

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO–METALURŠKI FAKULTET

Sanja M. Đurđević

**OPTIMIZACIJA PROCESA  
EKSTRAKCIJE ULJA DIVLJEG NARA  
(*Punica granatum* L.) PRIMENOM  
MIKROTALASA I ISPITIVANJE  
BIOLOŠKE AKTIVNOSTI DOBIJENOG  
ULJA**

Doktorska disertacija



Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Sanja M. Djurdjevic

**OPTIMIZATION OF THE OIL  
EXTRACTION PROCESS FROM WILD  
GROWING POMEGRANATE (*Punica  
granatum* L.) USING MICROWAVE AND  
ANALYSIS OF BIOLOGICAL ACTIVITY  
OF THE OBTAINED OIL**

Doctoral Dissertation



Belgrade, 2019

Mentori:

---

Dr Slobodan Petrović, profesor emeritus  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet

---

Dr Katarina Šavikin, naučni savetnik  
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”

Članovi komisije:

---

Dr Tatjana Stanojković, viši naučni saradnik  
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

---

Dr Stoja Milovanović, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet

---

Dr Dejan Pljevljakušić, naučni saradnik  
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”

---

Dr Dušan Mijin, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Mojim roditeljima*

## Sažetak

Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje potencijalne primene mikrotalasnog zračenja na povećanje prinosa ulja semena divljeg nara (*Punica granatum* L.) nakon ekstrakcije i ispitivanje biološke aktivnosti dobijenog ulja. Ispitan je uticaj operativnih parametara (snage i vremena) mikrotalasnog zračenja na prinos i sastav ulja dobijenog natkritičnom ekstrakcijom (NKE) sa ugljenik(IV)–oksidom (CO<sub>2</sub>) i ekstrakcijom heksanom u aparaturi po Soxhlet–u (SE). Seme divljeg nara je odabrano kao sirovina za ispitivanje zbog svoje vredne biološke aktivnosti (jakog antioksidativnog i potencijalnog citotoksičnog dejstva).

Za predtretman semena divljeg nara mikrotalasima odabrani su uslovi snage mikrotalasa 100, 250 i 600 W i vremena 2 i 6 minuta. Prikazane su kinetike NKE ulja iz semena divljeg nara tretirano mikrotalasima pri različitim uslovima, kao i rezultati SE. Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima ekstrakcije ulja iz semena divljeg nara koje nije tretirano mikrotalasima. Pokazano je da čak i pri najnižim vrednostima snage i vremena dejstva mikrotalasa (100 W i 2 minuta) dolazi do povećanja prinosa ulja (sa 27,7 % na 34,0 % za SE i sa 21,6 % na 25,5 % za NKE). Maksimalni prinos ulja za NKE (27,2 %) ostvaren je nakon mikrotalasnog predtretmana semena divljeg nara od 250 W tokom 6 minuta, dok je za SE (36,6 %) maksimalni prinos ostvaren nakon predtretmana od 600 W tokom 6 minuta.

Procesi NKE i SE semena divljeg nara omogućili su dobijanje ekstrakta bogatih masnim kiselinama, a u cilju njihove identifikacije, derivatizacijom su dobijeni metil–estri nezasićenih masnih kiselina. Za kvalitativni i kvantitativni sastav masnih kiselina dobijenog ulja korišćene su gasna hromatografija uz plameno–jonizujuću detekciju (GC/FID) i kombinacija gasne hromatografije i masene spektrometrije (GC/MS). Odabrane analitičke metode su pokazale da predtretman mikrotalasima ima zanemarljiv uticaj na količinu masnih kiselina, u poređenju sa značajnim uticajem na povećanje prinosa ulja. Analiza ulja pokazala je visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (83,5 %), dok je udeo mononezasićenih masnih kiselina (9,5 %) i zasićenih masnih kiselina (7,0 %) bio niži.

Lipofilni antioksidativni kapacitet dobijenog ulja semena divljeg nara određen je korišćenjem  $\alpha$ -trolox ekvivalent antioksidativne aktivnosti ( $\alpha$ -TEAC). Pokazano je da dobijeno ulje ispoljava visoku antioksidativnu aktivnost ( $410 \pm 89 \mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$ ).

Citotoksična aktivnost dobijenog ulja semena divljeg nara je ispitana na sledećim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa), LS174 (adenokarcinom debelog creva), A549 (adenokarcinom pluća), EA.hy926 (humane endotelijalne ćelije umbilikalne vene), kao i na zdravim MRC-5 (fetalni fibroblasti pluća) ćelijama, korišćenjem kolorimetrijskog MTT testa. Ispitivano masno ulje nije pokazalo citotoksično dejstvo prema normalnim MRC-5 i endotelijalnim EA.hy926 ćelijama ( $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), dok je prema malignim ćelijama HeLa, LS174 i A549 ( $\text{IC}_{50} = 49,51 - 91,54 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) pokazalo umeren citotoksični efekat. Ispitivanja na endotelijalnim EA.hy926 ćelijama ukazuju na umereni antiangiogenetski efekat ulja semena divljeg nara, pa se stoga može smatrati kandidatom za inhibiciju angiogeneze.

**Ključne reči:** mikrotalasni predtretman, natkritična ekstrakcija, ulje semena nara, masne kiseline, punicinska kiselina, antioksidativna aktivnost, citotoksična aktivnost

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Hemija

UDK broj:

## Abstract

The aim of this PhD thesis was investigation of the potential application of microwave radiation, in order to increase the yield of wild growing pomegranate seed oil (*Punica granatum* L.) after extraction and analysis of biological activity of the obtained oil. The influence of operating parameters (power and time) of microwave irradiation on yield and composition of the oil obtained by supercritical fluid extraction with carbon dioxide (SFE) and extraction with hexane in the Soxhlet apparatus (SE) was examined. Wild growing pomegranate seed was used as raw material for experiments, due to its valuable biological activity (strong antioxidant and potential cytotoxic effect).

For pretreatment of the seeds with microwaves, power of 100, 250 and 600 W and two irradiation times (2 and 6 min) were selected. Kinetics of oil extraction from wild growing pomegranate seed using SFE, treated with microwaves at different conditions, as well as, results of SE are also presented here. Obtained results were compared with the results of extraction of oil from non-treated seeds. Results showed that even the lowest values of applied power and time of microwave irradiation (100 W during 2 min) contributed to increase oil yield (from 27.7 % to 34.0 % and from 21.6 % to 25.5 % for SE and SFE, respectively). Maximal oil yield for SFE (27.2 %) was obtained with microwave irradiation of 250 W during 6 minutes, while for SE maximal oil yield (36.3 %) was achieved for pretreatment of 600 W during 6 minutes.

Processes of SFE and SE from wild growing pomegranate seed enabled obtaining extracts rich in fatty acids. In order to identify them, fatty acids were derivatized to their methyl esters. The qualitative and quantitative composition of fatty acids of the obtained oil was performed by gas chromatography/flame ionization detection (GC/FID) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Selected analytical methods showed that microwave pretreatment of seeds has a negligible influence on the amount of fatty acids, compared with its significant influence on oil extraction yield. The oil analysis showed high content of polyunsaturated fatty acids (83.5 %), while the content of monounsaturated fatty acid (9.5 %) and saturated fatty acid (7.0 %) were much lower.

The lipophilic antioxidant capacity of oil obtained from wild growing pomegranate seed was determined using  $\alpha$ -tocopherol equivalent antioxidant capacity assay ( $\alpha$ -TEAC). Results showed that obtained oil exhibited high antioxidant effects ( $410 \pm 89 \mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100\text{g}$ ).

The cytotoxic activities of oil obtained from wild growing pomegranate seed was tested against selected human malignant cell lines: HeLa (cervix adenocarcinoma), LS174 (colon adenocarcinoma), A549 (lung adenocarcinoma), EA.hy926 (human umbilical vein endothelial) as well as against normal fetal lung fibroblast (MRC-5) cell lines, using MTT colorimetric assay. Cytotoxic activity of fatty oil on normal MRC-5 and EA.hy926 cells were not observed. The IC<sub>50</sub> values in malignant HeLa, LS174 and A549 cells ranged from 49.51±0.57 µg/mL to 91.54±1.32 µg/mL showing a moderate cytotoxic effect. The investigation of EA.hy926 cells indicated moderate anti-angiogenic effects of pomegranate seed oil. It can thus be considered as a candidate for the inhibition of angiogenesis.

Key words: microwave pretreatment, supercritical fluid extraction, pomegranate seed oil, fatty acid, punicic acid, antioxidant activity, cytotoxic activity

Scientific field: Chemical Science

Scientific subfield: Chemistry

UDC number:



## Lista skraćenica

BM – biljni materijal

CLnA – konjugovana linoleinska kiselina

CO<sub>2</sub> – ugljenik(IV)–oksid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EFSA – Evropska agencija za bezbednost hrane

HDL – lipoproteini velike gustine

IUPAC – Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju

LDL – lipoproteini male gustine

LK – linolna kiselina

MK – masne kiseline

nkCO<sub>2</sub> – natkritični ugljenik(IV)–oksid

NKE – natkritična ekstrakcija

NMK – mononezasićene masne kiseline

PA – punicinska kiselina

p<sub>c</sub> – kritični pritisak

PC-3 i DU 145 – ćelije karcinoma prostate

PNMK – polinezasićene masne kiseline

PTPRG – tumor supresorski gen

SE – ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet-u

TAG – triacilgliceroli

T<sub>c</sub> – kritična temperatura

WHO – Svetska zdravstvena organizacija

ZMK – zasićene masne kiseline

## Sadržaj

1. UVOD .....	9
2. TEORIJSKI DEO .....	13
2.1 NAR ( <i>Punica granatum</i> L.).....	14
2.1.1. Botaničke karakteristike ploda nara.....	15
2.1.2. Hemijski sastav semena nara .....	17
2.1.2.1. Masne kiseline .....	18
2.1.3. Upotreba ulja semena nara.....	21
2.2. POSTUPCI IZOLACIJE EKSTRAKATA IZ BILJNOG MATERIJALA .....	22
2.2.1. Konvencionalne metode ekstrakcije .....	22
2.2.1.1. Ekstrakcija ulja mešanjem .....	23
2.2.1.2. Hladno ceđenje ulja .....	23
2.2.1.3. Ekstrakcija organskim rastvaračima .....	24
2.2.1.4. Ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet-u.....	25
2.2.2. Savremene metode ekstrakcije.....	26
2.2.2.1. Ekstrakcija upotrebom mikrotalasa .....	26
2.2.2.2. Ekstrakcija upotrebom ultrazvuka .....	27
2.2.2.3. Ekstrakcija tečnostima pod pritiskom.....	28
2.2.2.4. Ekstrakcija upotrebom natkritičnih fluida .....	28
2.2.2.4.1. Natkritična ekstrakcija iz semena nara .....	31
2.2.3. Intenzifikacija procesa ekstrakcije predtretmanom biljnog materijala .....	33
2.2.3.1. Mikrotalasnno zračenje.....	36
2.2.3.1.2. Mikrotalasi nasuprot konvencionalnom zagrevanju .....	37
2.2.3.1.3. Uticaj mikrotalasnog zagrevanja na biljke.....	38
2.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST SEMENA NARA .....	39
2.3.1. Antioksidativna aktivnost .....	40
2.3.1.1. Klasifikacija antioksidanasa .....	40
2.3.1.1.1. Vitamin E.....	40
2.3.1.1.2. Karotenoidi .....	42
2.3.1.1.3. $\beta$ – karoten .....	42
2.3.1.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti ulja semena nara.....	43
2.3.2. Citotoksična aktivnost.....	44

3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	47
3.1. MATERIJALI.....	48
3.1.1. Hemikalije i reagensi .....	48
3.2. METODE .....	49
3.2.1. Priprema semena za ekstrakciju ulja.....	50
3.2.1.1. Čišćenje semena.....	50
3.2.1.2. Mlevenje semena .....	51
3.2.2. Mikrotalasni predtretman.....	51
3.2.3. Ekstrakcija ulja iz semena divljeg nara.....	52
3.2.3.1. Ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet-u.....	52
3.2.3.2. Natkritična ekstrakcija .....	54
3.3. HEMIJSKA ANALIZA MASN OG ULJA SEMENA DIVLJEG NARA .....	55
3.3.1. Derivatizacija masnog ulja semena divljeg nara.....	55
3.3.2. Priprema uzorka za hemijsku analizu .....	56
3.3.3. Identifikacija metil estara masnih kiselina GC/FID analizom.....	56
3.3.4. Identifikacija metil estara masnih kiselina GC/MS analizom .....	56
3.4. HPLC ANALIZA SASTAVA I SADRŽAJA KAROTENOIDA U ULJU SEMENA DIVLJEG NARA .....	57
3.5. HPLC ANALIZA SASTAVA I SADRŽAJA VITAMINA E U ULJU SEMENA DIVLJEG NARA .....	57
3.6. ODREĐIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI MASN OG ULJA SEMENA DIVLJEG NARA .....	58
3.6.1. Određivanje lipofilnog antioksidativnog kapaciteta korišćenjem $\alpha$ – TEAC metode.....	58
3.6.2. Određivanje citotoksične aktivnosti ulja semena divljeg nara.....	58
3.6.2.1. Čelijske linije .....	58
3.6.2.2. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksične aktivnosti masnog ulja semena divljeg nara	59
3.6.2.3. Tretman čelijskih linija .....	60
3.6.2.4. Određivanje stepena preživljavanja ćelija .....	60
3.6.2.5. Ispitivanje uticaja masnog ulja semena divljeg nara na migraciju EA.hy926 ćelija.....	61
3.6.2.6. Efekat masnog ulja semena divljeg nara na proces angiogeneze .....	61
3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	62
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	63

4.1. UTICAJ MIKROTALASNOG ZRAČENJA NA PRINOS MASNOG ULJA SEMENA DIVLJEG NARA .....	64
4.1.1. Mikrotalasni predtretman i SE iz semena divljeg nara .....	64
4.1.2. Mikrotalasni predtretman i NKE iz semena divljeg nara .....	68
4.1.3. Kinetika natkritične ekstrakcije .....	71
4.1.4. Poređenje prinosa procesa SE i NKE pre i nakon predtretmana semena divljeg nara.....	74
4.2. UTICAJ MIKROTALASNOG PREDTRETMANA I METODE EKSTRAKCIJE NA HEMIJSKI SASTAV MASNIH KISELINA .....	76
4.3. SADRŽAJ KAROTENOIDA I VITAMINA E U ULJU SEMENA DIVLJEG NARA.....	84
4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ULJA SEMENA DIVLJEG NARA .....	87
4.5. CITOTOKSIČNA AKTIVNOST ULJA SEMENA DIVLJEG NARA PREMA TUMORSKIM ĆELIJAMA.....	88
4.5.1. Efekat ekstrakata na migraciju EA.hy926 ćelija.....	90
4.5.2. Efekat masnog ulja semena nara na proces angiogeneze.....	91
5. ZAKLJUČAK.....	93
Literatura .....	97
PRILOG.....	116
Biografija autora.....	120

# **1. UVOD**

Širom sveta, interesovanje za funkcionalnu hranu je u porastu poslednjih godina, usled podizanja svesti o upotrebi hrane koja je bogata bioaktivnim komponentama, kao što su: karotenoidi, tokoferoli, masne kiseline i dr. (Goldberg, 1996; Pereira i Meireles, 2010). Ova biološki aktivna jedinjenja mogu se dobiti različitim tehnikama ekstrakcije. Međutim, toksičnost upotrebljenih rastvarača u nekim procesima ekstrakcije, degradacija željenih jedinjenja, kao i selektivnost rastvarača su glavni parametri koji se moraju uzeti u obzir prilikom odabira tehnike ekstrakcije. Pri projektovanju procesa, za izolovanje bioaktivnih komponenti ključni faktori su: (1) izvor bioaktivnih jedinjenja; (2) ukupni prinos dobijen u datom postupku ekstrakcije; (3) produktivnost i (4) selektivnost. Faktori (1), (2) i (3) su direktno povezani sa ekonomskom održivošću odabranog industrijskog procesa. Sa druge strane, faktor (4) se odnosi na kvalitet i čistoću željenog finalnog proizvoda (Quispe–Condori i sar., 2005).

Kako je industrija u konstantnoj potrazi za inovacijama u ovoj oblasti, razmatraju se novi postupci koji mogu povećati ukupni prinos, produktivnost i selektivnost. Objavljene su brojne studije o ekstrakciji eteričnih ulja, fenolnih jedinjenja, karotenoida, tokoferola, tokotrienola, alkaloida i drugih jedinjenja iz različitih biljnih matrica, kao što su: seme, plod, list, cvet, rizom, koren i kora (Pereira i Meireles, 2010). Bioaktivna jedinjenja se nalaze unutar ćelija ili u specifičnim ćelijskim strukturama. Prinos bioaktivnih jedinjenja nakon ekstrakcije se može povećati razaranjem ćelija u kojima se nalaze, određenom vrstom predtretmana (npr. sečenjem, mlevenjem ili dehidracijom). Na taj način se uklanjanja otpor prenosu mase rastvarača i olakšava ekstrakcija. Predtretman mikrotalasima predstavlja efikasnu metodu za povećanje prinosa željenog jedinjenja nakon ekstrakcije uz skraćenje vremena obrade biljnog materijala i značajne uštede energije. Mikrotalasi direktno intereaguju sa materijalom što rezultira zagrevanjem materijala. Vlaga, koja se nalazi u biljnom materijalu se zagreva, isparava i stvara pritisak na ćelijske membrane biljnog materijala. Pritisak gura ćelijsku membranu iznutra, isteže i razara, što olakšava isticanje bioaktivnih jedinjenja iz pora ćelija biljnog materijala. Takođe, prodiranje rastvarača za ekstrakciju u ćelije kao i ekstrakcija bioaktivnih komponentata je olakšana (Azadmard–Damirchi i sar., 2011). Prema našim saznanjima, u dostupnoj literaturi, ne postoji informacija o primeni mikrotalasnog zračenja za tretman semena divljeg nara pre procesa ekstrakcije ulja.

Natkritična ekstrakcija (NKE) je relativno nova tehnika ekstrakcije, kojom se karakteristike finalnog proizvoda mogu lako menjati promenom parametara procesa kao što su: temperatura, pritisak i dodatak ko–rastvarača. NKE je brza, efikasna i „zelena” metoda, koja se može koristiti za ekstrakciju velikog broja komponenata iz biljnih matrica (Chemat i sar., 2011). Lakoća podešavanja radnih uslova u cilju povećanja solvatacije čini ovu metodu pogodnom za izolovanje različitih bioaktivnih jedinjenja. Proces NKE se može objasniti na sledeći način: (1) natkritični rastvarač difunduje unutar biljnog materijala, što dovodi do širenja/rastezanja ćelijskih struktura (širenje/rastezanje ćelijskih struktura olakšava prodiranje rastvarača smanjujući otpor prenosu mase u čvrstoj fazi); (2) istovremeno, rastvorljiva bioaktivna jedinjenja se rastvaraju u natkritičnom rastvaraču; (3) rastvorena bioaktivna jedinjenja difunduju na površinu čvrste faze; i (4) bioaktivna jedinjenja rastvorena u natkritičnoj fazi se izvode iz ekstraktora zajedno sa natkritičnim rastvaračem (Pereira i Meireles, 2010).

Natkritična ekstrakcija je važan proces u prehrambenoj, farmaceutskoj, hemijskoj i kozmetičkoj industriji jer omogućava dobijanje proizvoda visoke čistoće bez prisustva rastvarača. Usled odsustva organskih rastvarača u finalnom proizvodu, NKE je naročito pogodna za: (1) ekstrakciju vrednih bioaktivnih jedinjenja kao što su boje, ukusi i bioaktivne komponente ili (2) uklanjanje nepoželjnih jedinjenja kao što su organski zagađivači, toksini i pesticidi (Rodrigues i sar., 2002).

Ulje semena nara ima brojne zdravstvene koristi koje su povezane sa sastojcima, uglavnom vitamina E (Jing i sar., 2012) i polinezasićenih masnih kiselina (Eikani i sar., 2012). Vitamin E ima neuroprotektivna svojstva, može da smanji nivo holesterola i ima antioksidativnu aktivnost, dok su masne kiseline zaštitnici kardiovaskularnog sistema. Ulje semena nara se sastoji od oko 80 % konjugovane oktadekatrienske masne kiseline, sa visokim sadržajem *cis 9*, *trans 11*, *cis 13* kiseline tj. punicinske kiseline (Abbasi i sar., 2008). Punicinska kiselina je omega–5 nezasićena masna kiselina i izomer konjugovane  $\alpha$ –linoleinske kiseline (Joh i sar., 1995). Konjugovane masne kiseline imaju povoljan uticaj na zdravlje ljudi, koji se najčešće odnosi na njihovo antioksidativno i imunomodulatorno dejstvo (Carvalho i sar., 2010). Takođe, izomeri konjugovane linolne kiseline mogu sprečiti bolesti kao što je kancer (Liu i sar., 2012).

Imajući u vidu blagotvorna svojstva ulja iz semena nara, koje je bogato masnim kiselinama i vitaminom E, disertacija se fokusira na hemijsku analizu dobijenog masnog

ulja i na ispitivanje antioksidativnog dejstva i citotoksičnog efekta ulja dobijenog procesima NKE i SE iz semena divljeg nara. Procesi ekstrakcije su optimizovani primenom mikrotalasnog predtretmana sa ciljem povećanja prinosa ulja iz semena divljeg nara koje može naći primenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i/ili kozmetičkoj industriji.

### **Ciljevi istraživanja**

- optimizacija procesa predtretmana semena divljeg nara promenom snage i vremena dejstva mikrotalasa na biljni materijal;
- određivanje prinosa natkritične ekstrakcije (NKE) pomoću natkritičnog ugljenik(IV)–oksida ( $\text{nkCO}_2$ ) iz semena divljeg nara na pritisku 37,9 MPa i temperaturi 47 °C pre i nakon mikrotalasnog predtretmana;
- određivanje prinosa ekstrakcije heksanom u aparaturi po Soxhlet–u (SE) iz semena divljeg nara na temperaturi 69 °C pre i nakon mikrotalasnog predtretmana;
- određivanje hemijskog sastava dobijenih ekstrakata;
- evaluacija uticaja mikrotalasnog predtretmana na prinos i sastav ekstrakata dobijenih metodama SE i NKE;
- poređenje metoda ekstrakcije (NKE i SE) na osnovu ostvarenih prinosa i hemijskog sastava dobijenih ekstrakta, pre i nakon mikrotalasnog predtretmana;
- evaluacija antioksidativnog kapaciteta dobijenog masnog ulja semena nara;
- *in vitro* ispitivanje citotoksične aktivnosti dobijenog masnog ulja semena divljeg nara na komercijalnim malignim i zdravim ćelijskim linijama.



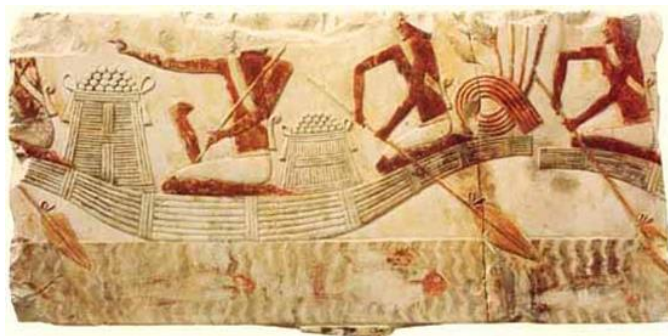
## **2. TEORIJSKI DEO**

## 2.1 NAR (*Punica granatum* L.)

Plod nara (*Punica granatum* L.), je voće koje se smatra jednim od najstarijih poznatih jestivih plodova i za drevne narode bio je simbol obilja i prosperiteta (Fadavi i sar., 2006). Pored masline i smokve, predstavlja najstarije poznato voće koje se spominje u Bibliji, gde verske slike često prikazuju Devicu Mariju ili malog Isusa kako u ruci drže nar (Slika 1a). Takođe, pominje se u Kuranu, jevrejskoj Tori i Talmudu kao „hrana Bogova” (Aviram i sar., 2000; Seeram i sar., 2006). Prema jevrejskoj tradiciji, savršen nar ima 613 semenki, po jednu za svaku zapovest iz Tore. Hiljadama godina verovalo se da nar ima višestruke pozitivne efekte na zdravlje, plodnost, dugovečnost (Chaturvedula i sar., 2011). U antičkoj literaturi, predstavljen je kao najznačajniji lek kod Hipokrata, Plinija, Soranusa i Dioscoridesa. U drevnom Egiptu, osim za terapeutsku upotrebu, korišćen je i u pogrebnim ritualima jer se verovalo da simbolizuje nadu u novi život (Slika 1b).



a)



b)

Slika 1. Upotreba nara kao simbola u slikarstvu: a) Veličanstvena Madona (Botticelli) i b) u egipatskim grobnicama (Izvor: <http://www.crystalinks.com/pomegranate.html>)

Nar potiče iz predela koji se proteže od Irana do severne Indije, odakle su ga stari Grci preneli na Mediteran, a zatim je sa Mavarima stigao u Španiju, po čemu je Granada dobila ime (Harlan, 1992; Smartt, 1976; Levin, 1994, 2006). Latinsko ime roda *Punica* je Rimsko ime za Kartaginu, jer prema Pliniju najbolji plodovi nara su sa područja Punije (Kartagina, današnji Tunis). Plod nara, u bukvalnom prevodu, znači *pōmum* „jabuka” i *grānātum* „zrnasto” (jabuka sa mnogo semena) (Jurenka, 2008). Rod *Punica* pripada familiji Punicaceae i redu Myrtales i obuhvata dve vrste: *P. granatum* i *P. protopunica*. Taksonomija ploda nara je data u Tabeli 1. *P. protopunica* je endemska vrsta na Sokotrskom ostrvu (Jemen) i smatra se pretkom roda *Punica* (Zukhovskij, 1950; Moriguchi i sar., 1987).

Tabela 1. Taksonomija ploda nara

<b>Carstvo</b>	Angiospermae
<b>Klasa</b>	Magnoliopsida
<b>Red</b>	Myrtales
<b>Porodica</b>	Punicaceae
<b>Rod</b>	<i>Punica</i>
<b>Vrsta</b>	<i>Punica granatum</i> L.

Chandra i sar. (2010) pružaju detaljan opis istorije nara, koji predstavlja jedan od najstarijih pripitomljenih voćnih useva. Pripitomljavanje nara započeto je negde u neolitskoj eri, prvobitno u Zakavkasko – Kaspijskoj regiji i severnoj Turskoj. Postoji mala razlika između pripitomljenih i kultivisanih vrsta nara. Smatra se da je divlji predak nara vrlo sličan po izgledu odomaćenim kulturama, ali primarna razlika je u veličini ploda.

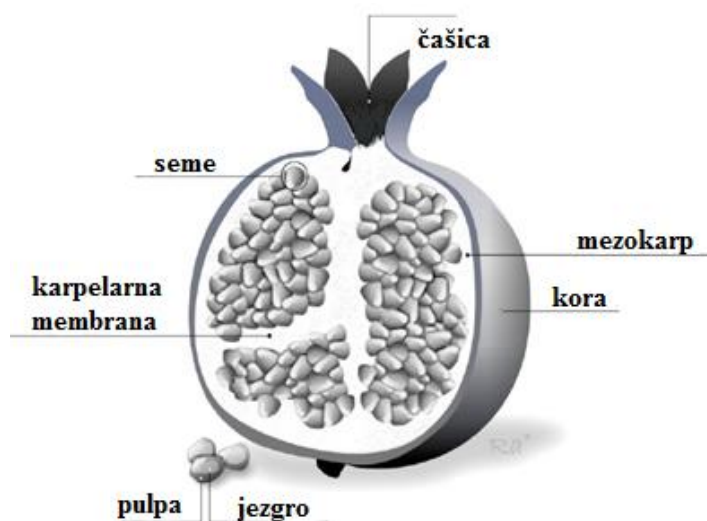
### 2.1.1. Botaničke karakteristike ploda nara

Plod nara je prosečne težine oko 700 g i sastoji se od zaobljene bobice sa debelom, glatkom i sjajnom kožom ili korom (exocarpom – spoljašnja kožica). Veličina i ukus ploda zavise od toga da li je reč o divljem ili pitomom naru. Nar koji raste u prirodi naziva se divljim narom. Plod divljeg nara je sitan i kiselkast, dok je plod pitomog nara veći i teži i ima veće svetlocrvene semenke veličine od 8–12 mm (Xhuveli, 2012).



Slika 2. Plod nara

Prateći razvoj ploda, boja čašice se kontinuirano menja od istaknuto narandžasto–crvene do zelene boje (Slika 2). U kasnijim fazama sazrevanja ploda, boja se ponovo menja sve dok ne dostigne svoju karakterističnu boju koja može biti žute, zelene ili ružičaste boje. Postoje određene sorte nara, poput crnog nara, koji vrlo rano poprima crnu boju i ostaje takav do pune zrelosti (Holland i sar., 2009).



Slika 3. Poprečni presek ploda nara (Izvor: Mena, 2013)

Na Slici 3 prikazan je poprečni presek ploda nara. Unutrašnost ploda čini belo, porozno tkivo, gorkog ukusa (mezokarp – karpelarna membrana), koje formira prostore

ispunjene hrskavim semenom i velikim brojem semenki, čije prosečne dimenzije iznose 5,5 mm dužine i 3 mm širine. Svako seme okružuje pulpa puna soka, koja može biti od bele do tamno crvene (rubin) boje (Stover i Mercure, 2007).

### 2.1.2. Hemijski sastav semena nara

Seme nara ima veoma složen hemijski sastav koji se može grupisati na makronutritijente, mikronutritijente, kao i na druga bioaktivna jedinjenja kao što su pektin, izoflavoni, fitoestrogen kumestrol, steroidi, steroli, polni hormon estron (Lansky i Newman, 2007; Kohno i sar., 2004). U makronutritijente spadaju šećeri, proteini, dijetna vlakna, masne kiseline i dr. Mikronutritijenti koji su prisutni u semenu nara su vitamini (vitamin E) i minerali (Mg) (El-Adawy i Taha, 2001; Viuda-Martos i sar., 2010; Singh i sar., 2002; Guo i sar., 2007).

Na hemijski sastav, kao i na sastav masnih kiselina utiče vrsta (sorta) nara, faktori životne sredine, sazrevanje, starost biljke i način prerade (Schwartz i sar., 2009; Kýralan i sar., 2009). Seme nara iz Nigerije i Saudijske Arabije je pokazalo značajnu razliku u procentu pepela, vlage, sirovih lipida, sirovih proteina, sirove celuloze, dostupnih ugljenih hidrata i energetske vrednosti. Analizom mineralnog sastava pepela utvrđeno je da je magnezijum najzastupljeniji element u semenu (5650 mg/100g i 1140,1 mg/100g u Nigeriji i Saudijskoj Arabiji, poštujući redosled) (Dangoggo i sar., 2012).

Tabela 2. Hemijski sastav semena i ulja semena nara (Sreekumar i sar., 2014)

	<b>Jedinjenja</b>
<b>Seme nara</b>	fenoli, tokoferoli, flavonoidi, tanini, steroli, fosfolipidi, proantocijanidini, polinezasićene masne kiseline
<b>Ulje semena nara</b>	linolna kiselina, punicinska kiselina, palmitinska kiselina, stearinska kiselina, oleinska kiselina, $\alpha$ -, $\beta$ - i $\gamma$ -tokoferol, karotenoidi, protokatehuinska kiselina, 4-hidroksibenzojeva kiselina

Seme nara, zbog svog složenog hemijskog sastava (Tabela 2), ima širok spektar biološke aktivnosti. Sadrži šećere, polinezasićene masne kiseline (PNMK), vitamine,

polisaharide, polifenolna jedinjenja i minerale (Syed i sar., 2007). Karakterističan je visok sadržaj PNMK, kao što su linolna i linoleinska kiselina, a prisutne su i druge masne kiseline poput, oleinske, stearinske i palmitinske. Ulje semena nara dobar je izvor lipida, koji čine 12 % do 20 % ukupne težine semena. Sadržaj masnih kiselina u ulju je preko 95 %, od čega su 99 % triacilgliceroli (TAG). Interesantno je, konjugovana linoleinska kiselina (CLnA) čini 70–76 % ulja (Monica i sar., 2013). Dokazano je da izomer CLnA, punicinska kiselina (eng. *punicic acid*), sa dvostrukim *cis*-9, *trans*-1, *cis*-13 vezama, poseduje antikancerogeno dejstvo regulacijom PTPRG-a proteina (eng. *protein tyrosine phosphatase, receptor type G*) (Kohno i sar., 2004).

### 2.1.2.1. Masne kiseline

Lipidi su glavni izvori esencijalnih masnih kiselina i vitamina i služe kao prekursori u sintezi steroidnih hormona i prostaglandina (Li i sar., 2016). Masne kiseline (MK) predstavljaju važne izvore energije i omogućavaju apsorpciju liposolubilnih vitamina. Dele se na: zasićene masne kiseline (ZMK) (Tabela 3) i nezasićene masne kiseline (NMK) (Tabela 4). NMK se dalje mogu podeliti na: mononezasićene (MNMK) i polinezasićene masne kiseline (PNMK).

Tabela 3. Važnije zasićene masne kiseline koje se javljaju u ulju semenki nara

Trivijalno ime	Skraćenica	Tipični izvori
Laurinska kiselina	C12:0	Kokosovo ulje i ulje iz palminih koštica
Miristinska kiselina	C14:0	Mlečna mast, kokosovo ulje i ulje iz palminih koštica
Palmitinska kiselina	C16:0	Većina masti i ulja
Stearinska kiselina	C18:0	Većina masti i ulja
Arahinska kiselina	C20:0	Ulje iz kikirikija
Behenska kiselina	C22:0	Ulje iz kikirikija
Lignocerinska kiselina	C24:0	Ulje iz kikirikija

Tabela 4. Važnije nezasićene masne kiseline koje se javljaju u ulju semenki nara

Trivijalno ime	Skraćenica	Tipični izvori
Palmitoleinska kiselina	C16:1	Ulje makadamije, većina životinjskih i biljnih ulja, ulja morskog porekla
Oleinska kiselina	C18:1	Sva ulja i masti, maslinovo ulje, visoko oleinska ulja šafranike i suncokreta
Vakcenska kiselina	C18:1	Većina biljnih ulja
Elaidinska kiselina	C18:1	Hidirirane masti

Polinezasićene masne kiseline (Tabela 5) obuhvataju esencijalne masne kiseline (EMK) značajne sastojke ćelijske membrane koje su važne za rast i razvoj organizma. Pošto se ne mogu sintetizovati u ljudskom organizmu, neophodno je uneti ih hranom.

Među PNMK najveći značaj ima omega-6 grupa i omega-3 grupa. Mogu se naći u velikim količinama u biljkama i ribljem ulju, a u organizmu se prvenstveno koriste za sintezu hormona koji regulišu krvni pritisak i nivo masti u krvi. Utiču na imuni sistem i odbranu organizma od infekcija, sastavni su deo membranskih lipida i prekursori prostaglandina. Ove kiseline poseduju dvostruke veze na  $\omega-3$  i  $\omega-6$  ugljenikovom atomu. U ljudskom organizmu ne postoji mehanizam za sintezu upravo tih veza, pa njihov nedostatak može izazvati depresiju ili agresiju u ponašanju (Jašić i Begić, 2008).

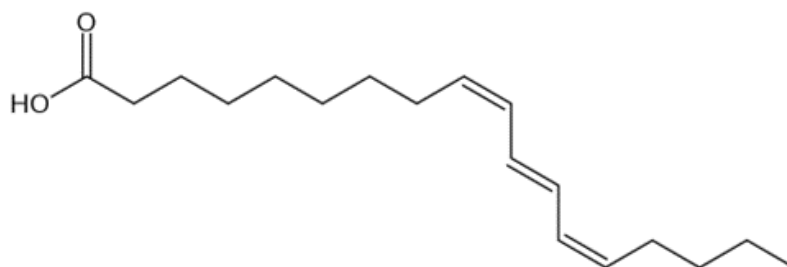
Ispitivanje omega-3 masnih kiselina na živim ćelijama van organizma (*in vitro* istraživanja), pokazalo je antidijabetski i antiinflamatorni efekat, kao i pozitivan efekat na sprečavanje razvoja raka dojke i prostate. U *in vivo* (eksperimenti koji koriste ceo, živ organizam) ispitivanjima potvrđeno je da *cis*-nezasićene masne kiseline snižavaju loš holesterol (LDL) u plazmi, pri čemu imaju neznatan efekat na dobar holesterol (HDL). Ulje koje sadrži *cis*-masne kiseline može se kvalifikovati kao funkcionalno i može doprineti smanjenju rizika oboljevanja od kardiovaskularnih bolesti i nastanku arterijske tromboze (Hornstra, 1999).

Tabela 5. Važnije polinezasićene masne kiseline koje se javljaju u ulju semenki nara

Trivijalno ime	Skraćenica	Tipični izvori
Linolna kiselina	C18:2	Većina biljnih i životinjskih masti
$\alpha$ -linoleinska kiselina	C18:3	Većina biljnih ulja
Linoleilaidinska kiselina	C18:2	Hidrogenizovana biljna ulja
Punicinska kiselina	C18:3	Ulje iz semena nara
Katalpinska kiselina	C18:3	Seme kineske katalpe
$\alpha$ -eleostearinska kiselina	C18:3	Ulje semena gorke dinje
Jakarinska kiselina	C18:3	Seme plave jakarande

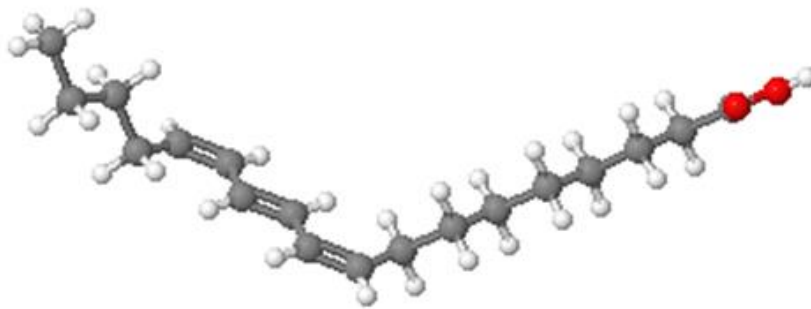
Ulje iz semena nara je dobar izvor konjugovanih masnih kiselina, posebno punicinske kiseline (PA). Pored nara, konjugovane masne kiseline mogu se izolovati iz gorke dinje ( $\alpha$ - i  $\beta$ -eleostearinska kiselina), semena nevena ( $\alpha$ - i  $\beta$ -kalendinska kiselina), katalpinog drveta (katalpinska kiselina), plamenog drveta (jakarinska kiselina) (Aruna i sar., 2015).

Visok sadržaj PA je važna nutritivna karakteristika ulja semena nara. Punicinska kiselina ili (*9Z,11E,13Z*)-oktadeka-9,11,13-trienska kiselina prema IUPAC nomenklaturi (eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry*), sadrži tri dvostruke veze (poznate kao *cis*-9, *trans*-11, *cis*-13 veze). Njena molekulska formula je  $C_{18}H_{30}O_2$ , a strukturna formula je prikazana na Slici 4. Punicinska kiselina je polinezasićena masna kiselina sa omega-5 dugim lancem i predstavlja izomer  $\alpha$ -linoleinske kiseline (CLnA) (Carvalho i sar., 2010).



a)





b)

Slika 4. a) Hemijska formula i b) trodimenzionalni prikaz punicinske kiseline

Ime je dobila po svom glavnom izvoru, naru (*Punica granatum* L.), a može se izolovati iz semena tikve Azijske zmijske i semena *Trichosanthes kirilowii* (Tabela 6).

Tabela 6. Izvori punicinske kiseline (Hennessy i sar., 2016)

Izvori punicinske kiseline	%	Literatura
<b>Nar (ulje semena)</b>		Spilmont i sar., 2013
Zasićene masne kiseline	10	
Nezasićene masne kiseline	10	
PA i izomeri (C18:3 9c,11t,13c)	70	
<b><i>Trichosanthes kirilowii</i> (ulje semena)</b>		Yamasaki i sar., 2006
Zasićene masne kiseline	7,50	
Nezasićene masne kiseline	22,91	
PA i izomeri (C18:3 9c,11t,13c)	35,89	

Nedavne studije pokazuju snažna terapijska i preventivna svojstva PA koja mogu pomoći ljudskom organizmu u borbi protiv kancera, gojaznosti, dijabetesa i kardiovaskularnih oboljenja.

### 2.1.3. Upotreba ulja semena nara

Seme nara, kao i kora nara zaostaju kao sporedni proizvodi prilikom proizvodnje sokova. Cam i sar. (2013) su inkorporirali koru i ulje semena nara u sladoled kako bi poboljšali funkcionalna svojstva sladoleda. Uvođenje fenolnih jedinjenja u sladoled, koja

se nalaze u kori nara, dovelo je do značajnih promena u pH vrednosti, kiselosti i boji sladoleda, kao i poboljšanja antioksidativnih i antidijabetskih svojstava, dok je zamena mlečnih masti uljem semena nara dovelo do povećanja sadržaja konjugovanih masnih kiselina u sladoledu. Lucci i sar. (2015) su ispitivali citotoksično i antioksidativno dejstvo etanolnog ekstrakta semena nara. Na osnovu dobijenih rezultata, predložili su upotrebu etanolnog ekstrakta u proizvodnji funkcionalne hrane koja ima povoljan uticaj na ljudsko zdravlje (sprečava bolesti, naročito karcinom prostate i dojke).

Kako bi se izbegla upotreba sintetičkih antioksidanasa, Devatkal i sar. (2010) su upotrebili ekstrakt semena nara u proizvodima od mesa kako bi povećali oksidativnu stabilnost tih proizvoda. U studiji koju su izveli, inkorporirali su prah kore citrusa i kore nara, kao i ekstrakt semena nara u proizvode od mesa. Najveći antioksidativni efekat primećen je u ekstraktu semena nara. Takođe, primetili su da nije došlo do promene senzornih svojstava proizvoda. Ovo ukazuje na potencijalnu upotrebu sporednih proizvoda kao prirodnih antioksidanasa. U drugoj studiji koju su izveli Keşkekoğlu i Uren (2014), je pokazano da ekstrakt semena nara može smanjiti formiranje heterocikličnih aromatičnih amina u proizvodima od mesa koji su pripremljeni na različitim temperaturama. Time je omogućena proizvodnja namirnica koje nisu štetne po zdravlje ljudi.

Pored prehrambene industrije, ulje semena nara našlo je primenu u kozmetičkoj industriji. Zbog složenog hemijskog sastava, ulje se može koristiti u preparatima koji regenerišu i podmlađuju zrelu i suhu kožu. Takođe, ima široku primenu kod oštećene, upaljane ili iritirane kože, ublažava simptome ekcema i psorijaze, kožnih alergija i sličnih kožnih bolesti (Aslam i sar., 2006).

## **2.2. POSTUPCI IZOLACIJE EKSTRAKATA IZ BILJNOG MATERIJALA**

### **2.2.1. Konvencionalne metode ekstrakcije**

Postoji čitav niz konvencionalnih metoda koje se mogu primeniti za izolovanje bioaktivnih komponenata iz biljnog materijala (ploda, kore, lista, ostatka nakon presovanja semena). Prilikom izbora odgovarajuće tehnike izolovanja bioaktivnih komponenata potrebno je voditi računa o toksičnosti rastvarača, kao i o selektivnosti procesa u odnosu na željena bioaktivna jedinjenja i mogućnostima razgradnje bioaktivnih

jedinjenja tokom procesa ekstrakcije (Ivanović, 2011). Najčešće korišćene konvencionalne metode izolovanja ulja iz semena nara su: ekstrakcija mešanjem, hladno ceđenje ulja, ekstrakcija organskim rastvaračima, ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet–u (SE) i dr.

#### **2.2.1.1. Ekstrakcija ulja mešanjem**

Ekstrakcija ulja mešanjem podrazumeva postupak potapanja biljnog materijala u odgovarajući rastvarač i sukcesivno mešanje suspenzije. Ekstrakcija iz semena se može ubrzati povećanjem kontaktne površine biljnog materijala sa rastvaračem, usitnjavanjem semena (Nwabanne, 2012; Saxena i sar., 2011). Nakon ekstrakcije, rastvarač se najčešće odvaja od ekstrakta uparivanjem pomoću rotacionog vakum uparivača.

U svom radu, Abbasi i sar. (2008) su ekstrahovali ulje iz semena nara pomoću četiri metode: ekstrakcija ulja mešanjem, SE, mikrotalasna i ultrazvučna ekstrakcija koristeći benzen i heksan. Dobijeni ekstrakti nisu imali značajne razlike u hemijskom sastavu masnih kiselina, ali je zabeležen manji prinos ulja koji je dobijen mešanjem u odnosu na druge metode ekstrakcije.

#### **2.2.1.2. Hladno ceđenje ulja**

Hladno ceđenje predstavlja tehnološki postupak u toku kojeg se iz biljnog materijala primenom pritiska npr. presovanjem, izdvaja ulje. Primenjuje se na sirov biljni materijal, koji u svojim perifernim ćelijskim strukturama ima visok sadržaj ulja (Skala i sar., 1999). Prilikom proizvodnje hladno presovanih ulja, bitno je voditi računa o temperaturi izlaznog ulja jer u toku procesa presovanja, dolazi do oslobađanja toplote nastale usled trenja. Prema podacima u dostupnoj literaturi maksimalna dozvoljena temperatura izlaznog ulja ne bi smela biti veća od 50 °C (Dimić, 2005), kako bi zadržala većinu svojih nutritivnih vrednosti, boju i ukus. Jedna od glavnih prednosti ovog procesa je taj što je ekološki prihvatljiv, ne zahteva upotrebu organskih rastvarača, pa samim tim nije potrebno dodatno prečišćavanje željenog proizvoda. Ulja dobijena na ovaj način boljeg su kvaliteta od ulja dobijena drugim klasičnim metodama ekstrakcije. Glavni nedostatak ove metode ogleda se u malom prinosu željenog proizvoda.

U dostupnoj naučnoj literaturi se može naći određeni broj studija u kojima je ulje semena nara dobijeno postupkom hladnog ceđenja (Schubert i sar., 1999; Kim i sar., 2002; Eikani i sar., 2012). Studije su potvrdile da je glavni nedostatak ove metode nizak prinos ekstrahovanog masnog ulja.

### 2.2.1.3. Ekstrakcija organskim rastvaračima

Izolovanje biljnih ekstrakta korišćenjem organskih rastvarača je metoda koja se često primenjuje za dobijanje bioaktivnih termolabilnih jedinjenja. U Tabeli 7 prikazani su najčešće korišćeni organski rastvarači u procesima ekstrakcije.

Proces ekstrakcije svežeg biljnog materijala se odigrava u tri faze: a) kvašenje rastvaračem i bubrenje ćelija biljnog materijala, b) prenos bioaktivnih materija kroz porozne zidove ćelija i c) prenos ekstraktivnih materija sa površine biljne sirovine u rastvarač za ekstrakciju (Ponomarev, 1976). Proces ekstrakcije osušenog biljnog materijala se odvija u više faza: a) prodiranje rastvarača u nerazorene ćelije, b) kvašenje ekstraktivnih materija koje se nalaze unutar ćelija, c) rastvaranje ekstraktivnih materija sa ćelijskih zidova, d) prenos ekstraktivnih materija kroz membranu ćelija iz unutrašnjosti nerazorenih ćelija do površine čestica biljnog materijala i e) prenos ekstraktivnih materija sa površine biljnog materijala u masu rastvarača (Ponomarev, 1976).

Tabela 7. Najčešće korišćeni organski rastvarači i njihove osobine (Damjanović, 2005)

Rastvarač	Hemijska formula	Tačka ključanja (°C)	Dielektrična konstanta	Gustina (g/mL)
Polarni rastvarači				
Metanol	CH <sub>3</sub> -OH	65	33	0,791
Etanol	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	79	24	0,789
<i>n</i> -butanol	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	118	18	0,810
Nepolarni rastvarači				
heksan	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	69	2,0	0,655
Hloroform	CHCl <sub>3</sub>	61	4,8	1,498
Dietil etar	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	35	4,3	0,719
Benzen	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	80	2,3	0,879

Prilikom izbora rastvarača treba imati u vidu da bude jeftin, selektivan i stabilan, da ima povoljne termodinamičke karakteristike, da nije lako zapaljiv i štetan po zdravlje

ljudi. Jedna od prednosti ekstrakcije organskim rastvaračima je mogućnost izolovanja ekstrakta koji poseduju jako antioksidativno dejstvo. Međutim, nedostatak ove vrste ekstrakcije je što rastvarač zaostaje u finalnom proizvodu, pa je upotreba u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji ograničena. Potrebno je prečistiti ekstrakt od rastvarača, što dodatno produžava vreme proizvodnje ekstrakta i čini postupak složenijim, a u toku uparavanja rastvarača, može doći i do degradacije lako isparljivih komponenata.

#### 2.2.1.4. Ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet–u

Ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet–u (SE) se primenjuje kada željena bioaktivna komponenta ima ograničenu rastvorljivost u rastvaraču. Takođe, upotrebljava se kada biljna sirovina sadrži termolabilna jedinjenja. Metoda omogućava ekstrakciju jedinjenja srednje i niske isparljivosti i termičke stabilnosti (Wang i Weller, 2006).

Prednost ove metode je visok prinos ekstrakta. Nedostatak se ogleda u potrebi za neprestanim zagrevanjem rastvarača i ekstrakta u balonu, na temperaturi ključanja rastvarača, što iziskuje veliku potrošnju vode za hlađenje i električne energije. Takođe, proces ekstrakcije može trajati dugo, što zavisi od vrste bioaktivnih komponenti koje se žele izolovati. Nakon završene ekstrakcije, rastvarač se najčešće odvaja od ekstrakta uparavanjem pomoću rotacionog vakuum uparivača, što dodatno produžava procesno vreme (Romanik i sar., 2007). Više autora je ispitivalo proces SE različitih vrsta semena nara, a neki od relevantnih rezultata predstavljeni su u Tabeli 8.

Tabela 8. Literaturni pregled – Ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet–u iz semena nara

Poreklo nara	t(h)/T(°C)	Rastvarač	Prinos (%)	Literatura
Isfahan, Iran	6/(–)	Benzen	18,6	Abbasi i sar., 2008
		heksan	18,7	
Fars, Iran	24/(–)	heksan	17,9	Eikani i sar., 2012
Ankara, Turska	8/110	heksan	34,7	Çavdar i sar., 2017
Teheran, Iran	20/69	heksan	22,3	Ahangari i Sargolzaei, 2012
Sinkjang, Kina	3/60	heksan	20,5	Tian i sar., 2013

Kao rastvarač za SE najčešće se koristi heksan. U studiji koju su izveli Abbasi i sar. (2008) nije primećena značajna razlika u prinosima ekstrahovanog ulja prilikom upotrebe iste količine benzena i heksana. Takođe, primećeno je da vreme trajanja ekstrakcije nije imalo uticaj na prinos dobijenog ulja.

### **2.2.2. Savremene metode ekstrakcije**

Zbog nedostataka konvencionalnih metoda ekstrakcije, postoji velika tendencija za pronalazak novih metoda koje će uštedeti energiju, skratiti vreme ekstrakcije, povećati prinos ekstrakata i smanjiti potrošnju organskih rastvarača. Organski rastvarači koji se upotrebljavaju u konvencionalnim metodama ekstrakcije nisu dovoljno selektivni jer rastvaraju veliki broj komponenata među kojima su i teško isparljiva jedinjenja, velikih molekularnih masa (smole, masne komponente, pigmenti, itd.). Nakon ekstrakcije, organski rastvarači se mogu ukloniti uparavanjem, međutim u finalnom proizvodu ipak zaostaju u tragovima. Utvrđeno je da prisustvo organskih rastvarača, čak i u tragovima, u većini slučajeva štetno deluje na ljudski organizam (Vidović, 2011). Pored toga, konvencionalne metode ekstrakcije podrazumevaju dugo vreme izvođenja procesa, velike količine biljnog materijala i organskih rastvarača, što ove procese čini neekonomičnim i nepogodnim sa aspekta održivog razvoja (Cvetanović i sar., 2017). Među savremenim metodama ekstrakcije izdvajaju se:

- mikrotalasna ekstrakcija (eng. *microwave-assisted extraction – MAE*),
- ultrazvučna ekstrakcija (eng. *ultrasound-assisted extraction – UAE*),
- ekstrakcija tečnostima pod pritiskom (eng. *pressurized liquid extraction – PLE*),
- natkritična ekstrakcija (eng. *supercritical fluid extraction – SFE*),
- pulsna električna polja (eng. *pulsed electric field - PEF*),
- enzimaska hidroliza (eng. *enzymatic hydrolysis*) (Azmir i sar., 2013).

#### **2.2.2.1. Ekstrakcija upotrebom mikrotalasa**

Zahvaljujući razvoju mikrotalasne tehnologije, mikrotalasna ekstrakcija se može izvesti na više načina:

- ekstrakcija bez rastvarača (mikrotalasna ekstrakcija bez rastvarača – eng. *solvent-free microwave extraction – SFME*) (Chemat i sar., 2004; Đurđević i sar., 2017),
- ekstrakcija organskim rastvaračima (mikrotalasna ekstrakcija organskim rastvaračima – eng. *microwave-assisted solvent extraction – MASE*) (Pare i sar., 1991; Pare, 1994),
- hidrodestilacija (mikrotalasna hidrodestilacija – eng. *microwave hydrodistillation – MWHD*) (Stashenko i sar., 2004),
- hidrodestilacija pod vakumom (vakum mikrotalasna hidrodestilacija – eng. *vacuum microwave hydrodistillation – VMHD*) (Mengal i Mompon, 1994, 1996),
- destilacija (mikrotalasna destilacija – eng. *microwave-assisted distillation – MAD*),
- destilacija komprimovanim vazduhom (mikrotalasna destilacija komprimovanim vazduhom – eng. *compressed air microwave distillation – CAMD*) (Craveiro i sar., 1989),
- gravitaciona hidrodifuzija (mikrotalasna gravitaciona hidrodifuzija – eng. *microwave hydrodiffusion and gravity – MHG*) (Ivanović, 2011).

Čavdar i sar. (2017) su koristili metodologiju odzivnih površina (eng. *response surface methodology – RSM*) kako bi odredili optimalne uslove MASE radi dobijanja maksimalnog prinosa ulja iz semena nara. Najveći prinos (35,19 %) je ostvaren pri sledećim uslovima: mikrotalasna snaga 220 W, veličina čestice semena nara 0,125 – 0,450 mm, odnos rastvarača (heksan) i uzorka 10:1 u trajanju od 5 minuta. MASE je obezbedila veći prinos ulja u poređenju sa SE (34,7 % za 8 h) i hladnim ceđenjem ulja (17,5 % tokom 8 h). Takođe, ulja dobijena metodom MASE imala su bolje fizičko-hemijske osobine, kao što je veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, bolju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa uljima koja su dobijena konvencionalnim metodama ekstrakcije.

#### **2.2.2.2. Ekstrakcija upotrebom ultrazvuka**

Ultrazvučna ekstrakcija podrazumeva upotrebu ultrazvuka sa frekvencijama u opsegu od 20 kHz do 2000 kHz. Delovanjem ultrazvučnih talasa povećava se permeabilnost ćelijskih zidova čime je omogućena veća difuzija rastvarača i ekstrakta kroz ćelijski zid i jednostavnije ispiranje bioaktivnih komponenti. Kalamara i sar. (2015)

su pokazali da se primenom ultrazvučne ekstrakcije dobijaju veći prinosi ulja semena nara za znatno kraće vreme u poređenju sa konvencionalnim metodama ekstrakcije.

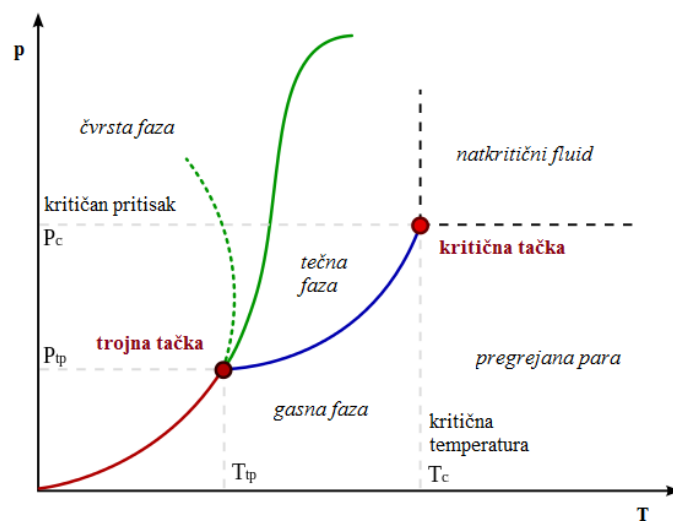
### 2.2.2.3. Ekstrakcija tečnostima pod pritiskom

Ekstrakcija tečnostima pod pritiskom predstavlja relativno novu metodu izolovanja bioaktivnih jedinjenja iz biljnih matrica. Tečni rastvarač koji se nalazi na povišenom pritisku i temperaturi (do 20 MPa i 200 °C) značajno povećava efikasnost ekstrakcije. Visoka temperatura omogućava povećanu rastvorljivost ekstrakta, kao i povećanu brzinu difuzije, dok veći pritisak omogućava lakšu penetraciju rastvarača u nerazorene biljne ćelije (Monrad i sar., 2009).

Prednost ove metode ogleda se u povećanoj efikasnosti ekstrakcije, smanjenoj upotrebi rastvarača (15 mL do 40 mL), smanjenom vremenu ekstrakcije (15 do 20 min), dobijanju finalnog proizvoda bez potrebe za filtracijom, kao i mogućnosti automatizacije procesa (Nieto i sar., 2009). Shodno navedenom, proces je pogodan za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Cvetanović i sar., 2017).

### 2.2.2.4. Ekstrakcija upotrebom natkritičnih fluida

Natkritična ekstrakcija (NKE) je postupak ekstrakcije fluidom koji se nalazi na temperaturi iznad svoje kritične temperature ( $T_c$ ) i pritisku iznad svog kritičnog pritiska ( $p_c$ ) u tzv. natkritičnom stanju (Slika 5).



Slika 5. Fazni dijagram (p-T) za CO<sub>2</sub>



Izbor odgovarajućeg rastvarača za NKE zavisi od njegovih fizičko–hemijskih karakteristika (Pereira i Meireles, 2010), a najviše u upotrebi su: ugljenik(IV)–oksid (CO<sub>2</sub>), heksan, propan, etan, pentan, butan, amonijak, voda, itd. (Smith, 1999). U Tabeli 9 date su vrednosti kritičnih parametara za odabrane rastvarače koji se koriste u procesima NKE.

Tabela 9. Vrednosti kritičnih parametara rastvarača koji su najčešće upotrebljavani za NKE (Pereda i sar., 2008)

<b>Fluid</b>	<b>Kritična temperatura (°C)</b>	<b>Kritičan pritisak (MPa)</b>	<b>Kritična zapremina (cm<sup>3</sup>/mol)</b>
CO <sub>2</sub>	30,95	7,38	94,07
heksan	234,4	3,02	368,0
propan	96,65	4,25	200,0
etan	32,15	4,87	145,5
amonijak	132,3	11,35	72,47
voda	373,9	22,06	55,95

Natkritični fluidi odlikuju se velikom gustinom koja je bliska gustinama tečnosti (Tabela 10) zbog čega imaju veliku moć rastvaranja (Brunner, 2005; Maksimović, 2007). Takođe, vrednosti dinamičke viskoznosti natkritičnih fluida su slične gasovima, što omogućava lakše prodiranje natkritičnog rastvarača u poroznu strukturu čvrstog materijala u poređenju sa tečnim rastvaračima i povećanje brzine ekstrakcije (Brunner, 2005).

Tabela 10. Vrednosti fizičkih parametara fluida u gasovitom, natkritičnom i tečnom stanju (Brunner, 2005)

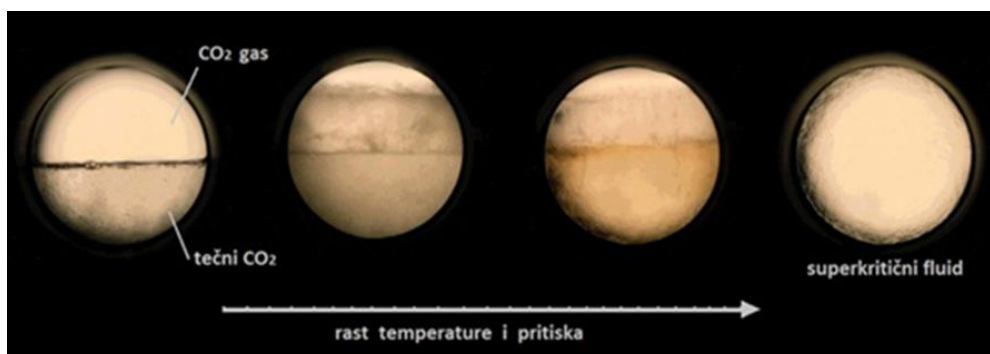
	<b>Gustina (kg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Koeficijent difuzije (m<sup>2</sup>/s)×10<sup>6</sup></b>	<b>Dinamička viskoznost (mPas)</b>	<b>Kinematska viskoznost (m<sup>2</sup>/s)×10<sup>6</sup></b>
Gas (sobna temperatura)	0,6–2	10–40	0,01–0,3	5–500
Natkritični fluid (T <sub>c</sub> , p <sub>c</sub> )	200–500	0,07	0,01–0,3	0,1–0,2
Tečnost (sobna temperatura)	600–1600	0,0002–0,002	0,2–3	0,1–5

Proces ekstrakcije natkritičnim fluidima se može prikazati kroz pet faza (Wakao i Kaguei, 1982):

- difuzija natkritičnog fluida do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje
- prodiranje i difuzija natkritičnog fluida kroz spoljašnji sloj sfernog omotača krutog, inertnog, materijala
- kontakt natkritičnog fluida sa rastvorljivom komponentom
- difuzija rastvorene komponente u natkritičnom fluidu kroz sloj spoljašnjeg sfernog omotača na spoljašnju površinu čestice
- difuzija rastvorene komponente kroz film natkritičnog fluida koji okružuje česticu.



Kao najpoželjniji fluid za procese NKE pokazao se CO<sub>2</sub>. U dostupnoj literaturi jasno su prikazane faze prelaska CO<sub>2</sub> u natkritično stanje (Slika 6) sa porastom temperature i pritiska. Naime, ispod kritične temperature ( $T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i kritičnog pritiska ( $p_c = 7,38 \text{ MPa}$ ), CO<sub>2</sub> postoji i u tečnoj i u gasovitoj fazi. Povećanjem temperature, gustina tečne i gasovite faze postaje sličnija, pa se granica između faza smanjuje. Nakon postignutog  $p_c$  i  $T_c$ , kinetička energija molekula poništava delovanje Van der Valsovih privlačnih sila, i granica između tečne i gasovite faze prestaje da postoji tj. nastaje nova homogena faza – natkritična faza (Knežević, 2008).



Slika 6. Različita stanja CO<sub>2</sub> (Knežević, 2008)

Zbog niske vrednosti kritične temperature (31,1 °C), CO<sub>2</sub> se najčešće primenjuje u procesima ekstrakcije aktivnih komponenti iz biljnih i životinjskih materijala koje su osetljive i nestabilne na povišenoj temperaturi. Ekstrakcijom aktivnih komponenti pomoću CO<sub>2</sub> na temperaturama koje su niže od onih primenjenih u konvencionalnim metodama ekstrakcije sprečena je termička degradacija biološki aktivnih komponenata. Uklanjanje CO<sub>2</sub> iz ekstrakta se vrši jednostavno i brzo, čime se dobija potpuno čist ekstrakt, bez prisustva rastvarača. Usled hemijske inertnosti CO<sub>2</sub>, izbegnuti su toksični ostaci rastvarača u ekstraktu, a samim tim sprečena je eventualna oksidacija proizvoda. Takođe, CO<sub>2</sub> je gas bez boje, ukusa i mirisa, koji je lako dostupan po niskoj ceni. Jedna od glavnih prednosti NKE pomoću CO<sub>2</sub> je mogućnost jednostavnog menjanja procesnih parametara, temperature i pritiska (odnosno gustine CO<sub>2</sub>) čime je omogućeno dobijanje ekstrakata željenog sastava.

Natkritičnim fluidima mogu se ekstrahovati etarska i masna ulja, arome i začini, kao i komponente sa različitom biološkom aktivnošću. Iako se masna ulja mogu dobiti klasičnom ekstrakcijom organskim rastvaračima, kao i hladnim presovanjem, organski rastvarači zaostali u finalnom proizvodu, kao i manji prinosi masnog ulja u postupku dobijanja hladnim presovanjem, daju prednost NKE (Nikolovski, 2009). Kao glavni nedostatak NKE navode se relativno velika investiciona ulaganja u odnosu na druge metode ekstrakcije, koje se izvode na nižim pritiscima.

#### 2.2.2.4.1. Natkritična ekstrakcija iz semena nara

Više autora je ispitivalo proces NKE iz semena nara pri različitim operativnim uslovima, a neki od rezultata su prikazani u Tabeli 11.

Tabela 11. Literaturni pregled – NKE iz različitih sorti semena nara

Poreklo nara	p (MPa) / T (°C) / t (h)	Prinos (%)	Literatura
Teheran, Iran	30 / 40 / 3	13,06	Ahangari i Sargolzaei, 2012
	30 / 60 / 3	12,21	
	25 / 50 / 3	11,23	
Pakchong, Tajland	40 / 55 / 2	4,5	Oonsivilai i sar., 2016
Isfahan, Iran	20 / 40 / –	0,89	Abbasi i sar., 2008
Sinkjang, Kina	37,9 / 47 / 2	15,63	Liu i sar., 2009

Može se primetiti da poreklo biljke i izbor pritiska, temperature, vremena ekstrakcije (operativni uslovi) imaju veliki uticaj na prinos dobijenog ulja. Pokazano je da se prinos ekstrakcije povećava usled povećanja pritiska jer dolazi do povećanja gustine tečnosti tj. rastvorne moći CO<sub>2</sub>. Međutim, zbog negativnog uticaja temperature na rastvornu moć CO<sub>2</sub> na odabranim uslovima, povećanje temperature rezultiralo je blagim smanjenjem prinosa ekstrakcije.

U studiji koju je izveo Liu i sar. (2009) je prezentovana optimizacija procesa NKE ulja semena nara primenom metodologije odzivnih površina (RSM). RSM metodologijom analiziran je uticaj procesnih parametara (pritiska, temperature i protoka CO<sub>2</sub>) na prinos ulja nara, čime je omogućeno određivanje optimalnih uslova NKE. Pomoću matematičkog modela, predviđeno je da maksimalni prinos natkritičnog ekstrakta semena nara iznosi 156,3 g/kg na temperaturi od 47 °C, pritisku 37,9 MPa i protoku nkCO<sub>2</sub> od 21,3 L/h.

U svom radu, Abbasi i sar. (2008) su primetili da se upotrebom kosolventa (vode, etanola i heksana) za NKE povećava prinos ekstrakcije, po redu: heksan>etanol>voda (Tabela 12). Naime, nkCO<sub>2</sub> je pogodan za rastvaranje nepolarnih supstanci, dok je rastvorljivost polarnih supstanci slaba. Kako bi se poboljšala moć rastvaranja polarnih supstanci, obično se u toku ekstrakcije koristi smeša nkCO<sub>2</sub> i kosolventa (Reverchon i De Marco, 2006).

Tabela 12. Uticaj kosolventa na prinos NKE iz semena nara (Abbasi i sar., 2008)

<b>Biljni materijal</b>	<b>Kosolvent</b>	<b>Zapremina kosolventa (mL/100g)</b>	<b>Prinos (%)</b>
Seme divljeg nara	voda	0	0,89
		9	0,80
		18	2,50
	etanol	0	2,14
		9	1,34
		18	3,39
	heksan	0	1,88
		9	3,21
		18	2,86

Primećeno je da povećanje zapremine kosolventa ima pozitivan efekat na prinos NKE. Među svim analiziranim parametrima (pritisak, temperatura, vreme ekstrakcije, kosolvent, zapremina kosolventa), promena zapremine kosolventa pokazala je najveći uticaj na prinos ekstrakcije, dok je temperatura imala najmanji uticaj na prinos ulja (Abbasi i sar., 2008).

### **2.2.3. Intenzifikacija procesa ekstrakcije predtretmanom biljnog materijala**

Predtretman biljnog materijala podrazumeva razaranje strukture biljnih tkiva u cilju obezbeđenja većeg prinosa ekstrakcije ili dobijanja ekstrakata sa većom koncentracijom željenih komponenti i poboljšanim biološkim karakteristikama za što kraći vremenski period. Postoji veliki broj predtretmana koji se mogu primeniti pre ekstrakcije iz biljnog materijala a neki od njih su: mehanički predtretman (npr. seckanje, mlevenje, kidanje), ultrazvučni predtretman, nagla dekompresija nakon kratkog izlaganja materijala CO<sub>2</sub>, mikrotalasni predtretman, itd. (Ivanović i sar., 2013; Crampon i sar., 2013).

Mlevenjem biljnog materijala izvodi se usitnjavanje čvrstih čestica do željene veličine. Za procese ekstrakcije najčešće se koriste čestice biljnog materijala srednjeg prečnika od 0,25 do 2,0 mm (Reverchon i De Marco, 2006). Cilj usitnjavanja je povećanje dostupnosti i oslobađanja bioaktivnih komponenata razaranjem ćelijskih zidova (Veličković, 2007). Ipak, prilikom usitnjavanja materijala potrebno je voditi računa o veličini čestica npr. čestice koje su suviše male, u ekstraktoru, mogu dovesti do kanalisanja toka natkritičnog fluida. Time, veći deo zapremine fluida ostaje neiskorišćen što dovodi do smanjenja efikasnosti procesa (Ivanović, 2011).

U studiji koju su izveli Riera i sar. (2004) je prezentovana primena ultrazvučnog predtretmana u cilju povećanja prinosa NKE bademovog ulja za 30 %. Primenom ultrazvuka je postignuta bolja penetracija rastvarača u nerazorene biljne ćelije, što je rezultovalo većim prinosom ulja za kraće vreme ekstrakcije.

Stamenić i sar. (2010) su ispitali bubrenje biljnog materijala pod uticajem nkCO<sub>2</sub>, kao i efekta koje bubrenje ima na proces NKE. Ustanovili su, da za pojedine biljne vrste iz porodice *Lamiaceae* predtretman naglom dekompresijom CO<sub>2</sub> ima pozitivan efekat na kinetiku ekstrakcije.

Broj publikacija o primeni mikrotalasa u predtretmanu biljnih sirovina, u cilju intenzifikacije procesa i dobijanja većeg prinosa ulja, se poslednjih godina povećava. Obzirom da se efikasnost konvencionalne ekstrakcije ulja iz semena sa niskim sadržajem masti/ulja ne može zanemariti, korišćenje mikrotalasnog predtretmana omogućava efikasniju primenu konvencionalne ekstrakcije kroz smanjenu potrošnju rastvarača i vreme obrade. Takođe, mikrotalasi omogućavaju brzo i ravnomerno zagrevanje relativno debelih materijala (Uquiche i sar., 2008). Upotreba mikrotalasa pre procesa ekstrakcije predstavlja adekvatan izbor jer ulje na taj način zadržava svoja nutritivna svojstva. Postoji veliki broj studija koje opisuju primenu mikrotalasa neposredno pre procesa ekstrakcije (Tabela 13).

Tabela 13. Literaturni pregled mikrotalasnog predtretmana različitih biljnih materijala

<b>Biljni materijal</b>	<b>Snaga (W)</b>	<b>Vreme (s)</b>	<b>Metoda ekstrakcije</b>	<b>Literatura</b>
Seme nara	720	60	SE	Gaikwad i sar., 2017
Uljana repica	800	120/240	Hladno ceđenje	Azadmard–Damirchi i sar., 2010
Plod palme	800	60/120/180/240	SE	Cheng i sar., 2011
Čileanski lešnik	400/600	120/180/240	Ceđenje	Uquiche i sar., 2008
Seme manga	300/450	70/90/130/180	SE	Momeny i sar., 2012
Seme manga	110/330/550	30/60/90/120/150	SE	Kittiphoom i Sutasinee, 2015
Seme <i>Moringa Oleifera</i>	100/200/400	30/60/90	SE i NKE	Porto i sar., 2016

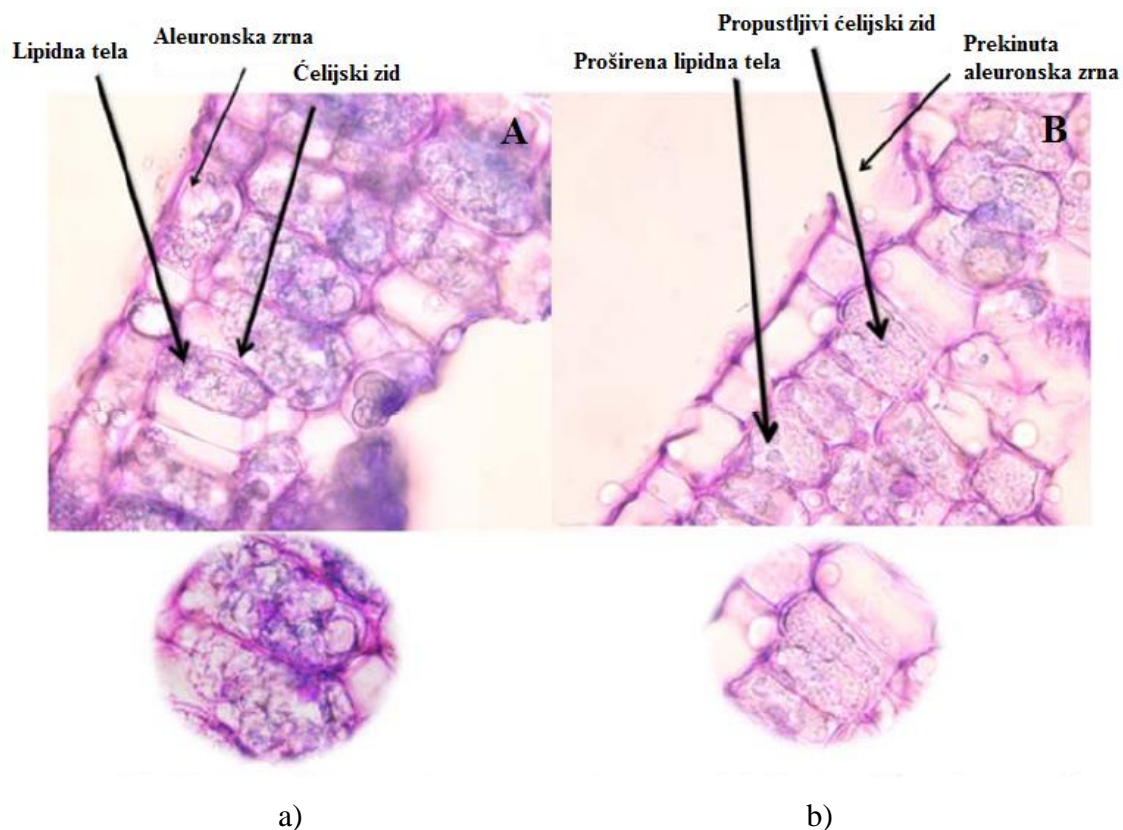
U svim studijama, primećeno je da se upotrebom mikrotalasa za predtretman povećava prinos ulja, skraćuje operativno vreme i povećava ušteda energije. Gaikwad i sar. (2017) su ispitali uticaj snage mikrotalasa, vreme predtretmana, kao i vreme ekstrakcije na prinos ulja iz semena nara. Rezultati su pokazali, da se prinos SE povećava sa povećanjem vremena ekstrakcije. Osim toga, primećeno je da povećanjem snage mikrotalasa, kao i produženjem vremena tretmana, povećava se prinos ekstrahovanog ulja.

Predtretman mikrotalasima može imati brojne pozitivne efekte na proces ekstrakcije iz biljnog materijala, kao što su:

- povećanje prinosa i kvaliteta ekstrakta,
- smanjene potrošnje energije,
- skraćanje procesnog vremena,
- smanjene upotrebe rastvarača (Ramanadhan, 2005).

Upotreba mikrotalasa predstavlja složen proces u kome dolazi do značajnih promena u biljnom materijalu. Energija mikrotalasa u interakciji sa vlagom, čak i iz osušenog biljnog materijala, dovodi do zagrevanja celog biljnog materijala. Vлага usled zagrevanja prelazi u parno stanje i stvara pritisak na ćelijsku membranu. Pritisak gura ćelijsku membranu iznutra, isteže je, a dalje izlaganje biljnih ćelija dejstvu mikrotalasa dovodi do pucanja ćelijske membrane. Razorene ćelije omogućavaju olakšano isticanje ulja, kao i lakše prodiranje rastvarača za ekstrakciju (Uquiche i sar., 2008; Wang i Weller, 2006; Sayyar i sar., 2011; Starmans i Nijhuis, 1996). Dodatno, duže izlaganje dejstvu mikrotalasa dolazi do sušenja biljnog materijala što, u slučajevima kada je generisana temperatura previsoka, može dovesti do uništavanja biljnog materijala (Chow i Ma, 2007; Cheng i sar., 2011).

U studiji koju su izveli Gaikwad i sar. (2017) je ispitan uticaj dejstva mikrotalasa na ćelijsku strukturu semena nara. Na Slici 7 prikazan je poprečni presek semena nara snimljen svetlosnim mikroskopom. Posmatrana je propustljivost ćelijskih zidova i proširenost lipidnih tela nakon mikrotalasnog predtretmana. Slika 7a prikazuje netaknuta aleuronska zrna, ćelijski zid, kao i lipidna tela, koja se nalaze u netretiranom semenu nara. U ovom slučaju, seme nije adekvatno za proces ekstrakcije, jer netaknuti ćelijski zid, kao i aleuronska zrna predstavljaju glavni otpor ekstrakcije (Aguilera i Stanley, 1999).



Slika 7. Seme nara pod svetlosnim mikroskopom: a) kontrolno seme nara; b) tretirano seme nara 720 W 60 s (Izvor: Gaikwad i sar., 2017)

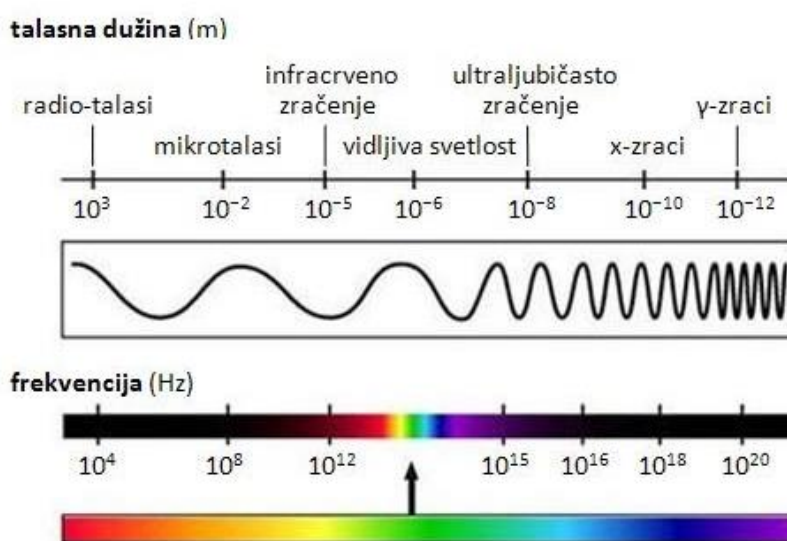
Slika 7b prikazuje strukturu semena nara nakon primene mikrotalasnog zračenja (720 W 60 s). Jasno se uočava da je došlo do modifikacije ćelijskog zida, čime je postignuta veća poroznost. Kao što je prethodno navedeno, predtretman mikrotalasima dovodi do povećanja prinosa ulja iz semena usled povećanja koeficijenta prenosa mase (Azadmard–Damirchi i sar., 2011). Pored toga, pore ćelija postaju propustljive i omogućavaju lakše isticanje ulja kroz propustljive ćelijske zidove (Kittiphoom i Sutasinee, 2015).

### 2.2.3.1. Mikrotalasno zračenje

Mikrotalasi predstavljaju nejonizujuće elektromagnetno zračenje talasne dužine od 1 mm do 1 m. U elektromagnetnom spektru, područje mikrotalasnog zračenja se nalazi između infracrvene i radio–talasne oblasti, što odgovara frekvencionom opsegu od 300 MHz do 300 GHz, dok su odgovarajuće energije  $1,24 \cdot 10^{-6}$  –  $1,24 \cdot 10^{-3}$  eV (Kappe i



Stadler, 2005) (Slika 8). Ove energije su mnogo niže od uobičajenih energija jonizacije bioloških jedinjenja (13,6 eV), energije kovalentnih veza (~4,51 eV), vodoničnih veza (2 eV), Van der Valsovih međumolekulskih sila (manje od 2 eV) čak niže i od energije Braunovog kretanja na 37 °C ( $1,7 \cdot 10^{-3}$  eV) (Hoz i Loupy, 2012). Proizilazi da mikrotalasi spadaju u nejonizujuće zračenje i da ne mogu dovesti do raskidanja veza. Takođe, ne dovode do promene strukture molekula, već samo do njegove rotacije (Pavlović, 2014).

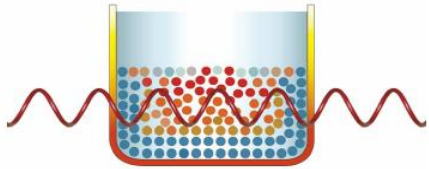
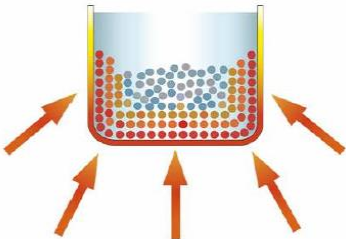


Slika 8. Elektromagnetni spektar

### 2.2.3.1.2. Mikrotalasi nasuprot konvencionalnom zagrevanju

Kod konvencionalnog zagrevanja koristi se plamen, zagrejan vazduh, direktan kontakt sa zagrejanom površinom itd. Toplota koja se isporučuje, prouzrokuje zagrevanje površinskih slojeva i uzastopno zagrevanje po slojevima. Nastaje temperaturni gradijent gde je površina materijala znatno više zagrejana od unutrašnjosti materijala. Nasuprot konvencionalnom zagrevanju, mikrotalasnno zračenje dovodi do efikasnog zagrevanja direktnom interakcijom mikrotalasnne energije sa biljnim materijalom (Kappe i sar., 2006). Bitnije razlike između konvencionalnog zagrevanja i zagrevanja upotrebom mikrotalasa se mogu videti u Tabeli 14.

Tabela 14. Razlika u mikrotalasnom i konvencionalnom zagreivanju (Pavlović, 2014)

ZAGREIVANJE MIKROTALASIMA	KONVENCIONALNO ZAGREIVANJE
Direktno unutrašnje zagreivanje	Zagreivanje kondukcijom/konvekcijom
	
Ceo materijal se zagreiva istovremeno	Površinsko zagreivanje
Brzo	Sporo
Polarne supstance selektivno apsorbuju radijaciju	Nije selektivno

I pored intenzivnog izučavanja, uticaj i mehanizam delovanja mikrotalasa i dalje nije u potpunosti razjašnjen. Može se objasniti toplotom koja nastaje tokom izlaganja materijala dejstvu mikrotalasa. Naime, u molekulu se javljaju rotacione sile koje dovode do trenja i zagreivanja materijala. Polarni molekuli apsorbuju energiju mikrotalasa i orijentišu se u pravcu oscilovanja električnog polja mikrotalasa. Promenom orijentacije molekula nastaje toplota usled raskidanja molekula i vodoničnih veza (Stanisavljev, 2009).

Prilikom mikrotalasnog zagreivanja, zagreivanje se odvija celom zapreminom biljnog materijala dok temperatura tretiranog materijala naglo raste. Glavne prednosti korišćenja mikrotalasnog zagreivanja su ušteda vremena i energije (Milovanović i sar., 2004).

#### 2.2.3.1.3. Uticaj mikrotalasnog zagreivanja na biljke

Interesovanje o primeni elektromagnetnog zračenja na biološke materijale datira sa kraja 19. veka, dok je interesovanje o primeni visokofrekventnih talasa na biljne materijale počelo 1920. godine (Ark i Parry, 1940). U mnogim slučajevima, kratka

izloženost semena biljaka radio–frekvenciji i mikrotalasnom zračenju dovodi do povećanja klijavosti i otpornosti nastalih sadnica (Tran, 1979; Tran, 1979a); međutim, dugotrajna izloženost obično rezultira „smrću” semena (Bebawi i sar., 2007).

Davis i sar. (1971; 1973) su među prvima proučavali efekat mikrotalasnog zagrevanja na seme. Tretiranjem semena u mikrotalasnoj pećnici pokazali su da je na oštećenje semena najviše uticala kombinacija sadržaja vlage semena i apsorbovane energije po semenu. Drugi nalazi sugerišu da su i specifična masa i specifična zapremina semena povezani sa „smrtnošću” semena (Davis i sar., 1973). Ovo bi se moglo objasniti „površinom radarskog preseka” (eng. *radar cross–section*) (Wolf i sar., 1993). Naime, mnoga semena imaju geometriju elipsoida ili čak sfere, tako da su mikrotalasni zraci usmereni ka jezgru semena što rezultira višim temperatura u središtu semena i veće stope „smrtnosti”. Semena, čija geometrija približno odgovara cilindru, takođe će usmeriti više energije ka svom jezgru naročito kako se povećava dimenzija semena. Barker i Craker (1991) su ispitali uticaj mikrotalasnog zagrevanja u zemljištima sa različitim sadržajem vlage (10–280 g vode/kg suvog zemljišta) kako bi uništili seme „Ogle“ ovasa (*Avena sativa*) i neodređeni broj prirodnih semena korova prisutnih u zemljištu. Rezultati su pokazali da osetljivost semena zavisi od temperature mikrotalasnog zagrevanja. Kada je temperatura zemljišta porasla na 75 °C, došlo je do smanjenja klijavosti u semenu ovasa i semenu korova. Kada je temperatura zemljišta porasla iznad 80 °C, klijavost semena u svim vrstama potpuno je inhibirana.

### **2.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST SEMENA NARA**

U naučnoj literaturi se može veliki broj podataka o biološkoj aktivnosti ulja semena nara:

- Ulje nara ispoljava antioksidativnu aktivnost, kao i svojstvo inhibicije eikozanoidnog enzima (Qu i sar., 2010),
- Pozitivno utiče na imunološku funkciju i metabolizam lipida (Yamasaki i sar., 2006),
- Sadrži visok procenat estrogena (Tong i sar., 2006),
- Inhibira fotostarenje kože (Park i sar., 2010),

- Deluje na lipoperoksidaciju i aktivnost antioksidativnih enzima (Melo i sar., 2010),
- Ispoljava zaštitni efekat protiv nefrotoksičnosti izazvane oksidativnim oštećenjem kao posledica upotrebe gentamicina (Asadpour i sar., 2010),
- Usled prisustva konjugovanih masnih kiselina, učestvuje u normalizovanju metabolizma masti kod gojaznih pacijenata (Mirmiran i sar., 2010),
- Ima ulogu u smanjenju masnog tkiva (McFarlin i sar., 2009).

### **2.3.1. Antioksidativna aktivnost**

Antioksidansi su supstance koje inhibiraju oksidaciju drugih molekula (hemijsku reakciju proizvodnje slobodnih radikala) (Halliwell i Gutteridge, 1989; Halliwell 1995; Jacob, 1995). Prekomerna proizvodnja slobodnih radikala dovodi do mnogih patoloških promena u ljudskom organizmu, kao što su oštećenje ćelijske membrane i razaranje DNK. Osim toga, imaju važnu ulogu u nastanku alergija, upalnih procesa creva (kao što je ulcerozni kolitis i Kronova bolest), kao i u nastanku bolesti tumora srca i pluća. Slaba fizička aktivnost, stres i infekcije drastično povećavaju proizvodnju slobodnih radikala (Moller i sar., 1996). Brojna istraživanja su dokazala da ukoliko ne bi postojali antioksidansi, slobodni radikali bi uništili naš organizam u samo jednom danu.

#### **2.3.1.1. Klasifikacija antioksidanasa**

Antioksidansi mogu se klasifikovati kao prirodni i sintetski (Shahidi i Zhong, 2010). Od prirodnih antioksidanasa u ulju semena nara mogu se izolovati vitamini (vitamin E) i karotenoidi (karoteni).

##### **2.3.1.1.1. Vitamin E**

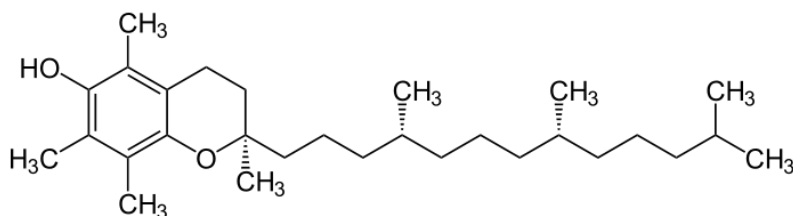
Termin vitamin E se odnosi na grupu hemijskih jedinjenja (tokoferoli i tokotrienoli). Vitamin E (Slika 9) je prihvaćen kao primarni antioksidans koji se rastvara u lipidima. Deluje putem dva osnovna mehanizma:

- 1) mehanizam prekidanja lanca elektron–donora (CB–D) i
- 2) mehanizam prekidanja lanca elektron–akceptora (CB–A).

Antioksidativna aktivnost  $\alpha$ -tokoferola zavisi od uslova njegovog skladištenja i temperaturnog tretmana (Thoo i sar., 2013; Pascual i sar., 2013), kao i od njegovog porekla (Beltrán i sar., 2010).

Tokoferoli i tokotrienoli su prirodni antioksidansi, rastvorljivi u mastima i predstavljaju esencijalne vitamine grupe E čija je primarna uloga u zaštiti masnih kiselina, lipoproteina i drugih komponenata ćelijske membrane od oksidacije. Mogu se klasifikovati u dve grupe:

- 1) Tokoferoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - tokoferol) i
- 2) Tokotrienoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - tokotrienoli).



Slika 9. Hemijska struktura vitamina E

Najvažnije i fiziološki najaktivnije jedinjenje grupe vitamina E je  $\alpha$ -tokoferol.  $\alpha$ -tokoferol predstavlja donore vodonika u reakciji sa lipidnim peroksil radikalom (LOO<sup>•</sup>). Nastali radikal je stabilizovan usled delokalizacije elektrona preko aromatičnog prstena. Radikal gradi  $\alpha$ -tokoferol-peroksid koji može preći u  $\alpha$ -tokohinon ili tokoferol dimer.

Nedovoljan unos vitamina E kod ljudi izaziva niz nepoželjnih neuromuskularnih promena kao npr. bolesti perifernih nerava, bolesti motornih neurona itd. Ono što je veoma važno, jeste da se višak  $\alpha$ -tokoferola izlučuje preko urina.

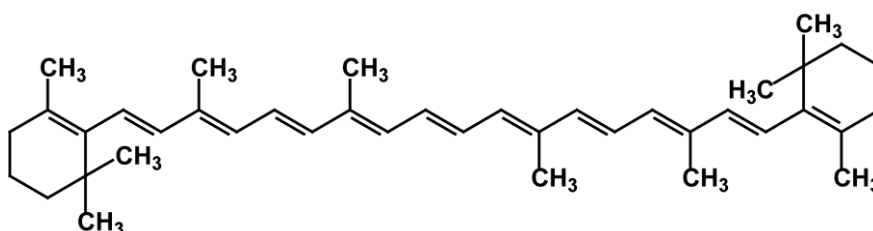
Brojna istraživanja su pokazala da  $\gamma$ -tokoferol, pored antioksidativne aktivnosti, ima važnu ulogu u organizmu: štiti ćeliju od starenja i nastanka tumora, učestvuje u stvaranju reproduktivnih ćelija i olakšava funkcionisanje nervnog sistema (Brigelius-Flohe i Traber, 1999). Evropska agencija za bezbednost hrane (eng. *The European Food Safety Authority – EFSA*) (EFSA, 2013) preporučuje unos vitamina E od 8 do 25 mg/dan, u zavisnosti od uzrasta.

### 2.3.1.1.2. Karotenoidi

Najmanje 60 karotenoida se javlja u voću i povrću koje je zastupljeno u ljudskoj ishrani. Glavni karotenoidi prisutni u dnevnoj ishrani su:  $\alpha$ - i  $\beta$ - karoten, likopen i hidroksi karotenoidi (ksantofil–zeaksantin i lutein). Obzirom na to da organizam sam ne može da sintetiše karotenoide, potrebno ih je unositi putem hrane. Karotenoidi su važni, ne samo zbog aktivnosti provitamina A, već imaju niz aktivnosti u biološkom sistemu. Tokoferoli, karotenoidi i ksantofili su efikasni u eliminisanju  $^1\text{O}_2$  (eng. „*singlet oxygen*”) (Nowicka i Kruk, 2012; Ramel i sar., 2012) i kao sakupljači slobodnih radikala (Böhm i sar., 2012). Takođe, u prisustvu hlorofila sprečavaju fotooksidaciju ulja. Tokom fotooksidacije, molekul ozona se pretvara u reaktivni singlet kiseonik. Nastali reaktivni singlet kiseonik ima veću moć oksidacije dvostrukih veza lipida od ozona. Karotenoidi pretvaraju reaktivni singlet kiseonik u njegov ozonski oblik, koji je mnogo manje aktivan (Pokorny i Parakanyiova, 2005). Osim toga, istraživanja su pokazala da karotenoidi imaju ulogu u prevenciji nastanka tumora pluća, debelog creva, materice, dojke i prostate. Imaju pozitivno dejstvo na imunološki sistem i štite kožu od UV zračenja.

### 2.3.1.1.3. $\beta$ – karoten

$\beta$  – karoten (Slika 10) je provitamin vitamina A koji se rastvara u mastima i sastoji se od dve retinil grupe (Condrón i sar., 2014; Weber i Grune, 2012). Predstavlja jedan od najjačih antioksidanasa, koji je u stanju da eliminiše singlet kiseonik i inhibira lipidnu oksidaciju (Samaniego–Sánchez i sar., 2010). Budući da je snažan antioksidans, štiti timus (grudna žlezda koja ima važnu ulogu u sazrevanju T limfocita i razvoju imunološke tolerancije) i stimuliše delovanje interferona. Preporučeni dnevni unos vitamina A je od 700 do 900  $\mu\text{g}$  (Mandić, 2007).

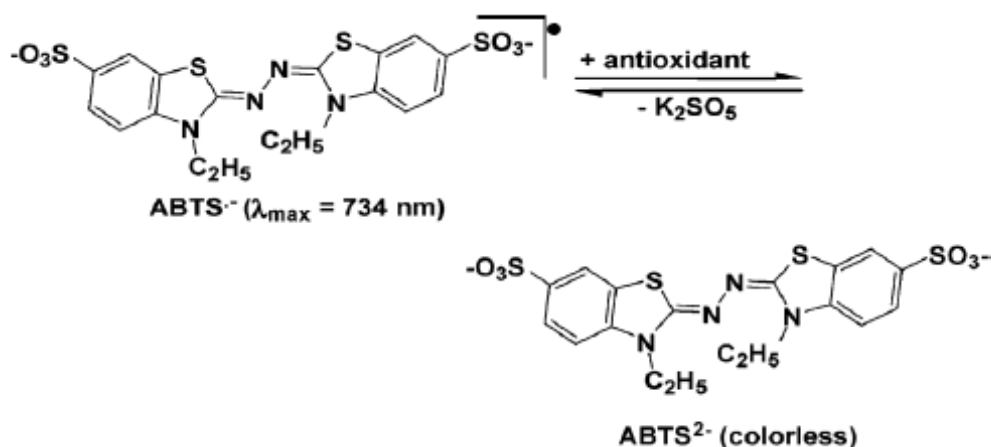


Slika 10. Hemijska struktura  $\beta$ -karotena

### 2.3.1.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti ulja semena nara

Antioksidativni kapacitet (AK) je povezan sa koncentracijom komponenata u uzorku koje su sposobne da zaštite biološki sistem od štetnih efekata procesa ili reakcija koje uključuju reaktivni kiseonik ili azot (ROS ili RNS) (MacDonald–Wicks i sar., 2006).

Sposobnost vezivanja radikala (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity – TEAC*) je metoda koja se temelji na reakciji prenosa jednog elektrona i koristi se za određivanje AK raznih prehrambenih proizvoda. Uključuje stvaranje radikala 2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfat) radikal-katjona ( $ABTS^{\bullet+}$ ) (Slika 11) koji ima apsorpcione maksimume na talasnim dužinama  $\lambda=414$  nm,  $\lambda=645$  nm,  $\lambda=734$  nm i  $\lambda=815$  nm.



Slika 11. Mehanizam delovanja  $ABTS^{\bullet+}$

Za određivanje  $ABTS^{\bullet+}$  mogu se koristiti različite metode (Re, 1999). Može se odrediti reakcijom u kojoj se obično koristi mangan(IV)-oksid ili kalijum-persulfat ( $K_2S_2O_8$ ) u cilju oksidacije ABTS radikala u radikal katjon  $ABTS^{\bullet+}$ . Određivanje se vrši na talasnoj dužini od  $\lambda=734$  nm, a vreme trajanja reakcije je od 1 do 30 minuta. Dobijeni rezultati su predstavljeni kao Troloks ekvivalenti.

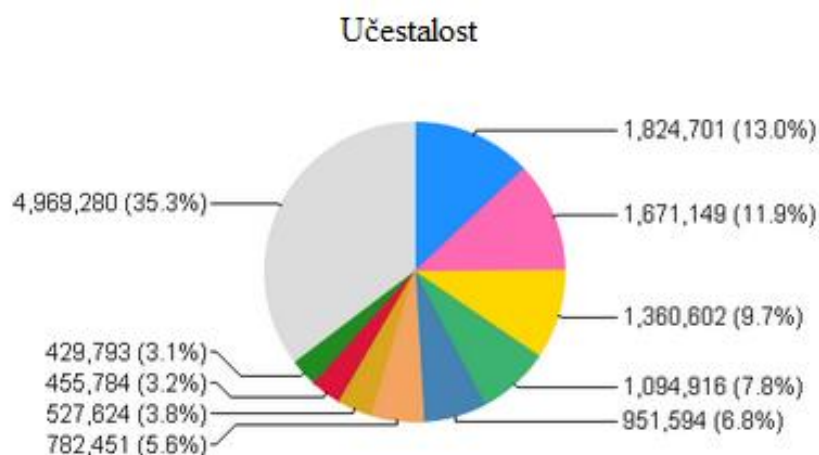
Prednosti TEAC metode je što se ABTS rastvara i u vodi i u organskim rastvaračima, pa se test može koristiti za određivanje hidrofилnih i lipofilnih antioksidanata. Takođe, test je jednostavan i omogućava testiranje u širokom rasponu pH, iako se najčešće koristi pH 7,4 (Ozgen i sar., 2006). Nedostaci TEAC testa je činjenica da test određuje reaktivnost samo prema ABTS radikal-katjonu, a ne inhibiciju

oksidativnog procesa. Neki autori navode i činjenicu da se radikal–katjon ABTS, koji se koristi kao oksidans u TEAC testu, ne pojavljuje u biološkim sistemima i da po svojoj strukturi i reaktivnosti nije sličan radikalima koji se tamo nalaze (MacDonald–Wicks i sar., 2006).

### 2.3.2. Citotoksična aktivnost

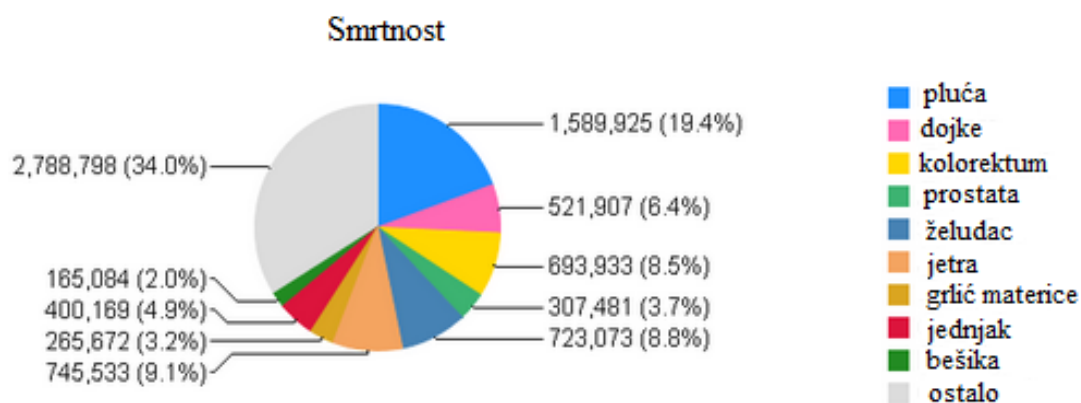
Pod malignim oboljenjem (rak, kancer ili tumor) podrazumeva se bolest koju karakteriše nekontrolisana deoba ćelija uzrokovana mutacijama jedarne DNK (Hajdu, 2011). Postoji stotine različitih vrsta tumora, koje su ime dobile po tkivu ili organu ili tipu ćelije u kojoj nastaju (Becker i sar., 2009). Pored toga, postoji nekoliko miliona predtumorskih ćelija (koji imaju izmenjen genetski materijal), za koje ljudski organizam ima urođene mehanizme prepoznavanja i izolovanja (Hanahan i Weinberg, 2000).

Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization – WHO*) je predvidela da će do 2020. godine broj novih obolelih od tumora dostići 17 miliona (Tavakoli i sar., 2012). Prema podacima WHO u 2012. godini je umrlo 8,2 miliona ljudi od različitih tipova tumora (Slika 12) (GLOBOCAN, 2012).



a)





b)

Slika 12. a) učestalost i b) smrtnost različitih tipova tumora za oba pola u svetu (Izvor: GLOBOCAN, 2012)

Najčešće metode lečenja tumora su hirurgija, radioterapija i hemoterapija (Yang i sar., 2012). Međutim, poslednjih godina sve više su u upotrebi hemopreventivni biljni lekovi. Hemoprevenirica se smatra tretmanom budućnosti u terapiji tumora i podrazumeva primenu prirodnih ili sintetičkih kompleksa u cilju smanjenja rizika od nastanka tumora. Hemopreventivni potencijal zasniva se na selektivnom citotoksičnom dejstvu na maligne ćelije sa niskim toksičnim dejstvom na zdrave ćelije. Značajni prirodni hemopreventivni kompleksi jesu sekundarni metaboliti biljaka, zatim polusintetički derivati sekundarnih metabolita biljaka, kao i jedinjenja koja su dobijena na osnovu strukture izvornog biljnog jedinjenja (taksani, vinka alkaloidi, itd).

U svojoj studiji Hartwell (1982) pominje preko 3000 različitih biljaka, kao izvor prirodnih jedinjenja ili njihovih derivata sa antitumornim delovanjem. Među proučavanim biljnim vrstama izdvajaju se: beli luk, aloja, bela imela, zeleni čaj, žen-šen, mačkov brk, kantarion, neven, rastavić, kopriva, mečja šapa, pacifička tisa i dr. Značajne grupe jedinjenja koja imaju ulogu u hemoprevenirici raka su: fenolna jedinjenja, vitamini, karotenoidi, alkaloidi, organosumporna jedinjenja, jedinjenja koja sadrže selen i masne kiseline (Hartwell, 1982).

Specifična masna kiselina koja je pronađena u ulju semena nara, sa hemopreventivnim dejstvom, naziva se punicinska kiselina. Lansky i sar. (2005) su proučavali inhibitorne efekte punicinske kiseline na PC-3 ćelije (eng. *human prostate*

*cancer cell lines*) i proliferaciju DU 145 ćelija i pokazali da punicinska kiselina značajno inhibira invaziju i proliferaciju ćelija tumora prostate. Takođe, dokazano je da punicinska kiselina inhibira proliferaciju tumora dojke u ćelijskim linijama koje su osjetljive i neosetljive na estrogen (Grossmann i sar., 2010).

# **3. EKSPERIMENTALNI DEO**

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je realizovan na Katedri za organsku hemijsku tehnologiju, Tehnološko–metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (Republika Srbija). Deo istraživanja je urađen na Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” (Republika Srbija), Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (Republika Srbija), kao i na Institutu za nutricionizam, Univerziteta Fridrih Šiler u Jeni (Savezna Republika Nemačka).

### 3.1. MATERIJALI

Plodovi divljeg nara (*Punica granatum* L.) su sakupljeni u periodu pune zrelosti, od septembra do novembra, tokom 2014. godine, sa plantaže koja se nalazi u selu Do u blizini grada Trebinja (Bosna i Hercegovina). Nadmorska visina ovog područja iznosi 498 m, na koordinatama 43.086° severne geografske širine i 18.140° istočne geografske dužine. Klimatski uslovi, koji karakterišu ovu oblast su mediteranskog tipa, sa kratkim blagim zimama i dugim toplim letima. Prosečna minimalna temperatura na plantaži iznosi 8,3 °C dok je prosečna maksimalna 26,5 °C. Godišnje količine padavina u proseku iznose 1624 mm. Seme divljeg nara je sakupljeno nakon proizvodnje soka.

#### 3.1.1. Hemikalije i reagensi

Hemikalije i reagensi upotrebljeni u eksperimentalnom radu su:

- komercijalni ugljenik(IV)–oksid (čistoće 99 %) Messer–Tehnogas, Republika Srbija;
- heksan (> 95 %) Sigma–Aldrich, Savezna Republika Nemačka;
- voda (HPLC čistoće, 18 MΩ, dobijena je iz Milli–Q sistema za prečišćavanje) Millipore GmbH, Schwalbach, Savezna Republika Nemačka;
- MTBE (metil–*terc*–butil–etar), Sauerbrey, Reinhardshagen, Savezna Republika Nemačka;
- svi tokoferoli, Calbiochem, Darmstadt, Savezna Republika Nemačka;
- svi tokotrienoli, Davos Life Science, Republika Singapur;
- karotenoidi (97–99 % analitičkog stepena čistoće), CaroNature, Ostermundigen, Švajcarska Konfederacija;

- 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), diamonijum so (ABTS), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Savezna Republika Nemačka;
- sve ćelijske linije su nabavljene od ustanove American Type Culture Collection, Manasas, VA, Sjedinjene Američke Države;
- reagensi za održavanje ćelijskih kultura su nabavljeni od Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, Sjedinjene Američke Države;
- antibiotici koji se dodaju u medijum su proizvodi kompanije Galenika A.D., Beograd, Republika Srbija.

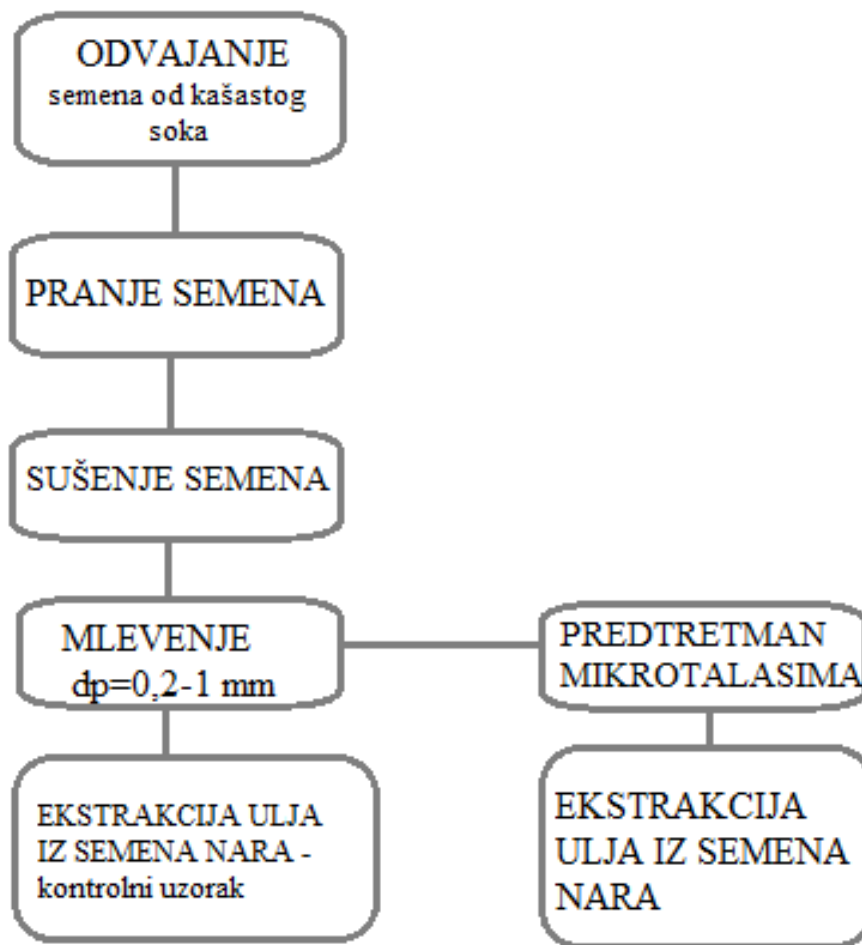
Ostale hemikalije i reagensi korišćeni u eksperimentalnom radu bili su stepena analitičke čistoće, Carlo Erba Reagents, Francuska Republika.

### **3.2. METODE**

Dobijanje ulja iz semena divljeg nara obuhvata tri osnovne faze:

1. Priprema semena za ekstrakciju ulja;
2. Predtretman semena mikrotalasima
3. Proces ekstrakcije:
  - a) ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet-u (SE)
  - b) natkritična ekstrakcija (NKE)

Na Slici 13 je data blok šema tehnološkog procesa proizvodnje ulja semena divljeg nara.



Slika 13. Šema i tok aktivnosti eksperimentalnog plana ekstrakcije ulja iz semena divljeg nara

### 3.2.1. Priprema semena za ekstrakciju ulja

#### 3.2.1.1. Čišćenje semena

Seme divljeg nara predstavlja otpad u procesu proizvodnje soka zbog čega sadrži određenu količinu nečistoća. Nečistoće mogu biti neorganskog i organskog porekla (preko 90 %). Organske nečistoće su uglavnom šećeri, adhezivni materijali, kao i osušeni delovi kore i pulpe, dok neorganske nečistoće potiču od zemlje, peska, prašine, vreća za transport. Proces čišćenja predstavlja uklanjanje svih organskih i neorganskih nečistoća iz biljnog materijala. Takođe, izdvajanje nečistoća doprinosi boljem kvalitetu dobijenog ulja.

Proces čišćenja započinje pažljivim pranjem semena destilovanom vodom i ručnim otklanjanjem pulpe sa semena kako bi se uklonili šećeri i ostali adhezivni materijali. Seme se, zatim, suši na temperaturi od 40 °C, nekoliko dana (4–6). Tako pripremljeno seme je spakovano u višeslojne papirne kese i ostavljeno u suvoj prostoriji na tamnom mestu do upotrebe.

Sadržaj vlage u očišćenom semenu divljeg nara je određen sušenjem semena u sušnici (MNOSZ 125, Labor, Mađarska) na temperaturi od  $105 \pm 1$  °C do konstantne mase. Količina vlage, koja je prisutna u semenu, je utvrđena gravimetrijski iz razlike mase semena pre i posle sušenja.

### **3.2.1.2. Mlevenje semena**

Kako bi tretman mikrotalasima, kao i proces ekstrakcije bio što efikasniji, osušeno seme je usitnjeno mlevenjem. U te svrhe upotrebljen je blender (MMB1000/05, Bosch, Savezna Republika Nemačka). Usitnjeni biljni materijal je prosejan kroz sistem sita sa okruglim otvorima. Za eksperimente upotrebljen je biljni materijal prečnika čestica u rasponu od 0,2 do 1 mm.

### **3.2.2. Mikrotalasni predtretman**

Nakon mlevenja i prosejavanja, seme je ravnomerno raspoređeno u tankom sloju (~3 mm) u Petri šolji prečnika 9 cm. Pre procesa ekstrakcije u aparaturi po Soxhlet-u (SE) 20 g biljnog materijala je tretirano mikrotalasima, dok je pre procesa natkritične ekstrakcije (NKE) 10 g biljnog materijala tretirano mikrotalasima. Petri šolja sa semenom je postavljena na sredinu rotacione ploče mikrotalasne pećnice sa inverter tehnologijom (NN-GD469M, Panasonic, Japan) zapremine 27 L ( $P_{\max}=1200$  W). Petri šolja sa biljnim materijalom rotira unutar pećnice tokom dejstva mikrotalasa nepromenjive snage. Operativni uslovi predtretmana mikrotalasima su dati u Tabeli 15.

Tabela 15. Operativni uslovi predtretmana mikrotalasima

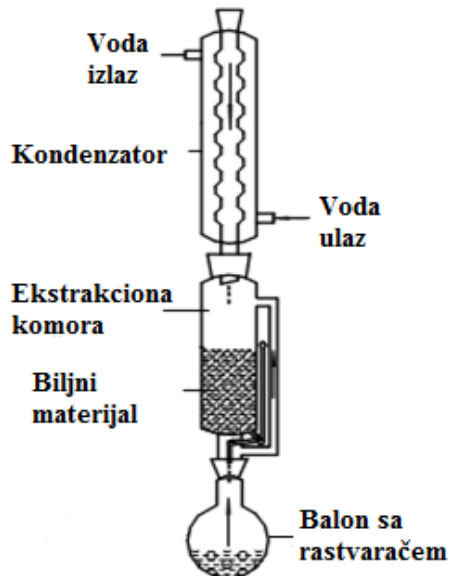
<b>Br.</b>	<b>Vreme (min)</b>	<b>Snaga (W)</b>
I	2	100
II	6	100
III	2	250
IV	2	250
V	2	600
VI	6	600

### **3.2.3. Ekstrakcija ulja iz semena divljeg nara**

#### **3.2.3.1. Ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet-u**

Za dobijanje ulja iz semena divljeg nara ekstrakcijom u aparaturi po Soxhlet-u (SE) (Slika 14) upotrebljen je heksan. Samleveno seme divljeg nara (20 g) je odmah nakon predtretmana mikrotalasima spakovano u vrećicu napravljenu od filter papira i ubačeno u komoru za ekstrakciju Soksletovog ekstraktora. Soksletov ekstraktor je zatim postavljen na balon u koji je prethodno dodato 250 mL heksana, a na vrhu ekstraktora je postavljen kondenzator. Rastvarač se zagreva pomoću električne obloge do temperature ključanja (69 °C). Tokom ključanja, para heksana se penje uz destilacionu cev i ulazi u komoru za ekstrakciju i kondenzator, koji dodatno hladi paru. Kondenzovan heksan natapa seme nara.





Slika 14. Aparatura po Soxhlet-u

Komora za ekstrakciju, u kojoj se nalazi seme divljeg nara, puni se prethodno zagrejanim heksanom koji rastvara bioaktivne komponente. Kada se ekstrakciona komora napuni, počinje da se prazni preko grane, koja je povezana sa destilacionom komorom, pri čemu se heksan sa rastvorenim ekstraktom vraća u destilacioni balon. Proces ekstrakcije je trajao 8 h.

Nakon ekstrakcije, heksan je odvojen od ekstrakta uparavanjem pomoću rotacionog vakum uparivača (Laboact SEM 842, KNF, Ujedinjeno Kraljevstvo) na 30 °C pod sniženim pritiskom. Ekstrakt je sakupljen u staklenu bočicu i odložen u frižider do dalje analize.

Radi određivanja uticaja dejstva mikrotalasa na prinos i sastav ekstrakta, na prethodno opisan način je izveden i eksperiment u kome je ekstrahovan biljni materijal koji nije tretiran mikrotalasima (kontrolni uzorak).

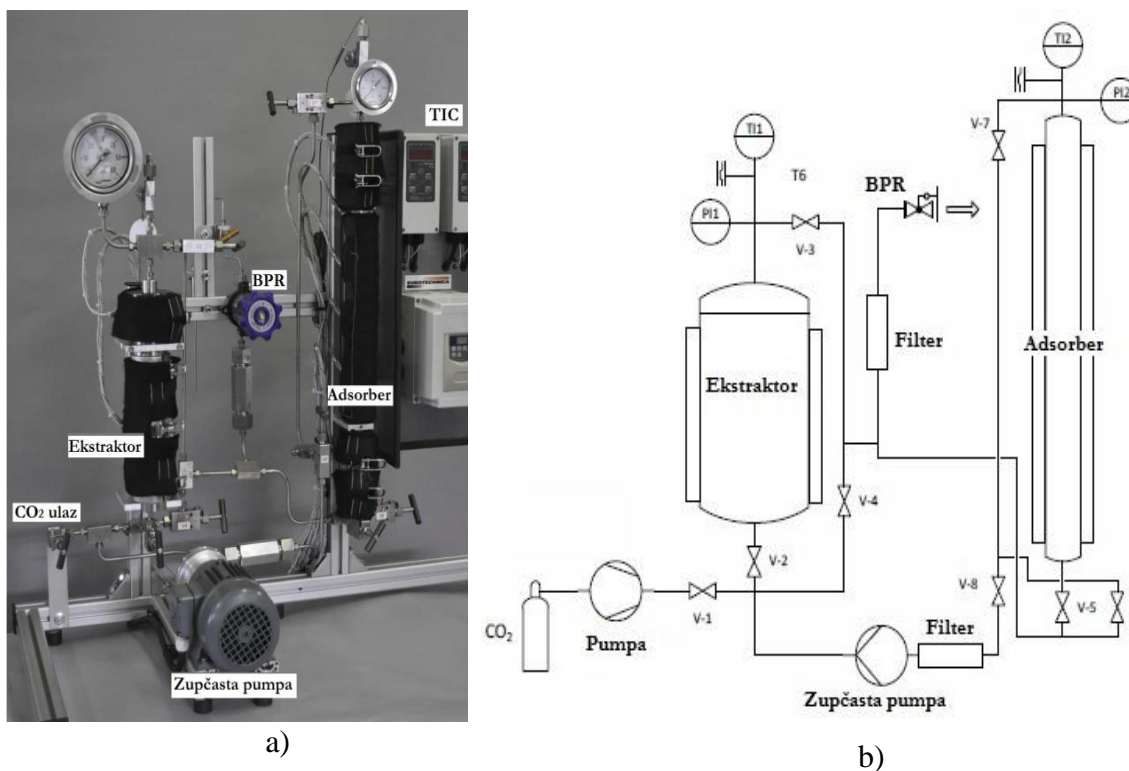
Nakon uparavanja heksana, meri se masa ekstrakta i računa prinos ekstrakcije pomoću jednačine (1).

$$Y(\%, w / w) = \frac{m_e}{m_{bm}} \cdot 100 \quad (1)$$

pri čemu je  $m_e$ –masa izdvojenog ekstrakta, a  $m_{bm}$ –masa biljne sirovine pre ekstrakcije.

### 3.2.3.2. Natkritična ekstrakcija

Ekstrakcija natkritičnim ugljenik(IV)–oksidom ( $\text{nkCO}_2$ ) je izvedena u laboratorijskom postrojenju HPEA (Eurotechnica GmbH, Savezna Republika Nemačka), prikazano na Slici 15. Postrojenje je projektovano za laboratorijski rad sa  $\text{nkCO}_2$  ( $P_{\text{max}}=50 \text{ MPa}$  i  $T_{\text{max}}=100 \text{ °C}$ ). HPEA se sastoji od ekstraktora unutrašnje zapremine 280 mL (širine 38 mm i dužine 254 mm), adsorbera unutrašnje zapremine 100 mL (širine 17 mm i dužine 500 mm) i zupčaste pumpe za cirkulaciju  $\text{nkCO}_2$  (P1). Tečni ugljenik(IV)–oksid ( $\text{CO}_2$ ), koji se nalazi u boci sa sifonom, prvo se hladi u kriostatu pre ulaska u pumpu (Milton Roy, Francuska Republika). Tokom kontinualne ekstrakcije, regulator pritiska (BPR) održava pritisak sistema konstantnim sa oscilacijama  $\pm 0,5 \text{ MPa}$ .



Slika 15. Postrojenje HPEA 500: a) slika postrojenja i b) šema postrojenja

Seme opranog i osušenog divljeg nara, nakon čišćenja, mlevenja i mikrotalasnog tretmana, mase  $10 \pm 0,1 \text{ g}$  je spakovano u filter kesice i smešteno u ekstraktor. Sud je zatvoren i nakon dostizanja željene temperature,  $\text{CO}_2$  je uveden u sistem i komprimovan otvaranjem ventila V1 i V2. Po dostizanju željenog pritiska, otvoren je ventil V3 i BPR

čime je omogućen kontinualni izlaz  $\text{nkCO}_2$  iz sistema sa masnim uljem. Masno ulje se sakuplja u separatoru.

U toku NKE merena je masa izdvojenog masnog ulja i računat maseni prinos po jednačini (1). Masa ekstrakta je merena nakon utroška određene količine  $\text{CO}_2$  (50 do 100 g) sukcesivno tokom ekstrakcije koji je trajao do 15 h. Proces ekstrakcije trajao je do iscrpljenja biljnog materijala tj. sve dok se ekstrakciona kriva, koja pokazuje zavisnost prinosa ekstrakta od specifične potrošnje  $\text{nkCO}_2$ , ne zaustavi rast na grafikonu. Tokom procesa ekstrakcije maseni protok  $\text{nkCO}_2$  tokom celog procesa ekstrakcije je bio konstantan i iznosio je 0,3 kg/h. Dobijeno masno ulje je prikupljeno u bočice i ostavljeno u frižider na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  do dalje analize.

Radi određivanja uticaja dejstva mikrotalasa na prinos i sastav ekstrakta, na prethodno opisan način je izveden i eksperiment u kome je ekstrahovan biljni materijal koji nije tretiran mikrotalasima (kontrolni uzorak).

Za ovaj eksperimentalni set izabrane su vrednosti pritiska od 37,9 MPa i temperature od  $47\text{ }^\circ\text{C}$ . Kao referenca za izbor navedenih vrednosti pritiska i temperature poslužio je rad Liu i sar. (2009) u kome je pokazano da upravo ovi uslovi omogućavaju zadovoljavajuću rastvorljivost masnih ulja u natkritičnom fluidu i da su optimalni za ekstrakciju masnih ulja pomoću  $\text{nkCO}_2$ .

### **3.3. HEMIJSKA ANALIZA MASNOG ULJA SEMENA DIVLJEG NARA**

Ispitivanje hemijskog sastava masnog ulja semena divljeg nara izvedeno je primenom gasne hromatografije uz plameno–jonizujuću detekciju (GC/FID) i kombinacijom gasne hromatografije i masene spektrometrije (GC/MS).

#### **3.3.1. Derivatizacija masnog ulja semena divljeg nara**

U slučaju analize nezasićenih masnih kiselina semena divljeg nara, izvedeno je metilovanje estara nezasićenih masnih kiselina kako bi se izvršila njihova kvalitativna i kvantitativna analiza u ekstraktima dobijenim procesima SE i NKE. Hidroliza uzorka je izvedena po metodi AOAC (AOAC, 1965).

Priprema uzorka po metodi AOAC je primenjena dodavanjem 2 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u 125 mL apsolutnog metanola (rastvor 1). Uzorci se odmeravaju (1 g) i rastvaraju u 60 mL rastvora 1. Derivatizacija se vrši zagrevanjem 2,5 h od momenta ključanja. Nakon završenog refluktovanja, rastvor se hladi i u separatoru dekantuje dodavanjem destilovane vode, sve dok kisela reakcija ne izostane. Nakon toga dodaje se 100 mL heksana, i zatim se sloj heksana odvaja i suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rastvarač se uparava na vodenom kupatilu a dobijeni ekstrakti odmeravaju i rastvaraju u heksanu. Tako pripremljeni rastvori se čuvaju u frižideru na –5 °C do kvalitativne i kvantitativne analize.

### **3.3.2. Priprema uzorka za hemijsku analizu**

Uzorci za analizu na gasno–masenoj spektrometriji pripremljeni su odmeravanjem 1 g ulja i njihovim rastvaranjem u rastvoru 1 (smeša sumporne kiseline u metanolu).

### **3.3.3. Identifikacija metil–estara masnih kiselina GC/FID analizom**

Gasnohromatografska analiza (GC/FID) uzoraka metil–estara nezasićenih masnih kiselina koje su izolovane iz semena divljeg nara, rađena je na Agilent Technologies, model 7890A gasnom hromatografu, opremljenom split–less injektorom i autosemplerom (ALS), povezanim sa HP–5MS kolonom (30 m x 0,25 mm, debljine filma 0,25 µl) i plameno–jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 mL/min), temperatura injektora iznosila je 250 °C, a detektora 300 °C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40–260 °C (program 4 °C/min), a potom držana konstantnom na 260 °C u toku 15 min. Rastvori ispitivanih uzoraka u heksanu (15 µl/mL) su jedan za drugim injektirani uz pomoć ALS (2 µl, korišćen je split režim od 1:30). Za kvantifikacione svrhe procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC/FID) uzeti su kao osnova.

### **3.3.4. Identifikacija metil–estara masnih kiselina GC/MS analizom**

Isti analitički uslovi korišćeni su i za potrebe GC/MS analize rađene na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu (Hewlett–Packard, Palo Alto, CA, Sjedinjene

Američke Države). Umesto vodonika, kao noseći gas korišćen je helijum. Sistem je radio na temperaturi od 260 °C. Maseni spektri snimani su u EI obliku (70 eV), u m/z opsegu 40–450. Rastvori uzorka ulja su injektovani su uz pomoć ALS (2 µl, korišćen je split režim od 1:30). Komponente masnog ulja identifikovane su poređenjem njihovih spektara sa literaturnim iz baza podataka Wiley 275 i NIST/NBS biblioteke. Eksperimentalne vrednosti retencionih (Kovačevih) indeksa određivane su upotrebom AMDIS ver. 2.1 softvera i poređene sa literaturnim iz Adams baze podataka (Adams, 2007).

### **3.4. HPLC ANALIZA SASTAVA I SADRŽAJA KAROTENOIDA U ULJU SEMENA DIVLJEG NARA**

Masno ulje semena divljeg nara 100 µL je rastvoreno u 1 mL smeše metanola/THF-a i analizirano pomoću reverzne faze C30–Develosil RPAQUEOUS (Phenomenex, Aschaffenburg, Savezna Republika Nemačka) u analitičkoj koloni (unutrašnje dimenzije 250 x 4 mm, 5 µm veličina čestice). Tokom analize, temperatura kolone je održavana na 13±1 °C. Mobilna faza se sastoji od rastvarača A (metanol) i rastvarača B (metil-*terc*-butil-etar). Frakcije su odvojene korišćenjem gradijenta elucije prema sledećoj šemi: 10–50 % B 0–40 min; 50–60 % B 40–42 min; 60–50 % B 42–65 min; 50–10 % B 65–70 min; 10–10 % B 70–75 min. Protok je podešen na 1 mL/min, a detekcija talasne dužine postavljena je na 450 nm. Kvantifikacija karotenoida je sprovedena na osnovu poređenja oblasti pikova sa onim koji su dobijeni za spoljne standarde sa definisanim koncentracijama. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta. Dobijeni rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija u mg/100 g.

### **3.5. HPLC ANALIZA SASTAVA I SADRŽAJA VITAMINA E U ULJU SEMENA DIVLJEG NARA**

HPLC analiza vitamina E u ispitivanom uzorku ulja urađena je u skladu sa prethodno objavljenom procedurom (Appenroth i sar., 2017). Za analizu tokoferola, alikvot izolovanog ulja semena divljeg nara sa smešom metanol/tetrahidrofuran je uparen pod parom azota, a zatim ponovo rastvoren u heksan/metil-*terc*-butil-etru (98 + 2, v/m).

HPLC analiza je izvršena sa normalnom fazom Eurospher 100 Diol (Knauer, Berlin, Savezna Republika Nemačka) u analitičkoj koloni (unutrašnje debljine  $250 \times 4,7 \mu\text{m}$  veličina čestice) koristeći 1,5 mL/min heksan/metil-terc-butil-etar (98 + 2, v/m) kao mobilnu fazu. Temperatura kolone je održavana na  $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  tokom izokratske analize. Kvantifikacija tokoferola je sprovedena na osnovu poređenja oblasti pikova sa onim koji su dobijeni za spoljne standarde sa definisanim koncentracijama.

### **3.6. ODREĐIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI MASN OG ULJA SEMENA DIVLJEG NARA**

#### **3.6.1. Određivanje lipofilnog antioksidativnog kapaciteta korišćenjem $\alpha$ – TEAC metode**

Antioksidativna aktivnost ulja semena divljeg nara izvršena je korišćenjem  $\alpha$ -TEAC testa u skladu sa prethodno objavljenom procedurom (Karmowski i sar., 2015). Metoda se zasniva na dekolorizaciji ABTS radikal katjona kako bi se odredio antioksidativni potencijal uzorka. 100  $\mu\text{L}$  prethodno rastvorenog uzorka ulja semena divljeg nara je pomešan sa 1000  $\mu\text{L}$  radnog rastvora ABTS radikal katjona. Smeša se 30 sekundi mučka u reakcionim epruvetama, a zatim potpuno prenese u polu-mikro kivete. Posle cetrifugiranja (30 s, 200 rcf) i 2 min nakon početka mešanja, izmerena je apsorbanca na 734 nm korišćenjem V-530 spektrofotometra (Jasco, Gross-Umstadt, Savezna Republika Nemačka). Lipofilni antioksidativni kapacitet je izražen u  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -tokoferola ekvivalenata na 100 g ( $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -TE/100g).

#### **3.6.2. Određivanje citotoksične aktivnosti ulja semena divljeg nara**

##### **3.6.2.1. Čelijske linije**

Za ispitivanje citotoksične aktivnosti ulja semena divljeg nara, u eksperimentima su korišćene sledeće čelijske linije (Tabela 16):

**HeLa** čelije su dobijene iz tkiva prilikom biopsije grlića materice pacijenta koji je bolovao od adenokarcinoma cerviksa. Proliferacija HeLa čelija je veoma brza, pa zbog

toga predstavlja najčešće upotrebljavanu malignu ćelijsku liniju (Macville i sar., 1999; Landry i sar., 2013).

**A549** ćelije su poreklom od pacijenta koji je bolovao od adenokarcinoma pluća. U kulturi stvaraju monosloj, a od tkiva iz kog su poreklom razlikuju se i strukturno i funkcionalno. U svojoj strukturi imaju visok sadržaj nezasićenih masnih kiselina i mogu sintetisati lecitin (Balis i sar., 1984). Osim toga, A549 ćelije koriste se kao modeli za ispitivanje metabolizma lekova.

**LS174** ćelije su poreklom iz invazivnog adenokarcinoma kolona. LS174 predstavljaju adhezivne ćelijske linije i ekspimiraju onkogene: c-myc, N-myc, H-ras, N-ras, Myb i FOS. Pored toga, negativne su na ekspresiju p53 antigena, ali postoji informaciona RNK ovog gena u ćelijama (Tom i sar., 1976).

**MRC-5** ćelije su poreklom iz zdravog tkiva pluća fetusa. Koriste se u proizvodnji vakcina, zatim u virologiji se upotrebljavaju u procesu transfekcije kao ciljna ćelija, i koristi se za *in vitro* ispitivanje citotoksičnosti supstanci (Jacobs i sar., 1970).

**EA.hy926** ćelije su nastale fuzionisanjem HUVEC ćelija (humane endotelijalne ćelije umbilikalne vene) i A549 ćelija (Edgell i sar., 1983). EA.hy926 ćelije se koriste kao model za ispitivanje invazivnosti ćelija, kao i potencijala ćelijske migracije.

Tabela 16. Karakteristike ćelijskih linija

Ćelijska linija	Morfologija	Vrsta	Tkivo/organ	Tumor
HeLa	epitelijalna	humane	cerviks	adenokarcinom
A549	epitelijalna	humane	pluća	adenokarcinom
LS174	epitelijalna	humane	kolon	adenokarcinom
MRC-5	vretenasta	humane	pluća	/
EA.hy926	endotelijalna	humane	hibrid somatskih ćelija	/

### 3.6.2.2. *In vitro* ispitivanje citotoksične aktivnosti masnog ulja semena divljeg nara

Potencijalno antitumorno dejstvo masnog ulja izolovano iz semena divljeg nara ispitivano je na nizu malignih ćelijskih linija: HeLa, A549 i LS174, kao i na normalnim MRC-5 ćelijskim linijama. HeLa, LS174, A549 i MRC-5 ćelije su održavane u hranljivoj podlozi RPMI-1640 (Sigma) na 37 °C. Hranljiva podloga sadrži 10 % termički

inaktivirani FBS (serum fetusa govečeta), 3 mM L–glutamina, 100 IU/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina i 25 mM HEPES (organski pufer) podešen na pH 7,2 bikarbonatnim rastvorom. Čelijske kulture su gajene u inkubatoru na temperaturi od 37 °C, u atmosferi vazduha obogaćenim 5 % CO<sub>2</sub> i zasićenom vodenom parom.

### **3.6.2.3. Tretman čelijskih linija**

Štokovi ispitivanog masnog ulja semena divljeg nara (100 mg/mL) su rastvoreni u odgovarajućoj podlozi kako bi se dobila tražena radna koncentracija. HeLa (2000 ćelija/otvoru), LS174 (7000 ćelija/otvoru), A549 (5000 ćelija/otvoru) i MRC–5 (5000 ćelija/otvoru) ćelije su zasađene u mikrotitar ploče sa 96 konusnih udubljenja, sa ravnim dnom. Nakon 24 h, posle čelijske adherencije, pet različitih duplo razblaženih koncentracija ispitivanog masnog ulja dodate su u konusna udubljenja ploča. Vrednosti finalnih koncentracija ulja u otvorima iznosile su 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL i 200 µg/mL, osim kontrolne ćelije, kojima je dodavana samo hranljiva podloga. Sve ispitivane koncentracije su izvedene u triplikatu (na tri otvora ćelija ostavljena su tri otvora u koji je dodata samo hranljiva podloga (kontrolna proba)). Hranljiva podloga odgovarajućih koncentracija masnog ulja bez zasejanih ćelija, je korišćena kao kontrolna proba u ovom eksperimentu. Kontrolna proba je postavljena u triplikatu. Kulture su inkubirane narednih 72 h.

### **3.6.2.4. Određivanje stepena preživljavanja ćelija**

Efekat ispitivanog ulja na preživljavanje specifičnih čelijskih linija određen je uz pomoć mikrokulture tetrazolium testa (MTT) na osnovu prethodno uspostavljene procedure (Mosmann 1983; Ohno i Abe, 1991). MTT (3–4,5’–dimetiliazol–2,5 difeniltetrazolijum–bromid, tetrazolijumska so) jeste supstanca žute boje, koja usled dejstva mitohondrijalnih reduktaza redukuje se u purpurni formazan.

Ukratko, 20 mL MTT rastvora (5 mg/mL PBS) se dodaje u svaki otvor ploče. Uzorci se zatim inkubiraju 4 h na temperaturi od 37 °C u vazduhu koji je zasićen vodenom parom 95 % vazduha/5 % CO<sub>2</sub> (v/v). Nakon toga, 100 µl rastvora 10 % SDS–a (100 g/L natrijum dodecil sulfata) je dodato, kako bi se rastvorio formazan koje stvaraju žive ćelije u procesu konverzije MTT boje. 24 h kasnije merena je apsorbanca (A) na 570 nm. Pomoću



ELISA čitača utvrđeno je da je broj vijabilnih ćelija u svakom otvoru proporcionalan intenzitetu apsorpcije. Pomoću jednačine 2 izračunato je ćelijsko preživljavanje: apsorbanca uzoraka sa tretiranim ćelijama ( $A_t$ ) oduzima od apsorbanca uzoraka sa slepom probom ( $A_s$ ), zatim pomnoži sa 100, i na kraju podeli sa apsorbancom kontrole, ( $A_k - A_s$ ).

$$S (\%) = (A_t - A_s) \times 100 / (A_k - A_s) \quad (2)$$

$IC_{50}$  koncentracija se definiše kao koncentracija agensa koja za 50 % inhibiše ćelijsko preživljavanje u odnosu na netretiranu kontrolu. Svi eksperimenti su izvedene u triplikatu.

### **Ćelijska linija EA.hy926**

EA.hy926 ćelije (5000 po otvoru) su zasađene u mikrotitar ploče sa ravnim dnom sa 96 otvora i 24 h nakon inkubacije, pet različitih koncentracija ulja semena divljeg nara u opsegu od 12,5  $\mu\text{g/mL}$  do 200  $\mu\text{g/mL}$ , dodate su u ćelije, dok je hranljiva podloga dodata samo kontrolnim ćelijama. Jedan dan nakon tretmana masnim uljem, u svaki otvor se doda po 10  $\mu\text{l}$  MTT rastvora (5 mg MTT/mL u fiziološkom rastvoru), a 4 h kasnije dodato je 100  $\mu\text{l}$  rastvora 10 % SDS-a. Apsorbanca izmerena na 570 nm, očitana je nakon 24 h.

#### **3.6.2.5. Ispitivanje uticaja masnog ulja semena divljeg nara na migraciju EA.hy926 ćelija**

EA.hy926 ćelije su zasađene u ploče sa 24 otvora i 24 h nakon inkubacije, ćelije su stvorile konfluentne monoslojeve, koji su ostrugani vrhom pipete p200 kako bi se napravila prava centralna linija. Ćelije su tretirane subtoksičnim koncentracijama ( $IC_{20}$ ) ulja semena divljeg nara tokom 24 h. Fotomikrografi su uzeti nakon nastajanja rane (0 h) i 24 h kasnije, pod obrnutim fazno-kontrastnim mikroskopom.

#### **3.6.2.6. Efekat masnog ulja semena divljeg nara na proces angiogeneze**

Ploče su obložene sa 200  $\mu\text{L}$  matriksnim matrigelom bazalne membrane i inkubirane 2 h. Nakon toga, EA.hy926 ćelije su dodate u ploče. U ćelije su dodate

subtoksične koncentracije (IC<sub>20</sub>) ulja semena divljeg nara, dok je hranljiva podloga dodata samo kontrolnim ćelijama. Nakon 24 h inkubacije, fotomokrogrami ćelija su snimljeni pod obrnutim fazno–kontrastnim mikroskopom.

### 3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Sva merenja i analize, kao i prinosi masnog ulja rađena su u tri ponavljanja. Podaci su u Tabelama i na Slikama prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između aritmetičkih sredina svih osnovnih skupova posmatranih kombinacija faktora za određeno svojstvo testirana je testovima parametarske statistike. Utvrđivanje normalnosti distribucija osnovnih skupova dobijenih eksperimentalnih podataka vršeno je Kolmogorov–Smirnovim testom normalnosti. Homogenost varijanse utvrđena je Levenovim testom. Testiranje nulte hipoteze između dve međusobno nezavisne grupe podataka vršena je dvostranim Studentovim t–testom sa podrazumevanom jednakom varijansom, dok su testovi nulte hipoteze između više od dve grupe podataka vršeni jednofaktorskom analizom varijanse (one–way ANOVA) sa pratećim *post–hoc* testom višestrukog ranga (Duncan's test). U tabelama su ocene statističke značajnosti između aritmetičkih sredina označavane različitim slovima za različite grupe na nivou značajnosti  $P < 0,05$ , dok su ocene statističke značajnosti na graficima označavane sa \* i \*\* za nivoe statističke značajnosti od  $P < 0,05$  i  $P < 0,01$ , poštujući redosled. Sve statističke analize i testovi, kao i izlazni grafici, urađeni su u programskom paketu STATISTICA v. 10.0.

# **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

#### **4.1. UTICAJ MIKROTALASNOG ZRAČENJA NA PRINOS MASNOG ULJA SEMENA DIVLJEG NARA**

Biljni materijal koji je upotrebljen u procesima ekstrakcije je očišćeno, oprano i osušeno seme divljeg nara koje sadrži 5,01 % vlage. U cilju povećanja efikasnosti procesa ekstrakcije (povećanje prinosa ekstrakta za kraće vreme), pored mlevenja semena divljeg nara, primenjen je i odgovarajući predtretman (tretman mikrotalasima).

Kako bi se utvrdio uticaj mikrotalasnog zračenja na prinos masnog ulja korišćena su dva tehnološka postupka ekstrakcije: ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet-u (SE) i natkritična ekstrakcija (NKE). Kao kontrolni uzorak upotrebljeno je seme divljeg nara koje nije bilo izloženo dejstvu mikrotalasa.

##### **4.1.1. Mikrotaladni predtretman i SE iz semena divljeg nara**

Set eksperimenata SE, koji su izvedeni upotrebom heksana na 69 °C, se sastojao od 7 eksperimenata. Najpre je ekstrahovano ulje iz semena divljeg nara koje nije bilo tretirano mikrotalasima, a zatim iz semena koje je prethodno tretirano mikrotalasima tri različite snage (100, 250 i 600 W) tokom dva vremena (2 i 6 min). Dobijeni su tečni ekstrakti braon do crne boje (Slika 16).



Slika 16. Ulje semena divljeg nara dobijeno SE nakon mikrotalasnog predtretmana

U Tabeli 17 su prikazani ostvareni prinosi masnog ulja koje je dobijeno nakon SE tretiranog i netretiranog semena divljeg nara. Poređenjem ostvarenih vrednosti može se uočiti da primena mikrotalasnog zračenja neposredno pre početka ekstrakcije značajno utiče na povećanje prinosa ulja. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim literaturnim podacima koji je objavio veći broj autora (Chemat i sar., 2005; Duvernay i sar., 2005; Cravotto i sar., 2008; Uquiche i sar., 2008; Azadmard–Damirchi i sar., 2010). Momeny i sar. (2012) su uočili povećanje prinosa ulja iz semena manga (sa 5,65 % na 8,9 %) upotrebom mikrotalasanog zračenja (300 W tokom 180 s) neposredno pre SE heksanom. Kittiphoom i Sutasinee (2015) su, takođe, pokazali da upotreba mikrotalasnog zračenja utiče na povećanje prinosa ekstrakta kod procesa SE iz semena manga. Povećanje prinosa ekstrakata dobijenih procesom SE iz semena nakon tretmana mikrotalasima se može objasniti razaranjem ćelijskih struktura u kojima se nalazi ulje, čime je olakšano isticanje ulja. Razaranje ćelija usled dejstva mikrotalasa je pripisano zagrevanju vlage unutar biljnog materijala čime pritisak na ćelijsku membranu raste sve dok ne dođe do njenog pucanja (Uquiche i sar., 2008).

Upotreba mikrotalasa pre ekstrakcije doprinela je povećanju prinosa masnog ulja sa 27,7 % (netretirano seme) na 34,0–36,3 %. Najveći prinos ulja je dobijen nakon primenjenog predtretmana od 600 W tokom 6 min, gde se prinos ulja povećao za ~30 % u odnosu na kontrolni uzorak. Iako je seme divljeg nara, tretirano na uslovima od 600 W i 6 min (36,3 %) dalo više ulja nego pri predtretmanu od 100 W i 2 min (34 %), dobijeno ulje je bilo značajno tamnije boje prema Pantone skali boja.

Anjum i sar. (2006) su ispitali uticaj mikrotalasnog zračenja na fizičko–hemijske karakteristike i oksidativnu stabilnost ulja semena suncokreta, i utvrdili da usled produženog vremena mikrotalasnog zračenja dolazi do promene boje ekstrahovanog ulja od svetlo žute do žute boje (za 5 min), i od žute do braon boje (za 10 min). Pojava promene boje, može se pripisati Maillardovoj reakciji, karamelizaciji i degradaciji fosfolipida (Yen, 1990; Megahad, 2001; Kim i sar., 2002).

Tabela 17. Prinosi SE i boja dobijenog ekstrakta semena divljeg nara

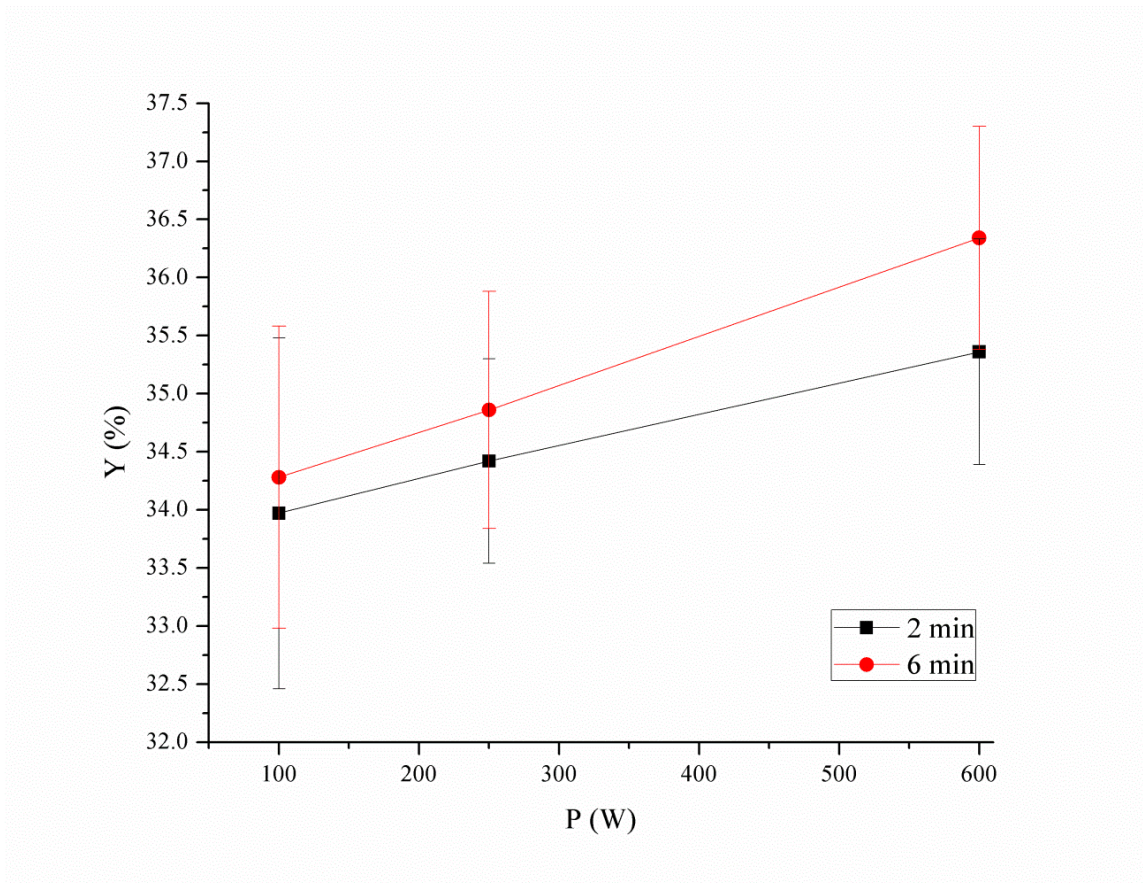
R. br.	Mikrotalasni predtretman		Prinos (%)*	Boja
	Snaga (W)	Vreme (min)		
1.	/	/	27,73 ± 1,18 <sup>b</sup>	braon
2.	100	2	33,97 ± 1,51 <sup>a</sup>	braon
3.	100	6	34,28 ± 1,30 <sup>a</sup>	braon
4.	250	2	34,42 ± 0,88 <sup>a</sup>	tamno braon
5.	250	6	34,86 ± 1,02 <sup>a</sup>	tamno braon
6.	600	2	35,36 ± 0,97 <sup>a</sup>	crna
7.	600	6	36,34 ± 0,96 <sup>a</sup>	crna

\* Prinos ulja dat je kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (n=3), izraženo kao % (w/w)

<sup>a-b</sup> Različita slova označavaju statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina ocenjene višestrukim testom intervala (Dankanov test) na nivou  $p < 0,05$

U studiji koju su izveli Sayyar i sar. (2011) je pokazano da povećanje vremena izlaganja semena jatrofe mikrotalasinom zračenju sa 2 na 4 min, dovodi do povećanja prinosa ekstrakcije sa 47,3 % na 49,4 %. Međutim, daljim izlaganjem semena mikrotalasinom zračenju od 6 min, smanjuje se prinos ekstrakcije na 38,6 %, i dolazi do ugljenisanja semena. Slično njima, Cheng i sar. (2011) su pokazali da produženo izlaganje palminog ploda mikrotalasnog zračenju dovodi do sušenja, pucanja i braoniranja ploda. Stoga, može se zaključiti da promena boja ulja od smeđe do tamno braon može biti posledica raspadanja semenog tkiva tokom produženog mikrotalasnog zračenja.

Uticao povećanja snage mikrotalasa i produženje vremena njihovog dejstva se može videti na Slici 17. Može se zaključiti da povećanjem snage dejstva mikrotalasa od 100 do 600 W dolazi do linearnog povećanja prinosa procesa SE. Dodatno, produženje vremena dejstva mikrotalasa, kada je snaga bila konstantna, je takođe imalo pozitivan efekat na prinos ekstrakta. Povećanjem snage mikrotalasa sa 100 na 600 W, primećeno je blago povećanje prinosa ekstrakcije sa 34,0 % na 35,4 % pri tretmanu koji je trajao 2 minuta i sa 34,3 % na 36,3 % pri tretmanu koji je trajao 6 minuta.



Slika 17. Uticaj povećanja snage mikrotalasa i vremena njihovog dejstva na prinos masnog ulja semena divljeg nara

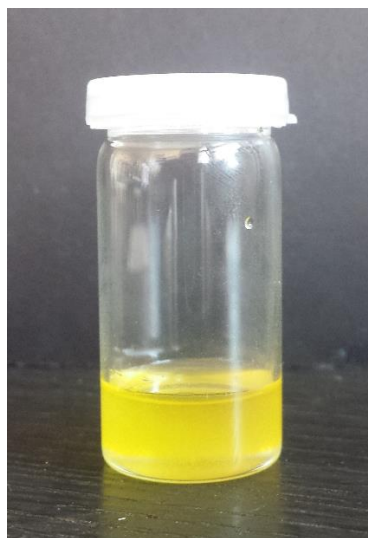
Gaikwad i sar. (2017) su ispitali uticaj snage mikrotalasnog zračenja, vremena predtretmana, kao i vremena trajanja procesa SE na prinos ulja iz semena nara. Kombinacijom parametara (720 W tokom 60 s, 4 h SE pomoću benzena) ostvaren je prinos od 28,23 %. Takođe, Moreno i sar. (2003) su potvrdili povećanje prinosa ulja iz pulpe avokada, sa 54 % na 97 %, primenom mikrotalasnog predtretmana od 859 W tokom 11 min neposredno pre SE heksanom. Dobili su ulje žute boje.

Poređenjem prinosa SE iz semena divljeg nara dobijenih u ovoj disertaciji sa rezultatima iz literature (Tabela 8), može se zaključiti da odabrani biljni materijal sadrži veću količinu ekstaktibilnih materija od semena nara poreklom iz Turske, Irana i Kine. Takođe, može se zaključiti i da izabrani predtretman (tretman mikrotalasima) dovodi do povećanja prinosa SE. Izuzetak je studija koji su izveli Çavdar i sar. (2017) koji su proces ekstrakcije izvodili u klasičnoj aparaturi po Soxhlet–u na temperaturi od 110 °C za razliku od SE u ovoj studiji koja je izvedena na temperaturi od 69 °C.

Na osnovu prikazanih podataka snage i vremena mikrotalasnog zračenja i odgovarajućih prinosa SE semena nara u Tabeli 17 i na Slici 17, može se primetiti da seme divljeg nara, tretirano na uslovima 100 W i 6 min (34,28 %) je dalo isti prinos pri uslovima od 250 W i 2 min (34,42 %). Kao što je već pomenuto, produženo izlaganje mikrotalasnom zračenju dovodi do sušenja, pucanja i ugljenisanja semena. Osim toga, cilj svakog industrijskog procesa je skraćanje vremena obrade biljnog materijala i ušteda energije. Stoga, sa ekonomske tačke gledišta, isplativije je povećati snagu mikrotalasa i dobiti isti prinos ulja za kraće vreme.

#### **4.1.2. Mikrotalasni predtretman i NKE iz semena divljeg nara**

Set eksperimenata NKE, koji su izvedeni na pritisku 37,9 MPa i temperaturi 47 °C, se sastojao od 7 eksperimenata. Najpre je ekstrahovano ulje iz semena divljeg nara koje nije bilo tretirano mikrotalasima, a zatim iz semena koje je prethodno tretirano mikrotalasima tri različite snage (100, 250 i 600 W) tokom dva vremena (2 i 6 min). Dobijeni su tečni ekstrakti žute boje (Slika 18).



Slika 18. Ulje semena divljeg nara dobijeno NKE nakon mikrotalasnog predtretmana

Prinosi masnog ulja semena divljeg nara koje je dobijeno nakon NKE tretiranog i netretiranog semena su prikazani u Tabeli 18. Iz dobijenih rezultata, može se zaključiti da primena mikrotalasnog zračenja neposredno pre početka NKE značajno utiče na



povećanje prinosa ulja. Veći prinos ulja nakon mikrotalasnog predtretmana dobili su i Porto i sar. (2016). Pomenuti autori su, prateći uticaj mikrotalasnog zračenja (povećanje snage i produženje vremena) na seme *Moringe*, zaključili da primena mikrotalasa od 100 W i 30 s, dovodi do povećanja prinosa ekstrahovanog ulja sa 30,70 % na 35,28 %.

Tabela 18. Prinosi NKE i boja masnog ulja semena divljeg nara

R. br.	Mikrotalasni predtretman		Prinos (%) <sup>*</sup>	Boja
	Snaga (W)	Vreme (min)		
1.	/	/	21,62 ± 0,58 <sup>d</sup>	žuta
2.	100	2	25,52 ± 0,46 <sup>b</sup>	žuta
3.	100	6	24,00 ± 0,73 <sup>c</sup>	žuta
4.	250	2	25,87 ± 1,04 <sup>b</sup>	žuta
5.	250	6	27,24 ± 0,82 <sup>a</sup>	žuta
6.	600	2	23,91 ± 0,97 <sup>c</sup>	žuta
7.	600	6	25,21 ± 0,66 <sup>bc</sup>	žuta

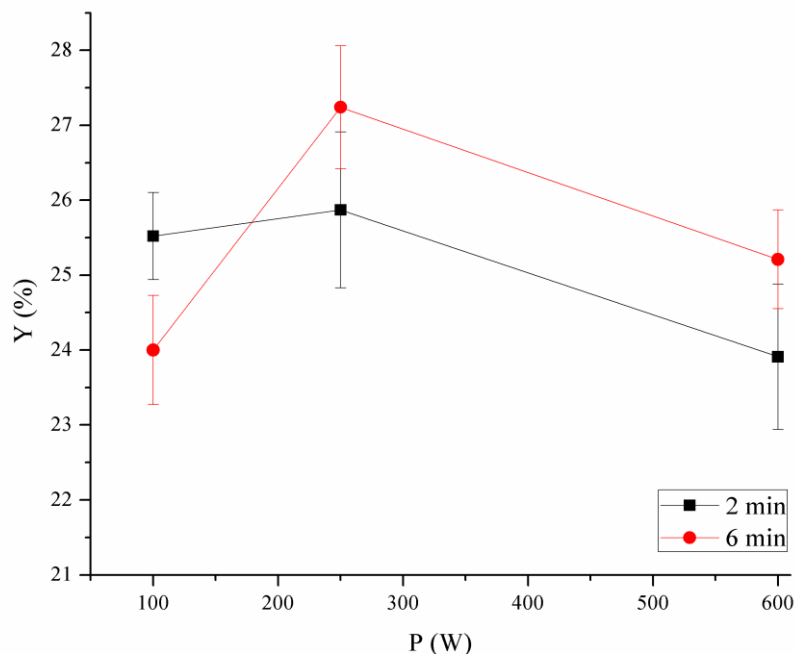
\*Prinos ulja dat je kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (n=3), izraženo kao % (w/w)

<sup>a-d</sup>Različita slova označavaju statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina ocenjene višestrukim testom intervala (Dankanov test) na nivou  $p < 0,05$

Primena predtretmana pre NKE doprinela je povećanju prinosa masnog ulja semena divljeg nara sa 21,6 % (za netretirano seme) na 23,9–27,2 %, pokazujući pozitivan uticaj mikrotalasnog predtretmana. Najveći prinos ulja je dobijen pri uslovima od 250 W i 6 min. Može se zaključiti da se primenom predloženog pretretmana mikrotalasila može povećati prinos NKE ulja iz semena divljeg nara do ~25 %.

U dostupnoj literaturi postoji veliki broj podataka o primeni mikrotalasnog zračenja za tretman biljnog materijala pre procesa ekstrakcije ulja u cilju povećanja prinosa ekstrakcije. Značaj ovog predtretmana se ogleda u direktnom, brzom i ravnomernom zagrevanju biljnog materijala kroz celu zapreminu, preko molekulske interakcije sa elektromagnetnim poljem, koje dovodi do razaranja ćelijske membrane. Ćelije postaju permeabilne što omogućava lakše isticanje ulja kroz propustljive zidove ćelija (Uquiche i sar., 2008; Decareau, 1985; Ayappa i sar., 1991; Thostenson i Chou, 1999; Venkatesh i Raghavan, 2004). Pomenutim predtretmanom, pored povećanog

prinos ekstrahovanog ulja, postiže se ušteda natkritičnog fluida, vreme obrade, a samim tim i ušteda energije (Ramanadhan, 2005).



Slika 19. Uticaj povećanja snage mikrotalasa i vremena njihovog dejstva na prinos masnog ulja semena divljeg nara

Uticaj povećanja snage mikrotalasa i produženje vremena njihovog dejstva se može videti na Slici 19. Može se primetiti da povećanje snage dejstva mikrotalasa od 100 do 600 W ima raznolik efekat na prinos NKE. Dok se prinos ekstrakcije povećao povećanjem snage mikrotalasa sa 100 na 250 W, dalje povećanje snage do 600 W rezultovalo je smanjenjem prinosa ekstrakcije. Dodatno, produženje vremena dejstva mikrotalasa kada je snaga bila 100 W je imalo negativan efekat na prinos ekstrakcije, ali kada je snaga mikrotalasa iznosila 250 i 600 W, produženje vremena dejstva mikrotalasa je imalo pozitivan efekat na prinos NKE.

Porto i sar. (2016) su primenili tri snage (100, 200 i 400 W) i tri vremena mikrotalasnog zračenja (30, 60 i 90 s) pre procesa ekstrakcije. Pomenuti autori su zaključili da se prinos ulja semena *Moringe* povećao kada je snaga mikrotalasa iznosila 100 W (sa 36,44 na 38,32 %). Dalje povećanje snage sa 100 na 200 i 400 W rezultovalo

je smanjenjem prinosa ekstrakcije. Slične rezultate dobio je Uquiche i sar. (2008) sugerirajući da efekat mikrotalasnog zračenja zavisi od vrste semena.

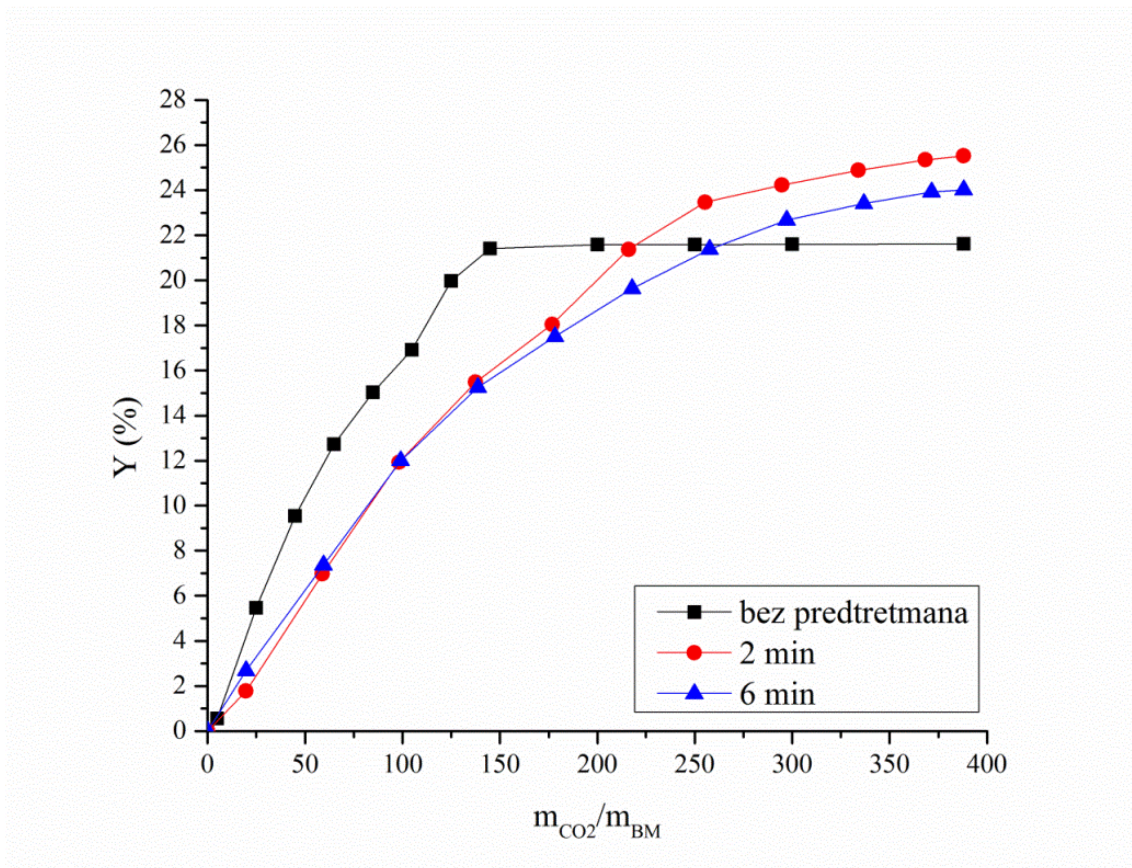
#### 4.1.3. Kinetika natkritične ekstrakcije

Uticaj uslova predtretmana mikrotalasima na kinetiku NKE utvrđen je merenjem mase izdvojenog ekstrakta u određenim vremenskim intervalima. Svi eksperimenti procesa NKE su izvedeni do iscrpljenja biljne sirovine, a maksimalno vreme trajanja procesa iznosilo je 15 h. Ekstrakciona kriva, na kojoj je prikazana zavisnost ekstrakcionog prinosa od potrošnje  $nkCO_2$ , data je na Slici 20.

Poznato je, da pri višim vrednostima pritiska (kao što je pritisak od 37,9 MPa primenjen u ovoj disertaciji), ugljenik(IV)–oksid ( $CO_2$ ) ima veću gustinu, a samim tim i veću moć rastvaranja. Zbog toga, na višim pritiscima dolazi do rastvaraja masnih ulja, voskova i smola, što značajno utiče na povećanje prinosa ekstrakcije, ali i na smanjenu selektivnost natkritičnog ugljenik(IV)–oksida ( $nkCO_2$ ) (Petrović, 2010).

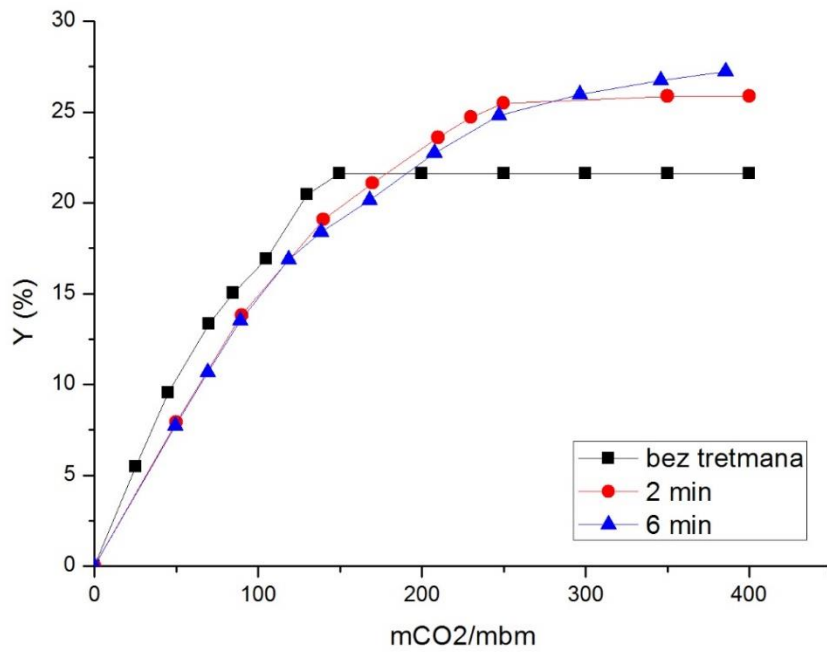
Na Slikama 20, 21 i 22 prikazana je kinetika NKE ulja iz semena divljeg nara nakon predtretmana mikrotalasima. Ekstrakcione krive prikazane su kao zavisnost prinosa masnog ulja od specifične potrošnje  $nkCO_2$  izražene u  $kg_{CO_2}$  po  $kg_{bm}$ . Mogu se uočiti dva karakteristična perioda i to:

1. konstantno povećanje prinosa ekstrahovanog ulja na samom početku procesa (strmiji nagib krive), poznato kao period ispiranja ili period brze ekstrakcije, i
2. sporiji porast koncentracije ekstrahovanog ulja u kasnijoj fazi ekstrakcije, poznato kao period spore ekstrakcije.

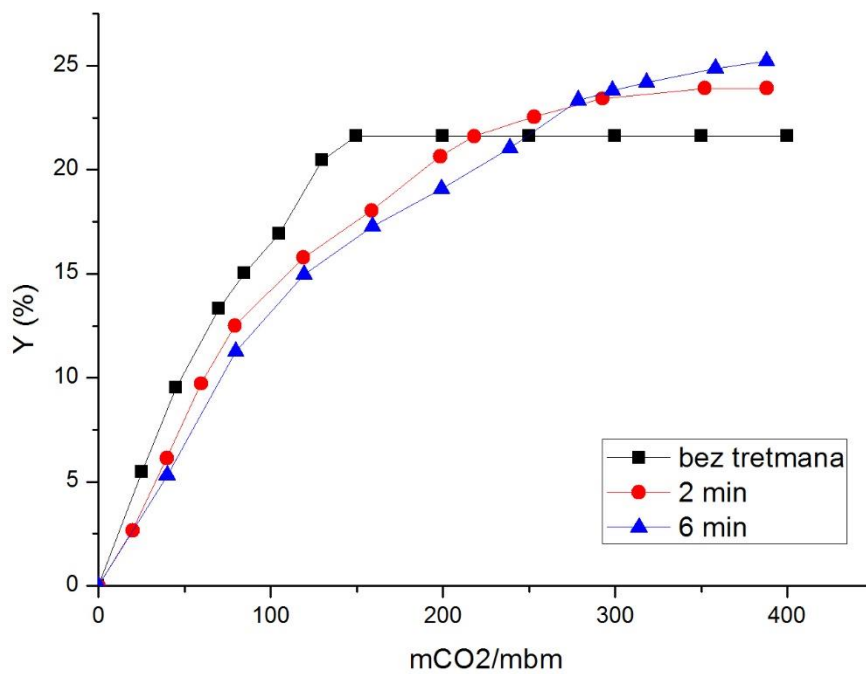


Slika 20. Kriva NKE iz semena divljeg nara sa i bez primene mikrotalasnog predtretmana (100 W tokom 2 i 6 min)

Na osnovu prikazanih rezultata na Slici 20 može se zaključiti da je kinetika NKE semena divljeg nara tretiranog mikrotalasima snagom od 100 W tokom 2 i 6 min identična za prvi period ekstrakcije. Završetkom perioda brze ekstrakcije, odnosno perioda ispiranja ulja iz razorenih ćelija, ekstrakcija ulja iz semena divljeg nara tretiranog mikrotalasima 6 min se usporava znatno brže od ekstrakcije ulja iz semena divljeg nara tretiranog mikrotalasima 2 min. Rezultati prikazani na Slici 21 ukazuju na jednaku kinetiku ekstrakcije ulja iz semena divljeg nara koje je tretirano mikrotalasima snagom od 250 W tokom 2 i 6 min. Slika 22 prikazuje kinetiku NKE semena divljeg nara tretiranog mikrotalasima snagom od 600 W tokom 2 i 6 min. Može se videti da je ekstrakcija ulja iz semena divljeg nara tretiranog mikrotalasima 2 min neznatno brža od ekstrakcije ulja iz semena divljeg nara tretiranog mikrotalasima 6 min.



Slika 21. Kriva NKE iz semena divljeg nara sa i bez primene mikrotalasnog predtretmana (250 W tokom 2 i 6 min)



Slika 22. Kriva NKE iz semena divljeg nara sa i bez primene mikrotalasnog predtretmana (600 W tokom 2 i 6 min)

Brzi porast prinosa masnog ulja u toku ekstrakcije iz svih uzoraka semena divljeg nara koji su tretirani različitim predtretmanima je zabeležen u toku prvih 5 h trajanja ekstrakcije. To je rezultat rastvaranja ekstrahovanih materija sa površine razorenih biljnih ćelija, dok je faza spore ekstrakcije, koja sledi u nastavku, posledica spore difuzije ekstraktivnih materija iz nerazorenih biljnih ćelija (Petrović i sar., 2012). Zanimljivo je primetiti da u prvom periodu ekstrakcije nagib krive je bio najviši za netretirano seme, sledeći smanjenje nagiba za seme tretirano sa 250 i 600 W, dok je seme tretirano sa 100 W imalo najmanji nagib u oba slučaja. Može se primetiti da je mikrotalasni predtretman smanjio prinos ulja na samom početku ekstrakcije, ali to je rezultiralo visokim prinosom ekstrakcije za drugi period ekstrakcije, gde je difuzija ulja kroz biljni materijal ograničavajući faktor ekstrakcije.

Takođe, može se primetiti za sve uzorke, da je na kraju perioda brze ekstrakcije, izolovano oko 80–95 % od ukupne količine ekstrahovanog ulja. Odavde sledi da je, sa ekonomske tačke gledišta, potpuno opravdano prekinuti proces na kraju prve faze ekstrakcije. Prekidanjem procesa ekstrakcije pre iscrpljenja biljnog materijala postiže se ušteda natkritičnog fluida, a skraćanjem vremena trajanja procesa postiže se i ušteda energije.

#### **4.1.4. Poređenje prinosa procesa SE i NKE pre i nakon predtretmana semena divljeg nara**

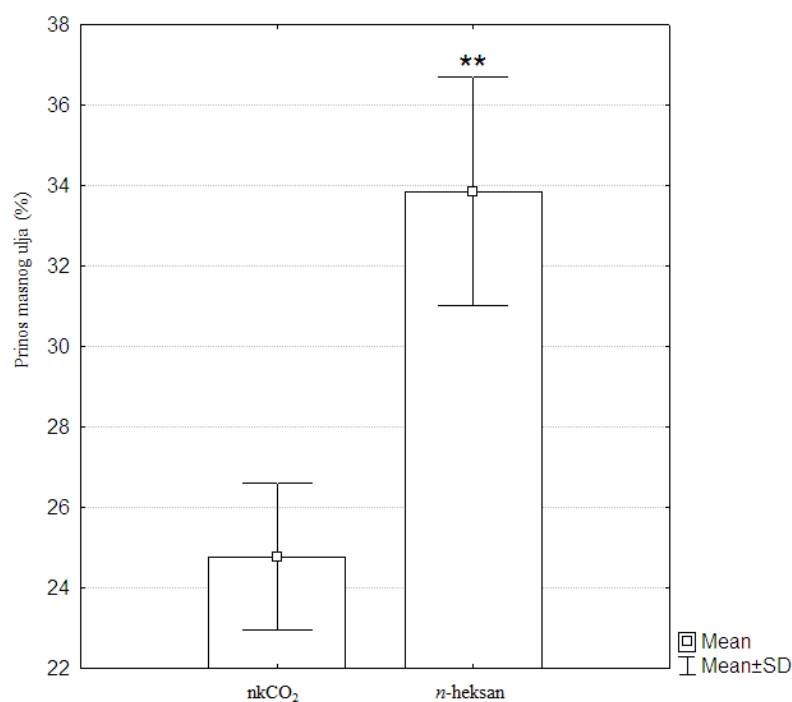
Kao što je prikazano u Tabelama 17 i 18, SE netretiranog semena divljeg nara dala je veći prinos ekstrakta (27,7 %) u poređenju sa prinosom NKE (21,7 %). Razlike u ostvarenim prinosima mogu se objasniti selektivnošću upotrebljenih rastvarača (Zhao i Zhang, 2013). Naime,  $\text{nkCO}_2$  je visoko selektivni rastvarač, dok je heksan neselektivan i uzrokuje istovremenu ekstrakciju neisparljivih pigmenata i voskova. Iz tog razloga, ulje dobijeno heksanom zahteva dodatno prečišćavanje, što produžava vreme ekstrakcije i smanjuje kvalitet ekstrahovanog ulja. Odavde sledi da se upotrebom  $\text{nkCO}_2$  može dobiti ulje boljeg kvaliteta iako je prinos ekstrakcije manji u poređenju sa SE (Porto i sar., 2016).

Dodatno, moguća razlika u prinosima ulja može se objasniti pomoću Hildebrandovog parametra rastvorljivosti (Burke, 1984). Naime, Hildebrandov parametar rastvorljivosti ( $\delta$ ) daje numeričku procenu stepena interakcije između supstanci i može

biti dobar pokazatelj rastvorljivosti, naročito nepolarnih supstanci. Prema literaturnim podacima, što je manja vrednost parametra, veća je rastvorljivost rastvarača. Hildebrandov parametar rastvorljivosti za heksan iznosi  $14,9 \text{ MPa}^{1/2}$  (Hansen, 1967). Ougiyangi i sar. (2003) su odredili vrednost parametara rastvorljivosti  $\text{nkCO}_2$  koji iznosi  $16,4 \text{ MPa}^{1/2}$ , na temperaturi od  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  i pritisku od  $40 \text{ MPa}$ .

Poređenjem prinosa ekstrakta netretiranog semena sa prethodno tretiranim semenima divljeg nara (Tabela 17 i 18), evidentan je pozitivan efekat mikrotalasnog predtretmana za obe metode ekstrakcije (došlo je do povećanja prinosa ekstrakcije do oko 31 % za SE i do oko 26 % za NKE). Niži prinos netretiranog semena može se objasniti postojanjem neoštećenih ćelija iz kojih se masno ulje nije moglo osloboditi ili izdvojiti upotrebom predloženih metoda ekstrakcije (Uquiche i sar., 2008).

Kako je prikazano u Tabeli 17 i na Slici 23, primenom SE ostvaren je veći prinos ekstrakta semena divljeg nara u poređenju sa NKE za netretirano seme (27,7 % u poređenju sa 21,62 %) i seme tretirano mikrotalasima (36,3 % u poređenju sa 27,2 %).



Slika 23. Prosečan prinos masnog ulja dobijenog NKE i SE nakon mikrotalasnog predtretmana (n=21),

\*\* označava statistički značajnu razliku na  $P < 0,01$  nivou.

Za razliku od SE u kojoj je najveći prinos postignut pri 600 W tokom 6 min, najveći prinos masnog ulja pri NKE zabeležen je primenom mikrotalasnog predtretmana pri snazi od 250 W i vremenu od 6 min. Osim toga, ekstrakt izolovan iz semena divljeg nara u procesu NKE bio je u tečnom stanju i žute boje bez obzira na primenjene operative uslove predtretmana, dok je ekstrakt izolovan u procesu SE bio braon do crne boje. Zbog odsustva promene boje ulja usled pojačanog ili produženog dejstva predtretmana, može se pretpostaviti da mikrotalasi nemaju veći uticaj na kvalitet ulja dobijenog procesom NKE. Slično rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, Cheng i sar. (2011) su pokazali da produženje vremena izlaganja mikrotalasima ima pozitivan efekat na prinos ulja izolovanog SE iz ploda palme, kao i da je ekstrahovano ulje bilo crne boje.

#### 4.2. UTICAJ MIKROTALASNOG PREDTRETMANA I METODE EKSTRAKCIJE NA HEMIJSKI SASTAV MASNIH KISELINA

Za određivanje procentualnog udela pojedinačnih masnih kiselina (MK) koje se nalaze u ulju semena divljeg nara upotrebljena je metoda gasne hromatografije uz plameno–jonizujuću detekciju i kombinacija gasne hromatografije i masene spektrometrije. Rezultati analize ekstrakata dobijenih procesom SE se mogu videti u Tabelama 20 i 21, a rezultati analize ekstrakata dobijenih procesom NKE se mogu videti u Tabelama 22 i 23.

Tabela 20. Udeo masnih kiselina (%) izolovanih iz ulja semena divljeg nara ekstrakcijom u aparaturi po Soxhlet–u sa i bez mikrotalasnog predtretmana

Masne kiseline		kontrolni uzorak	100 W	
			2 min	6 min
palmitinska kiselina	ZMK	2,81±0,09	2,75±0,06	2,74±0,10
margarinska kiselina	ZMK	0,06±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
linolna kiselina	PNMK	5,79±0,24	5,67±0,22	5,76±0,24
oleinska kiselina	MNMK	6,32±0,25	6,38±0,15	6,50±0,14
elaidinska kiselina	MNMK	0,59±0,02	0,59±0,03	0,64±0,01



Tabela 20. Nastavak

Masne kiseline		Kontrolni uzorak	100 W	
			2 min	6 min
stearinska kiselina	ZMK	2,57±0,11	2,62±0,11	2,66±0,13
linolelaidinska kiselina	PNMK	0,14±0,01	0,16±0,01	0,18±0,22
punicinska kiselina	PNMK	59,52±2,32	60,28±2,76	54,62±1,24
i. o. kiseline (1)	PNMK	8,59±0,18	8,70±0,28	9,45±0,34
i. o. kiseline (2)	PNMK	1,90±0,08	1,75±0,07	2,99±0,10
i. o. kiseline (3)	PNMK	7,01±0,31	6,66±0,30	9,87±0,46
i. o. kiseline (4)	PNMK	2,42±0,12	2,27±0,07	2,37±0,07
<i>cis</i> -11-e. kiselina	MNMK	0,80±0,02	0,66±0,02	0,73±0,02
<i>trans</i> -11-e. kiselina	MNMK	0,80±0,03	0,78±0,02	0,79±0,02
arahidinska kiselina	ZMK	0,56±0,02	0,56±0,01	0,54±0,00
behenska kiselina	ZMK	0,12±0,00	0,12±0,00	0,12±0,00

i. o. – izomer oktadekatrienske kiseline

e. – eikozenoinska kiselina

Tabela 21. Udeo masnih kiseline (%) izolovanih iz ulja semena divljeg nara ekstrakcijom u aparaturi po Soxhlet-u nakon mikrotalasnog predtretmana

Masne kiseline		250 W		600 W	
		2 min	6 min	2 min	6 min
palmitinska kiselina	ZMK	2,71±0,08	2,75±0,08	2,73±0,11	2,71±0,06
margarinska kiselina	ZMK	0,06±0,00	0,05±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00
linolna kiselina	PNMK	5,79±0,29	5,79±0,22	5,81±0,13	5,78±0,20
oleinska kiselina	MNMK	6,39±0,26	6,51±0,17	6,36±0,27	6,43±0,22
elaidinska kiselina	MNMK	0,53±0,02	0,60±0,03	0,50±0,02	0,44±0,02
stearinska kiselina	ZMK	2,59±0,08	2,64±0,05	2,60±0,07	2,58±0,12
linolelaidinska kiselina	PNMK	0,16±0,01	0,16±0,01	0,17±0,01	0,15±0,01
punicinska kiselina	PNMK	54,40±1,74	52,92±1,59	54,19±2,15	53,88±1,28
i. o. kiseline (1)	PNMK	8,96±0,38	10,06±0,36	9,13±0,41	8,79±0,40
i. o. kiseline (2)	PNMK	3,44±0,16	3,32±0,16	3,40±0,13	3,71±0,11

Tabela 21. Nastavak

Masne kiseline		250 W		600 W	
		2 min	6 min	2 min	6 min
i. o. kiseline (3)	PNMK	10,67±0,32	10,77±0,22	10,61±0,52	11,03±0,48
i. o. kiseline (4)	PNMK	2,27±0,08	2,33±0,11	2,32±0,10	2,32±0,08
<i>cis</i> -11-e. kiselina	MNMK	0,62±0,03	0,66±0,02	0,70±0,02	0,70±0,03
<i>trans</i> -11-e. kiselina	MNMK	0,78±0,02	0,81±0,03	0,75±0,02	0,77±0,03
arahidinska kiselina	ZMK	0,51±0,0,	0,54±0,01	0,53±0,02	0,53±0,03
behenska kiselina	ZMK	0,12±0,00	0,09±0,00	0,14±0,00	0,11±0,00

i. o. – izomer oktadekatrienske kiseline

e. – eikozenoinska kiselina

Procesima SE i NKE dobijeni su ekstrakti u kojima je detektovano šesnaest odnosno sedamnaest masnih kiselina (MK) u različitim količinama (Tabele 20, 21, 22 i 23). Takagi i sar. (1999), Yoshida i sar. (2005), Anjum i sar. (2006) i Yoshida i sar. (2006), su ispitivali uticaj mikrotalasnog zračenja na sojino zrno (*Glycine max*), seme kikirikija (*Arachis hypogaea* L.), seme suncokreta (*Heliantus annuus* L.) i seme bundeve (*Cucurbita spp.*). Pomenuti autori su zaključili da je došlo do promene u sastavu masnih kiselina u biljnim uljima, ali nisu naveli promene u prinosima ekstrakata. Anjum i sar. (2006) su ispitivali uticaj mikrotalasnog zračenja na fizičko-hemijske karakteristike i oksidativnu stabilnost ulja semena suncokreta, i utvrdili da se usled produženog vremena mikrotalasnog zračenja, povećava saponifikacija i sadržaj masnih kiselina u ulju suncokreta.

Poređenjem ostvarenih udela masnih kiselina u ulju semena divljeg nara može se uočiti da primena mikrotalasnog zračenja neposredno pre procesa SE i NKE ne utiče značajno na povećanje udela masnih kiselina u ulju. U pojedinim slučajevima, prezentovani rezultati ističu niži udeo masnih kiselina nakon primene mikrotalasnog zračenja i NKE. Tako je npr. udeo palmitinske kiseline, linolne kiseline, oleinske kiseline, stearinske kiseline i arahidinske kiseline manji u odnosu na udeo masnih kiselina netretiranog semena.

Tabela 22. Udeo masnih kiselina (%) izolovanih iz ulja semena divljeg nara NKE sa i bez mikrotalasnog predtretmana

Masne kiseline		Kontrolni uзорak	100 W	
			2 min	6 min
palmitinska kiselina	ZMK	3,20±0,07	2,77±0,11	2,75±0,10
margarinska kiselina	ZMK	0,06±0,00	0,05±0,00	0,08±0,00
linolna kiselina	PNMK	6,25±0,15	5,79±0,21	5,69±0,22
oleinska kiselina	MNMK	7,32±0,17	6,46±0,23	6,31±0,24
elaidinska kiselina	MNMK	0,43±0,02	0,41±0,01	0,38±0,01
stearinska kiselina	ZMK	2,60±0,11	2,53±0,07	2,50±0,07
linolelaidinska kiselina	PNMK	0,15±0,01	0,14±0,01	0,12±0,02
punicinska kiselina	PNMK	54,06±1,12	54,53±1,69	56,04±2,71
i. o. kiseline (1)	PNMK	8,82±0,26	8,85±0,18	8,55±0,41
i. o. kiseline (2)	PNMK	3,07±0,14	3,40±0,07	3,18±0,10
i. o. kiseline (3)	PNMK	9,72±0,36	10,59±0,45	9,95±0,28
i. o. kiseline (4)	PNMK	2,26±0,08	2,33±0,10	2,28±0,05
<i>cis</i> -11-e. kiselina	MNMK	0,74±0,03	0,77±0,03	0,72±0,02
<i>trans</i> -11-e. kiselina	MNMK	0,71±0,02	0,75±0,03	0,80±0,02
arahidinska kiselina	ZMK	0,53±0,01	0,50±0,01	0,52±0,02
behenska kiselina	ZMK	0,10±0,00	0,11±0,00	0,11±0,00
lignocerinska kiselina	ZMK			

i. o. – izomer oktadekatrienske kiseline

e. – eikozenoinska kiselina

Tabela 23. Udeo masnih kiselina (%) koje su izolovane iz ulja semena nara NKE nakon mikrotalasnog predtretmana

Masne kiseline		250 W		600 W	
		2 min	6 min	2 min	6 min
palmitinska kiselina	ZMK	2,83±0,14	2,74±0,07	2,76±0,14	2,79±0,10
margarinska kiselina	ZMK	0,06±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
linolna kiselina	PNMK	5,81±0,20	5,65±0,18	5,70±0,27	5,79±0,28
oleinska kiselina	MNMK	6,45±0,19	6,30±0,24	6,25±0,30	6,30±0,17

Tabela 23. Nastavak

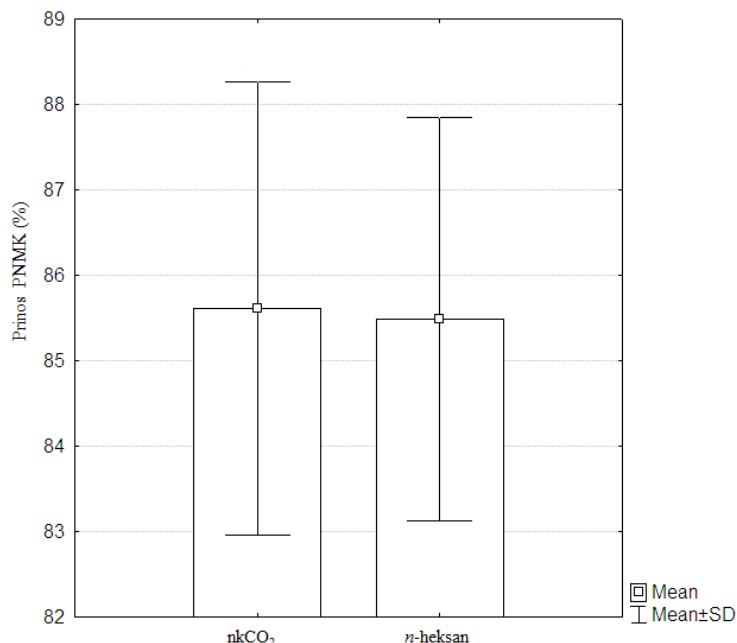
Masne kiseline		250 W		600 W	
		2 min	6 min	2 min	6 min
elaidinska kiselina	MNMK	0,41±0,01	0,34±0,01	0,33±0,01	0,33±0,01
stearinska kiselina	ZMK	2,55±0,12	2,48±0,10	2,45±0,10	2,46±0,06
linolelaidinska kiselina	PNMK	0,13±0,01	0,11±0,01	0,12±0,01	0,11±0,01
punicinska kiselina	PNMK	52,64±1,33	60,26±2,4 8	59,69±1,75	59,94±2,46
i. o. kiseline (1)	PNMK	9,37±0,33	8,50±0,41	8,13±0,35	8,25±0,18
i. o. kiseline (2)	PNMK	3,83±0,08	2,02±0,05	2,37±0,10	2,17±0,09
i. o. kiseline (3)	PNMK	11,45±0,57	7,05±0,34	7,84±0,30	7,44±0,24
i. o. kiseline (4)	PNMK	2,31±0,06	2,26±0,06	2,23±0,10	2,28±0,06
<i>cis</i> -11-e. kiselina	MNMK	0,69±0,01	0,73±0,02	0,73±0,02	0,65±0,02
<i>trans</i> -11-e. kiselina	MNMK	0,83±0,04	0,79±0,03	0,74±0,03	0,85±0,04
arahidinska kiselina	ZMK	0,52±0,01	0,52±0,02	0,52±0,02	0,50±0,01
behenska kiselina	ZMK	0,12±0,00	0,10±0,00	0,09±0,00	0,10±0,00
lignocerinska kiselina	ZMK		0,09±0,02		

i. o. – izomer oktadekatrienske kiseline

e. – eikozenoinska kiselina

U pogledu prinosa pojedinačnih grupa MK, između primenjenih metoda ekstrakcije nije bilo statistički značajne razlike (Slika 24), što sugeriše da se obe metode mogu podjednako primeniti za izolovanje MK iz semena divljeg nara. Rezultati pokazuju da su u ekstraktima najzastupljenije polinezasićene masne kiseline (PNMK) (sa sadržajem od 84,3–86,1 %), zatim mononezasićene masne kiseline (MNMK) sa sadržajem od 13,9–16,1 % i zasićene masne kiseline (ZMK) sa sadržajem od 5,8–6,5 %. Slične rezultate su dobili i Verardo i sar. (2014).

U uzorku dobijenom procesom NKE (85,6 %) uočen je neznatno veći prosečan prinos PNMK, u poređenju sa prosečnim prinosom PNMK (85,5 %) dobijeno procesom SE, bez statistički značajne razlike (Slika 24).



Slika 24. Prosečan prinos PNMK dobijen u procesima NKE i SE

Utvrđeno je da je najzastupljenija masna kiselina, dobijena u procesima SE i NKE, punicinska kiselina (PA) i da njen sadržaj iznosi oko 60 %. Kao što je prikazano u Tabelama 20 i 21, ekstrakt netretiranog semena dobijenog procesom SE ima veći sadržaj punicinske kiseline (59,5 %) u poređenju sa sadržajem u ekstraktu dobijenog procesom NKE (54,1 %). Razlike u ostvarenim prinosima masnog ulja mogu se objasniti selektivnošću upotrebljenih rastvarača (Zhao i Zhang, 2013) na osnovu čega se može pretpostaviti da heksan ima veći afinitet prema PA u odnosu na nkCO<sub>2</sub>. Primenjeni mikrotalasni predtretman pre SE zanemarljivo je uticao na povećanje udela PA sa 59,5 % (netretirano seme) na 60,3 % (100 W i 6 minuta). Međutim, u slučaju primene mikrotalasanog zračenja od 250 W tokom 6 minuta zabeležen je smanjeni udeo PA na 52,9 % sa 59,5 % (netretirano seme). Mikrotalasni predtretman pre NKE doprineo je blagom povećanju udela masne kiseline sa 54,1 % (netretirano seme) na 60,3 % (250 W i 6 minuta). U dostupnoj literaturi mogu se naći različite vrednosti udela PA u ulju semena nara, koji se kreću u opsegu od 0 do 86,6 % (Tabela 24).

Tabela 24. Literaturni pregled – Udeo punicinske kiseline u različitim sortama semena nara

Sorta nara	Period žetve	Poreklo biljke	Prinos (%)	Literatura
Fellahyemez, Katırbaşılı, Ekşilik, Hicaznar, Erdemli, Asınar, Izmir–23, Izmir–26, Ernar, Lefan, Silifke Aşısı, EkşI Goknar, Mayhos–IV, Izmir–1264, Izmir–1499, Izmir–1513	Oktobar	Turska	70,4–76,2	Kýralan i sar., 2009
Red PS Purple PS	/	Indonezija	9–16 0–25	Soetjipto i sar., 2010
Wonderful1, Wonderful, Akko, Hershkovitz; Mollar(1), Mollar(2) i Valenciana; Hijaz; Shiraz; G(1) i G(2)	Kraj septembra	Izrael Španija Turska Iran Tunis	72,4–84,1 80,3–84,1 81,7 78,7 82,9 i 77,3	Verardo i sar., 2014
Abanmahi, Malas, Pust Sefid i Shahvar	Jesen	Iran	72,1–73,3	Dadashi i sar., 2013
R19, R26, Cvg–Eve, North, Crab i Cranberry	Puna zrelost	USA	78,3–83,4	Pande i Akoh, 2009
Malas	/	Iran	69,8–79,0	Abbasi i sar., 2008
Siahdaneh Shirazi	Oktobar	Fars, Iran	70,7–81,7	Eikani i sar., 2012

Na udeo PA u ulju semena divljeg nara utiče veliki broj faktora, kao što su: genotip, lokacija, vreme žetve, klimatski uslovi, fizičko stanje zemljišta, primenjena metoda ekstrakcije, itd. (Harris i sar., 1978; Flagella i sar., 2002; Seiler i sar., 1983; Dolde i sar., 1999; Yaniv i sar., 1989; Holaday i Pearson, 1974). Određeni broj autora je pokazao

značaj uslova gajenja na sastav ulja dobijenog ekstrakcijom iz semena. Lajara i sar. (1990) su ispitali varijacije u hemijskom sastavu i sadržaju masnih kiselina između različitih sorti suncokreta i pokazali da sastav i sadržaj masnih kiselina u ulju variraju u zavisnosti od temperature uzgajanja, lokacije i sorte. Thompson i sar. (1973) su odredili sadržaj masnih kiselina kod četiri različite sorte kukuruza uzgajanih na pet različitih lokacija i pokazali su da razlike u sadržaju masnih kiselina prvenstveno zavise od lokaliteta uzgajanja. Dodatno, Robertson i sar. (1978) su pokazali da na sastav i sadržaj masnih kiselina utiče stepen zrelosti semena suncokreta.

Prisustvo većih količina PNMK u ekstrahovanom ulju je poželjno jer je PA veoma važna zbog svog potencijalnog biološkog i zdravstvenog efekata. Ovako visok sadržaj esencijalnih masnih kiselina, koje sprečavaju pojavu različitih poremećaja u funkcionisanju organizma, čini ulje semena divljeg nara poželjnim za ljudsku ishranu (Özgül–Yücel, 2005).

Druga najzastupljenija masna kiselina izolovana iz ulja semena divljeg nara je oleinska kiselina (C18:C19), čiji se udeo kreće u opsegu od 6,2 do 7,3 % (Tabela 20 i 21). Prema literaturnim podacima (Pande i Akoh, 2009; Jing i sar., 2012), oleinska kiselina je najčešća mononezasićena masna kiselina u Gruzijском i Kineskom ulju semena nara.

U drugim studijama, ulja koja su dobijena različitim metodama ekstrakcije (hladno ceđenje, ekstrakcija aparaturi po Soxhlet–u, ekstrakcija pregrejanim heksanom i NKE), najdominantnija polinezasićena masna kiselina bila je linolna kiselina (Fadavi i sar., 2006; Kýralan i sar., 2009; Tian i sar., 2013). U ovoj disertaciji, udeo linolne kiseline varira od 5,7 % do 6,2 % (Tabela 20 i 21), što je značajno manje nego kod drugih biljnih vrsta, kao što su šafranika (gde se udeo linolne kiseline kreće u opsegu 67,8–83,2 %), soja (sa udelom 48,0–59,0 %), suncokret (sa udelom 48,3–74,0 %) i laneno ulje (sa udelom 15,2–15,9 %) (Choo i sar., 2007).

U svim ekstraktima, izolovane su i masne kiseline sa većim brojem ugljenikovih atoma (Tabela 20 i 21) kao što su arahidinska kiselina (sa udelom oko 0,51 %) i behenska kiselina (sa udelom oko 0,11 %). U dostupnoj literaturi, udeo arahidinske kiseline u uljima semena nara kreće se u opsegu od 0–2,8 % (Özgül–Yücel, 2005), a udeo behenske kiseline se kreće u opsegu od 0–3,9 % (Fadavi i sar., 2006). Takođe, u ovoj disertaciji, primenom mikrotalasnog predtretmana (250 W i 6 min) i NKE, dobijena je lignocerinska kiselina, koja je prisutna u tragovima.

Iako rezultati dobijeni u ovoj disertaciji odgovaraju rezultatima prethodno objavljenih studija, primećena je razlika u sastavu i sadržaju masnih kiselina. Razlika u sadržaju masnih kiselina se može pripisati razlikama u genotipu nara, lokaciji gajenja nara, vremenu žetve, klimatskim uslovima, itd. (Kýralan i sar., 2009).

#### **4.3. SADRŽAJ KAROTENOIDA I VITAMINA E U ULJU SEMENA DIVLJEG NARA**

Sadržaj karotenoida i vitamina E (odnosno tokoferola i tokotrienola) u ulju semena divljeg nara je ispitano HPLC metodom. Za analizu je odabrano ulje dobijeno procesom NKE nakon mikrotalasnog predtretmana od 250 W tokom 6 min. Dobijeni rezultati su pokazali da se u ulju semena divljeg nara nalaze karotenoidi, koji su prisutni u tragovima (Tabela 25). Prisustvo karotenoida u ulju je značajno, ne samo zbog uloge provitamina, već i zbog pozitivnog efekta na imunološki sistem i uloge u prevenciji nastanka tumora pluća, debelog creva, materice, dojke i prostate. U ispitanom ulju se nalazi najviše (E)- $\beta$ -karotena koji je provitamin A i jedan od najjaćih antioksidanasa. Njegovo dejstvo se manifestuje eliminacijom reaktivnog kiseonika i inhibicijom lipidne oksidacije (Samaniego-Sánchez i sar., 2010). Sadržaj (E)- $\beta$ -karotena u testiranom ulju semena divljeg nara iznosi 0,15 mg/100g. Uzimajući u obzir da je dnevna potreba organizma za vitaminom A između 700 i 900  $\mu$ g (Mandić, 2007), može se zaključiti da se ulje semena divljeg nara može koristiti kao dodatak hrani ili za razvoj suplemenata za ljudsku ishranu koji će zadovoljiti potrebe za vitaminom A. Prikazani rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim literaturnim podacima, u kojima je navedeno da seme nara sadrži malu kolićinu karotenoida (Fernandes i sar., 2015).

Rezultati su takođe pokazali da su u odabranom uzorku ulja semena divljeg nara, prisutna i četiri tokola, uključujući tri tokoferola ( $\alpha$ -tokoferol,  $\gamma$ -tokoferol,  $\delta$ -tokoferol) i jedan tokotrienol ( $\beta$ -tokotrienol) (Tabela 25). Najzastupljeniji izomer bio je  $\gamma$ -tokoferol koji predstavlja više od 93 % vrednosti ukupnih tokoferola. Sadržaj  $\gamma$ -tokoferola u ulju semena divljeg nara dobijenog u ovoj studiji je 128,6 mg/100g. Sličan rezultat od 153,2 mg/100g  $\gamma$ -tokoferola u ulju prikazali su Melo i sar. (2016). Slični ili viši sadržaj  $\gamma$ -tokoferola u ulju objavili su Fernandes i sar. (2015) sa vrednostima od 159,7 do 586,2 mg/100g i Liu i sar. (2012) sa vrednostima od 120,6 do 672,6 mg/100g. Niži sadržaj



$\gamma$ - tokoferola u ulju od 2,7 mg/100g je prikazan u studiji Caligiani i sar. (2010), kao i 3,4– 5,5 mg/100g prikazan u studiji koju su izveli Jing i sar. (2012). Takođe, u ovoj disertaciji dobijen je veći sadržaj  $\gamma$ -tokoferola u poređenju sa onim koje su objavili Karmowski i sar. (2015). Pomenuti autori su, u svom radu pokazali da je najveći sadržaj  $\gamma$ -tokoferola zabeležen u kukuruznom ulju ( $87\pm 8,0$  mg/100g), zatim u ulju oraha ( $29\pm 0,3$  mg/100g) i ulju susama ( $0,3\pm 0,02$  mg/100g).

Tabela 25. Sadržaj tokoferola i karotenoida u ulju semena divljeg nara dobijeno procesom NKE i nakon mikrotalasnog predtretmana

	<b>Komponenta</b>	<b>Sadržaj (mg/100g)</b>
<b>Vitamin E</b>	$\alpha$ -tokoferol	$4,33 \pm 0,15$
	$\beta$ -tokoferol	–
	$\gamma$ -tokoferol	$128,56 \pm 4,50$
	$\delta$ -tokoferol	$2,52 \pm 0,32$
	$\beta$ -tokotrienol	$2,71 \pm 0,13$
	$\Sigma$ mg/100 g	$138,12 \pm 5,08$
<b>Karotenoidi</b>	(E)- $\beta$ -karoten	$0,15 \pm 0,01$
	9-(Z)- $\beta$ -karoten	*tr
	$\Sigma$ mg/100 g	$0,15 \pm 0,01$

\*tr – u tragovima

Visok sadržaj  $\gamma$ -tokoferola u odabranom ulju je izuzetno zadovoljavajući, jer je  $\gamma$ -tokoferol supstanca od velikog značaja. Tako je npr.  $\gamma$ -tokoferol otporniji na oksidaciju u poređenju sa drugim tokolima, a pokazuje i najveću antioksidativnu aktivnost (Maguire i sar., 2004). Važna uloga  $\gamma$ -tokoferol u organizmu se ogleda u zaštiti ćelija od starenja, omogućavanju normalnog funkcionisanja nervnog sistema, kao i u sprečavanju nastanka tumora (Brigelius-Flohe i Traber, 1999).

Drugi najzastupljeniji tokol u testiranom ulju je  $\alpha$ -tokoferol, najvažnije jedinjenje iz grupe tokoferola, koji poseduje najslabiju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ostalim tokoferolima. Ukoliko uporedimo dobijene rezultate sa podacima iz literature

(Pande i Akoh, 2009; Jing i sar., 2012; Fernandes i sar., 2015; Elfalleh i sar., 2011), možemo zaključiti da su vrednosti sadržaja  $\alpha$ -tokoferola u ulju znatno više u objavljenim istraživanjima. Međutim, u objavljenim studijama, korišćena su sveža i sirova semena (bez prethodne termičke obrade) za razliku od uzoraka u ovom radu, koja su tretirana mikrotalasnim zračenjem. Takođe, u disertaciji je ispitana temperatura koja je postignuta unutar mikrotalasne pećnice, koja se kreće u opsegu od 63 do 136 °C. Pretpostavlja se da proces zagrevanja može uticati na prinos  $\alpha$ -tokoferola zbog njegove male oksidacijske stabilnosti. Dodatno, u ovoj disertaciji rezultati pokazuju sadržaj  $\alpha$ -tokoferola koji je niži i od onih u: suncokretovom ulju (45 mg/100g), ulju kikirikija (20 mg/100g), kukuruznom ulju (13 mg/100g) (Karmowski i sar., 2015), ulju badema (11 mg/100g) i ulju semenu suncokreta (11,6 mg/100g) (Delgado-Zamarreño i sar., 2016).

Sadržaj  $\delta$ -tokoferola u testiranom ulju iznosi 2,5 mg/100g. Prikazana vrednost je slična ili niža od prethodno publikovanih vrednosti. U dostupnoj literaturi postoji veliki broj podataka o sadržaju  $\delta$ -tokoferola u različitim vrstama nara (Tabela 26). Razlike u prinosima među ovim studijama mogu biti posledica različitih faktora kao što su genotip nara, uslovi gajenja, klima ili vreme žetve.

Tabela 26. Sadržaj  $\delta$ -tokoferola u različitim vrstama nara

<b>Sorta</b>	<b>Sadržaj <math>\delta</math>-tokoferola (mg/100g)</b>	<b>Literatura</b>
Wonderful1, Wonderful, Akko i Hershkovitz (Izrael); Mollar(1), Mollar(2) i Valenciana (Španija); Hijaz (Turska); Shiraz (Iran); G(1) i G(2) (Tunis)	0,9–2,6	Verardo i sar., 2014
CG8, Cis 127, Mollar de Elche, Parfianka, Katirbasi, Valenciana, White, Wonderful 1 i Wonderful 2 (Španija)	6,0–15,2	Fernandes i sar., 2015
Ulje semena nara (USA)	17,04	Melo i sar., 2016

Tabela 26. Nastavak

Sorta	Sadržaj $\delta$ -tokoferola (mg/100g)	Literatura
R19, R26, Cvg–Eve, North, Crab, Cranberry (USA)	20,3–23,8	Pande i Akoh, 2009
Chetoui, Gabsi2, Gabsi3, Garsi, Mezzi i Zehri (Tunis)	24,2–29,9	Elfalleh i sar., 2011
Tianhongdan, Jingpitian, Sanbaitian i Suanshiliu (Kina)	141,4–351,3	Jing i sar., 2012

Iz testiranog ulja divljeg nara, izolovan je i jedan tokotrienol.  $\beta$ -tokotrienol, sa sadržajem od 2,5 mg/100g, ima udeo od 1,9 % od ukupnih tokoferola, slično kao u radu koji su objavili Verardo i sar. (2014). Prikazana vrednost je viša nego u studijama za pojedine bobice i ulja iz semena ribizle (Bada i sar., 2014). Prema literaturnim podacima (Ahsan i sar., 2014), tokotrienoli mogu sprečiti razvoj hroničnih oboljenja. Na primer, tokotrienoli (posebno  $\delta$ -tokotrienol) ispoljavaju veći antiproliferativni i pro-apoptički efekat od tokoferola u malignim ćelijskim linijama (Constantinou i sar., 2008).

Uzimajući u obzir da dnevna potreba organizma za vitaminom E iznosi od 8 do 25 mg/dan, a da dobijeno ulje semena divljeg nara sadrži 13,8 mg vitamina E u 100 g ulja, može se zaključiti da se dobijeno ulje može koristiti za razvoj preparata koji će sprečiti deficit vitamina E kod ljudi i sprečiti nastanak nepoželjnih neuromuskularnih promena.

#### 4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ULJA SEMENA DIVLJEG NARA

Antioksidativna aktivnost ulja semena divljeg nara dobijenog procesom NKE nakon mikrotalasnog predtretmana od 250 W tokom 6 min je ispitana prema sposobnosti vezivanja radikala tzv.  $\alpha$ -TEAC testom.

Antioksidativna aktivnost testiranog ulja je  $410 \pm 89 \mu\text{mL } \alpha\text{-TE}/100\text{g}$ . Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da masno ulje semena nara poseduje snažno antioksidativno dejstvo. Antioksidativno dejstvo je naročito značajan efekat koje ulje

dobijeno u ovoj disertaciji može da ispolji. To znači da svojim delovanjem ulje semena divljeg nara može da zaštiti ćelije životinja i ljudi od štetnih efekata reaktivnih kiseonika ili azota (MacDonald–Wicks i sar., 2006) i proizvodnje slobodnih radikala (Halliwell i Gutteridge, 1989; Halliwell, 1995; Jacob, 1995). Imajući u vidu visok sadržaj masnih kiselina, kao i sadržaj  $\gamma$ -tokoferola i  $\beta$ -tokotrienola, može se zaključiti da sve navedene grupe jedinjenja, koje se nalaze u ispitanom ulju semena divljeg nara, podjednako utiču na njegovo snažno antioksidativno dejstvo. Lipofilne komponente (masne kiseline, tokoferoli i karotenoidi) imaju brojne biološke aktivnosti koje doprinose poboljšanju zdravlja ljudi (Ju i sar., 2010; Li i sar., 2007).

U studiji koju su izveli Karmowski i sar. (2015) ispitivano je antioksidativno dejstvo kukuruznog ulja, kikirikijevog ulja, susamovog ulja, suncokretovog ulja i orahovog ulja pomoću  $\alpha$ -TEAC metode. Dobijeni rezultati bili su u opsegu od 41  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -TE/100g do 177  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -TE/100g, što pokazuje znatno nižu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji.

#### **4.5. CITOTOKSIČNA AKTIVNOST ULJA SEMENA DIVLJEG NARA PREMA TUMORSKIM ĆELIJAMA**

Citotoksična aktivnost ulja semena divljeg nara, dobijenog procesom NKE nakon mikrotalasnog predtretmana od 250 W tokom 6 min, je ispitana na malignim ćelijskim linijama HeLa, A549, i LS174, kao i na normalnim MRC-5 i EA.hy926 ćelijskim linijama. Ćelijske linije su kultivisane 72 h u različitim koncentracijama ulja semena divljeg nara i analizirane MTT testom. Ispitivanje citotoksične aktivnosti ulja semena divljeg nara na odabrane ćelijske linije je izvedeno po prvi put. Vrednosti citotoksične aktivnosti ( $\text{IC}_{50}$ ) ispitivanog masnog ulja semena divljeg nara su prikazane u Tabeli 27.

Tabela 27. Citotoksični efekat masnog ulja semena nara na HeLa, LS, A549, MRC–5 i EA.hy926 ćelije

IC <sub>50</sub> (µg/mL)				
Maligne ćelije			Normalne ćelije	
HeLa	LS174	A549	MRC–5	EA.hy926
49,51 ± 0,57	63,22 ± 2,11	91,54 ± 1,32	>200	199,36 ± 0,90

Napomena: vrednosti IC<sub>50</sub> u tabeli su predstavljene kao µg/mL±SD određene na osnovu tri nezavisna eksperimenta

Masno ulje je ispoljilo najviši citotoksični efekat prema HeLa malignim ćelijama (adenokarcinom cerviksa). Izražena je slabija citotoksična aktivnost prema LS174 (adenokarcinom debelog creva) i A549 ćelijskim linijama (adenokarcinom pluća). Normalne zdrave ćelijske linije MRC–5 (fetalni fibroblasti pluća) i EA.hy926 (humane endotelijalne ćelije umbilikalne vene) bile su najmanje osetljive na toksično dejstvo ispitivanog masnog ulja što predstavlja značajan rezultat ovog ispitivanja.

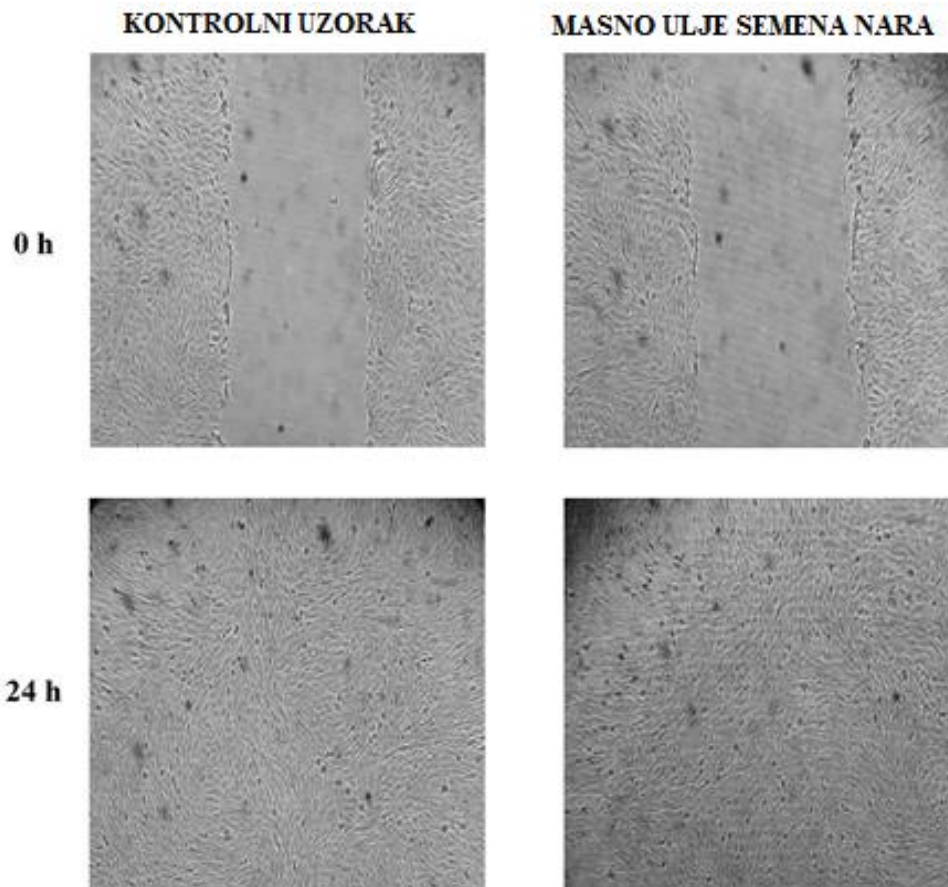
Hartwell (1982) pominje preko 3000 različitih biljaka, kao izvor prirodnih jedinjenja ili njihovih derivata sa antitumornim delovanjem npr. beli luk, aloja, bela imela, zeleni čaj, žen–šen, mačkov brk, kantarion, neven, rastavić, kopriva, mečja šapa, pacifička tisa i dr. Pokazao je da je grupa jedinjenja odgovorna za hemoprevenciju raka, kao što su: fenolna jedinjenja, vitamin, masne kiseline, itd. (Hartwell, 1982). Do sada, sprovedeno je nekoliko studija u cilju procene antikancerogene aktivnosti nara prema različitim tipovima tumorskih ćelijskih linija, kao što je rak debelog creva, rak dojke, rak prostate, pluća i rak grlića materice (Eddebbagh i sar., 2016; El–Awady i sar., 2015; Sepehr i sar., 2012). Hemopreventivno dejstvo ulja semena divljeg nara je pripisano punicinskoj kiselini (Lansky i sar., 2005; Grossmann i sar., 2010).

Prevenција ili smanjenje rizika od nastanka tumora (hemoprevencija), naročito primenom prirodnih preparata, se smatra tretmanom budućnosti. Uzimajući u obzir hemopreventivni potencijal ispitivanog ulja semena divljeg nara sa selektivnim citotoksičnim dejstvom na maligne ćelije i relativno niskim toksičnim dejstvom na zdrave ćelije, može se zaključiti da dobijeni rezultati ukazuju na moguću primenu ispitivanog masnog ulja kao antikancerogenog agensa za lečenje ljudi ili prevenciju bolesti.

#### 4.5.1. Efekat ekstrakata na migraciju EA.hy926 ćelija

Invazija ćelija je obeležje ćelija raka. Kako bi se utvrdila sposobnost ispitivanog masnog ulja semena divljeg nara da inhibiše invazivnost malignih ćelija, eksperiment je urađen uz pomoć humanih transformisanih endotelijalnih ćelija umbilikalne vene (EA.hy926 ćelija). U ovoj metodi, opisanoj u studiji koju su objavili Liang i sar. (2007), zapaženo je ako se u monosloju ćelija stvori „rana”, tj. prorez, ćelije će se deliti sve dok se tzv. „rana“ ne zatvori i dok ne formira monosloj. Predstavlja jednu od jednostavnijih metoda za *in vitro* analizu invazivnosti ekstrakata, koja donekle imitira *in vivo* migraciju ćelija. Zato je *in vitro* „scratch” test, poznatiji kao „wound healing” test, jedan od prvih metoda koje se koriste prilikom testiranja i proizvodnje novih jedinjenja sa terapijskom aktivnošću.

Reprezentativne fotomikrografije napravljene su neposredno nakon početka tretmana ispitivanog ekstrakta, a zatim nakon 24 h inkubacije. Na Slici 25 su prikazane EA.hy926 ćelije u kontrolnom uzorku, kao i EA.hy926 ćelije koje su bile izložene testiranom ekstraktu pri subotoksičnim koncentracijama (IC<sub>20</sub>).



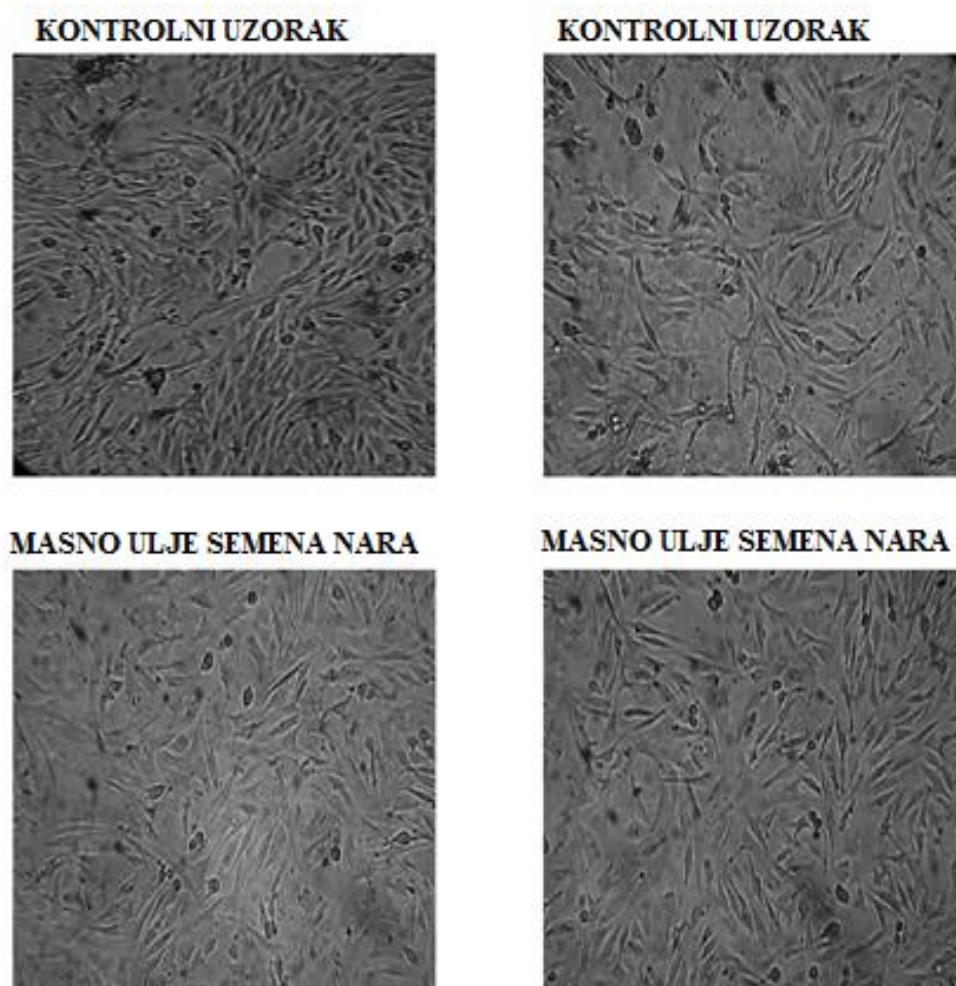
Slika 25. Efekat masnog ulja semena divljeg nara na migraciju EA.hy926 ćelija.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se uočiti da masno ulje nije pokazalo supresivni efekat na migraciju EA.hy926 ćelija.

#### 4.5.2. Efekat masnog ulja semena nara na proces angiogeneze

Angiogeneza predstavlja proces u kome je malignoj ćeliji omogućeno stvaranje sistema krvnih sudova. Ovakav sistem snabdeva malignu ćeliju hranljivim materijama i kiseonikom, i eliminiše produkte metabolizma i ugljen–dioksida (Hanahan i Weinberg, 2011). Inhibitori angiogeneze smatraju se dopunom za konvencionalni tretman kancera. Antiangiogenetsko svojstvo masnog ulja semena divljeg nara je ispitivano na EA.hy926 ćelijama primenom „*endothelial cell tube formation*” testa, poznatijeg kao *in vitro* test angiogeneze.

Reprezentativne fotomikrografije nakon 24 h inkubacije EA.hy926 ćelija u kontrolnom uzorku, kao i EA.hy926 ćelija koje su bile izložene testiranom ekstraktu pri subotoksičnim koncentracijama su prikazane na Slici 26.



Slika 26. Efekat masnog ulja semena divljeg nara na angiogenezu EA.hy926 ćelija

Uočava se da masno ulje ima blag anti–angiogenetski efekat koji pokazuje sposobnost da blago smanji razvoj tubula iz izduženih ćelija tela, kao i da smanji broj ćelijskih veza. Rezultati ukazuju na umereni antiangiogenetski efekat masnog ulja semena divljeg nara pa se stoga može smatrati kandidatom za inhibiciju angiogeneze.



## **5. ZAKLJUČAK**

- Seme divljeg nara, koje zaostaje kao sporedni proizvod pri proizvodnji sokova, odličan je izvor ulja koje sadrži tokoferol i masne kiseline, što potvrđuju dobijeni rezultati. Masno ulje koje je dobijeno predloženim metodama ekstrakcije predstavlja veoma vrednu sirovinu za moguću dalju upotrebu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.
- Primenjena su dva postupka ekstrakcije semena divljeg nara: natkritična ekstrakcija ( $\text{nkCO}_2$ ; 37,9 MPa; 47 °C) i ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet-u (heksan; 69 °C; 8 h) kojima je dobijeno biološki vredno ulje.
- Radi ispitivanja mogućnosti poboljšanja prinosa ekstrakcije, povećanja brzine ekstrakcije, kao i dobijanja ekstrakta sa većom koncentracijom željenih komponenti, primenjen je mikrotalasni predtretman biljnog materijala neposredno pre procesa ekstrakcije. Biljni materijal je predtretiran mikrotalasima tri snage (100, 250 i 600 W) u vremenskim intervalima 2 i 6 minuta. Dobijeni rezultati su upoređeni sa kontrolnim uzorkom koji je dobijen pri istim uslovima ekstrakcije, ali bez primene predtretmana.
- Primenjeni mikrotalasni predtretman omogućio je povećanje prinosa ekstrakta. Dok je za proces SE prinos ekstrakta povećan za oko 30 %, u slučaju NKE prinos je povećan za oko 25 %.
- Najveći prinos ekstrakta dobijenog procesom NKE (27,24 %) ostvaren je pri 250 W i 6 minuta. Natkritični ekstrakti bili su žuti i mirisa na ulje.
- Najveći prinos ekstrakta dobijenog procesom SE (36,34 %) ostvaren je pri 600 W i 6 minuta. Dobijeni ekstrakti bili su od svetlo braon do tamno braon boje, mirisa na ulje.
- Analizom metil-estara masnih kiselina ulja semena divljeg nara utvrđeno je da je, nezavisno od metode ekstrakcije i primenjenog rastvarača, najzastupljenija punicinska kiselina, zatim oleinska, linolna, palmitinska i stearinska kiselina, dok elaidinska, arahidinska, linolelaidinska, behenska, lignocerinska i margarinska kiselina zajedno učestvuju u sastavu ulja sa manje od 2 %. Statistički gledano, nije bilo značajnih razlika između dobijenih uzoraka, što sugeriše da su obe ekstrakcione tehnike primenjive za

dobijanje ulja iz semena divljeg nara. Takođe, mikrotalasno zračenje nije imalo značajan uticaj na količinu metil–estara masnih kiselina.

➤ Sadržaj karotenoida i tokoferola u ekstraktima određen je pomoću HPLC metode. Masno ulje, koje je dobijeno mikrotalasnim predtretmanom biljnog materijala neposredno pre procesa NKE (250 W i 6 min), je dobar izvor tokoferola, dok su karotenoidi izolovani u tragovima. Mikrotalasni predtretman semena divljeg nara nije uticao negativno na sadržaj tokoferola. Najzastupljeniji izomer je  $\gamma$ -tokoferol (128,6 mg/100g) što čini 93 % ukupnih tokoferola.

➤ Lipofilni antioksidativni kapacitet masnog ulja semena divljeg nara određen je  $\alpha$ -TEAC metodom. Masno ulje dobijeno je NKE i predtretmanom koji obezbeđuje najveći prinos ulja iz semena divljeg nara (250 W tokom 6 min). Rezultati ispitivanja pokazuju visok antioksidativni efekat ( $410 \pm 89 \mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$ ), pa se može konstatovati da masno ulje semena divljeg nara predstavlja potencijalno značajan izvor antioksidanasa.

➤ Citotoksična aktivnost masnog ulja semena divljeg nara je ispitana po prvi put. Relativni broj živih ćelija u kulturi utvrđen je MTT testom. Ulje, koje je dobijeno mikrotalasnim predtretmanom semena (250 W tokom 6 min) i NKE, pokazalo je umerenu citotoksičnu aktivnost na HeLa ćelije ( $\text{IC}_{50}$  vrednosti  $49,51 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$ ) u *in vitro* uslovima. Generalno, ispitivani uzorak je ispoljio najslabije dejstvo prema LS174 i A549 ćelijama. Citotoksičnost ispitivanog uzorka masnog ulja nije pokazana na MRC-5 i EA.hy926 ćelije, ističući da masno ulje semena divljeg nara dobijeno predloženim metodama ekstrakcije može naći primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

➤ U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o uticaju masnog ulja semena divljeg nara na migraciju ćelija, kao i na angiogenezu. Dobijeni rezultati predstavljaju prve literaturne podatke o ovim aktivnostima. Ispitan je uticaj masnog ulja na migraciju EA.hy926 ćelija i utvrđeno je da masno ulje ne pokazuje supresivni efekat na migraciju EA.hy926 ćelija. Takođe, prikazani rezultati ispitivanja ukazuju na umereni antiangiogenetski efekat, pa se stoga ekstrakt može smatrati kandidatom za inhibiciju angiogeneze.

- Prikazani rezultati predstavljaju osnovu za dalja ispitivanja bioloških aktivnosti ulja semena divljeg nara. Usled prisustva tokoferola i nezasićenih masnih kiselina, predlaže se izrada farmaceutskih preparata koji bi imali potencijalnu primenu kod lečenja psorijaze, akni i ekcema, zaštitu kože od sunca, ublažavanju crvenila i svraba.
  
- Osim toga, shodno utvrđenom hemijskom sastavu ulja semena divljeg nara, buduća istraživanja se mogu fokusirati na razvoj funkcionalnih prehrambenih proizvoda obogaćenih bioaktivnim jedinjenjima. U tom pogledu, smatra se da bi inkapsulacija u ovom slučaju predstavljala efikasan tehnološki postupak dobijanja stabilnih proizvoda, kao i proizvoda sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne komponente na ciljano mesto u organizmu.

# Literatura

Abbasi, H., Rezaei, K., Rashidi, L., Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85 (2008) 83–89.

Adams, R.P., *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, fourth ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA (2007).

Aguilera, J.M., Stanley, D.W., *Microstructural principles of food processing and engineering* 2nd ed. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc. (1999) pp. 325–372).

Ahangari, B., Sargolzaei, J., Extraction of Pomegranate Seed Oil Using Subcritical Propane and Supercritical Carbon Dioxide, *Theor. Found. Chem. Eng.* 46 (2012) 258–265.

Ahsan, H., Ahad, A., Iqbal, J. et al., Pharmacological potential of tocotrienols: A review, *Nutr. Metab. (Lond.)* 11 (2014) 52.

Anjum, F., Anwar, F., Jamil, A. et al., Microwave roasting effects on the physico-chemical composition and oxidative stability of sunflower seed oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (83) (2006) 777–784.

Appenroth, K., Sree, K., Böhm, V. et al., Nutritional value of duckweeds (*Lemnaceae*) as human food, *Food Chem.* 217 (2017) 266–273.

Ark, P.A., Parry, W., Application of High-Frequency Electrostatic Fields in Agriculture, *Q. Rev. Biol.* 15 (1940) 172–191.

Aruna, P., Venkataramanamma, D., Kumar Singh, A. et al., Health Benefits of Punicic Acid: A Review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15 (2016) 16–27.

Asadpour, E., Boroushaki, M., Sadeghnia, H., Protective effect of pomegranate seed oil against gentamicin induced nephrotoxicity in rat, *Toxicol. Lett.* 196(1) (2010) 232.

Aslam, M., Lansky, E., Varani, J., Pomegranate as a cosmeceutical source: pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase–1 production in human skin cells, *J. Ethnopharmacol.* 103(3) (2006) 311–318.

Aviram, M.L., Dornfeld, M., Rosenblat, N. et al., Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation:

Studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 1062–1076.

Ayappa, K.G., Davis, H.T., Davis, E.A. et al., Analysis of microwave heating of materials with temperature-dependent properties, *AIChE Journal* 37 (1991) 313–321.

Azadmard-Damirchi, S., Habibi-Nodeha, F., Hesaria, J. et al., Effect of pretreatment with microwaves on oxidative stability and nutraceuticals content of oil from rapeseed, *Food Chem.* 121(4) (2010) 1211–1215.

Azadmard-Damirchi, S., Alirezalu, K., Fathi Achachlouei, B., Microwave pretreatment of seeds to extract high quality vegetable oil, *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 57 (2011) 72–75.

Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *J. Food Eng.* 117(4) (2013) 426–436.

Bada, J., León-Camacho, M., Copovi, P. et al., Characterization of Berry and Currant Seed Oils from Asturias, Spain, *Int. J. Food Prop.* 17 (2014) 77–85.

Balis, J.U., Bumgarner, S.D., Paciga, J.E. et al., Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells: description of an in vitro model for human type II cell dysfunction, *Exp Lung Res.* 6(3-4) (1984) 197–213.

Barker, A.V., Craker, L.E., Inhibition of weed seed germination by microwaves, *Agron. J.* 83 (1991) 302–305.

Bebawi, F.F., Cooper, A.P., Brodie, G.I. et al., Effect of microwave radiation on seed mortality of rubber vine (*Cryptostegia grandiflora* R.Br.), parthenium (*Parthenium hysterophorus* L.) and bellyache bush (*Jatropha gossypifolia* L.), *Plant Prot. Q.* 22 (2007) 136–142.

Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., Hardin, J. et al., *The World of the Cell*. 7th ed. San Francisco: Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings (2009) 757–790.

Beltrán, G., Jimenez, A., del Rio, C. et al., Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors, *J. Food Compos. Anal.* 23(6) (2010) 633–639.

Böhm, F., Edge, R., Truscott, G., Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: Potential effects for human health, *Mol Nutr Food Res* 56(2) (2012) 205–216.

Brigelius-Flohé, R., Traber, M.G., Vitamin E: Function and metabolism, *FASEB J.* 13(10) (1999) 1145–1155.

Brunner, G., Supercritical fluids: technology and application to food processing, *J. Food Eng.* 67(1-2) (2005) 21–33.

Burke, J., AIC book and paper group annual, vol. 3, in: C. Jensen (Ed), *Solubility Parameters: Theory and Application*, Washington, (1984) pp. 13–58.

Caligiani, A., Bonzanini, F., Palla, G. et al., Characterization of a potential nutraceutical ingredient: pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil unsaponifiable fraction, *Plant Foods Hum. Nutr.* 65 (2010) 277–283.

Cam, M., Erdogan, F., Aslan, D. et al., Enrichment of functional properties of ice cream with pomegranate by-products, *J. Food Sci.* 78 (2013) 1543–1550.

Carvalho, E.B.T.d., Melo, I.L.P.d, Mancini-Filho, J., Chemical and physiological aspects of isomers of conjugated fatty acids, *Food Sci. Technol. (Campinas)* 3 (2010) 295–307.

Çavdar, H., Yanık, D., Gök, U. et al., Optimisation of Microwave-Assisted Extraction of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil and Evaluation of Its Physicochemical and Bioactive Properties, *Food Technol. Biotechnol.* 55(1) (2017) 86–94.

Chandra, R., Babu, D.K., Jadhav, V.T. et al., Origin, history and domestication of pomegranate, In: Chandra, R. *Pomegranate. Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol.* 4(2) (2010) 1–6.

Chaturvedula, V., Prakash, I., Bioactive Chemical Constituents from Pomegranate (*Punica granatum*) Juice, Seed and Peel - A Review, *Int. J. Res. Chem. Environ.* 1(1) (2011) 1–18.

Chemat, F., Huma, Z., Khan, M.K., Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 813–835.

Chemat, S., Ait-Amar, H., Lagha, A. et al., Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds, *Chem. Eng. Process.* 44 (2005) 1320–1326.

Chemat, F., Lucchesi, M.E., Smadja, J., Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances, American patent, US 2004/0187340A1 (2004).



Cheng, S.F., Mohd, N.L., Chuah, C.H., Microwave pretreatment: A clean and dry method for palm oil production, *Ind. Crops Prod.* 34(1) (2011) 967–971.

Chow, M.C., Ma, A.N., Processing of fresh palm fruits using microwaves, *J. Microw. Power Electromagn. Energy* 40(3) (2007) 165–173.

Condrón, K.N., Lemenager, R.P., Claeys, M.C. et al., Supplemental  $\beta$ -carotene I: Effect on plasma vitamin A, growth, performance, and carcass characteristics of feedlot cattle, *Meat Sci.* 98(4) (2014) 736–743.

Constantinou, C., Papas, A., Constantinou, A., Vitamin E and cancer: an insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs, *Int. J. Cancer* 123 (2008) 739–752.

Crampon C., Mouahid A., Toudji S.A.A. et al., Influence of pretreatment on supercritical CO<sub>2</sub> extraction from *Nannochloropsis oculata*, *J. Supercrit. Fluids* 79 (2013) 337–344.

Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Alencar, J.W. et al., Microwave extraction of an essential oil, *Flav. Frag. J.* 4 (1989) 43–44.

Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S. et al., Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrason. Sonochem.* 15 (2008) 898–902.

Cvetanović, A., Radojković, M., Đurović, S. et al., Inovativne tehnologije u ekstrakciji biološki važnih molekula, XXII Savetovanje o biotehnologiji, *Zbornik radova* 2 (2017) 485–490.

Dadashi, S., Mousazadeh, M., Emam-Djomeh, Z. et al., Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed: A comparative study on biochemical composition and oil physicochemical characteristics, *IJABBR* 1 (4) (2013) 351–363.

Damjanović, B., Ispitivanje ekstrakcije ploda morača (*Foeniculum vulgare* Mill.) natkritičnim ugljen-dioksidom, *Doktorska disertacija Tehnološki fakultet Novi Sad* (2005).

Dangoggo, S.M., Bunu, M.I., Uba, A. et al., Study of proximate, mineral and anti-nutrient composition of *Punica granatum* seeds from North-Western Nigeria and Saudi Arabia, *Researcher* 4 (2012) 4–9.

Davis, F.S., Wayland, J.R., Merkle, M.G., Ultrahigh-Frequency Electromagnetic Fields for Weed Control: Phytotoxicity and Selectivity, *Science* 173 (1971) 535–537.

Davis, F.S., Wayland, J.R., Merkle, M.G., Phytotoxicity of a UHF Electromagnetic Field, *Nature* 241 (1973) 291–292.

Decareau, R.V., *Microwaves in the food processing industry*, London, UK: Academic Press (1985) pp. 28–32.

Delgado-Zamarreño, M., Fernández-Prieto, C., Bustamante-Rangel, M. et al., Determination of tocopherols and sitosterols in seeds and nuts by QuEChERS-liquid chromatography, *Food Chem.* 192 (2016) 825–830.

Devatkal, S.K., Narsaiah, K., Borah, A., Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties, *Meat Sci.* 85 (2010) 155–9.

Dimić, E., Hladno ceđena ulja, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad (2005).

Dolde, D., Vlahakis, C., Hazebroek, J., Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition, and temperature during development, *JAOCS* 76 (1999) 349–355.

Duvernay, W.H., Assad, J.M., Sabliov, C.M. et al., Microwave extraction of antioxidant components from rice bran, *Pharm. Eng.* 25 (2005) 1–5.

Durđević S.M., Šavikin K.P., Petrović S.D., Microwave dielectric heating in food/pharmaceutical industry, *Proceedings of the 17th International Conference „Research and Development in Mechanical Industry“*, Zlatibor (2017) 331–338.

Eddebbagh, M., Messaoudi, M., Abourriche, A. et al., Correlation of the cytotoxic and antioxidant activities of moroccan pomegranate (*Punica granatum*) with phenolic and flavonoid contents, *J. Pharm. Pharmacol.* 4 (2016) 511–519.

Edgell, C.J., McDonald, C.C., Graham, J.B., Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization, *PNAS USA* 80(12) (1983) 3734–7.

Eikani, M.H., Golmohammad, F., Homami, S.S., Extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using superheated hexane, *Food Bioprod. Process.* 90 (2012) 32–36.

El-Awady, M.A., Awad, N.S., El-Tarras, A.E., Evaluation of the anticancer activities of pomegranate (*Punica granatum*) and harmal (*Rhazya stricta*) plants grown in Saudi arabia, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 4 (2015) 1158–1167.

El-Adawy, T.A., Taha, K.M., Characteristics and composition of different seed oils and flours, *Food Chem.* 74 (2001) 47–54.

Elfalleh, W., Tlili, N., Nasri, N. et al., Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits, *J. Food Sci.* 76 (2011) 707–712.

Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, M.H., Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 676–680.

Fernandes, L., Pereira, J.A., Lopez-Corte, I. et al., Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain, *J. Food Compos. Anal.* 39 (2015) 13–22.

EFSA, Scientific opinion on dietary reference values for vitamin C, 11(11) (2013) pp. 3418.

Flagella, Z., Rotunno, T., Tarantino, E. et al., Changes in seed yield and oil fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and the water regime, *Eur. J. Agronomy* 17 (2002) 221–230.

Gaikwad, N.N., Yedle, V.H., Yenge, G. et al., Effect of microwave pretreatment on extraction yield of pomegranate seed (cv. Bhagwa) oil, *Int J Chem Stud* 5(4) (2017) 1291–1294.

GLOBOCAN 2012, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization 2012. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)

Goldberg, I., Functional foods: Designer foods, Pharmafoods, Nutraceuticals, Springer US (1996) pp. 3.

Grossmann, M.E., Mizuno, N.K., Schuster, T. et al., Punicic acid is an omega-5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation, *Int. J. Oncol.* 36 (2010) 421–426.

Guo, S., Deng, Q., Xiao, J. et al., Evaluation of antioxidant activity and preventing DNA damage effect of pomegranate extracts by chemiluminescence method, *J. Agric. Food. Chem.* 55 (2007) 3134–3140.

Hajdu, S.I., A note from history: landmarks in history of cancer, part 1, *Cancer* 117(5) (2011) 1097–1102.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press 3 (1989) 22–85.

Halliwell, B., Antioxidant characterization: Methodology and mechanism, *Biochem. Pharmacol.* 49 (1995) 1341–1348.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer, *Cell* 100 (2000) 57–70.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.

Hansen, C.M., The Three Dimensional Solubility Parameter Key to Paint Component Affinities: 1. Solvents Plasticizers, Polymers, and Resins, *J. Paint Technol.* 39(505) (1967).

Harris, H.C., McWilliam, J.R., Mason, W.K., Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed, *Aust. J. Agric. Res.* 29 (1978) 1203–1212.

Harlan, J.R., *Crops and Man*, 2nd Edn. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, WI, (1992) pp. 295.

Hartwell, J.L., *Plants used against cancer*, Quarterman Publications, Lawrence, (1982).

Hennessy, A.A., Ross, P.R., Fitzgerald, G.F. et al., Sources and Bioactive Properties of Conjugated Dietary Fatty Acids, *Lipids* (51) (2016) 377–397.

Holaday, C.H., Pearson, J.L., Effects of genotype and production area on the fatty acid composition, total oil and total protein in peanuts, *J. Food Sci.* 39 (1974) 1206–1209.

Holland, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I., Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding, In: Janick, J. (Ed.), *Hortic. Rev.* 35(2) (2009) pp. 127–191.

Hornstra, G., Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 101(12) (1999) 456–466.

Hoz, A., Loupy, A., *Microwaves in Organic Synthesis*, 3rd Edition, Wiley-VCH Verlag & Co. KgaA, Germany 1 (2012).

Ivanović, J., *Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom*, Doktorska disertacija, Beograd, 2011.

Ivanović J., Meyer F., Misic D. et al., Influence of different pretreatment methods on isolation of extracts with strong antibacterial activity from lichen *Usnea barbata* using carbon dioxide as a solvent, *J. Supercrit. Fluids* 76 (2013) 1–9.

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, The nomenclature of lipids (Recommendations, 1976), *Biochem J* 171 (1978) 21–35.

Jacob, R.A., The integrated antioxidant system, *Nutr. Res.* 15 (1995) 755–766.

Jacobs, J.P., Jones, C.M., Baille, J.P., Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5, *Nature* 227 (1970) 168–170.

Jašić, M., Begić, L., *Biohemija hrane I*, Tuzla: Univerzitet u Tuzli (2008).

Jing, P., Ye, T., Shi, H. et al., Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds, *Food Chem.* 132 (2012) 1457–1464.

Joh, Y.G., Kim, S.J., Christie, W., The structure of the triacylglycerols, containing punicic acid, in the seed oil of *Trichosanthes kirilowii*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (1995) 1037–1042.

Ju, J., Picinich, S.C., Yang, Z. et al., Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols, *Carcinogenesis* 31 (2010) 533–542.

Jurenka, J., Therapeutic application of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review, *Altern. Med. Rev.* 13 (2008) 128–144.

Kalamara, E., Goula, A., Adamopoulos, K., An integrated process for utilization of pomegranate wastes Seeds, *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 27 (2015) 144–153.

Kappe, C., Dallinger, D., Murphree, S., *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists*, Wiley-VCH, Weinheim (2006).

Kappe, C.O., Stadler, A., *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim (2005).

Karmowski, J., Hintze, V., Kschonsek, J. et al., Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence, *Food Chem.* 175 (2015) 593–600.

Keşkekoğlu, H., Uren, A., Inhibitory effects of pomegranate seed extract on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef and chicken meatballs after cooking by four different methods, *Meat Sci.* 96 (2014) 1446–51.

Kim, I.H., Kim, C.J., You, M.J. et al., Effect of Roasting Temperature and Time on the Chemical Composition of Rice Germ Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (79) (2002) 413–418.

Kittiphoom, S., Sutasinee, S., Effect of microwaves pretreatments on extraction yield and quality of mango seed kernel oil, *Int. Food Res. J.* 22(3) (2015) 960–964.

Knežević, V., Superkritične tekućine,  
[\(http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod\\_za\\_kemiju\\_i\\_biokemiju/laboratorij\\_za\\_fizikalnu\\_kemiju\\_i\\_koroziju/odabrana\\_poglavlja\\_zelene\\_kemije/nastavni\\_materijali/studentski\\_seminari/2008\\_2009/superkriticne\\_tekucine\\_vlatka\\_knezevic\)](http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_fizikalnu_kemiju_i_koroziju/odabrana_poglavlja_zelene_kemije/nastavni_materijali/studentski_seminari/2008_2009/superkriticne_tekucine_vlatka_knezevic) (2008).

Kohno, H., Suzuki, R., Yasui, Y. et al., Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats, *Cancer Sci.* 95 (2004) 481–486.

Kýralan, M., Göllükcü, M., Tokgöz, H., Oil and conjugated linolenic acid contents of seeds from important pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Turkey, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86 (2009) 985–990.

Lajara, J.R., Diaz, U., Quidlledo, R.D., Definite influence of location and climatic conditions on the fatty acid composition of sunflower seed oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67 (1990) 618–623.

Landry, J.J., Pyl, P.T., Rausch, T. et al., The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line, *G3 (Bethesda)* 3(8) (2013) 213–224.

Lansky, E.P., Newman, R.A., *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer, *J. Ethnopharmacol.* 109 (2007) 177–206.

Lansky, E.P., Harrison, G., Froom, P. et al., Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel, *Invest New Drugs* 23 (2005) 121–122.

Levin, G.M., Pomegranate (*Punica granatum*) plant genetic resources in Turkmenistan, *Plant Genet. Resour. Newslett.* 97 (1994) 31–36.

Levin, G.M., *Pomegranate Roads: A Soviet Botanist's Exile from Eden*, 1st Edn. Floreant Press, Forestville, California, (2006) pp. 15–183.

Li, L., Tsao, R., Yang, R. et al., Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.), *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 1164–1169.

Li, X., Kong, W., Shi, W. et al., A combination of chemometrics methods and GC-MS for the classification of edible vegetable oils, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 155 (2016) 145–150.

Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L., In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nat Protoc.* 2(2) (2007) 329–33.

Liu, G., Xu, X., Hao, Q. et al., Supercritical CO<sub>2</sub> optimization of pomegranate (*Punica Granatum L.*) seed oils using response surface methodology, *LWT Food Sci. Technol.* 42 (2009) 1491–1495.

Liu, G., Xu, X., Gong, Y. et al., Effects of supercritical CO<sub>2</sub> extraction parameters on chemical composition and free radical-scavenging activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed oil, *Food Bioprod. Process.* 90 (2012) 573–578.

Lucci, P., Pacetti, D., Loizzo, M.R. et al., *Punica granatum* cv. Dente di Cavallo seed ethanolic extract: antioxidant and antiproliferative activities, *Food Chem.* 165 (2015) 475–83.

MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review, *J. Sci. Food Agric.* 86 (2006) 2046.

Macville, M., Schröck, E., Padilla-Nash, H. et al., Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping, *Cancer Res.* 59(1) (1999) 141–150.

Maguire, L., O'Sullivan, S., Galvin, K. et al., Fatty acid profile tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 55 (2004) 171–178.

Maksimović, S., Ekstrakcija iz smilja (*Helichrysum italicum*) i impregnacija čvrstih nosača ekstraktom primenom natkritičnog ugljenik(IV)-oksida, Doktorska disertacija, Beograd, 2017.

Mandić, M.L., Znanost o prehrani: hrana i prehrana u čuvanju zdravlja, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek (2007).

McFarlin, B.K., Strohacker, K.A., Kueht, M.L., Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice, *Br. J. Nutr.* 102 (2009) 54.

Megahad, M.G., Microwave Roasting of Peanuts: Effects on Oil Characteristics and Composition, *Nahrung* (45) (2001) 255–257.

Melo, I.L.P., Carvalho, E.B.T., Silva, A.M.O. et al., Effects of pomegranate seed oil on lipoperoxidation and activity of antioxidant enzymes in liver and brain of rats, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (1) (2010) 189.

Melo, I.L.P., Carvalho, E.B.T., Silva, A.M.O. et al., Characterization of constituents, quality and stability of pomegranate seed oil (*Punica granatum* L.), *Food Sci. Technol. (Campinas)* 36 (2016) 132–139.

Mena, P., Development and assessment of pomegranate (*Punica granatum* L.)-derived food products, rich in bioactive phytochemicals, PhD thesis, Spanish National Research Council, 2013.

Mengal, P., Mompon, B., Procède et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes, International patent, WO 94/26853 (1994).

Mengal, P., Mompon, B., Procède et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes, European patent, EP 698 076 B1 (1996).

Milovanović, B., Joković, J., Atanasković, A. et al., Razvoj protipa mikrotalasnog aplikatora za sušenje materijala, *Industrijska energetika, Donji Milanovac, Zbornik radova*, (2004).

Mirmiran, P., Fazeli, M.R., Asghari, G. et al., Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical trial, *Br. J. Nutr.* 104 (2010) 402–406.

Moller, P., Wallin, H., Knudsen, L.E., Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and lifestyle factors, *Chem. Biol. Interact.* 102 (1996) 17–36.

Momeny, E., Rahmati, S., Ramli, N., Effect of Microwave Pretreatment on the Oil Yield of Mango Seeds for the Synthesis of a Cocoa Butter Substitute, *J Food Process Technol* 3 (2012) 1–7.

Monica, V., Raquel, H., Pinyi, L. et al., Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2013) 18.

Monrad, J.K., Howard, L. R., King, J.W. et al., Subcritical Solvent Extraction of Procyanidins from Dried Red Grape Pomace, *J. Agric. Food Chem.* 58(7) (2009) 4014–4021.



Moreno, A.O., Dorantes, L., Galindez, J. et al., Effect of different extraction methods on fatty acids volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* mill.) oil, *J. Agric. Food. Chem.* 51 (2003) 2216–2221.

Moriguchi, T., Omura, M., Matsuta, N. et al., In vitro adventitious shoot formation from anthers of pomegranate, *HortScience* 22 (1987) 947–948.

Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65(1–2) (1983) 55–63.

Nieto, A., Borrull, F., Marcé, R.M. et al., Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216(30) (2009) 5619–5625.

Nikolovski, B., Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz bobica klele (*Juniperus communis* L.) i semenki tikve (*Cucurbita pepo* L.) natkritičnim ugljendioksidom, Doktorska disertacija, 2009.

Nowicka, B., Kruk, J., Plastoquinol is more active than  $\alpha$ -tocopherol in singlet oxygen scavenging during high light stress of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* 1817(3) (2012) 389–394.

Nwabanne, J.T., Kinetics and Thermodynamics Study of Oil Extraction from Fluted Pumpkin Seed, *Int J Multidisc Sci Eng* 3(6) (2012) 11–15.

Official Surplus Method 965.4 Fatty Acids in Oils and Fats, Preparation of Methyl Esters, Final Action 1984, Surplus 1965.

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

Oonsivilai, R., Chirinang, P., Thaiudom, S. et al., Response surface methodology application in optimization of thai pomegranate seed oil using supercritical fluid extraction, *Int J Adv Sci Eng Technol* 4(4) (2016) 5–8.

Ougiyani, J., Meguro, Y., Yoshida, Z. et al., Solvent effect on distribution ratio of Pd(II) in supercritical carbon dioxide extraction and solvent extraction using 2-methyl-8-quinolinol, *Talanta* 59 (2003) 1189–1198.

Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio, A.Z. et al., Modified ABTS method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH methods, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1151.

Özgül-Yücel, S., Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey, *JAOCs* 82(12) (2005) 893–897.

Pande, G., Akoh, C., Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia grown pomegranate cultivars, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 9427–9436.

Pare, J.R.J., Sigouin, M., Lapointe, J., Microwave-assisted natural product extraction, American patent, US 5 002 784, 1991.

Pare, J.R.J., Microwave extraction of volatile oils, American patent, US 5 338 557, 1994.

Park, H.M., Moon, E., Kim, A.J. et al., Extract of *Punica granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation, *Int. J. Dermatol.* 49 (2010) 276–282.

Pascual, C., Massaretto, I., Kawassaki, F. et al., Effects of parboiling, storage and cooking on the levels of tocopherols, tocotrienols and  $\gamma$ -oryzanol in brown rice (*Oryza sativa* L.), *Food Res. Int.* 50(2) (2013) 676–681.

Pavlović, K., Mikrotalasno stimulisane transformacije prirodnih i sintetičkih karboksilnih kiselina i njihovih derivata, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Novom Sadu (2014).

Pereda, S., Bottini, S.B., Brignole, E.A., Fundamentals of supercritical fluid technology, Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds, Ed. Jose L. Martinez, CRC Press, Boca Raton, USA (2008) 1–23.

Pereira, C., Meireles, M., Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives, *Food Bioprocess Technol.* 3 (2010) 340–372.

Petrović, S.S., Ivanovic, J., Milovanovic, S. et al., Comparative analyses of the diffusion coefficients from thyme for different extraction processes, *J. Serb. Chem. Soc.* 77 (6) (2012) 799–813.

Petrović, L., Dobijanje ekstrakta nevena (*Calendula officinalis* L.) ugljen dioksidom pod pritiskom i njegovo mikrokapsuliranje u sistemu polimer–površinski aktivna materija, Doktorska disertacija, Novi Sad, 2010.

Pokorny, J., Parkányiová, J., Lipids with antioxidant properties, In Akoh, C.C. and Lai, O-M (Eds.), *Healthful Lipids*, AOCS Press. (2005) 273–300.

Ponomarev, V.D., *Ekstragirovanie lekarstvennogo syr'ya*, Medicina, Moscow (1976).

Porto, C., Decorti, D., Natolino, A., Microwave pretreatment of *Moringa oleifera* seed: effect on oil obtained by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction and Soxhlet apparatus, *J. Supercrit. Fluids* 107 (2016) 38–43.

Qu, W., Pan, Z., Ma, H., Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc, *J. Food Eng.* 99 (2010) 16–23.

Quispe-Condori, S., Sanchez, D., Foglio, M.A., et al., Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 36 (2005) 40–48.

Ramanadhan, B., Microwave extraction of essential oils (from black pepper and coriander) at 2.46 GHz, Canada: University of Saskatchewan, MSc thesis, 2005.

Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C. et al., Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(14) (2012) 5535–5540.

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

Riera, E., Golas, Y., Blanco, A. et al., Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound, *Ultrason. Sonochem.* 11 (2004) 241–244.

Robertson, J.A., Chapman, G.W., Wilson, R.L., Relation of days after flowering to chemical composition and physiological maturity of sunflower seed, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55 (1978) 266–269.

Rodrigues, V.M., Sousa, E.M.B., Monteiro, A.R. et al., Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO<sub>2</sub>: A pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure+solute+solvent, *J. Supercrit. Fluids* 22 (2002) 21–36.

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

Samaniego-Sánchez, C., Quesada-Granados, J.J., de la Serrana, H.L.G. et al.,  $\beta$ -Carotene, squalene and waxes determined by chromatographic method in picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system, *J. Food Compos. Anal.* 23(7) (2010) 671–676.

Saxena, D.K., Sharma, S.K., Sambi, S.S., Kinetics and thermodynamics of cottonseed oil extraction, *Grasas Aceites* 62 (2011) 198–205.

Sayyar, S., Abidin, Z.Z., Yunus, R. et al., Solid liquid extraction of jatropha seeds by microwave pretreatment and ultrasound assisted methods. *J. Appl. Sci.* 11 (13) (2011) 2444–2447.

Schubert, S.Y., Lansky, E.P., Neeman, I., Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids, *J. Ethnopharmacol.* 66 (1999) 11–17.

Schwartz, E., Tzulker, R., Glazer, I. et al., Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits, *J. Agric. Food. Chem.* 57 (2009) 9197–9209.

Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y. et al., Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours, *J. Nutr.* 136 (10) (2006) 2481–2485.

Seiler, G.J., Effect of genotype, flowering date, and environment on oil content and oil quality of wild sunflower seed, *Crop. Sci.* 23 (1983) 1063–1068.

Sepehr, K.S., Baradaran, B., Mazandarani, M. et al., Studies on the cytotoxic activities of *Punica granatum* L. var. spinosa (Apple Punice) extract on prostate cell line by induction of apoptosis, *ISRN Pharm.* 2012 (2012) 1–6.

Shahidi, F., Zhong, Y., Novel antioxidants in food preservation and health promotion, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 930–940.

Singh, R.P., Chidambara Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K., Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models, *J. Agric. Food. Chem.* 50 (2002) 81–86.

Skala, D., Žižović, I., Petrović, S.S., Etarska ulja-destilacija, ekstrakcija, izbor tehnologije i kvalitet, *Pregledni rad, Hemijska industrija* 53 (1999) 123–139.

Smartt, J., N.W., *Evolution of Crop Plants*. Ed. N.W. Simmonds. London: Longmans, (1976) pp. 350.

Smith, R.M., Supercritical fluids in separation science—the dreams, the reality and the future, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 83–115.

Spilmont, M., Léotoing, L., Davicco, M.J. et al., Pomegranate seed oil prevents bone loss in a mice model of osteoporosis, through osteoblastic stimulation, osteoclastic inhibition and decreased inflammatory status, *J. Nutr. Biochem.* 24 (2013) 1840–8.

Sreekumar, S., Sithul, H., Muraleedharan, P. et al., Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds, *Biomed. Res. Int.* (2014).

Stamenić, M., Zizović, I., Eggers, R. et al., Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 52 (2010) 125–133.

Stanisavljev, D., Fizičkohemijski procesi u mikrotalasnom polju, Fakultet za fizičku hemiju, Pregledni rad, Beograd (2009).

Starmans, D.A.J., Nijhuis, H.H., Extraction of secondary metabolites from plant material: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 7 (1996) 191–197.

Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E., Martinez, J.R., Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity, *J. Chromatogr. A.* 1025 (2004) 93–103.

Stover, E., Mercure, E.W., The pomegranate: a new look at the fruit of paradise, *HortScience* 42 (2007) 1088–1092.

Syed, D.N., Afaq, F., Mukhtar, H., Pomegranate derived products for cancer chemoprevention, *Semin. Cancer Biol.* 17 (2007) 377–385.

Takagi, S., Ienaga, H., Tsuchiya, C. et al., Microwave roasting effects on the composition of tocopherols and acyl lipids within each structural part and section of a soya bean, *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 1155–1162.

Tavakoli, J., Miar, S., Zadehzare, M.M. et al., Evaluation of Effectiveness of Herbal Medication in Cancer Care: A Review Study, *Iran J Cancer Prevent* 5(3) (2012) 144–156.

Thompson, D.L., Jellum, M.D., Young, C.T., Effect of controlled temperature environments on oil content and on fatty acid composition of corn oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 50 (1973) 540–542.

Thoo, Y.Y., Abas, F., Lai, O.M. et al., Antioxidant synergism between ethanolic *Centella asiatica* extracts and  $\alpha$ -tocopherol in model systems, *Food Chem.* 138(2) (2013) 1215–1219.

Thostenson, E.T., Chou, T.W., Microwave processing: Fundamentals and applications, *Compos. Part A, Appl. Sci. Manuf.* 30 (1999) 1055–1071.

Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B. et al., Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil, *Ultrason. Sonochem.* 20 (2013) 202–208.

Tong, P., Kasuga, Y., Khoo, C.S., Liquid chromatographic mass spectrometric method for detection of estrogen in commercial oils and in fruit seed oils, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 150–156.

Tom, B.H., Rutzky, L.P., Jakstys, M.M. et al., Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line, *In Vitro* 12(3) (1976) 180–191.

Tran, V.N., Effects of Microwave Energy on the Strophiole, Seed Coat and Germination of Acacia Seeds, *Aust. J. Plant Physiol.* 6 (1979) 277–287.

Tran, V.N., Cavanagh, A.K., Effects of microwave energy on *Acacia longifolia*, *J Microw Power* 14 (1979a) 21–27.

Uquiche, E., Jeréz, M., Ortíz, J., Effect of pretreatment with microwaves on mechanical extraction yield and quality of vegetable oil from Chilean hazelnuts (*Gevuina avellana* Mol), *Innov Food Sci Emerg Technol* 9 (2008) 495–500.

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

Venkatesh, M.S., Raghavan, S.V., An overview of microwave processing and dielectric properties of agri-food materials, *Biosyst. Eng.* 88 (2004) 1–18.

Verardo, V., Garcia-Salas, P., Baldi, E. et al., Pomegranate seeds as a source of nutraceutical oil naturally rich in bioactive lipids, *Food Res. Int.* 65 (2014) 445–452.

Vidović, S., Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad (2011).

Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J., Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review, *Compr. Rev. Food Sci. Saf.* 9 (2010) 635–654.

Wakao, N., Kaguei, S., Heat and mass transfer in packed beds, Gordon and Breach, New York (1982) 156.

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

Weber, D., Grune, T., The contribution of  $\beta$ -carotene to vitamin A supply of Humans, *Mol Nutr Food Res* 56 (2012) 251–258.

Wolf, W.W., Vaughn, C.R., Harris, R. et al., Insect radar cross-section for aerial density measurement and target classification, *Trans ASABE* 36 (1993) 949–954.

Xhuveli, L., Albania, the domestication country for pomegranate (*Punica granatum* L.), *Genetic Resources and Crop Evolution* 59 (2012) 1605–1610.

Yamasaki, M., Kitagawa, T., Koyanagi, N. et al., Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice, *Nutrition* 22 (2006) 54–59.

Yang, G., Li, X., Li, X. et al., Traditional Chinese medicine in cancer care: A review of case series published in the Chinese literature, *Evid Based Complement Alternat Med* 2012 (2012).

Yaniv, Z., Ranen, C., Levy, A. et al., Effect of temperature on the fatty acid composition and yield of evening primrose (*Oenothera lamarckiana*) seeds, *J. Ex. Bot.* 40 (1989) 609–613.

Yen, G.C., Influence of Seed Roasting Process on the Changes in Composition and Quality of Sesame (*Sesamum indicum*) Oil, *J. Sci. Food Agric.* (50) (1990) 563–570.

Yoshida, H., Hirakawa, Y., Tomiyama, Y. et al., Fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in peanut seeds (*Arachis hypogaea* L.) following microwave treatment, *J. Food Compos. Anal.* 18 (2005) 3–14.

Yoshida, H., Tomiyama, Y., Hirakawa, Y. et al., Microwave roasting effects on the oxidative stability of oils and molecular species of triacylglycerols in the kernels of pumpkin (*Cucurbita spp.*) seeds, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 330–339.

Zhao, S., Zhang, D., A parametric study of supercritical carbon dioxide extraction of oil from *Moringa oleifera* seeds using a response surface methodology, *Sep. Purif. Technol.* 113 (2013) 9–17.

Zukhovskij, P.M., *Cultivated Plants and their Wild Relatives*, State Publishing House, Soviet Science, Moscow, (1950) 60–61.

## PRILOG

Tabela P1. Eksperimentalni podaci (vreme ekstrakcije, potrošnja rastvarača i prinos ekstrakta) dobijeni procesom NKE semena divljeg nara i mikrotalasnim predtretmanom od 100 W tokom 2 i 6 minuta

100 W					
2 min			6 min		
t (min)	mCO <sub>2</sub> /mBM	Y (%)	t (min)	mCO <sub>2</sub> /mBM	Y (%)
32	19,65	1,774	51	19,81	2,682
63	39,29	4,131	92	39,62	4,710
102	58,94	6,971	135	59,44	7,366
147	78,58	9,662	178	79,25	9,988
192	98,23	11,924	221	99,06	12,001
235	117,87	13,849	266	118,87	13,742
280	137,52	15,483	309	138,69	15,247
325	157,16	16,862	352	158,50	16,513
370	176,81	18,048	397	178,31	17,515
415	196,45	18,978	442	198,12	18,378
460	216,10	21,972	490	217,93	19,641
507	235,74	22,742	535	237,75	20,724
555	255,39	23,466	580	257,56	21,380
599	275,04	23,865	625	277,37	22,284
642	294,68	24,224	669	297,18	22,667
686	314,33	24,525	714	316,99	23,120
731	333,97	24,883	759	336,81	23,412
776	353,62	25,153	804	356,62	23,702
810	368,35	25,345	839	371,48	23,913
844	383,09	25,518	874	386,34	24,003
865	388,20	25,520	894	388,09	24,011



Tabela P2. Eksperimentalni podaci (vreme ekstrakcije, potrošnja rastvarača i prinos ekstrakta) dobijeni procesom NKE semena divljeg nara i mikrotalasnim predtretmanom od 250 W tokom 2 i 6 minuta

<b>250 W</b>					
<b>2 min</b>			<b>6 min</b>		
t (min)	mCO <sub>2</sub> /mBM	Y (%)	t (min)	mCO <sub>2</sub> /mBM	Y (%)
19	9,99	0,759	20	9,88	1,025
40	19,98	2,854	40	19,76	3,483
58	29,98	4,410	59	29,65	5,492
78	39,97	6,347	79	39,53	6,541
95	49,96	7,935	99	49,41	7,737
112	59,95	9,370	118	59,29	9,243
133	69,94	11,030	138	69,18	10,683
153	79,94	12,666	156	79,06	12,067
171	89,93	13,823	176	88,94	13,514
191	99,92	15,028	196	98,82	14,746
209	109,91	16,15	216	108,71	15,95
228	119,91	17,22	236	118,59	16,88
247	129,90	18,180	256	128,47	17,62
267	139,89	19,089	276	138,35	18,38
286	149,88	19,829	296	148,24	19,06
305	159,87	20,474	316	158,12	19,61
324	169,86	21,059	336	168,00	20,15
343	179,86	21,696	356	177,88	20,70
362	189,85	22,322	376	187,77	21,23
380	199,84	22,629	396	197,65	21,755
400	209,83	23,609	416	207,53	22,754
420	219,82	24,244	436	217,41	23,595
443	229,82	24,724	456	227,30	24,134

Tabela P2. Nastavak

<b>250 W</b>					
<b>2 min</b>			<b>6 min</b>		
t (min)	m <sub>CO2</sub> /m <sub>BM</sub>	Y (%)	t (min)	m <sub>CO2</sub> /m <sub>BM</sub>	Y (%)
462	239,81	25,196	476	237,18	24,542
480	249,80	25,499	496	247,06	24,830
499	259,79	25,886	516	256,94	25,141
519	269,78	25,859	597	296,47	25,982
536	279,78	25,874	637	316,24	26,284
576	300,01	25,881	710	355,77	26,851
659	335,14	25,893	730	365,65	27,025
704	364,08	25,909	750	375,53	27,150
741	384,51	25,894	770	385,42	27,235

Tabela P3. Eksperimentalni podaci (vreme ekstrakcije, potrošnja rastvarača i prinos ekstrakta) dobijeni procesom NKE semena divljeg nara i mikrotalasnim predtretmanom od 600 W tokom 2 i 6 minuta

<b>600 W</b>					
<b>2 min</b>			<b>6 min</b>		
t (min)	m <sub>CO2</sub> /m <sub>BM</sub>	Y (%)	t (min)	m <sub>CO2</sub> /m <sub>BM</sub>	Y (%)
20	9,92	0,636	38	19,90	2,295
40	19,84	2,666	76	39,80	5,301
60	39,134	6,134	113	59,71	8,856
108	59,53	9,717	147	79,61	11,249
153	79,37	12,510	183	99,51	13,363
199	99,22	14,220	218	119,41	14,951
242	119,06	15,778	254	139,32	16,208
282	138,91	17,001	290	159,22	17,264
325	158,75	18,032	326	179,12	18,165
369	178,59	19,011	362	199,02	19,093

Tabela P3. Nastavak

<b>600 W</b>					
<b>2 min</b>			<b>6 min</b>		
t (min)	m <sub>CO2</sub> /m <sub>BM</sub>	Y (%)	t (min)	m <sub>CO2</sub> /m <sub>BM</sub>	Y (%)
428	198,44	20,642	398	218,93	19,682
477	218,28	21,607	433	238,83	21,038
531	238,12	22,168	467	258,73	22,502
585	253,01	22,544	500	278,63	23,338
628	272,85	23,050	533	298,54	23,798
668	292,69	23,417	567	318,44	24,201
708	312,54	23,683	599	338,34	24,527
748	332,38	23,865	637	358,24	24,868
779	352,22	23,909	664	378,15	25,084
809	372,54	23,915	680	388,10	25,207

## Biografija autora

Sanja Đurđević je rođena 1984. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 2010. godine na Katedri za organsku hemijsku tehnologiju Tehnološko–metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Diplomski rad na temu „Antimikrobna svojstva srebro/poli(2–hidroksietilakrilat/itakonska kiselina) hibridnih hidrogelova prema sojevima bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* u toku kontrolisanog otpuštanja jona srebra” pod rukovodstvom mentora prof. dr Aleksandre Perić–Grujić odbranila je sa ocenom 10. U toku studiranja obavila je stručnu studentsku praksu u trajanju od mesec dana u farmaceutsko–hemijskoj industriji Hemofarm A.D u Vršcu.

Doktorske studije upisala je 2012. godine na smeru Hemija. Prvu i drugu godinu doktorskih studija završila je sa prosečnom ocenom 9,82. Odbranila je završni ispit pod nazivom „Intenzifikacija procesa ekstrakcije iz semena nara primenom mikrotalasa” pod rukovodstvom mentora prof. dr Slobodana Petrovića.

Sanja Đurđević je objavila dva naučna rada, kao prvi autor u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), kao i nekoliko saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima štampanim u izvodu ili u celini.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Сања Ђурђевић

Број индекса 4042/2012

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Оптимизација процеса екстракције уља дивљег нара (*Punica granatum L.*)  
применом микроталаса и испитивање биолошке активности добијеног уља**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, 24.12.2018.

---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Сања Ђурђевић

Број индекса: 4042/2012

Студијски програм: Хемија

Наслов рада: **Оптимизација процеса екстракције уља дивљег нара (*Punica granatum* L.) применом микроталаса и испитивање биолошке активности добијеног уља**

Ментори: проф. Др Слободан Петровић и Др Катарина Шавикин

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 24.12.2018.

---

## Изјава о коришћењу

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

**Оптимизација процеса екстракције уља дивљега нара (*Punica granatum* L.) применом микроталаса и испитивање биолошке активности добијеног уља**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

**Потпис аутора**

У Београду, 24.12.2018.

---