,19				0,04			1552,5
97	Tetracosane				1,30	0,52			6,67	2402,2
100	Pentacosane						0,04	0,11	0,06	2504,8
1	α -Pinene	0,51	0,33							924,9
2	Camphene	0,35	0,21							938,0
3	Sabinene	0,21	0,13							973,1
5	1-Octen-3-ol	0,24	0,14							985,7
6	Myrcene	1,64	0,94							989,8
7	3-Octanol	0,24	0,17							1002,1
9	α -Terpinene	0,21	0,20							1011,1
11	Limonene	1,03	0,53							1021,8
13	trans- β -Ocimene	1,55	0,80							1047,1
16	Linalool	0,72	0,38							1102,6
17	trans-Thujone	0,21	0,17							1115,0
21	Menthol	0,26	0,09							1170,3
29	Geranial	0,50	0,24							1274,7
30	Bornyl acetate	0,27	0,14							1279,1
33	α -Cubebene		0,12		0,07					1341,2
43	6,9-Guaiadiene		0,11		0,13					1432,2
44	cis-Muurola-3,5-diene		0,24			0,15				1434,0
59	Methyl dodecanoate		0,16				0,05			1523,8
62	Elemol	0,29	0,20							1543,1
68	β -Copaen-4- α -ol	0,24	0,17							1583,4
69	Humulene epoxide II	0,46	0,32							1594,7
71	1,10-di-epi-Cubenol	0,43	0,44							1602,2
72	n.i.=not identified	0,22	0,19							1615,7
73	n.i.=not identified	0,21	0,15							1619,3
8	α -Phellandrene		0,09							1009,1
45	trans-Muurola-3,5-diene		0,10							1437,0
	Укупно =>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
	Број једињења =>	67	81	68	82	75	90	69	76	

7.3. Прилог 3 : Апсорбанце раствора очитаване су спектрофотометријски на 515-517 nm (читаач микроплоча Multiscan Spectrum, Thermo Corporation)

Сроч	Crad	BHT							
		A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)	
1	2000	66,67	0,055	0,059	0,053	0,056	0,049	0,006	96,40
2	1000	33,33	0,055	0,062	0,056	0,058	0,046	0,012	93,04
3	500	16,67	0,084	0,085	0,087	0,085	0,045	0,040	77,44
4	250	8,33	0,116	0,113	0,116	0,115	0,046	0,069	61,37
5	125	4,17	0,142	0,147	0,150	0,146	0,045	0,102	43,12
6	62,5	2,08	0,175	0,178	0,172	0,175	0,042	0,133	25,84
7	15,625	0,52	0,196	0,202	0,198	0,199	0,043	0,156	12,92
kontrol a		0,216	0,215	0,216	0,217	0,216	0,037	0,179	5.582 µg/ml



Сроч	Crad	BHA							
		A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)	
1	124	4,13	0,097	0,065	0,063	0,075	0,050	0,025	87,21
2	62	2,07	0,095	0,098	0,090	0,094	0,045	0,049	75,00
3	31	1,03	0,165	0,147	0,140	0,151	0,046	0,105	46,92
4	15,5	0,52	0,169	0,174	0,172	0,172	0,046	0,126	36,22
5	7,75	0,26	0,191	0,193	0,197	0,194	0,043	0,151	23,51
6	3,88	0,13	0,204	0,215	0,213	0,211	0,046	0,165	16,30
7	1,938	0,06	0,208	0,221	0,229	0,219	0,045	0,174	11,50
kontrol a		0,233	0,228	0,236	0,241	0,234	0,037	0,197	0.9777 µg/ml

Сроч	Crad	Ekstrakt 1						
		A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
50	1666,7	0,110	0,102	0,106	0,106	0,069	0,038	76,22
10	333,3	0,160	0,160	0,150	0,157	0,056	0,101	43,41
5	166,7	0,183	0,179	0,175	0,179	0,048	0,130	26,77
2,5	83,33	0,200	0,195	0,188	0,195	0,046	0,148	16,67
1,25	41,67	0,210	0,213	0,200	0,208	0,044	0,164	7,94
0,625	20,83	0,209	0,212	0,220	0,213	0,043	0,171	4,15
0,313	10,42	0,217	0,219	0,209	0,215	0,044	0,171	4,20
0,156	5,208	0,216	0,219	0,220	0,218	0,043	0,176	1,33
kontrola		0,227	0,220	0,216	0,221	0,043	0,178	IC50 = 439.4

								ug/ml
Cpoc	Crad	Ekstrakt 2						
mg/ml	ug/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
2	66,67	0,059	0,062	0,060	0,060	0,053	0,007	95,62
1	33,33	0,056	0,058	0,059	0,058	0,050	0,008	95,37
0,5	16,67	0,054	0,057	0,055	0,056	0,046	0,010	94,10
0,25	8,33	0,054	0,073	0,132	0,086	0,045	0,041	75,74
0,125	4,167	0,101	0,127	0,131	0,120	0,043	0,076	55,28
0,063	2,083	0,144	0,169	0,167	0,160	0,044	0,116	31,92
0,031	1,042	0,176	0,190	0,190	0,185	0,043	0,143	16,57
kontrola		0,208	0,212	0,218	0,213	0,042	0,171	IC50 = 3.637 ug/ml

Cpoc	Crad	Ekstrakt 3						
mg/ml	ug/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
2	66,67	0,059	0,059	0,060	0,059	0,050	0,009	94,79
1	33,33	0,057	0,066	0,061	0,061	0,048	0,014	92,42
0,5	16,67	0,068	0,055	0,059	0,061	0,046	0,015	91,70
0,25	8,33	0,063	0,095	0,081	0,080	0,048	0,032	82,08
0,125	4,167	0,125	0,148	0,146	0,140	0,071	0,069	61,68
0,063	2,083	0,168	0,178	0,177	0,174	0,084	0,091	49,33
0,031	1,042	0,188	0,198	0,195	0,194	0,043	0,151	15,64
kontrola		0,220	0,220	0,224	0,221	0,042	0,179	IC50 = 2.323 ug/ml

Cpoc	Crad	Ekstrakt 4						
mg/ml	ug/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
10	2000	0,073			0,073	0,052	0,021	86,71
10	1333	0,081	0,081	0,083	0,082	0,049	0,033	79,32
10	666,7	0,111	0,114	0,112	0,112	0,046	0,066	58,02
10	333,3	0,145	0,135	0,141	0,140	0,043	0,097	43,06
5	166,7	0,160	0,162	0,171	0,165	0,044	0,121	29,40
2,5	83,33	0,169	0,176	0,179	0,175	0,044	0,130	23,84
1,25	41,67	0,191	0,189	0,191	0,190	0,045	0,145	14,95
0,625	20,83	0,176	0,198	0,200	0,191	0,044	0,147	14,12
0,313	10,42	0,170	0,206	0,209	0,195	0,046	0,149	12,69
0,156	5,208	0,155	0,209	0,224	0,196	0,044	0,152	11,00
kontrola		0,211	0,215	0,219	0,215	0,044	0,171	IC50 = 459.4 ug/ml

Cpoc	Crad	Ekstrakt 5						
mg/ml	ug/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
50	1666,7	0,068	0,063	0,065	0,065	0,057	0,008	94,86
25	833,3	0,075	0,083	0,075	0,078	0,053	0,025	84,07
10	333,3	0,116	0,127	0,128	0,124	0,048	0,076	46,74
5	166,7	0,161	0,163	0,163	0,162	0,045	0,117	17,58
2,5	83,33	0,192	0,188	0,182	0,188	0,044	0,144	-1,19
1,25	41,67	0,193	0,196	0,194	0,194	0,043	0,151	-6,56
0,625	20,83	0,204	0,206	0,205	0,205	0,042	0,163	-14,93
0,313	10,42	0,211	0,211	0,192	0,205	0,043	0,162	-13,75

0,156	5,208	0,210	0,219	0,210	0,213	0,044	0,169	-19,28
kontrola		0,200	0,219	0,139	0,186	0,044	0,142	IC50 = 417.3 ug/ml

Cpoc	Crad	Ekstrakt 6						
mg/ml	ug/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
50	1666,7	0,076	0,080	0,091	0,082	0,059	0,023	85,32
25	833,3	0,106	0,108	0,103	0,106	0,052	0,054	65,73
10	333,3	0,141	0,146	0,146	0,144	0,050	0,094	38,22
5	166,7	0,174	0,176	0,172	0,174	0,047	0,127	16,12
2,5	83,33	0,189	0,191	0,195	0,192	0,057	0,135	11,02
1,25	41,67	0,201	0,198	0,204	0,201	0,044	0,157	-3,34
0,625	20,83	0,214	0,192	0,207	0,205	0,043	0,162	-6,33
0,313	10,42	0,213	0,180	0,214	0,203	0,047	0,155	-2,10
0,156	5,208	0,215	0,227	0,218	0,220	0,043	0,177	-16,44
kontrola		0,215	0,158	0,219	0,197	0,045	0,152	IC50 = 506.8 ug/ml

Cpoc	Crad	Ekstrakt 7						
mg/ml	ug/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
10	333,33	0,079	0,095	0,094	0,089	0,055	0,035	78,01
5	166,67	0,127	0,140	0,139	0,135	0,053	0,083	47,75
2	66,67	0,157	0,152	0,142	0,150	0,045	0,105	38,87
1	33,33	0,207	0,199	0,196	0,201	0,043	0,158	8,39
0,5	16,67	0,216	0,208	0,208	0,210	0,046	0,165	4,20
0,25	8,33	0,220	0,211	0,211	0,214	0,042	0,172	-0,07
0,125	4,167	0,159	0,162	0,156	0,159	0,042	0,117	32,15
0,063	2,083	0,212	0,210	0,225	0,216	0,043	0,173	-0,80
0,031	1,042	0,222	0,210	0,213	0,215	0,043	0,172	-0,06
kontrola		0,221	0,211	0,212	0,215	0,043	0,172	IC50 = 146.5 ug/ml

Cpoc	Crad	Ekstrakt 8						
mg/ml	ug/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
2	66,67	0,056	0,070	0,064	0,063	0,050	0,013	92,57
1	33,33	0,053	0,054	0,053	0,053	0,052	0,002	98,87
0,5	16,67	0,062	0,054	0,056	0,057	0,050	0,007	95,76
0,25	8,33	0,054	0,059	0,065	0,059	0,042	0,017	90,42
0,125	4,167	0,096	0,103	0,095	0,098	0,045	0,053	69,49
0,063	2,083	0,157	0,164	0,161	0,160	0,043	0,117	32,88
0,031	1,042	0,179	0,190	0,193	0,187	0,044	0,144	17,94
kontrola		0,213	0,219	0,221	0,218	0,042	0,175	IC50 = 2.941 ug/ml

Cpoc	Crad	Ekstrakt 9						
mg/ml	ug/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
2	66,67	0,062	0,058	0,058	0,059	0,050	0,009	94,32
1	33,33	0,054	0,054	0,056	0,055	0,045	0,010	93,90
0,5	16,67	0,054	0,056	0,054	0,055	0,044	0,011	93,57
0,25	8,33	0,055	0,055	0,053	0,055	0,043	0,011	93,30
0,125	4,167	0,088	0,093	0,090	0,090	0,044	0,047	71,83
0,063	2,083	0,161	0,162	0,160	0,161	0,043	0,118	28,62

0,031	1,042	0,187	0,184	0,184	0,185	0,044	0,141	14,87
kontrola		0,217	0,213	0,214	0,215	0,049	0,166	IC50 = 3.000 ug/ml

Cpoc	Crad	Etarsko ulje						
uL/ml	uL/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
100	3,333	0,059	0,068	0,059	0,062	0,045	0,017	90,69
50	1,667	0,080	0,078	0,078	0,079	0,043	0,035	80,31
25	0,833	0,112	0,117	0,107	0,112	0,045	0,067	62,59
12,5	0,417	0,174	0,127	0,142	0,148	0,043	0,104	41,97
6,25	0,208	0,170	0,162	0,154	0,162	0,044	0,118	34,44
3,13	0,104	0,189	0,183	0,187	0,186	0,043	0,143	20,32
1,56	0,052	0,205	0,196	0,197	0,199	0,043	0,156	13,12
kontrola		0,226	0,220	0,229	0,225	0,045	0,180	IC50 = 0.503 uL/ml

Cpoc	Crad	Ekstrakt 13						
uL/ml	uL/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
100	3,333	0,077	0,064	0,071	0,070	0,065	0,005	97,22
50	1,667	0,059	0,057	0,061	0,059	0,048	0,010	94,28
25	0,833	0,063	0,058	0,056	0,059	0,048	0,011	94,09
12,5	0,417	0,065	0,070	0,060	0,065	0,044	0,022	88,25
6,25	0,208	0,130	0,113	0,107	0,117	0,043	0,074	59,72
3,13	0,104	0,166	0,172	0,168	0,168	0,044	0,124	32,17
1,56	0,052	0,193	0,198	0,191	0,194	0,047	0,147	19,70
kontrola		0,226	0,230	0,223	0,226	0,043	0,183	IC50 = 0.168 uL/ml

Cpoc	Crad	Ekstrakt 15						
uL/ml	uL/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
10	0,333	0,054	0,053	0,055	0,054	0,047	0,006	95,38
5	0,167	0,060	0,060	0,056	0,059	0,049	0,009	93,17
2,5	0,083	0,097	0,107	0,105	0,103	0,051	0,052	62,62
1,25	0,042	0,153	0,171	0,161	0,162	0,049	0,112	18,63
0,625	0,021	0,175	0,161	0,182	0,172	0,044	0,128	7,10
0,313	0,010	0,196	0,160	0,191	0,182	0,050	0,132	4,09
0,156	0,005	0,194	0,186	0,201	0,194	0,047	0,146	-6,00
kontrola		0,157	0,170	0,214	0,180	0,042	0,138	IC50 = 0.070 uL/ml

Cpoc	Crad	Ekstrakt 11						
uL/ml	uL/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
1000	100	0,164	0,153	0,166	0,161	0,043	0,118	31,41
500	50	0,192	0,187	0,188	0,189	0,043	0,146	14,96
250	25	0,194	0,199	0,197	0,197	0,042	0,155	10,06
125	12,5	0,227	0,200	0,206	0,211	0,042	0,169	1,51
62,5	6,25	0,202	0,199	0,202	0,201	0,043	0,158	8,21
kontrola		0,219	0,207	0,217	0,215	0,043	0,172	

Cpoc	Crad	Ekstrakt 12						
uL/ml	uL/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
1000	100	0,157	0,162	0,163	0,161	0,047	0,114	30,21
500	50	0,192	0,186	0,187	0,188	0,042	0,146	10,45
250	25	0,193	0,194	0,203	0,197	0,043	0,154	5,44
125	12,5	0,199	0,199	0,207	0,202	0,042	0,160	1,96
62,5	6,25	0,191	0,198	0,182	0,190	0,042	0,148	8,95
kontrola		0,206	0,207	0,203	0,205	0,042	0,163	

Cpoc	Crad	Ekstrakt 14						
uL/ml	uL/ml	A (515 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor	I (%)
1000	100	0,176	0,179	0,184	0,179	0,046	0,134	19,36
500	50	0,198	0,196	0,195	0,197	0,045	0,152	8,32
250	25	0,201	0,201	0,200	0,201	0,046	0,155	6,86
125	12,5	0,202	0,209	0,203	0,205	0,044	0,161	2,94
62,5	6,25	0,185	0,192	0,193	0,190	0,042	0,148	10,82
kontrola		0,209	0,208	0,208	0,208	0,042	0,166	

Napomena : ekstrakti 11,12 i 14 nisu aktivni pa nije bilo moguće dobiti IC₅₀ za njih

КОРИШЋЕНЕ СКРАЋЕНИЦЕ

Скраћеница	Значење
BHA	Бутиловани хидроксианизол
BHT	Бутиловани хидрокситолуен
DMSO	Диметил-сулфоксид
DPPH	1,1-дифенил-2-пикрилхидразил
EtOH	Етанол
KI	Коватс индекс
MS	Масена спектрометрија
СП-130	Дестилациони уређај радне запремине 125 литара
HKE	Надкритична екстракција
FR1	Фракција 1
FR2	Фракција 2
HKE 30	Екстракција без прекида на 30 МПа
Грам (+)	Грам позитивне бактерије
Грам (-)	Грам негативне бактерије
HK-CO ₂	Надкритични угљеник(IV)-оксид
GC/FID	Гасна хроматографија (<i>енг. gas chromatography</i>)
Ph Eur 6.0	Европска фармакопеја вер. 6.0
ISO	Међународна организација за стандардизацију
GRAS	Генерално безбедно (<i>Generally Recognized As Safe</i>)
TBHQ	Терс-бутилхидрохинон
PG	Пропилгалат
E 310 - E 312	Естри галне киселине, галати
MIC	Минимална инхибиторна концентрација
MBC	Минимална бактерицидна концентрација
MFC	Минимална фунгицидна концентрација
DMSO	Диметилсулфоксид
EtOH	Етанол

8. БИОГРАФИЈА

1. **Име и презиме:** Слободан Петровић
2. **Датум рођења:** 09.10.1957.
3. **ЈМБГ:** 0910957850045
4. **Адреса:** Булевар ослобођења 401 и, Београд
5. **Телефон:** 3677450, 063 88 43 234
6. **Е-маил:** biossloba@gmail.com
7. **Образовање:** магистар техничких наука

Институција	од (год.)	до (год.)	Стечена диплома
Универзитет у Новом Саду, Технички факултет	1979	1983	Дипломирани професор политехнике
Универзитет у Београду, Машински факултет	1985	1987	Магистар техничких наука
Универзитет у Нишу Технолошки факултет у Лесковцу	2013.		Пријављена докторска дисертација

8. Професионално искуство:

Организација	од (год.)	до (год.)	Функција
Научно истраживачки институт „Михајло Пупин“ Београд	1988	2002	Водећи истраживач
БИОСС-ПС и остали, Београд	2002	активно	Оснивач и власник

9. Чланство у професионалним асоцијацима и др.:

- Међународно удружење за промоцију и развој квантне медицине
- Српско лекарско друштво, сарадник

10. Претходни пројекти у којима је био учесник:

- ✓ Безотпадна технологија у преради плодова клеке ((*Lat. Juniperus communis*), Коаутор делова 3.2, 3.3 /Уређаји и опрема за производњу етарских уља/ ; Иновациони пројекат I.3.1212, МНТС, 1997.
- ✓ *Развој технолошких поступака за производњу сировина и производа за потребе фармацеутске, козметичке и прехрамбене индустрије, 1998-2000, ев. бр.*

C.3.11.27.0063. Директно је био одговоран за ПП4 : *Развој и оптимизација технолошких поступака за производњу фармацеутских сировина*.

- ✓ *Биоактивни конституенти самониклих биљака и могућности њихова примене у фармацији, козметици и прехрани (1862), 2002-2005.* Директно је био задужен за развој нових поступака у изоловању биоактивних молекула. Затим је радио на развоју и оптимизацији технолошких поступака за непосредну производњу фармацеутски потенцијалних сировина
- ✓ За потребе ЈП “Национални парк Тара“ реализован је комплетан програм који се и данас примењује, са информацијском и технолошко – техничком подршком у циљу даље прераде отпада након шумске сече јеле и бора. Крајњи производ била су етарска уља и компост, тако да је у потпуности задовољен захтев за ткзв. “безотпадном технологијом“.
- ✓ За потребе општине Црна Трава реализован и примењен је комплетан програм под називом : „Безотпадна технологија у коришћењу самониклог лековитог и ароматичног биља (лиаб) на подручју Власинског језера“.

11. **Пројекти у којима је био руководиоцац:** Иновациони пројекат - Развој технолошки оригиналних поступака и производа биљног порекла за потребе фармацеутске и козметичке индустрије. 2012/2013.

12. **Патенти и где су заштићени:** Завод за интелектуалну својину Слободан Петровић, Исправа о патенту бр : **51508, признат патент** под називом : Поступак за добијање биљних вагиналета по пријави П-2006/0394. Патент важи до 2026 г. Објављено у Гласнику интелектуалне својине 30.06.2011.

13. **Познавање језика: Енглески (чита, говори), Руски (чита, говори, пише), Француски (чита, говори)**

14. **Рад са рачунаром:** ACAD, C++, Fortran 4.0, интегрисани пакети MS Office, Origin, MatLab, itd.

ОБЈАВЉЕНИ РАДОВИ

РАД ОБЈАВЉЕН У ВРХУНСКОМ МЕЂУНАРОДНОМ ЧАСОПИСУ

Dejan Z Orčić, Neda Mimica-Dukić, S. S. Petrović, Marina M Francišković, Emilija Đ Jovin, Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L., Chemistry Central Journal, 2011, 5:34.

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ЧАСОПИСИМА МЕЂУНАРОДНОГ ЗНАЧАЈА

Slobodan S. Petrović, Jasna Ivanović, Stoja Milovanović, Irena Žižović; Comparative analyses of diffusion coefficients for different extraction processes from thyme, J. Serb. Chem. Soc. (2011) doi: 10.2298/JSC110616009P.

Slobodan S. Petrović, Nada Babovic, Mihailo S. Ristić, Miodrag L. Lazić, Marina Francišković, Slobodan D. Petrović, Chemical composition and antioxidative activity of essential oil of *Thymus serpyllum* L., Chemical Industry 01/2013, DOI:10.2298/HEMIND130513051P.

РАДОВИ САОПШТЕНИ НА СКУПОВИМА МЕЂУНАРОДНОГ ЗНАЧАЈА

Petrović S., Matović M; Extraction of the chamomile essential oil on principle of hydro-distillation by use of distillation appliance of the type SP 130, Syposium with International Participants "Healing Herbs Days 96", Brezovica, 08 / 1996.

Petrović S. ; Rapport d'analyse *Angelica archangelica* L (1 et 2), Universite Catholique de Louvain, Unit d'analyse chimique et physico-chimique des medicaments, Bruxelles, 02/764.72.30, Avril 1997.

Presentation of the new technological solution: Petrović S. ; Distillation appliance SP-130, ; Syposium with International Participants "Healing Herbs Days 97", Brezovica, 09 / 1997.

S. Grujić- Jovanović, M. Ristić, S. S. Petrović, S. D. Petrović, P. Marin, B. Petković: Dobijanje etarskog ulja *Stachys plumosa* Gris. (Lamiaceae) korišćenjem SP-130/250 uređaja za destilaciju, IV simpozijum sa međunarodnim učešćem "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Leskovac ; 2000.

Slavica Grujić-Jovanović, Mihajlo S. Ristić, Slobodan S. Petrović, Petar D. Marin; Essential oil of *Stachys germanica* L. (Lamiaceae) ; VII meeting Days of medicinal plants with International participation, Belgrade, 2001.

N.V. Aničić, S.S. Petrović, S. Dimitrijević, M. Ristić, S.D. Petrović. "Antimicrobial activity of essential oil of *Helicrisium Italicum*, L, Asteraceae P93. 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of South-East European Countries. Iasi-Romania 28th-31st of May 2006.

Žižović, M. Ristić, S. S. Petrović, S. Petrović, D. Skala, Supercritical carbon dioxide extraction of celery essential oil – chemical composition and comparison with

hydrodistillation, V International Symposium on High Pressure Technology and Chemical Engineering – Segovia Romania; 2007.

N. Babović, G. Dražić, S. S. Petrović (2013), Dobijanje aktivnih materija u preradi aromatičnog bilja na primeru majkine dušice (*Thymus serpyllum* L.), Međunarodna konferencija Održive posleubirajuće i prehrambene tehnologije – INOPTEP 2013 i 24. nacionalni skup „Procesna tehnika i energetika u poljoprivredi“ – PTEP 2013, 21-26. april, Vrnjačka Banja, Zbornik radova

Babović, N., S. S. Petrović, S. D. Petrović (2013): Nekonvencionalna medicina na primeru upotrebe biljnih vagitorija - BlueBalance, 6. Međunarodni kongres "Ekologija, zdravlje, rad, sport" 05-08. septembar, Banja Luka, Zbornik radova, str. 148-154, Udruženje "Zdravlje za sve", ISBN 987-99955-789-3-6

Babović, N., S. S. Petrović, S. D. Petrović, Jovičić D (2013): Antioksidativna aktivnost etarskog ulja majkine dušice (*Thymus serpyllum* L.), 6. Međunarodni kongres "Ekologija, zdravlje, rad, sport" 05-08. septembar, Banja Luka, Zbornik radova, str. 155-159, Udruženje "Zdravlje za sve", ISBN 987-99955-789-3-6

Babović, G. Dražić, S. S. Petrović (2013), Dobijanje aktivnih materija u preradi aromatičnog bilja na primeru majkine dušice (*Thymus serpyllum* L.), Međunarodna konferencija Održive posleubirajuće i prehrambene tehnologije – INOPTEP 2013 i 24. nacionalni skup „Procesna tehnika i energetika u poljoprivredi“ – PTEP 2013, 21-26. april, Vrnjačka Banja, Zbornik izvoda.

РАДОВИ САОПШТЕНИ НА СКУПОВИМА НАЦИОНАЛНОГ ЗНАЧАЈА

Matović M., Petrović S.; Simić B. ; Technology without residue in production of essential oils, alcohol and components for animal food (Lat. Juniperus communis), Preventive engineering and living environment, Niš, 1996.

N.Lj.Ružić, S.S.Petrović, D.G.Antonović, S.D.Petrović, "Prilog proučavanju etarskog ulja čubra (*Satureja montana* L.)", III Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Leskovac, 1998.

Petrović S., Mirković B. ; Determination of MIC (minimal inhibition concentration) for essential oil of Juniperus communis L., Pharmacology Archive 6, 1998.

F.J.Šamanc, S.S.Petrović, S.D.Petrović, "Prilog optimizaciji dobijanja etarskog ulja hajdučke trave (*Achillea crithmifolia* L.) destilacijom vodenom parom", III Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Leskovac, 1998.

Slavica Grujić-Jovanović, M.Ristić, S.S.Petrović, S.D.Petrović, P.Marin, B.Petković ; "Diterpeni roda *Stachys* L.- Potencijalni izvor bioaktivnih komponenata", "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Leskovac , 2001.

J.Stjepanović, A.D.Marinković, M.Vukašinović, S.Šiler-Marinković, S.S.Petrović, S.D.Petrović, Dobijanje etarskih ulja smreke-*picea abies* i ruzmarina-*rosmarinus officinalis*

korišćenjem SP-130/250 uređaja za destilaciju i ispitivanje njihove antimikrobne vrednosti, XLII Savetovanje srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 2004.

N.Aničić, S.Dimitrijević, M.Ristić, S.S.Petrović, S.D.Petrović, "Prilog proučavanju antimikrobne aktivnosti etarskog ulja", VI simpozijum Savremene tehnologije i privredni razvoj", Leskovac, 2005.

Babović, N., M. Lazić, S. Milovanović, S. D. Petrović, S. S. Petrović (2013): Natkritična ekstrakcija etarskog ulja majkine dušice (*Thymus serpyllum* L.), 6. simpozijum Hemija i zaštita životne sredine – EnviroChem 2013, 21-24. maj, Vršac, Knjiga izvoda, str. 394-395, Srpsko Hemijsko Društvo, ISBN 978-86-7132-052-8

Babović, N., S. S. Petrović, S. D. Petrović (2013): Antioksidativna aktivnost hidrolata hajdučke trave (*Achillea millefolium* L.), 6. simpozijum Hemija i zaštita životne sredine – EnviroChem 2013, 21-24. maj, Vršac, Knjiga izvoda, str. 396-397, Srpsko Hemijsko Društvo, ISBN 978-86-7132-052-8

Babović, N., S. S. Petrović, S. D. Petrović (2013): Bezotpadna tehnologija u preradi lekovitog i aromatičnog bilja, 6. simpozijum Hemija i zaštita životne sredine – EnviroChem 2013, 21-24. maj, Vršac, Knjiga izvoda, str. 94-95, Srpsko Hemijsko Društvo, ISBN 978-86-7132-052-8

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ДОМАЋИМ ЧАСОПИСИМА

Matović M., Mihajlov M., Petrović S.S.; Widespreading of Juniper Berry (Lat. *Juniperus communis*) within Zlatař and its ecological and economic significance, Healing sources 15, 1996.

Petrović S.S., Matović M, Maksimović S. ; A Contribution to technological procedure of essential oil extraction from medicinal and aromatic herbs by use of water and water steam, Healing sources 15, 1996.

Petrović S.S. ; History of distillation, Healing Herbs 17, 1998.

Petrović S., Ružić N., Petrović D., Stevanović-Janežić T.; Contribution to optimization of essential oil production deriving from the 'green waste' upon pine tree cutting (Lat. *Pinus sylvestris*) by water steam distillation procedure, Chemical Industry, 07.1999.

Skala D., Petrović S.S., Žižović I., Essential oil distillation, extraction, technology choice and quality, Chemical Industry April. 1999.

Essential oils of *Stachys plumosa* Griseb (Lamiaceae) , Slavica Grujić-Jovanović, Mihajlo S. Ristić, Slobodan S. Petrović, Petar D. Marin, Branimir Petković, Healing sources. 2001.

S.Grujić-Jovanović, M.S.Ristić, S.S.Petrović, S.D.Petrović, P.D.Marin, Z.Krivošej;; ESSENTIAL OIL of *Stachys palustris* L. (LAMIACEAE) , Arh.far., 6; 2001.

Aničić, Nada V., Dimitrijević, Suzana, Ristić, Mihailo S., , Slobodan S. Petrović, Slobodan D. Petrović, Antimicrobial activity of *Melissa officinalis* L., Lamiaceae essential oil, Chemical Industry, 59, 2005.

N.Aničić, S.Dimitrijević, M.Ristić, S.S.Petrović, S.D.Petrović, "Antimikrobna aktivnost etarskih ulja", Hemijska industrija 598 (9-102) 2005.

Babović, N., Dražić, G., Petrović, S.S. (2013): Dobijanje aktivnih materija u preradi aromatičnog bilja na primeru majkine dušice (*Thymus serpyllum* L.), Journal on Processing and Energy in Agriculture, Vol. 17, 2013, p. 89-92.

У Београду, 02/2014