



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

Branimir Pavlić, master inženjer

Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Salvia officinalis* L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

Mentor: Prof. dr Zoran Zeković

Novi Sad, 2017.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Branimir Pavlić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Zoran Zeković, redovni profesor
Naslov rada: NR	Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (<i>Salvia officinalis</i> L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada: FO	(7 poglavlja / 173 stranice / 42 slike / 32 tabele / 158 referenci / 36 priloga)
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Farmaceutsko inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Salvia officinalis</i> , savremene ekstrakcione tehnike, polifenoli, etarsko ulje, <i>spray drying</i> , biološka aktivnost
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Glavni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bio valorizacija sporednog proizvoda žalfije (<i>Salvia officinalis</i> L.) iz fabrike čaja za dobijanje visokovrednih ekstrakata željenih osobina koji bi imali primenu u gotovim proizvodima prehrambene, kozmetičke i farmaceutske industrije.</p> <p>U cilju ekstrakcije polifenolnih jedinjenja su primenjene konvencionalne (maceracija) i savremene (ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija i ekstrakcija subkritičnom vodom) ekstrakcione tehnike. U postupku maceracije je optimizovana koncentracija etanola u ekstragensu, dok je za optimizaciju savremenih ekstrakcionih tehnika primenjen eksperimentalni dizajn i metoda odzivne površine. Prinos polifenola (ukupnih fenola i ukupnih flavonoida) i antioksidativna aktivnost određena različitim <i>in vitro</i> testovima su bili ispitivani odzivi. Za svaki od navedenih ekstrakcionih postupaka je ispitivan uticaj glavnih ekstrakcionih parametara: ultrazvučna ekstrakcija (temperatura, vreme ekstrakcije i snaga ultrazvuka), mikrotalasna ekstrakcija (koncentracija etanola, vreme ekstrakcije i odnos rastvarač-droga) i ekstrakcija subkritičnom vodom (temperatura, vreme ekstrakcije i koncentracija HCl u ekstragensu). Tečni ekstrakti dobijeni</p>

	<p>ultrazvučnom, mikrotalasnom i subkritičnom ekstrakcijom su pokazali izuzetno visoku antioksidativnu aktivnost određenu „hvatanjem“ DPPH i O_2^- radikala i kapacitetom redukcije Fe^{3+} jona i imali su znatno veći sadržaj polifenola u odnosu na ekstrakte dobijene maceracijom.</p> <p>U cilju ekstrakcije terpenoidnih jedinjenja su primenjeni postupci Soxhlet ekstrakcije, destilacije vodenom parom i ekstrakcije superkritičnim CO_2. Postupak superkritične ekstrakcije je optimizovan metodom odzivne površine i optimalni uslovi ekstrakcije su bili pritisak 290 bar, temperatura $55^\circ C$ i protok CO_2 od 0,4 kg/h, dok su predviđene i eksperimentalne vrednosti prinosa ekstrakcije bile 8,90 i 8,84%. Hemijskom analizom lipofilnih ekstrakata i etarskog ulja je utvrđeno da su oksidovani monoterpeni (α-tujon i kamfor), oksidovani seskviterpeni (viridiflorol) i polifenolni diterpeni (epirosmanol) dominantna jedinjenja prisutna u ovim uzorcima.</p> <p>Tečni ekstrakti žalfije dobijeni konvencionalnim i savremenim ekstrakcionim tehnikama su <i>spray drying</i> tehnikom osušeni u cilju prevođenja u stabilniju formu suvog ekstrakta. Suvim ekstraktima su određene fizičko-hemijske osobine (hemijski sastav, sadržaj vlage, higroskopnost, moć rehidratacije, WAI i WSI) i biološka aktivnost (antimikrobna i antioksidativna aktivnost) i procenjena je njihova mogućnost primene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	02.03.2017.
Datum odbrane: DO	

Članovi komisije: KO	predsednik: dr Senka Vidović, docent, Tehnološki fakulteta u Novom Sadu član: dr Zoran Zeković, redovni profesor, Tehnološki fakulteta u Novom Sadu član: dr Stela Jokić, vanredni profesor, Prehrambeno-tehnološki fakulteta u Osijeku član: dr Dušan Rakić, docent, Tehnološki fakulteta u Novom Sadu
-------------------------	--

University of Novi Sad
Faculty of Technology
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Branimir Pavlić
Mentor: MN	Dr Zoran Zeković
Title: TI	Valorization of sage (<i>Salvia officinalis</i> L.) by-product for recovery of bioactive compounds by novel extraction techniques
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2017.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Physical description: PD	(7 chapters / 173 pages / 42 figures / 32 tables / 158 references / 36 appendices)
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Pharmaceutical engineering
Subject, Key words SKW	<i>Salvia officinalis</i> , novel extraction techniques, polyphenols, essential oil, spray drying, biological activity
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	None
Abstract: AB	<p>The main aim of this dissertation was valorization of sage (<i>Salvia officinalis</i> L.) by-product from filter-tea factory for recovery of high-value extracts with desirable properties for application in food, cosmetics and pharmaceutical products. Conventional (maceration) and novel (ultrasound-assisted, microwave-assisted and subcritical water extraction) extraction techniques were applied for polyphenols recovery. Ethanol concentration was optimized in maceration process, while experimental design and response surface methodology were applied for optimization of novel extraction techniques. Polyphenols yield (total phenols and total flavonoids) and antioxidant activity, determined by various <i>in vitro</i> assays, were investigated responses. Influence of main process parameters was determined for each technique: ultrasound-assisted extraction (temperature, extraction time and ultrasonic power), microwave-assisted extraction (ethanol concentration, extraction time and sample-solvent ratio) and subcritical water extraction (temperature, extraction time and HCl concentration in solvent). Liquid extracts obtained by novel extraction technique exhibited higher antioxidant activity determined by scavenging of DPPH and O₂⁻ radicals and reduction of Fe³⁺ and also provided higher polyphenols yield comparing to extracts obtained by maceration.</p>

	<p>Soxhlet extraction, hydrodistillation and supercritical fluid extraction were applied for terpenoids recovery. Supercritical fluid extraction process was optimized by response surface methodology and optimal conditions were pressure of 290 bar, temperature of 55°C and CO₂ flow rate of 0.4 kg/h, while predicted and experimentally obtained values of total extraction yield at these conditions were 8.90 i 8.84%, respectively. According to chemical analysis, the most abundant compounds in lipid extracts and essential oil were oxygenated monoterpenes (α-thujone and camphor), oxygenated sesquiterpenes (viridiflorol) and diterpene polyphenols (epirosmanol). Sage liquid extracts obtained by conventional and novel extraction techniques were spray dried in order to obtain dry extract form. Physico-chemical properties (chemical profile, moisture content, hygroscopicity, rehydration time, WAI and WSI) and biological activity (antimicrobial and antioxidant activity) were determined in dry extracts and their potential application in food and pharmaceutical formulations was discussed.</p>
Accepted on Senate on: AS	2 nd March 2017.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: dr Senka Vidović, assistant professor, Faculty of Technology, Novi sad member: dr Zoran Zeković, full professor, Faculty of Technology, Novi sad member: dr Stela Jokić, associate professor, Faculty of Food Technology, Osijek member: dr Dušan Rakić, assistant professor, Faculty of Technology, Novi sad</p>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Žalfija	3
2.1.1. Taksonomija i rasprostranjenost.....	4
2.1.2. Bioaktivna jedinjenja žalfije.....	4
2.1.2.1. Polifenolna jedinjenja	4
2.1.2.2. Etarsko ulje	6
2.2. Filter čaj	7
2.3. Savremene ekstrakcione tehnike	8
2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija	10
2.3.1.1. Parametri koji utiču na proces.....	12
2.3.1.2. Procesna oprema.....	14
2.3.1.3. Primena UAE za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora	16
2.3.2. Mikrotalasna ekstrakcija	17
2.3.2.1. Parametri koji utiču na proces.....	18
2.3.2.2. Procesna oprema.....	20
2.3.2.3. Primena MAE za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora.....	22
2.3.3. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju	24
2.3.3.1. Parametri koji utiču na proces.....	25
2.3.3.2. Procesna oprema.....	29
2.3.3.3. Primena SWE za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora.....	30
2.3.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom.....	33
2.3.4.1. Parametri koji utiču na proces.....	35
2.3.4.2. Procesna oprema.....	38
2.3.4.3. Primena SFE za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora.....	40
2.4. Spray drying.....	42
2.4.1. Nosači	46
2.5. Eksperimentalni dizajn	47
3. EKSPERIMENTALNI DEO	51
3.1. Biljni materijal.....	51
3.2. Hemikalije i reagensi.....	51
3.3. Karakterizacija biljnog materijala	53

3.3.1. Određivanje sadržaja vlage	53
3.3.2. Određivanje sadržaja pepela.....	53
3.3.3. Određivanje sadržaja etarskog ulja	53
3.4. Ekstrakcija.....	53
3.4.1. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja	53
3.4.1.1. Konvencionalna Č/T ekstrakcija.....	53
3.4.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija.....	54
3.4.1.3. Mikrotalasna ekstrakcija.....	54
3.4.1.4. Ekstrakcija subkritičnom vodom.....	55
3.4.2. Ekstrakcija lipofilnih jedinjenja i etarskog ulja	55
3.4.2.1. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom	55
3.4.2.2. Destilacija vodenom parom.....	56
3.4.2.3. Soxhlet ekstrakcija	57
3.5. Hemijska karakterizacija tečnih ekstrakata	57
3.5.1. Analiza polifenolnih jedinjenja	57
3.5.1.1. Sadržaj ukupnih fenola (UF)	57
3.5.1.2. Sadržaj ukupnih flavonoida (UF).....	58
3.5.1.3. HPLC analiza fenolnih kiselina	58
3.5.1.4. Antioksidativna aktivnost	59
3.5.2. Analiza terpenoidnih jedinjenja	61
3.6. Eksperimentalni dizajn i optimizacija ekstrakcije	62
3.7. Dobijanje suvih ekstrakata <i>spray drying</i> tehnikom	64
3.7.1. Priprema napojne smeše.....	64
3.7.2. <i>Spray drying</i>	65
3.8. Karakterizacija suvih ekstrakata	66
3.8.1. Hemijska karakterizacija.....	66
3.8.2. Biološka aktivnost suvih ekstrakata	66
3.8.2.1. <i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost	66
3.8.2.2. Antimikrobna aktivnost	66
3.8.3. Fizičke osobine suvih ekstrakata	68
3.8.3.1. Efikasnost sušenja.....	68
3.8.3.2. Sadržaj vlage	68
3.8.3.3. Higroskopnost.....	68
3.8.3.4. Vreme rehidracije.....	69

3.8.3.5. Indeks apsorpcije vode (WAI) i indeks rastvorljivosti u vodi (WSI)	69
3.9. Statistička analiza	69
4. REZULTATI I DISKUSIJA	70
4.1. Karakterizacija sirovine i konvencionalna Č/T ekstrakcija	70
4.2. Ultrazvučna ekstrakcija (UAE)	72
4.2.1. Provera modela	72
4.2.2. Uticaj parametara ultrazvučne ekstrakcije.....	74
4.2.3. Optimizacija procesa	77
4.3. Mikrotalasna ekstrakcija (MAE)	78
4.3.1. Provera modela	72
4.3.2. Uticaj parametara MAE	81
4.3.3. Optimizacija procesa	82
4.3.3. Antioksidativna aktivnost ekstrakata SPŽ dobijenih ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom	82
4.3.5. HPLC analiza ekstrakata	85
4.4. Ekstrakcija subkritičnom vodom.....	87
4.4.1. Provera modela	88
4.4.2. Uticaj parametara SWE	88
4.4.3. Antioksidativna aktivnost ekstrakata SPŽ dobijenih subkritičnom vodom	94
4.4.4. Optimizacija procesa	96
4.5. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom	99
4.5.1. Provera modela	101
4.5.2. Uticaj parametara SFE	101
4.5.2.1. Uticaj pritiska	102
4.5.2.2. Uticaj temperature	103
4.5.2.3. Uticaj protoka CO ₂	104
4.5.3. Optimizacija procesa	106
4.5.4. Hemijski sastav lipofilnih ekstrakata i etarskog ulja	106
4.6. <i>Spray drying</i>	114
4.6.1. Karakterizacija napojne smeše.....	114
4.6.2. Biohemijske karakteristike suvih ekstrakata	115
4.6.2.1. Sadržaj polifenola	115
4.6.2.2. Antioksidativna aktivnost	119

4.6.2.3. Antimikrobna aktivnost	121
4.6.3. Fizičke karakteristike suvih ekstrakata	124
4.6.3.1. Sadržaj vlage	125
4.6.3.2. Higroskopnost.....	126
4.6.3.3. Vreme rehidracije.....	127
4.6.3.4. WAI i WSI	127
5. ZAKLJUČCI	130
6. LITERATURA	133
7. PRILOG.....	149

1. UVOD

Lekovito bilje i proizvodi dobijeni iz prirodnih sirovina imaju sve veću primenu kao supstitucija za sintetske lekove. Interesovanje za razvoj proizvoda na bazi lekovitog bilja se javilo usled brojnih nedostataka konvencionalnih lekova (neželjena dejstva i njihova zloupotreba), kao i ogromnog uticaja na zagađenje životne sirovine koji izaziva sintetska hemijska industrija. Prema tome, veliki udeo svetske populacije se vraća tradicionalnoj medicini i prirodnim proizvodima. Kao polazni materijal za dobijanje prirodnih bioaktivnih jedinjenja se najviše koristi lekovito bilje. Međutim, poznato je da prirodni resursi, koji se koriste kao polazni materijal u proizvodnji, nisu dovoljno iskorišćeni od savremene prehrambene, kozmetičke i farmaceutske industrije. Žalfija se komercijalno najviše koristi u obliku biljnog čaja, ali i za dobijanje etarskog ulja postupkom destilacije vodenom parom. Sadrži veliki udeo bioaktivnih jedinjenja koja mogu biti izolovana iz biljnog materijala i iskorišćena za proizvodnju visoko-vrednih proizvoda.

Što se prehrambene industrije tiče, izražen negativan uticaj na životnu sredinu ima generisanje velikih količina sporednih proizvoda i otpada, kako u svetu, tako i u Srbiji. To direktno utiče na smanjenje isplativosti samog procesa proizvodnje usled slabog iskorišćenja potencijala prirodne sirovine, ali i na zagađivanje životne sredine. S obzirom da poljoprivredni otpad ili sporedni proizvodi iz prehrambene industrije sadrže određene količine vrednih bioaktivnih jedinjenja, postoji tendencija za njihovo dalje iskorišćavanje kao polaznog materijala za ekstrakciju. Prema tome, sporedni proizvod koji se generiše u fabrici filter čaja, tj. fini biljni prah, ima veliki potencijal da bude valorizovan za dobijanje velikog broja bioaktivnih jedinjenja, u zavisnosti od same vrste biljne sirovine.

Nedovoljno iskorišćenje prirodnih resursa je, takođe, posledica primene tradicionalnih postupaka ekstrakcije koji ne mogu da odgovore na ekonomske aspekte procesa proizvodnje u pogledu potrošnje vremena, energije i rastvarača. S tim u vezi, teži se razvoju savremenih ekstrakcionih postupaka koji će smanjiti potrošnju u samom procesu proizvodnje i istovremeno povećati prinos i kvalitet proizvoda koji se dobija. Takve tehnologije su upravo ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija i visoko-pritisne ekstrakcije tehnologije, kao što su ekstrakcija subkritičnom vodom i superkritičnim

gasovima, pre svega ugljendioksidom. Prema tome, iskorišćenje sporednih proizvoda prehrambene industrije kao polaznog materijala za ekstrakciju savremenim ekstrakcionim tehnikama predstavlja izazov koji je potrebno rešiti u pogledu optimizacije parametara samog procesa i dobijanja visoko-vrednog proizvoda željenih osobina.

Glavni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je valorizacija sporednog proizvoda žalfije iz fabrike čaja korišćenjem savremenih ekstrakcionih tehnika. Krajnji rezultat bi bio dobijanje ekstrakata željenih osobina koji bi imali primenu u gotovim proizvodima prehrambene, kozmetičke i farmaceutske industrije.

Odabranim savremenim ekstrakcionim tehnikama (ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija, ekstrakcija subkritičnom vodom i ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom) će biti ekstrahovane dve glavne grupe bioaktivnih jedinjenja žalfije (polifenolna jedinjenja i etarsko ulje). Svaka ekstrakciona tehnika će biti posebno optimizovana u smislu definisanja glavnih parametara ekstrakcije u cilju dobijanja maksimalnog prinosa ekstrakcije, ciljanih grupa jedinjenja i bioloških osobina ekstrakata (*in vitro* antioksidativna aktivnost). To će omogućiti međusobno poređenje ispitivanih tehnika i definisanje najbolje ekstrakcione tehnike za ciljnu grupu jedinjenja.

Tečni ekstrakti dobijeni na optimalnim uslovima će biti osušeni sušenjem raspršivanjem (*spray drying*) i suvim ekstraktima će biti definisane najvažnije fizičke i hemijske osobine, kao i biološka aktivnost. Krajnji cilj je dobijanje kvalitetnih suvih ekstrakata koji mogu biti direktno dodati u hranu, dijetetske suplemente i farmaceutske formulacije.

2. OPŠTI DEO

2.1. Žalfija

Žalfija (*Salvia officinalis* L.) predstavlja jednu od komercijalno najvažnijih biljnih vrsta iz porodice *Lamiaceae*. Predstavlja višegodišnji, razgranat grm visine od 50 do 90 cm. Stabljika je drvenasta, višegodišnja i četvorouglasta, dok su listovi srebrenozeleni zbog velikog broja dlačica. Cvetovi su plavo-ljubičasti, ponekad ružičasto-beličasti (Slika 1). Cijela biljka je vrlo aromatičnog i karakterističnog mirisa (Tucakov, 1984). Žalfija zauzima značajno mesto u tradicionalnoj medicini za tretman različitih oboljenja, a to govori i poreklo njenog imena (*salvere*) što na laticinskom znači spasiti. Najčešće je bila korišćena za lečenje oboljenja usne duplje i upale grla, a Rimljani su je zvali sveta biljka. Kao homeostatski lek i diuretik su je koristili Hipokrat (460 – 370 god. pre n.e.), Galen (130 – 210 god.) i Paracelzus (1493 – 1541 god.), a u XVII veku je donešena u Severnu Ameriku (Grdiša i sar., 2015).



Slika 1. *Salvia officinalis* L.

Ova droga je i danas veoma cenjena usled sve veće upotrebe prirodnih proizvoda i bioaktivnih jedinjenja u modernoj medicini. Kao droga se propisuje lišće žalfije (*Salviae folium*), etarsko ulje (*Salviae aetheroleum*) i tinktura, koji su oficinalni po evropskoj farmagopeji (*Ph. Eur.* 6). Do danas je dokazano da žalfija i preparati ili bioaktivna jedinjenja izolovana iz ove biljke poseduju širok spektar biološke aktivnosti kao što su antidiabetička,

antioksidativna, gastroprotektivna, antiinflamatorna, antivirusna, fungicidna, baktericidna, spazmolitička i antikancerogena aktivnost (Grdiša i sar., 2015).

2.1.1. Taksonomija i rasprostranjenost

U Tabeli 1 je prikazana taksonomija žalfije. Pripada familiji *Lamiaceae* koju čine oko 240 rodova, a rod *Salvia* je najveći među njima sa oko 1000 vrsta koje karakteriše izražen aromatičan miris. Vrste ovog roda su rasprostranjene po celom svetu, a pogotovo u Evropi, oko mediteranskog pojasa. Pored toga su rasprostranjene u jugoistočnoj Aziji i Južnoj Americi (Ulubelen, 2000). *S. officinalis* je posebno karakteristična za zemlje Zapadnog Balkana (Bosna i Hercegovina, Crna Gora, Hrvatska, Albanija i sever Grčke). Usled visoke tržišne vrednosti njeog etarskog ulja, ova biljna vrsta se danas uzgaja i u drugim mediteranskim državama (Malta, Španija i Portugal).

Tabela 1. Taksonomija žalfije (*Salvia officinalis* L.)

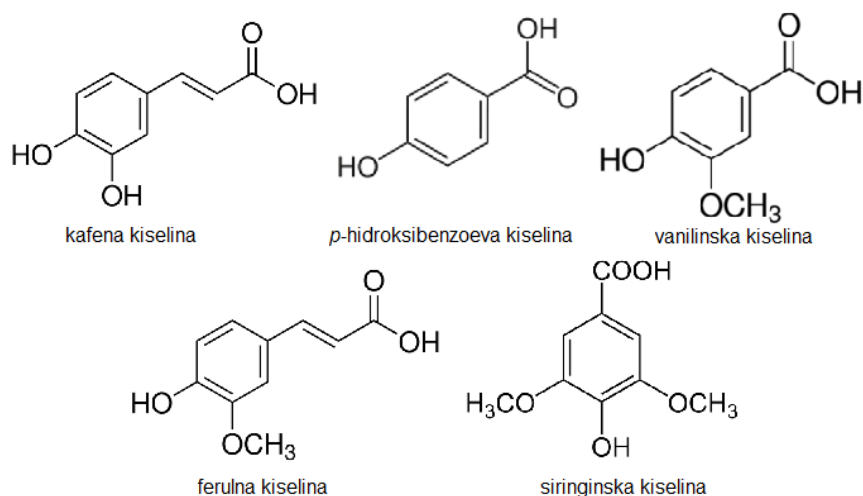
<i>Regnum</i>	<i>Plantae</i>
<i>Divisio</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Clasis</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Ordo</i>	<i>Lamiales</i>
<i>Familia</i>	<i>Lamiaceae</i>
<i>Genus</i>	<i>Salvia</i>
<i>Species</i>	<i>Salvia officinalis</i>

2.1.2. Bioaktivna jedinjenja žalfije

2.1.2.1. Polifenolna jedinjenja

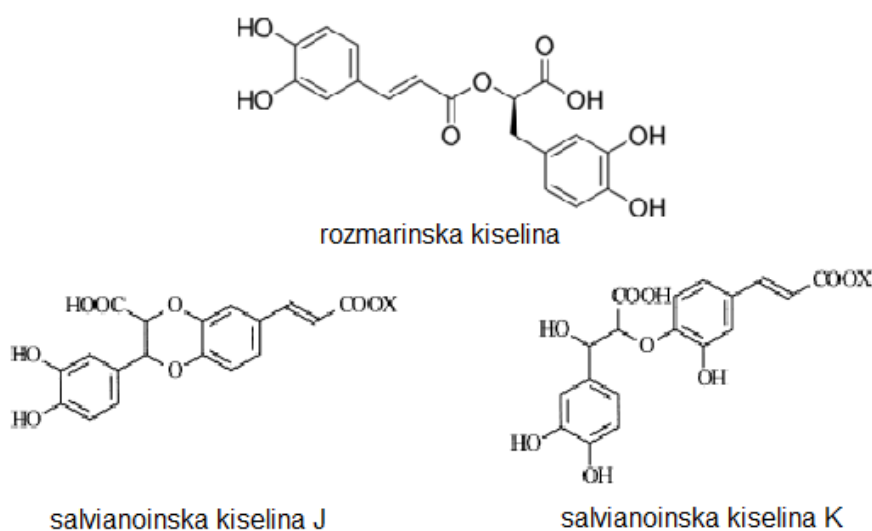
Fenolne kiseline predstavljaju dominantna bioaktivna jedinjenja u polarnim ekstraktima žalfije, a među njima se posebno izdvajaju derivati kafene kiseline. Kafena kiselina ima ključnu ulogu u biohemijskim procesima biljaka iz familije *Lamiaceae*, i obično se nalazi u formi dimera (rozmarinska kiselina). Kafena kiselina u žalfiji predstavlja gradivnu jedinicu za veliki broj sekundarnih metabolita, od jednostavnih monomera, do različitih proizvoda kondenzacije (Lu i Foo, 2002). Trimeri i tetrameri kafene kiseline su od posebnog interesa jer poseduju izraženu biološku aktivnost. Monomerni derivati kafene kiseline koji su

prisutni u žalfiji su *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, ferulna i siringinska kiselina (Dent i sar., 2013), čije su strukture prikazane na Slici 2.



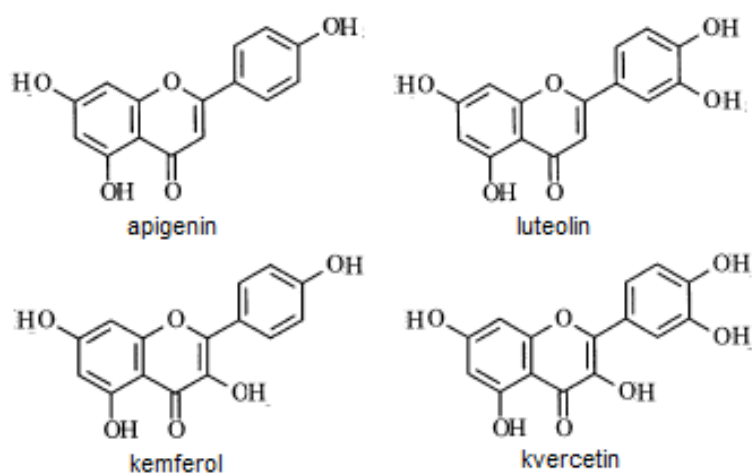
Slika 2. Monomeri kafene kiseline prisutni u žalfiji

Što se oligomera kafene kiseline tiče, rozmarinska kiselina predstavlja daleko nazastupljenije jedinjenje u žalfiji, i predstavlja jedno od glavnih jedinjenja odgovornih za izraženu antioksidativnu aktivnost (Cuvelier i sar., 1996). Trimeri kafene kiseline prisutni u žalfiji obuhvataju salvinoinsku kiselinu J i K, koje su pored žalfije detektovani i u 10 drugih vrsta roda *Salvia* (Lu i Foo, 2002; Dent i sar., 2013). U žalfiji su zastupljeni još i tetrameri kafene kiseline koji predstavljaju kondenzate rozmarinske kiseline, međutim, njihov sadržaj u odnosu na ostale derivate je dosta manji.



Slika 3. Dimeri i trimeri kafene kiseline prisutni u žalfiji

Flavnoidi se u biljkama roda *Salvia* uglavnom nalaze u obliku flavona, flavonola i njihovih glikozida, a za ovaj rod su posebno karakteristični 6-hidroksilovani flavoni (Lu i Foo, 2002). Dominantni flavnoidi u *S. officinalis* su metoksi derivati apigenina i luteolina, a pored njih se nalaze i 6-hidroksilovani flavoni kao što su skutelarein i hispidulin. Što se flavonola tiče, oni su uglavnom metoksi derivati kemferola i kvercetina. Flavnoidni glikozidi žalfije su derivati apigenina i luteolina kod kojih je hidroksi grupa u C7 položaju supstituísana šećernom komponentom (glukoza, rutinoza i glukuronska kiselina) (Lu i Foo, 2002). Hemijske strukture glavnih flavonoidnih aglikona od kojih je izgrađena većina flavonoida žalfije su prikazani na Slici 4.

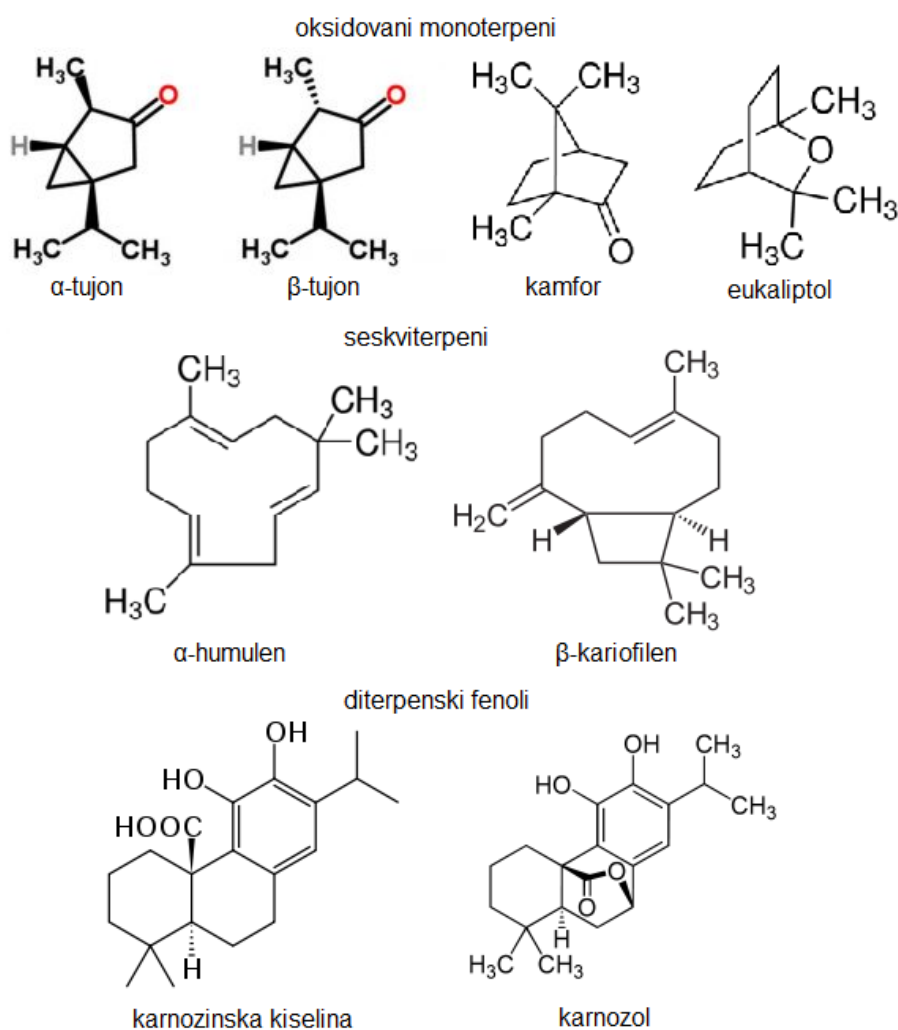


Slika 4. Flavonoidni aglikoni žalfije

2.1.2.2. Etarsko ulje

Žalfija je posebno cenjena zbog svog etarskog ulja koje sadrži niz bioaktivnih jedinjenja. *S. officinalis* ima najveći sadržaj etarskog ulja od svih vrsta roda *Salvia* (Newall i sar., 1996). Glavni konstituenti etarskog ulja su monoterpenka jedinjenja kao što su α -tujon, β -tujon, kamfor i eukaliptol, dok se u manjem procentu nalaze seskviterpeni (α -humulen, β -kariofilen i njihovi derivati) (Grdiša i sar., 2015). U etarskom ulju se nalaze i diterpenski polifenoli kao što su karnozol, rosmanol, epirosmanol, karnozinska kiselina, itd. Ova jedinjenja se odlikuju posebno visokom antioksidativnom aktivnošću (Babović i sar., 2010). Sadržaj etarskog ulja i jedinjenja prisutnih u njemu može da varira u zavisnosti od geografskog porekla. Žalfija sadrži od 0,7 do 5,2% (v/m) etarskog ulja, čiji prinos u velikoj

meri zavisi i od primenjene ekstrakcione tehnike (Glišić i sar., 2010). Hemijske strukture glavnih konstituenata etarskog ulja žalfije su prikazane na Slici 5.

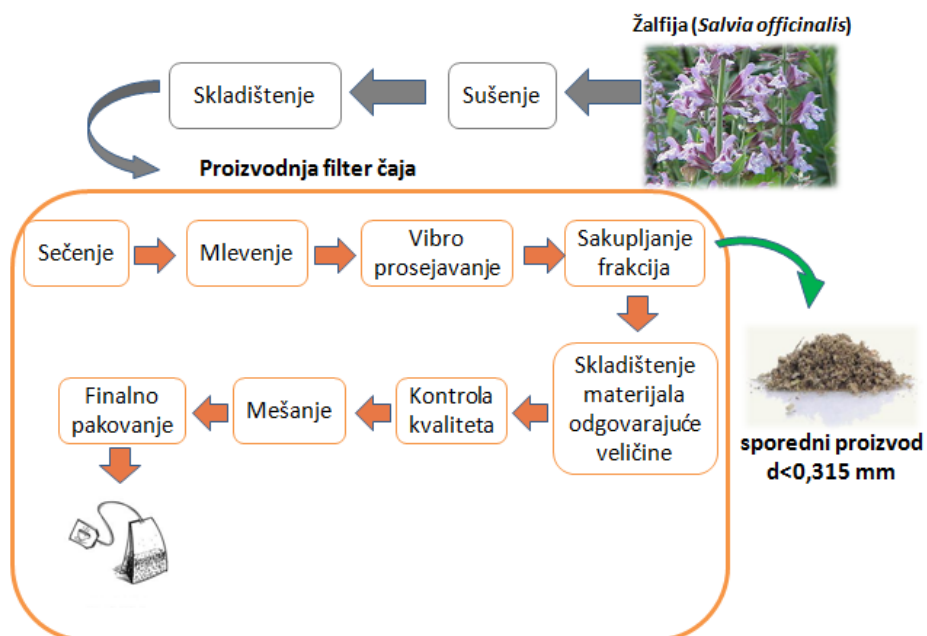


Slika 5. Terpenoidna jedinjenja prisutna u etarskom ulju žalfije

2.2. Filter čaj

Danas se lekovito bilje na tržištu najčešće nalazi u obliku biljnog čaja, koji je postao jedno od omiljenih pića, kako u svetu, tako i u Srbiji (Vidović i sar., 2013). Šema tehnološkog procesa proizvodnje filter čaja je prikazana na Slici 6, odakle se može uočiti da se u proizvodnji čaja koriste različite tehnološke operacije kao što su sušenje, usitnjavanje, prosejavanje, mešanje, itd. Međutim, tokom proizvodnje filter čaja, odnosno tokom operacije usitnjavanja, nastaje određena količina finog biljnog praha (oko 20%) (Ramić i sar., 2015). Ova frakcija ne može da se koristi za pakovanje filter čaja s obzirom da je njen prečnik čestica (<0,315 mm) manji od veličine pora filter kesice. Prema tome, ova frakcija se

odbacuje iz proizvodnje kao sporedni proizvod. Iako u proizvodnji filter čaja dolazi do određene degradacije bioaktivnih jedinjenja u odnosu na polazni biljni materijal (Vidović i sar., 2013), ovaj sporedni proizvod i dalje sadrži značajnu količinu visoko-vrednih jedinjenja. Pored toga, ovakav materijal predstavlja i pogodnu sirovinu za čvrsto-tečnu (Č/T) ekstrakciju s obzirom na relativno mali prečnik čestica koji smanjuje ograničenja za prenos mase iz čvrste u tečnu fazu. S obzirom na navedene činjenice, postoji sve veći interes za upotrebu biljnog praha kao polazne sirovine za ekstrakciju biološki važnih jedinjenja. Tokom proizvodnje jednokomponentnog filter čaja od žalfije ili čajne mešavine u filter vrećicama koja sadrži žalfiju, dobija se oko 10 – 20% sporednog proizvoda žalfije (SPŽ). Ova frakcija može da se podvrgne aglomeraciji i da se povećanjem prečnika čestica dobije biljni materijal koji može da se pakuje u filter kesice, međutim, ovaj postupak se obično ne izvodi u malim i srednjim preduzećima. S obzirom na visok sadržaj bioaktivnih jedinjenja u nativnoj žalfiji, SPŽ bi potencijalno mogao da se iskoristi kao polazna sirovina za dobijanje polifenolnih i terpenoidnih jedinjenja konvencionalnim i savremenim postupcima Č/T ekstrakcije.



Slika 6. Šema tehnološkog procesa proizvodnja filter čaja

2.3. Savremene ekstrakcione tehnike

Ekstrakcija prirodnih proizvoda se koristila još u kolevkama civilizacije gde su drevni narodi primenom postupaka sličnim maceraciji i destilaciji dobijali proizvode koje su koristili

kao hranu i lekove. Danas gotovo da ne postoji tehnološki proces u bilo kojoj grani hemijske industrije u kojem se ne koristi ekstrakcija. Ekstrakcija prirodnih proizvoda u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji se smatra „čistim“ procesom u poređenju sa baznom hemijskom industrijom, ali njen uticaj na prirodnu sredinu je veći od očekivanog (Chemat i sar., 2012). Veliki utrošak energije i rastvarača, kao i mali prinos željenog jedinjenja su najveći problemi koji se mogu javiti. Danas je trend u pronalasku rešenja koja će smanjiti upotrebu organskih rastvarača, a u isto vreme obezbediti intenzifikaciju procesa i isplativu proizvodnju kvalitetnih ekstrakata. „Zeleni“ postupci ekstrakcije imaju za cilj da obezbede visoko-efikasne procese i relativno velike prinose iz obnovljivih prirodnih izvora bez upotrebe opasnih hemijskih supstanci (Mustafa i Turner, 2011). Oni bi trebali da obezbede visok prinos ciljanih jedinjenja iz obnovljivih biljnih izvora korišćenjem alternativnih rastvarača (uglavnom na bazi vode), smanje potrošnju energije ili obezbede kruženje energije u ciklusu, obezbede iskorišćenje sporednih proizvoda procesa u poljoprivredi, smanje broj operacija u postupku proizvodnje i obezbede dobijanje nenedaturisanih, biorazgradivih ekstrakata bez kontaminenata (Chemat i sar., 2012).

Dobro razdvajanje, identifikaciju i karakterizaciju bioaktivnih jedinjenja moguće je izvesti samo uz predhodno adekvatno izvedenu ekstrakciju iz prirodnog materijala (Azmir i sar., 2013). Svi ekstrakcioni postupci imaju za cilj da ekstrahuju željena bioaktivna jedinjenja, da im povećaju selektivnost i osetljivost prilikom postupka određivanja i da ih prevedu u najpogodniji oblik za razdvajanje (Smith, 2003). Tradicionalni postupci ekstrakcije uključuju Soxhlet ekstrakciju, maceraciju, perkolaciju i destilaciju vodenom parom. Ovi procesi zahtevaju dugo vreme ekstrakcije, veliku masu uzorka i veliku potrošnju organskih rastvarača čija je cena uglavnom visoka, a odlaganje ima negativan uticaj na životnu sredinu i mogu biti toksični za ljudski organizam (Ramos i sar., 2002). Drugi nedostaci tradicionalnih ekstrakcionih postupaka su potreba za koncentrovanjem i prečišćavanjem dobijenih ekstrakata koji, usled male selektivnosti rastvarača, sadrže relativno veliki procenat balasnih materija, što otežava ekstrakciju osetljivih i termolabilnih jedinjenja koja se u malom udelu nalaze u sirovini (Mustafa i Turner, 2011). U cilju prevazilaženja navedenih nedostataka i unapređenja postupaka za ekstrakciju jedinjenja iz biljnog materijala, razvijene su savremene metode ekstrakcije koje obuhvataju mikrotalasnu (MAE; microwave-assisted extraction), ultrazvučnu (UAE; ultrasound-assisted extraction), ekstrakciju fluidima u superkritičnom

stanju (SFE; supercritical fluid extraction) i ekstrakciju tečnostima pod pritiskom (PLE; pressurized liquid extraction). U cilju povećanja prinosa i selektivnosti ekstrakcije mogu se koristiti i pulsna električna polja, kao i enzimaska hidroliza (Azmir i sar., 2013). Savremene ekstrakcione tehnike su razvijene u skladu sa principima „zelene“ ekstrakcije (Chemat i sar., 2012):

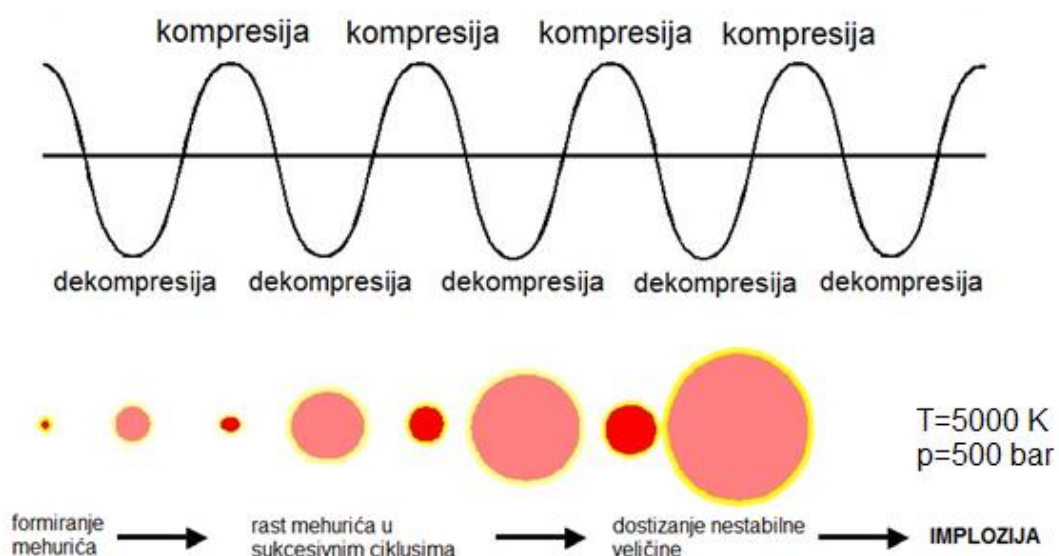
- Inovacije sa selektovanjem odabranih biljnih vrsta i obnovljivim biljnim resursima,
- upotreba alternativnih rastvarača, na prvom mestu vode,
- smanjenje potrošnje energije korišćenjem novih tehnologija,
- dobijanje nusproizvoda umesto otpada, koji se mogu koristiti u industriji,
- smanjenje broja tehnoloških operacija i razvijanje robusnih i kontrolisanih procesa i
- dobijanje nenedenaturisanih i biorazgradivih ekstrakata bez kontaminenata.

2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučni talasi frekvencije od 20 do 10 MHz imaju široku primenu u hemijskoj i prehrambenoj industriji. Ultrazvučna ekstrakcija (UAE) se izdvaja od konvencionalnih i drugih ekstrakcionih tehnika po tome što ima određene prednosti u pogledu cene opreme, potrošnje energije i vremena, upotrebe „zelenih“ rastvarača i njihovog uklanjanja iz ekstrakta. Upotreba ultrazvuka je relativno jednostavna, fleksibilna i zahteva manja investiciona ulaganja u odnosu na druge ekstrakcione tehnike, kao što su visoko-pritiskne tehnologije. Prema tome, ova tehnika je okarakterisana kao „zelena“, čista i bez negativnog efekta na životnu sredinu. Upotreba ultrazvuka može da se podeli na sonikaciju niskog intenziteta ($<1 \text{ W/cm}^2$) i visokog intenziteta ($10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$) (Tiwari, 2015). Prva tehnika se prvenstveno koristi kod nedestruktivnih analitičkih metoda, za kontrolu procesa i fizičko-hemijskih osobina, dok se druga koristi za ekstrakciju i druge operacije koje imaju primenu u hemijsko-procesnoj i prehrambenoj industriji.

Prilikom UAE, različiti fizički i hemijski fenomeni dovode do ubrzanja prenosa mase iz čvrste u tečnu fazu. Ti fenomeni obuhvataju kavitaciju, agitaciju, vibraciju, pritisak, šok talase, trenje, mikromlazove, kompresiju, dekompresiju i formiranje slobodnih radikala. Fizičko-hemijski efekti koji se javljaju prilikom UAE zavise od frakvencije s obzirom da fizički

efekti imaju glavni uticaj na nižim (20 – 100 kHz), a hemijski na višim frekvencijama (200 – 500 kHz) (Tiwari, 2015). Akustična kavitacija predstavlja glavnu pogonsku silu u ultrazvučnoj ekstrakciji. Ultrazvučni talasi prilikom prolaska kroz tečnu fazu indukuju seriju kompresija i dekompresija mehurića gasa u tečnoj fazi. To dovodi do formiranja, rasta i implozije mehurića (Slika 7), što dalje prouzrokuje naglo lokalno povećanje temperature (oko 5000 K) i pritiska (oko 500 bar) (Mason i Peters, 2002). Nagli porast temperature i pritiska koji se dešava na površini biljnog materijala dovodi do razaranja ćelija oštećenjem ćelijskog zida i membrane. To dalje vodi do lakše difuzije rastvarača u ćelije, rastvaranje intraćelijskog sadržaja i ubranu difuziju jedinjenja iz čvrste u tečnu fazu. Pored toga, implozijom mehurića vazduha dolazi i do turbulencija na mikroskopskom nivou i sudaranja čestica pri velikim brzinama, a ubrzana difuzija se javlja kao rezultat ovih fenomena (Valachovic i sar., 2001). Sposobnost ultrazvuka da izazovu kavitaciju zavisi od osobina samog zračenja (frekvencija i snaga), osobina rastvarača (viskoznost i površinski napon) i ambijentalnih uslova (temperatura i pritisak). Što se hemijskih fenomena tiče, tokom ultrazvučne ekstrakcije visokog intenziteta dolazi do formiranja reaktivnih slobodnih radikala usled visoke temperature i pritiska (Henglein i Kormann, 1985). Zbog reaktivnosti, ovi radikali takođe mogu da oštete ćelijski zid ako dođu u kontakt sa njim, međutim, mogu da indukuju i niz reakcija koje mogu da dovedu do degradacije ciljanih jedinjenja, prema tome, parametre procesa je neophodno podesiti tako da prinos ekstrakcije bude povećan, a degradacija ciljanih jedinjenja minimalna.



Slika 7. Mehanizam nastanka i implozije mehurića vazduha prilikom ultrazvučne kavitacije

2.3.1.1. Parametri koji utiču na proces

Na proces UAE utiče nekoliko parametara koji zavise od vrste ultrazvučnog reaktora (kupati, sonda, itd.), ultrazvučnog zračenja (frekvencija i snaga) i drugih faktora kao što su temperatura, osobine rastvarača, odnos rastvarač-droga i vreme ekstrakcije. Optimizacija ovih parametara predstavlja ključni korak u intenzifikaciji procesa UAE. Uticaj parametara UAE je prikazan u Tabeli 2 (Tiwari, 2015).

Tabela 2. Glavni faktori UAE i njihov uticaj na fenomene prenosa

Faktor	Uticaj
Snaga zračenja	Povišena snaga zračenja izaziva eroziju sonde, intenzifikuje mešanje i može da dovede do degradacije osetljivih jedinjenja
Frekvencija	Niža frekvencija obično obezbeđuje veći prinos ekstrakcije
Temperatura	Povišena temperatura povećava interakcije čvrste i tečne faze, povećava difuzivnost rastvarača Snižena temperatura intenzifikuje akustičnu kavitaciju
Vreme ekstrakcije	Produženo vreme ekstrakcije obezbeđuje veći prinos i može dovesti do hemijskih promena u ekstraktu
Osobine rastvarača	Viskoznost rastvarača smanjuje kavitaciju. Polarnost rastvarača utiče na selektivnost ekstrakcije, a napon pare i površinski napon utiču na kavitaciju
Biljni materijal	Prečnik čestica i odnos droga-rastvarač utiču na prenos mase

Uticaj snage i frekvencije ultrazvučnih talasa na prinos ekstrakcije i fenomene prenosa nije jednostavno izmeriti. Obično se to radi posrednim merenjem prenosa energije preko merenja određenih hemijskih i fizičkih promena (Chemat i sar., 2017). Poznato je da primena ultrazvuka veće snage dovodi do intenzivnijeg razaranja biljnih ćelija, međutim, ovaj parametar se u prehrambenoj industriji uglavnom optimizuje tako da se sa minimalnom primenjenom snagom dobiju najbolji rezultati (Bermúdez-Aguirre i sar., 2011). Pored toga, zabeleženo je da snaga ultrazvuka može da ima uticaj na selektivnost ekstrakcije, kao i na sam hemijski sastav dobijenih ekstrakata. Što se frekvencije zračenja tiče, u prehrambenoj industriji se uglavnom koriste frekvencije od 20 do 100 kHz (Chemat i sar., 2017). Primenom zračenja većih frekvencija je zabeležen smanjen uticaj fizičkih fenomena na prenos mase usled smanjenja intenziteta kavitacije (Toma i sar., 2001).

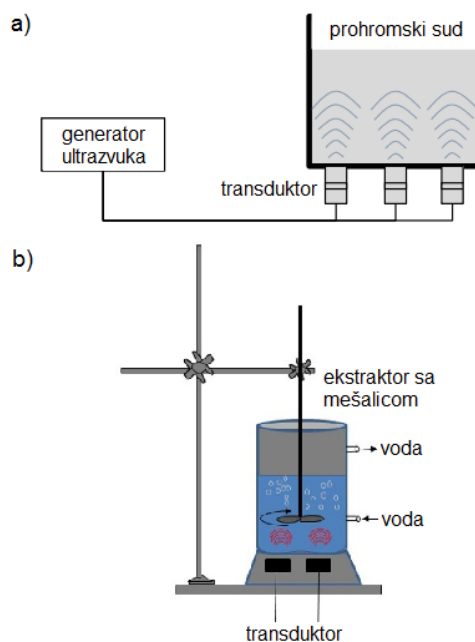
Temperatura se u većini ekstrakcionih tehnika navodi kao parametar koji ima najviše uticaja na prenos mase. Prilikom UAE, temperatura utiče, kako na biljni materijal, tako i na osobine rastvarača. Povećanjem temperature dolazi do smanjenja viskoziteta i površinskog napona rastvarača i porasta napona pare. To dovodi do olakšane difuzije rastvarača u šupljine biljnog materijala koje su nastale usled kavitacije. Međutim, na povišenim temperaturama dolazi do smanjenog uticaja fizičkih fenomena na prenos mase usled brže implozije mehurića vazduha i oslobađanja manje količine energije (Chemat i sar., 2017). Pored uticaja na rastvarač, povišena temperatura dovodi i do ubrzane denaturacije i razaranja stabilne strukture ćelijskog zida biljnog materijal, otvaranja pora i olakšane difuzije intramolekulskog sadržaja u tečnu fazu. Što se prinosa ekstrakcije tiče, on obično raste sa porastom temperature. Međutim, na povišenim temperaturama može da dođe do hemijskih promena u ekstraktu, kao i do degradacije ciljanih jedinjenja. Prema tome, temperaturu je potrebno optimizovati u cilju dobijanja maksimalnog prinosa ciljanih jedinjenja, a ne ukupnog prinosa ekstrakcije. Prilikom razmatranja uticaja temperature, neophodno je u obzir uzeti i vreme ekstrakcije. Vreme ekstrakcije uglavnom ima monoton uticaj na prinos ekstrakcije izazivajući nagli porast prinosa na početku i sporije povećanje prinosa asimptotskim približavanjem stacionarnom stanju. Međutim, kombinovani uticaj povišene temperature i vremena ekstrakcije u određenim slučajevima može da dovede do degradacije ciljanih jedinjenja što se negativno odražava na ekonomsku isplativost tehnološkog procesa.

Vrsta rastvarača direktno utiče na selektivnost ekstrakcije, a prema tome i na hemijski sastav dobijenih ekstrakata. Bitne fizične osobine rastvarača koje utiču na prenos mase su viskozitet, površinski napon, napon pare i dielektrična konstanta. Kod rastvarača velikog viskoziteta i površinskog napona se umanjuje efekat ultrazvučne kavitacije na fenomene prenosa, pa je u tim slučajevima neophodno primeniti zračenje većeg intenziteta (Chemat i sar., 2017). Prilikom UAE je poželjna upotreba rastvarača sa nižim naponom pare jer u njima dolazi do intenzivnije implozije mehurića vazduha, a samim tim i bržeg oštećenja biljnog materijala (Flannigan i Suslick, 2010). Kao što je napomenuto, fizičke osobine rastvarača zavise i od temperature, pa je prilikom optimizacije parametara UAE neophodno ispitati uticaj temperature na proces. Što se hemijske prirode rastvarača tiče, UAE dozvoljava upotrebu praktično svih rastvarača, kako vode, tako i organskih rastvarača. Međutim, u skladu sa trendovima „zelene“ hemije, kao rastvarači za UAE se uglavnom koriste voda i

smeše etanol-voda za ekstrakciju polarnih, i biljna ulja za ekstrakciju nepolarnih jedinjenja. Što se karakteristika biljnog materijala tiče, kompaktnost ćelijskog zida i srednji prečnik čestica imaju najveći uticaj na UAE.

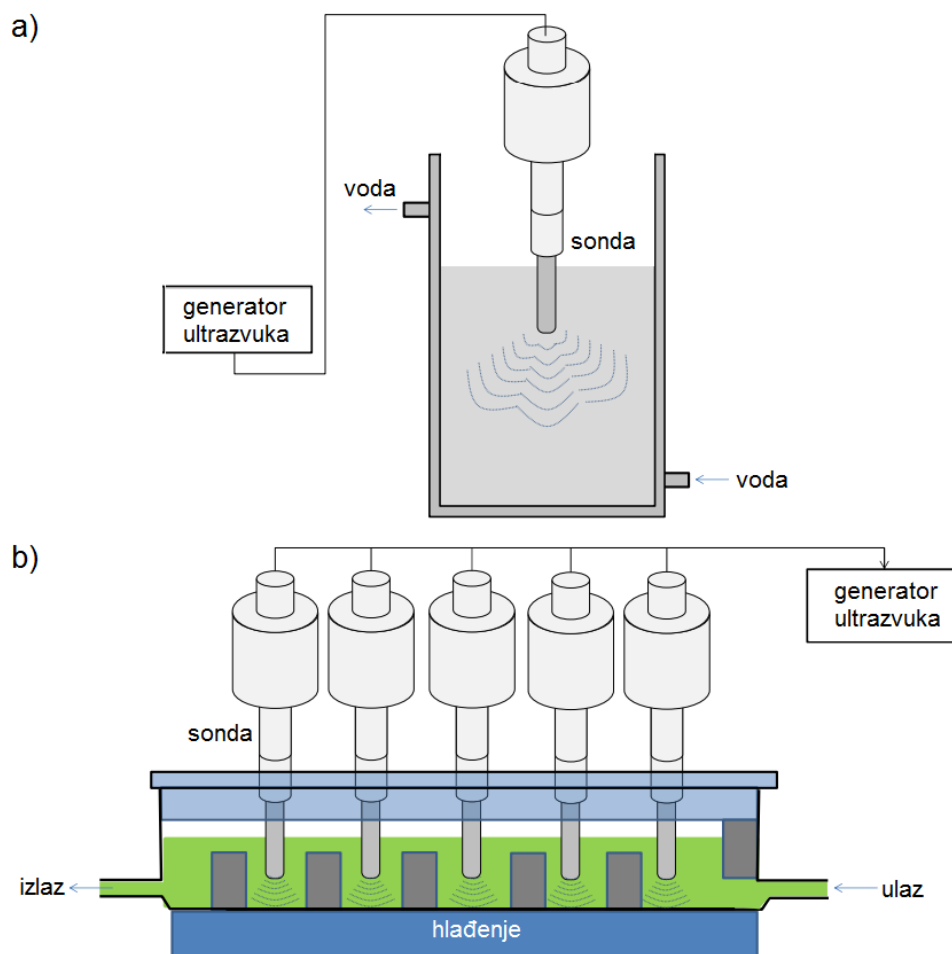
2.3.1.2. Procesna oprema

Primena ultrazvuka u cilju intenzifikacije ekstrakcije može da se primeni na dva tipa uređaja, ultrazvučno kupatilo i ekstraktor sa ultrazvučnom sondom. U oba slučaje se kao izvor ultrazvučnog zračenja koristi piezoelektrični transdudktor (Chemat i sar., 2017). Ultrazvučno kupatilo se najčešće koristi za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora na laboratorijskom nivou. Kao ekstraktor može da se koristi odgovarajući erlenmajer ili prilagođeni reaktor sa mešanjem (Tiwari, 2015; Chemat i sar., 2017). Ultrazvučna kupatila (Slika 8a) uglavnom rade na frekvencijama od 40 kHz i imaju mogućnost kontrole temperature. Dobra osobina im je relativno niska cena i mogućnost ekstrakcije više uzoraka istovremeno. Međutim, karakteriše ih niska reproduktivnost i smanjenje efektivne snage koja je isporučena uzorku usled raspodele ultrazvuka u celom kupatilu (Chemat i sar., 2017). Prema tome, efektivna energija koja zavisi od zapremine vode koja se nalazi u kupatilu, se uglavnom izražava kao odnos snage i zapremine (W/L). Ultrazvučni ekstraktori sa mešanjem (Slika 8b) se sastoje od duplikatora kroz koji struji voda za održavanje radne temperature, a mešanjem se dodatno intezifikuje prenos mase iz čvrste u tečnu fazu.



Slika 8. Šematski prikaz a) ultrazvučnog kupatila i b) ekstraktora sa mešalicom

Danas se za UAE uglavnom koriste uređaji na bazi ultrazvučne sonde. U zavisnosti od tipa ekstraktora, mogu da se primene diskontinualni (Slika 9a) i kontinualni (Slika 9b) sistemi. Sistem sonde karakteriše efektivnija isporuka snage zračenja u zapremini ekstraktora s obzirom da se snaga prenosi kroz manju površinu (vrh sonde) (Chemat i sar., 2017). Uglavnom rade na frekvencijama od 20 kHz i prilikom ekstrakcije je neophodno da sonda bude zaronjena u ekstraktor. Usled isporuke ultrazvuka intenzivnijeg zračenja dolazi do brzog zagrevanja ekstraktora, pa se uglavnom koriste sistemi za hlađenje kako bi se temperatura održavala konstantnom. Ultrazvučna ekstrakcija je kombinovana i sa drugim ekstrakcionim tehnikama, pa su tako razvijene kombinovane tehnike kao što su UAE – Soxhlet, UAE – mikrotalasna ekstrakcija, UAE – superkritična ekstrakcija, kao i UAE – destilacija vodenom parom. Danas je posebno interesantna kombinacija UAE-MAE s obzirom da je dokazano da postoji sinergistički efekat u ubrzavanju prenosa mase zajedničkim delovanjem ultrazvuka i mikrotalasa (Gude, 2015).



Slika 9. Ultrazvučni ekstraktor sa sondom: a) diskontinualni i b) kontinualni

2.3.1.3. Primena UAE za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora

U poslednje vreme se UAE široko primenjuje, kako u istraživačke svrhe, tako i u različitim industrijskim procesima. Hemijska priroda jedinjenja koja se ekstrahuju ovom tehnikom može da varira u širokim granicama, a selektivnost ekstrakcije zavisi od primenjenog rastvarača. Ali, kao što je već rečeno, akcenat se stavlja na upotrebu vode i drugih netoksičnih rastvarača kao što su etanol i biljna ulja koji su okarakterisani kao GRAS (generally recognized as safe). Pregled primene UAE za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora je prikazan u Tabeli 3 (Roselló-Soto i sar., 2015). Može se uočiti da se UAE uglavnom primenjuje za ekstrakciju polarnih i umereno polarnih jedinjenja, kao što su polifenoli. UAE nepolarnih jedinjenja kao što su etarska ulja, karotenoidi i masne kiseline predstavlja veliki izazov sa aspekta „zelene“ hemije s obzirom na manji broj nepolarnih rastvarača okarakterisanih kao GRAS.

Tabela 3. Primena UAE za ekstrakciju različitog spektra bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora

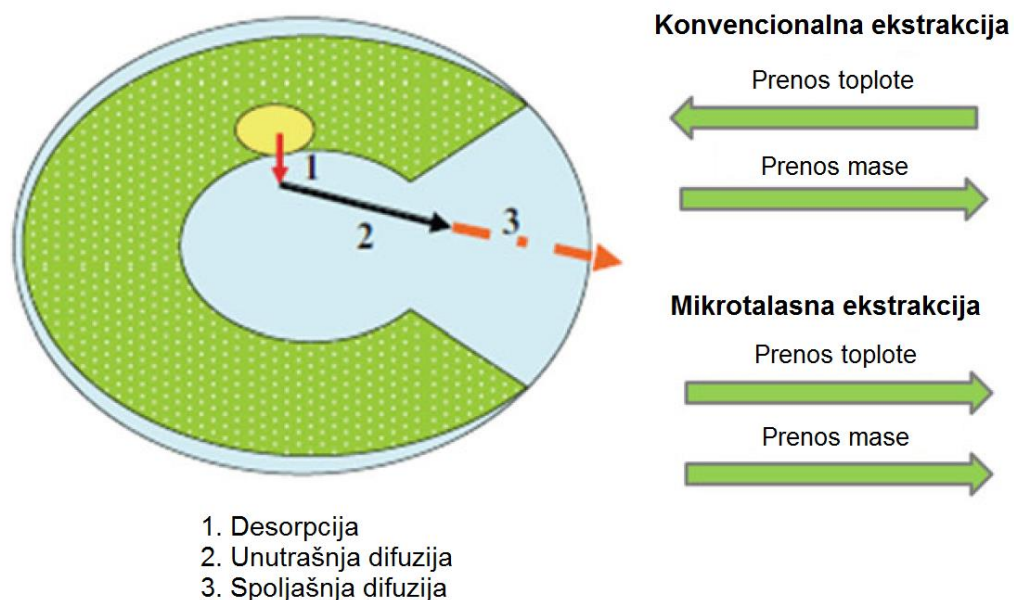
Sirovina	Uslovi ekstrakcije	Rastvarač
Polifenolna jedinjenja		
Trop jabuke	25 kHz, 150 W, 10-40°C, 5-55 min	50% etanol
Aronija	25 kHz, 150 W, 10-40°C, 5-55 min	0-96% etanol
Trop grožđa	35 kHz, 70°C, 1 min	50% etanol
Trop masline	30 kHz, 100 W, 0-25°C, 4-30 min	80-96% etanol
Kora narandže	25 kHz, 150 W, 30°C, 15 min	50% etanol
	25 kHz, 50-150 W, 10-40°C, 60 min	20-80% etanol
Kora nara	20 kHz, 2,4-59,2 W, 25°C, 2-90 min	0-96% etanol
Rogač	35 kHz, 320 W, 30°C, 30 min	0-100% aceton
Kora nara	35 kHz, 140 W, 30-60°C, 10-30 min	37% etanol
Karotenoidi		
Šargarepa	20-60°C, 5-35 min	<i>n</i> -heksan
Crveni grejpfrut	20 kHz, 95-855 W, 0-50°C, 15-90 min	Petroletar-aceton-etanol (50:25:25; v/v/v)
Kukuruz	20 kHz, 700-900 W, 38-40°C, 1-3 min	96% etanol
Paradajz	24 kHz, 200 W, 5°C, 1-30 min	<i>n</i> -heksan-metanol-aceton (50:25:25; v/v/v)
	40 kHz, 50 W, 53,2-86,8°C, 13,2-46,8 min	etil acetat
<i>Chlorella vulgaris</i>	50-160°C, 120 min	90% etanol

Što se tiče uticaja parametara UAE na prinos polifenolnih jedinjenja, na primeru ekstrakcije tropa jabuke je zabeležen pozitivan uticaj snage ultrazvuka, temperature i vremena ekstrakcije na prinos, međutim uticaj snage je bio manje izražen u odnosu na temperaturu (Virot i sar., 20016). Pored toga, zabeleženo je da UAE pruža povećanje prinosa polifenola za 30% u poređenju sa konvencionalnom ekstrakcionom tehnikom. UAE je takođe primenjena za ekstrakciju različitih polifenolnih jedinjenja (flavonoidi, antocijani i proantocijanidini) iz sporednog proizvoda aronije koji se generiše u fabrici čaja (Ramić i sar., 2015). Dobijeni optimalni uslovi za ekstrakciju ukupnih polifenola su bili temperatura od 70°C, snaga ultrazvuka od 207 W i vreme ekstrakcije od 80 min. Takođe, UAE se pokazala kao veoma pogodna tehnika za ekstrakciju karotenoida iz sporednih proizvoda paradajza (kožica, seme i trop) povećanjem prinosa za 143% u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju, pri čemu nije došlo do degradacije ovih jedinjenja (Sivakumar i sar., 2011). U cilju izolovanja etarskog ulja, UAE može da se koristi u kombinaciji sa destilacijom vodenom parom (Chemat i sar., 2017). Pored povećanja prinosa, zabeležena je i veća selektivnost UAE u porećenju sa konvencionalnom destilacijom prilikom izolovanja karvona i limonena iz semena kima (Assami i sar., 2012).

2.3.2. Mikrotalasna ekstrakcija

Mikrotalasna ekstrakcija (MAE) se u poslednje vreme intenzivno primenjuje za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. Princip ove tehnike se ogleda u primeni elektromagnetnog zračenja frekvencije od 0,3 – 300 GHz koje prodire kroz određene materijale i usled interakcije sa polarnim molekulima dolazi do generisanja toplotne energije (Chan i sar., 2011). Samo određeni materijali mogu da apsorbuju mikrotalase što zavisi od njihove dielektrične konstante, a zagrevanje se odigrava na molekulskom nivou jonskom kondukcijom i rotacijom dipola (Eskilsson i Björklund, 2000). Do jonske kondukcije dolazi jer migracijom jona u rastvoru usled delovanja elektromagnetnog polja dolazi do otpora i trenja, što dalje dovodi do zagrevanja (Chemat i Cravotto, 2012). Slična je situacija i sa rotacijom dipola, gde se toplota generiše usled trenja između molekula koji rotiraju. Prema tome, stepen apsorpcije mikrotalasnog zračenja zavisi od dielektrične konstante rastvarača, kao i od prisustva vode u biljnom materijalu.

Prenos toplote i mase kod MAE se razlikuje u odnosu na konvencionalnu Č/T ekstrakciju. Prilikom konvencionalne ekstrakcije, prenos toplote se odvija iz tečne u čvrstu fazu, s obzirom da se zagrevanje uglavnom vrši grejnim oblogama. Sa druge strane, prenos mase se vrši iz čvrste u tečnu fazu prodiranjem rastvarača u biljni materijal, rastvaranjem jedinjenja, unutrašnjom difuzijom na površinu biljnog materijala i spoljašnjom difuzijom u tečnu fazu ekstrakta (Slika 10) (Périno-Issartier i sar., 2011). Kod MAE se prenos mase odvija na isti način kao kod konvencionalne ekstrakcije, dok se prenos toplote odvija iz čvrste u tečnu fazu zagrevanjem polarnih molekula u biljnom materijalu. Prema tome, gradijent prenosa toplote i mase kod MAE je u istom smeru.



Slika 10. Mehanizam prenosa mase i toplote pri konvencionalnoj i mikrotalasnoj ekstrakciji

2.3.2.1. Parametri koji utiču na proces

Efikasnost mikrotalasne ekstrakcije u velikoj meri zavisi od primenjenih uslova ekstrakcije. Faktori koji utiču na proces MAE su priroda rastvarača i biljnog materijala, odnos droga-rastvarač, snaga zračenja, temperatura, vreme ekstrakcije, mešanje, itd., kao i njihova međusobna interakcija.

Izbor rastvarača u MAE se zasniva na afinitetu i selektivnosti prema ciljanom jedinjenju, difuzivnosti rastvarača i njegovoj dielektričnoj konstanti (Chan i sar., 2011). Pored vode, za MAE mogu da se koriste polarni organski rastvarači kao što su etanol, metanol i

aceton, kao i njihove smeše sa vodom. Upotreba nepolarnih organskih rastvarača u MAE je ograničena, slabom apsorpcijom mikrotalasnog zračenja, toksičnošću za čoveka i okolinu i opasnošću za rad u uslovima MAE (povišena temperatura). Etanol i smeša etanol-voda imaju daleko najveću primenu za MAE zbog mogućnosti ekstrakcije širokog spektra jedinjenja (Zhou i Liu, 2006). Neophodno je istaći da izbor rastvarača za MAE ne može da se izvede na osnovu konvencionalne ekstrakcije kao što je slučaj kod ultrazvučne ekstrakcije. Osobine rastvarača se mogu modifikovati dodavanjem kosolventa, a za tu svrhu se najčešće koristi voda s obzirom da ona dobro prodire u pore biljnog materijala i dobro apsorbuje mikrotalasno zračenje (Alfaro i sar., 2003). U slučaju primene rastvarača koji se ne mešaju sa vodom, kao zamena može da se primeni etanol. Pored izbora rastvarača, odnos droga-rastvarač predstavlja bitan faktor u mikrotalasnoj ekstrakciji, s obzirom da optimalan odnos treba da obezbedi homogeno i efektivno zagrevanje (Chan i sar., 2011). Upotreba velike količine rastvarača dovodi do slabijeg zagrevanja biljnog materijala, jer rastvarač apsorbuje veći deo energije zračenja, pa je tada neophodno povećati snagu mikrotalasnog zračenja. Sa druge strane, premalo rastvarača predstavlja ograničenje u pogledu prenosa masa, jer je koncentracioni gradijent iz čvrste u tečnu fazu manji. Prema tome, pored optimizacije koncentracije rastvarača u smeši ekstragenta, vrlo je čest slučaj da se optimizuje i odnos droga- rastvarač.

Snaga mikrotalasnog zračenja takođe predstavlja važan parametar s obzirom da upotreba mikrotalasa veće snage može da dovede do degradacije termolabilnih jedinjenja. Ukupan prinos ekstrakcije raste sa porastom snage zračenja, međutim, sadržaj ciljanih jedinjenja u ekstraktu može da bude niži usled koekstrakcije balasnih materija. Povećana snaga zračenja izaziva lokalno zagrevanje u ćelijama biljnog materijala, što dovodi do brzog razaranja biljnih ćelija i olakšane difuzije intraćelijskog sadržaja (Chan i sar., 2011). Uticaj temperature na proces MAE je sličan kao i kod ostalih ekstrakcionih tehnika, a ona direktno zavisi od primenjene snage zračenja. U otvorenim MAE sistemima, ekstrakcija se uglavnom odigrava na temperaturi ključanja rastvarača, ako je za to dovoljna isporučena snaga zračenja. Kod zatvorenih sistema MAE može da se odigrava i na znatno višim temperaturama od temperature ključanja, jer se rastvarač zadržava u tečnom stanju povećanjem pritiska. Prema tome, ograničavajući faktor za izbor optimalne snage mikrotalasa i temperature je stabilnost jedinjenja koja se ekstrahuju.

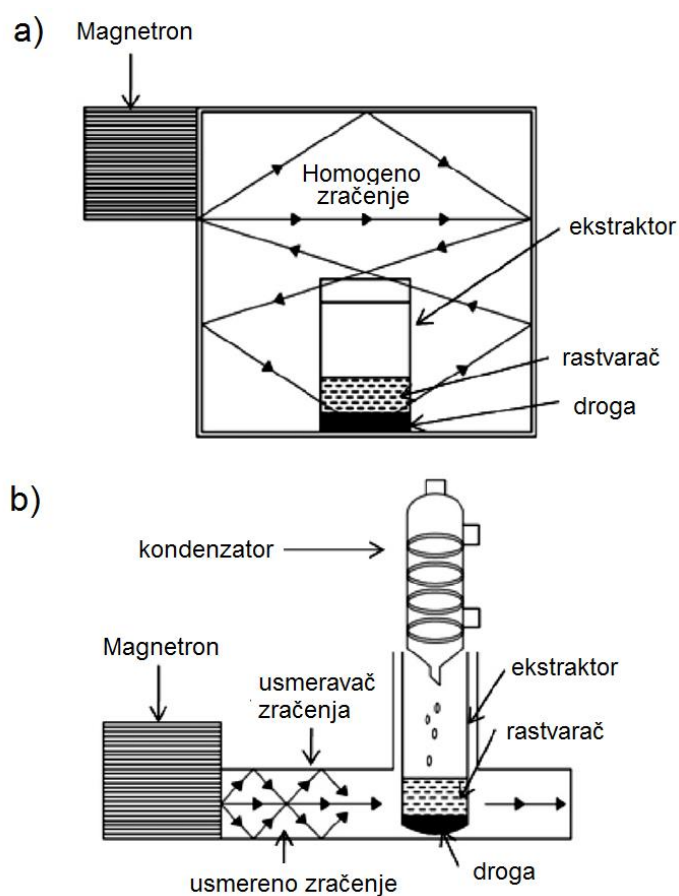
Vreme ekstrakcije takođe predstavlja bitan faktor u MAE s obzirom da može da bude u značajnoj interakciji sa snagom zračenja i temperaturom. Produženo izlaganje ekstrakcione smeše mikrotalasima može da dovede do degradacije osetljivih jedinjenja, čak i pri nižim temperaturama (Hao i sar., 2002). U takvoj sredini postoji rizik da može da dođe do hidrolize i oksidacije određenih jedinjenja, što može da se negativno odrazi na kvalitet ekstrakta (Chan i sar., 2011). Prema tome, vreme ekstrakcije u MAE je značajno kraće u poređenju sa ostalim ekstrakcionim tehnikama i obično traje 1 – 30 min. U slučajevima kada je za potpuno iscrpljenje biljnog materijala potrebno produženo vreme, rizik od degradacije jedinjenja može da se izbegne primenom ciklusa mikrotalasnih tretmana. Na taj način će biti ograničena isporučena energija mikrotalasnog zračenja koja će se efektivnije koristiti za ubrzavanje procesa ekstrakcije umesto za degradaciju jedinjenja (Chan i sar., 2011). Pored toga, u svakom ciklusu može da se doda i određena količina svežeg rastvarača, a optimizaciju ovakvih procesa je naophodno izvršiti u smislu racionalne potrošnje resursa (vreme ekstrakcije i rastvarač).

Biljni materijal koji se podvrgava MAE je obično prethodno osušen i usitnjen. Previše mali srednji prečnik čestica droge može dovesti do otežanog razdvajanja čvrste i tečne faze nakon ekstrakcije. Poželjno je da biljni materijal sadrži određenu količinu vode koja će moći da apsorbuje mikrotalasno zračenje, pa se u određenim slučajevima droga nakvasi vodom pre ekstrakcije kako bi se apsorpcija mikrotalasnog zračenja lokalizovala u njoj (Chan i sar., 2011).

2.3.2.2. Procesna oprema

MAE sistemi mogu biti sa usmerenim i neusmerenim zračenjem. Obično se sistemi sa neusmerenim zračenjem koriste za ekstrakcije pod pritiskom, odnosno u zatvorenim sistemima, dok se usmereno zračenje koristi za ekstrakciju pod atmosferskim pritiskom (otvoren sistem). Šematski prikaz MAE sa zatvorenim i otvorenim sistemom je prikazan na Slici 11 (Mandal i sar., 2007). Kod zatvorenog MAE sistema, ekstrakcija se odvija u zatvorenim sudovima i sa uniformnom raspodelom zračenja unutar ekstraktora. S obzirom da metali reflektuju mikrotalasno zračenje, ekstraktor mora biti izrađen od materijala koji će da propusti zračenje, a da pri tome može da izdrži velike pritiske do kojih dolazi tokom procesa, pa se u tu svrhu obično koriste teflonske čaure. Iako je kod ovih uređaja moguće

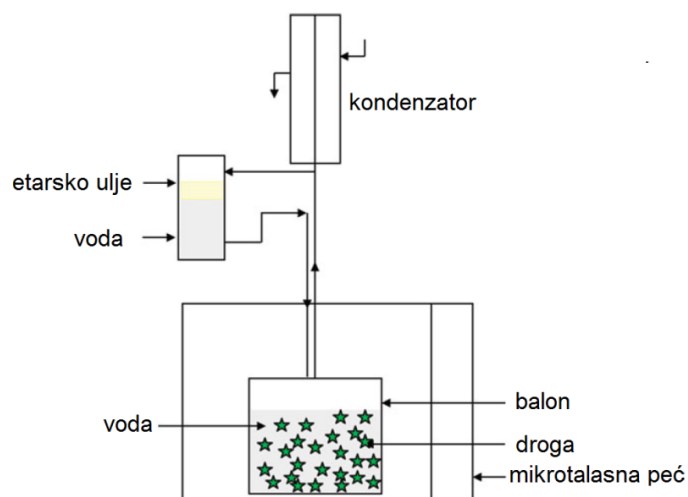
vrlo precizno kontrolisati radni pritisak i temperaturu, glavni nedostaci su potencijalni gubici isparljivih jedinjenja i relativno mali kapacitet (Chan i sar., 2011). Neophodno je istaći da postoje određeni rizici pri radu sa zatvorenim MAE sistemima, jer može da dođe do eksplozije ekstraktora. Sa druge strane, otvoreni MAE sistem može da prevaziđe navedene nedostatke zatvorenog sistema. Blaži ekstrakcioni uslovi, prvenstveno niža temperatura, ga čine pogodnim za ekstrakciju termolabilnih jedinjenja (Luque-Garcia i Castro, 2003). Ekstrakcija se u ovom slučaju odvija na atmosferskom pritisku i na temperaturi ključanja rastvarača koji isparava, kondenzuje se i vraća u ekstraktor. Ovaj sistem ima širu primenu za ekstrakciju metabolita iz biljnog materijala (Chan i sar., 2011).



Slika 11. Šematski prikaz a) zatvorenog i b) otvorenog sistema za mikrotalasnu ekstrakciju

Pored primene za ekstrakciju, mikrotalasi su u zadnje vreme našli široku primenu i za destilaciju etarskog ulja, pa su razvijeni različiti tipovi uređaja. Najčešći slučaj je mikrotalasna destilacija gde se zagrevanje suda u kome se nalazi biljni materijal i voda odvija usled delovanja mikrotalasa (Slika 12) (Chemat i Cravotto, 2012). Osnovne prednosti ove tehnike su efikasnije zagrevanje, skraćanje vremena procesa i dobijanje većeg prinosa uz

odgovarajući sastav etarskih ulja, dok se kao glavni nedostaci navode rizici od potencijalnih hemijskih promena etarskog ulja, pošto je takva sredina pogodna za reakcije hidrolize i oksidacije. Postoje i različite modifikacije ove metode koje su pogodne za izvođenje u određenim slučajevima, a obuhvataju mikrotalasnu destilaciju bez rastvarača, mikrotalasnu gravitacionu hidrodifuziju i mikrotalasnu destilaciju komprimovanim vazduhom (Jacotet-Navarro i sar., 2016).



Slika 12. Šematski prikaz aparature za mikrotalasnu destilaciju

2.3.2.3. Primena MAE za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora

Kao i ostale savremene ekstrakcione tehnike, MAE je u poslednje vreme pronašla široku primenu, prvenstveno za ekstrakciju na laboratorijskom nivou. S obzirom na mehanizam ubrzavanja ekstrakcije, spektar jedinjenja koji mogu biti ekstrahovani ovom tehnikom nije toliko širok kao što je to slučaj sa ultrazvučnom ili ekstrakcijom tečnostima pod pritiskom. Grupe jedinjenja za koje se MAE pokazala kao pogodna tehnika su polifenoli, hinoni, terpeni i alkaloidi, a primeri primene MAE su prikazani u Tabeli 4 (Zhang i sar., 2011).

MAE je najširu primenu našla za izolovanje polifenolnih jedinjenja, prvenstveno flavonoida i to u pogledu povećanja prinosa, kvaliteta ekstrakata i selektivnosti (Routray i Orsat, 2012). U poređenju sa refluks ekstrakcijom, MAE je pokazala značajnu prednost u pogledu skraćanja vremena ekstrakcije, potrošnje rastvarača i povećanja prinosa polifenolnih jedinjenja izolovanih iz ruzmarina (Proestos i Komaitis, 2008). Izvršena je i mikrotalasna ekstrakcija polifenola žalfije i dobijeni su izuzetno visoki prinosi polifenolnih jedinjenja

(Dragovic-Uzelac i sar., 2012; Dent i sar., 2013), međutim nije sprovedena detaljna optimizacija parametara ekstrakcije. Može se zaključiti da je u velikom broju slučajeva MAE pogodnija za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja od konvencionalnih tehnika kao što su Soxhlet ekstrakcija, maceracija i ekstrakcija uz refluks i mešanje (Mandal i sar., 2007).

Tabela 4. Praktična primena MAE u izolovanju bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala

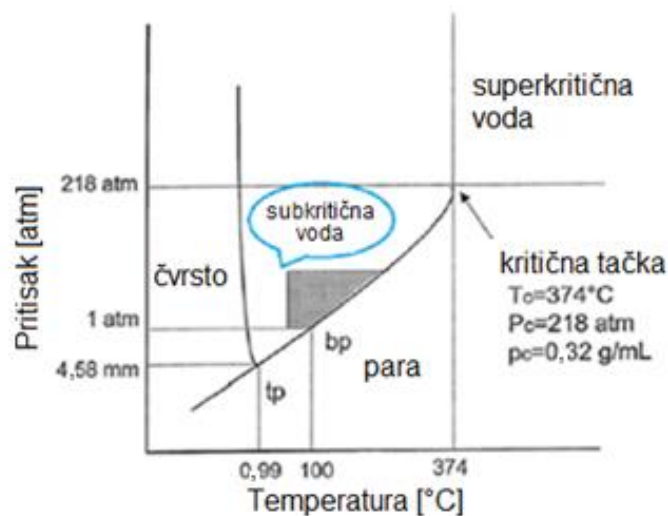
Jedinjenje	Biljna vrsta	Tip MAE	Rastvarač
Ukupni fenoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Zatvoren sistem	50% etanol
Hesperidin	<i>Citrus unshiu</i>	Zatvoren sistem	70% etanol
Luteolin	<i>Buddleia officinalis</i>	-	95% etanol
Izoflavoni	<i>Glycine max</i>	Kontinualni sistem	etanol
Bergenin	<i>Ardisia crenata</i>	Otvoren sistem + mešanje	60% metanol
Silimarin	<i>Silybum marianum</i>	Otvoren sistem + mešanje	81,5% etanol
Oleanolinska kiselina	<i>Gymnema sylvestre</i>	Otvoren sistem + mešanje	90% etanol
Etarsko ulje	<i>Laurus nobilis</i>	Mikrotalasna destilacija	voda
Etarsko ulje	<i>Narandža</i>	Mikrotalasna destilacija	voda
Kofein	<i>Camellia sinensis</i>	Otvoren sistem	50% etanol
Astragalozidi	<i>Astragalus membranaceus</i>	Otvoren sistem	80% etanol
Ginsenzozidi	<i>Panax ginseng</i>	Zatvoren sistem	70% etanol

Prilikom ekstrakcije antrahinona iz *Morinda citrifolia*, ekstrakti dobijeni primenom MAE su pokazali veću antioksidativnu aktivnost od ekstrakata dobijenih maceracijom i ultrazvučnom ekstrakcijom, pri čemu je ispitan uticaj temperature i vremena ekstrakcije na prinos antrahinona derivata obtusina (Hemwimon i sar., 2007). I u slučaju izolovanja artemisinina iz semena *Artemisa annua*, MAE je pokazala prednosti u pogledu značajnog skraćanja vremena ekstrakcije u odnosu na Soxhlet i superkričnu ekstrakciju. Pored toga, ova tehnika se pokazala pogodnijom od ultrazvučne ekstrakcije, maceracije i perkolacije za izolovanje određenih alkaloida, kao što su sangvinarin i heleritrin iz ploda *Macleaya cordata* (Zhang i sar., 2011).

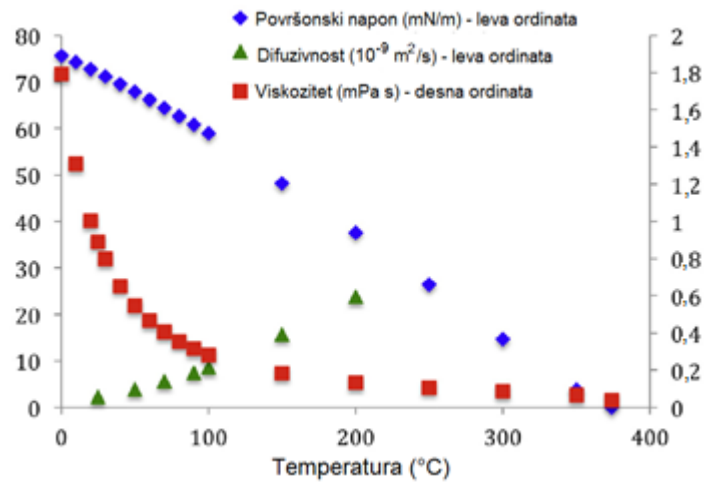
Može se zaključiti da se MAE može prilagoditi za ekstrakciju velikog broja polarnih i umereno polarnih jedinjenja i da u najvećem broju slučajeva pruža prednosti u odnosu na konvencionalne ekstrakcione tehnike. Međutim, treba uzeti u obzir da postoje i negativni aspekti ove tehnike, a kao najvažniji se navode hemijske promene do kojih može doći tokom procesa, degradacija termolabilnih jedinjenja, opasnost pri radu sa zatvorenim sistemima pod pritiskom, zapaljivim rastvaračima i ograničena primena za ekstrakciju lipofilnih jedinjenja kao što su masne kiseline i karotenoidi.

2.3.3. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju

Posebnu tehniku ekstrakcije tečnostima pod pritiskom predstavlja ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju (SWE; subcritical water extraction), koja je poznata i kao ekstrakcija pregrejanom vodom ili ekstrakcija vrelom vodom pod pritiskom. SWE predstavlja novu ekstrakcionu tehniku koja se odvija na temperaturama od 100 do 374°C i pritisku koji je dovoljno velik da zadrži vodu u tečnom stanju (obično od 10 do 60 bar) (Herrero i sar., 2006) (Slika 13). Karakteristične osobine vode na ambijentalnim uslovima su neproporcionalno visoka temperatura ključanja spram molekulske mase, velika dielektrična konstanta i polarnost usled intermolekulskih vodoničnih veza. Porast temperature dovodi do povećanja difuzivnosti vode i smanjenja viskoznosti i površinskog napona (Slika 14). Na sobnoj temperaturi polarna jedinjenja imaju dobru rastvorljivost u vodi, dok voda u subkritičnom stanju predstavlja dobar rastvarač za umereno polarna i nepolarna jedinjenja (Plaza i Turner, 2015).



Slika 13. Fazni dijagram vode u zavisnosti od temperature i pritiska

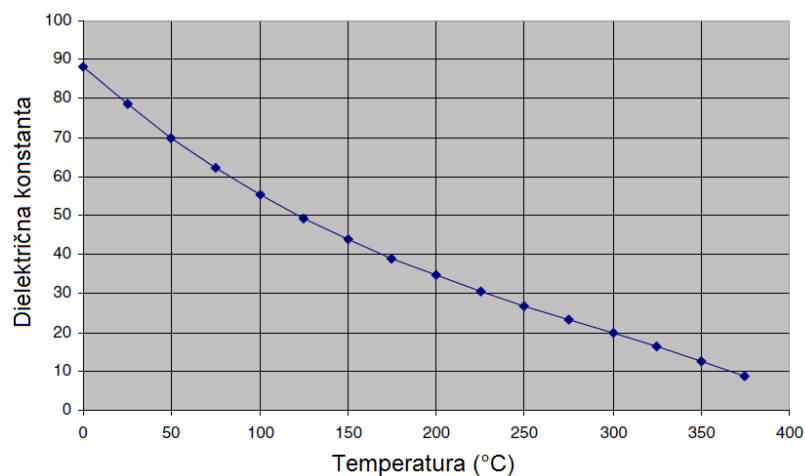


Slika 14. Uticaj temperature na površinski napon, difuzivnost i viskozitet vode

2.3.3.1. Parametri koji utiču na proces

Temperatura predstavlja jedan od najvažnijih parametara koji utiču na proces SWE. Porast temperature dovodi do povećanja difuzivnosti, smanjenja površinskog napona i viskoziteta, kao i smanjenja dielektrične konstante vode (Slika 14). Gornja temperatura koja ograničava proces je temperatura iznad koje dolazi do povećane degradacije ili hidrolize određenog jedinjenja, ili grupe jedinjenja tokom procesa. Potrebno je naglasiti da stepen degradacije jedinjenja ne zavisi samo od temperature, već i od vremena izlaganja prilikom procesa ekstrakcije (Carr i sar., 2011). Povećana temperatura, osim uticaja na fizičke osobine vode, ima uticaj i na biljni materijal izazivajući u njemu raspadanje prekidanjem Van der Waals-ovih veza, vodoničnih veza i dipol-dipol interakcija (Richter i sar., 1996). Dovođenje toplotne energije sprečava kohezivne i adhezivne intermolekulske interakcije između jedinjenja koja se ekstrahuju i nerastvornog biljnog materijala smanjenjem energije aktivacije potrebne za desorpciju tih jedinjenja (Mustafa i Turner, 2011). Smanjenje površinskog napona i viskoziteta vode dovodi do smanjenja ugla kvašenja između vode i biljnog materijala, što dovodi do boljeg i bržeg prodiranja rastvarača u pore čvrstog uzorka koje dovodi do bržeg prenosa mase, rastvaranja jedinjenja od interesa i unapređenja ekstrakcije kod difuziono-zavisnih ekstrakcionih procesa. Pored potencijalne degradacije jedinjenja od interesa, povišena temperatura može da dovede i do visokog prinosa ekstrakcije balasnih jedinjenja, što dodatno otežava proces prečišćavanja ekstrakata. Voda na sobnoj temperaturi predstavlja veoma polaran rastvarač sa dielektričnom konstantom oko 80, ali ova vrednost može da se značajno smanji prilikom povećanja temperature i

pritiska (Slika 15), što dovodi do povećanja selektivnosti prema nepolarnim jedinjenjima. Međutim, rastvorljivost nepolarnih jedinjenja u vodi nije uvek direktno proporcionalna dielektričnoj konstanti usled kompleksnih interakcija molekula rastvarača i jedinjenja koje se ekstrahuje. Najveći broj jedinjenja karakteriše blago povećanje rastvorljivosti u vodi na temperaturama do 150°C i značano povećanje rastvorljivosti na temperaturama iznad 150°C (Carr i sar., 2011). Međutim, aromatična jedinjenja i monoterpene karakteriše smanjenje rastvorljivosti u vodi na temperaturama između 25 i 60°C, a potom značajno povećanje rastvorljivosti iznad 60°C (Miller i Hawthorne, 2000). Toplotni uticaj na prinos SWE se, prema tome, karakteriše pozitivnim i negativnim uticajem na rastvorljivost, koji deluju kao dve sile suprotnog smera. "Negativna" toplota dovodi do stvaranja "kaveza" vodoničnih veza oko ciljanih molekula i tom prilikom dolazi do smanjenja rastvorljivosti sa povećanjem temperature. Povećanje rastvorljivosti na temperaturama preko 150°C ukazuje na nemogućnost formiranja "kaveza" i dominantnog uticaja "pozitivne" toplote na proces ekstrakcije (Shinoda, 1977).



Slika 15. Uticaj temperature na dielektričnu konstantu vode

Najveća prednost upotrebe povišenog pritiska u postupcima ekstrakcije je mogućnost ekstrakcije na temperaturama većim od temperature ključanja rastvarača. Povišen pritisak uz visoku temperaturu i smanjen površinski napon rastvarača utiče na bolje prodiranje rastvarača u pore čvrstog biljnog materijala i na taj način utiče na povećanje brzine prenosa mase (Mustafa i Turner, 2011). Pored toga, povišeni pritisak može da utiče na razaranje čvrstog materijala, pa na taj način intraćelijski molekuli postaju lako dostupni za ekstrakciju. Prilikom klasične ekstrakcije može da dođe do formiranja mehurića vazduha oko materijala

koji se ekstrahuje, pa na taj način dolazi do smanjenja slobodne površine za prenos mase iz čvrste u tečnu fazu. Međutim, u procesu SWE ovaj se problem prevazilazi delovanjem povišenog pritiska. U opštem slučaju, dovoljno je da radni pritisak prilikom postupka SWE bude dovoljan da održi vodu u tečnom stanju na određenoj temperaturi ekstrakcije. Dalje povećanje pritiska u slučaju ekstrakcije najvećeg broja bioaktivnih jedinjenja nema značajan uticaj na povećanje prinosa zbog toga što promena pritiska ispod 1000 bar ima jako mali uticaj na promenu dielektrične konstante vode (Carr i sar., 2011).

Protok rastvarača ima uticaja samo kod polukontinualnog tipa SWE. U najvećem broju slučajeva povećanje protoka dovodi do većih prinosa ekstrakcije usled dovođenja veće količine svežeg rastvarača u kontakt sa iscrpljenom sirovinom i održavanja koncentracionog gradijenta između čvrste i tečne faze. Međutim, upotreba velikih protoka u SWE je ograničena zapreminom dobijenog ekstrakta i koncentracijom ciljane grupe jedinjenja u njemu, koja može biti jako mala u slučaju upotrebe velike zapremine rastvarača, odnosno vodenom ekstraktu se razbražuje koncentracija (Güçlü-Üstündağ i Mazza, 2008). U slučajevima kada povećanje protoka dovodi do značajnog povećanja prinosa ekstrakcije, prenos mase sa površine čvrstog materijala u tečnu fazu je ograničavajući faktor za brzinu ekstrakcije. U slučajevima kada povećanjem protoka vode ne dolazi do povećanja prinosa, prenos mase iz čvrste u tečnu fazu nije ograničen rastvorljivošću ispitivanih jedinjenja u subkritičnoj vodi, već je ograničen unutrašnjom difuzijom iz čestica biljnog materijala u tečnu fazu (Asl i Khajenoori, 2013).

Prilikom određivanja optimalnog vremena za potpunu ekstrakciju određene grupe jedinjenja, potrebno je posebnu pažnju obratiti na interakciju sa drugim parametrima procesa. U određenim slučajevima šaržne SWE, produženjem vremena ekstrakcije nije uvek moguće postići potpuno iscrpljenje sirovine, dok kod polukontinualnog procesa produženje ekstrakcije može obezbediti bolje prinose željenih jedinjenja. Vreme ekstrakcije je vrlo često povezano sa temperaturom i prirodom jedinjenja koja se ekstrahuju usled potencijalne degradacije termolabilnih jedinjenja dužim izlaganjem povišenoj temperaturi. Prema tome, prilikom optimizacije procesa SWE, potrebno je istovremeno posmatrati temperaturu i vreme kao nezavisne promenljive, s obzirom da povećanje temperature najčešće dovodi do skraćanja vremena ekstrakcije. Na primer, prinos ekstrakcije oksidovanih monoterpena,

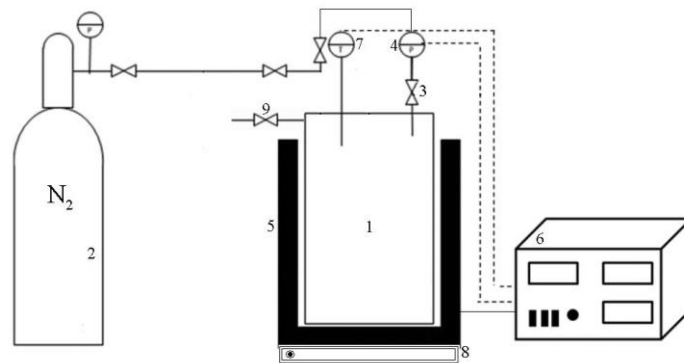
eugenola i eugenil acetata, iz karanfilića na 125°C i 80 min je jednak prinosu dobijenom na 250°C i 15 min (Rovio i sar., 1999).

Srednji prečnik čestica ima uticaja u svim procesima prenosa mase. Smanjenje prečnika čestica dovodi do povećanja slobodne površine za prenos mase iz čvrste u tečnu fazu i u najvećem broju slučajeva dovodi do većih prinosa ekstrakcije. Stepent usitnjenosti biljnog materijala mora da bude odgovarajući kako bi se obezbedio maksimalan kontakt čestica i rastvarača i sprečila aglomeracija čestica. Prilikom šaržne SWE previše usitnjene čestice mogu da znatno otežaju proces filtracije usled ubrzanog začepljenja pora filtera i značajnog povećanja viskoziteta ekstrakta usled rastvaranja jedinjenja iz biljnog materijala. Pored ovog problema, prilikom polukontinualne SWE može da dođe do otežanog protoka rastvarača kroz ekstraktor. U ovom slučaju je moguće dodati staklene perle koje bi obezbedile uniformnu raspodelu čvrste faze u ekstraktoru i poboljšale perkolacione osobine biljnog materijala (Plaza i Turner, 2015). Zapremina ekstraktora se može dopuniti staklenim kuglicama u slučajevima kada je zapremina (masa) čvrstog uzorka mala. U tom slučaju one imaju ulogu da smanje slobodan prostor u ekstraktoru i na taj način smanje potrošnju rastvarača

Veliki broj različitih aditiva može da utiče na povećanje prinosa u procesima SWE. Zabeležena je upotreba jonskih i nejonskih površinski aktivnih materija (PAM) na povećanje prinosa i smanjenje degradacije bioaktivnih jedinjenja (Plaza i Turner, 2015). Povišena temperatura prilikom procesa SWE vrlo često predstavlja pogodnu sredinu za oksidaciju pojedinih grupa jedinjenja, pa se u cilju njihove zaštite vrlo često dodaju antioksidanti kao što su askorbinska kiselina i butilovani hidroksitoluol (BHT). Za postizanje radnog pritiska se vrlo često koriste vazduh, azot i ugljendioksid (CO_2), međutim, za ekstrakciju jedinjenja osetljivih na oksidaciju se ne preporučuje upotreba vazduha. pH vrednost rastvora takođe može uticati na rastvaranje i ekstrakciju određenih jedinjenja, a može da se podešava dodatkom pufera ili korišćenjem CO_2 za postizanje radnog pritiska (Mustafa i Turner, 2011). Različiti organski rastvarači mogu da se koriste kao kosolventi u postupcima SWE, međutim, njihova upotreba je nepoželjna usled zadržavanja u tečnom ekstraktu. Visok sadržaj vlage u uzorku može u velikoj meri uticati na prinos jedinjenja, tako da se vlažni uzorci pre ekstrakcije u ekstraktoru mešaju sa sredstvima za dehidrataciju, kao što je dijatomejska zemlja, što u velikoj meri može ubrzati proces ekstrakcije.

2.3.3.2. Procesna oprema

Na tržištu trenutno ne postoji aparatura namenjena posebno za SWE, već se u te svrhe koriste diskontinualni (šaržni) i polukontinualni (protočni) reaktori prilagođeni za ovaj proces. Diskontinualna SWE izvodi se u šaržnim visoko-pritisnim reaktorima prikazanim na Slici 16 (Zeković i sar, 2014).

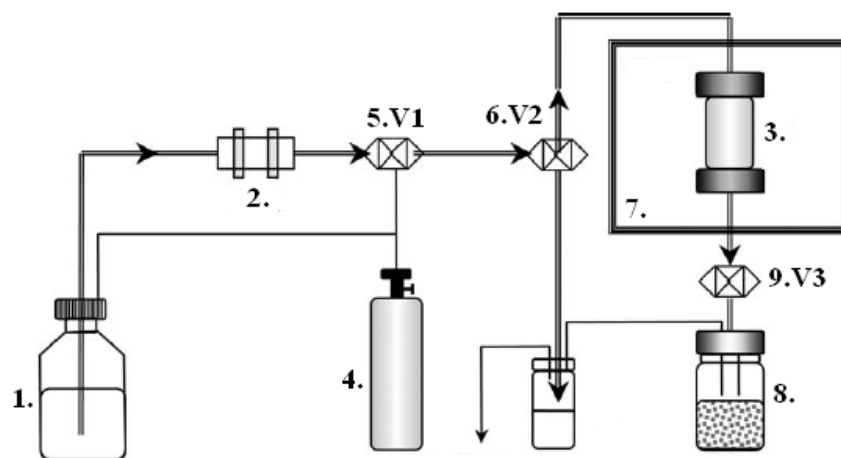


Slika 16. Šematski prikaz šaržne SWE: 1. ekstraktor; 2. boca sa azotom; 3. ulazni ventil za gas; 4. manometar; 5. električna grejna obloga; 6. temperaturni kontroler; 7. temperaturna sonda; 8. magnetna mešalica; 9. izlazni ventil za gas

Diskontinualna SWE se odvija direktnim mešanjem sirovine i rastvarača (vode) u ekstraktoru (1). Radni pritisak se postiže uvođenjem azota iz boce (2) kroz ulazni ventil (3) u ekstraktor i meri se na manometru (4). Azot se koristi kako bi se sprečila moguća oksidacija na povišenoj temperaturi i pritisku u prisustvu kiseonika iz vazduha. Radna temperatura se postiže zagrevanjem ekstraktora električnom grejnom oblogom (5), a merenje i regulacija temperature se vrši temperaturnim kontrolerom (6) i mernom sondom (7). Magnetna mešalica (8) se koristi u cilju intezifikacije prenosa mase i toplote, kao i sprečavanja lokalnog pregrevanja na unutrašnjim zidovima ekstraktora. Nakon ekstrakcije, ekstraktor se hladi u ledenom kupatilu do sobne temperature i azot se ispušta kroz izlazni ventil (9).

Za razliku od šaržne SWE gde se voda i uzorak direktno mešaju, protočna SWE omogućava stalno dovodenje svežeg rastvarača koji dolazi u kontakt sa sirovinom, što dovodi do većeg koncentracionog gradijenta između rastvorka u čvrstoj i tečnoj fazi. Osnovni nedostatak šaržne SWE je nemogućnost potpunog iscrpljenja sirovine usled ograničene zapremine ekstraktora, što se može prevazići višestupnom ekstrakcijom iscrpljene sirovine svežom vodom. Kritični parametri u šaržnoj SWE su temperatura i vreme ekstrakcije.

Aparatura za polukontinualnu SWE (Slika 17) se sastoji od rezervoara sa vodom (1) koji je povezan sa pumpom visokog pritiska (2) koja uvodi rastvarač u ekstraktor (3). Azot iz boce (4), koji se koristi za postizanje radnog pritiska, se preko uvodnog ventila (5) meša sa vodom, a zajedno se preko ventila (6) uvode u ekstraktor koji je termostatisan električnim grejačem (7). Prenos mase se odvija između vode koja protiče i nepokretnog sloja sirovine u ekstraktoru. Ekstrakt se nakon toga sakuplja u kolektorskom sudu (8), a azot može da se ispušta u atmosferu ili preko ventila vraća nazad u sistem. U cilju bržeg hlađenja, kolektor može da se nalazi u ledenom kupatilu kako bi gubitak vode iz ekstrakta bio minimalan prilikom pada pritiska. Svi delovi koji dolaze u kontakt sa subkritičnom vodom se uglavnom izrađuju od kiselo-otpornog nerđajućeg čelika kako bi se sprečila korozija materijala na povišenoj temperaturi. Na izlasku iz ekstraktora nalazi se filter koji omogućava razdvajanje ekstrakta od čvrste faze. Prilikom protočne SWE se nakon postizanja radne temperature i pritiska ekstrakcija vrši bez protoka rastvarača kroz ekstraktor određeni vremenski period (najčešće 5-15 min), slično perkolaciji, a statični ciklusi se po potrebi mogu ponavljati u cilju boljeg iscrpljenja sirovine.



Slika 17. Šematski prikaz protočnog sistema za SWE: 1. rezervoar sa vodom; 2. pumpa; 3. ekstraktor; 4. boca sa azotom; 5. ventil V1; 6. ventil V2; 7. električna grejna obloga; 8. kolektor; 9. ventil V3

2.3.3.3. Primena SWE za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora

SWE se u poslednje vreme široko primenjuje za ekstrakciju različitih bioaktivnih jedinjenja širokog spektra polarosti. S obzirom na specifične osobine ekstragensa i

fenomene prenosa koji se odigravaju u ovom procesu, ovaj postupak je pogodan za ekstrakciju kako polarnih jedinjenja, kao što su polisaharidi, tako i nepolarnih, kao što su masne kiseline. Pregled primene SWE za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja u poslednjih 10 godina je prikazan u Tabeli 5 (Plaza i Turner, 2015).

Tabela 5. Primena SWE za ekstrakciju različitog spektra bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora

Grupa jedinjenja	Biljni materijal	Uslovi ekstrakcije	Tip procesa
Antioksidanti	Lišće masline	200°C, 100 bar, 20 min	Šaržno
Polifenolna jedinjenja	Matičnjak	150°C, 100 bar, 10 min	Šaržno
	Neven	220°C, 60 bar, 45 min	Šaržno
	Korijander	200°C, 30 bar, 28 min	Šaržno
Flavonoli	Trop jabuke	125°C, 100 bar, 3 min	Šaržno
	Trop grožđa	124°C, 100 bar, 1 min	Šaržno
	<i>Moringa oleifera</i>	100°C, 20 min	Protočno
Flavoni	Trop citrusa	200°C, 140 bar	Šaržno
Antocijani	Trop grožđa	85°C, 100 bar, 1 min	Šaržno
Proantocijanidini	Trop grožđa	100°C, 100 bar, 5 min	Šaržno
Flavonoli	Otpad crnog luka	120°C, 80 bar, 45 min	Protočno
Polisaharidi	<i>Chlorella vulgaris</i>	150°C, 100 bar, 20 min	Šaržno
Masno ulje	Suncokret	130°C, 30 bar, 30 min	Šaržno

U zadnjih 15 godina je objavljen veliki broj radova o korišćenju SWE kao alternativne metode za ekstrakciju etarskih ulja. S obzirom da temperatura ima dominantan uticaj na kvalitativni i kvantitativni sastav dobijenih ekstrakata, prilikom optimizacije procesa biljni materijal se prvo ekstrahuje na različitim temperaturama. Subkritična voda na 100°C ima mnogo veći afinitet prema oksidovanim monoterpenima, ali se monoterpeni (p -cimen i γ -terpinen) i seskviterpeni (β -kariofilen) na tim uslovima ekstrahuju u znatno manjem procentu (Kubátová i sar., 2001). Porast temperature dovodi do blagog povećanja prinosa monoterpena i seskviterpena. Značajniji porast u prinosu β -kariofilena iz *Mentha piperita* je zabeležen tek iznad 175°C. Mentil acetat, i pored toga što je oksidovani monoterpen, ekstrahuje se slično kao neoksidovani monoterpeni čija je potpuna ekstrakcija zabeležena tek na 200°C. Subkritična voda na 100°C je veoma selektivna prema oksidovanim monoterpenima, posebno tokom prvih 20 min ekstrakcije, kada se preko 70% ukupnih oksidovanih monoterpena i manje od 10% neoksidovanih monoterpena ekstrahuje iz

Satureja hortensis (Kubátová i sar., 2001). Nakon 40 min na 100°C dolazi do potpune ekstrakcije oksidovanih monoterpena, ali se smanjuje selektivnost i povećava prinos neoksidovanih jedinjenja. Prilikom SWE etarskog ulja iz lekovitog bilja, istraživači su uglavnom dolazili do sličnih optimalnih uslova. Ispitivanjem SWE etarskog ulja origana najveći prinos je zabeležen na 125°C, 20 bar i pri protoku rastvarača od 1 mL/min (Soto Ayala i de Castro, 2001). Izvršena je SWE origana na optimalnim uslovima kako bi se uporedio kvalitet i prinos ulja dobijen destilacijom vodom. Rezultati ukazuju na očigledne prednosti SWE u pogledu vremena ekstrakcije, s obzirom da je za 15 min bio mnogo veći prinos u odnosu na destilaciju koja je vršena 3 h. Velika prednost SWE je mogućnost variranja sastava dobijenih ekstrakata variranjem temperature i protoka. Međutim, i destilacija ima određene prednosti zbog toga što nakon destilacije dolazi do spontanog razdvajanja dve faze koje se ne mešaju, dok su ekstrakti dobijeni subkritičnom vodom uglavnom emulzije iz kojih se etarsko ulje mora izolovati T/T ekstrakcijom (Soto Ayala i Luque de Castro, 2001). Za SWE etarskog ulja komorača (*Foeniculum vulgare*) optimalni uslovi ekstrakcije su bili: 150°C, 20 bar i protok vode od 2 mL/min (Gamiz-Gracia i Luque de Castro, 2000). Temperatura od 150°C je i u ovom slučaju bila najpogodnija za ekstrakciju oksidovanih monoterpena, dok je najveći prinos neoksidovanih monoterpena bio na 200°C. Kvalitet etarskog ulja dobijenog SWE na optimalnim uslovima upoređen je sa etarskim uljem dobijenim destilacijom vodom i Č/T ekstrakcijom sa metilen hloridom. Autori su zaključili da se najbolji prinos ostvaruje SWE i da pored prethodno navedenih prednosti ova metoda predstavlja „čist“ proces u poređenju sa ekstrakcijom metilen hloridom, gde je jako teško potpuno ukloniti rastvarač iz ekstrakta. Osim optimizacije ekstrakcionih parametara, kritičan korak u SWE etarskih ulja predstavlja razdvajanje ulja iz vodenog ekstrakta. U cilju destabilizacije emulzije, dodaje se NaCl kako bi se poboljšalo razdvajanje faza i vrši se T/T ekstrakcija primenom metilen hlorida ili *n*-heksana (Ozel i sar., 2003). Ekstrakcija na čvrstoj fazi može da posluži kao alternativa T/T ekstrakciji u razdvajanju etarskih ulja iz ekstrakata dobijenih subkritičnom vodom. Međutim, u određenim slučajevima se izdvajanja etarskog ulja iz vodenih ekstrakata može izbeći kada se ekstrakt koristi kao takav, ili se etarsko ulje mikrokapsulira i osuši odgovarajućim postupkom.

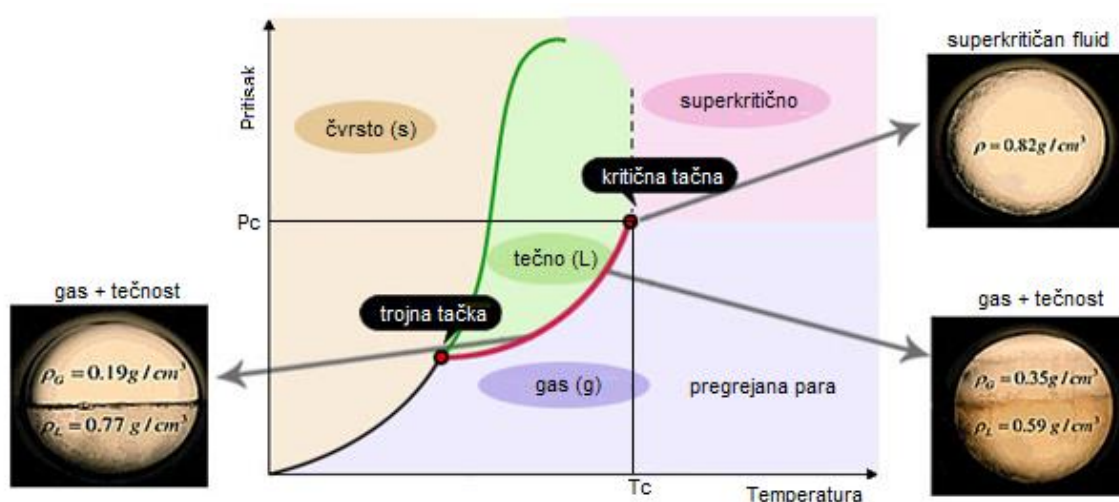
Savremene metode ekstrakcije kao što su UAE, MAE i SWE su pokazale veliku prednost u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja u poređenju sa konvencionalnim metodama kao što su Soxhlet ekstrakcija, maceracija i perkolacija. Ispitana je ekstrakcija velikog broja vrsta

lekovitog bilja sa visokim sadržajem polifenolnih jedinjenja poznatih po svojoj antioksidativnoj aktivnosti. Izvršena je ekstrakcija origana (*Origanum vulgare*) variranjem temperature (25 - 200°C) pri konstantnom pritisku (100 bar) i vremenu ekstrakcije (30 min), a u ekstraktima je određen sadržaj ukupnih fenola i antioksidativna aktivnost (Rodríguez-Meizoso i sar., 2006). Sa porastom temperature ekstrakcije zabeležen je približno linearan rast ukupnog prinosa ekstrakcije koji je bio najveći na 200°C (54%). Sadržaj ukupnih fenola u suvim ekstraktima je bio najveći u ekstraktima dobijenim na najnižoj temperaturi (25°C). Međutim, uzimajući u obzir ukupan prinos ekstrakcije, najveći prinos fenolnih jedinjenja u odnosu na drogu se ostvaruje na 150°C (8,73 g GAE/100 g droge) i skoro duplo je veći u odnosu na prinos dobijen na 25°C (5,31 g GAE/100 g). Do smanjenja u prinosu fenola na 200°C verovatno dolazi usled degradacije termolabilnih jedinjenja tokom dužeg izlaganja povišenoj temperaturi. Ekstrakti dobijeni na 150°C su imali najveću antioksidativnu aktivnost ($EC_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$), a najmanju su imali ekstrakti dobijeni na 25°C. U cilju boljeg potpunog iscrpljenja sirovine i dobijanja većih prinosa polifenolnih jedinjenja, moguće je vršiti stupnjevite ekstrakcije (frakcionisanje) gde sirovina nakon ekstrakcije na jednoj temperaturi podleže novim ekstrakcijama na povišenim temperaturama u dva ili više koraka (Rodríguez-Meizoso i sar., 2006; Ibanez i sar., 2003). Izvršena je stupnjevita SWE ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) na 100, 150 i 200°C pri konstantnom pritisku (60 bar) i protoku rastvarača (1 mL/min) tokom 15 min (Ibanez i sar., 2003). Sva tri ekstrakta su sakupljena i njihove komponente razdvojene korišćenjem HPLC na obrnutoj fazi. Posmatranjem hromatograma ekstrakta dobijenog na 100°C može se zaključiti da se najveći broj ekstrahovanih komponenata eluira sa kolone već posle 7 min, što ukazuje na to da se na 100°C prvo ekstrahuju polarnije komponente, i da porastom temperature i smanjenjem dielektrične konstante vode dolazi do ekstrakcije umereno polarnih i nepolarnih jedinjenja. Utvrđeno je da se procesom SWE iz ruzmarina dobijaju ekstrakti čije su dominantne komponente rozmarinska kiselina, rozmanol, epirozmanol, skutelarein, karnosol, karnosinska kiselina, metil karnosat, episorozmanol i rozmadial.

2.3.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom

Superkrična fluidna ekstrakcija (SFE) razvila usled potrebe za prevazilaženjem glavnih nedostatak tradicionalnih ekstrakcionih tehnika, kao što su produženo vreme ekstrakcije, velika potrošnja toksičnih rastvarača, niska selektivnost i mali prinos ekstrakcije.

Princip SFE se zasniva na upotrebi fluida u superkritičnom stanju, pri čemu dolazi do modifikacije njihovih fizičkih osobina (Slika 18).



Slika 18. p-T dijagram CO₂ sa faznim stanjima

Gustina superkritičnih fluida je slična tečnostima, dok su viskozitet i difuzivnost slični gasovima (Tabela 6) (Herrero i sar., 2006). Usled niskog viskoziteta i visoke difuzivnosti, superkritične fluide karakterišu bolje osobine prenosa toplote i mase u odnosu na tečnosti, prema tome mogu brže da difunduju u pore biljnog materijala i rastvaraju ciljana jedinjenja.

Tabela 6. Fizičko-hemijske osobine gasova, tečnosti i superkritičnih fluida

Stanje	Gustina [g/cm ³]	Difuzivnost [cm ² /s]	Viskozitet [g s/cm]
Gasovito	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻⁴
Tečno	1	<10 ⁻⁵	10 ⁻²
Superkritično	0,3-0,8	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ -10 ⁻¹

Kritični parametri rastvarača koji se koriste u SFE su dati u Tabeli 7 (Pereira i Meireles, 2010). Kao rastvarač u procesima SFE najčešće se koristi CO₂, a glavni razlozi su relativno niske vrednosti kritične temperature (31,3°C) i pritiska (72,9 bar). U odnosu na vodu i metanol, on ima znatno niže kritične parametre. Sa druge strane, u odnosu na organska jedinjenja sličnih kritičnih parametara kao što su dimetil etar, etilen i propan, ima veliku prednost sa aspekta sigurnosti s obzirom da nije eksplozivan i zapaljiv. Važno je istaći da je kod SFE relativno jednostavno odvajanje ekstragensa od ekstrakta promenom temperature i

pritiska, gde se CO₂ izdvaja kao gas, i dobijaju se ekstrakti potpuno oslobođeni rastvarača. Pored toga, CO₂ ima i druge prednosti, dostupan je u visokom stepenu čistoće, relativno jeftin, netoksičan (GRAS), nezapaljiv i inertan (Reverchon i De Marco, 2006). Kada se SFE primenjuje u industrijskim razmerama, moguće je da se CO₂ tokom procesa recirkuliše i ponovo koristi kao ekstragens. CO₂ predstavlja dobar ekstragens za nepolarna jedinjenja, a glavno ograničenje je njegov mali afinitet prema polarnim jedinjenjima, pa se u tu svrhu koriste polarni modifikatori ili kosolventi, koji se u određenom udelu dodaju ugljendioksidu u procesu SFE (Herrero i sar., 2006).

Tabela 7. Kritični parametri rastvarača koji se koriste za SFE

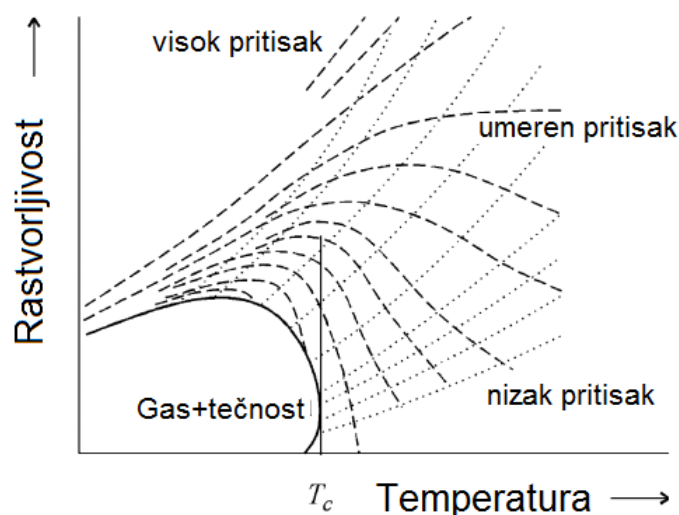
Rastvarač	Kritična temperatura [°C]	Kritični pritisak [bar]
Amonijak	132,4	113,5
Ugljendioksid	31,1	73,7
Dimetil etar	127,1	52,7
Etan	32,3	48,7
Etilen	9,3	50,4
Metanol	239,6	80,9
<i>n</i> -Heksan	234,5	30,2
Propan	96,8	42,5
Voda	374,1	220,6
Ksenon	17,1	58,0

2.3.4.1. Parametri koji utiču na proces

S obzirom da SFE predstavlja visoko-pritisnu tehnologiju, može se zaključiti da pritisak predstavlja najvažniji procesni parametar. Pritisak je direktno povezan sa gustinom koja utiče na moć rastvaranja (solubility power) superkritičnog fluida. Povećanje pritiska utiče na povećanje gustine fluida i samim tim na povećanje prinosa ekstrakcije, koje ne mora uvek da bude prednost ekstrakcije, jer može da dođe do koekstrakcije pratećih jedinjenja koja su nepoželjna u finalnom proizvodu. Sa druge strane, povećanje temperature dovodi do smanjenja gustine CO₂, što kao posledicu ima smanjenje ukupnog prinosa (da Silva i sar., 2016). Pored uticaja na ekstragens, temperatura predstavlja jedini parametar koji utiče na napon pare jedinjenja koje se ekstrahuje. Povećanjem temperature dolazi do povećanja napona pare lako isparljivih jedinjenja, a samim tim i njihove rastvorljivosti. Uticaj temperature na napon pare je znatno slabije izražen u slučaju slabo isparljivih jedinjenja.

Prema tome, nije uvek moguće predvideti da li će promena temperature imati pozitivan ili negativan uticaj na ukupni prinos ekstrakcije.

Jedna od glavnih prednosti SFE je mogućnost promene selektivnosti menjanjem gustine, odnosno procesnih parametara (temperature i pritiska) (Valle i Aguilera, 1999). Na Slici 19 je prikazan uticaj temperature i pritiska na rastvorljivost slabo isparljivih jedinjenja u sub- i superkričnom fluidu (Brunner, 1994). Može se uočiti da rastvorljivost varira u širokim granicama podešavanjem procesnih parametara, što omogućava kontrolu selektivnosti procesa. U subkričnom stanju rastvorljivost raste sa porastom temperature do temperature bliskoj kritičnoj, kada počinje da opada. Dalji porast temperature na nižim pritiscima dovodi do smanjenja rastvorljivosti usled smanjenja gustine superkričnog fluida. Na umerenim i visokim pritiscima je promena gustine sa temperaturom dosta manja, prema tome, u ovom slučaju dolazi do povećanja rastvorljivosti jedinjenja.



Slika 19. Uticaj procesnih parametara SFE (temperatura i pritisak) na rastvorljivost jedinjenja

Prema pregledu literature, najveći broj SFE prirodnih proizvoda se odvija na pritiscima od 100 do 400 bar i temperaturama od 40 do 60°C (Slika 20) (De Melo i sar., 2014). U ovom intervalu temperature i pritiska, gustina CO₂ se kreće od 200 do 900 kg/m³. Ovaj interval gustine može da obezbedi adekvatnu moć rastvaranja za veliki broj nepolarnih jedinjenja. Povećanje temperatura iznad ovog opsega može da se negativno odrazi na kvalitet ekstrakata, jer može da dođe do degradacije osetljivih jedinjenja, a upotreba umerenih

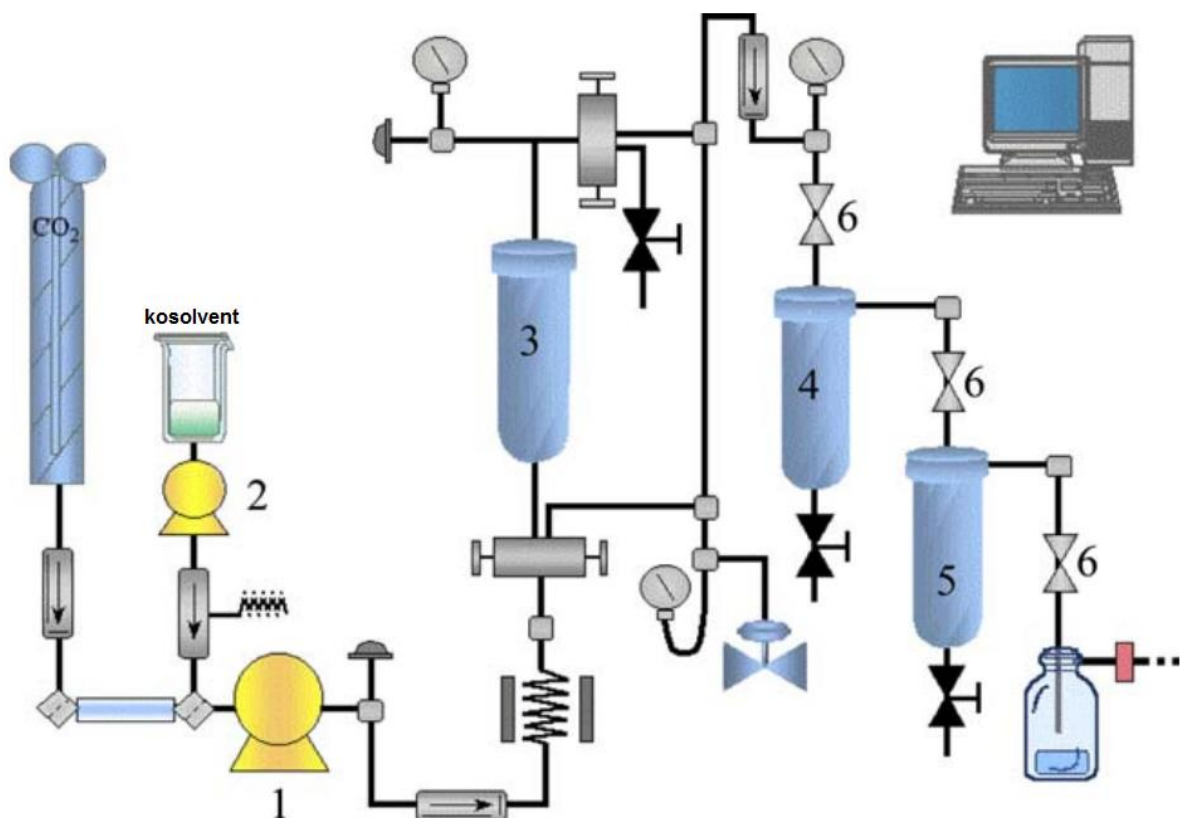
povećanja ukupnog prinosa. Međutim, u industrijskim procesima je neophodno SFE proces učiniti ekonomski isplativim, pa se ekstrakcija uglavnom vrši samo dok traje period brze ekstrakcije koji je kontrolisan rastvorljivošću jedinjenja u ekstragensu, a obično se prekida kad počne period spore ekstrakcije, koji je kontrolisan unutrašnjom (molekulskom) difuzijom. Razumevanje oba perioda ekstrakcije i analiza kinetike su neophodni za razumevanje fenomena prenosa koji se odigravaju u ovom procesu.

U cilju menjanja selektivnosti ekstragensa, SFE se često izvodi uz dodatak kosolventa. U tu svrhu se najčešće koriste organski rastvarači kao što su etanol, metanol, *n*-heksan, metilen hlorid, a ponekad se koriste voda i biljna ulja (De Melo i sar., 2014). Zbog svoje umerene polarnosti, ali i sa zdravstvenog aspekta, daleko najviše se kao kosolvent koristi etanol. On uglavnom ima zadatak da poveća afinitet superkritičnog CO₂ prema ekstrakciji polarnih jedinjenja kao što su polifenoli. Upotreba drugih organskih rastvarača može pozitivno da utiče na povećanje prinosa, međutim, nakon ekstrakcije se javlja problem uklanjanja toksičnih rastvarača iz ekstrakata, što umanjuje kvalitet i tržišnu vrednost proizvoda. Što se vode tiče, njena rastvorljivost u superkritičnom CO₂ je ograničena i biljni materijal koji se podvrgava ekstrakciji obično sadrži određeni udeo vezane vode (do 10%). Što se osobina biljnog materijala tiče, srednji prečnik čestica ima uticaj na kinetiku i ukupan prinos ekstrakcije. Usitnjavanjem biljnog materijala se prevazilazi ograničenje u prenosu mase iz čvrste faze, međutim, usled preteranog usitnjavanja može da dođe do gubitka lako isparljivih jedinjenja kao što su etarska ulja (Reverchon i De Marco, 2006).

2.3.4.2. Procesna oprema

Uređaji koji se koriste za SFE su znatno kompleksniji od ostalih uređaja koji se primenjuju u savremenim ekstrakcionim tehnikama. Za razliku od ekstrakcije tečnostima pod pritiskom, SFE nije moguće vršiti u diskontinualnim sistemima i neophodno je ostvariti protok ekstragensa kroz ekstraktor napunjen biljnim materijalom. Pored toga, velika je razlika u postrojenjima koja se koriste na laboratorijskom i industrijskom nivou. Osnovni sistem za SFE je prikazan na Slici 21 (Herrero i sar., 2006). Uređaj se sastoji iz boce sa CO₂ i rezervoarom za kosolvent koji se pumpom (2) dovodi u kontakt sa CO₂ i zajedno se u kompresoru (1) komprimuju na radni pritisak koji se podešava sistemom ventila. Superkritični CO₂ i kosolvent (ako je on potreban) prolaze kroz ekstraktor (3) i nakon

ekstrakcije se dovode u prvi separator (4) gde se promenom procesnih parametara menja moć rastvaranja CO₂ i dobija se prvi ekstrakt. Ekstragens dalje sa jedinjenjima koja se nisu izdvojila u prvom separatoru dolazi u drugi separator (5) gde se pritisak i temperatura spuštaju ispod kritičnih uslova, i CO₂ se u obliku gasa oslobađa u atmosferu, ili se vraća u proces do kompresora. Kod savremenih sisitema je regulacija procesnih parametara (temperatura, pritisak i protok) obično regulisana preko računara. Jednostavnije konfiguracije koje se uglavnom koriste u laboratorijskim uslovima nemaju pumpu za kosolvent, pa je selektivnost ekstragensa moguće menjati samo promenom pritiska i temperature.



Slika 21. Šematski prikaz uređaja za SFE: 1) kompresor, 2) pumpa za kosolvent, 3) ekstraktor, 4) I separator, 5) II separator i 6) ventili

Kao glavni nedostatak SFE navode se investicioni troškovi za opremu. Cena aparature za industrijsku SFE sa po dva ekstraktora od 5, 50 i 500 L je 100 000, 300 000 i 1 150 000 \$ (Prado i sar., 2012). Prema tome, neophodno je imati izuzetno vredan proizvod za koji bi se primenila ova tehnologija kako bi došlo do povrata uloženog kapitala. Na Slici 22 je prikazano industrijsko postrojenje za SFE proizvođača Separex (Francuska) koje se u firmi Atelier Fluides

Supercritiques (Nion, Francuska) koristi za uslužnu proizvodnju superkritičnih ekstrakata iz različitih prirodnih sirovina.

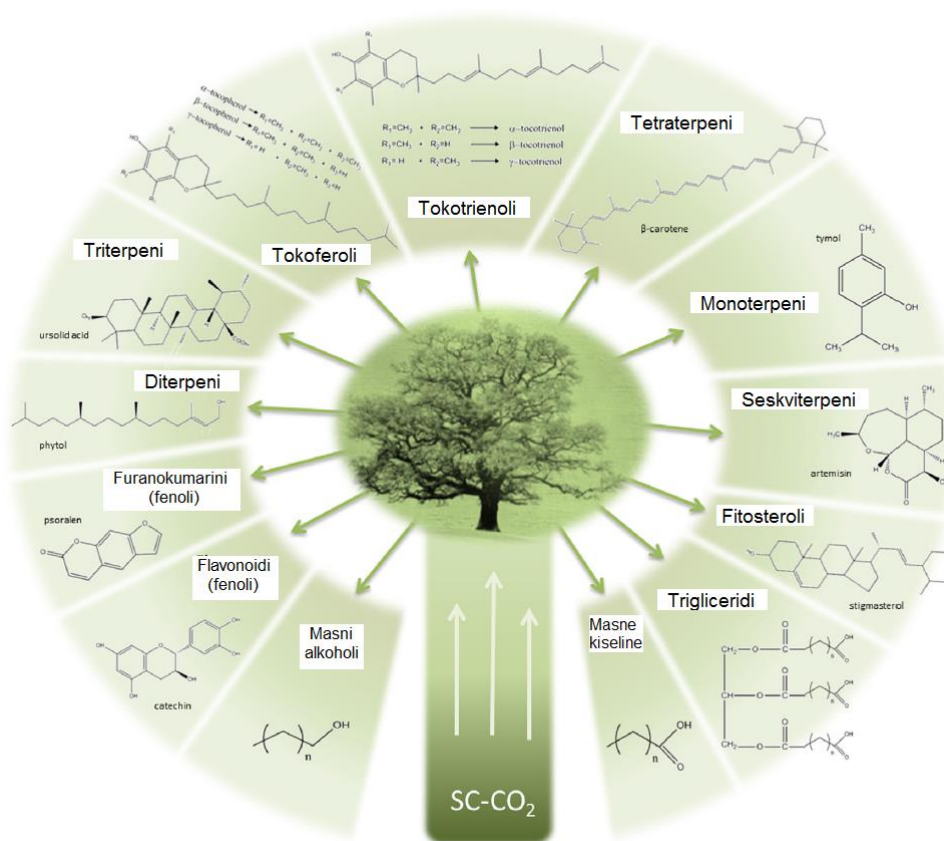


Slika 22. Industrijsko postrojenje za SFE (Separex, Francuska)

2.3.4.3. Primena SFE za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora

SFE je do danas primenjena za ekstrakciju različitih grupa bioaktivnih jedinjenja i na veliki broj sirovina. Na Slici 23 su prikazane glavne grupe jedinjenja na koje je moguće primeniti ovu tehnologiju (De Melo i sar., 2014). SFE je našla veliku primenu u ekstrakciji terpenoidnih jedinjenja, prvenstveno mono- i seskviterpena koji se nalaze u etarskim uljima različitih biljnih vrsta. Etarsko ulje se iz biljaka uglavnom ekstrahuje tradicionalnim tehnikama kao što su Č/T ekstrakcija organskim rastvaračima, destilacija vodenom parom i presovanje. Kao organski rastvarači se najčešće primenjuju *n*-heksan i metilen hlorid koji dobro ekstrahuju etarsko ulje, međutim u velikoj meri ekstrahuju i druga lipofilna jedinjenja. Drugi problemi koji se javljaju sa ovim rastvaračima su toksičnost za čoveka i okolinu, pa je u skladu sa trendovima „zelene“ hemije tendencija u smanjenju njihove upotrebe, kako u analitičke, tako i u industrijske svrhe. Destilacijom vodenom parom se dobijaju čista etarska ulja bez tragova rastvarača i balasnih materija, međutim, i ova tehnika ima svoja ograničenja. Naime, destilacija se odvija na povišenoj temperaturi relativno dugo vreme što zahteva

veliku potrošnju energije za zagrevanje. Pored toga, na povišenim temperaturama može da dođe do određenih hemijskih promena i degradacije termolabilnih jedinjenja, što umanjuje kvalitet proizvoda (Pourmortazavi i Hajimirsadeghi, 2007). Sa druge strane, SFE može da odgovori na navedene nedostatke i da posluži kao odlična alternativa za ekstrakciju etarskih ulja. Etarska ulja se dobro ekstrahuju na umerenim pritiscima (90 – 100 bar) i temperaturama (40 - 50°C), odnosno na relativno niskim gustinama CO₂ (Reverchon i De Marco, 2006). Povećanjem moći rastvaranja CO₂ sa povećanjem pritiska (250 – 300 bar) može da se poveća prinos etarskog ulja, međutim, pod tim uslovima dolazi i do koekstrakcije pratećih jedinjenja, kao što su kutikulatni voskovi, i dobijaju se ekstrakti nižeg kvaliteta (Pereira i Meireles, 2010). Etarska ulja visokog kvaliteta se ovom tehnikom mogu dobiti razdvajanjem u dva separatora. Naime, voskovi su praktično nerastvorni na niskim temperaturama (-5 – 5°C), pa ako se ekstrakcija vrši na 90 bar i 40°C, podešavanjem uslova u prvom separatoru na 90 bar i 0°C dolazi do precipitacije voskova, a etarsko ulje ostaje rastvoreno u superkritičnom CO₂ i uvodi se u drugi separator gde se daljim smanjenjem pritiska na 20 bar dobija etarsko ulje visokog stepena čistoće (Reverchon i De Marco, 2006).



Slika 23. Glavne grupe jedinjenja za čije izolovanje je moguće primeniti SFE tehnologiju

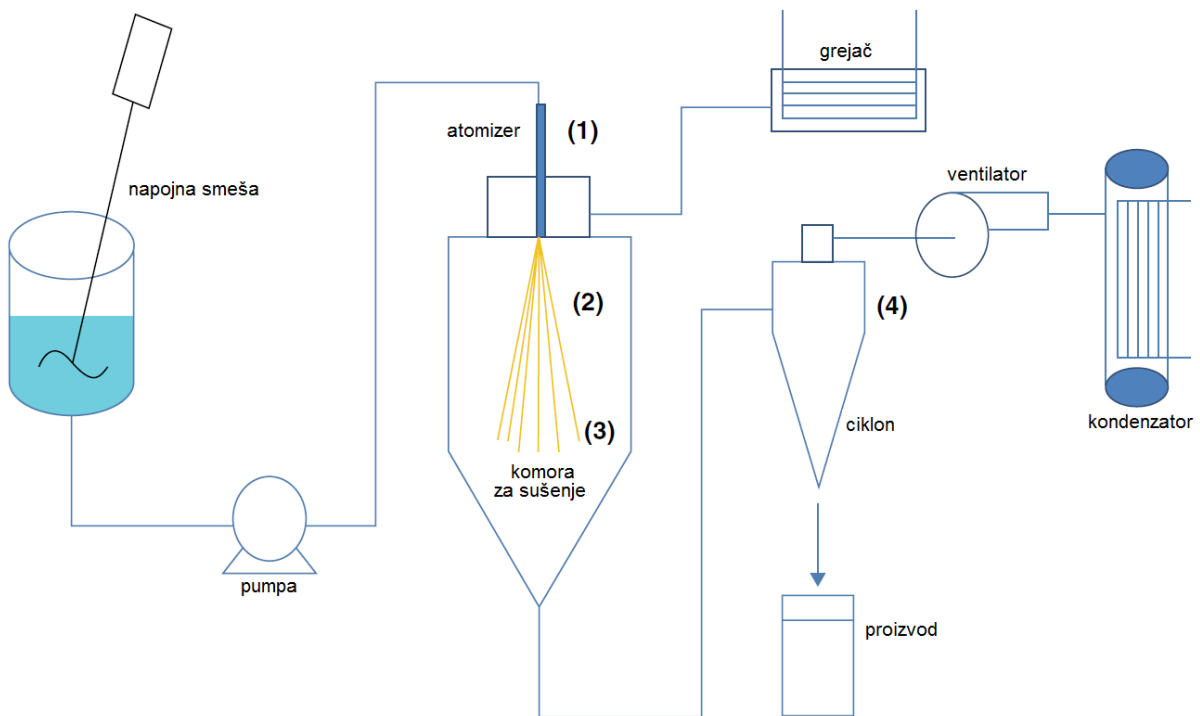
Pored etarskog ulja, SFE je našla veliku primenu za ekstrakciju biljnih ulja koja se tradicionalnim ekstrakcionim postupcima ekstrahuju uglavnom heksanom. Uparavanjem ekstrakata u cilju eliminacije heksana može da dođe do hemijskih promena u ekstraktu, a pored toga heksan u tragovima (500 – 1000 ppm) može da zaostaje u ekstraktu (Reverchon i De Marco, 2006). Masna ulja su rastvorna u superkritičnom CO₂ na 40°C, međutim, za razliku od etarskih ulja, neophodno je povećati pritisak (gustinu) ekstragenta (>280 bar) kako bi došlo do ekstrakcije ovih jedinjenja. Na ovaj način se dobijaju visoko-kvalitetna biljna ulja potpuno oslobođena tragova rastvarača. SFE je našla posebnu primenu u ekstrakcije visokovrednih bioaktivnih jedinjenja kao što su karotenoidi, tokoferoli i fitosteroli, čija tržišna vrednost opravdava upotrebu ove tehnologije (De Melo i sar., 2014).

2.4. Spray drying

Savremene ekstrakcione tehnike mogu da odgovore na zahteve u pogledu željenog prinosa ciljanih jedinjenja i hemijskog sadržaja dobijenih ekstrakata, međutim, kada se radi u primeni ekstrakata u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, tečnu formu odlikuju određeni nedostaci. Tečni ekstrakti su osetljivi na okolne faktore i vrlo lako može da dođe do degradacije aktivnih pricipa usled delovanja svetlosti i kiseonika u prisustvu vode. Prednosti suvih ekstrakata u odnosu na tečne su jednostavnije skladištenje, veća koncentracija aktivnih pricipa i produžena stabilnost proizvoda. Pored toga, suvi ekstrakti su prihvatljiviji od strane potrošača. U cilju prevođenja tečnih u suve ekstrakte u najvećem broju slučajeva se koristi *spray drying* tehnika, odnosno sušenje raspršivanjem (Đorđević i sar., 2015).

Sušenje raspršivanjem predstavlja tehniku koja se široko koristi za rastvore, suspenzije i emulzije, kao i za oblaganje koloidnih čestica odgovarajućim nosačima i njihovo prevođenje u formu praha, odnosno za mikrokapsuliranje. Osušeni proizvod može biti u obliku praha, granula ili aglomerata, što zavisi od fizičkih i hemijskih osobina napojne smeše, uslova sušenja i osobina primenjenog nosača. Proces sušenja raspršivanjem je relativno jednostavan. Zasniva se na dovođenju u kontakt raspršenih kapljica napojne smeše i zagrejanog vazduha, pri čemu dolazi do isparavanja rastvarača. Glavni delovi uređaja za sušenje raspršivanjem su prikazani na Slici 24 (Anandharamakrishnan, 2015). Tokom prevođenja tečnog u suvi ekstrakt, dolazi do sledećih procesa: 1) raspršivanje, odnosno atomizacija napojne smeše, 2) kontakt kapljica i grejnog medijuma, 3) isparavanje rastvarača

i 4) odvajanje čvrstih čestica od gasne faze (Slika 23). Pre raspršivanja, obično se izvrši zagrevanje napojne smeše pri čemu se smanjuje njen viskozitet, što olakšava raspršivanje.



Slika 24. Šema uređaja za sušenje raspršivanjem

Samo raspršivanje predstavlja ključak momentat ovog procesa. Raspršivanjem napojne smeše u veliki broj sitnih kapljica se povećava efektivna površina kontakta i smanjuje se otpor prenosu toplote i mase. Jedan m^3 napojne smeše se raspršuje na oko $2 \cdot 10^{12}$ uniformnih kaplica prečnika $100 \mu m$ ukupne površine od $60\,000 m^2$ (Masters, 2002). Od načina raspršivanja zavise oblik, struktura, veličina i raspodela veličina čestica gotovog proizvoda (Anandharamakrishnan, 2015). Velika specifična površina obezbeđuje efektivniji kontakt sa zagrejanim medijumom i brzo isparavanje rastvarača. Dva osnovna tipa atomizera su rotacioni i atomizeri sa diznama.

Rotacioni atomizeri

Ovi atomizeri rade na principu propuštanja napojne smeše kroz cilindar koji dovodi tečnost do rotacionog diska čija je periferna brzina oko $200 m/s$ (Slika 25) (Murali i sar., 2014). Prednosti ovog tipa atomizera su dobijanje čestica uniformne raspodele i činjenica da se retko kad začepe. Relativno su jednostavni za rukovanje, a veličina usitnjenih kapljica zavisi od brzine rotacije diska. S obzirom da se energija raspršivanja obezbeđuje rotacionim

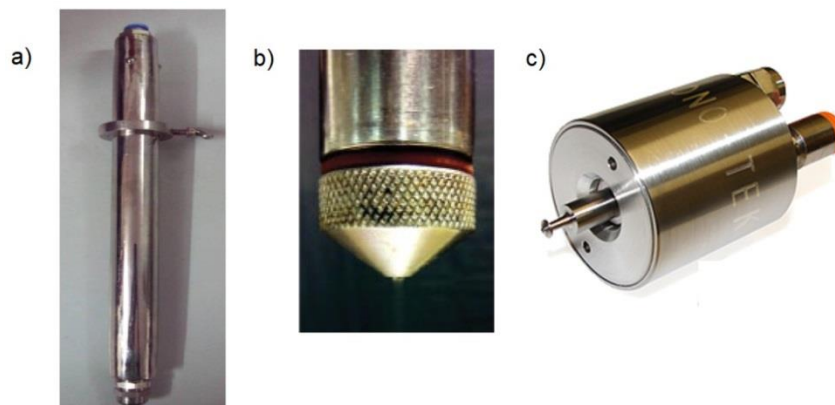
diskom, oni mogu da rade na atmosferskom pritisku. Otežani rad sa tečnostima povišenog viskoziteta predstavlja glavno ograničenje rotacionih atomizera. Pored toga, može da nastane i velika količina finih čestica koja se u ciklonu ne razdvaja od gasne faze, što vodi do povećanih gubitaka, odnosno smanjenja prinosa (Anandharamakrishnan, 2015).



Slika 25. Rotacioni atomizer

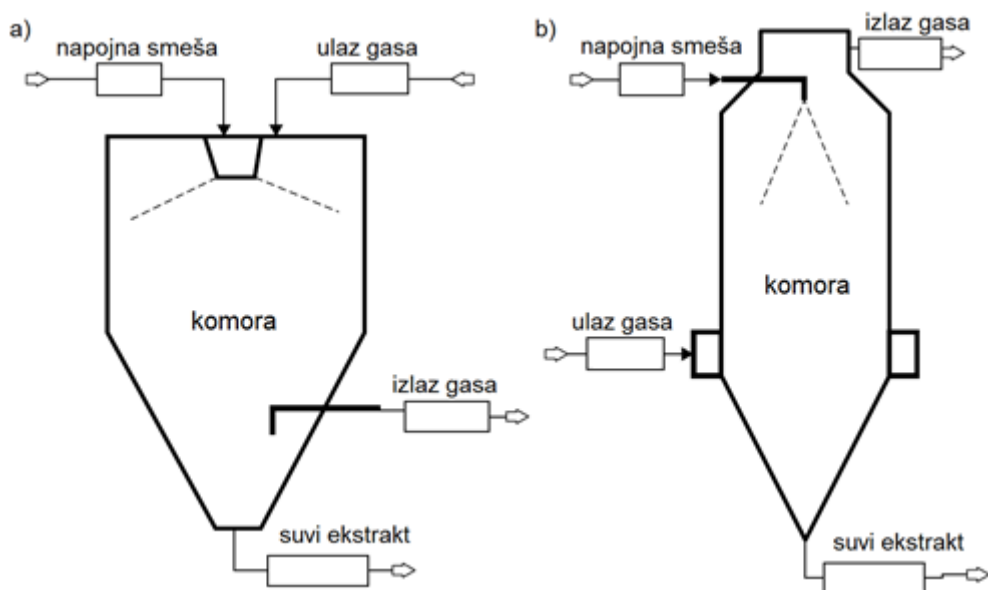
Dizne pod pritiskom

Atomizeri ovog tipa se dele na hidraulične dizne, dizne sa dva fluida i ultrazvučne dizne (Slika 26). Kod hidrauličnih dizni se pritiskom dobija kinetička energija neophodna za proterivanje napojne smeše kroz diznu. Ovom atomizacijom se dobijaju čestice dobrih protočnih karakteristika, međutim, sprej nije homogen kao kod rotacionih diskova, pa se dobijaju prahovi neuniformne raspodele veličine čestica i postoji rizik od začepjenja dizne. Kod dizni sa dva fluida se napojna smeša meša sa vazduhom ili drugim gasom pod pritiskom i zajedno prolaze kroz diznu. Ovakav tip dizni je pogodan za viskozne tečnosti. Pored toga, dobijaju se prahovi manje veličine čestica i uniformnije raspodele. Glavni problem koji se javlja je zadržavanje velike količine vazduha koji ostaje zarobljen u česticama, pa se na taj način dobijaju čestice male gustine i loših protočnih karakteristika. Sve veću primenu imaju ultrazvučne mlaznice kod kojih se delovanjem ultrazvuka visoke frekvencije smanjuje površinski napon tečnosti i olakšava se raspršivanje kroz diznu. Na taj način se prevazilaze svi nedostaci prethodnih tehnika, dobijaju se fine čestice uniformne raspodele i olakšan je rad sa viskozim fluidima (Anandharamakrishnan, 2015).



Slika 26. Dizne za raspršivanjem: a) hidraulična, b) dizna sa dva fluida i c) ultrazvučna

Do kontakta kapljica i grejnog medijuma dolazi nakon raspršivanja tečne faze. Na ovaj način dolazi do brzog isparavanja rastvarača sa površine kapljica, a vrlo je bitno da topao vazduh bude uniformno raspoređen u celoj komori. Smer kretanja grejnog medijuma i kapljica može da bude istostrujan i protivstrujan (Slika 27) (Oakley, 2004). Kod ove tehnike se češće praktikuje istostrujni smer kretanja, s obzirom da kapljice dolaze prvo u kontakt sa najtoplijim vazduhom pri čemu dolazi do brzog isparavanja. Nakon formiranja čvrstih čestica vazduh se hladi, jer se deo toplote troši na isparavanje rastvarača, a čvrste čestice u ciklonu dolaze u kontakt sa vazduhom znatno niže temperature u odnosu na ulaznu. Ovakav tip sušenja je pogodan za sušenje termolabilnih jedinjenja s obzirom na kratko vreme kontakta između grejnog medijuma i kapljica tečnosti. Sa druge strane, protivstrujan tip sušenja obezbeđuje efikasnije iskorišćenje toplotne energije, međutim, suvi ekstrakt nakon sušenja dolazi u kontakt sa vazduhom visoke temperature što može negativno da se odrazi na njegov kvalitet usled potencijalne degradacije osetljivih jedinjenja. Nakon sušenja, suvi ekstrakt se od gasa odvaja u ciklonu, a gubici se mogu javiti usled formiranja finih čestica koje odlaze zajedno sa gasom, ili se deo suvog ekstrakta lepi na unutrašnju površinu uređaja. Kako bi sušenje bilo efikasno, neophodno je optimizovati nekoliko ključnih parametara procesa. Fizičke osobine napojne smeše kao što su viskozitet, površinski napon, temperatura i koncentracija suve materije utiču na proces raspršivanja i na osobine čestica suvog ekstrakta. Što se ostalih procesnih parametara tiče, najvažniji su ulazna i izlazna temperatura, protok i koncentracija nosača. Neophodno je izvršiti njihovu optimizaciju kako bi se dobio kvalitetan suvi ekstrakt.



Slika 27. a) Istrostrujni i b) protivstrujni kontakt napojne smeše i grejnog medijuma

2.4.1. Nosači

Kao najveći nedostatak sušenja raspršivanjem se navodi lepljenje ekstrakta po unutrašnjoj površini uređaja. Ekstrakti koji se suše raspršivanjem mogu da se podele na lepljive i nelepljive. Neki primeri lepljivih ekstrakata su sokovi voća i povrća, med i amorfnak laktoza, dok ekstrakti lekovitog bilja uglavnom spadaju u grupu nelepljivih ekstrakata. Do lepljenja dolazi usled prisustva jedinjenja sa niskom temperaturom staklavosti kao što su prosti šećeri. Iz tog razloga je vrlo često neophodno dodati nosač koji će da poveća temperaturu staklavosti napojne smeše i spreči lepljenje ekstrakta. Nosači koji se koriste moraju da imaju dobre osobine u pogledu emulgovanja, rastvorljivosti, oblaganja i bilo bi poželjno da su njihovi rastvori niskog viskoziteta pri višim koncentracijama. U tu svhu se vrlo često koriste gume (guma arabika i guar guma) i proteini (natrijum kazeinat, proteini surutke i želatin) (Đorđević i sar., 2015). Guma arabika ispunjava većinu navedenih zahteva i vrlo često se koristi kao nosač, međutim, njena cena je konstantno u porastu, pa to predstavlja jedno od ograničenja (Charve i Reineccius, 2009). U poslednje vreme se kao nosači vrlo često koriste maltodekstrini različitog glukoznog ekvivalenta (DE), koji predstavlja stepen hidrolize i povezan je sa prosečnom molekulskom masom. Maltodekstrin predstavlja polisaharid koji se dobija hidrolizom skroba. Temperatura staklavosti maltodekstrina povećava se sa smanjenjem DE, pa se maltodekstrini sa manjim glukoznim ekvivalentom koriste kao nosači kod ekstrakata koje je teško sušiti, kao što su voćni sokovi bogati šećerom. Prednosti

maltodekstrina su da nije sladak, ima mali viskozitet pri velikom rasponu koncentracija, dobra rastvornost u hladnoj vodi i niska cena, dok se kao najveći nedostatak navodi slaba emulgujuća svojstva (Đorđević i sar., 2015). Ovo može da predstavlja problem pri proizvodnji mikrokapsula, pa se maltodekstrin uglavnom kombinuje sa nekim površinski aktivnim polimerima, kao što su proteini i drugi modifikatori skroba.

2.5. Eksperimentalni dizajn

Optimizacija je neizbežan korak u svakoj analitičkoj tehnici ili industrijskom procesu. Konvencionalan pristup optimizaciji predstavlja analizu uticaja jednog po jednog faktora (eng. one-factor-at-a-time) dok se svi ostali parametri održavaju konstantnim. Pored velikog broja eksperimenata koje je potrebno izvršiti, što zahteva potrošnju vremena i novca, glavno ograničenje ovog pristupa je nemogućnost određivanja uticaja interakcije između nezavisnih promenljivih. U cilju prevazilaženja ovih ograničenja razvijene su različite tehnike multivarijantne statistike, a među njima se kao najpoznatija izdvaja metoda odzivne površine (eng. response surface methodology; RSM). RSM predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika koje se baziraju na fitovanju eksperimentalnih vrednosti polinomnim jednačinama (Baš i Boyacı, 2007). Ova metoda se često primenjuje kada se ispituje uticaj više procesnih parametara na jedan ili više odziva, u cilju njihove simultane optimizacije i dobijanja željenih vrednosti odziva. Kompletna RSM studija optimizacije se sastoji od sledećih koraka (Bezerra i sar., 2008):

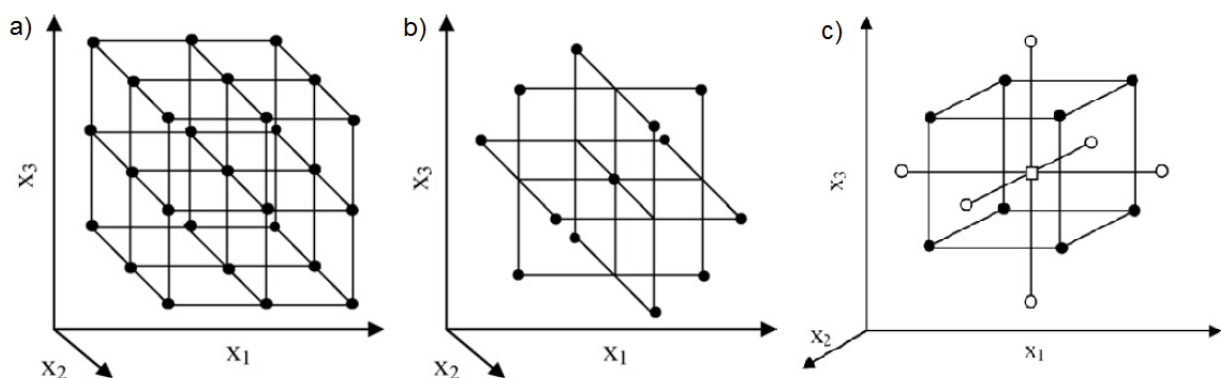
1. Izbor nezavisnih promenljivih sa glavnim uticajem na ispitivani sistem,
2. Izbor eksperimentalnog dizajna i izođenje eksperimenata,
3. Matematičko-statistički tretman eksperimentalnih rezultata,
4. Provera adekvatnosti modela,
5. Verifikacija slaganja modela sa predviđenim vrednostima i
6. Definisavanje optimalnih vrednosti za sve ispitivane promenljive.

Početni korak predstavlja izbor nezavisnih promenljivih, gde je prvo potrebno napraviti skrining eksperimente kako bi se grubo ispitao uticaj više parametara i među njima odabrali oni sa glavnim uticajem. U tu svrhu se najčešće koristi faktorijalni dizajn na dva nivoa (2^k faktorijalni dizajni, gde je k broj faktora) koji je za ovu svrhu efikasan i ekonomičan (Lundstedt i sar., 1998). Pored preliminarnih eksperimenata, u obzir treba uzeti i prethodne

rezultate i iskustva koji su primenjeni u sličnim sistemima koji se optimizuju. Nakon toga, na red dolazi izbor eksperimentalnog dizajna koji će se koristiti za studiju optimizacije, kao i eksperimentalnog domena nezavisnih promenljivih. Što se tiče eksperimentalnog dizajna koji se koriste za optimizaciju, obično se koriste 3^k faktorijalni dizajni (Full-factorial) ili neke od modifikacija sa smanjenim brojem eksperimenata. Raspodela faktora (x_1 , x_2 i x_3) i njihovih nivoa u 3^3 potpunom faktorijalnom dizajnu je prikazana na Slici 28a. Upotreba 3^k faktorijalnog dizajna je ograničena velikim brojem eksperimenata s obzirom da ukupan broj eksperimenata (N) eksponencijalno raste sa brojem faktora ($N=3^k$). Prednost 3^k u odnosu na 2^k faktorijalni dizajn je mogućnost fitovanja eksperimentalnih rezultata kvadratnim modelom, dok se 2^k dizajn vezuje samo za linearne modele. Kao alternativa 3^k faktorijalnom dizajnu su se pojavili dizajni sa smanjenim brojem eksperimenata, a najčešće se koriste Box-Behnken i centralno-kompozitni dizajn (Slika 28). Glavne osobine Box-Behnken eksperimentalnog dizajna su (Bezerra i sar., 2008):

- Broj eksperimenata se određuje prema jednačini: $N=2k(k-1)+c_p$, gde je c_p broj ponavljanja u centralnoj tački i
- Nezavisne promenljive moraju biti raspoređene na tri nivoa (-1, 0, 1) sa jednakim rastojanjem između njih.

Centralno-kompozitni dizajn takođe ima smanjen broj eksperimenata u odnosu na Full-factorial, međutim, raspored eksperimentalnih tačaka u njemu je različit (Slika 28c). Faktori su u okviru ovog dizajna raspoređeni na pet nivoa ($-\alpha$, -1, 0, 1, α), a vrednost α zavisi od broja faktora koji se ispituju. Face-Centered dizajn se izdvaja kao najčešće korišćeni eksperimentalni dizajn iz grupe centralno-kompozitnih dizajna.



Slika 28. a) Full-factorial, b) Box-Behnken i c) Centralno-kompozitni eksperimentalni dizajn

Nakon izvršenih eksperimenata i izmerenih vrednosti odziva, na red dolazi fitovanje rezultata odgovarajućim polinomnim modelima. S obzirom da je najčešće neophodno naći kritične tačke (minimum ili maksimum), obično se koriste polinomi sa kvadratnim članovima (Ferreira i sar., 2007):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

gde je Y odziv, X_i i X_j su kodirane nezavisno promenljive, a β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} su regresioni koeficijenti za odsečak, linearne, kvadratne i članove interakcije. U cilju određivanja regresionih koeficijenata u jednačini (1), koristi se metoda najmanjih kvadrata. Definisanjem regresionih koeficijenata se generiše matematički model koji može da predvidi ponašanje ispitivanog odziva u okviru eksperimentalnog domena. Zatim je neophodno proveriti slaganje matematičkog modela i eksperimentalnih rezultata. U tu svrhu se koristi deskriptivna statistika koja obuhvata koeficijente determinacije (R^2) i varijanse (CV). Međutim, u cilju potpunog definisanja slaganja modela neophodno je primeniti analizu varijanse (ANOVA) kojom se definišu reziduali modela koji potiču od greške merenja i od neadekvatnosti samog modela primenom Fišerovog testa (F-test) (Bezerra i sar., 2008). Prvi korak predstavlja određivanje značajnosti regresije, odnosno p -vrednosti koja mora da bude statistički značajna ($p < 0,05$). Drugi način predstavlja određivanje nedostatka prilagođavanja, odnosno *lack of fit* test. Na osnovu ponavljanja eksperimenata u centralnoj tački je moguće odrediti da li neslaganje sa modelom potiče usled neadekvatnosti samog modela ili usled greške merenja. Dobijanje neznačajne p -vrednosti za nedostatak prilagođavanja ($p > 0,05$) znači da disperzija eksperimentalnih rezultata ne zavisi od modela i u domenu je greške merenja (Myers i sar., 2009). Nakon što je utvrđeno slaganje modela sa eksperimentalnim vrednostima, neophodno je izvršiti verifikaciju modela. To se utvrđuje izvođenjem eksperimenata na predviđenim uslovima i poređenjem vrednosti eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva.

RSM ima nekoliko prednosti u odnosu na tradicionalne tehnike optimizacije. Naime, ova tehnika omogućava dobijanje velike količine informacije iz relativno malog broja eksperimenata, dok je kod tradicionalnih tehnika neophodno izvršiti veliki broj eksperimenata kako bi se opisalo ponašanje sistema (Baş i Boyacı, 2007). Pored toga, RSM

omogućava definisanje uticaja interakcije ispitivanih parametara na odziv, što je pogotovo interesantno na hemijske i biohemijske procese gde sinergizam ili antagonizam određenih faktora može da ima veliki uticaj na odziv. Sa druge strane, ova tehnika poseduje određene nedostatke, a glavni nedostatak RSM je ograničenost matematičkog modela na ispitivani eksperimentalni domen. Pored toga, kod RSM se uglavnom koristi polinom drugog reda, a veliki broj hemijskih procesa se ponaša po nekoj drugoj matematičkoj funkciji. Ovaj problem se donekle može rešiti odgovarajćim transformacijama odziva (logaritmovanje, korenovanje, itd.), ali se za opisivanje zavisnosti i dalje koristi kvadratni polinom (Baş i Boyacı, 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Glavni eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je realizovan u laboratorijama Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko iženjerstvo, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Deo istraživanja je urađen na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Departmanu za poljoprivredne i prehrambene nauke, Univerziteta u Bolonji (Cezena, Italija), kao i u SP Laboratoriji a.d. (Bečej). Detaljna šema i tok aktivnosti eksperimentalnog plana su prikazani na Slici 29.

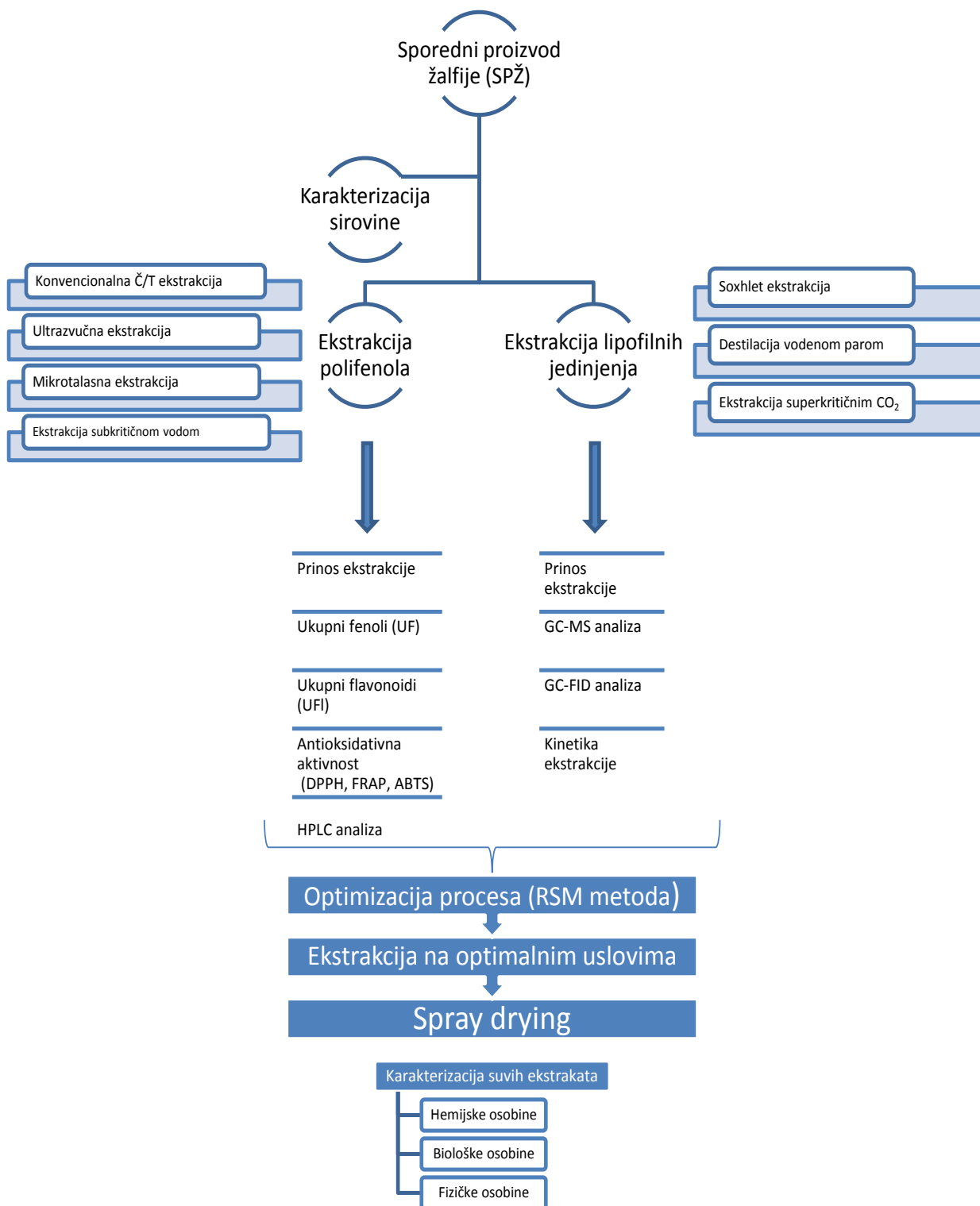
3.1. Biljni materijal

Sporedni proizvod žalfije (SPŽ) (*Salvia officinalis* L.) poreklom iz Crne Gore je dobijen od lokalne fabrike za proizvodnju filter čaja (Fructus D.O.O., Bačka Palanka, Srbija). Tehnološke operacije koje su korišćene za tretman biljnog materijala i proizvodnju filter čaja su detaljno objašnjene u Poglavlju 2.2. Frakcija biljne prašine žalfije sa prečnikom čestica <0,315 mm je dobijena kao sporedni proizvod nakon prosejavanja na vibracionim sitima.

3.2. Hemikalije i reagensi

Hemikalije i reagensi korišćeni u eksperimentalnom radu su kupljeni od sledećih proizvođača:

- Folin-Ciocalteu reagens, (\pm)-katehin, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil-hidrat (DPPH \cdot), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijumova so (ABTS) i Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilnaiselina), 5-di-*tec*-butil-4-hidroksi-toluen (BHT), fenazin metosulfat (PMS), 2,3,5-trifeniltetrazolijum hlorid (TPTZ, Tetrazolium Red) i β -nikotinamid adenin dinukleotid 2'-fosfat redukovana tetranatrijumova so hidrat (NADH) - Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemačka,
- Galna kiselina, α -tujon - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD,
- Kalijum persulfat (99% čistoće) - Acros Organics, Geel, Belgija,
- Nitroplavi tetrazolijum (NBT) - Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka,
- Askorbinska kiselina – Centrohem, Stara Pazova, Srbija,
- Ugljendioksid (>99,98% čistoće) – Messer, Novi Sad, Srbija,



Slika 29. Šema i tok aktivnosti eksperimentalnog plana

- α -Pinen, β -pinen, kamfor, metilhavikol (estragol) i eukaliptol (1,8-cineol) - Dr Ehrenstorfer, Nemačka,
- γ -Terpinen, (+)-limonen, linalool, geraniol, karvakrol, eugenol i α -terpineol - Carl Roth, Nemačka,
- Natrijum acetat i hlorovodonična kiselina – Merck, Darmstadt, Nemačka,
- Mravlja kiselina - VWR International, Milan, Italija,
- Maltodekstrin (DE19.7) – Brenntag, Mülheim, Nemačka.

Svi ostale hemikalije upotrebljene u eksperimentalnom radu su bile analitičke čistoće.

3.3. Karakterizacija biljnog materijala

3.3.1. Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage u biljnom materijalu određen je gravimetrijskom metodom na osnovu gubitka sušenjem koji propisuje *Ph. Jug. IV*.

3.3.2. Određivanje sadržaja pepela

Sadržaj pepela u SPŽ je određen gravimetrijskom metodom na osnovu količine mineralnih materija koja zaostaju nakon potpunog žarenja droge, postupkom koji propisuje *Ph. Jug. IV*.

3.3.3. Određivanje sadržaja etarskog ulja

Sadržaj etarskog ulja je određen destilacijom vodenom parom koristeći aparaturu po Cleavenger-u (*Ph. Jug. IV*).

3.4. Ekstrakcija

3.4.1. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja

3.4.1.1. Konvencionalna Č/T ekstrakcija

Konvencionalna Č/T ekstrakcija je izvršena u cilju određivanja eksperimentalnog domena za koncentraciju etanola koja je korišćena za optimizaciju ultrazvučne ekstrakcije. Pored toga, cilj je bio poređenje prinosa polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata dobijenih konvencionalnim i savremenim tehnikama. U svim eksperimentima, 5,0

g SPŽ je ekstrahovano sa 100 mL različitog ekstragensa. Ekstrakcije su vršene na sobnoj temperaturi tokom 24 h na laboratorijskoj tresilici sa termostatom (150 rpm) (KS 4000, IKA, Staufen, Nemačka). Kao ekstragens je korišćena voda i smeša etanol-voda (20, 40, 60, 80 i 96%; m/m). Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom, zatim prebačeni u staklene bočice i čuvani na 4°C do analize. Ukupan prinos ekstrakcije određen je primenom standardne metode po *Ph. Jug.* IV (1984). Poznata zapremina tečnog ekstrakta (10 mL) je prenesena u prethodno izmereni balon i sadržaj balona je uparavan do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Dobijeni ekstrakt se suši u sušnici na temperaturi od 105°C u toku 3 sata, odnosno do konstantne mase. Prinos ekstrakcije je izražen kao % (g/100 g droge).

3.4.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija

U svim eksperimentima, 5,0 g SPŽ je pomešano sa 100 mL 60% etanola u erlenmajeru (250 mL). Ekstrakcije su vršene na ultrazvučnom kupatilu (EUP540A, Euinstruments, Francuska) sa konstantnom frekvencijom od 40 kHz. Temperatura (40, 60 i 80°C), vreme ekstrakcije (40, 60 i 80 min) i snaga ultrazvuka (24, 42 i 60 W/L) su kontrolisani preko kontrolne table uređaja. Na erlenmajer je postavljen povratni hladnjak kako bi se sprečilo eventualno isparavanje ekstragensa. Erlenmajeri su uvek postavljeni na istom rastojanju od emitera ultrazvuka i dodatno mešanje tokom ekstrakcije nije primenjivano. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom, sakupljeni u staklene bočice i čuvani na 4°C do analize.

3.4.1.3. Mikrotalasna ekstrakcija

Za mikrotalasnu ekstrakciju je prepravljena kuhinjska mikrotalasna peć (NN-E201W, Panasonic, Japan) u koju je adekvatno postavljen stakleni balon sa povratnim hladnjakom. U svim eksperimentima, 5,0 g SPŽ pomešano sa odgovarajućom zapreminom ekstragensa koja je zavisila od primenjenog odnosa rastvarač-droga (20, 30 i 40 mL/g). Sve ekstrakcije su vršene na konstantnoj frekvenciji i snazi mikrotalasnog zračenja (600 W). Baloni su uvek postavljeni na istom rastojanju od magnetrona i dodatno mešanje tokom ekstrakcije nije primenjivano. Pored odnosa rastvarač-droga, nezavisne promenljive u ovom procesu su bili koncentracija etanola (40, 60 i 80%) i vreme ekstrakcije (10, 20 i 30 min). Nakon ekstrakcije,

ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom, preneti u staklene bočice i čuvani na 4°C do analize.

3.4.1.4. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Ekstrakcija subkritičnom vodom je izvršena u šaržnom visoko-pritiskom ekstraktoru (Parr Instrument Company, SAD) unutrašnje zapremine 450 mL i maksimalnim radnim pritiskom i temperaturom od 200 bar i 350°C. Ekstraktor je povezan sa temperaturim kontrolerom (4838, Parr Instrument Company, SAD). Šematski prikaz sa glavnim delovima uređaja je dat na Slici 16. U svim eksperimentima, 10,0 g SPŽ je pomešano sa 100 mL ekstragensa (destilovana voda ili odgovarajući rastvor HCl) u ekstraktoru (1). Radni pritisak je postignut uvođenjem azota iz boce (2) kroz ventil (3) i meren je manometrom (4). Azot je korišćen za postizanje radnog pritiska kako bi se sprečila potencijalna oksidacija do koje može doći na povišenoj temperaturi u prisustvu kiseonika iz vazduha. Ekstraktor je zagrevan grejnom oblogom (5), a temperatura je merena i kontrolisana preko kontrolne table (6), povezane sa temperaturnom sondom (7). Magnetna mešalica (8) (1000 rpm) je korišćena za ubrzavanje prenosa toplote i mase, kao i za sprečavanje lokalog pregrevanja na zidovima ekstraktora. Temperatura (120, 170 i 220°C), vreme ekstrakcije (10, 20 i 30 min) i koncentracija HCl u ekstragensu (0, 0,75 i 1,5%) su bile nezavisne promenljive, dok su svi ostali parametri procesa bili konstantni. Nakon ekstrakcije, ekstraktor je ohlađen na ledenom kupatilu do 30°C i azot je ispušten kroz ventil (9). Potom su ekstrakti profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom (V-700, Büchi, Switzerland), a zatim su sakupljeni u staklene bočice i čuvani na 4°C do analize.

3.4.2. Ekstrakcija lipofilnih jedinjenja i etarskog ulja

3.4.2.1. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom

Ekstrakcija superkritičnim CO₂ je vršena na laboratorijskom postrojenju za visoko-pritisku ekstrakciju (HPEP, NOVA – Swiss), čija je šema prikazana na Slici 30. Ekstraktor (E) je prvo napunjen odmerenom masom SPŽ (35,0 g). Biljni materijal u ekstraktoru se najpre oslobađa prisutnog vazduha produvanjem CO₂ iz boce (GC) u gasovitom stanju, nakon čega se zatvore ventil (V5) i regulacioni ventil (RV2). Ultratermostatima (UT1) i (UT2) se održavaju radne temperature u ekstraktoru (E) i separatoru (S) pri zatvorenom ventilu (V1)

3.4.2.2. Destilacija vodenom parom

Postupak izolovanja etarskog ulja destilacijom vodenom parom je opisan u Poglavlju

3.3.3.

3.4.2.3. Soxhlet ekstrakcija

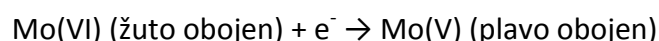
Izmerena droga (10,0 g) je prenesena u ekstrakcionu čauru koja je postavljena u Soxhlet ekstraktor na koji je vezan povratni hladnjak. U balon je zatim dodat ekstragens (120 mL). Sadržaj balona se zagreva pri čemu pare rastvarača prolaze kroz cev ekstraktora, kondenzuju se u povratnom hladnjaku, vraćaju u telo ekstraktora gde se odvija ekstrakcija. Kad se telo ekstraktora napuni ekstragensom, sadržaj se preliva preko sifona u balon i postupak se ponavlja 15 puta (≈ 6 h). Nakon završene ekstrakcije izvršeno je uklanjanje rastvarača iz ekstrakta uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču do suva i određen je prinos ekstrakcije (% m/m).

3.5. Hemiska karakterizacija tečnih ekstrakata

3.5.1. Analiza polifenolnih jedinjenja

3.5.1.1. Sadržaj ukupnih fenola (UF)

Sadržaj UF je u tečnim i suvim ekstraktima SPŽ određen spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rosi, 1965). Ova metoda se zasniva na merenju redukcionog kapaciteta polifenolnih jedinjenja. Disocijacijom polifenola nastaje proton i fekoksidni anjon. Nastali fenoksidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona:



Odgovarajuće razblaženje tečnog ekstrakta ili rastvor suvog ekstrakta SPŽ (0,1 mL) je pomešano sa 7,9 mL destilovane vode, 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 mL 20% Na_2CO_3 . U pripremi slepe probe je umesto 0,1 mL uzorka dodato 0,1 mL destilovane vode, ili odgovarajuće smeše etanol-voda koja je korišćena kao ekstrages u Č/T ekstrakciji. Reakciona smeša je inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi i apsorbancija uzorka je izmerena na 750 nm.

Sva merenja su izvršena u tri ponavljanja. Prinos UF u postupcima Č/T ekstrakcije je izražen u g ekvivalenta galne kiseline po 100 g droge (g GAE/100 g droge), dok je sadržaj UF u suvim ekstraktima izražen u mg GAE po g suvog ekstrakta (mg GAE/g).

3.5.1.2. Sadržaj ukupnih flavonoida (UFI)

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima SPŽ određen je kolorimetrijskom metodom po Markham-u (Harborne, 1989). Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida zasnovano je na njihovoj sposobnosti da sa metalima grade odgovarajuće metalo-organske komplekse.

Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 1 mL uzorka (odgovarajuće razblaženje tečnog ekstrakta ili suvog ekstrakta SPŽ rastvoreno u destilovanoj vodi) sa 4 mL destilovane vode i 0,3 mL 5% NaNO₂. Smeša se zatim inkubira na sobnoj temperaturi 6 minuta i u nju se doda 0,3 mL 10% AlCl₃ x 10H₂O i 5 minuta kasnije 2 mL 1 M NaOH. Dobijena smeša se dopuni destilovanom vodom (3,4 mL) do ukupne zapremine 10 mL. Kao slepa proba koristi se smeša u koju je umesto 1 mL uzorka dodato 1 mL rastvarača (destilovana voda ili odgovarajuća smeša etanol-voda). Apsorbanca uzorka je merena na talasnoj dužini od 510 nm i sva merenja su izvršena u tri ponavljanja. Prinos UFI u postupcima Č/T ekstrakcije je izražen u g ekvivalenta katehina po 100 g droge (g CE/100 g droge), dok je sadržaj UFI u suvim ekstraktima izražen u mg CE po g suvog ekstrakta (mg CE/g).

3.5.1.3. HPLC analiza fenolnih kiselina

Reakcija na kojoj se zasniva merenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja nije specifična, jer na isti način sa Folin-Ciocalteu reagensom mogu da reaguju još neka jedinjenja redukujućeg karaktera, kao što su određeni proteini, šećeri, askorbinska kiselina, itd. Prema tome, da bi se odredio sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u nekom uzorku, potrebna je primena kvalitativne i kvantitativne HPLC tehnike.

Za određivanje glavnih fenolnih kiselina SPŽ je korišćen HPLC sistem (Dionex DX500, Milano, Italy) sa termostatom (30°C), fotodiodnim detektorom (DAD) i Aquapore ODS-300 RP-C18 kolonom (250 x 4,6 mm; 7 µm veličina čestica; Applied Biosystems, San Jose, CA, SAD). Chromeleon chromatography manager softver v. 6,60 SP2 je korišćen za identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih kiselina prema metodi Ivanova-Petropulos i sar. (2015). Rastvori standarda fenolnih kiselina i odgovarajuća razblaženja uzoraka su filtrinani preko 0,20 µm

celulozno-acetatnog membranskog filtera (GVS Filter Technology, Indianapolis, SAD) pre injektovanja u HPLC sistem. Mobilna faza je bila smeša rastvarača A (destilovana voda-mravlja kiselina; 98:2; v/v) i rastvarača B (acetonitril-destilovana voda-mravlja kiselina; 80:18:2; v/v/v) sa protokom od 0,5 mL/min. Udeo rastvarača B u mobilnoj fazi se menjao prema sledećem gradijentu: 0–50 min, 9%; 65–70 min, 10%; 77 min, 30%; 80–97 min, 0%. Kafena, ferulna i rozmarinska kiselina su kvantifikovane na 256 nm, dok je *p*-kumarinska kiselina određena na 308 nm. Sadržaj fenolnih kiselina je određen u tečnim ekstraktima SPŽ dobijenim na prethodno optimizovanim uslovima za procese konvencionalne, ultrazvučne i mikrotalasne ekstrakcije, dok je u suvim ekstraktima SPŽ određen sadržaj dominantne komponente, t.j. rozmarinske kiseline. Prinos pojedinačnih fenolnih kiselina je izražen u g po 100 g droge (g/100 g droge), dok je sadržaj rozmarinske kiseline u suvim ekstraktima izražen u mg po g suvog ekstrakta (mg/g).

3.5.1.4. Antioksidativna aktivnost

Sposobnost neutralizacije DPPH radikala

Sposobnost neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala je izvršena spektrofotometrijskom metodom (Soler-Rivas i sar., 2000). Metoda se zasniva praćenju promene boje rastvora DPPH radikala (ljubičasto obojen) u njegov redukovan oblik (DPPH-H) koji je žuto obojen. 10 μ L tečnog ekstrakta SPŽ ili suvog ekstrakta rastvorenog u odgovarajućem rastvaraču koji je korišćen kao ekstrages u Č/T ekstrakciji je u seriji različitih koncentracija pomešano sa 100 μ L 90 μ mol/L rastvora DPPH u metanolu i u reakcionu smešu je dodato 190 μ L metanola. Prilikom pripremanja slepe probe umesto uzorka dodat je rastvarač. Apsorbanca uzorka je merena nakon 1 h na 515 nm. Komercijalno dostupni sintetski antioksidanti (propil galat i butilovani hidroksitoluen) su korišćeni kao pozitivna kontrola. Sva merenja su izvršena u tri ponavljanja i rezultat je izražen kao srednja vrednost \pm standardno odstupanje. Rezultati antioksidativne aktivnosti za tečne ekstrakte su izraženi kao IC₅₀ (μ g/mL), što predstavlja koncentraciju koja dovodi do neutralizacije 50% DPPH radikala u reakcionoj smeši. Sa druge strane, rezultati antioksidativne aktivnosti suvih ekstrakata SPŽ su izraženi kao mg Trolox-a po g suvog ekstrakta (mg Trolox/g).

Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona

Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona (eng. Ferric ion reducing antioxidant power) je određena FRAP testom (Benzie i Strain, 1996). Tečni ekstrakti i različite koncentracije suvih ekstrakata SPŽ rastvorene u odgovarajućem rastvaraču (10 µL) su pomešani sa 290 µL FRAP reagensa. Prilikom pripreme slepe probe, umesto FRAP reagensa je dodata destilovana voda. FRAP reagens je pripremljen mešanjem 10 mmol/L 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u 40 mmol/L HCl, 0,02 mol/L FeCl₃ i sirćetnom puferu (pH 3,6), u odnosu 1:1:10 (v/v/v). Kalibraciona kriva je pripremljena sa askorbinskom kiselinom (1,25 - 140 µg/mL). Nakon inkubacije od 6 min, apsorbanca uzorka je izmerena na 593 nm. Sva merenja su izvršena u tri ponavljanja i rezultat je izražen kao srednja vrednost ± standardno odstupanje. Rezultati su za tečne ekstrakte izraženi kao mg ekvivalenta askorbinske kiseline (AAE) po gramu droge (mg AAE/g droge), dok su rezultati u slučaju suvih ekstrakata izraženi kao mg ekvivalenta Fe²⁺ jona po g suvog ekstrakta (mg Fe²⁺/g).

Redukciona moć ekstrakata

Redukciona moć tečnih ekstrakata SPŽ je određena za ekstrakte dobijene ekstrakcijom vodom u subkritičnom stanju. Test redukcionne moći (eng. reducing power assay) je izveden spektrofotometrijskom metodom (Oyaizu, 1986). Odgovarajuće razblaženje tečnog ekstrakta SPŽ (1 mL) je pomešano sa fosfatnim puferom (1 mL, 0,2 M, pH 6,6) i 1% rastvorom kalijum fericijanida (1 mL). Inkubacija je vršena na 50°C tokom 20 min. Nakon inkubacije, u reakcionu smešu je dodato 1 mL 10% rastvora trihlorsirćetne kiseline. Kivete sa uzorcima su zatim centrifugirane na 3000 o/min (10 min). Nakon toga, supernatan (2 mL) je pomešan sa 2 mL bidestilovane vode i 0,4 mL 0,1% rastvora FeCl₃. Apsorbanca je potom izmerena na 700 nm. Slepa proba je pripremljena na isti način, osim što je umesto ekstrakta dodata destilovana voda. Kao mera redukcionne moći koristi se EC₅₀ vrednost (µg/mL) koja predstavlja koncentraciju ispitivanog uzorka pri kojoj se postiže apsorbanca od 0,5 pri navedenim uslovima analize.

Sposobnost neutralizacije ABTS radikala

Sposobnost neutralizacije ABTS radikala je određena spektrofotometrijskom metodom (Re i sar., 1999). Rastvor ABTS reagensa je pripremljen mešanjem 7mM vodenog

rastvora 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijumova so (ABTS) i 2,45 mM kalijum persulfata u odnosu 1:1 (v/v) i inkubacijom na sobnoj temperaturi tokom 16 h zaštićeno od svetlosti. ABTS reagens je razblažen acetatnim puferom (pH 3,3) kako bi se apsorbanca na 734 nm podesila na $0,70 \pm 0,02$. Odgovarajuća razblaženja tečnih i suvih ekstrakata SPŽ (0,1 mL) su pomešana sa ABTS reagensom (2,9 mL) i inkubacija je izvršena na sobnoj temperaturi u mraku tokom 300 min. Merenje apsorbance je zatim urađeno na 734 nm. U cilju dobijanja kalibracionog dijagrama, korišćen je sveže pripremljen vodeni rastvor Trolox-a (0-0,8 mM, $R^2=0,973$). U slučaju tečnih ekstrakata, rezultati su izraženi u mM ekvivalenta Trolox-a po 100 g droge (mM Trolox/100 g droge), dok su u slučaju suvih ekstrakata rezultati izraženi u mg ekvivalenta Trolox-a po g suvog ekstrakta (mg Trolox/g).

Sposobnost neutralizacije superoksid anjon (O_2^-) radikala

Sposobnost tečnih ekstrakata SPŽ da neutralizuju superoksid anjon radikal koji nastaje pri redukciji NBT-a sa NADH u prisustvu PMS pod aerobnim uslovima je izvršena spektrofotometrijskom metodom (Nishikimi i sar., 1972). Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 50 μ L NBT-a (144 μ mol/L), 10 μ L ekstrakta (koncentracije 0,625 – 5 mg/mL i 0,15 – 10 mg/mL za ekstrakte dobijene ultrazvučnom, odnosno mikrotalasnom ekstrakcijom, 20 μ L sveže pripremljenog rastvora PMS-a (60 μ mol/L) i 220 μ L fosfatnog pufera (pH 8,3). U kontrolnom uzorku je umesto ekstrakta dodat rastvarač, dok je slepa proba pripremljena mešanjem 310 μ L fosfatnog pufera i 10 μ L uzorka. Nakon inkubacije od 5 min, izmerena je apsorbanca na 560 nm. Sva merenja su izvršena u tri ponavljanja i rezultat je izražen kao IC_{50} vrednost (μ g/mL) (srednja vrednost \pm standardno odstupanje).

3.5.2. Analiza terpenoidnih jedinjenja

GC-MS i GC-FID analiza su korišćene za identifikaciju i kvantifikaciju terpenoidnih jedinjenja, kako u lipofilnim ekstraktima dobijenim Soxhlet i superkričnom ekstrakcijom, tako i u etarskom ulju SPŽ dobijenom destilacijom vodenom parom. Analize su izvršene na Agilent GC890N sistemu opremljenim sa HP-5MS kolonom (30 m dužine, 0,25 mm unutrašnji prečnik i 0,25 μ m debljina filma stacionarne faze). Lipofilni ekstrakti i etarsko ulje su rastvoreni u metilen hloridu (≈ 1 mg/mL) i zapremina injektovanog rastvora je bila 5 μ L pri split odnosu 30:1 (Pavlić i sar., 2015).

- Uslovi rada GC/MS analize:

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

- Uslovi rada GC/FID analize:

Temperatura injektora iznosila je 250°C. Linearni temperaturni režim od 60°C do 150°C (4°C/min) i temperatura detektora od 300°C. I u ovom slučaju je helijum korišćen kao gas nosač (2 mL/min).

Identifikacija organskih jedinjenja je izvršena pomoću masenog spektrometra MS 5795 (Agilent), poređenjem masenog spektra jedinjenja dobijenog iz uzorka, na odgovarajućem retencionom vremenu, i masenog spektra iz baze podataka masenih spektara. Korišćene su biblioteke sa podacima masenih spektara Wiley 7n i NIST 05. Sadržaj identifikovanih jedinjenja u ispitivanim uzorcima je izražen kao relativni udeo (%).

Za kvantitativno određivanje dominantnih monoterpena je korišćena GC-FID analiza. Rastvori standardnih jedinjenja (limonen, eukaliptol, γ -terpinen, linalool, α -terpineol, metil-havikol, geraniol, karvakrol, α -pinen, β -pinen, kamfor, eugenol i α -tujon) različitih koncentracija (1 – 500 μ g/mL) u metilen hloridu su korišćeni za dobijanje jednačina koje opisuju zavisnost površine pika i mase. Minimalni koeficijent korelacije iznosio je 0,99. Svi eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja. Sadržaj terpenoidnih jedinjenja u lipofilnim ekstraktima i etarskom ulju izražen je u mg po g ekstrakta (mg/g), dok je njihov prinos izražen u mg po 100 g droge (mg/100 g).

3.6. Eksperimentalni dizajn i optimizacija ekstrakcije

Optimizacija konvencionalne ekstrakcije je vršena tradicionalnom metodom jedan-po-jedan-faktor (one-factor-at-a-time), gde je ispitivan uticaj ekstragensa (voda i 20, 40, 60, 80 i 96% etanol) na prinos polifenola (UF i UFI) i antioksidativnu aktivnost ekstrakata žalfije. Pritom su ostali parametri ekstrakcije bili konstantni.

Za analizu uticaja parametara savremenih ekstrakcionih tehnika (ultrazvučna, mikrotalasna, subkritična i superkritična ekstrakcija) na ispitivane odzive i optimizaciju ekstrakcije SPŽ je korišćena metoda odzivne površine (RSM; response surface methodology).

Svaka primenjena tehnika je posebno ispitivana i optimizovana pri čemu je ispitan uticaj najvažnijih parametara procesa na različite odzive. U svim slučajevima je korišćen Box-Behnken eksperimentalni dizajn sa tri numerička faktora na tri nivoa. Dizajn se sastojao od sedamnaest eksperimenata sa pet ponavljanja u centralnoj tački, osim u slučaju superkritične ekstrakcije gde je izvedeno tri eksperimenta u centralnoj tački. U Tabeli 7 je prikazan eksperimentalni dizajn sa realnim i kodiranim parametrima ekstrakcije za svaku ispitivanu tehniku.

Tabela 7. Box-Behnken eksperimentalni dizajn sa realnim i kodiranim vrednostima parametara ispitivanih ekstrakcionih tehnika

Ekstrakciona tehnika	Nezavisna promenljiva	Kodirana vrednost		
		-1	0	1
		Realna vrednost		
Ultrazvučna ekstrakcija	Temperatura [°C]	40	60	80
	Vreme ekstrakcije [min]	40	60	80
	Snaga ultrazvuka [W/L]	24	42	60
Mikrotalasna ekstrakcija	Koncentracija etanola [%]	40	60	80
	Vreme ekstrakcije [min]	10	20	30
	Odnos rastvarač-droga [mL/g]	20	30	40
Ekstrakcija subkritičnom vodom	Temperatura [°C]	120	170	220
	Vreme ekstrakcije [min]	10	20	30
	Koncentracija HCl [%]	0	0,75	1,5
Ekstrakcija superkritičnim CO ₂	Pritisak [bar]	100	200	300
	Temperatura [°C]	40	50	60
	Protok CO ₂ [kg/h]	0,2	0,3	0,4

Sve nezavisne promenljive su kodirane tako da budu u opsegu od -1 do 1, u cilju normalizacije parametara kako bi njihove jedinice bile nebitne (Baş and Boyacı, 2007):

$$X = \frac{(x_i - x_0)}{\Delta x} \quad (2)$$

gde X predstavlja kodiranu vrednost, x_i realnu vrednost, x_0 realnu vrednost u centralnoj tački i Δx razliku maksimalne i centralne vrednosti nezavisne promenljive. Ispitivani odzivi su fitovani kvadratnim polinomom prema jednačini (Ferreira i sar., 2007):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

gde je Y odziv, X_i i X_j su stvarne ili kodirane nezavisno promenljive, a β_0 , β_i , β_{ii} , i β_{ij} su regresioni koeficijenti za srednju vrednost, linearne, kvadratne i članove interakcije. Optimalni uslovi ekstrakcije su određeni primenom željene funkcije, D (eng. desirability function) (Derringer i Suich, 1980) i analize linearne regresije, a u tu svrhu je korišćen Design-Expert v.7 Trial (Stat-Ease, Minneapolis, Minnesota, USA) softver. Rezultati su statistički tretirani analizom varijanse (ANOVA), dok je adekvatnost modela određena koeficijentom determinacije (R^2), koeficijentom varijacije (CV) i p -vrednostima za model i nedostatak prilagođavanja (lack of fit). U cilju provere predviđenih vrednosti odziva na optimalnim uslovima ekstrakcije, izvršena je validacija i eksperimentalno dobijene vrednosti odziva su poređene sa 95% intervalom poverenja za predviđene vrednosti.

3.7. Dobijanje suvih ekstrakata *spray drying* tehnikom

3.7.1. Priprema napojne smeše

Maceracija

Konvencionalna Č/T ekstrakcija, t.j. maceracija, je izvršena primenom optimalne koncentracije etanola (60%) u cilju povećanja prinosa polifenola i antioksidativne aktivnosti. Biljni materijal (200 g) i 60% etanol (4 L) su pomešani u staklenom sudu. Ekstrakcija je izvršena na sobnoj temperaturi tokom 5 dana. Sud je intenzivno mućkan dva puta dnevno. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je profiltriran kroz filter papir pod vakuumom i u staklenoj boci čuvan na 4°C do dalje upotrebe.

Destilacija vodenom parom

Destilacija vodenom parom je primenjena u cilju izdvajanja etarskog ulja od neisparljivih jedinjenja koja se zadržavaju u postdestilacionom ostatku. Etarsko ulje je izdvojeno oficinalnom procedurom koristeći aparaturu po Cleavenger-u (*Ph. Jug.* IV). Nakon

destilacije, posdestilacioni ostatak je ohlađen, profiltriran kroz filter papir pod vakuumom i u staklenoj boci čuvan na 4°C do dalje upotrebe.

Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija je izvedena na aparaturi prethodno opisanoj u Poglavlju 3.4.1.2. Ekstrakcija je izvršena na optimalnim uslovima koji predviđaju maksimalan prinos polifenola: temperatura of 75°C, vreme ekstrakcije od 80 min i snaga ultrazvuka od 43 W/L.

Mikrotalasna ekstrakcija

Mikrotalasna ekstrakcija je urađena aparaturi prethodno opisanoj u Poglavlju 3.4.1.3. Ekstrakcija je rađena na optimalnim uslovima koji predviđaju maksimalan prinos polifenola: koncentracija etanola od 46%, vreme ekstrakcije od 18,7 min i odnos rastvarač-droga od 20 mL/g. Predviđena optimalna vrednost za odnos rastvarač-droga je bila 40 mL/g, međutim, ekstrakcija je izvršena pri nižem odnosu, s obzirom da bi se primenom odnosa od 40 mL/g dobili ekstrakti sa suviše malom koncentracijom rastvorenih jedinjenja, što ne bi bilo pogodno za *spray drying*.

Ekstrakcija subkritičnom vodom

Ekstrakcija subkritičnom vodom je izvedena na pilot šaržnom visoko-pritisnom ekstraktoru (Parr Instrument Company, SAD) sa unutrašnjom zapreminom od 15 L i maksimalnoj radnoj temperaturi i pritisku od 350°C i 200 bar, koji je povezan sa temperaturnim kontrolerom (4848BM, Parr Instrument Company, SAD). Ekstrakcija je izvršena na optimalnim uslovima koji predviđaju maksimalan prinos polifenola i maksimalnu antioksidativnu aktivnost: temperatura od 201°C, vreme ekstrakcije od 15,8 min i primena čiste vode kao ekstragensa (bez dodatka HCl).

3.7.2. Spray drying

Dobijeni tečni ekstrakti SPŽ su sušeni *spray drying* tehnikom na poluindustrijskom uređaju Anhydro spray dryer (APV Anhydro AS, Danska). Ulazne i izlazne temperature svih sušenja su date u Tabeli 8. Tečni ekstrakti SPŽ su u *spray dryer* prebačeni peristaltičkom pumpom (FH100 Series, Thermo Scientific, USA) protokom 1,36 L/h. Za svaki uzorak je uzeta ista zapremina uzorka (2 L). Pre sušenja, napojna smeša je zagrejana na 40°C. Za atomizaciju

tečnih ekstrakata je korišćen atomizer sa rotirajućim diskom brzine okretanja od 20000 do 21000 o/min. Nakon sušenja, odnosno ispravanja rastvarača, suvi ekstrakt je odvojen od toplog vazduha u ciklonu i sakupljen u prihvatnom sudu. Svi ekstrakti su sušeni bez i sa dodatkom nosača (20%). Maltodekstrin (DE 19,7) je korišćen kao nosač. Pre sušenja je rastvor maltodekstrina pomešan sa ekstraktom, homogenizovan i sa mešanjem napojne smeše je nastavljeno tokom celog *spray drying* procesa. Dobijeni suvi ekstrakti su sakupljeni u staklene posude i čuvani zaštićeni od vazduha i vlage, na sobnoj temperaturi.

Tabela 8. Vrednosti ulazne i izlazne temperature tokom sušenja ekstrakata SPŽ

Uzorak	MD ^a [%]	T _u ^b [°C]	T _i ^c [°C]
MAC	0	120-130	76-86
MAC-20	20	120-125	80-90
UAE	0	120-130	80-90
UAE-20	20	120	80
MAE	0	120-130	80-82
MAE-20	20	120-125	80-84
SWE	0	125	74-78
SWE-20	20	120-125	74-82
PHD	0	120-125	74-80
PHD-20	20	120	74-80

^a koncentracija maltodekstrina [%],

^b ulazna temperatura,

^c izlazna temperatura.

3.8. Karakterizacija suvih ekstrakata

3.8.1. Hemijska karakterizacija

U suvim ekstraktima SPŽ dobijenim *spray* tehnikom, izvršeno je određivanje sadržaja ukupnih fenola (UF), ukupnih flavonoida (UFI) i rozmarinske kiseline (RK). Postupci za ova određivanja su detaljno opisani u Poglavljima 3.5.1.1., 3.5.1.2. i 3.5.1.3.

3.8.2. Biološka aktivnost suvih ekstrakata

3.8.2.1. *In vitro* antioksidativna aktivnost

Postupci za određivanje antioksidativne aktivnosti suvih ekstrakata SPŽ (DPPH, FRAP i ABTS testovima) su detaljno opisani u Poglavlju 3.5.1.4.

3.8.2.2. Antimikrobna aktivnost

Sojevi bakterija i kvasaca

Korišćeni sojevi bakterija su bili: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus saprophyticus*^w, *Bacillus cereus*^w, *Listeria monocytogenes*^w i *Enterococcus faecalis*^w (^w – prirodni izolat). Prirodni izolati iz hrane i vode za piće su identifikovani sistemom Vitek®2 Compact System (BioMérieux, Francuska). Korišćeni sojevi kvasaca su bili: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 i *Candida albicans* ATCC 10231.

Skrining antimikrobne aktivnosti

U cilju određivanja antimikrobne aktivnosti suvih ekstrakata SPŽ su korišćena dve različite metode: disk-difuziona metoda i određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) mikrodilucionom metodom.

Disk-difuziona metoda

Bakterijski sojevi su zasejani na Müller-Hinton agaru (HiMedia, Mumbai, India) i inkubacija je vršena na 37°C tokom 24 h i na 30°C tokom 18 h (u slučaju *Bacillus cereus* ATCC 11778 i *Bacillus cereus*^w). Kvasci su zasejani za Sabouraud Maltose agar (HiMedia, Mumbai, India) i inkubacija je vršena na 25°C (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763) i na 37°C (*Candida albicans* ATCC 10231) tokom 48 h.

Ćelije su suspendovane u sterilnom 0,9% rastvoru NaCl i koncentracija suspenzije je podešena na 10⁶ cfu/mL (određeno na uređaju Densichek; BioMérieux, Francuska). Nakon toga je izvršeno zasejavanje otopljenih podloga (18 mL, 45°C) sa 2 mL suspenzije mikroorganizama u Petri pločama.

Nakon očvršćavanja podloga, četiri sterilna diska prečnika 6 mm (HiMedia, Mumbai, Indija) su postavljena na inokulisane petri ploče. Diskovi su impregnirani sa 15 µL MAC, UAE, MAE, SWE ili PHD suvog ekstrakta SPŽ rastvorenog u vodi (50 mg/mL). Sterilna destilovana voda je korišćena kao negativna kontrola, dok su rastvori sledećih antibiotika i antimikrobitka korišćeni kao pozitivna kontrola: ACV supplement 1 mg/mL i 0,8 mg/mL (HiMedia, Mumbai,

Indija) za *P. aeruginosa* ATCC 27853, aktidion (3 mg/mL) (Acros Organic, New Jersey, USA) za *S. cerevisiae* ATCC 9763 i *C. albicans* ATCC 10231 i CTC (cefotaksim 30 µg i klavulanska kiselina 10 µg po disku) (HiMedia, Mumbai, Indija) za sve ostale mikroorganizme. Nakon inkubacije, izmeren je prečnik zone inhibicije korišćenjem HiAntibiotic Zone Scale™ (HiMedia, Mumbai, Indija). Sva merenja su izvršena u tri ponavljanja.

Mikro-diluciona metoda

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata SPŽ je određena za Gram-pozitivne bakterije korišćenjem mikro-dilucione metode u sterilnim mikrotitar pločama sa ravnim dnom. Priprema suspenzija mikroorganizama je izvršena po prethodno objašnjenom postupku za disk-difuzionu metodu. 1 mL suspenzije (10^6 cfu/mL) je homogenizovan sa 9 mL Müller-Hinton agara (HiMedia, Mumbai, Indija). U cilju dobijanja različitih koncentracija u mikrotitar pločama, 100 µL inokulisane podloge je pomešano sa 100 µL odgovarajućeg razblaženja rastvora SPŽ u vodi. Za svaki test je izvršena pozitivna i negativna kontrola. Sve ploče su inkubirane na 37°C (30°C za *Bacillus* sojeve). Nakon toga je alikvot od 100 µL prebačen u Petri ploču i homogenizovan sa Plate Count agarom (HiMedia, Mumbai, Indija). Petri ploče su zatim inkubirane pod istim uslovima kao i mikrotitar ploče, i nakon inkubacije, urađeno je brojanje kolonija. MIC je zatim izračunat prema sledećoj jednačini:

$$\text{MIC} = 100 \times \frac{(N_c - N_t)}{N_c} \quad (4)$$

gde su N_c i N_t broj ćelija u pozitivnoj kontroli i uzorku sa ekstraktom SPŽ.

3.8.3. Fizičke osobine suvih ekstrakata

3.8.3.1. Efikasnost sušenja

Efikasnost predstavlja odnos mase dobijenog suvog ekstrakta i očekivane teorijske mase izražene u procentima (%). U laboratorijskim uslovima, proces sušenja se smatra efikasnim ukoliko je efikasnost veća od 50% (Vidović i sar., 2014).

3.8.3.2. Sadržaj vlage

Sadržaj vlage u dobijenim suvim ekstraktima određen je standardnom metodom, sušenjem uzorka na temperaturi od 105°C do konstantne mase (*Ph. Jug. IV*) i rezultat je izražen u procentima (%).

3.8.3.3. Higroskopnost

Higroskopnost je određena merenjem promene masa uzorka koji se nalazio u eksikatoru u kojoj je prethodno stavljen zasićen rastvor natrijum hlorida (Vidović i sar., 2014). Zasićen rastvor natrijumhlorida služi da bi povećao relativnu vlažnost vazduha u eksikatoru. Higroskopnost je merena nakon 48 časova i rezultat je izražen u procentima (%).

3.8.3.4. Vreme rehidracije

Rehidracija suvih ekstrakata se određuje mešanjem 2 g suvog ekstrakta SPŽ i 50 mL destilovane vode na sobnoj temperaturi i merenjem brzine rastvaranja ekstrakta. Smeša praha i destilovane vode meša se u čaši od 100 mL magnetnom mešalicom (890 o/min; magnet dimenzija 2 x 7 mm). Vreme koje je potrebno da se materijal potpuno rastvori u vodi naziva se vreme rehidracije i rezultat je izražen u sekundama (s) (Goula i Adamopoulos, 2008).

3.8.3.5. Indeks apsorpcije vode (WAI) i indeks rastvorljivosti u vodi (WSI)

Indeks rastvorljivosti u vodi (WSI) i indeks adsorpcije vode (WAI) su određeni tako što je 1,5 g uzorka pomešano sa 15 mL destilovane vode u kiveti za centrifugiranje i inkubirano tokom 30 minuta u vodenom kupatilu na 30°C. Nakon inkubacije smeša je centrifugirana 15 minuta na 3000 o/min. Supernatant je sakupljen u prethodno izmerene petri ploče i, nakon sušenja u sušnici na 105°C preko noći, izmerena je masa suvog ostatka. WSI predstavlja odnos mase osušenog supernatanta i ukupne suve materije u prvobitnom uzorku (1,5 g) izražen u procentima (%). Indeks rastvorljivosti u vodi je pokazatelj degradacije sastojka praha. WAI predstavlja odnos mase čvrstih peleta zaostalih nakon centrifugiranja i ukupne suve materije u prvobitnom uzorku (1,5 g) izražen u procentima (%) (Vidović i sar., 2014).

3.9. Statistička analiza

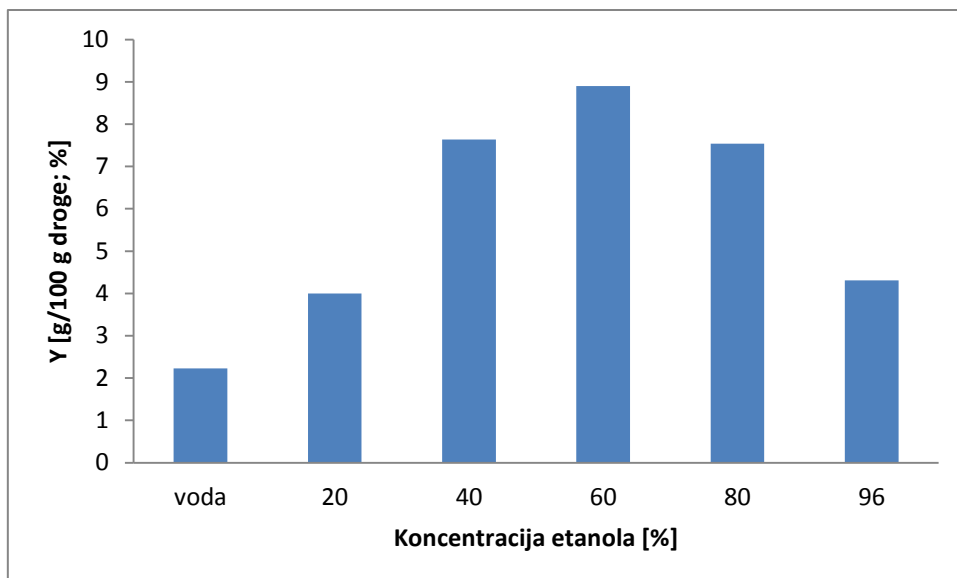
Postupak optimizacije pojedinačnih ekstrakcionih tehnika i statistička obrada rezultata vezanih za tečne ekstrakte SPŽ je detaljno objašnjena u poglavlju 3.6. Statistička obrada rezultata vezanih za suve ekstrakte SPŽ je izvršena analizom varijanse (ANOVA), a značajnost razlike je ocenjena Tukey testom ($p < 0,05$). Pored toga, za određivanje korelacije je izračunat Pirsonov koeficijent korelacije (r) na nivou značajnosti $p < 0,05$. Statistička analiza je izvršena korišćenjem statističkog programa Minitab 16 Trial.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

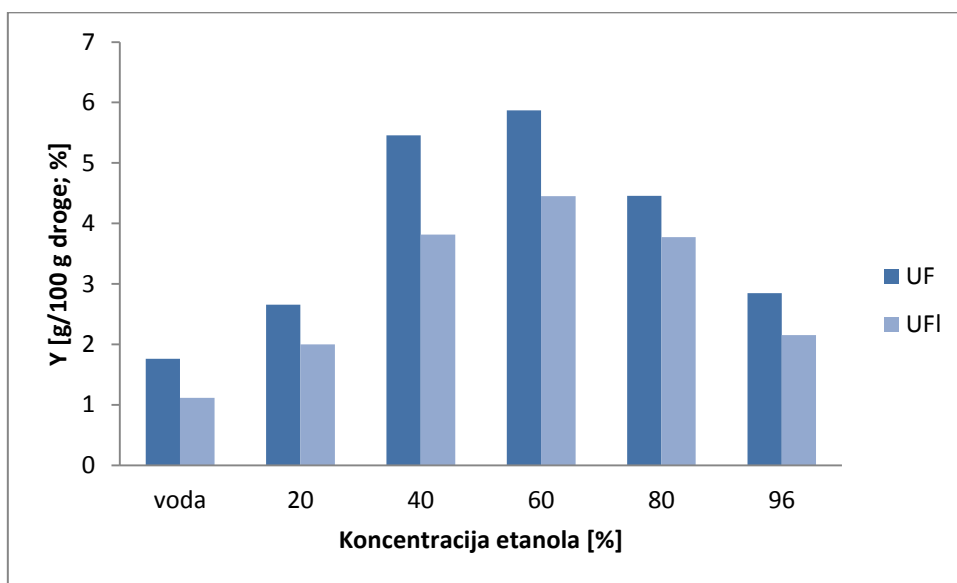
4.1. Karakterizacija sirovine i konvencionalna Č/T ekstrakcija

Kao sirovina u ovom radu je korišćen sporedni proizvod (SPŽ) žalfije (*Salvia officinalis* L.) koji je dobijen kao sporedni proizvod (prečnik čestica biljnog materijala manji od 0,315 mm). U ispitivanom biljnom materijalu sadržaj vlage je iznosio $7,24 \pm 0,05\%$, dok je sadržaj pepela bio $2,20 \pm 0,09\%$, i ove vrednosti se nalaze u granicama propisanim Farmakopejom (*Ph. Jug. IV*). Sadržaj etarskog ulja određen destilacijom vodenom parom je bio $1,80 \pm 0,05\%$, što je u skladu sa sadržajem etarskog ulja u žalfiji koji se navodi u literaturi (0,7 - 5,2%) (Glišić i sar., 2010).

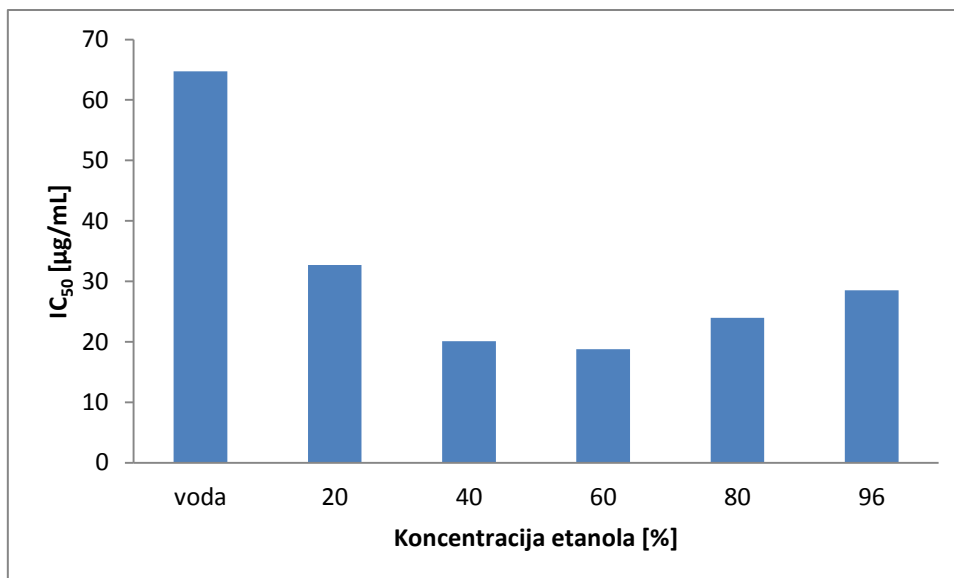
Rezultati ukupnog prinosa ekstrakcije (Y), kao i prinosa ukupnih fenola (UF) i ukupnih flavonoida (UFI), u ekstraktima SPŽ su prikazani na Slikama 31 i 32. Y u ovim uzorcima je bio od 2,22 do 8,90% (Slika 31). Najveći prinos je dobijen korišenjem 60% etanola, dok je u slučaju kada je kao ekstragens korišćena voda, prinos ekstrakcije bio najmanji. U zavisnosti od odnosa voda-etanol u ekstragensu, UF je bio između 1,761 i 5,872 g GAE/100 g droge, a UFI od 1,112 do 4,452 g CE/100 g droge (Slika 32). Kao i u slučaju prinosa ekstrakcije, najveći UF i UFI su dobijeni korišćenjem 60% etanola kao ekstragensa. Na osnovu rezultata se može zaključiti da Y, UF i UFI rastu sa povećanjem udela etanola u ekstragensu, dostižu maksimum (60% etanol) i zatim opadaju sa daljim povećanjem koncentracije etanola. Antioksidativna aktivnost ekstrakata SPŽ dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom je bila od 18,75 do 64,74 $\mu\text{g/mL}$ (Slika 33). Prema Hamrouni-Sellami i sar. (2013), ekstrakti žalfije dobijeni maceracijom metanolom su imali antioksidativnu aktivnost od 3,37 do 10,08 $\mu\text{g/mL}$, a rezultat je varirao u zavisnosti od primenjene tehnike sušenja žalfije. Dok je u ovom radu, kao i kod prinosa polifenolnih jedinjenja, ekstrakt dobijen 60% etanolom pokazao najveću aktivnost, voda se pokazala kao najnepođniji ekstragens za izolovanje polifenolnih antioksidanata. Prema Durling i sar. (2007), 55-75% etanol predstavlja najpođniji rastvarač za ekstrakciju najvažnijih polifenola iz žalfije, što je u skladu sa rezultatima ovog rada.



Slika 31. Ukupan prinos ekstrakcije SPŽ dobijen maceracijom korišćenjem vode i etanola različite koncentracije kao ekstragensa



Slika 32. Prinos polifenolnih jedinjenja (ukupnih fenola i ukupnih flavonoida) u ekstraktima SPŽ dobijenih maceracijom korišćenjem vode i etanola različite koncentracije kao ekstragensa



Slika 33. Antioksidativna aktivnost ekstrakata SPŽ dobijenih maceracijom korišćenjem vode i etanola različite koncentracije kao ekstragensa određena DPPH testom

4.2. Ultrazvučna ekstrakcija (UAE)

4.2.1. Provera modela

Kako je konvencionalnom Č/T ekstrakcijom dobijen najveći prinos Y, UF i UFI korišćenjem 60% etanola kao ekstragensa, taj rastvarač je dalje korišćen za ultrazvučnu ekstrakciju (UAE). U slučaju UAE ispitivan je uticaj temperature (40, 60 i 80°C), vremena ekstrakcije (40, 60 i 80 min) i snage ultrazvuka (24, 42 i 60 W/L) na UF i UFI, dok su svi ostali parametri procesa bili konstantni. Eksperimentalne vrednosti UF i UFI u ekstraktima SPŽ dobijenim UAE su prikazani u Tabeli 9. Dobijeni rezultati su fitovani kvadratnim modelom drugog reda (jednačina (3)), a za proveru slaganja modela sa eksperimentalnim podacima korišćena je analiza varijanse (ANOVA) i deskriptivna statistika (koeficijent determinacija i koeficijent varijacije), a rezultati su prikazani u Tabeli 10. Koeficijent determinacije (R^2) je korišćen kao prvi indikator pogodnosti primenjenog modela i njegova visoka vrednost u slučaju UF i UFI (0,958 i 0,984) ukazuje na to da primenjeni polinom drugog reda predstavlja dobru aproksimaciju eksperimentalnih rezultata. Vrednost koeficijenta varijacije (CV) za UF i UFI je bila 3,95 i 1,98%, što ukazuje na relativno male varijacije srednje vrednosti i na dobru reproduktivnost rezultata. Kako deskriptivna statistika sama ne pruža dovoljno informacija o slaganju modela, neophodno je primeniti analizu varijanse. Ispitivanje slaganja modela sa eksperimentalnim vrednostima je izvršeno Fišerovim testom (F-test) za model i za

nedostatak prilagođavanja (lack of fit). Dobro slaganje modela sa realnim vrednostima je potvrđeno sa značajnim p -vrednostima za model ($p < 0,05$), kao i neznačajnim p -vrednostima za nedostatak prilagođavanja ($p > 0,05$) (Tabela 10), što znači da disperzija eksperimentalnih rezultata ne zavisi od modela i u domenu je greške merenja (Myers i sar., 2009). Prema tome, može se zaključiti da primenjeni model predstavlja dobru aproksimaciju eksperimentalnih rezultata. U cilju određivanja regresionih koeficijenata u jednačini (3) primenjena je metoda najmanjih kvadrata. Polinomi koji opisuju ponašanje UF i UFI u ispitivanom eksperimentalnom domenu sa izostavljenim koeficijentima čiji je uticaj neznačajan (Tabela 10) su:

$$UF = 9,25 + 1,24 X_1 + 0,25 X_2 - 1,06 X_1^2 \quad (5)$$

$$UFI = 6,38 + 10,81 X_1 + 0,16 X_2 - 0,44 X_1^2 + 0,13 X_2^2 \quad (6)$$

gde su X_1 , X_2 i X_3 procesni parametri (temperatura, vreme ekstrakcije i snaga ultrazvuka).

Prinos ekstrakcije UF primenom UAE je bio od 6,220 do 9,903 g GAE/100 g droge (Tabela 9). Poznato je da *S. officinalis* predstavlja dobar izvor polifenola i veliki prinos UF dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom ukazuje na mogućnost upotrebe ovog sporednog proizvoda za dobijanje visoko-vrednih bioaktivnih jedinjenja. Najmanji prinos UF je dobijen na temperaturi od 40°C, vremenu ekstrakcije od 60 min i snazi ultrazvuka od 24 W/L, dok je najveći prinos dobijen na centralnoj tački (uzorak 17) (Tabela 9). Svi uzorci dobijeni na temperaturi od 40°C su imali značajno manji prinos UF (6,220 – 7,230 g GAE/100 g droge) u poređenju sa ekstraktima dobijenim na 60 i 80°C (>8,5 g GAE/100 g droge) (Tabela 9). Ovo ukazuje da se temperatura ističe kao najvažniji parametar ultrazvučne ekstrakcije. Roby i sar. (2016) su odredili UF u ekstraktima žalfije dobijenim maceracijom korišćenjem metanola, etanola, dietil etra i *n*-heksana, kao ekstragensa, i najveći prinos UF je zabeležen korišćenjem etanola i metanola (5,80 i 5,95 mg GAE/g suvog ekstrakta (SE)). Prema Farhat i sar. (2013), geografski lokalitet u velikoj meri utiče na UF u metanolnim ekstraktima *S. officinalis* (10 – 16 g GAE/100 g droge), međutim, to je zabeleženo u uzorcima žalfije iz Tunisa, dok je uzorak korišćen u ovom radu poreklom iz Crne Gore. Prema tome, prilikom određivanja sadržaja bioaktivnih jedinjenja u jednoj biljnoj vrsti neophodno je imati u vidu da uticaj na njihov sadržaj može da ima geografsko poreklo, ambijentalni uslovi gajenja, kao i različite sorte te biljne vrste. Hossain i sar. (2010) su primenili ubrzanu ekstrakciju (tečnost pod pritiskom)

korišćenjem smeše rastvarača metanol-voda (32 – 88%) kao ekstragensa. Optimizovani uslovi za maksimalan prinos UF (6,16 g GAE/100 g droge) su bili temperatura od 129°C i 60% metanol kao ekstragens.

4.2.2. Uticaj parametara ultrazvučne ekstrakcije

Uticaj parametara UAE na prinos UF je prikazan na Slici P1 (Prilog), a značajnost njihovog uticaja je određena na osnovu dobijenih p -vrednosti. Prema rezultatima iz Tabele 10, može se zaključiti da linearni i kvadratni član temperature imaju visoko značajan uticaj ($p < 0,01$) na UF, dok je linearni član vremena ekstrakcije pokazao umereno značajan uticaj. Pozitivan uticaj linearnog člana temperature je bio najdominantniji, što je i očekivano s obzirom da temperatura direktno utiče na ubrzavanje prenosa mase difuzijom, izazivajući degradaciju biljnog materijala i modifikujući fizičke osobine primenjenog rastvarača u smislu povećanja difuzivnosti i moći rastvaranja (Ramić i sar., 2015). To je u skladu sa prethodnim istraživanjima vezanim za ultrazvučnu ekstrakciju polifenola iz različitih biljnih sirovina, ali u sličnom eksperimentalnom domenu (Ramić i sar., 2015; Tomšik i sar., 2016). Prema jednačini (5), kvadratni član temperature je pokazao značajan negativan uticaj na UF, što znači da će prinos UF rasti sa porastom temperature do određene vrednosti (70 – 75°C) i nakon toga će UF početi da opada usled degradacije polifenola na povišenoj temperaturi. Umereno značajan uticaj vremena ekstrakcije ukazuje na malo, ali konstantno povećanje vrednosti UF sa povećanjem vremena ekstrakcije u ispitivanom eksperimentalnom domenu. Ovo je u skladu sa studijom kinetike ultrazvučne ekstrakcije žalfije, gde je pokazano da ukupni prinos ekstrakcije naglo raste u prvih 10 minuta (brza ekstrakcija), a zatim umereno raste sa povećanjem vremena do 80 min (spora ekstrakcija) (Veličković i sar., 2006).

Prinos UFI u ekstraktima SPŽ dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom je bio između 5,027 i 7,090 g CE/100 g droge. Isti uslovi ekstrakcije na kojima je zabeležena najmanja vrednost UF (40°C, 60 min i 24 W/L) su doveli i do najmanje vrednosti UFI, što ukazuje na dobru korelaciju između uticaja parametara UAE na UF i UFI. I u ovom slučaju je relativno mali prinos UFI (<5,464 g CE/100 g droge) zabeležen na temperaturi od 40°C. Sa druge strane, najveći prinos UFI je zabeležen na temperaturi od 80°C, vremenu ekstrakcije od 80 min i snazi ultrazvuka od 42 W/L.

Tabela 9. Box-Behnken eksperimentalni dizajn sa realnim i kodiranim parametrima ultrazvučne ekstrakcije i eksperimentalno dobijene i predviđene vrednosti prinosa ukupnih fenola (UF) i ukupnih flavonoida (UFI)

Redni broj	Nezavisne promenljive						Odzivi			
	Temperatura [°C]		Vreme ekstrakcije [min]		Snaga ultrazvuka [W/L]		UF [g GAE/100 g droge]		UFI [g CE/100 g droge]	
	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	Eksperimentalno	Predviđeno	Eksperimentalno	Predviđeno
1	0	60	0	60	0	42	9,061	9,247	6,510	6,375
2	0	60	-1	40	1	60	8,713	8,729	6,560	6,458
3	1	80	-1	40	0	42	8,926	9,064	6,617	6,693
4	0	60	0	60	0	42	8,904	9,247	6,345	6,375
5	0	60	1	80	1	60	9,308	9,347	6,768	6,764
6	-1	40	1	80	0	42	7,230	7,093	5,464	5,387
7	1	80	0	60	1	60	9,195	9,041	6,739	6,765
8	-1	40	-1	40	0	42	6,893	6,778	5,112	5,135
9	0	60	0	60	0	42	9,386	9,247	6,488	6,375
10	-1	40	0	60	1	60	6,848	6,947	5,241	5,321
11	0	60	0	60	0	42	8,982	9,247	6,223	6,375
12	0	60	-1	40	-1	24	8,690	8,651	6,302	6,306
13	1	80	0	60	-1	24	9,319	9,221	6,875	6,795
14	0	60	1	80	-1	24	9,049	9,033	6,524	6,626
15	-1	40	0	60	-1	24	6,220	6,740	5,027	5,001
16	1	80	1	80	0	42	9,633	9,746	7,090	7,068
17	0	60	0	60	0	42	9,903	9,247	6,309	6,375

Tabela 10. Analiza varijanse (ANOVA) fitovanja rezultata polinomnim modelom drugog reda

Ultrazvučna ekstrakcija		Mikrotalasna ekstrakcija	
Ukupni fenoli			
Član	p-vrednost	Član	p-vrednost
Model	0,0005*	Model	0,0064*
X_1 - Temperatura	< 0,0001*	X_1 – Koncentracija etanola	0,0005*
X_2 – Vreme ekstrakcije	0,0760***	X_2 – Vreme ekstrakcije	0,0393**
X_3 – Snaga ultrazvuka	0,4402	X_3 – Odnos rastvarač/droga	0,4925
$X_1 \cdot X_2$	0,6023	$X_1 \cdot X_2$	0,8749
$X_1 \cdot X_3$	0,3046	$X_1 \cdot X_3$	0,9895
$X_2 \cdot X_3$	0,7387	$X_2 \cdot X_3$	0,4792
X_1^2	0,0004*	X_1^2	0,0025*
X_2^2	0,9257	X_2^2	0,1009
X_3^2	0,1220	X_3^2	0,5894
Lack of fit	0,8463	Lack of fit	0,2245
Ukupni flavonoidi			
Član	p-vrednost	Član	p-vrednost
Model	< 0,0001*	Model	0,0025*
X_1 - Temperatura	< 0,0001*	X_1 – Koncentracija etanola	0,0005*
X_2 – Vreme ekstrakcije	0,0089*	X_2 – Vreme ekstrakcije	0,0224**
X_3 – Snaga ultrazvuka	0,1406	X_3 – Odnos rastvarač/droga	0,0025*
$X_1 \cdot X_2$	0,6371	$X_1 \cdot X_2$	0,0959
$X_1 \cdot X_3$	0,1983	$X_1 \cdot X_3$	0,2332
$X_2 \cdot X_3$	0,9554	$X_2 \cdot X_3$	0,0126**
X_1^2	0,0002*	X_1^2	0,0361**
X_2^2	0,0647***	X_2^2	0,0966***
X_3^2	0,6167	X_3^2	0,4044
Lack of fit	0,4561	Lack of fit	0,1647

* visoko značajan ($p < 0,01$)** značajan ($0,01 < p < 0,05$)*** umereno značajan ($0,05 < p < 0,10$)

Prema Gird i sar. (2014), UFI zabeležen u ekstraktima žalfije dobijenim zagrevanjem uz refluks primenom 70% etanola kao ekstragensa je bio između 1,1323 i 2,0994 g ekvivalenta rutina (RE)/100 g droge i značajno je varirao sa vremenom sakupljanja biljnog materijala. Prema Veličkoviću i sar. (2011), UFI u ekstraktima žalfije dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom je bio 59,6 i 63,2 mg RE/g suvog ekstrakta, u zavisnosti od primenjenog

rastvarača (metanol i 70% etanol). Poređenjem prinosa UFI dobijenog konvencionalnom Č/T ekstrakcijom (Slika 32) i ultrazvučnom ekstrakcijom (Tabela 9), može se zaključiti da upotreba ultrazvuka u velikoj meri utiče na povećanje prinosa ovih jedinjenja. Međutim, Veličković i sar. (2011) su utvrdili da ne postoji značajna razlika između UFI u ekstraktima žalfije dobijenih konvencionalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom.

Prema rezultatima ANOVA (Tabela 10) može se uočiti da linearni članovi temperature i vremena ekstrakcije, kao i kvadratni član temperature imaju značajan uticaj na UFI. Oba linearna člana imaju pozitivan uticaj na UFI (Slika P2; Prilog), što ukazuje na to da će produžena ekstrakcija na povišenoj temperaturi biti neophodna za potpunu ekstrakciju flavonoida, što je u skladu sa prethodnim radovima (Ramić i sar., 2015; Tomšik i sar., 2016). Međutim, najveća ispitivana temperatura (80°C) neće biti optimalna za ekstrakciju flavonoida s obzirom na značajan negativan uticaj kvadratnog člana temperature (Tabela 10).

4.2.3. Optimizacija procesa

U cilju simultanog povećanja prinosa UF i UFI, za optimizaciju je korišćena željena funkcija (desirability function) (Derringer, 1980). Predviđeni optimalni uslovi za povećanje prinosa UF i UFI su prikazani u Tabeli 11. Prema tome, najveći prinos UF i UFI će biti ostvaren na temperaturi od 75,4°C, vremenu ekstrakcije od 80 min i snazi ultrazvuka od 42,54 W/L. Optimizovani uslovi su bili u skladu sa analizom metode odzivne površine i ANOVE (Tabela 10). Može se zaključiti i da UAE obezbeđuje značajno povećanje prinosa polifenola u poređenju sa konvencionalnom ekstrakcijom. Pored toga, druge prednosti ove metode su relativno niski operativni troškovi i mogućnost *scale up*-a na industrijski nivo. U cilju eksperimentalne provere predviđenih optimalnih uslova, izvršena je ekstrakcija SPŽ pri tim uslovima i uočeno je dobro slaganje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti. To znači da su dobijeni polinomni modeli (jedničine (5) i (6)) verifikovane i da mogu da se adekvatno koriste za opisivanje procesa ultrazvučne ekstrakcije u okviru ispitivanog eksperimentalnog domena.

Tabela 11. Optimalni uslovi ultrazvučne i mikrotalasne ekstrakcije i simultana maksimizacija sadržaja ukupnih fenola i ukupnih flavonoida

Ekstrakciona tehnika	Optimizovani uslovi	Predviđena vrednost odziva *	Ekperimentalno dobijen odziv **
Ultrazvučna ekstrakcija	Temperatura: 75,4 °C Vreme ekstrakcije: 80 min Snaga ultrazvuka: 42,54 W/L	UF = 9,876 ± 0,584 g GAE/100 droge UFI = 7,052 ± 0,209 g CE/100 g droge	UF = 9,881 ± 0,157 g GAE/100 g droge UFI = 6,997 ± 0,341 g CE/100 g droge
Mikrotalasna ekstrakcija	Koncentracija etanola: 46,2% Vreme ekstrakcije: 18,7 min Odnos rastvarač/droga: 40 mL/g	UF = 10,105 ± 0,685 g GAE/100 g droge UFI = 7,802 ± 0,338 g CE/100 g droge	UF = 10,379 ± 0,193 g GAE/100 g droge UFI = 7,544 ± 0,098 g CE/100 g droge

* predviđena vrednost odziva ± 5% interval poverenja

** srednja vrednost ± standardno odstupanje (n=4)

4.3. Mikrotalasna ekstrakcija

4.3.1. Provera modela

Primenom mikrotalasne ekstrakcije (MAE) ispitan je uticaj koncentracije etanola (40, 60 i 80%), vremena ekstrakcije (10, 20 i 30 min) i odnosa rastvarač-droga (20, 30 i 40 mL/g) na prinose UF i UFI, dok su svi ostali parametri procesa bili konstantni. Ekseperimentalno dobijene vrednosti UF i UFI u ekstraktima SPŽ dobijenim MAE su date u Tabeli 12. Prvi indikator dobrog slaganja polinoma drugog reda sa eksperimentalnim podacima su velike vrednosti R^2 (0,910 i 0,932) i male vrednosti CV (3,95 i 1,98%) za UF i UFI. Adekvatnost modela je potvrđena i Fišerovim testom modela ($p < 0,01$) i nedostatka prilagođavanja ($p > 0,05$). Prema tome, može se zaključiti da primenjeni kvadratni model predstavlja dobru aproksimaciju eksperimentalnih rezultata i u slučaju mikrotalasne ekstrakcije. Jednačine koje opisuju ponašanje UF i UFI u ispitivanom eksperimentalnom domenu sa izostavljenim koeficijentima čiji je uticaj neznačajan (Tabela 10) su:

$$UF = 9,75 - 0,89 X_1 + 0,37 X_2 - 0,92 X_1^2 \quad (7)$$

$$UFI = 7,25 - 0,44 X_1 + 0,21 X_2 + 0,33 X_3 - 0,34 X_2 X_3 - 0,26 X_1^2 + 0,19 X_2^2 \quad (8)$$

gde su X_1 , X_2 i X_3 procesni parametri mikrotalasne ekstrakcije (koncentracija etanola, vreme ekstrakcije i odnos rastvarač-droga).

Prinos UF je u slučaju MAE bio između 7,012 i 10,283 g GAE/100 g droge, u zavisnosti od primenjenih eksperimentalnih uslova. U poređenju sa konvencionalnom ekstrakcijom (Slika 33), može se zaključiti da MAE pruža izvesne prednosti u pogledu povećanja prinosa polifenolnih jedinjenja (Tabela 12). Najveći prinos UF je zabeležen u uzorku 5 (centralna tačka) koji je dobijen pri sledećim eksperimentalnim uslovima: 60% etanol, 20 min i 30 mL/g. U poređenju sa ultrazvučnom ekstrakcijom (Tabela 9), može se uočiti da mikrotalasna ekstrakcija pruža umereno povećanje prinosa UF. Glavni razlog za to je primena većeg odnosa rastvarač-droga (20 – 40 mL/g), u poređenju sa ultrazvučnom ekstrakcijom (20 mL/g). Veći odnos rastvarač-droga dovodi do povećanja koncentracionog gradijenta između čvrste (biljni materijal) i tečne (rastvarač) faze i samim tim omogućava potpunije iscrpljenje biljnog materijala. Prema tome, može se očekivati da bi i prinos UF porastao i u slučaju UAE, kada bi se povećao odnos rastvarač-droga. Dragović-Uzelac i sar. (2012) su izvršili MAE *S. officinalis* na sličnim eksperimentalnim uslovima i utvrdili su da se najveći prinos UF (4,70 g ekvivalenta rozmarinske kiseline (RAE)/100 g droge) dobija pri sledećim eksperimentalnim uslovima: 30% etanol, 8 min, 500 W. Dent i sar. (2013) su ispitivali uticaj koncentracije etanola, vremena ekstrakcije i temperature na prinos UF u ekstraktima žalfije dobijenim mikrotalasnom ekstrakcijom i najveći prinos UF (6,278 g RAE/100 g droge) je postignut na temperaturi od 60°C, vremenu ekstrakcije od 30 min i korišćenjem 30% etanola kao ekstragensa. Pored toga, određen je hemijski sastav polifenolnih jedinjenja i zaključeno je da su dominantna jedinjenja u ekstraktima žalfije derivati fenolnih kiselina (rozmarinska, karnozinska, kafena, ferulna, cimetna i hlorogenska kiselina) i flavonoidi (derivati luteolina i apigenina) (Hossain i sar., 2010; Dragović-Uzelac i sar., 2012; Dent i sar., 2013; Roby i sar., 2013).

Tabela 12. Box-Behnken eksperimentalni dizajn sa realnim i kodiranim parametrima mikrotalasne ekstrakcije i eksperimentalno dobijene i predviđene vrednosti prinosa ukupnih fenola (UF) i ukupnih flavonoida (UFI)

Redni broj	Nezavisne promenljive						Odzivi			
	Koncentracija etanola [%]		Vreme ekstrakcije [min]		Odnos rastvarač-droga [mL/g]		UF [g GAE/100 g droge]		UFI [g CE/100 g droge]	
	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	Eksperimentalno	Predviđeno	Eksperimentalno	Predviđeno
1	0	60	0	20	0	30	9,642	9,750	6,997	7,253
2	0	60	0	20	0	30	9,440	9,750	7,312	7,253
3	-1	40	1	30	0	30	9,946	9,740	7,366	7,264
4	0	60	0	20	0	30	9,845	9,750	7,377	7,253
5	0	60	0	20	0	30	10,283	9,750	7,334	7,253
6	-1	40	-1	10	0	30	8,597	8,934	7,366	7,235
7	0	60	1	30	-1	20	9,757	9,902	7,312	7,193
8	1	80	-1	10	0	30	7,012	7,217	5,857	5,959
9	1	80	0	20	1	40	8,217	8,156	6,886	6,665
10	1	80	0	20	-1	20	7,747	7,939	6,280	6,269
11	0	60	-1	10	-1	20	9,252	8,854	6,187	6,097
12	0	60	1	30	1	40	9,407	9,805	7,087	7,177
13	-1	40	0	20	1	40	10,126	9,934	7,803	7,815
14	-1	40	0	20	-1	20	9,667	9,728	6,667	6,889
15	0	60	-1	10	1	40	9,519	9,374	7,316	7,435
16	0	60	0	20	0	30	9,541	9,750	7,247	7,253
17	1	80	1	30	0	30	8,226	7,889	6,639	6,770

4.3.2. Uticaj parametara MAE

Ispitivanjem analize uticaja procesnih parametara može se uočiti da su linearni i kvadratni članovi koncentracije etanola pokazali visoko značajan uticaj na prinos UF, a pored toga i linearni član vremena ekstrakcije je pokazao značajan uticaj (Tabela 10). Prema jednačini (7), linearni član koncentracije etanola je pokazao negativan uticaj na prinos UF. Međutim, kvadratni član koncentracije etanola je, takođe, pokazao negativan uticaj, što znači da će prinos UF opadati kako se koncentracije etanola približava 40%. U skladu sa tim, može se očekivati da koncentracija bliska 40% bude optimalna za ekstrakciju polifenola. To potvrđuje i činjenica da se MAE žalfije sa 30% etanolom kao ekstragensom ostvaruje veći prinos UF u poređenju sa primenom 50% etanola (Dent i sar., 2013). Kao i kod ultrazvučne ekstrakcije, i ovde se može uočiti pozitivan linearan uticaj vremena ekstrakcije. Međutim, nakon određenog vremena, prinos UF će početi da opada usled degradacije polifenola (Dragović-Uzelac i sar., 2012; Dent i sar., 2013). Uticaj parametara mikrotalasne ekstrakcije na prinos UF je prikazan na Slici P3 (Prilog).

Što se tiče flavonoida, najveći prinos ovih jedinjenja u ekstraktima SPŽ dobijenih MAE je bio 7,803 g CE/100 g droge i ostvaren je sa 40% etanolom, vremenu ekstrakcije od 20 min i pri odnosu rastvarač-droga 40 mL/g. Najmanji prinos UFI (5,857 g CE/100 g droge) je zabeležen pri sledećim eksperimentalnim uslovima: 80% etanol, 10 min, 30 mL/g rastvarač-droga. Kao i u slučaju UF, i ovde se može zaključiti da savremene ekstrakcione tehnike (ultrazvučna i mikrotalasna) obezbeđuju značajno povećanje prinosa UFI u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju. Pored toga, može se uočiti da flavonoidi čine najveći deo frakcije ukupnih fenola (>60%) (Tabela 12). To je u skladu sa prethodnim istraživanjima gde je zabeleženo da MAE žalfije obezbeđuje prinos UFI od 1,61 g/100 g droge, za razliku od konvencionalne ekstrakcije gde je prinos UFI bio oko 3 puta niži (0,54 g/100 g droge) (Dragović-Uzelac i sar., 2012). U poređenju sa prethodnim istraživanjima mikrotalasne ekstrakcije (Dragović-Uzelac i sar., 2012; Dent i sar., 2013), prinos UFI koji je ostvaren u okviru ovog rada je bio značajno veći. Razlog za to je manje selektivna primenjena analitička tehnika u okviru ovog rada (spektrofotometrija) u poređenju za prinosom UFI izraženim kao suma prinosa pojedinačnih flavonoida određenih HPLC metodom.

Prema rezultatima ANOVA iz Tabele 10, može se uočiti da svi linearni članovi pokazuju značajan uticaj na vrednost UFI, dok je uticaj linearnog člana koncentracije etanola i odnosa rastvarač-droga visoko značajan ($p < 0,01$), a linearni član vremena ekstrakcije umereno značajan ($p < 0,05$). Vreme ekstrakcije i odnos rastvarač-droga su pokazali pozitivan uticaj, dok je uticaj koncentracije etanola na prinos UFI negativan. Prema tome, može se zaključiti da se flavonoidi žalfije bolje ekstrahuju polarnijim smešama rastvarača, odnosno, kada je udeo etanola u smeši etanol-voda manji. Negativan uticaj kvadratnog člana koncentracije etanola je u skladu sa prethodnim istraživanjima vezanim za mikrotalasnu ekstrakciju flavonoida (Silva i sar., 2007). To ukazuje na to da prinos UFI raste sa smanjenjem koncentracije etanola, dostiže svoj maksimum i ponovo počinje da opada kako se koncentracija etanola u ekstragensu bliži 40% (Slika P4; Prilog). To je u skladu i sa prethodnim istraživanjima vezanim za mikrotalasnu ekstrakciju flavonoida žalfije, gde je ustanovljeno da sa opadanjem koncentracije etanola raste prinos UFI (Dent i sar., 2013).

4.3.3. Optimizacija procesa

Određivanjem optimalnih uslova za simultano povećanje prinosa UF i UFI u procesu MAE SPŽ zaključeno je da su najpogodniji uslovi za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja: 46,2% etanol kao ekstragens, vreme ekstrakcije of 18,7 min i odnos rastvarač-droga od 40 mL/g. U cilju provere predviđenih eksperimentalnih uslova, izvršena je mikrotalasna ekstrakcija na optimalnim uslovima i zaključeno je vrlo dobro slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti (Tabela 11). Na ovaj način je predloženi matematički model verifikovan kao odgovarajuća prezentacija modela ekstrakcije UF i UFI u okviru ispitivanog eksperimentalnog domena.

4.3.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata SPŽ dobijenih ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom

Neravnoteža između proizvodnje slobodnih radikala i antioksidanata u organizmu može da dovede do stanja poznatog kao oksidativni stres (Wen i sar., 2013), koji karakteriše nastajanje slobodnih radikala u koje spadaju reaktivne kiseonične vrste (ROS), reaktivne azotne vrste (NOS), ugljenikovi i sumporni radikali (Wu i sar., 2013). ROS, kao što su superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil radikal (ROO^{\cdot}) i vodonik peroksid (H_2O_2) mogu da indukuju oksidativnu degradaciju proteina, nezasićenih masnih kiselina, ugljenih

hidrata i nukleinskih kiselina, što dalje može da dovede do raznih patofizioloških stanja kao što su ateroskleroza, kardiovaskularna oboljenja, artritis, astma, Parkinsonova i Alchajmerova bolest, autoimuna oboljenja i kancer (Sindhi i sar., 2016). Antioksidanti predstavljaju jedinjenja koja mogu da uspore ili da potpuno zaustave negativne efekte slobodnih radikala. Sekundarni metaboliti biljaka iz polifenolne grupe jedinjenja pokazuju jaku antioksidativnu aktivnost zahvaljujući njihovoj strukturi. Ova jedinjenja su sposobna da neutrališu slobodne radikale prenosom elektrona ili atoma vodonika, kompleksiranjem i redukcijom prelaznih metala, inhibicijom oksidativnih enzima i regeneracijom esencijalnih vitamina (Sharma, 2013). Imajući u vidu ulogu oksidativnog stresa u razvoju ozbiljnih hroničnih oboljenja, neophodno je ispitati antioksidativnu aktivnost ekstrakata SPŽ i povezanost ove aktivnosti sa sadržajem polifenolnih jedinjenja. S obzirom da antioksidanti mogu da ostvare svoj efekat na različite načine, neophodno je primeniti različite testove kako bi se odredio antioksidativni potencijal biljnih ekstrakata ili čistih jedinjenja (Sharma, 2013). Prema tome, ekstraktima SPŽ dobijenim ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom je određena redukciona moć i kapacitet hvatanja DPPH i superoksid anjon radikala.

Kapacitet hvatanja DPPH radikala određen u ekstraktima SPŽ, izražen kao IC_{50} vrednost, je bio od 9,02 do 21,44 $\mu\text{g/mL}$ i od 10,40 do 17,24 $\mu\text{g/mL}$, za ekstrakte dobijene ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom (Tabela 13). Najveća antioksidativna aktivnost prema DPPH radikalima u ekstraktima dobijenim UAE (9,02 $\mu\text{g/mL}$) je zabeležena u uzorku 3 dobijenom na temperaturi of 80°C , vremenu ekstrakcije od 40 min i snazi ultrazvuka od 42 W/L, dok je u slučaju mikrotalasne ekstrakcije najveća antioksidativna aktivnost (10,40 $\mu\text{g/mL}$) dobijena pri sledećim procesnim parametrima: 40% etanol, 30 min i odnos rastvarač-droga 30 mL/g. Pored toga, zabeležena je umerena negativna korelacija ($p < 0,05$) između IC_{50} vrednosti i sadržaja polifenola ($r = -0,612$ i $r = -0,590$ za UF i UFI) (Tabela P5; Prilog), što ukazuje na povezanost polifenolnih jedinjenja sa antioksidativnim efektima. Takođe, svi ekstrakti SPŽ dobijeni mikrotalasnom i ultrazvučnom ekstrakcijom su pokazali veću aktivnost od sintetičkih antioksidanata koji su komercijalno dostupni (propil galat i butilovani hidroksitoluen) (Tabela 13). To znači da bi ovi ekstrakti mogli da posluže kao alternativa propil galatu i butilovanom hidroksitoluenu, za koje se zna da poseduju određene neželjene efekte (Pop i sar., 2013). Jeshvaghani i sar. (2015) su odredili IC_{50} vrednost (233,0 $\mu\text{g/mL}$) ekstrakta *S. officinalis* dobijenog konvencionalnom Č/T ekstrakcijom metanolom, što predstavlja relativno visoku

vrednost. To ukazuje da upotreba savremenih ekstrakcionih tehnika (mikrotalasna i ultrazvučna ekstrakcija) može da dovede do značajnog povećanja antioksidativnog kapaciteta ekstrakata SPŽ. Međutim, prema Veličkoviću i sar. (2011), ne postoji značajna razlika u antioksidativnoj aktivnosti prema DPPH radikalima ekstrakata žalfije dobijenih konvencionalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom. S obzirom da sadržaj polifenola varira sa geografskim poreklom biljke, Farhat i sar. (2013) su utvrdili da i antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata žalfije zavisi od ovog faktora.

Iako nije zabeležena značajna razlika u prinosu UF i UFI, kao i u kapacitetu „hvatanja“ DPPH radikala, između ekstrakata SPŽ dobijenih ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom, sposobnost redukcije Fe^{3+} (FRAP) ekstrakata dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom (124,1 – 221,0 mg AAE/g droge) je bila približno duplo veća u poređenju sa ekstraktima dobijenim primenom MAE (68,19 – 92,57 mg AAE/g DW) (Tabela 13). Ova pojava se može objasniti potencijalnom oksidacijom određenih antioksidanata do koje može da dođe pri intenzivnim uslovima tokom mikrotalasne ekstrakcije. Najveća redukciona moć ekstrakata SPŽ dobijenih ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom je bila 221,0, odnosno 92,57 mg AAE/g droge i ostvarena je na centralnim tačkama oba eksperimentalna dizajna (Tabele 9 i 12). Prema Pirsonovim koeficijentima korelacije (r) iz Tabele P5 (Prilog), postoji dobra korelacija između prinosa polifenolnih jedinjenja i redukcionne moći ($p < 0,05$), koja je bila veća u slučaju ultrazvučne ekstrakcije. Prema podacima iz literature, redukciona moć ekstrakata žalfije dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom je 167 μM Trolox/100 g droge (Wojdyło i sar., 2007) i 178,65 – 197,33 mM Fe(II)/mg (Farhat i sar., 2013), dok je ova vrednost u ekstraktima dobijenih smešom metanol-voda pod pritiskom bila od 5,84 do 20,34 g Trolox/100 g droge (Hossain i sar., 2010).

Sposobnost „hvatanja“ superoksid anjon radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$) u ekstraktima SPŽ dobijenih savremenim ekstrakcionim tehnikama, izražena kao IC_{50} vrednost, je prikazana u Tabeli 13. U slučaju ultrazvučne ekstrakcije, ekstrakt koji je pokazao najveću aktivnost, tj. najmanju IC_{50} vrednost (34,03 $\mu\text{g/mL}$), je dobijen na temperaturi od 40°C, vremenu ekstrakcije od 60 min i pri snazi ultrazvuka 24 W/L, što predstavlja relativno „blage“ uslove ekstrakcije u poređenju sa optimalnim uslovima za ekstrakciju UF i UFI. To ukazuje na slabu korelaciju antioksidativne aktivnosti prema $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikalima i sadržaja polifenolnih jedinjenja, što je i potvrđeno malim koeficijentima korelacije (Tabela P5; Prilog). Sa druge strane, u ekstraktima SPŽ dobijenim

mikrotalasnom ekstrakcijom, najveću aktivnost prema $O_2^{\bullet-}$ radikalima pokazao je uzorak dobijen pri sledećim uslovima: 60% etanol, vreme ekstrakcije od 20 min i odnos rastvarač-droga 30 mL/g. S obzirom da je uočena slaba korelacija između ove aktivnosti i sadržaja polifenola ($p > 0,05$), može se zaključiti da i druga jedinjenja mogu da ostvare neutralizaciju $O_2^{\bullet-}$ radikala. Propil galat je pokazao jače izraženo antioksidativno delovanje prema ovim radikalima (17,00 $\mu\text{g/mL}$) od ekstrakata SPŽ dobijenih savremenim ekstrakcionim tehnikama ($>34,03 \mu\text{g/mL}$). Fenolni diterpeni, uglavnom derivati karnozinske kiseline, su okarakterisani kao jedinjenja žalfije sa najizraženijom antioksidativnom aktivnošću (Babović i sar., 2010). Prema Lu i Foo (2001), kafena i rozmarinska kiselina su najvažnija jedinjenja žalfije odgovorna za neutralizaciju $O_2^{\bullet-}$ radikala i pokazuju oko 15-20 puta veću aktivnost u odnosu na Trolox.

Na osnovu rezultata *in vitro* analize antioksidativne aktivnosti ekstrakata žalfije, dobijenih ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom, može se zaključiti da su ispitivani ekstrakti pokazali visoku aktivnost neutralizacije DPPH i $O_2^{\bullet-}$ radikala, kao i moć redukcije Fe^{3+} jona. Na ovaj način je potvrđeno da sporedni proizvod bez upotrebne vrednosti, tj. SPŽ iz fabrike čaja, predstavlja visoko-vrednu sirovinu koja može biti iskorišćena u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji.

4.3.5. HPLC analiza ekstrakata

HPLC analiza ekstrakata SPŽ dobijenih konvencionalnim i savremenim ekstrakcionim tehnikama na optimalnim uslovima (Tabele 9 i 12) je izvršena u cilju određivanja prinosa glavnih fenolnih kiselina, posebno rozmarinske kiseline. Prema rezultatima iz Tabele 14, može se uočiti da i ultrazvučna i mikrotalasna ekstrakcija obezbeđuju značajno povećanje (oko 2 puta) prinosa rozmarinske kiseline u odnosu na konvencionalni postupak ekstrakcije. To ukazuje na opravdanost upotrebe savremenih tehnika u cilju iskorišćenja SPŽ kao sirovine za dobijanje važnih bioaktivnih jedinjenja. Značajno povećanje u pogledu prinosa je zabeleženo samo u slučaju rozmarinske kiseline, dok su u slučaju kafene, *p*-kumarinske i ferulne kiseline razlike u prinosima bile neznačajne. Međutim, u poređenju sa drugim fenolnim kiselinama, sadržaj rozmarinske kiseline je bio neuporedivo veći u svim ispitivanim ekstraktima (Tabela 14).

Tabela 13. Antioksidativna aktivnost ekstrakata SPŽ dobijenih ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom

Redni broj	Ultrazvučna ekstrakcija			Mikrotalasna ekstrakcija		
	DPPH [•] [μg/mL]	FRAP [mg AAE/g]	O ₂ ^{-•} [μg/mL]	DPPH [•] [μg/mL]	FRAP [mg AAE/g]	O ₂ ^{-•} [μg/mL]
1	9,76 ± 0,3787	221,0 ± 9,441	41,76 ± 2,093	12,40 ± 0,525	92,57 ± 4,234	52,30 ± 0,537
2	16,51 ± 0,6126	184,9 ± 3,056	53,44 ± 2,977	11,88 ± 0,165	86,49 ± 4,007	43,64 ± 2,708
3	9,02 ± 0,4864	207,8 ± 8,581	42,07 ± 3,230	10,40 ± 0,213	90,59 ± 0,552	45,27 ± 2,732
4	11,57 ± 0,2348	190,4 ± 8,514	48,37 ± 3,020	12,85 ± 0,922	80,72 ± 3,501	65,32 ± 3,917
5	10,35 ± 0,3525	196,3 ± 19,25	42,44 ± 2,023	13,25 ± 0,474	74,98 ± 0,767	54,49 ± 2,149
6	21,44 ± 2,1247	167,1 ± 9,025	50,66 ± 1,292	11,18 ± 0,478	83,16 ± 1,899	55,65 ± 0,459
7	9,29 ± 0,8527	194,8 ± 11,69	37,99 ± 1,579	13,34 ± 0,444	81,48 ± 2,419	66,57 ± 4,779
8	13,89 ± 1,3693	148,6 ± 6,764	72,88 ± 3,197	16,38 ± 0,639	68,19 ± 4,349	59,97 ± 0,828
9	10,22 ± 0,5164	195,9 ± 7,796	66,49 ± 0,989	15,19 ± 0,355	68,41 ± 3,403	95,48 ± 1,329
10	12,30 ± 0,4074	176,3 ± 8,014	71,18 ± 4,151	17,24 ± 0,587	71,43 ± 2,538	85,04 ± 5,042
11	11,03 ± 0,723	183,7 ± 4,675	41,19 ± 0,393	14,12 ± 0,828	76,39 ± 1,640	53,89 ± 3,831
12	10,35 ± 0,7944	211,2 ± 11,44	71,66 ± 2,761	13,66 ± 0,566	75,84 ± 1,438	56,28 ± 3,206
13	11,49 ± 0,6677	199,9 ± 17,41	55,44 ± 5,510	11,40 ± 0,605	84,04 ± 1,938	59,46 ± 1,478
14	10,73 ± 0,3736	170,1 ± 8,674	34,34 ± 1,871	15,07 ± 0,503	85,39 ± 4,046	69,09 ± 2,588
15	15,41 ± 0,7871	124,1 ± 9,799	34,03 ± 2,136	13,67 ± 0,226	79,83 ± 1,562	48,73 ± 0,947
16	10,49 ± 0,1957	203,1 ± 11,89	38,93 ± 3,438	13,03 ± 0,836	85,19 ± 0,980	59,34 ± 2,566
17	11,89 ± 0,9599	190,6 ± 8,252	81,09 ± 1,351	15,20 ± 0,478	71,03 ± 4,171	65,35 ± 5,197
PG*	24,99 ± 0,300		17,00 ± 1,000			
BHT**	50,77 ± 4,000					

* propil galat

** butilovani hidroksitoluen

Tabela 14. Prinos dominantnih fenolnih kiselina u ekstraktima dobijenim maceracijom (60% etanol) i optimizovanim postupcima ultrazvučne i mikrotalasne ekstrakcije

Jedinjenje	Ekstrakciona tehnika		
	Maceracija	Ultrazvučna ekstrakcija	Mikrotalasna ekstrakcija
	Prinos [mg/100 g droge]		
Kafena kiselina	33,69	30,93	18,07
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	5,40	5,03	5,53
Ferulna kiselina	13,14	14,08	4,72
Rozmarinska kiselina	840,43	1.623,21	1.724,81

4.4. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Eksperimentalno dobijene vrednosti prinosa ekstrakcije, UF, UFI, kao i parametara antioksidativne aktivnosti, u ekstraktima SPŽ dobijenim ekstrakcijom subkritičnom vodom (SWE) pod različitim uslovima procesa (temperatura, vreme ekstrakcije i koncentracija HCl) su date u Tabeli 15. Prvobitno korišćen eksperimentalni dizajn za ekstrakciju semena korijandera sa temperaturom, pritiskom i vremenom ekstrakcije kao nezavisno promenljivim procesnim parametrima (Zeković i sar., 2014) je promenjen na taj način što je pritisak zamenjen koncentracijom HCl kao nezavisna promenljiva. Prethodno je ustanovljeno da uticaj pritiska na ekstrakciju polifenola i antioksidativnu aktivnost ekstrakata može biti zanemaren kao procesni parametar u SWE (Mustafa i Turner, 2011; Zeković i sar., 2014). Prema tome, HCl (koncentracije 0, 0,75 i 1,5%) je dodata kao nezavisna promenljiva u cilju potencijalne hidrolize vezanih polifenola i aglikona iz njihovih flavonoidnih glikozida (Ravber i sar., 2015). Temperaturni profili svake ekstrakcije su prikazani na Slici P6 (Prilog). Može se uočiti da svi eksperimenti izvršeni na istim temperaturama imaju veoma slične temperaturne režime tokom zagrevanja, stacionarne faze i hlađenja. Trenutak kada temperatura dostiže stacionarnu fazu ($120\pm 2^{\circ}\text{C}$; $170\pm 2^{\circ}\text{C}$ ili $220\pm 2^{\circ}\text{C}$) predstavlja početak ekstrakcije i vreme ekstrakcije je mereno od tog trenutka do početka hlađenja. Faza zagrevanja je trajala 18, 23 i 29 min za ekstrakcije izvršene na 120, 170 i 220°C , dok je hlađenje u ledenom kupatilu bilo približno 10 min u svim slučajevima (Slika P6; Prilog). Efikasnost ekstrakcije, koja je određena kao ukupan prinos ekstrakcije (Y), je bila između 26,04 i 45,48% (Tabela 15). U poređenju sa konvencionalnom ekstrakcijom (Slika 32), može se zaključiti da subkritična voda kao

ekstragens u velikoj meri dovodi do povećanja Y, što je i očekivano, jer uslovi pri kojima se ovaj proces odvija omogućavaju znatno bržu difuziju supstanci iz biljnog materijala u tečnu fazu.

4.4.1. Provera modela

Eksperimentalne vrednosti odziva su fitovane kvadratnim polinomom (jednačina (3)) i metoda najmanjih kvadrata je korišćena za određivanje regresionih koeficijenata za linearne, kvadratne i interakcijske članove. Rezultati ANOVA i deskriptivne statistike za sve ispitivane odzive su dati u Tabeli 16. Na osnovu statističkih parametara (R^2 i CV) se može zaključiti da kvadratni model predstavlja dobru aproksimaciju svih odziva. To je potvrđeno i F -testom, s obzirom da su p -vrednosti u svim slučajevima bile manje, odnosno veće od 0,05 za model i nedostatak prilagođavanja. Na taj način je potvrđena konstantna greška modela koja zavisi samo od eksperimentalnog merenja. Pored toga, dobra reproduktivnost (CV<10%) je postignuta za sve odzive, osim za IC_{50} gde umereno povišena vrednost CV (14,80%) ukazuje na mogućnost zavisnosti greške od merenja i primenjenog modela (Myers i sar., 2009). Slični statistički parametri su zabeleženi i u drugim slučajevima ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala pomoću subkritične vode (Kim i Mazza, 2006; Zeković i sar., 2014), što ukazuje na mogućnost primene kvadratnog modela za fitovanje rezultata.

4.4.2. Uticaj parametara SWE

Eksperimentalno dobijene vrednosti prinosa UF u ekstraktima SPŽ dobijenim ekstrakcijom vodom u subkritičnom stanju su bile od 4,1373 do 7,8255 g GAE/100 g droge (Tabela 15). Prinos u ekstraktima dobijenim na najnižoj ispitivanoj temperaturi (120°C) je bio najmanji. Prinos UF primenom SWE je bio manji od prinosa dobijenog maceracijom samo u uzorcima 3, 13 i 15, međutim, neophodno je uzeti u obzir da su ekstrakcije subkritičnom vodom vršene značajno kraće vreme (10 – 30 min) u odnosu na maceraciju (24 h). Prema tome, najmanji prinos UF (4,1373 g GAE/100 g droge) je zabeležen pri sledećim uslovima ekstrakcije: temperatura od 120°C, vreme ekstrakcije 30 min i 0,75% koncentracija HCl, dok je najveći prinos ekstrakcije ostvaren na temperaturi od 170°C, vremenu ekstrakcije 30 min i bez dodatka HCl u ekstragens. Prema rezultatima iz Tabele 15, može se zaključiti da je neophodno povećati temperaturu subkritične vode kako bi se ostvario veći prinos UF.

Tabela 15. Realne i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih, Box-Behnken eksperimentalni dizajn i eksperimentalno dobijene vrednosti ispitivanih odziva (Y, UF, UFI, TEAC i EC₅₀) u ekstraktima dobijenim subkritičnom vodom

Redni broj	Nezavisne promenljive						Odzivi					
	Realno			Kodirano			Y	UF	UFI	IC ₅₀	TEAC	EC ₅₀
	Temperatura; X ₁ [°C]	Vreme ekstrakcije; X ₂ [min]	HCl konc.; X ₃ [%]	X ₁	X ₂	X ₃	[%]	[g GAE/100 g droge]	[g CE/100 g droge]	[µg/mL]	[mM Trolox/100 g]	[µg/mL]
1	170	10	1,5	0	-1	1	39,26	7,4886	2,1442	31,11	37,20	44,93
2	120	20	0	-1	0	-1	32,06	6,7249	4,9280	20,31	36,63	57,44
3	120	10	0,75	-1	-1	0	40,98	4,4012	3,1115	40,22	22,66	70,92
4	170	20	0,75	0	0	0	42,74	6,7586	3,5773	29,54	31,09	48,24
5	170	20	0,75	0	0	0	41,70	7,5672	3,5021	32,30	33,03	45,73
6	220	10	0,75	1	-1	0	35,98	7,5560	3,7779	22,82	39,56	40,87
7	220	30	0,75	1	1	0	33,56	7,1292	3,6095	26,91	41,45	44,44
8	170	20	0,75	0	0	0	42,24	7,0618	3,5737	26,99	33,66	45,51
9	220	20	0	1	0	-1	26,04	7,4437	4,7668	18,10	39,18	47,18
10	220	20	1,5	1	0	1	36,44	7,0394	2,0475	22,72	42,08	50,02
11	170	30	0	0	1	-1	32,94	7,8255	4,8921	16,08	39,65	46,07
12	170	10	0	0	-1	-1	33,34	7,6233	4,9423	15,89	33,74	49,96
13	120	20	1,5	-1	0	1	45,48	4,1710	1,7716	36,55	27,44	66,19
14	170	30	1,5	0	1	1	43,04	6,8597	2,0618	15,89	33,91	41,67
15	120	30	0,75	-1	1	0	45,16	4,1373	3,3229	40,00	23,69	68,94

Tabela 16. Analiza varijanse (ANOVA) fitovanja polinomnim modelom drugog reda odziva izmerenih u ekstraktima dobijenim subkritičnom vodom

Odziv	Član	Suma kvadrata	df ^a	Srednji kvadrat	F–vrednost	p–vrednost
Sadržaj ukupnih fenola ^b	Model	21,86	9	2,43	7,63	0,0188
	<i>T</i>	11,84	1	11,84	37,18	0,0017
	<i>t</i>	0,16	1	0,16	0,49	0,5152
	<i>HCl konc.</i>	2,06	1	2,06	6,46	0,0517
	<i>T x t</i>	$6,63 \cdot 10^{-3}$	1	$6,63 \cdot 10^{-3}$	0,02	0,8909
	<i>T x HCl konc.</i>	1,16	1	1,16	3,63	0,1152
	<i>t x HCl konc.</i>	0,17	1	0,17	0,54	0,4947
	<i>T</i> ²	5,44	1	5,44	17,08	0,0091
	<i>t</i> ²	0,04	1	0,044	0,14	0,7249
	<i>(HCl konc.)</i> ²	0,68	1	0,68	2,14	0,2036
	Rezidual	1,59	5	0,32		
	Lack of Fit	1,26	3	0,42	2,52	0,2972
	Greška	0,33	2	0,17		
	Ukupno	23,45	14			
Sadržaj ukupnih flavonoida ^c	Model	16,83	9	1,87	90,83	< 0,0001
	<i>T</i>	0,14	1	0,14	6,92	0,0465
	<i>t</i>	$1,00 \cdot 10^{-3}$	1	$1,00 \cdot 10^{-3}$	0,05	0,8341
	<i>HCl konc.</i>	16,54	1	16,54	803,47	< 0,0001
	<i>T x t</i>	0,04	1	0,04	1,75	0,2430
	<i>T x HCl konc.</i>	0,05	1	0,05	2,32	0,1882
	<i>t x HCl konc.</i>	$2,60 \cdot 10^{-4}$	1	$2,599 \cdot 10^{-4}$	0,01	0,9149
	<i>T</i> ²	0,05	1	0,05	2,31	0,1887
	<i>t</i> ²	$1,21 \cdot 10^{-3}$	1	$1,21 \cdot 10^{-3}$	0,06	0,8185
	<i>(HCl konc.)</i> ²	0,01	1	0,01	0,62	0,4655
	Rezidual	0,10	5	0,02		
	Lack of Fit	0,10	3	0,03	18,38	0,0520
	Greška	$3,60 \cdot 10^{-3}$	2	$1,80 \cdot 10^{-3}$		
	Ukupno	16,93	14			
IC ₅₀ (DPP H test) ^d	Model	989,33	9	109,93	7,32	0,0206
	<i>T</i>	270,75	1	270,75	18,02	0,0081
	<i>t</i>	9,37	1	9,37	0,62	0,4654
	<i>HCl konc.</i>	184,22	1	184,22	12,26	0,0173
	<i>T x t</i>	4,63	1	4,63	0,31	0,6029
	<i>T x HCl konc.</i>	33,76	1	33,76	2,25	0,1942
	<i>t x HCl konc.</i>	80,33	1	80,33	5,35	0,0687
	<i>T</i> ²	61,77	1	61,77	4,11	0,0984
	<i>t</i> ²	5,44	1	5,44	0,36	0,5735

	<i>(HCl konc.)</i> ²	317,90	1	317,90	21,16	0,0058
	Rezidual	75,13	5	15,03		
	Lack of Fit	61,07	3	20,36	2,89	0,2672
	Greška	14,06	2	7,03		
	Ukupno	1064,46	14			
TEAC ^e	Model	469,67	9	52,19	5,96	0,0318
	<i>T</i>	335,96	1	335,96	38,38	0,0016
	<i>t</i>	3,84	1	3,84	0,44	0,5372
	<i>HCl konc.</i>	9,18	1	9,18	1,05	0,3528
	<i>T x t</i>	0,19	1	0,19	0,02	0,8892
	<i>T x HCl konc.</i>	36,51	1	36,51	4,17	0,0966
	<i>t x HCl konc.</i>	21,19	1	21,19	2,42	0,1805
	<i>T</i> ²	0,27	1	0,27	0,03	0,8665
	<i>t</i> ²	0,85	1	0,85	0,10	0,7679
	<i>(HCl konc.)</i> ²	59,47	1	59,47	6,79	0,0479
	Rezidual	43,77	5	8,75		
	Lack of Fit	40,17	3	13,39	7,45	0,1206
	Greška	3,59	2	1,80		
	Ukupno	513,43	14			
EC ₅₀ (reducing power metod) ^f	Model	1269,23	9	141,03	5,18	0,0424
	<i>T</i>	819,77	1	819,77	30,12	0,0027
	<i>t</i>	0,01	1	0,01	4,19 · 10 ⁻⁴	0,9845
	<i>HCl konc.</i>	6,87	1	6,87	0,25	0,6367
	<i>T x t</i>	7,72	1	7,72	0,28	0,6172
	<i>T x HCl konc.</i>	8,75	1	8,75	0,32	0,5952
	<i>t x HCl konc.</i>	5,35	1	5,35	0,20	0,6760
	<i>T</i> ²	394,13	1	394,13	14,48	0,0126
	<i>t</i> ²	1,05	1	1,05	0,04	0,8520
	<i>(HCl konc.)</i> ²	9,68	1	9,68	0,36	0,5768
	Rezidual	136,07	5	27,21		
	Lack of Fit	131,46	3	43,82	19,02	0,0504
	Greška	4,61	2	2,30		
	Ukupno	1405,30	14			

^a Broj stepeni slobode

^b $R^2=0,932,$

^c $R^2=0,994,$

^d $R^2=0,924,$

^e $R^2=0,915,$

^f $R^2=0,903,$

Prema literaturnim podacima, do sada nije vršena ekstrakcija žalfije subkritičnom vodom. Hossain i sar. (2010) su primenili ekstrakciju tečnostima pod pritiskom koristeći

smeše metanol-voda za ekstrakciju polifenola iz žalfije, i ostvarili prinos UF od 4,14 do 6,16 g GAE/100 g droge. I u ovom slučaju, može se zaključiti da primena subkritične vode može da pruži određene prednosti u pogledu prinosa i kraćeg trajanja procesa u odnosu na konvencionalnu Č/T ekstrakciju.

Uticaj parametara SWE je statistički određen kao značajan ($p < 0,05$), umereno značajan ($0,05 < p < 0,10$) i neznačajan ($p > 0,10$), prema p -vrednostima za članove (Tabela 16). Regresioni koeficijenti iz jednačine (3) su metodom najmanjih kvadrata određeni za sve ispitivane odzive (UF, UFI, IC₅₀, TEAC i EC₅₀) i dobijene jednačine kojima je moguće predvideti vrednosti ispitivanih odziva u primenjenom eksperimentalnom domenu su date u Tabeli 17.

Prema dobijenim podacima iz Tabele 16 može se uočiti da su linearni i kvadratni član temperature pokazali značajan uticaj na prinos UF, dok je linearni član koncentracije HCl pokazao umereno značajan uticaj. Linearni član temperature je pokazao pozitivan uticaj na UF, što je u skladu sa prethodno uočenim visokim vrednostima UF na višim temperaturama (Tabela 15). Prema Vergara-Salinas i sar. (2012), prinos UF konstantno raste sa porastom temperature do 200°C u ekstrakciji polifenola iz timijana korišćenjem subkritične vode kao ekstragensa, i na temperaturama većim od 200°C dolazi do degradacije određenih derivata hidroksicimene kiseline, kao što je rozmarinska kiselina. Tokom procesa SWE temperatura utiče i na čvrstu (biljni materijal), i na tečnu fazu (ekstragens). Povišena temperatura smanjuje površinski napon i viskozitet vode, što dalje vodi do bržeg prodiranja ekstragensa u pore biljnog materijala. Pored toga, temperatura utiče i na prekidanje interakcija vezanih jedinjenja i biljnog materijala koje potiču od Van der Waals-ovih sila, vodoničnih veza i dipol-dipol interakcija, olakšavajući difuziju jedinjenja u tečnu fazu (Mustafa i Turner, 2011). Međutim, negativan uticaj kvadratnog člana temperature ukazuje na to da će prinos UF sa porastom temperature dostići svoj maksimum, a zatim početi da opada kako se temperatura približava maksimalnoj ispitivanoj u ovom radu (220°C). Sličan uticaj temperature na prinos UF zabeležen je u ekstrakciji semena korijandera subkritičnom vodom (Zeković i sar., 2014). To je u skladu sa glavnim konceptom SWE, koji ukazuje na to da eksperimente treba vršiti na maksimalnoj temperaturi koja ne izaziva degradaciju ciljanih jedinjenja. Sa druge strane, linearni član koncentracije HCl je pokazao negativan uticaj na prinos UF, ukazujući na smanjenje UF sa porastom koncentracije kiseline u ekstragensu (Slika P7; Prilog). Negativan uticaj vremena ekstrakcije ukazuje na to da će optimalni uslovi za ekstrakciju polifenola biti

na povišenoj temperaturi, za kratko vreme i bez dodatka kiseline u ekstragens, međutim, uticaj vremena ekstrakcije i koncentracije HCl je bio dosta manji u odnosu na dominantni uticaj temperature (Tabela 16).

Tabela 17. Jednačine modela koje predviđaju vrednosti odziva u ispitanom eksperimentalnom domenu

Odziv	Polinomni model drugog reda
Ukupni fenoli	$UF = 7,13 + 1,22 X_1 - 0,14 X_2 - 0,51 X_3 - 0,04 X_1 X_2 + 0,54 X_1 X_3 - 0,21 X_2 X_3 - 1,21 X_1^2 - 0,11 X_2^2 + 0,43 X_3^2$
Ukupni flavonoidi	$UFI = 3,55 + 0,13 X_1 - 0,01 X_2 - 1,44 X_3 - 0,10 X_1 X_2 + 0,11 X_1 X_3 - 8,06 \cdot 10^{-3} X_2 X_3 - 0,11 X_1^2 + 0,02 X_2^2 - 0,06 X_3^2$
IC ₅₀ vrednost	$IC_{50} = 29,61 - 5,82 X_1 - 1,08 X_2 + 4,80 X_3 + 1,08 X_1 X_2 - 2,90 X_1 X_3 - 4,48 X_2 X_3 + 4,09 X_1^2 - 1,21 X_2^2 - 9,28 X_3^2$
TEAC	$TEAC = 32,59 + 6,48 X_1 + 0,69 X_2 - 1,07 X_3 + 0,22 X_1 X_2 + 3,02 X_1 X_3 - 2,30 X_2 X_3 - 0,27 X_1^2 - 0,48 X_2^2 + 4,01 X_3^2$
EC ₅₀ vrednost	$EC_{50} = 46,49 - 10,12 X_1 - 0,04 X_2 + 0,93 X_3 + 1,39 X_1 X_2 - 1,48 X_1 X_3 - 1,16 X_2 X_3 + 10,33 X_1^2 - 0,53 X_2^2 - 1,62 X_3^2$

Eksperimentalne vrednosti prinosa UFI u ekstraktima SPŽ dobijenih subkritičnom vodom su date u Tabeli 15. Prinos UFI je bio od 1,7716 do 4,9423 g CE/100 g droge. Najmanji prinos UFI je ostvaren na temperaturi od 120°C, vremenu ekstrakcije 20 min, korišćenjem 1,5% HCl kao ekstragensa. Svi uzorci koji su dobijeni primenom čiste vode kao ekstragensa su pokazali relativno visok prinos UFI (4,7668 – 4,9423 g CE/100 g droge), ukazujući na to da je uticaj koncentracije HCl u ekstragensu više izražen u poređenju sa ostalim parametrima procesa. Flavonoidi predstavljaju oko 80% polifenolne frakcije u etanolnim ekstraktima žalfije dobijenim konvencionalnom ekstrakcijom (Veličković i sar., 2011), dok je HPLC analizom utvrđeno da flavonoidnu frakciju žalfije čine apigenin, luteolin, kvercetin, kemferol i njihovi glikozidi (Roby i sar., 2013).

Kvadratni polinom kojim se može predvideti ponašanje UFI u ispitivanom eksperimentalnom domenu je prikazan u Tabeli 17. Iz rezultata se može zaključiti da linearni član koncentracije HCl ($p < 0,0001$) predstavlja najuticajniji parametar procesa ekstrakcije flavnoida SPŽ pomoću SWE. Pored toga, uticaj linearnog člana temperature je, takođe, bio značajan, dok je uticaj ostalih parametara bio statistički neznačajan ($p > 0,10$). Uticaj koncentracije HCl je bio negativan, što je u skladu sa eksperimentalno dobijenim malim vrednostima UFI pri povećanoj koncentraciji HCl u ekstragensu (Tabela 15). Međutim, nije

utvrđeno da li HCl dovodi do potpune degradacije flavonoida ili samo do parcijalne hidrolize flavonoidnih glikozida na aglikone. Posmatrajući uticaj temperature na prinos UFI, može se zaključiti da je sličan kao u slučaju UF (Slika P8; Prilog), a prethodno je zabeleženo da je optimalna temperatura ekstrakcije UF i UFI veoma bliska, kada se kao rastvarač koristi subkritična voda bez dodatka kiseline (Zeković i sar., 2014).

4.4.3. Antioksidativna aktivnost ekstrakata SPŽ dobijenih subkritičnom vodom

Antioksidativna aktivnost ekstrakata SPŽ dobijenih SWE je određena brzim *in vitro* testovima, tj. merenjem direktnog „hvatanja“ DPPH i ABTS radikala, kao i redukcionom kapacitetu prema Fe^{3+} jonima. Uticaj parametara SWE na antioksidativnu aktivnost određenu DPPH, ABTS i testom redukcione moći je data na Slikama P9-P11 (Prilog). Eksperimentalno dobijene IC_{50} vrednosti subkritičnih ekstrakata SPŽ su bile od 15,89 do 40,22 $\mu g/mL$. U uzorcima 12 (170°C, 10 min i 0% HCl) i 14 (170°C, 30 min i 1,5% HCl) su zabeležene najmanje IC_{50} vrednosti, odnosno, ovi uzorci su pokazali najveću antioksidativnu aktivnost prema DPPH radikalima. Sa druge strane, uzorak dobijen na temperaturi od 120°C, vremenu ekstrakcije 10 min i sa 0,75% HCl kao ekstragensom je pokazao najmanju antioksidativnu aktivnost. Slična antioksidativna aktivnost (3,37 – 10,08 $\mu g/mL$) je zabeležena i u metanolnim ekstraktima žalfije (Hamrouni-Sellami i sar., 2013). Sa druge strane, subkritični ekstrakti SPŽ su pokazali slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte žalfije dobijene konvencionalnom ekstrakcijom metanolom (3,37 – 10,08 $\mu g/mL$) (Farhat i sar., 2013), međutim, žalfija korišćena u okviru tog rada je sa severa Afrike, dok je biljni materijal korišćen u okviru ovog rada poreklom iz Crne Gore. Antioksidativna aktivnost ekstrakata žalfije poreklom iz Grčke je bila od 0,39 do 1,64 $\mu mol Trolox/mL$, gde je zabeleženo da antioksidativna aktivnost raste sa porastom temperature ekstrakcije (Skotti i sar., 2014).

Rezultati antioksidativne aktivnosti prema ABTS radikalima (TEAC) su dati u Tabeli 15. Može se uočiti da je najveća antioksidativna aktivnost (42,08 mM Trolox/100 g droge) dobijena na temperaturi od 220°C, vremenu ekstrakcije 20 min korišćenjem 1,5% HCl kao ekstragensa, dok je najniža vrednost TEAC (22,66 mM Trolox/100 g droge) zabeležena pri sledećim ekstrakcionim parametrima: 120°C, 10 min i 0,75% HCl. Najmanja antioksidativna aktivnost prema DPPH i ABTS radikalima je zabeležena u istom uzorku (uzorak 3), što ukazuje na potencijalnu korelaciju antioksidativne aktivnosti određene različitim testovima. TEAC

vrednosti dobijene u okviru ovog rada su veoma slične antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta žalfije dobijenog ekstrakcijom u blenderu pomoću 80% etanola (32 mM Trolox/100 g droge) (Mantle i sar., 2000). Prema Skotti i sar. (2014), vrednosti TEAC u ekstraktima žalfije dobijenih konvencionalnom, ultrazvučnom i ekstrakcijom na povišenoj temperaturi (85°C) su bile 0,50, 0,62 i 1,63 mM Trolox/100 g droge.

Redukciona moć ekstrakata SPŽ izražena kao EC₅₀ vrednost je bila od 40,87 do 70,92 µg/mL (Tabela 15). Kao i u slučaju prethodna dva antioksidativna testa, najslabija aktivnost je i u ovom slučaju zabeležena u istom uzorku (3). Sa druge strane, najveća redukciona moć, tj. najniža EC₅₀ vrednost je dobijena na temperaturi od 220°C, vremenu ekstrakcije 10 min i 0,75% koncentraciji HCl. Hamrouni-Sellami i sar. (2013) su odredili redukcionu moć ekstrakata žalfije koja je bila od 236,17 do 375,15 µg/mL, što je oko 6 puta manja aktivnost u poređenju sa rezultatima ovog rada. Drugi autori su koristili druge antioksidativne testove za određivanje redukcionog kapaciteta, kao što je FRAP metoda i dobili su da je redukciona moć 12,77 g Trolox/100 g droge u ekstraktu žalfije dobijenom ekstrakcijom smešom metanol-voda pod pritiskom (Hossain i sar., 2010).

Antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata je u najvećem broju slučajeva povezana sa sadržajem polifenola, prema tome, neophodno je proveriti da li postoji korelacija između ovih vrednosti. Rezultati antioksidativne aktivnosti su fitovani linearnim modelom i može se uočiti da postoji umerena pozitivna korelacija između prinosa UF i TEAC, dok je UF u umerenoj negativnoj korelaciji sa IC₅₀ i EC₅₀ vrednostima (Slika P12a; Prilog). Slična korelacija između UF i IC₅₀ vrednosti je zabeležena u ekstraktima korijandera dobijenim SWE tehnikom (Zeković i sar., 2014). Sa druge strane, ustanovljeno je da ne postoji linearna zavisnost između UFI i parametara antioksidativne aktivnosti (IC₅₀, TEAC i EC₅₀) (Slika P12a; Prilog). Ustanovljeno je da postoji korelacija između svih parametara antioksidativne aktivnosti ($p < 0,05$), s obzirom da su vrednosti Pirsonovih koeficijenata korekacije za IC₅₀-TEAC, IC₅₀-EC₅₀ i TEAC-EC₅₀ bile -0,716, 0,704 i -0,776, što ukazuje na to da parametri ekstrakcije subkritičnom vodom slično utiču na antioksidativnu aktivnost ekstrakata SPŽ određenu pomoću tri različita testa.

Prema ANOVA rezultatima, linearni član temperature i koncentracije HCl, kao i kvadratni član koncentracije HCl, je pokazao značajan uticaj ($p < 0,05$) na IC₅₀ vrednost, dok je

kvadratni član temperature i interakcija vreme ekstrakcije - koncentracija HCl pokazala umereno značajan uticaj ($p < 0,10$) (Tabela 16). IC_{50} vrednost opada sa porastom temperature, odnosno povećanje temperature utiče na povećanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata, što se može uočiti na Slici P8 (prilog). Isti slučaj bio je i sa TEAC i EC_{50} vrednošću (Tabela 16). Sa druge strane, koncentracija HCl je pokazala značajan pozitivan uticaj na IC_{50} vrednost, što znači da će najveća antioksidativna aktivnost biti ostvarena u ekstraktima dobijenim čistom ili blago zakiseljenom vodom. Međutim, interakcija vreme ekstrakcije - koncentracija HCl je pokazala negativan efekat na IC_{50} vrednost, što znači da će antioksidativna aktivnost biti veća kada se duže vreme ekstrakcije kombinuje sa primenom zakiseljene vode kao ekstragensa. To potencijalno ukazuje da tokom ekstrakcije zakiseljenom vodom dolazi do oslobađanja potentnih flavonoidnih aglikona usled kiselinske hidrolize do koje dolazi tokom ekstrakcije. Interakcija temperatura – koncentracija HCl je pokazala umereno pozitivan uticaj ($p < 0,10$) na TEAC, što znači da će pri povišenoj temperaturi i koncentraciji HCl u ekstragensu doći do povećanja antioksidativne aktivnosti.

4.4.4. Optimizacija procesa

Regresiona analiza uticaja parametara ekstrakcije subkritičnom vodom na ispitivane odzive, zajedno sa metodom odzivne površine (RSM), može da se koristi za optimizaciju procesa u cilju dobijanja željenih veličina odziva (Ferreira i sar., 2007; Leardi, 2009; Myers i sar., 2009). Prema tome, izvršena je optimizacija ekstrakcije SPŽ pomoću subkritične vode na osnovu tri različita sistema u zavisnosti od ciljanih odziva (Tabela 18). Cilj prvog sistema je bila optimizacija povećanja prinosa UF i UFI i predviđeni optimalni uslovi su temperatura od 184°C , vreme ekstrakcije 15,9 min i primena čiste vode kao ekstragensa (bez dodatka HCl). Prethodno je uočeno da povećanje koncentracije HCl u ekstragensu vodi do povećanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata, prema tome, drugi sistem je imao za cilj optimizaciju u smislu povećanja antioksidativne aktivnosti (minimalni IC_{50} i EC_{50} i maksimalni TEAC). Dobijeni optimalni uslovi su temperatura od $215,5^{\circ}\text{C}$, vreme ekstrakcije od 30 min i 1,5% HCl kao ekstragens. To je u skladu sa ANOVA rezultatima s obzirom da je zabeleženo da je interakcija vreme ekstrakcije – koncentracija HCl pokazala pozitivan uticaj na antioksidativnu aktivnost (Tabele 15 i 16). Glavna prednost metode odzivne površine je simultana optimizacija više odziva u definisanom eksperimentalnom domenu, prema tome, treći sistem je imao za cilj simultano povećanje prinosa polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti

ekstrakata. Predviđeni optimalni uslovi optimizacije su bili temperatura od 201,5°C, vreme ekstrakcije 15,8 min i čista voda kao ekstragens (Tabela 18). Predviđene vrednosti odziva na ovim eksperimentalnim uslovima su 7,98 g GAE/100 g droge, 4,93 g CE/100 g droge, 13,38 µg/mL, 38,34 mM Trolox/100 g droge i 41,66 µg/mL, za UF, UFI, IC₅₀, TEAC i EC₅₀.

Može se zaključiti da primenjeni kvadratni model predstavlja dobru matematičku aproksimaciju ispitivanih odziva na osnovu odgovarajućih parametara ANOVA i deskriptivne statistike (R^2 and CV). Prema tome, metoda odzivne površine može uspešno biti primenjena za optimizaciju procesa ekstrakcije SPŽ subkritičnom vodom na šta ukazuju i velike vrednosti željene funkcije (Tabela 18). Pored toga, može se uočiti da ova ekstrakciona tehnika obezbeđuje povećanje prinosa polifenolnih jedinjenja uz značajno skraćanje vremena ekstrakcije u poređenju sa konvencionalnom Č/T ekstrakcijom. To znači da se SPŽ može iskoristiti kao dobra sirovina za dobijanje visoko-vrednih polifenolnih jedinjenja i ekstrakata sa izraženom antioksidativnom aktivnošću, koji se uz dalju preradu mogu koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Tabela 18. Optimalni uslovi dobijeni metodom odzivne površine i predviđene vrednosti ispitivanih odziva

Cilj optimizacije	Optimalni uslovi			Predviđeni odzivi					<i>D</i> *
	Temperatura [°C]	Vreme ekstrakcije [min]	HCl koncentracija [%]	UF [g GAE/100 g droge]	UFI [g CE/100 g droge]	IC ₅₀ [µg/mL]	TEAC [mM Trolox/100 g]	EC ₅₀ [µg/mL]	
UF, UFI maksimalni	184	15,9	0	8,12	4,94				1
TEAC maksimalan IC ₅₀ , EC ₅₀ minimalni	215,5	30	1,5			14,78	42,08	43,35	0,955
TP, TF, TEAC maksimalan IC ₅₀ , EC ₅₀ minimalni	201,5	15,8	0	7,98	4,93	13,38	38,34	41,66	0,952

* Željena funkcija

4.5. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom

U cilju izolovanja lipofilne frakcije SPŽ, kao savremena ekstrakciona tehnika je primenjena ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SFE). Ispitan je uticaj pritiska (100, 200 i 300 bar), temperature (40, 50 i 60°C) i protoka CO₂ (0,2, 0,3 i 0,4 kg/h) na ukupan prinos ekstrakcije (Y). Eksperimentalno dobijene vrednosti izmerenih odziva u Box-Benken eksperimentalnom dizajnu su date u Tabeli 19. Pored SFE, u cilju izolovanja nepolarnih i lako isparljivih jedinjenja, primenjene su Soxhlet ekstrakcija i destilacija vodenom parom (Tabela 20). Može se uočiti da je Y ostvaren superkritičnom ekstrakcijom bio od 1,81 do 8,83%. Najveći prinos je zabeležen na sledećim eksperimentalnim uslovima: 300 bar, 50°C i 0,4 kg/h. Sa druge strane, prinos etarskog ulja dobijen destilacijom vodenom parom (1,80%, v/m) iz SPŽ je bio manji od svih Y dobijenih primenom SFE. S obzirom na to da se destilacijom vodenom parom dobija „čisto“ etarsko ulje koje sadrži samo lako isparljiva jedinjenja, primenom SFE se pored lakoisparljivih izoluju i druga nepolarna jedinjenja. Pored toga, može se uočiti da je Y ostvaren Soxhlet ekstrakcijom bio najveći (Tabela 20). Soxhlet ekstrakciju karakteriše potpuno iscrpljenje biljne sirovine i mala selektivnost, prema tome, očekuje se da ovom tehnikom budu ekstrahovana sva jedinjenja rastvorna u primenjenim rastvaračima (metilen hlorid i *n*-heksan).

Prema literaturnim navodima, superkritična ekstrakcija terpena iz *S. officinalis* je često bila predmet istraživanja u poslenjih nekoliko godina (Glišić i sar., 2010; Fornari i sar., 2012; Gaňán i Brignole, 2013). Babović i sar. (2010) su izvršili superkritičnu ekstrakciju žalfije na temperaturi od 100°C i pritisku 250-350 bar i ostvarili prinos od 1,53%, a razlog za primenu ovih uslova ekstrakcije, t.j. povišene temperature, je selektivnost superkritičnog CO₂ prema polifenolnim diterpenima (karnozinska kiselina, karnozol, epirosmanol, itd.), koji su i detetkovani u ekstraktima. Glišić i sar. (2010) su takođe poredili prinos Soxhlet ekstrakcije, superkritične ekstrakcije i destilacije vodenom parom. Prinos etarskog ulja žalfije ostvaren destilacijom vodenom parom je bio 0,5%, dok je najveći prinos SFE bio 4,28%, a ostvaren je na 300 bar i 50°C, što je u skladu sa rezultatima ovog rada, jer je najveći prinos ostvaren pri istoj temperaturi i pritisku, odnosno gustini CO₂ (Tabela 19). Fornari i sar. (2011) su izvršili superkritičnu ekstrakciju žalfije (300 bar i 40°C), ali su ekstrakte frakcionisali u dva separatora na 40°C i pritisku od 100 i 10 bar. Ostvareni Y u prvom i drugom separatoru je bio 1,39 i

3,23%, a ekstrakti su se razlikovali po hemijskom sastavu. Što se čistog etarskog ulja žalfije tiče, prinos može da varira od 0,7% (Fellah i sar., 2005) do 5,2% (Menaker i sar., 2004), a prinos etarskog ulja ostvaren u ovom radu je bio u ovom opsegu (Tabela 20).

Tabela 19. Box-Behnken eksperimentalni dizajn sa realnim i kodiranim parametrima superkritične ekstrakcije i eksperimentalno dobijene vrednosti ukupnog prinosa ekstrakcije (Y)

Redni broj	Pritisak [bar]	Temperatura [°C]	Zapreminska masa [g/cm ³]	Protok CO ₂ [kg/h]	Y [g/100 g droge; %]
1	100 (-1)	60 (1)	0,290	0,3 (0)	1,81
2	300 (1)	50 (0)	0,871	0,2 (-1)	5,66
3	200 (0)	40 (-1)	0,840	0,4 (1)	6,58
4	200 (0)	60 (1)	0,724	0,2 (-1)	5,07
5	200 (0)	40 (-1)	0,840	0,2 (-1)	5,14
6	300 (1)	60 (1)	0,830	0,3 (0)	7,82
7	100 (-1)	50 (0)	0,384	0,4 (1)	3,57
8	100 (-1)	50 (0)	0,384	0,2 (-1)	2,55
9	300 (1)	40 (-1)	0,910	0,3 (0)	6,42
10	200 (0)	60 (1)	0,724	0,4 (1)	7,48
11	200 (0)	50 (0)	0,784	0,3 (0)	5,56
12	100 (-1)	40 (-1)	0,629	0,3 (0)	2,75
13	200 (0)	50 (0)	0,784	0,3 (0)	5,68
14	200 (0)	50 (0)	0,784	0,3 (0)	5,71
15	300 (1)	50 (0)	0,871	0,4 (1)	8,83

Tabela 20. Prinos etarskog ulja i lipofilnih ekstrakata SPŽ dobijenih konvencionalnim tehnikama

Ekstrakciona tehnika	Uslovi ekstrakcije	Ekstragens	Y [%, m/m]
Destilacija vodenom parom	Temperatura ključanja (<100°C); 2 sata	-	1,80*
Soxhlet ekstrakcija	Temperatura ključanja; 15 sifoniranja	Metilen hlorid	14,68
		<i>n</i> -Heksan	10,84

* Prinos etarskog ulja je izražen kao % [v/m]

4.5.1. Provera modela

Statistički parametri (ANOVA i deskriptivna statistika) koji opisuju slaganje eksperimentalno dobijenih vrednosti Y ostvarenih superkritičnom ekstrakcijom i kvadratnog polinoma su prikazani u Tabeli 21. I u ovom slučaju su parametri deskriptivne statistike bili odgovarajući ($R^2=0,995$ i $CV=4,23\%$), a adekvatnost primenjenog modela je potvrđena Fišerovim testom za model i nedostatka prilagođavanja ($p<0,05$ i $p>0,05$). Prema tome, može se zaključiti da kvadratni polinom sa regresionim koeficijentima iz Tabele 22 može da se koristi za predviđanje vrednosti Y u okviru ispitanog eksperimentalnog domena parametara superkritične ekstrakcije (pritisak, temperatura i protok CO_2).

Tabela 21. Analiza varijanse (ANOVA) fitovanja rezultata polinomnim modelom drugog reda

Član	Suma kvadrata	df ^a	Srednji kvadrat	F-vrednost	p-vrednost
Model	55,94	9	6,22	120,43	< 0,0001
<i>Pritisak</i>	40,71	1	40,71	788,76	< 0,0001
<i>Temperatura</i>	0,21	1	0,21	4,04	0,1007
<i>Protok CO₂</i>	8,09	1	8,09	156,81	< 0,0001
<i>Pritisak × Temperatura</i>	1,38	1	1,38	26,69	0,0036
<i>Pritisak × Protok CO₂</i>	1,16	1	1,16	22,44	0,0052
<i>Temperatura × Protok CO₂</i>	0,23	1	0,23	4,46	0,0884
<i>Pritisak²</i>	3,21	1	3,21	62,27	0,0005
<i>Temperatura²</i>	$8,80 \cdot 10^{-4}$	1	$8,80 \cdot 10^{-4}$	0,017	0,9012
<i>(Protok CO₂)²</i>	0,69	1	0,69	13,44	0,0145
Rezidual	0,26	5	0,05		
Lack of fit	0,25	3	0,08	12,78	0,0735
Greška	0,013	2	$6,40 \cdot 10^{-3}$		
Ukupno	56,20	14			

^a broj stepeni slobode

4.5.2. Uticaj parametara SFE

Na Slici P13 (Prilog) prikazan je kombinovan uticaj parametara superkritične ekstrakcije na ukupan prinos ekstrakcije. Prema rezultatima ANOVA, može se uočiti da značajan uticaj na Y imaju linearni članovi pritiska i protoka CO_2 , interakcija pritisak-temperatura i pritisak-protok CO_2 , i kvadratni članovi pritiska i protoka CO_2 . Svi linearni članovi i interakcije su pokazali pozitivan uticaj, dok su kvadratni članovi imali negativan

uticaj na Y, što se može uočiti i na Slici P13 (Prilog). Pozitivan uticaj pritiska i protoka CO₂ je očekivan, dok negativan uticaj njihovih kvadratnih članova ukazuje na postizanje maksimalne vrednosti Y u okviru ispitivanog eksperimentalnog domena i dalje opadanje Y sa porastom ovih parametara. To se može i uočiti i na Slici P13 gde se maksimalna vrednost Y dostiže blizu gornjih nivoa pritiska i protoka CO₂ (300 bar i 0,4 kg/h). Pozitivan uticaj interakcije pritisak-temperatura i pritisak-protok CO₂ ukazuje na značano povećanje prinosa sa porastom temperature i protoka CO₂, kada se ekstrakcije vrše na najvišem ispitivanom nivou pritiska (300 bar).

Tabela 22. Regresioni koeficijenti fitovanja polinomnog modela drugog reda za supekritičnu ekstrakciju SPŽ

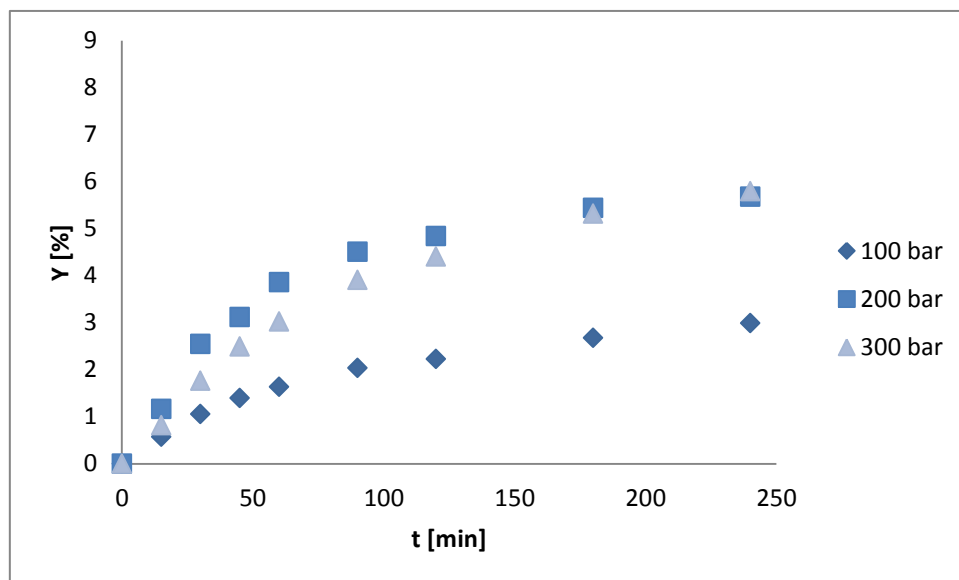
Koeficijent	Odziv
	Y
β_0	5,65*
Linearni	
β_1	2,26*
β_2	0,16
β_3	1,01*
Interakcija	
β_{12}	0,59*
β_{13}	0,54*
β_{23}	0,24
Kvadratni	
β_{11}	-0,93*
β_{22}	-0,02
β_{33}	-0,43*

* statistički značajan ($p < 0,05$)

4.5.2.1. Uticaj pritiska

U cilju detaljne analize uticaja parametara superkritične ekstrakcije izvršena su dva dodatna eksperimenta kao dopuna ekperimentima u okviru Box-Behnken eksperimentalnog dizajna (Tabela 19). Superkritična ekstrakcija SPŽ je izvršena na pritiscima od 100, 200 i 300 bar, pri konstantnim vrednostima temperature (50°C) i protoka CO₂ (0,3 kg/h), a kinetičke krive ekstrakcije su prikazane na Slici 35. Može se uočiti da Y raste od 2,99 do 5,80% sa porastom pritiska od 100 do 300 bar pri konstantnoj temperaturi (50°C) i protoku CO₂ (0,3 kg/h) za krajnje vreme ekstrakcije (240 min). Pored toga, može se uočiti da je porast prinosa

više izražen pri porastu pritiska sa 100 na 200 bar, dok pri daljem porastu pritiska ne dolazi do značajnijeg porasta prinosa ekstrakcije. Ovo je očekivano s obzirom da je gustina CO₂, koja utiče na njegovu moć rastvaranja, na temperaturi 50°C jednaka 0,384, 0,784 i 0,871 g/cm³ na pritiscima 100, 200 i 300 bar. Sličan uticaj pritiska na Y pri izoterminim uslovima su zabeležili i Glišić i sar. (2010). Prema Fornari i sar. (2012), pritisak predstavlja najvažniji procesni parametar superkritične ekstrakcije koji utiče na vrednost Y. Porast pritiska utiče na povećanje gustine CO₂, što direktno vodi do povećanja moći rastvaranja, kao i do smanjenja selektivnosti ekstrakcije. Međutim, upotreba visokog pritiska se ne preporučuje uvek, pogotovo u slučaju kada je cilj ekstrakcija aromatičnih jedinjenja sadržanih u etarskom ulju (Pourmortazavi i Hajimirsadeghi, 2007). Prema tome, ekstrakti SPŽ dobijeni na povišenim pritiscima će pored aromatičnih jedinjenja sadržavati različite smole i voskove.

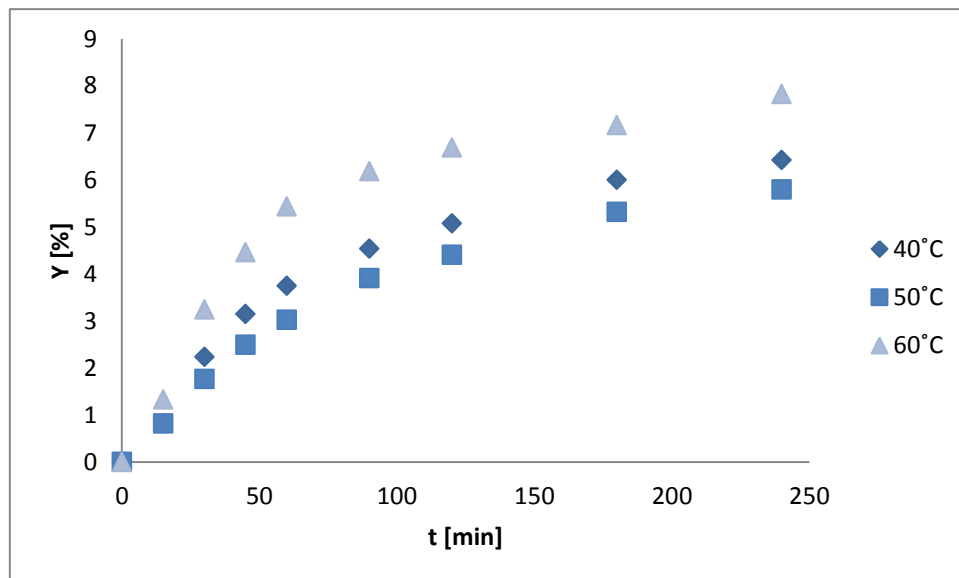


Slika 35. Uticaj pritiska na kinetiku superkritične ekstrakcije na temperaturi od 50°C i protoku CO₂ 0,3 kg/h

4.5.2.2. Uticaj temperature

Uticaj temperature na ukupan prinos SFE SPŽ je posmatran na 40, 50 i 60°C, pri konstantnom pritisku i protoku CO₂ (300 bar i 0,3 kg/h) i kinetičke krive su prikazane na Slici 36. Može se uočiti da je Y bio najveći (7,48%) na 60°C, a najmanji (5,68%) na 50°C pri izobarnim uslovima ekstrakcije. Za razliku od pritiska, uticaj temperature na Y je kompleksniji s obzirom da temperatura utiče i na osobine CO₂ i na biljni materijal. Gustina CO₂ opada sa

porastom temperature, prema tome, moć rastvaranja CO₂ se smanjuje. Sa druge strane, temperatura utiče na isparljivost jedinjenja koja se ekstrahuju, pa je teško predvideti kakav će biti krajnji ishod. Prema Pourmortazavi i Hajimirsadeghi (2007), superkritična ekstrakcija na višim temperaturama će uticati na smanjenje prinosa neisparljivih jedinjenja, i povećanje temperature utiče na kompeticiju između rastvorljivosti i isparljivosti jedinjenja. Prema tome, relativno visok prinos je ostvaren na 40°C, koji zatim opada na 50°C i ponovo raste pri porastu radne temperature na 60°C (Slika 36). Pri porastu temperature sa 40 na 50°C, gustina CO₂ opada sa 0,840 na 0,784 g/cm³ pri pritisku 300 bar, što vodi do smanjenja Y usled smanjenja moći rastvaranja CO₂. Daljim povećanjem temperature na 60°C pri konstatnom pritisku dolazi do smanjenja gustine CO₂ na 0,724 g/cm³, ali u ovom slučaju je zabeleženo povećanje Y (7,48%) (Slika 36) usled povećanja napona pare rastvorka, pa prema tome, rastvorljivost ciljanih jedinjenja zavisi od ravnoteže između gustine CO₂ i napona pare tih jedinjenja (Nađalin i sar., 2014).

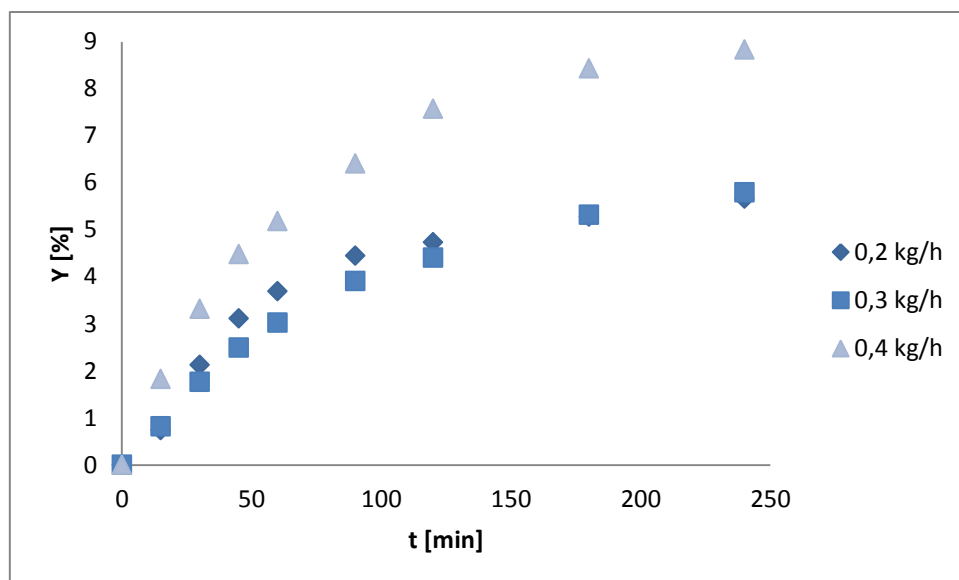


Slika 36. Uticaj temperature na kinetiku superkritične ekstrakcije na pritisku od 300 bar i protoku CO₂ 0,3 kg/h

4.5.2.3. Uticaj protoka CO₂

Uticaj protoka CO₂ (0,2, 0,3 i 0,4 kg/h) na ukupan prinos superkritične ekstrakcije SPŽ je ispitan na izoterminim-izobarnim uslovima (50°C i 300 bar) i kinetičke krive su prikazane na Slici 37. Može se uočiti da je najveći Y (8,83%) ostvaren pri najvećem ispitivanom protoku

CO₂, kao i da ne postoji značajna razlika u kinetici ekstrakcije kada se primene protoci CO₂ 0,2 i 0,3 kg/h (Slika 37). Efikasnost procesa ekstrakcije se povećava smanjenjem otpora prenosu mase, što se može postići smanjenjem srednjeg prečnika čestica biljnog materijala ili povećanjem protoka CO₂ (Fornari i sar., 2012). Međutim, povećanje protoka CO₂ dovodi do povećanja njegove potrošnje, kao i povećanja operativnih troškova, pa je i to potrebno uzeti u obzir prilikom optimizacije parametara procesa (Pereira i Meireles, 2010). Prema Papamichail i sar. (2000), veliko povećanje protoka CO₂ može da dovede do smanjenja Y usled smanjenja vremena kontakta između ekstragensa i rastvorka, kao i onemogućavanja unutrašnje difuzije. Pored toga, uticaj protoka CO₂ je neophodno povezati sa vremenom ekstrakcije, jer je sa industrijske tačke gledišta neophodno proces SFE prilagoditi da bude ekonomski isplativ, tako da je potrebno ekstrakcije vršiti dok traje period brze ekstrakcije, koji je kontrolisan rastvorljivošću ciljanih jedinjenja. Ovaj period karakteriše veći nagib ekstrakcione krive i traje oko 90 min, a nakon toga počinje period spore ekstrakcije, koji je ograničen unutrašnjom difuzijom (tzv. molekulska difuzija) jedinjenja iz biljnog materijala u superkritični CO₂, i karakteriše ga manji nagib ekstrakcione krive koja se približava stacionarnoj fazi (od 100 do 140 min) (Slika 37).



Slika 37. Uticaj protoka CO₂ na kinetiku superkritične ekstrakcije na pritisku od 300 bar i temperaturi 50°C

4.5.3. Optimizacija procesa

Optimizacija industrijskog procesa predstavlja ključan korak koji utiče na njegovu efikasnost i isplativost, prema tome neophodno je podesiti parametre superkritične ekstrakcije (pritisak, temperatura i protok CO₂) da oni obezbede najveći Y iz SPŽ. Optimizacija samog procesa je izvršena na osnovu analize eksperimentalno dobijenih vrednosti Y (Tabela 19) metodom odzivne površine. Optimizovani uslovi supekritične ekstrakcije SPŽ koji obezbeđuju maksimalan Y su prikazani u Tabeli 23. Može se uočiti da su svi optimalni parametri superkritične ekstrakcije imali vrednost blisku njihovim gornjim nivoima (300 bar, 60°C i 0,4 kg/h). U cilju potvrde predviđenih optimalnih uslova i generisanog matematičkog modela, izvršena je superkritična ekstrakcija SPŽ na optimalnim uslovima. Poređenjem eksperimentalno dobijene i predviđene vrednosti Y može se zaključiti da je eksperimentalna vrednost bila u 95% intervalu poverenja za predviđenu vrednost. Na taj način je generisan kvadratni polinom verifikovan kao odgovarajuća aproksimacija dobijenih rezultata.

Tabela 23. Optimalni parametri superkritične ekstrakcije SPŽ i predviđena maksimalna vrednost ispitivanog odziva

Optimalni uslovi	Ispitivani odziv
	Y [%]
Predviđena vrednost	8,90
Eksperimentalna vrednost	8,84
Pritisak [bar]	290
Temperatura [°C]	55
Protok CO ₂ [kg/h]	0,4

4.5.4. Hemijski sastav lipofilnih ekstrakata i etarskog ulja

Hemijski profil ekstrakata SPŽ dobijenih superkritičnom i Soxhlet ekstrakcijom, kao i etarskog ulja dobijenog destilacijom vodenom parom je određen GC-MS metodom i prikazan je u Tabelama 24 i 25. Površina pika je korišćena za određivanje relativnog udela jedinjenja u uzorcima, a hromatogrami su prikazani na Slikama P14-P31 (Prilog). Na osnovu rezultata iz Tabela 24 i 25, može se uočiti da su oksidovani monoterpeni (α -tujon i kamfor), oksidovani seskviterpeni (viridiflorol) i polifenolni diterpeni (epirosmanol) dominantna jedinjenja

prisutna u lipofilnim ekstraktima i etarskom ulju SPŽ. Pored toga, nekoliko oksidovanih monoterpena (eukaliptol, β -tujon, borneol, bornil acetat i izo-geraniol) i seskviterpenskih ugljovodonika (*trans*-kariofilen i α -humulen) su detektovani u svim superkritičnim ekstraktima sa relativnim udelom većim od 1% (Tabela 24). Ostala jedinjenja koja su detektovana u svim superkritičnim ekstraktima su monoterpensi ugljovodonici (β -mircen, α -terpinen, *p*-cimen, limonen, γ -terpinen i dehidro-*p*-cimen), oksidovani monoterpeni (*cis*-linalool oksid, mentol, 4-terpineol, timol i karvakrol), seskviterpensi ugljovodonici (γ -kariofilen, aromadendren, leden i kariofilen) i oksidovani seskviterpeni (kariofilen oksid i humulen oksid), međutim, sa relativno niskim relativnim udelom (Tabela 24). Sličan hemijski profil je dobijen u superkritičnim ekstraktima žalfije pri izotermnim uslovima (50°C) na različitim pritiscima (70, 100, 150, 200 i 300 bar) (Glišić i sar., 2010), dok je superkritičnom ekstrakcijom na 90 bar i 50°C (Aleksovski i Sovová, 2007) i na 150 bar i 40°C zabeležen znatno niži udeo viridiflorola i epirosmanola (Maksimović i sar., 2013).

U etarskom ulju i Soxhlet ekstraktima SPŽ je identifikovano znatno manje jedinjenja u odnosu na superkritične ekstrakte (Tabela 25). Međutim, kao i u slučaju superkritične ekstrakcije, slična jedinjenja su sa najvećim relativnim udelom detektovana i u ovim uzorcima (α -tujon, β -tujon, kamfor, eukaliptol, borneol, viridiflorol i epirosmanol). Prema literaturnim navodima, oksidovani monoterpeni (eukaliptol, α -tujon, β -tujon i kamfor) predstavljaju jedinjenja sa najvećim ukupnim udelom u etarskom ulju žalfije (\approx 70%) (Aleksovski i Sovová, 2007; Glišić i sar., 2010; Maksimović i sar., 2013; Gaňán i sar., 2013; Occhipinti i sar., 2014). Prema Glišić i sar. (2010), polifenolni diterpeni i triterpeni predstavljaju dominantna jedinjenja u Soxhlet ekstraktima dobijenim korišćenjem 70% etanola kao ekstragensa, što je i očekivano s obzirom na znatno veću polarnost primenjenog ekstragensa u poređenju sa metilen hloridom i *n*-heksanom korišćenim u ovom radu. Korišćenjem *n*-heksana kao ekstragensa dobijen je veći udeo monoterpena u ekstraktima, dok je relativni udeo epirosmanola znatno niži (5,48%) u poređenju sa ekstraktom dobijenim metilen hloridom (22,77%) (Tabela 25), što ukazuje na bolju selektivnost polarnijeg rastvarača za ekstrakciju polifenolnih diterpena.

Tabela 24. Relativni udeo detektovanih jedinjenja u supekritičnim ekstraktima SPŽ

Jedinjenje	t_R^a [min]	Relativni udeo [%]															
		SFE-1	SFE-2	SFE-3	SFE-4	SFE-5	SFE-6	SFE-7	SFE-8	SFE-9	SFE-10	SFE-11	SFE-12	SFE-13	SFE-14	SFE-15	
1	β -Miracen	4,460	0,05	0,05	0,07	0,04	0,07	0,06	0,03	0,05	0,06	0,06	0,06	0,04	0,05	0,05	0,07
2	α -Terpinen	5,067	0,01	0,09	0,08	0,08	0,09	0,10	0,04	0,03	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,10
3	<i>p</i> -Cimen	5,283	0,27	0,25	0,25	0,21	0,31	0,28	0,19	0,25	0,28	0,28	0,26	0,23	0,24	0,23	0,31
4	Limonen	5,341	0,26	0,31	0,42	0,31	0,51	0,42	0,32	0,34	0,44	0,45	0,46	0,36	0,40	0,38	0,50
5	Eukaliptol	5,420	3,89	5,46	6,15	4,47	5,82	5,43	3,43	4,50	5,70	5,51	5,41	4,16	4,93	4,82	6,14
6	γ -Terpinen	6,106	0,02	0,06	0,07	0,06	0,07	0,08	0,04	0,04	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,09
7	<i>cis</i> -Linalool oksid	6,556	0,07	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,04	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,04	0,06
8	Dehidro- <i>p</i> -cimen	6,997	0,10	0,07	0,09	0,08	0,10	0,09	0,07	0,10	0,09	0,08	0,09	0,09	0,08	0,08	0,09
9	α -Tujon	7,487	10,52	8,99	9,70	8,19	10,02	8,79	8,46	11,00	9,29	9,10	9,36	9,48	8,98	9,82	9,41
10	β -Tujon	7,781	3,15	2,68	2,98	2,44	2,95	2,79	2,56	3,31	2,88	2,72	2,91	2,97	2,59	8,38	2,92
11	Kamfor	8,643	15,86	12,77	14,40	12,99	14,49	13,30	11,44	15,97	13,79	13,74	14,27	13,39	13,99	12,73	14,03
12	Borneol	9,480	5,99	4,22	4,23	4,20	4,29	4,08	4,65	4,97	4,09	4,15	4,14	4,72	4,29	3,88	4,13
13	Mentol	9,653	0,14	0,11	0,12	0,13	0,14	0,12	0,19	0,15	0,06	0,11	0,08	0,17	0,09	0,11	0,08
14	4-Terpineol	9,689	0,35	0,26	0,26	0,21	0,26	0,25	0,26	0,33	0,21	0,21	0,23	0,28	0,19	0,25	0,22
15	Karvotanaceton	11,826	n.d. ^b	n.d.	0,06	0,04	0,05	0,08	n.d.	n.d.	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,08
16	<i>trans</i> -Geraniol	12,191	0,07	n.d.	0,06	0,06	n.d.	0,07	0,07	0,08	0,06	0,06	0,04	0,05	0,06	0,05	0,07
17	Bornil acetat	12,861	2,16	1,44	1,46	1,48	1,50	1,40	1,51	1,94	1,43	1,47	1,51	1,57	1,53	1,36	1,45
18	Kamfen	13,123	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,14	0,16	0,11	0,12	0,13	0,14	0,12	0,11	0,13
19	Timol	14,111	0,42	0,37	0,39	0,33	0,34	0,63	0,41	0,39	0,38	0,37	0,34	0,51	0,19	0,30	0,53
20	Karvakrol	14,400	0,17	0,16	0,14	0,13	0,16	0,20	0,18	0,14	0,14	0,13	0,13	0,19	0,15	0,13	0,16
21	γ -Kariofilen	16,531	0,09	0,11	0,11	0,12	0,11	0,10	0,10	0,11	0,10	0,11	0,10	0,10	0,09	0,09	0,14
22	<i>trans</i> -Kariofilen	16,942	2,81	1,81	1,85	1,86	1,90	1,75	1,66	2,27	1,77	1,83	1,97	1,77	1,80	1,71	1,76
23	Aromadendren	17,530	0,15	0,14	n.d.	0,14	0,14	0,15	0,12	0,14	0,12	0,14	0,07	0,09	0,12	0,12	0,11
24	α -Humulen	18,009	4,15	3,05	3,10	3,37	3,18	2,99	2,50	3,49	2,90	3,15	3,30	2,83	3,08	2,91	2,94

25	Leden	19,240	0,62	0,45	0,45	0,49	0,48	0,44	0,54	0,59	0,42	0,44	0,45	0,48	0,43	0,39	0,47
26	Kariofilen oksid	21,927	0,39	0,31	0,37	0,39	0,37	0,49	0,41	0,48	0,47	0,45	0,48	0,50	0,52	0,46	0,40
27	Viridiflorol	22,386	18,64	17,07	16,85	16,97	15,97	16,96	18,64	15,58	16,58	16,79	16,59	17,55	16,91	15,48	16,29
28	Ledol	22,586	n.d.	0,08	0,08	n.d.	0,10	0,13	0,16	0,15	0,08	0,08	0,10	0,07	0,07	0,11	0,11
29	Humulen oksid	22,720	0,52	0,39	0,47	0,47	0,42	0,61	0,48	0,53	0,46	0,38	0,39	0,46	0,35	0,35	0,45
30	izo-Geraniol	24,262	1,41	1,62	1,54	1,68	1,53	1,70	1,76	1,32	1,61	1,56	1,51	1,56	1,57	1,43	1,58
31	Kariofilen	24,690	0,61	0,76	0,71	0,76	0,68	0,79	0,84	0,57	0,73	0,73	0,70	0,71	0,71	0,65	0,70
32	Epirosmanol	34,120	12,84	21,60	20,64	21,90	19,61	19,63	22,70	15,97	20,76	21,70	20,60	21,92	21,59	20,08	20,30
33	Fitol	35,324	n.d.	n.d.	n.d.	0,39	0,33	n.d.	0,44	0,44	0,44	0,41	0,31	0,48	0,25	0,30	0,31
34	Feruginol	40,274	n.d.	n.d.	n.d.	0,78	n.d.	n.d.	0,42	0,32	0,81	0,69	1,01	0,60	0,89	0,81	1,18
	Ukupno		85,73	84,72	87,14	84,82	86,03	83,96	84,8	85,77	86,51	87,26	87,24	87,7	86,47	87,78	87,31

^a retenciono vreme [min],

^b nije detektovano.

Tabela 25. Relativni udeo jedinjenja detektovanih u etarskom ulju i Soxhlet ekstraktima SPŽ

Jedinjenje	t_R^a [min]	Relativni udeo [%]		
		EU ^b	SOX-MeCl ^c	SOX-Hex ^d
1 Limonen	5,341	0,36	0,38	0,82
2 Eukaliptol	5,420	3,30	4,46	11,84
3 α -Tujon	7,487	5,26	7,76	16,36
4 β -Tujon	7,781	4,09	2,88	3,25
5 Kamfor	8,643	12,74	14,05	23,57
6 Borneol	9,480	3,28	3,15	4,68
7 Mentol	9,653	n.d. ^e	n.d.	0,22
8 Bornil acetat	11,513	1,26	1,24	1,69
9 Timol	14,111	1,61	1,93	0,29
10 Karvakrol	14,400	0,95	1,48	0,11
11 <i>trans</i> -Kariofilen	16,942	1,62	1,12	0,84
12 α -Humulen	18,009	3,62	2,84	1,43
13 Kariofilen oksid	21,927	0,42	0,60	0,16
14 Viridiflorol	22,386	18,42	17,55	22,45
15 Epirosmanol	34,120	26,25	22,77	5,48
16 Fitol	35,324	n.d.	1,51	0,28
17 Feruginol	40,274	1,81	1,46	n.d.
Ukupno		85,01	85,16	93,46

^a retenciono vreme [min],

^b etarsko ulje dobijeno destilacijom vodenom parom,

^c Soxhlet ekstrakt dobijen metilen hloridom,

^d Soxhlet ekstrakt dobijen *n*-heksanom,

^e nije detektovano.

Na osnovu rezultata iz Tabele 24 može se zaključiti da se hemijski sastav superkritičnih ekstrakata ne menja značajno u zavisnosti od primenjenih eksperimentalnih uslova (pritiska, temperature i protoka CO₂). Međutim, GC-MS analiza i relativni procenat detektovanih jedinjenja nije dovoljan kvantitativni pokazatelj ove promene. Prema tome, GC-FID analizom je određen sadržaj monoterpena (limonen, eukaliptol, γ -terpinen, linalool, α -terpineol, metil-havikol, geraniol, karvakrol, α -pinen, β -pinen, kamfor, eugenol i α -tujon) u supekritičnim ekstraktima, etarskom ulju i lipofilnim ekstraktima dobijenim Soxhlet ekstrakcijom (Tabela P32; Prilog). Na osnovu sadržaja detekovanih jedinjenja u ekstraktima i ukupnog prinosa ekstrakcije je izračunat prinos dominantnih monoterpena (limonen, eukaliptol, α -terpineol, karvakrol, kamfor i α -tujon) izražen u mg/100 g droge (Tabela 26). Kao i u slučaju ukupnog prinosa ekstrakcije, izvršena su dva dodatna eksperimenta kao dopuna ekperimentima Box-Behnken eksperimentalnog dizajna (Tabela 19), kao i analiza

uzorka dobijenog na optimalnim uslovima (290 bar, 55°C, 0,4 kg CO₂/h), u cilju detaljne analize uticaja parametara superkritične ekstrakcije. Na osnovu rezultata iz Tabele 26, može se uočiti da su eukaliptol (34,75 – 233,38 mg/100 g droge), kamfor (174,67 – 614,11 mg/100 g droge) i α -tujon (122,90 – 489,19 mg/100 g droge) dominantna jedinjenja prisutna u ispitivanim ekstraktima. Najniži prinos sva tri jedinjenja je zabeležen u uzorku SFE-1 (100 bar, 60°C, 0,3 kg CO₂/h), dok je najveći prinos dobijen u uzorku SFE-10 (200 bar, 60°C, 0,4 kg CO₂/h), ukazujući da prinos raste sa porastom pritiska i protoka CO₂ pri izotermnim uslovima. U slučaju eukaliptola, prinos Soxhlet ekstrakcijom sa metilen hloridom je bio najveći (309,75 mg/100 g droge), dok je u slučaju prinosa ostalih jedinjenja, kao i prinos ukupnih monoterpena bio najveći u uzorcima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom (SFE-4, SFE-7, SFE-10, SFE-11, SFE-13, SFE-14, SFE-15 i SFE-18) (Tabela 26). Ovo ukazuje na prednost savremene ekstrakcione tehnike u odnosu na konvencionalne u pogledu prinosa ekstrakcije terpena, kao što je bio slučaj i pri ekstrakciji polifenolnih jedinjenja. Što se ostalih monoterpena tiče, njihov prinos ostvaren superkritičnom ekstrakcijom je bio 2,72 – 21,69, 6,15 – 21,69 i 5,61 – 27,37 mg/100 g droge za limonen, α -terpineol i karvakrol. Samo u slučaju limonena, najveći prinos je ostvaren destilacijom vodenom parom (23,22 mg/100 g droge), dok je kod α -terpineola i karvakrola superkritična ekstrakcija pokazala prednost nad destilacijom vodenom parom i Soxhlet ekstrakcijom u pogledu prinosa (Tabela 26).

Uticaj parametara SFE (pritiska, temperature i protoka CO₂) na prinos eukaliptola, kamfora i α -tujona je prikazan na Slici 38. Kod sva tri jedinjenja je zabeleženo povećanje prinosa pri povećanju pritiska sa 100 na 200 bar, dok dalje povećanje pritiska (300 bar) dovodi do smanjenja prinosa. To je posledica povećanja gustine CO₂ (0,384, 0,784 i 0,871 g/cm³) pri promeni pritiska od 100, 200 i 300 bar, što direktno utiča na selektivnost ekstragensa. Prema tome, selektivnost CO₂ prema monoterpenima je pri izotermnim uslovima (50°C) najveća na 200 bar (0,784 g/cm³), dok dalje povećanje pritiska, t.j. gustine CO₂, dovodi do povećanja rastvorljivosti većih molekula i smanjenja selektivnosti prema monoterpenima (Glišić i sar., 2010). U slučaju uticaja temperature, zabeleženo je smanjenje prinosa eukaliptola, kamfora i α -tujona pri povećanju temperature sa 40 na 50°C pri izobarnim uslovima (300 bar), što se može objasniti smanjenjem gustine CO₂, a samim tim i smanjenja moći rastvaranja CO₂ (Slika 39). S obzirom da su monoterpeni lako isparljiva jedinjenja, dalje povećanje temperature (60°C) dovodi do povećanja prinosa ispitivanih

jedinjenja usled povećanja njihovog napona pare (Lang i Wai, 2001). Slična promena prinosa eukaliptola, kamfora i α -tujona je zabeležena i sa porastom protoka CO₂ pri konstantnom pritisku i temperaturi (Slika 40). Do smanjenja prinosa ispitivanih jedinjenja sa povećanjem protoka sa 0,2 na 0,3 kg/h potencijalno dolazi usled smanjenja vremena kontakta između ekstragensa i rastvorka, odnosno onemogućavanja unutrašnje difuzije, dok je dalje povećanje prinosa sa porastom protoka na 0,4 kg/h uslovljeno povećanjem koncentracionog gradijenta konstantnim dovođenjem svežeg rastvarača. Međutim, to uslovljava i veću potrošnju CO₂, pa je sa ekonomskog aspekta racionalno ekstrakcije vršiti na nižem protoku (0,2 kg/h).

Tabela 26. Prinos monoterpena u etarskom ulju i lipofilnim ekstraktima SPŽ dobijenim superkričnom i Soxhlet ekstrakcijom

Uzorak	Prinos [mg/100 g droge]						
	Limonen	Eukaliptol	α -Terpineol	Karvakrol	Kamfor	α -Tujon	Σ MT ^a
SFE-1	2,72	34,75	6,15	5,61	174,67	122,90	346,80
SFE-2	12,45	160,18	14,72	14,72	435,82	331,11	968,99
SFE-3	13,82	159,89	16,45	20,40	398,75	310,58	919,88
SFE-4	11,66	171,37	18,76	15,72	533,36	400,02	1.150,89
SFE-5	11,82	142,38	13,36	12,85	386,01	312,51	878,94
SFE-6	10,95	141,54	16,42	22,68	353,46	281,52	826,57
SFE-7	11,07	137,09	19,28	11,07	489,45	423,40	1.091,35
SFE-8	6,63	81,09	10,97	6,12	310,59	256,02	671,42
SFE-9	13,48	161,14	16,69	19,26	409,60	330,63	957,86
SFE-10	21,69	233,38	21,69	17,95	614,11	489,19	1.405,49
SFE-11	13,90	166,24	15,57	16,12	460,92	363,07	1.041,39
SFE-12	7,95	84,94	11,23	8,77	285,78	242,49	644,72
SFE-13	13,06	159,04	17,04	14,20	472,58	369,77	1.051,94
SFE-14	14,85	186,72	18,84	14,28	523,61	416,83	1.181,40
SFE-15	15,01	193,38	21,19	27,37	467,99	378,81	1.112,58
SFE-16 ^b	6,96	92,22	12,76	18,56	240,70	186,18	557,38
SFE-17 ^c	6,88	66,38	11,36	7,18	258,93	220,96	571,69
SFE-18 ^d	19,49	214,41	21,26	24,81	501,48	416,42	1.206,73
EU	23,22	186,12	<1	4,32	319,32	305,28	838,26
Soxhlet-MeCl	13,21	309,75	<1	<1	447,74	248,09	1.018,79
Soxhlet-Hex	11,92	214,63	<1	<1	336,04	131,16	693,76

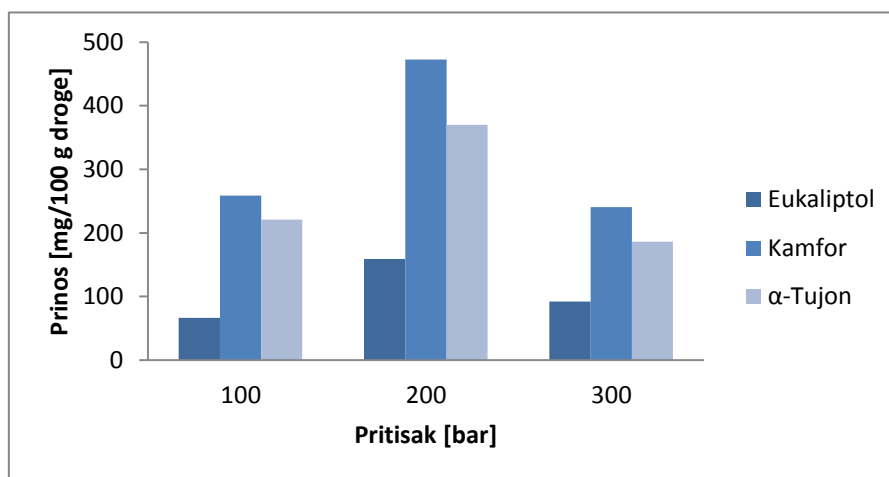
^a ukupno monoterpena,

^b 300 bar, 50°C, 0,3 kg CO₂/h,

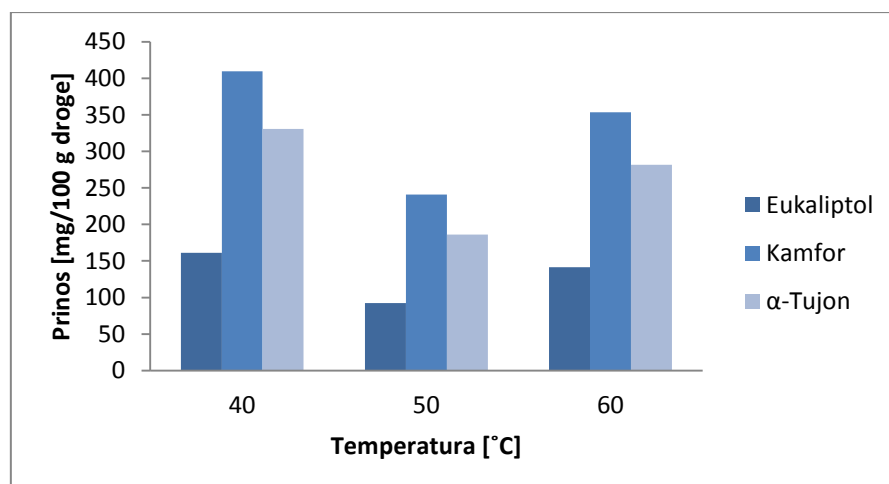
^c 100 bar, 50°C, 0,3 kg CO₂/h,

^d 290 bar, 55°C, 0,4 kg CO₂/h (optimalni uslovi).

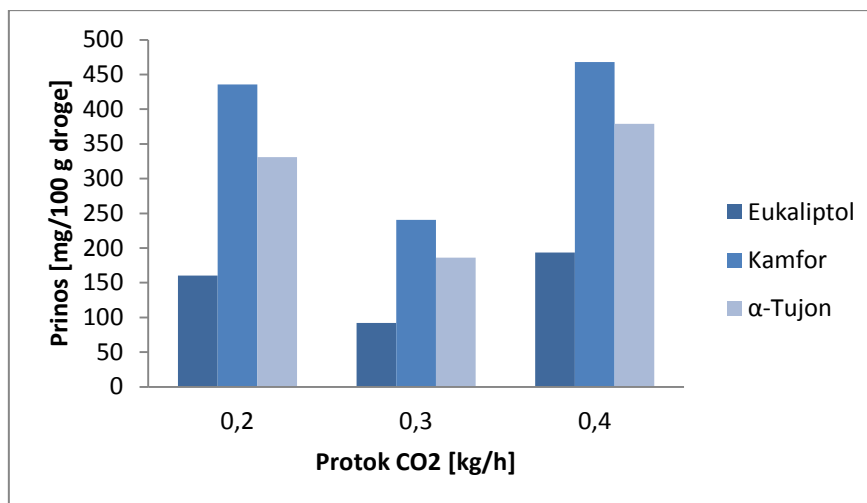
Promena prinosa „sporednih“ monoterpena (limonen, α -terpineol i karvakrol) u zavisnosti od primenjenih ekstrakcionih parametara je prikazana na Slikama P33-P35 (Prilog). U slučaju limonena i α -terpineola promena prinosa u zavisnosti od pritiska i temperature je bila slična kao kod dominantnih monoterpena, dok je u slučaju karvakrola zabeleženo konstantno povećanje prinosa sa porastom pritiska, odnosno gustine CO₂ (Slika P33; Prilog), kao i sa povećanjem protoka CO₂ (Slika P35; Prilog). Što se uticaja temperature tiče, sličan trend je zapažen kod promene prinosa, kako „sporednih“, tako i dominantnih monoterpena (Slika P34; Prilog).



Slika 38. Uticaj pritiska na prinos ekstrakcije dominantnih monoterpena pri konstantnoj temperaturi (50°C) i protoku CO₂ (0,3 kg/h)



Slika 39. Uticaj temperature na prinos ekstrakcije dominantnih monoterpena pri konstantnom pritisku (300 bar) i protoku CO₂ (0,3 kg/h)



Slika 40. Uticaj protoka CO₂ na prinos ekstrakcije dominantnih monoterpena pri konstantnom pritisku (300 bar) i temperaturi (50°C)

4.6. *Spray drying*

Tečni ekstrakti su osetljivi na faktore sredine, pa vrlo često može doći do degradacije bioaktivnih jedinjenja usled prisustva vode, svetlosti ili kiseonika. Prema tome, neophodno je prevesti tečne ekstrakte u suvi oblik kojeg karakteriše veća stabilnost (Munin i Edwards-Levy, 2011), lakša primena, standardizacija, transport i lagerovanje (Oliveira i sar., 2006). Kao prednosti suvih ekstrakata navode se i bolja prihvatljivost kod potrošača i laka rastvorljivost, a dobijeni prahovi se dalje mogu lako dodati kako u prehrambene proizvode, tako i u čvrste farmaceutske oblike (tablete i kapsule), koji predstavljaju najčešće korišćene forme lekova i dijetetskih suplemenata (Leuenberger i Lanz, 2005). Prema tome, ekstrakti SPŽ dobijeni konvencionalnim (maceracija i destilacija vodenom parom) i savremenim (ultrazvučna, mikrotalasna i ekstrakcija subkritičnom vodom) na prethodno optimizovanim uslovima su korišćeni kao napojna smeša za *spray drying* i dobijanje suvih ekstrakata (prahova) SPŽ.

4.6.1. Karakterizacija napojne smeše

U napojnim smešama, t.j. tečnim ekstraktima SPŽ, su prvobitno određeni sadržaj ukupnih rastvorenih materija (URM), UF, UFI i Y. Prema rezultatima iz Tabele 27, može se uočiti da se najveći Y (35,62%) dobija ekstrakcijom subkritičnom vodom, što je i očekivano, s obzirom na parametre procesa (voda pod pritiskom i povišena temperatura) koji dovode do oštećenja ćelijske strukture biljnog materijala i omogućavaju olakšanu difuziju iz čvrste u tečnu fazu (Mustafa i Turner, 2011). Dalje, Y koji je dobijen ekstrakcijom subkritičnom

vodom je bio manji u odnosu na Y koji se dobija na laboratorijskom postrojenju (Pavlić i sar., 2016). Napojna smeša za sušenje raspršivanjem je pripravljena na optimalnim uslovima za laboratorijski ekstraktor, a ekstrakcija je izvršena na pilot postrojenju, što je dovelo do značajnog produžetka faze zagrevanja i hlađenja u procesu ekstrakcije. Sa druge stranem, najniži Y (28,82%) je ostvaren maceracijom. Ova ekstrakciona tehnika zahteva najveću potrošnju vremena (5 dana), međutim, ekstrakcija se izvodi na sobnoj temperaturi (*Ph. Jug.* IV). Sve druge tehnike su izvedene na povišenoj temperaturi, što je dovelo do značajnog povećanja Y. URM u tečnim ekstraktima SPŽ je bio od 12,91 do 35,62 mg/mL. Određivanje ove vrednosti je ključno, s obzirom da može značajno uticati na fizičko-hemijske parametre suvih ekstrakata dobijenih spray drying tehnikom (Couto i sar., 2012). U slučaju sadržaja polifenola, najveći UF i UFI su zabeleženi u ekstraktu dobijenom subkritičnom vodom, dok je najniži sadržaj bio u postdestilacionom ostatku. Sa druge strane, prinos UF dobijen primenjenim ekstrakcionim tehnikama je bio 7,90, 9,83, 10,57, 6,90 i 6,75 g GAE/100 g droge (Tabela 27). Najveći prinos UF i UFI je dobijen mikrotalasnom ekstrakcijom. UF i UFI dobijeni ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom su bili u skladu sa predviđenim vrednostima koji se dobijaju na optimalnim uslovima.

Tabela 27. Karakterizacija napojnih smeša dobijenih različitim ekstrakcionim tehnikama

Uzorak	Ekstrakciona tehnika	Y [%]	URM [mg/mL]	UF [mg GAE/mL]	UFI [mg CE/mL]	TP/TF
MAC	Č/T ekstrakcija (maceracija)	25,82	12,91	3,95	2,71	1,46
UAE	Ultrazvučna ekstrakcija	30,44	15,22	4,92	2,86	1,72
MAE	Mikrotalasna ekstrakcija	32,18	16,09	5,29	3,37	1,57
SWE	Ekstrakcija subkritičnom vodom	35,62	35,62	6,90	4,57	1,51
PHD	Destilacija vodenom parom (postdestilacioni ostatak)	31,38	15,69	3,38	2,22	1,52

4.6.2. Biohemijske karakteristike suvih ekstrakata

4.6.2.1. Sadržaj polifenola

Glavni problem koji se javlja kod primene biljnih ekstrakata je nedostatak odgovarajućih procedura za standardizaciju sadržaja aktivnih principa. S obzirom da su

polifenolna jedinjenja okarakterisana sa velikim bioaktivnim potencijalom, neophodno je odrediti njihov sadržaj u ekstraktima koji će se dalje inkorporirati u farmaceutske formulacije, dijetetske suplemente ili funkcionalnu hranu. Sadržaj UF, UFI i rozmarinske kiseline (RK) u suvim ekstraktima SPŽ sa i bez dodatka nosača su dati u Tabeli 28. Najveći sadržaj UF (290,28 mg GAE/g) je zabeležen u UAE uzorku, dok je najniži (90,20 mg GAE/g) bio u PHD ekstraktu. U naučnoj literaturi nema podataka u dobijanju suvih ekstrakata *S. officinalis* tehnikom *spray drying*. Međutim, ruzmarin je biljka veoma slična žalfiji u pogledu sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti, i prema Couto i sar. (2012), sadržaj UF u ekstraktima ruzmarina dobijenim maceracijom i osušeni *spray drying* tehnikom je bio od 132 do 174 mg GAE/g. S obzirom da su svi ekstrakti osušeni pod istim uslovima, UF je direktno povezan sa primenjenom ekstrakcionom tehnikom korišćenom za dobijanje napojne smeše, kao i sa dodatkom nosača. Prema Şahin-Nadeem i sar. (2013), UF u ekstraktima *Salvia fruticosa* dobijenim *spray drying* tehnikom je bio od 132,8 do 297,2 mg/g, slično kao i u suvim ekstraktima SPŽ. UF je u ekstraktima sa dodatkom maltodekstrina (20%) bio niži u odnosu na uzorke bez dodatka nosača, što je i očekivano s obzirom na dodatak nosača utiče na smanjenje koncentracije aktivnih principa u ekstraktima. Može se uočiti da su MAC, UAE i MAE suvi ekstrakti sa relativno visokim sadržajem polifenola (Tabela 28). Međutim, neophodno je razmotriti i ukupan prinos ekstrakcije (Tabela 27) koji je bio najmanji u slučaju maceracije. Iako maceracija obezbeđuje dobijanje prahova sa visokim sadržajem UF, ukupan prinos polifenola će biti manji u odnosu na UAE i MAE uzorke. Ovo ukazuje na prednosti upotrebe savremenih u odnosu na konvencionalne ekstrakcione tehnike. Relativno mali sadržaj UF u SWE i PHD ekstraktima može da se objasni upotrebom vode kao rastvarača, koja poseduje nisku selektivnost prema polifenolnim jedinjenjima u poređenju sa smešama etanol-voda korišćenim u uzorcima MAC, UAE i MAE. Međutim, s obzirom na visok Y kod SWE uzorka (35,62%), ovom tehnikom će biti dobijen zadovoljavajući prinos UF u suvim ekstraktima, ali će njihov sadržaj biti razblažen balasnim materijama koje se vodom ekstrahuju u početnom koraku Č/T ekstrakcije.

Sa druge strane, najveći sadržaj UFI (154,88 mg CE/g) je zabeležen u ekstraktu dobijenom maceracijom, a najniži (56,98 mg CE/g) u SWE uzorku sa dodatkom maltodekstrina. I u ovom slučaju je UFI u MAC, UAE i MAE uzorcima bio značano veći u odnosu na SWE i PHD ekstrakte (Tabela 28). To ponovo ukazuje na izvesne prednosti UAE i

MAE uzoraka, s obzirom na visok sadržaj UFI i ukupan prinos ekstrakcije (Tabela 27). Pored prednosti u pogledu prinosa, ove dve tehnike pružaju značajno manju potrošnju vremena, jer je vreme ekstrakcije u ova dva slučaja bilo 80 i 18,7 min. UFI je u ekstraktima ružmarina dobijenim *spray drying* tehnikom bio od 46 do 76,4 mg/g (Couto i sar., 2012), što je značajno manje u odnosu na ekstrakt SPŽ (154,88 mg CE/g) dobijen na sličan način. Što se sadržaja RK tiče, slična je raspodela kao i u slučaju UF i UFI. Ponovo je UAE uzorak pokazao najbolje karakteristike u pogledu sadržaja RK (42,01 i 42,11 mg/g), dok je najmanji sadržaj zabeležen u SWE uzorcima (3,04 i 3,16 mg/g). Do malog sadržaja RK u SWE uzorcima je došlo usled degradacije derivata hidrokisicimetne kiseline na povišenoj temperaturi koja je primenjena u ekstrakciji subkritičnom vodom (200°C). Međutim, prethodno je zabeleženo da u takvoj sredini, pored degradacije polifenola, može da dođe do transformacije i do nastajanja novih jedinjenja sa izuzetno visokom antioksidativnom aktivnošću (Zeković i sar., 2014; Zeković i sar., 2016).

Tabela 28. Sadržaj UF, UFI i RK u suvim ekstraktima SPŽ dobijenim *spray drying* tehnikom

Uzorak	MD* [%]	UF [mg GAE/g]	UFI [mg CE/g]	RK [mg/g]
MAC	0	280,35 ± 5,24 ^a	154,88 ± 1,33 ^a	40,64 ± 0,89 ^b
MAC-20	20	226,90 ± 4,00 ^b	133,55 ± 1,69 ^b	37,08 ± 0,54 ^c
UAE	0	290,28 ± 2,31 ^c	147,70 ± 2,24 ^c	42,01 ± 0,75 ^a
UAE-20	20	281,88 ± 1,57 ^d	135,41 ± 1,32 ^d	42,11 ± 0,36 ^a
MAE	0	254,43 ± 2,51 ^c	150,07 ± 1,69 ^a	40,68 ± 0,74 ^b
MAE-20	20	210,79 ± 2,80 ^e	119,41 ± 1,80 ^b	36,66 ± 0,87 ^c
SWE	0	106,26 ± 2,68 ^f	58,97 ± 1,02 ^e	3,16 ± 0,63 ^e
SWE-20	20	91,35 ± 1,72 ^g	56,98 ± 1,00 ^f	3,04 ± 0,37 ^e
PHD	0	106,59 ± 1,52 ^h	74,02 ± 0,98 ^g	17,78 ± 0,91 ^d
PHD-20	20	90,20 ± 1,58 ⁱ	59,87 ± 0,44 ^h	17,16 ± 0,53 ^d

Vrednosti obeležene istim slovom u koloni nisu značajno različite na 5% (Tukey's test),

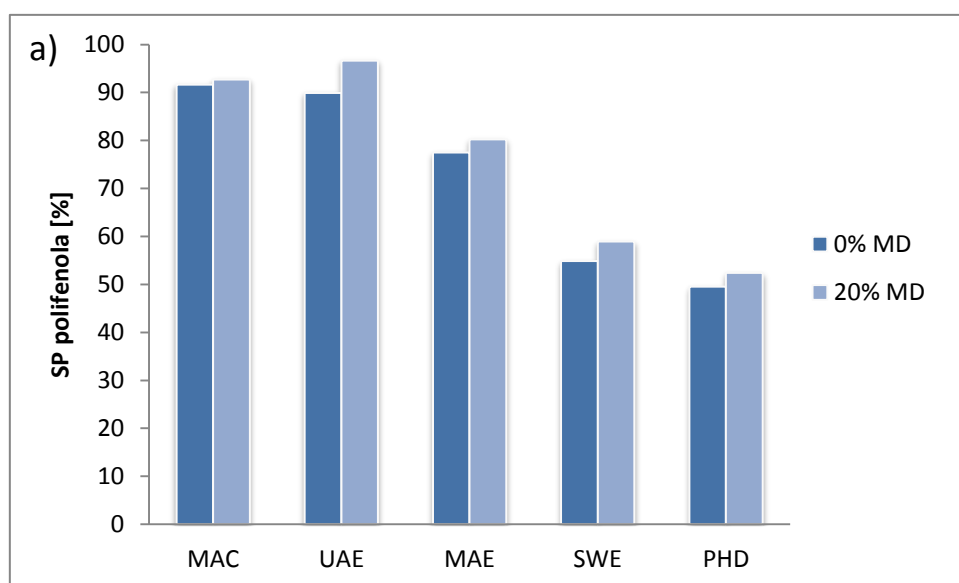
* koncentracija maltodekstrina [%].

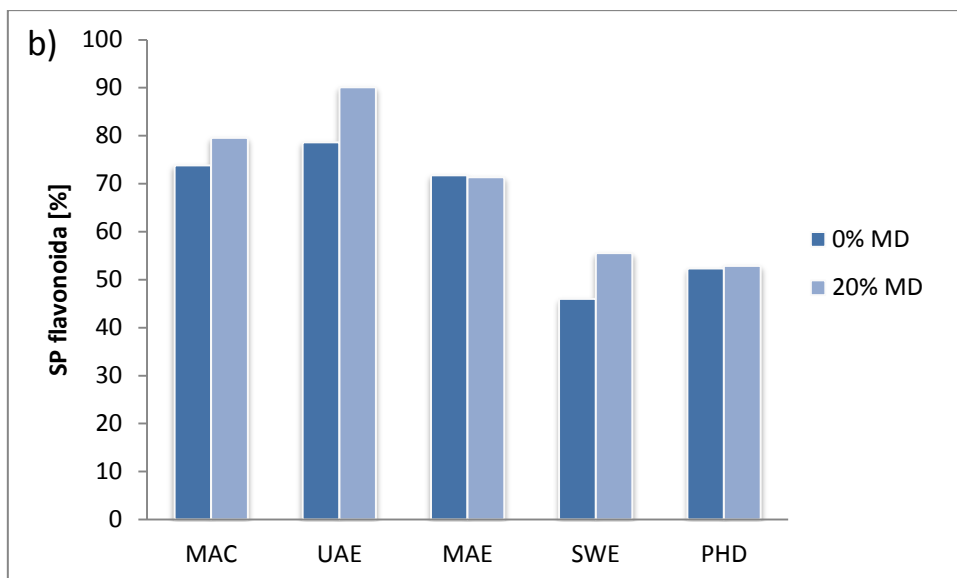
U cilju određivanja stepena degradacije polifenola, stepen prezervacije (SP) je izračunat iz sledeće jednačine (Shofinita i Langrish, 2014):

$$SP [\%] = \frac{UF_{se}}{UF_{te}} 100 \quad (9)$$

gde je UF_{se} sadržaj ukupnih fenola u suvom ekstraktu, a UF_{te} sadržaj u tečnom ekstraktu. Na isti način je izračunat SP za flavonoide koristeći UFI u suvom i tečnom ekstraktu. SP

polifenola i flavonoida zabeležen u suvim ekstraktima SPŽ dobijenih *spray drying* tehnikom je prikazan na Slici 41. SP polifenola je bio najveći kod uzorka UAE-20 (96,62%), a najmanji u uzorku PHD (49,55%). Sličan slučaj je bio i kod SP flavonoida, s obzirom da je najveći SP (90,08%) zabeležen u istom uzorku, dok je najmanji SP bio u uzorku SWE (49,55%). Prema Souza i sar. (2008), tokom *spray drying* procesa dolazi do degradacije polifenolnih jedinjenja usled oksidativne kondenzacije i toplotne degradacije indukovane visokom temperaturom. Međutim, pored pozitivnog efekta na stabilnost suvih ekstrakata, dodatak nosač utiče i na smanjenje degradacije ciljanih jedinjenja tokom procesa *spray drying* (Krishnaiah i sar., 2014). Na Slici 41 se može uočiti da je SP polifenola i flavonoida bio veći kada je maltodekstrin korišćen kao nosač, što ukazuje na sposobnost maltodekstrina da smanji toplotnu degradaciju ovih jedinjenja. To je u skladu sa literaturnim navodima, jer je prethodno zabeleženo da maltodekstrin ima bolje protektivne sposobnosti od drugih nosača kao što su izolat sojinog proteina i proteina graška (Moreno i sar., 2016). SP je bio u korelaciji sa ekstragensom koji je primenjen u početnom koraku Č/T ekstrakcije, opadajući sa povećanjem udela vode u ekstragensu. Najveći SP je zabeležen u MAC i UAE uzorcima (60% etanol), zatim u MAE (45% etanol), dok je najniži bio u SWE i PHD uzorcima, gde je kao ekstragens korišćena voda. Ovo se može objasniti povećanjem temperature ključanja kada se kao rastvarač koristi voda, što znači da je temperatura veća u procesu *spray drying*, a samim tim i stepen degradacije određenih polifenola i flavonoida.





Slika 41. SP a) ukupnih polifenola i b) ukupnih flavonoida u suvim ekstraktima SPŽ sa i bez dodatka maltodekstrina

4.6.2.2. Antioksidativna aktivnost

Usled specifične strukture i sposobnosti da reaguju kao „hvatači“ slobodnih radikala, konzumiranje hrane bogate polifenolima, kao što su crna čokolada, masline, zeleni čaj, crveno vino, bobičasto voće i lekovito bilje (Pérez-Jiménez i sar., 2010), može da pomogne u prevenciji srčanih oboljenja, kancera, kao i da pomogne za postizanje drugih pozitivnih efekata na ljudsko zdravlje (Pandey i Rizvi, 2009). Pored oksidativne stabilnosti, prisustvo polifenola u hrani može da utiče i na ukus, boju i miris. S obzirom da žalfija predstavlja drogu sa visokim antioksidativnim potencijalom, neophodno je odrediti aktivnost suvih ekstrakata SPŽ antioksidativnim testovima *in vitro*.

Prema tome, antioksidativna aktivnost suvih ekstrakata SPŽ je komparativno određena DPPH, FRAP i ABTS testovima. Antioksidativna aktivnost prema DPPH radikalima je bila od 244,26 do 476,00 mg Trolox/g, a posebno visoka aktivnost je zabeležena u UAE i MAE uzorcima (Tabela 29). U slučaju redukcione moći prema Fe^{3+} jonima, najveći FRAP je zabeležen u uzorku UAE (52,56 mg Fe^{2+} /g), dok je najniža vrednost dobijena u PHD-20 uzorku (25,74 mg Fe^{2+} /g). Antioksidativna aktivnost prema ABTS radikalima u suvim ekstraktima SPŽ je bila od 377,52 do 811,68 mg Trolox/g. Na osnovu rezultata iz Tabele 29 se može zaključiti da suve ekstrakte SPŽ odlikuje izrazito visok antioksidativni kapacitet.

Kao i u slučaju sadržaja polifenola, antioksidativna aktivnost je bila manja u uzorcima gde je maltodekstrin korišćen kao nosač, s obzirom na razblaženje aktivnih principa dodatkom inertnog jedinjenja. SWE i PHD uzorci su pokazali znatno nižu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ostalim (Tabela 29), što je direktno povezano sa sadržajem polifenola u suvim ekstraktima (Tabela 28). Pored toga, etarsko ulje žalfije, koje poseduje određenu antioksidativnu aktivnost (Božin i sar., 2007), je uklonjeno iz PHD uzorka, s obzirom da je postdestilacioni ostatak korišćen za sušenje *spray drying* tehnikom. To je dovelo da antioksidativna aktivnost PHD uzorka bude značajno manja u odnosu na ostale (Tabela 29). Prema svim parametrima antioksidativne aktivnosti, MAC, UAE i MAE uzorci su pokazali značajno veću aktivnost u poređenju sa ostalim uzorcima (Tabela 29). Iako je MAC uzorak pokazao sličan antioksidativni kapacitet kao UAE i MAE, značajno veća vrednost Y se dobija primenom savremenih ekstrakcionih tehnika. Na taj način je opravdana upotreba savremenih ekstrakcionih tehnika koje bi obezbedile dobra antioksidativna svojstva i visok prinos ekstrakcije u početnom koraku Č/T ekstrakcije.

Tabela 29. Antioksidativna aktivnost suvih ekstrakata SPŽ određena DPPH, FRAP i ABTS testovima

Uzorak	DPPH [mg Trolox/g]	FRAP [mg Fe ²⁺ /g]	ABTS [mg Trolox/g]
MAC	418,11 ± 6,24 ^a	45,14 ± 0,93 ^a	670,55 ± 36,48 ^a
MAC-20	379,47 ± 12,95 ^b	39,27 ± 0,28 ^b	600,79 ± 19,10 ^b
UAE	442,58 ± 3,19 ^c	52,56 ± 1,30 ^c	669,26 ± 25,91 ^c
UAE-20	369,16 ± 5,27 ^b	37,42 ± 0,87 ^d	538,89 ± 30,13 ^{a,b,d}
MAE	476,00 ± 17,01 ^a	42,56 ± 0,51 ^e	811,69 ± 34,97 ^{a,d}
MAE-20	372,24 ± 1,69 ^b	40,19 ± 1,11 ^{b,e}	595,91 ± 9,63 ^e
SWE	298,63 ± 7,54 ^d	31,09 ± 0,33 ^f	431,88 ± 11,88 ^f
SWE-20	244,26 ± 6,90 ^e	28,30 ± 0,97 ^g	377,52 ± 15,59 ^g
PHD	275,99 ± 13,01 ^d	28,45 ± 1,01 ^g	496,81 ± 11,88 ^h
PHD-20	247,60 ± 11,60 ^e	25,74 ± 0,73 ^h	429,77 ± 15,59 ^f

Vrednosti obeležene istim slovom u koloni nisu značajno različite na 5% (Tukey's test).

Antioksidativna aktivnost suvih ekstrakata SPŽ je bila u korelaciji sa sadržajem polifenola u uzorcima. Na Slici P36 se može uočiti dobra linearna veza između UF, UFI i parametara antioksidativne aktivnosti (DPPH, FRAP i ABTS). Prema literaturnim navodima, slična korelacija između UF i antioksidativne aktivnosti je zabeležena u suvim ekstraktima *Salvia fruticosa* i *Rosmarinus officinalis* dobijenim *spray drying* tehnikom (Şahin-Nadeem i sar., 2013; Couto i sar., 2012). Linearna regresija UFI i antioksidativne aktivnosti je bila bolja

u odnosu na UF, usled veće vrednosti R^2 (Slika P36; Prilog). Ovo ukazuje na činjenicu da su polifenolna jedinjenja najvećim delom odgovorna za antioksidativne efekte ekstrakata SPŽ, iako i neki drugi metaboliti žalfije mogu da poseduju određenu antioksidativnu aktivnost. Dalje, može se zaključiti da će dodatak maltodekstrina uticati na smanjenje gubitka antioksidativne aktivnosti sprečavajući degradaciju polifenolnih jedinjenja (Slika 41). S obzirom na izražen antioksidativni potencijal suvih ekstrakata SPŽ, odgovarajuća bi bila njihova upotreba, kako u farmaceutskim formulacijama, tako i kao dodatak hrani sa funkcionalnim svojstvima.

4.6.2.3. Antimikrobna aktivnost

Lekovito bilje se u velikoj meri koristi u tradicionalnoj i savremenoj medicini kao izvor aktivnih principa sa antimikrobnim delovanjem. Prema literaturnim navodima, etarsko ulje i različiti ekstrakti žalfije poseduju određenu antimikrobnu aktivnost (Božin i sar., 2007; Stanojević i sar., 2010; Witkowska i sar., 2013). Bez obzira na dobar antibakterijski efekat, vrlo je teško uporediti rezultate različitih autora usled razlika u poreklu biljnog materijala, hemijskom sastavu i primenjenim ekstrakcionim tehnikama. Iz toga razloga je neophodno odrediti antimikrobni potencijal suvih ekstrakata SPŽ, koji je određen samo u ekstraktima dobijenim bez dodatka maltodekstrina.

Preliminarna evaluacija antimikrobne aktivnosti je izvršena disk-difuzionom metodom. Na osnovu rezultata iz Tabele 30 može se uočiti da su Gram-negativne bakterije i kvasci bili potpuno rezistentni na sve ekstrakte SPŽ. Rezistentnost kvasaca može biti povezana sa kompleksnijom strukturom ćelije (eukariotska ćelika) u poređenju sa bakterijama (prokariotska ćelija), dok je neefikasnost ekstrakata protiv Gram-negativnih bakterija posledica specifične strukture ćelijske membrane. Gram-negativne bakterije su obavijene tankim zidom peptidoglikana koji je okružen spoljašnjom memberanom koju čine lipopolisaharidi, dok Gram-pozitivnim bakterijama nedostaje spoljašnja membrana (Silhavy i sar., 2010). Prema tome, spoljašnja membrana predstavlja barijeru koja ograničava difuziju aktivnih principa (Pierozan i sar., 2009). Dobijeni rezultati antimikrobne aktivnosti su bili u skladu sa prethodnim literaturnim navodima vezanim za antimikrobne efekte ekstrakata žalfije (Pierozan i sar., 2009).

Sa druge strane, iz Tabele 30 se može zaključiti da su Gram-pozitivne bakterije osetljive na efekte ispitivanih uzoraka. MAC, UAE i MAE uzorci su pokazali slučnu aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama, dok se uzorci SWE i PHD odlikuju slabijom aktivnošću (prečnik zone inhibicije oko 10 mm) ili je aktivnost potpuno izostala. Suvi ekstrakti SPŽ su pokazali najveću aktivnost prema *Staphylococcus saprophyticus*^w, dok je najrezistentniji Gram-pozitivni soj bio *Bacillus cereus*^w.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakata SPŽ je određena za sve ispitivane Gram-pozitivne sojeve i rezultati dobijeni mikrodilucionom metodom su dati u Tabeli 31. Može se uočiti da su svi uzorci pokazali zadovoljavajuću antimikrobnu aktivnost usled niske MIC (<50 mg/mL), koja je bila povećana samo u slučaju *Bacillus cereus*^w. Na osnovu vrednosti MIC iz Tabele 31 može se zaključiti da su sojevi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus saprophyticus*^w, *Listeria monocytogenes*^w i *Enterococcus faecalis*^w bili posebno osetljivi na efekte MAC, UAE i MAE uzoraka, dok je vrednost MIC za uzorke SWE i PHD bila značajno veća. Dalje, ispitani uzorci su pokazali slabu aktivnost prema *Bacillus cereus*^w, dok je MIC za *Bacillus cereus* ATCC 11778 bila znatno manja, ukazujući na veću rezistentnost prirodnih izolata. Međutim, nije bio isti slučaj sa *Enterococcus faecalis*, s obzirom da je prirodni izolat pokazao veću osetljivost na suve ekstrakte SPŽ. Prema Pierozan i sar. (2009), MIC etarskog ulja žalfije rastvorenog u dimetilsulfoksidu (DMSO) je bila <10 mg/mL za *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*. Međutim, za ekstrakte SPŽ je voda korišćena kao rastvarač, pa je na taj način potpuno eliminisan uticaj rastvarača na antimikrobnu aktivnost. Prema Witkowska i sar. (2013), MIC ekstrakata žalfije dobijenih wodom, etanolom i *n*-heksanom kao ekstragensom je bila 10-40 mg/mL za *Staphylococcus aureus*, ali i u ovom slučaju je DMSO korišćen kao rastvarač za određivanje antimikrobne aktivnosti. Antimikrobna aktivnost je bila u korelaciji sa sadržajem polifenola (Tabela 28) i antioksidativnom aktivnošću (Tabela 29), s obzirom da su uzorci MAC, UAE i MAE bili znatno potentniji od SWE i PHD. To takođe ukazuje na povezanost polifenola žalfije i biološke aktivnosti (antioksidativne i antimikrobne).

Tabela 30. Antimikrobna aktivnost ekstrakata SPŽ (srednja vrednost prečnika zone inhibicije (mm) uključujući disk (6 mm))

Grupa	Soj	Disk-difuziona metoda (15 µL, koncentracija ekstrakta od 50 mg/mL)					Pozitivna kontrola
		Uzorak					
		MAC	UAE	MAE	SWE	PHD	
G(-) bakterije	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	nd	nd	nd*	nd	nd	14,0±0,0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	nd	nd	nd	nd	nd	15,3±1,7***
G(+) bakterije	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12,33±0,58**	14,33±0,58**	nd	10,67±0,58**	12,00±0,00**	12,00±0,00
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	20,00±1,00	18,00±2,65	20,33±2,08	8,67±0,58	11,00±0,00	nd
	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	18,67±0,58	16,67±0,58	19,67±0,58	7,33±1,15	13,33±0,58	7,67±0,58
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	15,67±2,31	16,33±0,58	17,00±0,00	nd	10,00±0,00	9,00±1,20
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ^w	23,00±1,00	21,33±2,89	24,00±0,00	7,33±0,58	11,00±0,00	11,00±0,58
	<i>Bacillus cereus</i> ^w	8,00±0,58	8,00±0,00	8,00±2,08	nd	nd	nd
	<i>Listeria monocytogenes</i> ^w	15,67±0,58	15,67±1,53	22,33±0,58	8,00±0,00	nd	10,20±0,42
	<i>Enterococcus faecalis</i> ^w	12,00±1,73	nd	13,33±2,08	nd	11,00±0,00	8,00±0,00
	Kvasci	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		nd	nd	nd	nd	nd	12,00±0,00****

* nema zone inhibicije; ** čista zona oko diska; *** ACV suplement, **** aktidion

Tabela 31. Minimalna inhibitorna koncentracija (mg/mL) određena mikrodilucionom metodom

Ispitani sojevi		MIC [mg/mL]				
		MAC	UAE	MAE	SWE	PHD
G(+) bakterije	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	12,5	12,5	50	25
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	37,5	9,4	37,5	37,5	37,5
	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	6,25	9,4	6,25	6,25	9,4
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	25	50	50	25	25
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ^w	6,25	9,4	9,4	18,8	9,4
	<i>Bacillus cereus</i> ^w	>50	>50	>50	>50	>50
	<i>Listeria monocytogenes</i> ^w	3,12	6,25	12,5	6,25	12,5
	<i>Enterococcus faecalis</i> ^w	6,25	6,25	9,4	18,8	18,8

^w prirodni izolat

Poređenjem rezultate disk-difuzione i mikrodilucione metode može se zaključiti da rezultati nisu potpuno uniformni. Međutim, oba testa ukazuju na osetljivost Gram-pozitivnih bakterija na suve ekstrakte SPŽ. Prema tome, disk-difuziona metoda se može adekvatno koristiti kao preliminarni test, dok diskdifuziona metoda predstavlja kvantifikovanje antimikrobne aktivnosti. Na osnovu rezultata iz Tabela 30 i 31 se može zaključiti da je UAE uzorak okarakterisan sa najizraženijom antimikrobnom i antioksidativnom aktivnošću, kao i najvećim sadržajem polifenola. Usled određenih antimikrobnih efekata, suvi ekstrakti žalfije se potencijalno mogu koristiti kao konzervansi, posebno pogodni za čvrstu hranu, ali i u farmaceutskim formulacijama sa ciljem ostvarenja antimikrobnog i antioksidativnog efekta.

4.6.3. Fizičke karakteristike suvih ekstrakata

Prinos sušenja u *spray drying* procesu se uglavnom izražava kao efikasnost sušenja, a predstavlja odnos eksperimentalno dobijene mase suvog ekstrakta i teorijske vrednosti koja se izračunava is sadržaja rastvorenih materija u napojnoj smeši. Efikasnost sušenja tečnih ekstrakata SPŽ je bila od 37,29% (MAC-20) do 57,18% (PHD). Do gubitaka u ovom procesu dolazi usled zadržavanja suvog ekstrakta na zidovima komore i ciklona, što je nepoželjno sa aspekta ekonomičnosti procesa. Pored toga, materijal koji se duže vreme zadržava u uređaju usled dužeg izlaganja povišenoj temperaturi degradira i, ako se spontano ukloni sa zida uređaja, može da dovede do kontaminacije proizvoda (Santana i sar., 2013). Ekstrakt koji se

duže zadržava u uređaju na povišenoj temperaturi može da ima promenjene osobine (sadržaj vlage, boja, rastvorljivost, itd.) i ne može se smatrati dobrim proizvodom. Efikasnost sušenja >50% se navodi kao kriterijum uspešnog sušenja u laboratorijskim uslovima (Bhandari i sar., 1997), što je ostvareno za uzorke UAE, UAE-20, MAE-20, SWE, SWE-20 i PHD (Tabela 32). Sličan opseg efikasnosti sušenja (25,8 – 56,1%) je zabeležen u sušenju ekstrakata *Carzocar brasiliense* (Santana i sar., 2013). U većini slučajeva (UAE, MAE i SWE) je zabeleženo povećanje efikasnosti sušenja sa dodatkom maltodekstrina, što je u skladu sa prethodnim literaturnim navodima (Vidović i sar., 2014), s obzirom da je tokom sušenja ekstrakata bez dodatka nosača olakšano deponovanje i lepljenje ekstrakta na zidove uređaja. Pored toga, sušenje je u okviru ovog rada izvedeno na pilot postrojenju koje zahteva veću zapreminu od zapremine ekstrakata koja je korišćena za sušenje (oko 2 L), pa se može očekivati da odnos sakupljenog ekstrakta i deponovanog na zidove uređaja bude relativno nizak, odnosno da gubici budu veći.

Tabela 32. Efikasnost sušenja i fizičke karakteristike suvih ekstrakata SPŽ dobijenih *spray drying* tehnikom

Uzorak	MD [%]	Efikasnost [%]	Sadržaj vlage [%]	Higroskopnost [%]	Vreme rehidracije [s]
MAC	0	40,64	7,18 ^{c,d}	13,86 ^c	7,89 ^d
MAC-20	20	37,29	15,35 ^a	13,80 ^c	11,91 ^d
UAE	0	51,52	8,94 ^{b,c}	14,40 ^c	20,57 ^b
UAE-20	20	54,29	10,04 ^b	14,30 ^c	24,01 ^a
MAE	0	39,05	5,92 ^{d,e}	15,75 ^b	9,82 ^d
MAE-20	20	53,65	9,40 ^b	16,08 ^b	25,82 ^a
SWE	0	53,72	5,49 ^{d,e}	14,42 ^c	4,24 ^e
SWE-20	20	56,61	4,53 ^e	18,02 ^a	3,45 ^e
PHD	0	57,18	7,31 ^{c,d}	13,83 ^c	3,39 ^e
PHD-20	20	49,47	5,72 ^{d,e}	13,61 ^c	16,93 ^c

Vrednosti obeležene istim slovom u koloni nisu značajno različite na 5% (Tukey's test).

4.6.3.1. Sadržaj vlage

Sadržaj vlage je u suvim ekstraktima SPŽ bio od 4,53 do 15,35%. Nizak sadržaj vlage u suvim ekstraktima je poželjan, jer se na taj način sprečava aglomeracija čestica i zadržavaju se dobre protočne osobine prahova (da Silva i sar., 2013). Prema Sinija i Mishra (2008), instant čajevi koji imaju sadržaj vlage <5% imaju veliku stabilnost tokom pakovanja i

sladištenja, prema tome, samo uzorak SWE-20 ispunjava ovaj kriterijum. Dodatak maltodekstrina je kod uzoraka MAC, UAE i MAE doveo do povećanja sadržaja vlage, dok je kod uzoraka SWE i PHD bio obrnut slučaj (Tabela 32). Prema Kha i sar. (2010), povećanje koncentracije maltodekstrina dovodi do smanjenja sadržaja vlage u suvim ekstraktima *Momordica cochinchinensis*. Sa druge strane, zabeleženo je povećanje sadržaja vlage sa dodatkom maltodekstrina usled otežane difuzije molekula vode pored velikih molekula maltodekstrina tokom procesa sušenja (Adhikari i sar., 2004), što je i bio slučaj u uzorcima MAC, UAE i MAE. Sadržaj vlage u velikoj meri zavisi od temperaturnog gradijenta, odnosno od razlike ulazne i izlazne temperature koja je u svim eksperimentima bila oko 40°C. Sadržaj vlage u suvim ekstraktima *Salvia fruticosa* je bio od 3-5%, međutim, ulazna temperatura je u ovom slučaju bila značajno veća (145 – 165°C), što je ubrzalo isparanja rastvarača tokom *spray drying* procesa (Şahin-Nadeem i sar., 2013). Uzorci MAC-20 i UAE-20 pokazali su neodgovarajuće karakteristike u pogledu povećanog sadržaja vlage (>10%). Što se ostalih uzoraka tiče, njihova upotreba u farmaceutskoj industriji bi mogla biti ograničena jer bi veći sadržaj vlage (>5%) imao negativan uticaj na osobine tableta sa suvim ekstraktima SPŽ. Međutim, neophodno je izvršiti dalja istraživanja da bi se utvrdila mogućnost eventualne upotrebe ovih ekstrakata u čvrstim farmaceutskim oblicima.

4.6.3.2. Higroskopnost

Higroskopnost predstavlja masu vode koju apsorbuje 100 g praha tokom sedam dana skladištenja na 25°C i 90% relativnoj vlažnosti vazduha (Krishnaiah i sar., 2014). U suvim ekstraktima SPŽ se ova vrednost kretala od 13,61 do 18,02%. Najveća higroskopnost je zabeležena u uzorcima MAE, MAE-20 i SWE (15,75, 16,08 i 18,02%), dok između ostalih uzoraka nije ustanovljena statistički značajna razlika (Tabela 32). Higroskopnost ekstrakata i hrane je povezana sa prisustvom hidrofilnih molekula koji mogu da vezuju vodu iz atmosfere. Najveća higroskopnost je zabeležena u uzorku SWE-20 (18,02%), gde je kao rastvarač korišćena subkritična voda koja ima veliku moć rastvaranja, kako za umereno polarna jedinjenja kao što su polifenoli, tako i za polarne biomolekule (ugljene hidrate i proteine) koji imaju sposobnost vezivanja vode. Sličan opseg higroskopnosti (13,85 – 14,81%) je zabeležen u suvim ekstraktima *Myrciaria jaboticaba*, gde je maltodekstrin (30%) takođe korišćen kao nosač (Silva i sar., 2013). Prema literaturnim navodima, očekuje se da dodatak maltodekstrina dovede do smanjenja higroskopnosti suvih ekstrakata usled povećanja

temperature staklavosti (T_g) tečnog ekstrakta (Vladić i sar., 2016). Međutim, ovaj fenomen je zabeležen samo kod uzoraka MAC, UAE i PHD, dok je kod uzoraka MAE i SWE dodatak maltodekstrina doveo do povećanja higroskopnosti. Pored dodatka nosača, temperatura sušenja takođe ima veliki uticaj na higroskopnost i očekivano je da prahovi osušeni na većim temperaturama imaju veću higroskopnost, s obzirom da se na višim temperaturama dobijaju poroznije čestice, pa je na taj način olakšana apsorpcija vode (de Souza i sar., 2015). Sui ekstrakti SPŽ su imali nižu higroskopnost nakon 48 h od suvih ekstrakata sporednog proizvoda hajdučke trave (20,52 – 21,49%), dobijenih pod sličnim uslovima (Vladić i sar., 2016).

4.6.3.3. Vreme rehidracije

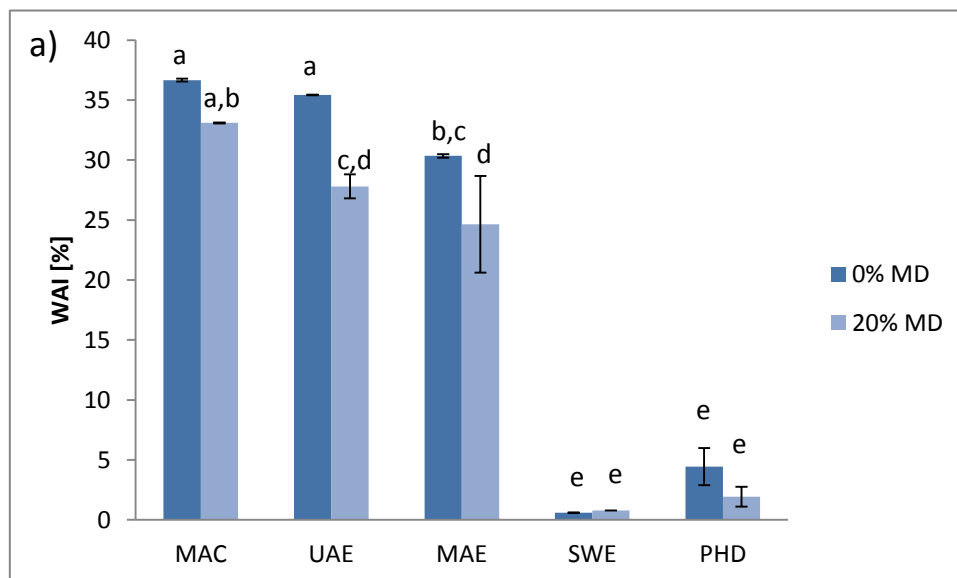
Maltodekstrin predstavlja jedan od najčešće korišćenih nosača za *spray drying*, a jedan od razloga za to su njegove dobre fizičke karakteristike, kao što je rastvorljivost u vodi (Krishnaiah i sar., 2014). S obzirom da maltodekstrin predstavlja modifikovani skrob, njegovo vreme rastvaranja je duže od većine hidrofilnih jedinjenja prisutnih u biljnim ekstraktima (Caliskan i Dirim, 2016), pa je očekivano da ekstrakti sa maltodekstrinom imaju produženo vreme rehidracije (Nunes i sar., 2015). U skladu sa tim, vreme rehidracije je za sve uzorke, osim SWE, bilo produženo u uzorcima gde je maltodekstrin korišćen kao nosač (Tabela 32). Vreme rehidracije je u suvim ekstraktima SPŽ bilo od 3,45 do 25,82 s. Kraće vreme rehidracije je ostvareno u uzorcima SWE i PHD u odnosu na ostale. To se može objasniti upotrebom vode kao ekstragensa u početnom koraku Č/T ekstrakcije, prema tome, rekonstitucija ovih ekstrakata u vodenoj sredini je olakšana u odnosu na uzorke gde je kao ekstragens korišćena smeša etanol-voda (MAC, UAE i MAE). Može se zaključiti da su svi suvi ekstrakti imali relativno kratko vreme rehidracije (Tabela 32), za razliku od suvih ekstrakata *Ilex paraguariensis*, gde je vreme rehidracije bilo od 292 do 589 s, i bilo je veće sa porastom koncentracije dodatog maltodekstrina.

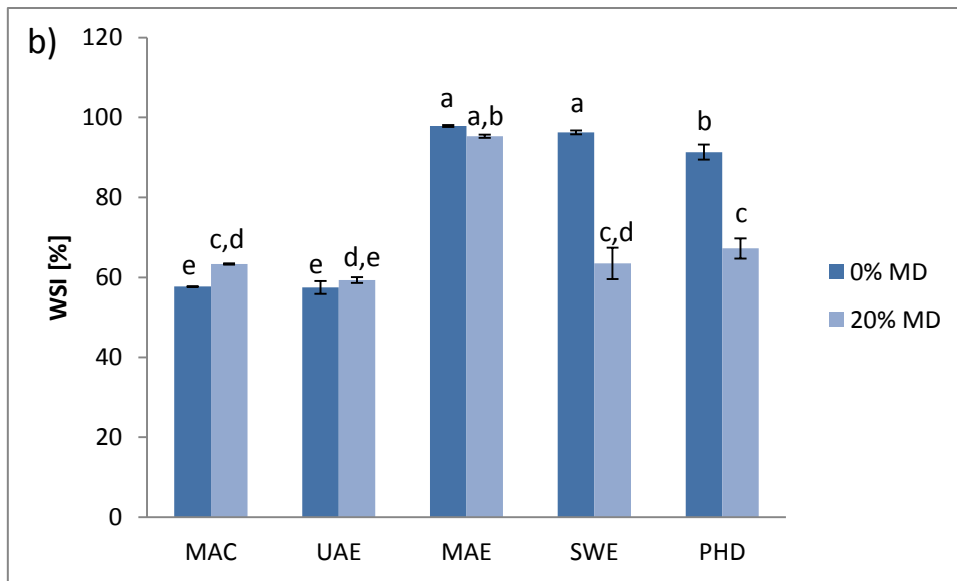
4.6.3.4. WAI i WSI

Indeks apsorpcije vode (WAI) i indeks rastvorljivosti u vodi (WSI) predstavljaju važne osobine suvih ekstrakata koje su povezane sa njihovom rastvorljivošću. WAI je bio relativno visok u uzorcima MAC, UAE i MAE, dok su statistički značajno niže vrednosti zabeležene kod SWE i PHD uzoraka (Slika 42a). WAI predstavlja sposobnost ekstrakata da apsorbuje vodu i

poželjno je da bude što niži kako bi karakteristike praha bile bolje (Vladić i sar., 2016). S obzirom da maltodekstrin smanjuje kapacitet zadržavanja vode u suvim ekstraktima, dodatak maltodekstrina je u svim uzorcima doveo do smanjenja WAI, što je u skladu sa prethodnim literaturnim navodima (Vidović i sar., 2014). Nizak WAI u uzorcima SWE i PHD je bio sličan sa WAI ekstrakata *Satureja montana* (2 – 6%) dobijenim pod sličnim uslovima (Vidović i sar., 2014), dok je u slučaju suvih ekstrakata hajdučke trave, WAI bio povećan (17,32 – 20,08%) (Vladić i sar., 2016).

WSI predstavlja parametar koji opisuje rastvorljivost suvih ekstrakata u vodi i veće vrednosti su poželjne, s obzirom na povećanje kapaciteta rekonstitucije ekstrakata u vodi. WSI suvih ekstrakata SPŽ je bio od 57,52 do 97,87% (Slika 42b). U uzorcima bez dodatka maltodekstrina veći WSI je bio u uzorcima kod kojih su u stupnju Č/T ekstrakcije korišćeni polarniji rastvarači (voda i 45% etanol), dok primena 60% etanola kao ekstragensa dovodi do značajnog smanjenja WSI. Kod uzoraka MAE, SWE i PHD je dodatak maltodekstrina doveo do smanjenja WSI, koje je posebno izraženo kod uzoraka kod kojih je kao ekstragens korišćena voda (SWE i PHD). WSI suvih ekstrakata SPŽ je bio u skladu sa WSI suvih ekstrakata *Satureja montana* (Vidović i sar., 2014) i hajdučke trave (Vladić i sar., 2016) (87,85 – 90,55% i 72,12 – 76,39%).





Slika 42. a) WAI i b) WSI u suvim ekstraktima SPŽ sa i bez dodatka maltodekstrina (Vrednosti obeležene različitim slovom su značajno različite na 5% (Tukey's test))

5. ZAKLJUČCI

- Ekstrakcija polifenola sporednog proizvoda žalfije (SPŽ) je izvršena konvencionalnom (maceracijom) i savremenim (ultrazvučna, mikrotalasna i ekstrakcija subkritičnom vodom) ekstrakcionim tehnikama i zaključeno je da savremene tehnike obezbeđuju značajno veći prinos ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFI), kao i veću antioksidativnu aktivnost.
- Kod konvencionalne ekstrakcije je optimizovana koncentracija etanola u cilju dobijanja maksimalnog prinosa ekstrakcije (Y), UF i UFI, i ustanovljeno je da se korišćenjem 60% etanola dobija ekstrakt najboljih karakteristika.
- Ultrazvučna (UAE), mikrotalasna (MAE), ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju (SWE) i ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SFE) su optimizovane korišćenjem Box-Behnken eksperimentalnog dizajna i metode odzivne površine. Na osnovu parametara deskriptivne statistike (R^2 i CV) i analize varijanse (ANOVA) može se zaključiti da su primenjeni kvadratni polinomi u svim slučajevima predstavljali dobru aproksimaciju eksperimentalnih rezultata.
- Optimalni uslovi ultrazvučne ekstrakcije su bili temperatura od 75,4°C, vreme ekstrakcije 80 min i snaga ultrazvuka od 42,54 W/L, dok su predviđene vrednosti UF i UFI bile $9,876 \pm 0,584$ g GAE/100 g droge i $7,052 \pm 0,209$ g CE/100 g droge.
- Optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije su bili koncentracija etanola od 46,2%, vreme ekstrakcije 18,7 min i odnos rastvarač-droga 40 mL/g, dok su predviđene vrednosti UF i UFI bile $10,105 \pm 0,685$ g GAE/100 g droge i $7,802 \pm 0,338$ g CE/100 g droge.
- Tečni ekstrakti dobijeni ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom su pokazali izuzetno visoku antioksidativnu aktivnost određenu „hvatanjem“ DPPH i O₂⁻ radikala i kapacitetom redukcije Fe³⁺ jona.
- Analizom uticaja parametara na proces ekstrakcije zaključeno je da temperatura predstavlja glavni parametar u ultrazvučnoj ekstrakciji, dok su koncentracija etanola i vreme ekstrakcije bili parametri sa glavnim uticajem u mikrotalasnoj ekstrakciji.
- Optimalni uslovi ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju koji predviđaju najveći prinos polifenola i najveću antioksidativnu aktivnost su bili temperatura od 201,5°C,

15,8 min, bez dodatka HCl u ekstragens. Predviđene vrednosti odziva na ovim uslovima su bile 7,98 g GAE/100 g droge, 4,93 g CE/100 g droge, 13,38 µg/mL, 38,34 mM Trolox/100 g droge i 41,66 µg/mL za UF, UFI i antioksidativnu aktivnost određenu DPPH, ABTS i testom redukcione moći.

- Zaključeno je da ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju pruža prednosti u odnosu na konvencionalnu tehniku u pogledu znatno kraćeg vremena ekstrakcije, kao i da temperatura predstavlja glavni parametar ovog procesa.
- Ekstrakcija terpenoidnih jedinjenja je izvršena konvencionalnim (Soxhlet ekstrakcija i destilacija vodenom parom) i savremenim (ekstrakcija superkritičnim CO₂) ekstrakcionim tehnikama i upoređen je ukupan prinos ekstrakcije i sadržaj terpenoidnih jedinjenja u ekstraktima.
- Optimalni uslovi ekstrakcije superkritičnim CO₂ su bili pritisak 290 bar, temperatura 55°C i protok CO₂ od 0,4 kg/h, dok su predviđene i eksperimentalne vrednosti prinosa ekstrakcije bile 8,90 i 8,84%.
- Zaključeno je da svi parametri superkritične ekstrakcije značajno utiču na prinos, a da se kao najdominantniji izdvaja uticaj pritiska. Pored toga, međusobna interakcija parametara je pokazala značajan uticaj na ispitivani odziv.
- Hemijskom analizom lipofilnih ekstrakata je utvrđeno da su oksidovani monoterpeni (α -tujon i kamfor), oksidovani seskviterpeni (viridiflorol) i polifenolni diterpeni (epirosmanol) dominantna jedinjenja prisutna u lipofilnim ekstraktima i etarskom ulju SPŽ.
- Kvantitativnom analizom pojedinačnih monoterpena je zaključeno da se superkritičnom ekstrakcijom ostvaruje najveći prinos limonena, karvakrola, α -terpineola, kamfora i α -tujona, dok se Soxhlet ekstrakcijom dobija najveći prinos eukaliptola. Soxhlet ekstrakcijom se dobija najveći ukupan prinos ekstrakcije, ali je prinos terpena relativno mali usled manje selektivnosti. Sa druge strane, destilacija vodenom parom ima veliku selektivnost prema terpenoidnim jedinjenjima, međutim prinos pojedinačnih monoterpena je bio veći u ekstraktima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom.

- Tečni ekstrakti žalfije dobijeni konvencionalnim i savremenim ekstrakcionim tehnikama su *spray drying* tehnikom osušeni u cilju prevođenja u stabilniju formu suvog ekstrakta.
- Suvi ekstrakti su okarakterisani u pogledu hemijskog sastava (UF i UFI), biološke aktivnosti (antimikrobna i antioksidativna aktivnost) i fizičkih osobina (sadržaj vlage, higroskopnost, moć rehidracije, WAI i WSI).
- U pogledu isptivanih karakteristika, suvi ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom je pokazao najbolji balans fizičko-hemijskih osobina. Ekstrakti su pokazali izuzetno visoku antioksidativnu aktivnost određenu DPPH, FRAP i ABTS testovima, kao i izraženu antimikrobnu aktivnost prema odabranim Gram-pozitivnim bakterijama.
- Na osnovu izvedenih eksperimenata se može zaključiti da se upotreba savremenih ekstrakcionih tehnika u kombinaciji sa sušenjem raspršivanjem može uspešno koristiti za dobijanje kvalitetnih suvih ekstrakata koji mogu biti inkorporirani u različite forme proizvoda prehrambene i farmaceutske industrije. Na taj način je sporedni proizvod žalfije iz fabrike čaja valorizovan kao sirovina za dobijanje visokovrednih bioaktivnih jedinjenja.

6. Literatura

Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B. R., Troung, V. (2004). Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modelling. *Journal of Food Engineering*, 62(1), 53-68.

Aleksovski, S. A., Sovová, H. (2007). Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. *The Journal of Supercritical Fluids*, 40(2), 239-245.

Alfaro, M. J., Bélanger, J. M., Padilla, F. C., Paré, J. J. (2003). Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAP™) extraction of ginger (*Zingiber officinale*). *Food Research International*, 36(5), 499-504.

Anandharamakrishnan, C. (2015). *Spray drying techniques for food ingredient encapsulation*. John Wiley & Sons.

Asl, A. H., Khajenoori, M. (2013). Subcritical Water Extraction. In *Mass Transfer – Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling* (pp. 459-487).

Assami, K., Pingret, D., Chemat, S., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2012). Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 62, 99-105.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.

Babović, N., Đilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanović, J., Petrović, S., Žižović, I. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 98-107.

Baş, D., Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836-845.

Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Ultrasound applications in food processing. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 65-105). Springer New York.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.

Bhandari, B. R., Datta, N., Howes, T. (1997). Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying Technology*, 15(2), 671-684.

Božin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7879–7885.

Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67(1), 21-33.

Caliskan, G., Dirim, S. N. (2016). The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder Technology*, 287, 308-314.

Carr, A. G., Mammucari, R., Foster, N. R. (2011). A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 172(1), 1-17.

Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C., Kung, F. W. L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213-6225.

Charve, J., Reineccius, G. A. (2009). Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(6), 2486-2492.

Chemat, F., Cravotto, G. (Eds.). (2012). Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice (Vol. 4). Springer Science & Business Media.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.

Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615-8627.

Couto, R. O., Conceição, E. C., Chaul, L. T., Oliveira, E. M. S., Martins, F. S., Bara, M. T. F., Rezende, K. R., Alves, S. F., Paula, J. R. (2012). Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. *Food Chemistry*, 131(1), 99–105.

Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(5), 645.

da Silva, F. C., da Fonseca, C. R., de Alencar, S. M., Thomazini, M., de Carvalho Balieiro, J. C., Pittia, P., Favaro-Trindade, C. S. (2013). Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food and Bioproducts Processing*, 91(1), 28-36.

da Silva, R. P., Rocha-Santos, T. A., Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.

De Melo, M. M. R., Silvestre, A. J. D., Silva, C. M. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115-176.

de Souza, V. B., Thomazini, M., de Carvalho Balieiro, J. C., Fávaro-Trindade, C. S. (2015). Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing*, 93, 39-50.

Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84-91.

Derringer, G., Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of quality technology*, 12(4), 214-219.

Dragović-Uzelac, V., Garofulić, I. E., Jukić, M., Penić, M., Dent, M. (2012). The influence of microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technology and Biotechnology*, 50(3), 377-383.

Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., Perry, N. B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry*, 101(4), 1417-1424.

Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452-490.

Eskilsson, C. S., Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.

Farhat, M. B., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A., Jordán, M. J. (2013). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49, 904-914.

Fellah, S., Diouf, P. N., Petrissans, M., Barth, D., Romdhane, M., Perrin, D., Abderrabba, M. (2005, December). Supercritical CO₂, hydrodistillation extractions of *Salvia officinalis* L. Influence of extraction process on antioxidant properties. In *Proceedings of the 10th European Meeting on Supercritical Fluids, Reactions, Materials and Natural Products*.

Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandao, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. C., Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186.

- Flannigan, D. J., Suslick, K. S. (2010). Inertially confined plasma in an imploding bubble. *Nature Physics*, 6(8), 598-601.
- Fornari, T., Ruiz-Rodriguez, A., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., Reglero, G. (2012). Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from Lamiaceae family. *The Journal of Supercritical Fluids*, 64, 1-8.
- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., Reglero, G. (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1250, 34-48.
- Gamiz-Gracia, L., Luque de Castro, M. D. (2000). Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*, 51(6), 1179-1185.
- Gañán, N., Brignole, E. A. (2013). Supercritical carbon dioxide fractionation of *T. minuta* and *S. officinalis* essential oils: Experiments and process analysis. *The Journal of Supercritical Fluids*, 78, 12-20.
- Gird, C. E., Nencu, I., Costea, T., Duțu, L. E., Popescu, M. L., Ciupitu, N. (2014). Quantitative analysis of phenolic compounds from *Salvia officinalis* L. leaves. *Farmacia*, 62(4), 649-657.
- Glišić, S., Ivanović, J., Ristić, M., Skala, D. (2010). Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 52(1), 62-70.
- Goula, A. M., Adamopoulos, K. G. (2008). Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. Powder properties. *Drying Technology*, 26(6), 726-737.
- Grdiša, M., Jug-Dujaković, M., Lončarić, M., Carović-Stanko, K., Ninčević, T., Liber, Z., Radosavljević, I., Šatović, Z. (2015). Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): A Review of Biochemical Contents, Medical Properties and Genetic Diversity. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)*, 80(2), 69-78.
- Güçlü-Üstündağ, Ö., Mazza, G. (2008). Extraction of saponins and cyclopeptides from cow cockle seed with pressurized low polarity water. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9), 1600-1606.

Gude, V. G. (2015). Synergism of microwaves and ultrasound for advanced biorefineries. *Resource-Efficient Technologies*, 1(2), 116-125.

Hamrouni-Sellami, I., Rahali, F. Z., Rebey, I. B., Bourgou, S., Limam, F., Marzouk, B. (2013). Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 806-817.

Hao, J. Y., Han, W., Xue, B. Y., Deng, X. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology*, 28(3), 191-196.

Harborne, J.B., 1984. *Methods of plant analysis*, Springer, Netherlands.

Hemwimon, S., Pavasant, P., Shotipruk, A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54(1), 44-50.

Henglein, A., Kormann, C. (1985). Scavenging of OH radicals produced in the sonolysis of water. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 48(2), 251-258.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, 98(1), 136-148.

Hossain, M. B., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., Barry-Ryan, C. (2010). Application of response surface methodology to optimize pressurized liquid extraction of antioxidant compounds from sage (*Salvia officinalis* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Food & Function*, 1(3), 269-277.

Ibanez, E., Kubátová, A., Señoráns, F. J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthorne, S. B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 375-382.

Ivanova-Petropulos, V., Ricci, A., Nedelkovski, D., Dimovska, V., Parpinello, G. P., Versari, A. (2015). Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Food Chemistry*, 171, 412-420.

Jacotet-Navarro, M., Rombaut, N., Deslis, S., Fabiano-Tixier, A. S., Pierre, F. X., Bily, A., Chemat, F. (2016). Towards a “dry” bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. *Green Chemistry*, 18(10), 3106-3115.

Jeshvaghani, Z. A., Rahimmalek, M., Talebi, M., Goli, S. A. H. (2015). Comparison of total phenolic content and antioxidant activity in different *Salvia* species using three model systems. *Industrial Crops and Products*, 77, 409-414.

Kha, C. T., Nguyen, M. H., Roach, P. D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 385-392.

Kim, J. W., Mazza, G. (2006). Optimization of extraction of phenolic compounds from flax shives by pressurized low-polarity water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7575-7584.

Krishnaiah, D., Nithyanandam, R., Sarbatly, R. (2014). A critical review on the spray drying of fruit extract: effect of additives on physicochemical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(4), 449–473.

Kubátová, A., Lagadec, A. J., Miller, D. J., Hawthorne, S. B. (2001). Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(1), 64-73.

Kubátová, A., Lagadec, A. J., Miller, D. J., Hawthorne, S. B. (2001). Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(1), 64-73.

Lang, Q., Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 53(4), 771-782.

Leardi, R. (2009). Experimental design in chemistry: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 652(1), 161-172.

Leuenberger, H., Lanz, M. (2005). Pharmaceutical powder technology - from art to science: the challenge of the FDA's Process Analytical Technology initiative. *Advanced Powder Technology*, 16(1), 3–25.

Lu, Y., Foo, L. Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75(2), 197-202.

Lu, Y., Foo, L. Y. (2002). Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochemistry*, 59(2), 117-140.

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J., & Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42(1), 3-40.

Luque-Garcia, J. L., de Castro, M. L. (2003). Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going?. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(2), 90-98.

Maksimović, S., Kesić, Z., Lukić, I., Milovanović, S., Ristić, M., Skala, D. (2013). Supercritical fluid extraction of curry flowers, sage leaves, and their mixture. *The Journal of Supercritical Fluids*, 84, 1-12.

Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 7-18.

Mantle, D., Eddeb, F., Pickering, A. T. (2000). Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1), 47-51.

Mason, T. J., Peters, D. (2002). *Practical sonochemistry: Power ultrasound uses and applications*. Woodhead Publishing.

Masters, K. (2002). *Spray Drying in Practice*, pp. 1–35, Spray Dry Consult, Denmark.

Menaker, A., Kravets, M., Koel, M., Orav, A. (2004). Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs. *Comptes Rendus Chimie*, 7(6), 629-633.

Miller, D. J., Hawthorne, S. B. (2000). Solubility of liquid organic flavor and fragrance compounds in subcritical (hot/liquid) water from 298 K to 473 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 45(2), 315-318.

Moreno, T., de Paz, E., Navarro, I., Rodríguez-Rojo, S., Matías, A., Duarte, C., Sanz-Buenhombre, M., Cocero, M. J. (2016). Spray drying formulation of polyphenols-rich grape marc extract: Evaluation of operating conditions and different natural carriers. *Food and Bioprocess Technology*, 1-13.

Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829.

Murali, K., Kannan, S. M., Prabhu, M. S. (2014). Correlation development for Sauter mean diameter of rotary atomizer. *American Journal of Engineering Research* 3(3), 339–345.

Mustafa, A., Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8-18.

Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2009. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*, third ed., John Wiley and Sons, New Jersey.

Nađalin, V., Lepojević, Ž., Ristić, M., Vladić, J., Nikolovski, B., Adamović, D. (2014). Investigation of cultivated lavender (*Lavandula officinalis* L.) extraction and its extracts. *CI&CEQ*, 20(1), 71-86.

Newall, C. A., Anderson, L. A., Phillipson, J. D. (1996). *Herbal medicines. A guide for health-care professionals*. The Pharmaceutical Press.

Nishikimi, M., Rao, N. A., Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849-854.

Nunes, G. L., Boaventura, B. C. B., Pinto, S. S., Verruck, S., Murakami, F. S., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. D. M. C. (2015). Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 151, 60-68.

Oakley, D. E. (2004). Spray dryer modeling in theory and practice. *Drying Technology*, 22(6), 1371-1402.

- Occhipinti, A., Capuzzo, A., Arceusz, A., Maffei, M. E. (2014). Comparative analysis of α - and β -thujone in the essential oil and supercritical CO₂ extract of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 26(2), 85-90.
- Oliveira, W. P., Bott, R. F., Souza, C. R. F. (2006). Manufacture of Standardized Dried Extracts from Medicinal Brazilian Plants. *Drying Technology*, 24(4), 523–533.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction - antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Ozel, M. Z., Gogus, F., Lewis, A. C. (2003). Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry*, 82(3), 381-386.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
- Papamichail, I., Louli, V., Magoulas, K. (2000). Supercritical fluid extraction of celery seed oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, 18(3), 213-226.
- Pavlič, B., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cindrić, M., Zeković, Z. (2016). Subcritical water extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by-products – process optimization by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 116, 36–45.
- Pavlič, B., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Zeković, Z. (2015). Isolation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil by green extractions versus traditional techniques. *The Journal of Supercritical Fluids*, 99, 23-28.
- Pereira, C. G., Meireles, M. A. A. (2010). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 340-372.
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, S112-S120.

Périno-Issartier, S., Abert-Vian, M., Chemat, F. (2011). Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1020-1028.

Pharmacopoea Jugoslavica, Editio Quarta (Ph. Jug. IV), vol. 1, Federal Institute of Public Health, Belgrade, Yugoslavia, 1984 (in Serbian).

Pharmacopoeia, E. (2002). European pharmacopoeia. Strasbourg: Council of Europe.

Pierozan M. K., Pauletti G. F., Rota L., Santos A. C. A., Lerin L. A., di Luccio M., Mossi A. J., Atti-Serafini L., Cansian R. L., Vladimir Oliveira J. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species, *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 29, 764-770.

Plaza, M., Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 39-54.

Pop, A., Berce, C., Bolfa, P., Nagy, A., Catoi, C., Dumitrescu, I. B., Silaghi- Dumitrescu, L., Loghin, F. (2013). Evaluation of the possible endocrine disruptive effect of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and propyl gallate in immature female rats. *Farmacia*, 61(1), 202-211.

Pourmortazavi, S. M., Hajimirsadeghi, S. S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1163(1), 2-24.

Prado, J. M., Dalmolin, I., Carareto, N. D., Basso, R. C., Meirelles, A. J., Oliveira, J. V., Batista, E. A.C., Meireles, M. A. A. (2012). Supercritical fluid extraction of grape seed: process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, 109(2), 249-257.

Proestos, C., Komaitis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 41(4), 652-659.

Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejin, A., Pavlić, B. (2015). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 360-368.

- Ramos, L., Kristenson, E. M., Brinkman, U. A. (2002). Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 3-29.
- Ravber, M., Knez, Ž., Škerget, M. (2015). Optimization of hydrolysis of rutin in subcritical water using response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104, 145-152.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Reverchon, E., De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146-166.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.
- Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F. R., Herrero, M., Señorans, F. J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1560-1565.
- Roselló-Soto, E., Galanakis, C. M., Brnčić, M., Orlie, V., Trujillo, F. J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari B. K., Barba, F. J. (2015). Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 42(2), 134-149.
- Routray, W., Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 409-424.

Rovio, S., Hartonen, K., Holm, Y., Hiltunen, R., Riekkola, M. L. (1999). Extraction of clove using pressurized hot water. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(6), 399-404.

Şahin-Nadeem, H., Dinçer, C., Torun, M., Topuz, A., Özdemir, F. (2013). Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa* Miller) by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 52(1), 31–38.

Santana, A. A., Kurozawa, L. E., de Oliveira, R. A., Park, K. J. (2013). Influence of process conditions on the physicochemical properties of pequi powder produced by spray drying. *Drying Technology*, 31(7), 825-836.

Sharma R., 2014. Polyphenols in health and disease: practice and mechanisms of benefits, in: R.R. Watson, V.R. Preedy, S. Zibadi (Eds.), *Polyphenols in human health and disease*, Academic, San Diego.

Shinoda, K. (1977). "Iceberg" formation and solubility. *The Journal of Physical Chemistry*, 81(13), 1300-1302.

Shofinita, D., Langrish, T. A. G. (2014). Spray drying of orange peel extracts: Yield, total phenolic content, and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, 139, 31-42.

Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010). *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.

Silva, E. M., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55(3), 381-387.

Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., de Oliveira, I. R. N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 538-544.

Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants—A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 828-835.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Sinija, V. R., Mishra, H. N. (2008). Moisture sorption isotherms and heat of sorption of instant (soluble) green tea powder and green tea granules. *Journal of Food Engineering*, 86(4), 494-500.

Sivakumar, V., Vijaeeswarri, J., Anna, J. L. (2011). Effective natural dye extraction from different plant materials using ultrasound. *Industrial Crops and Products*, 33(1), 116-122.

Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46-54.

Smith, R. M. (2003). Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000(1), 3-27.

Soler-Rivas, C., Espín, J. C., Wichers, H. J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 11(5), 330-338.

Soto Ayala, R., Luque de Castro, M. D. (2001). Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry*, 75(1), 109-113.

Souza, C. R. F., Schiavetto, I. A., Thomazini, F. C. F., Oliveira, W. P. (2008). Processing of *Rosmarinus officinalis* Linne extract on spray and spouted bed dryers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25(1), 59–69.

Stanojević D., Čomić Lj., Stefanović O., Solujić-Sukdolac S. (2010). *In vitro* synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. and some preservatives, *Archives of Biological Sciences*, 6, 175-183.

Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.

Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137-142.

Tomšik, A., Pavlič, B., Vladić, J., Ramić, M., Brindza, J., Vidović, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 502-511.

Tucakov, J. (1984). *Lecenje biljem*. Rad, Beograd.

Ulubelen, A. (2000). III. Chemical Constituents 4. Terpenoids in the genus *Salvia*. *The Genus Salvia*, 55.

Valachovic, P., Pechova, A., Mason, T. J. (2001). Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 111-117.

Valle, J. D., Aguilera, J. M. (1999). High pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry. *Food Science and Technology International-Frederick*, 5(1), 1-24.

Veličković, D. T., Karabegović, I. T., Stojičević, S. S., Lazić, M. L., Marinković, V. D., Veljković, V. B. (2011). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from *Salvia glutinosa* L. and *Salvia officinalis* L. *Hemijska Industrija*, 65(5), 599-605.

Veličković, D. T., Milenović, D. M., Ristić, M. S., Veljković, V. B. (2006). Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(2), 150-156.

Vergara-Salinas, J. R., Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., Agosin, E., Pérez-Correa, J. R. (2012). Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10920-10929.

Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P., Popović, L. M. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technology*, 258, 209-215.

Vidović, S., Cvetkovic, D., Ramić, M., Dunjić, M., Malbaša, R., Tepić, A., Šumić, Z., Velićanski, A., Jokić, S. (2013). Screening of changes in content of health benefit compounds,

antioxidant activity and microbiological status of medicinal plants during the production of herbal filter tea. *Industrial Crops and Products*, 50, 338-345.

Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M., Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1066-1074.

Wen, X., Wu, J., Wang, F., Liu, B., Huang, C., Wei, Y. (2013). Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 402-410.

Witkowska, A. M., Hickey, D. K., Alonso-Gomez, M., Wilkinson, M. (2013). Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria. *Journal of Food Research*, 2(4), 37–54.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940-949.

Wu, J. Q., Kosten, T. R., Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, 200-206.

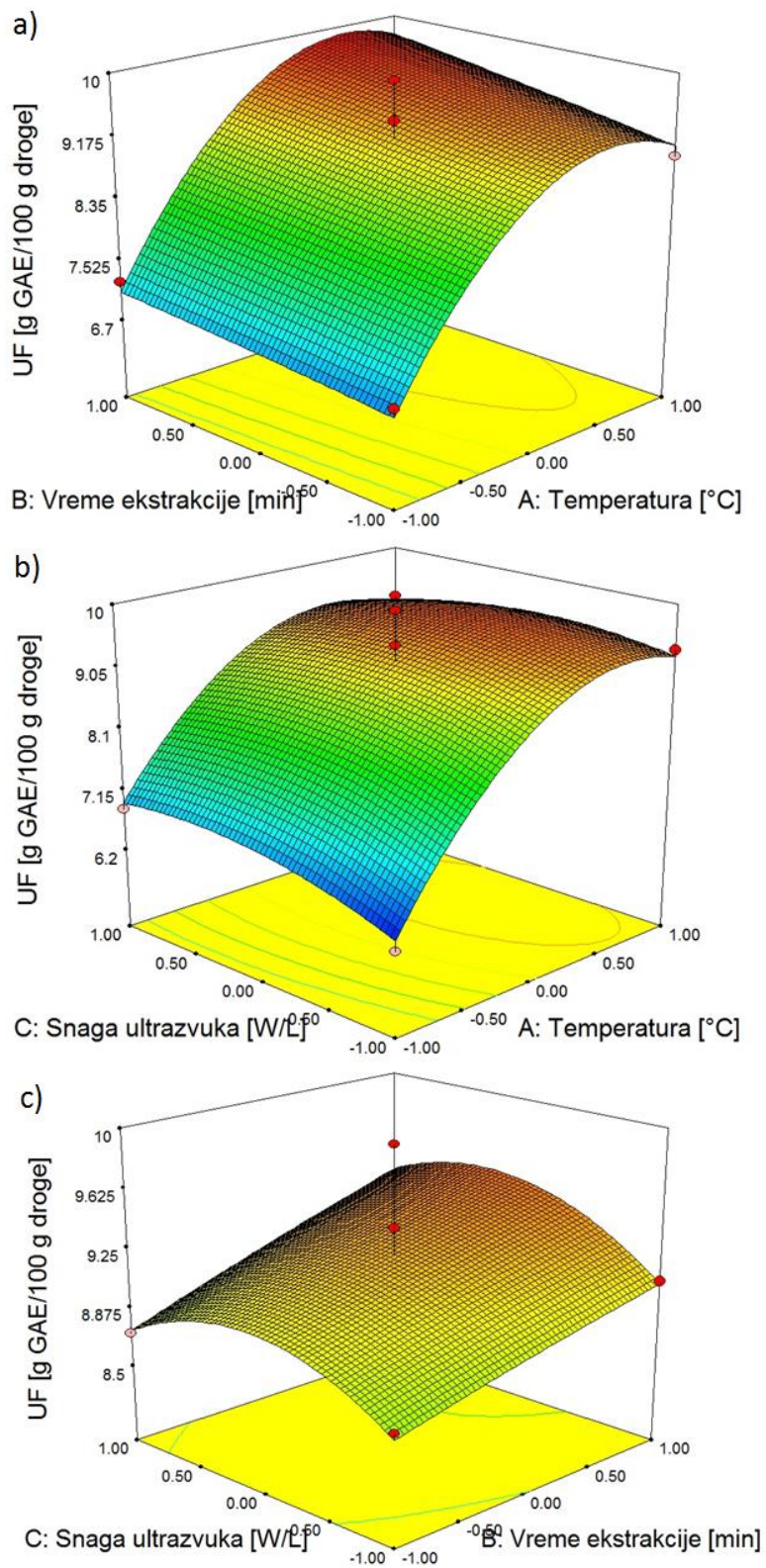
Zeković, Z., Kaplan, M., Pavlič, B., Olgun, E. O., Vladić, J., Canlı, O., Vidović, S. (2016). Chemical characterization of polyphenols and volatile fraction of coriander (*Coriandrum sativum* L.) extracts obtained by subcritical water extraction. *Industrial Crops and Products*, 87, 54-63.

Zeković, Z., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cvejic, A., Elgndi, M. A., Pavlič, B. (2014). Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 560-566.

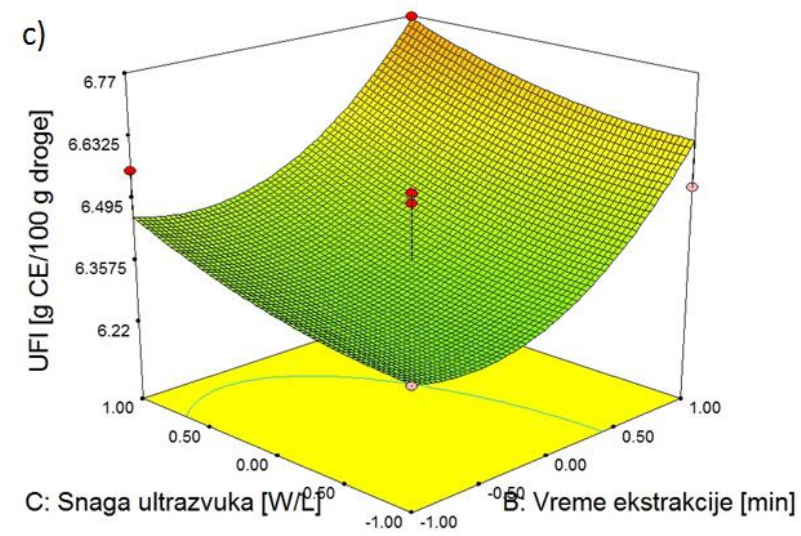
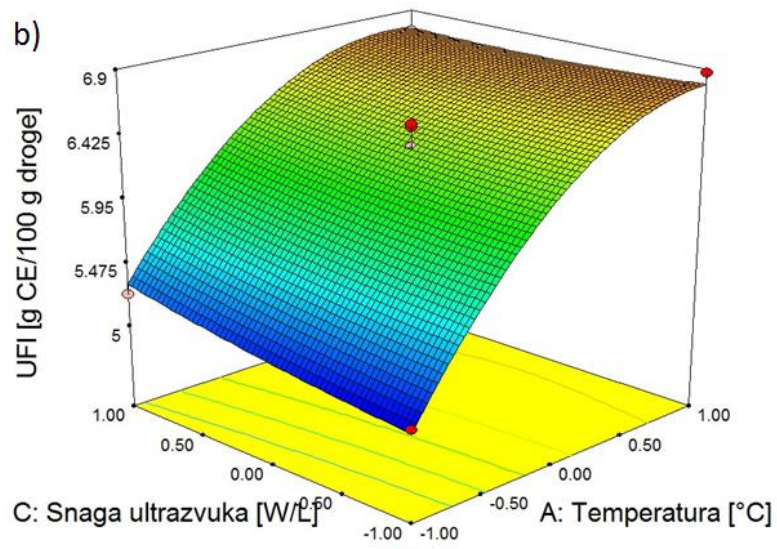
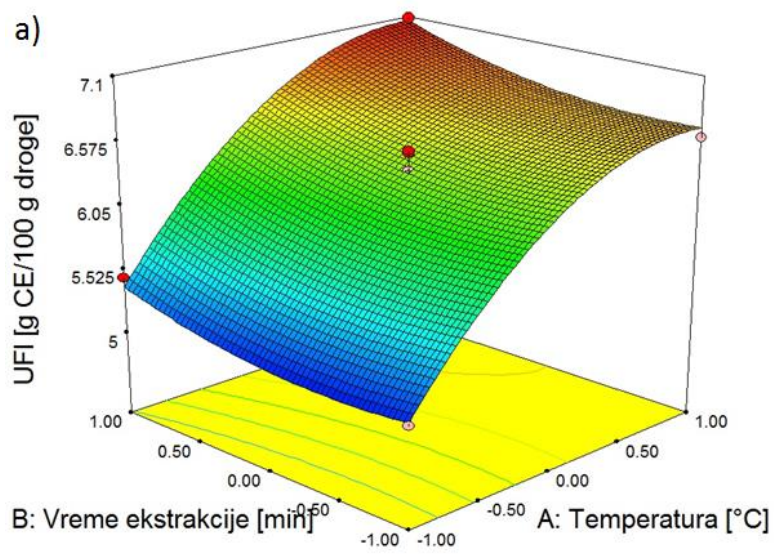
Zhang, H. F., Yang, X. H., Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(12), 672-688.

Zhou, H. Y., Liu, C. Z. (2006). Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *Journal of Chromatography A*, 1129(1), 135-139.

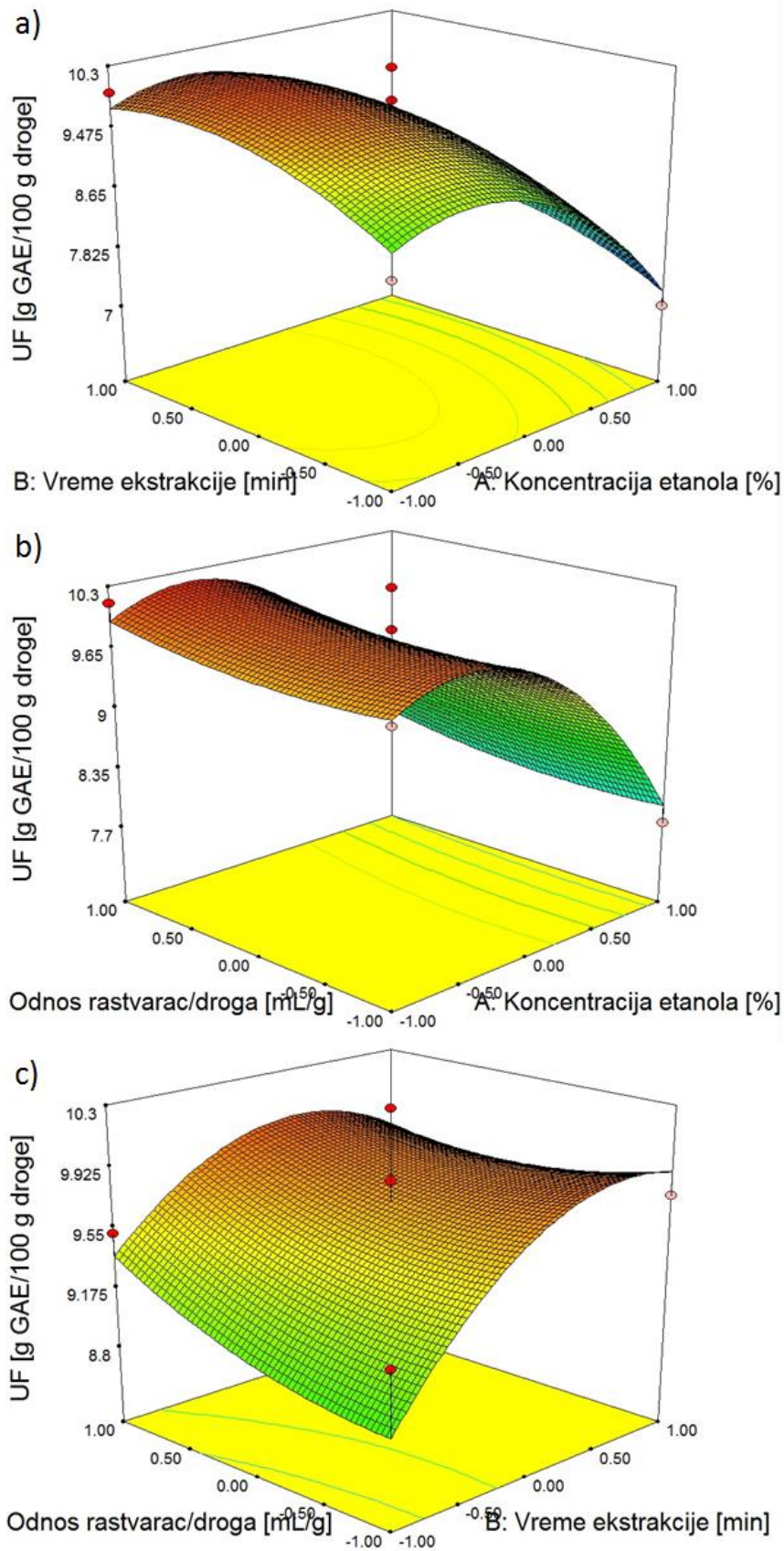
7. PRILOG



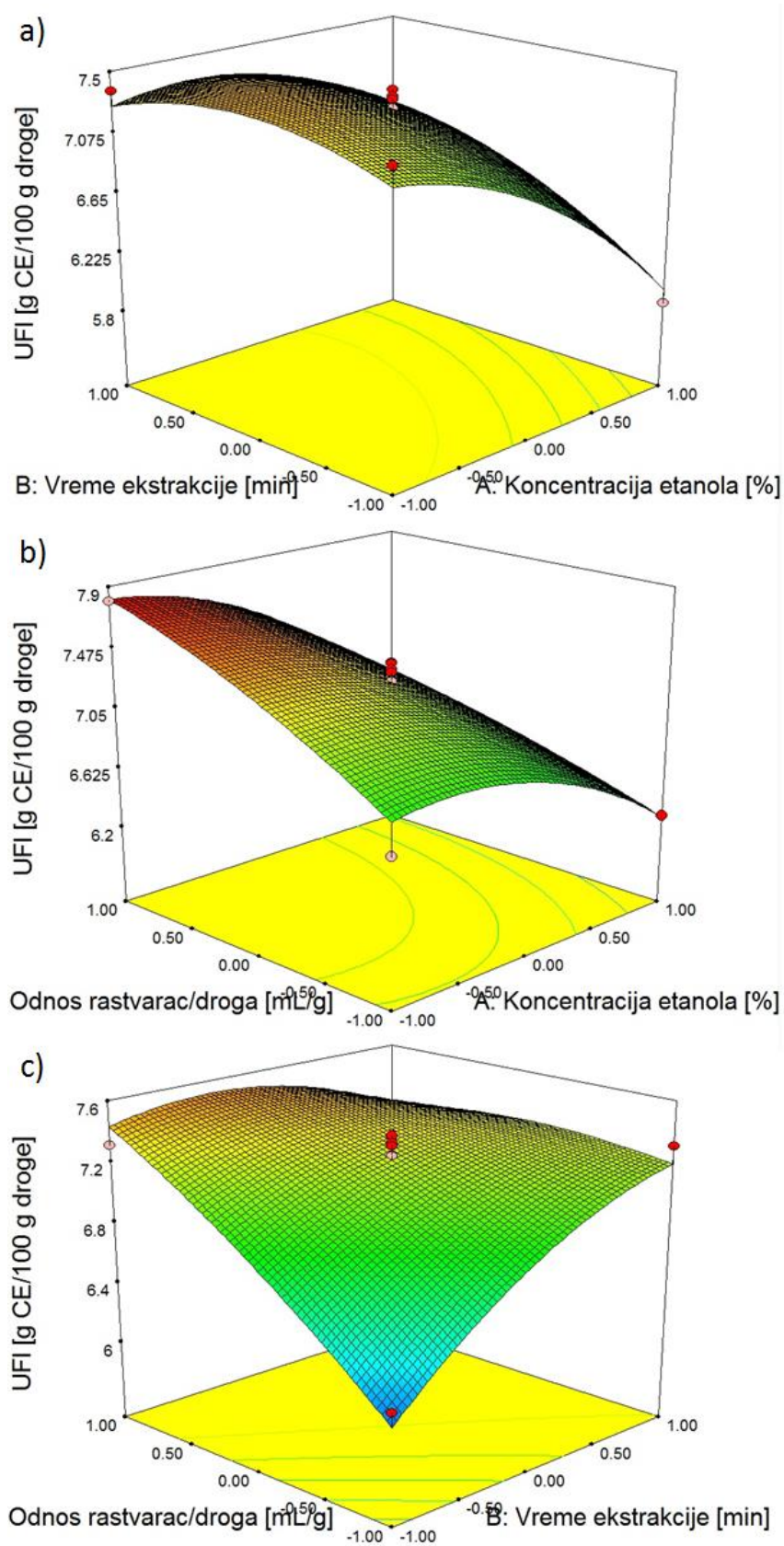
Slika P1. Uticaj parametara ultrazvučne ekstrakcije (temperatura, vreme ekstrakcije i snaga ultrazvuka) na prinos UF



Slika P2. Uticaj parametara ultrazvučne ekstrakcije (temperatura, vreme ekstrakcije i snaga ultrazvuka) na prinos UFI



Slika P3. Uticaj parametara mikrotalasne ekstrakcije (koncentracija etanola, vreme ekstrakcije i odnos rastvarač-droga) na prinos UF



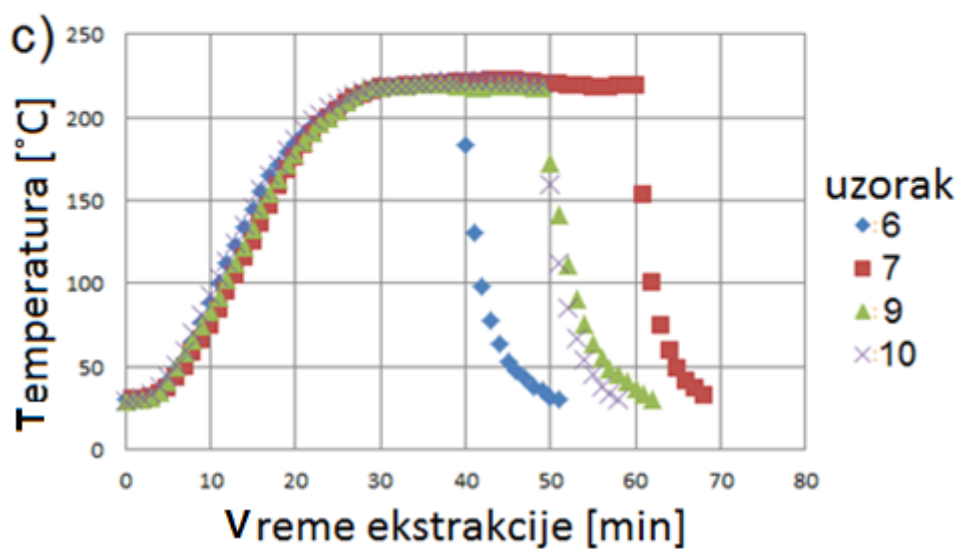
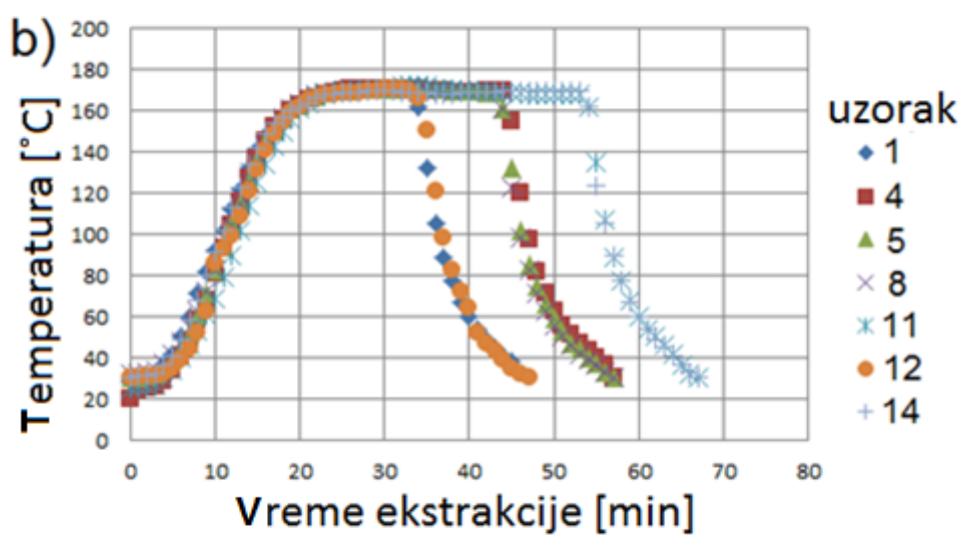
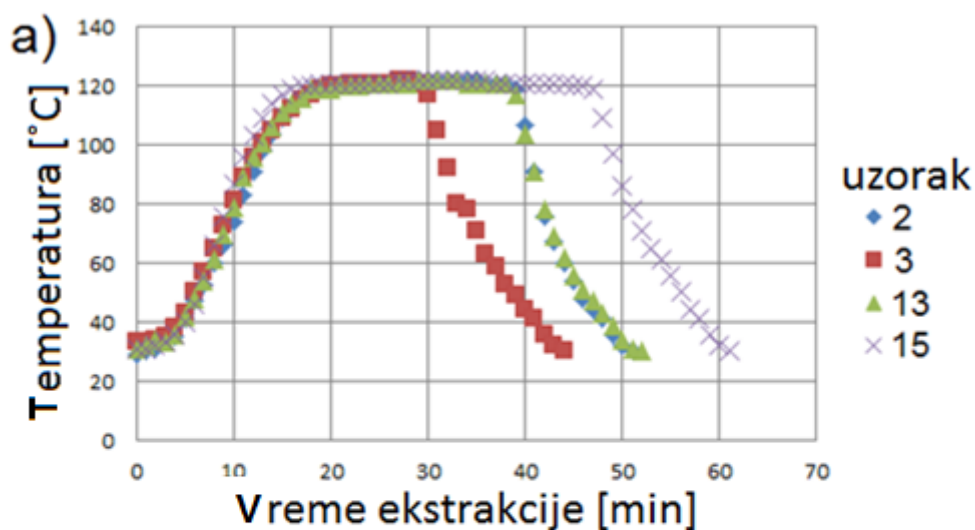
Slika P4. Uticaj parametara mikrotalasne ekstrakcije (koncentracija etanola, vreme ekstrakcije i odnos rastvarač-droga) na prinos UFI

Tabela P5. Korelaciona matrica sa Pirsonovim koeficijentima korelacije (r) za UF, UFI, DPPH \cdot , FRAP i O $_2^{\cdot-}$

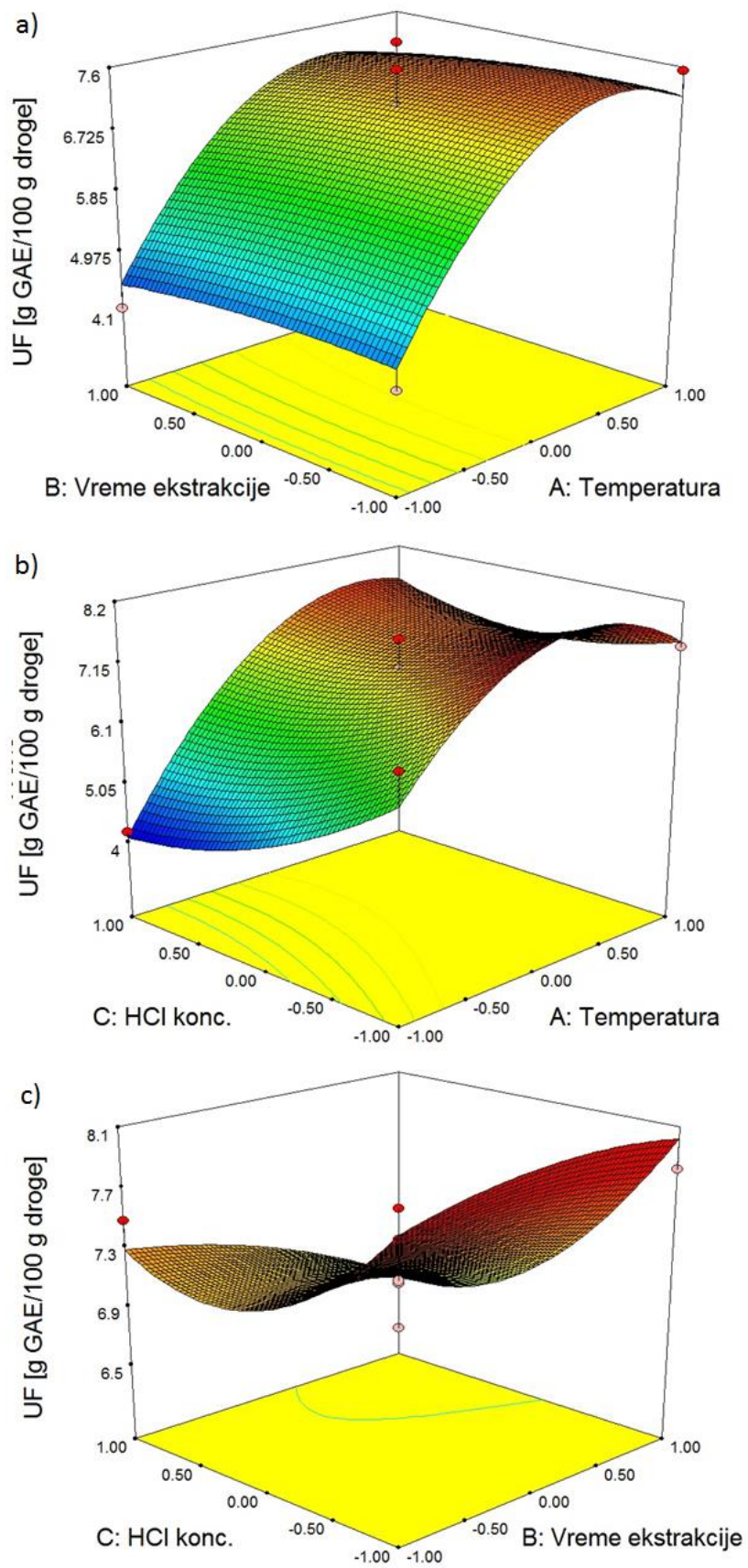
r^*	Ultrazvučna ekstrakcija					Mikrotalasna ekstrakcija				
	UF	UFI	DPPH \cdot	FRAP	O $_2^{\cdot-}$	UF	UFI	DPPH \cdot	FRAP	O $_2^{\cdot-}$
UF	1					1				
UFI	0,932**	1				0,754**	1			
DPPH \cdot	-0,612**	-0,590**	1			-0,700**	-0,811**	1		
FRAP	0,785**	0,793**	-0,602**	1		0,689**	0,581**	-0,774**	1	
O $_2^{\cdot-}$	-0,078	-0,293	0,098	0,045	1	-0,476	-0,331	0,658**	-0,582**	1

* Pirsonov koeficijent korelacije

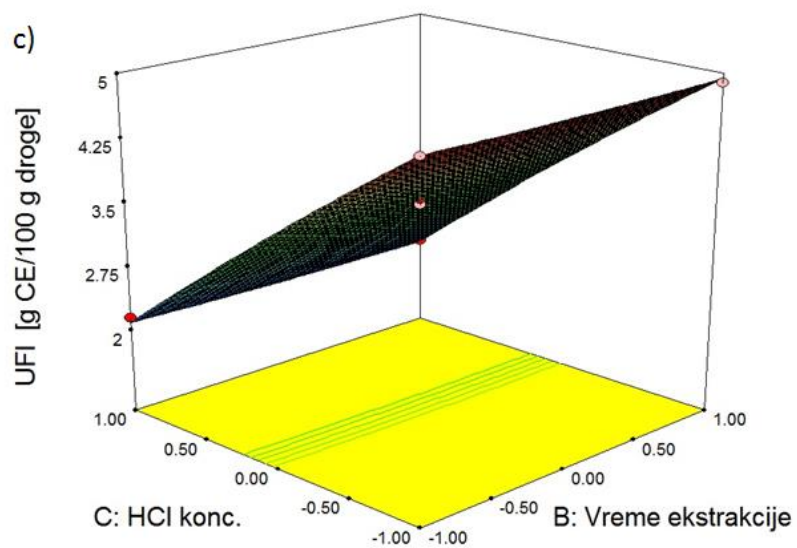
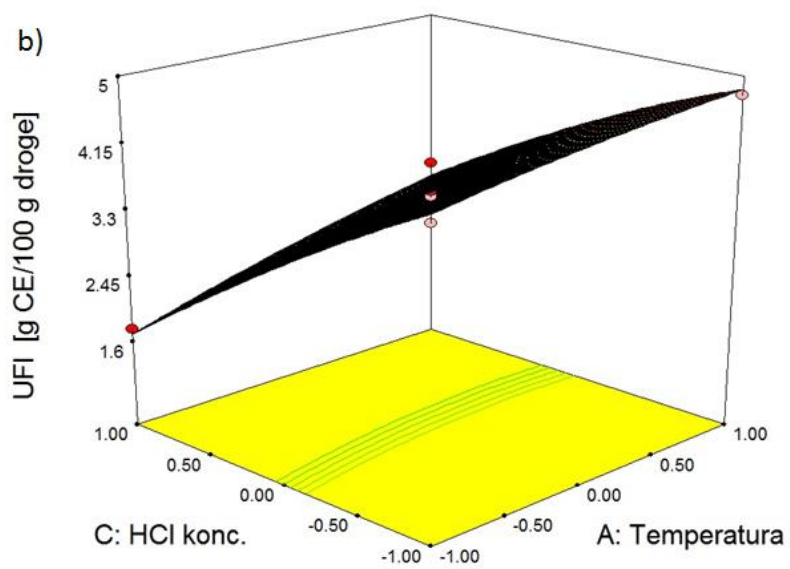
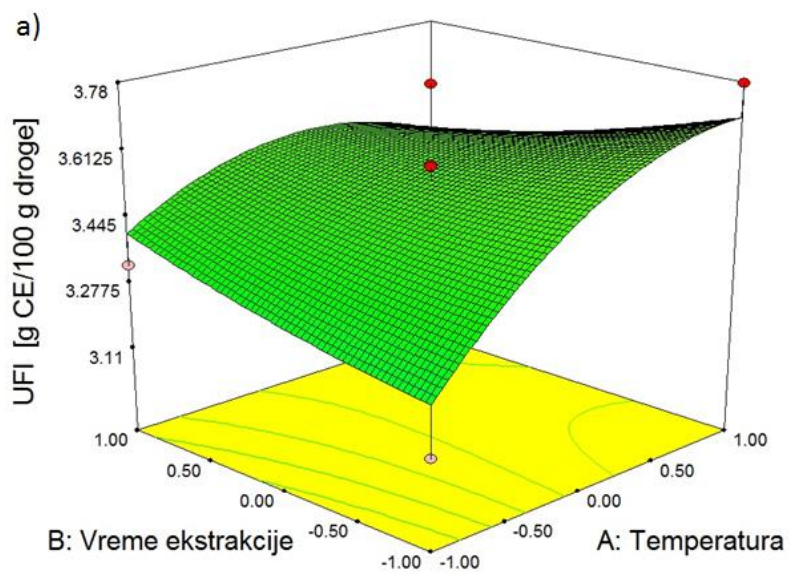
** $p < 0,05$



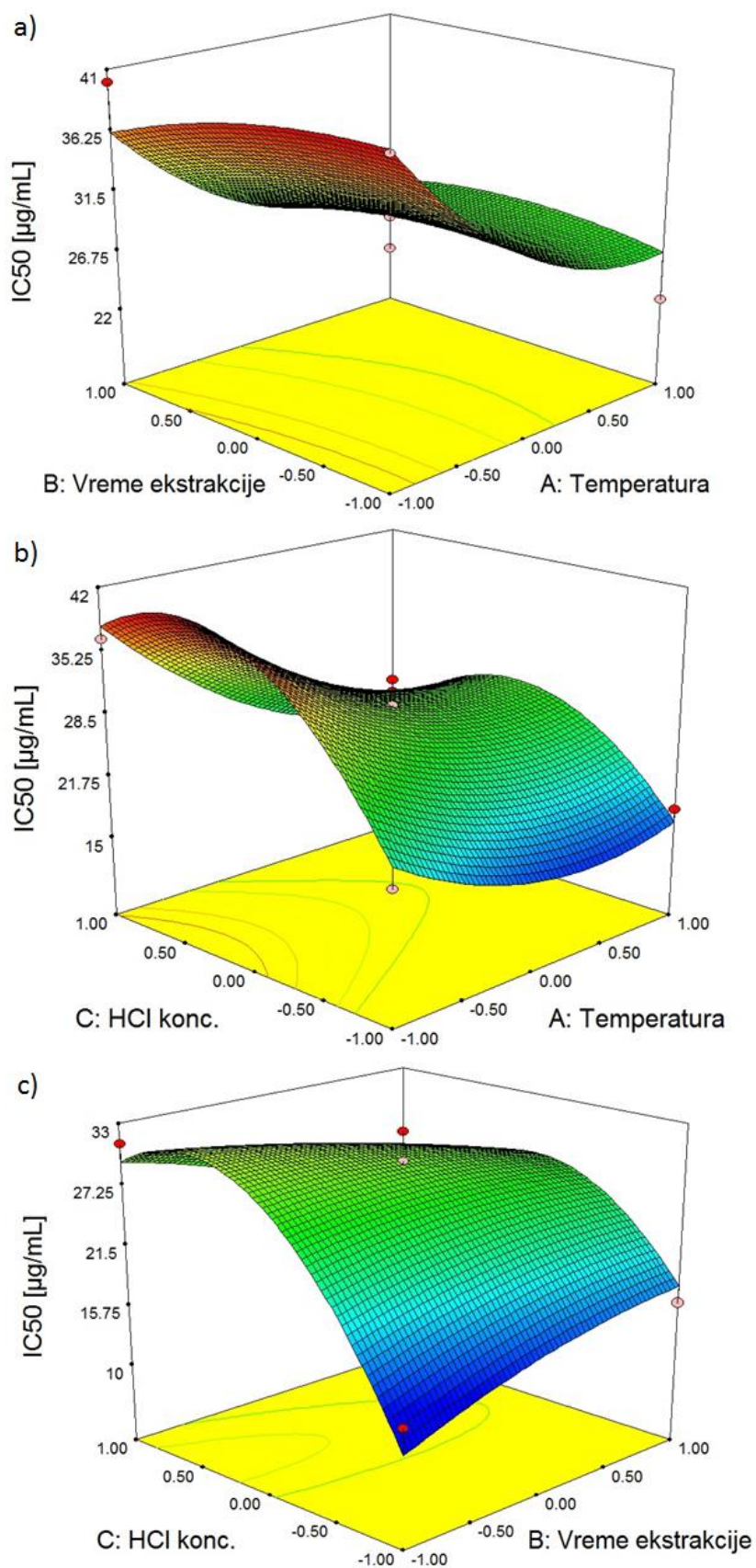
Slika P6. Temperaturni profili ekstrakcije subkritičnom vodom na a) 120°C, b) 170°C i c) 220°C



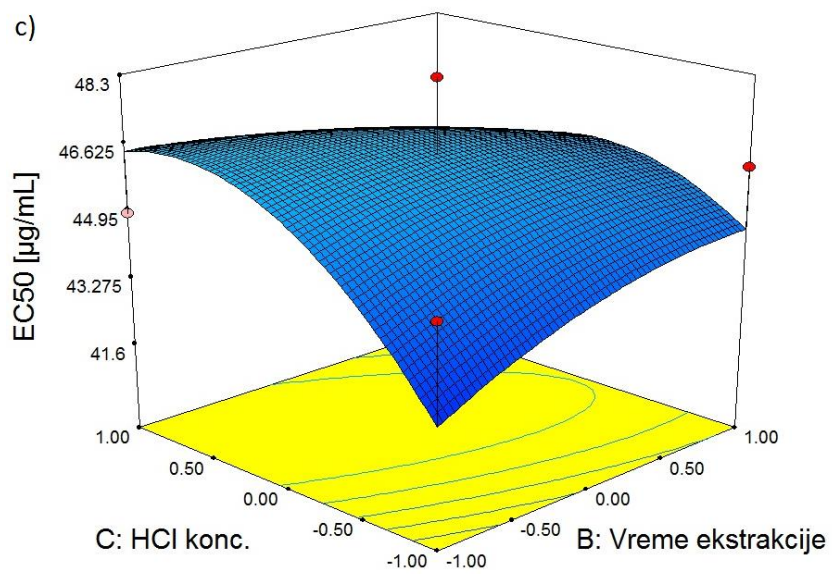
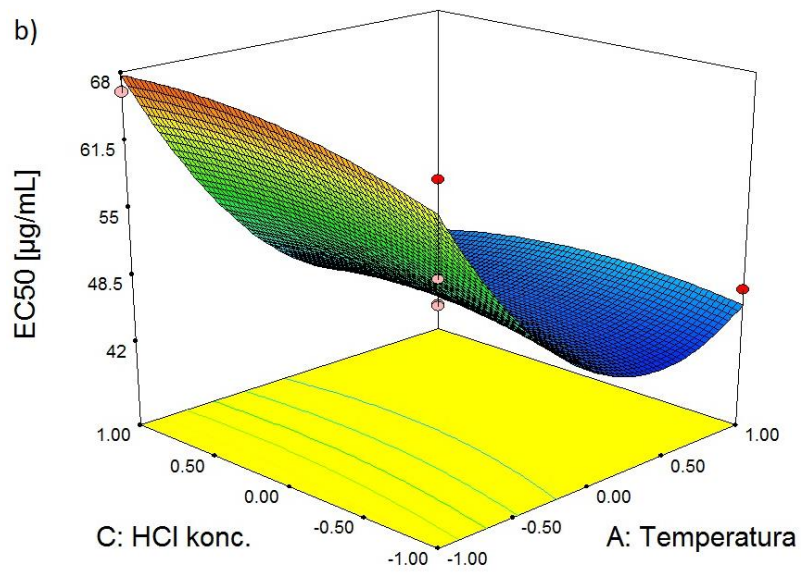
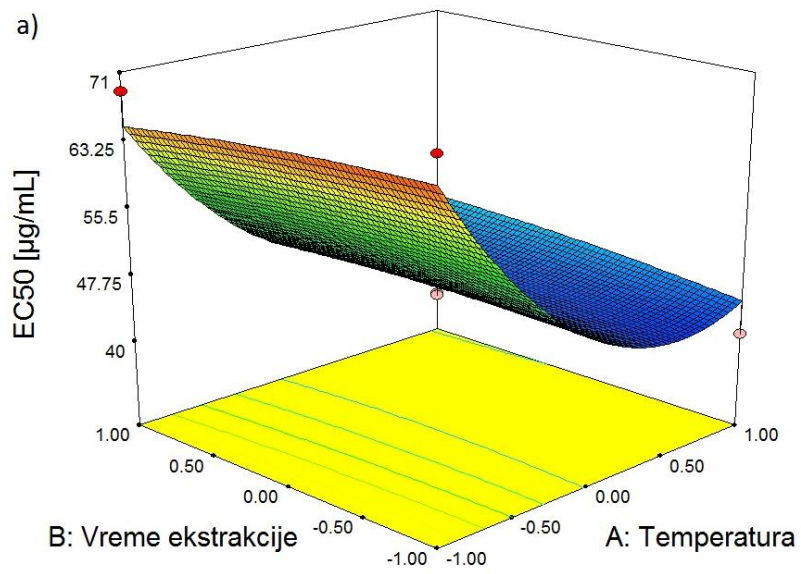
Slika P7. Uticaj parametara ekstrakcije subkritičnom vodom (temperatura, vreme ekstrakcije i koncentracija HCl) na prinos UF



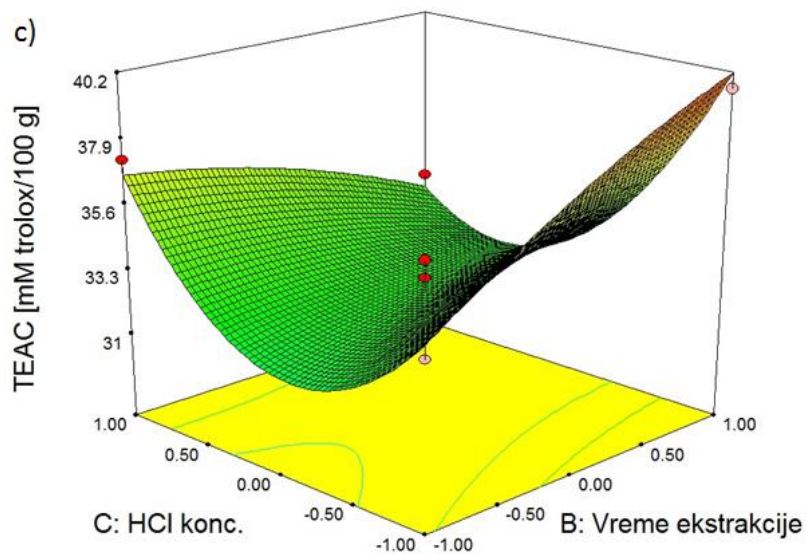
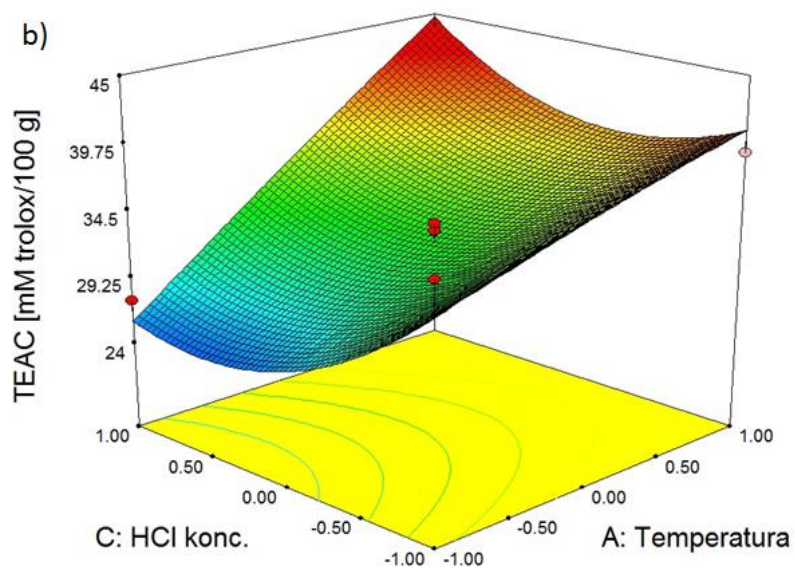
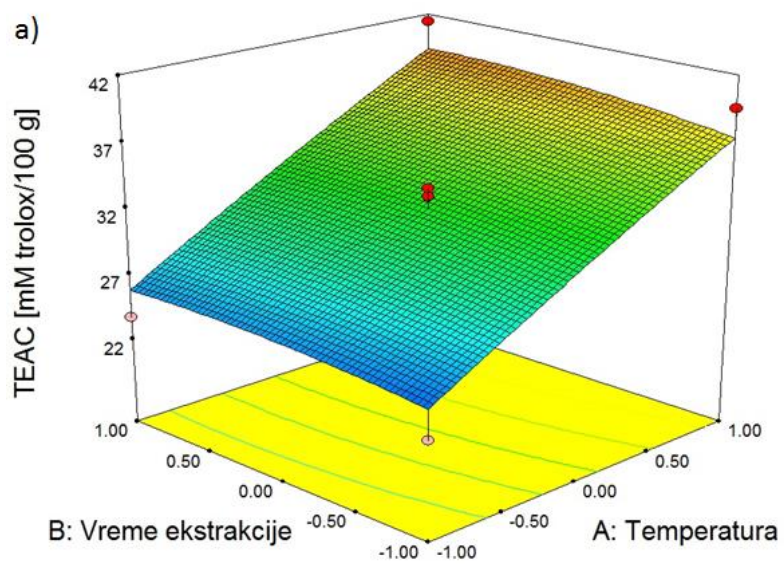
Slika P8. Uticaj parametara ekstrakcije subkritičnom vodom (temperature, vreme ekstrakcije i koncentracija HCl) na prinos UFI



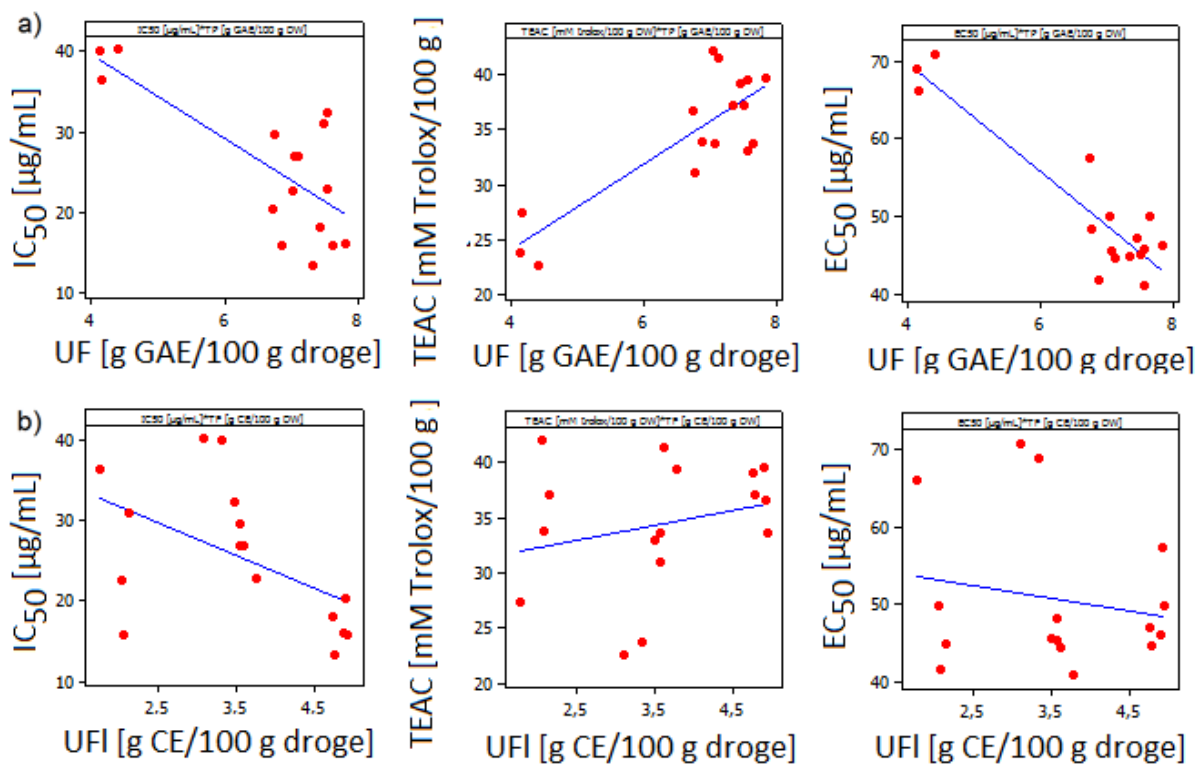
Slika P9. Uticaj parametara ekstrakcije subkritičnom vodom (temperature, vreme ekstrakcije i koncentracija HCl) na sposobnost „hvatanja“ DPPH radikala



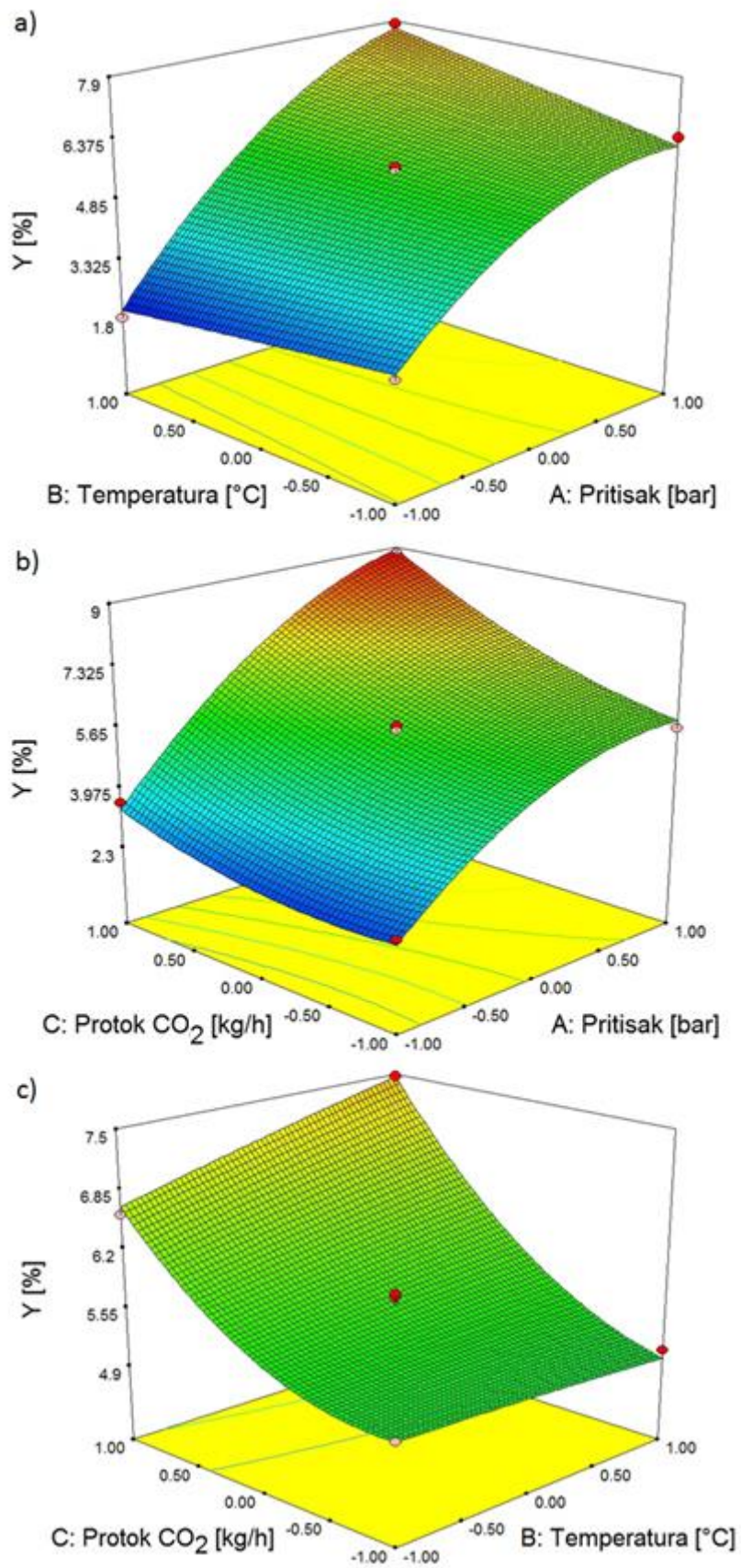
Slika P10. Uticaj parametara ekstrakcije subkritičnom vodom (temperature, vreme ekstrakcije i koncentracija HCl) na redukcionu moć ekstrakata



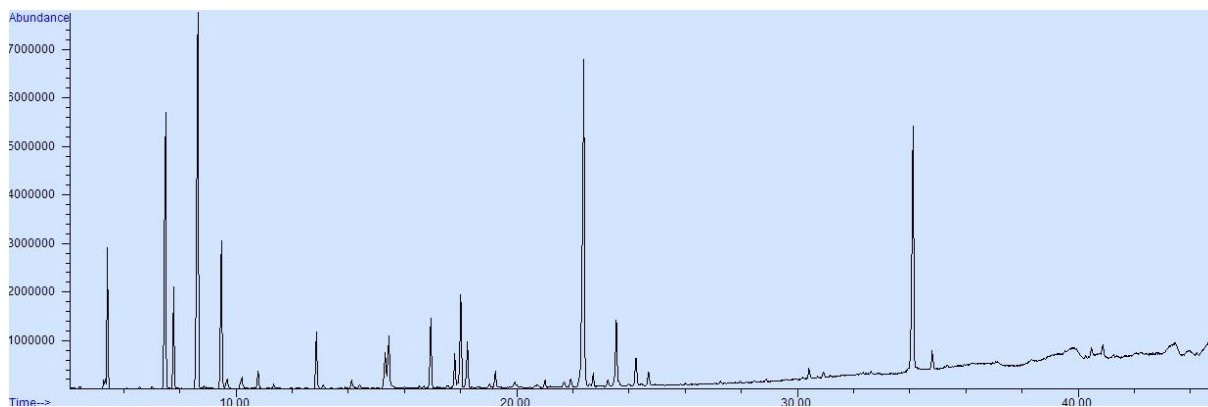
Slika P11. Uticaj parametara ekstrakcije subkritičnom vodom (temperature, vreme ekstrakcije i koncentracija HCl) na sposobnost hvatanja ABTS radikala



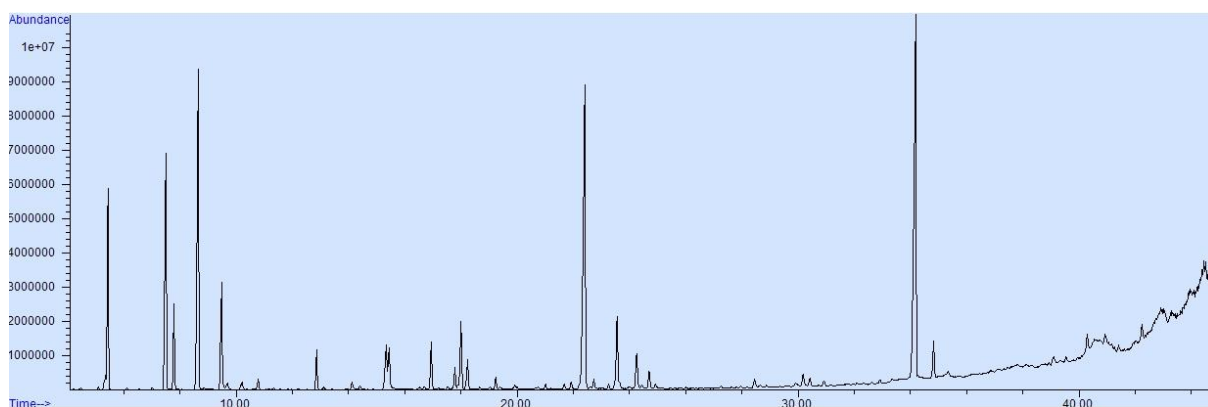
Slika P12. Korelacija između antioksidativne aktivnosti određene DPPH, ABTS i testom redukcione moći: a) UF i b) UFI u ekstraktima SPŽ dobijenim subkritičnom vodom.



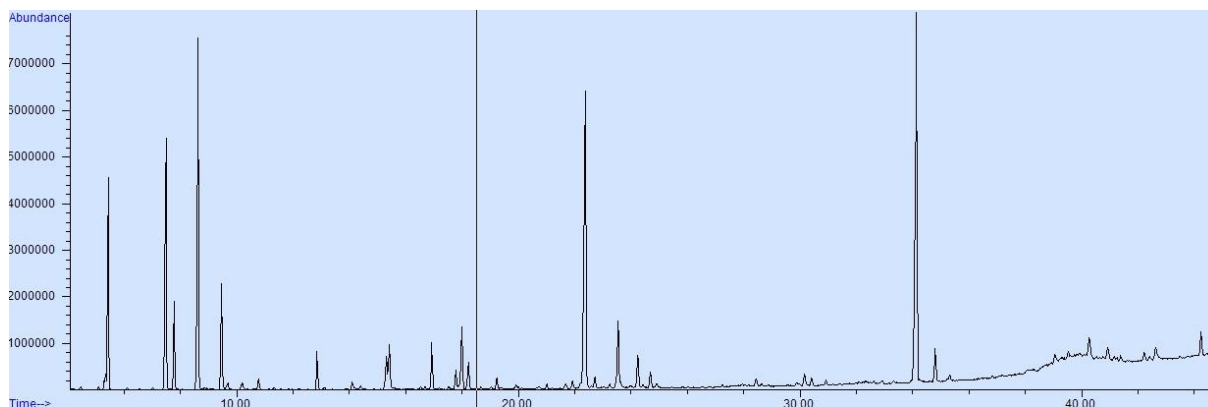
Slika P13. Uticaj parametara superkriticne ekstrakcije (pritisak, temepratura i protok CO₂) na ukupni prinos ekstrakcije



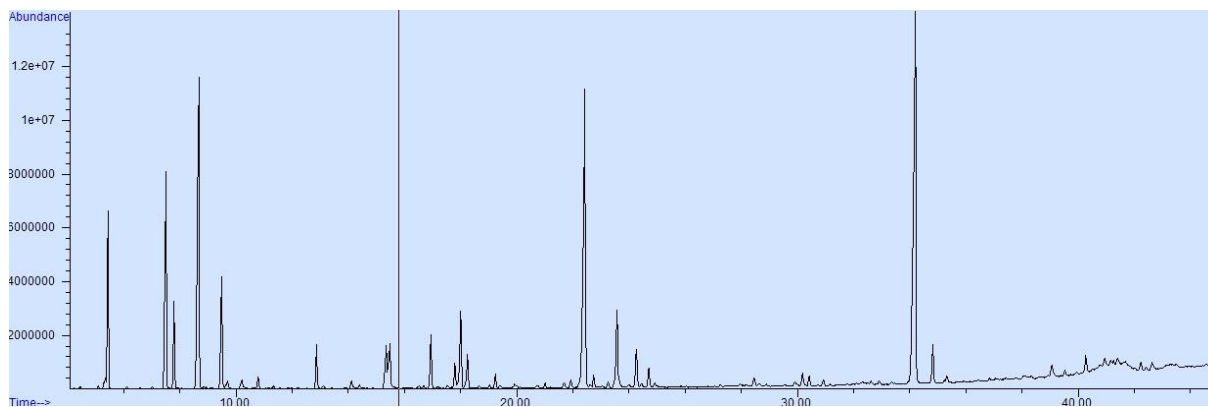
Slika P14. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (100 bara, 60°C i 0,3 kg CO₂/h)



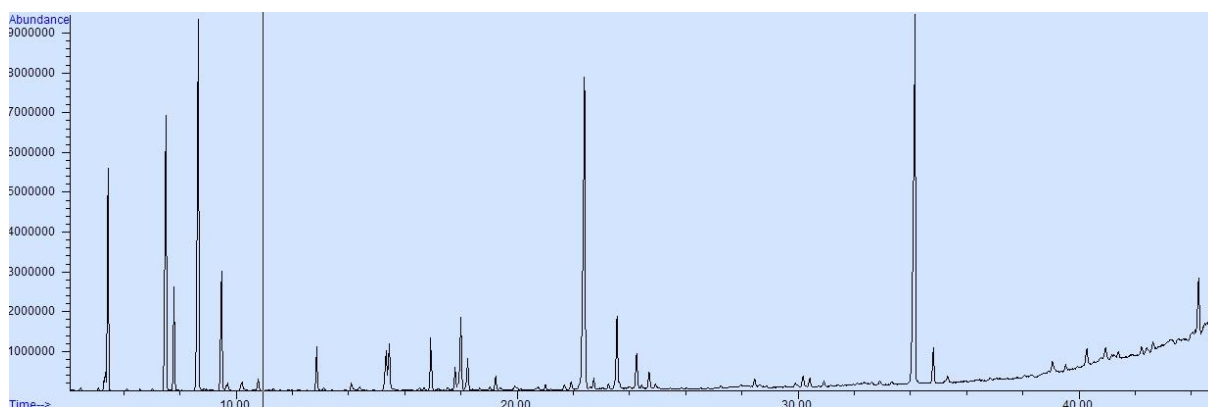
Slika P15. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (300 bara, 50°C i 0,2 kg CO₂/h)



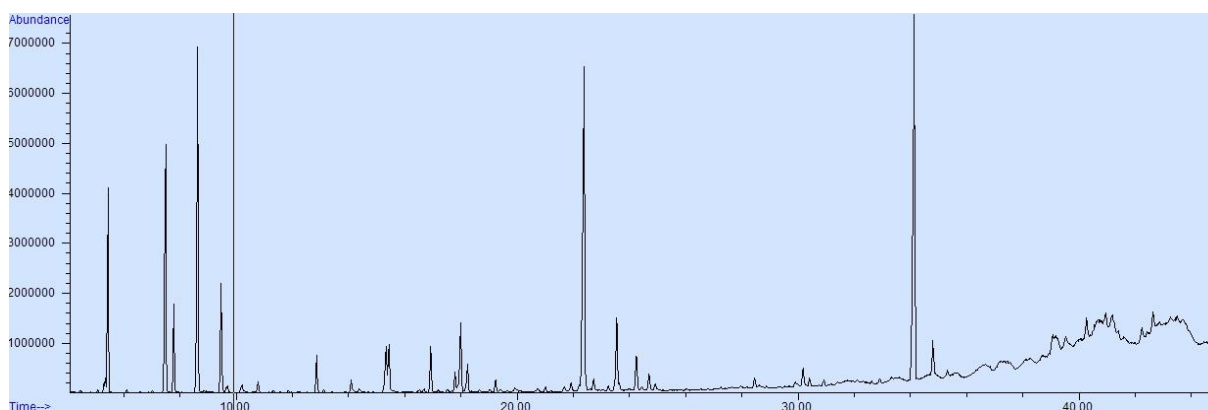
Slika P16. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (200 bara, 40°C i 0,4 kg CO₂/h)



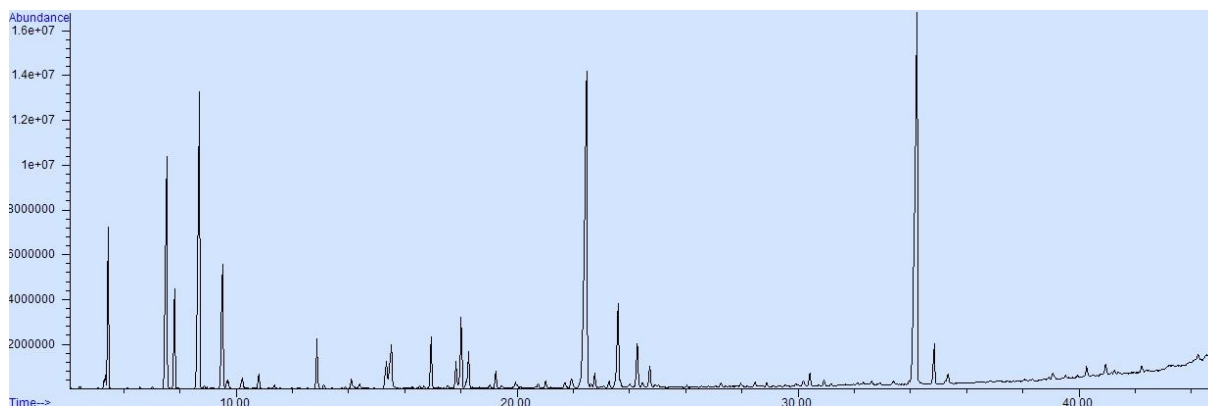
Slika P17. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (200 bara, 60°C i 0,2 kg CO₂/h)



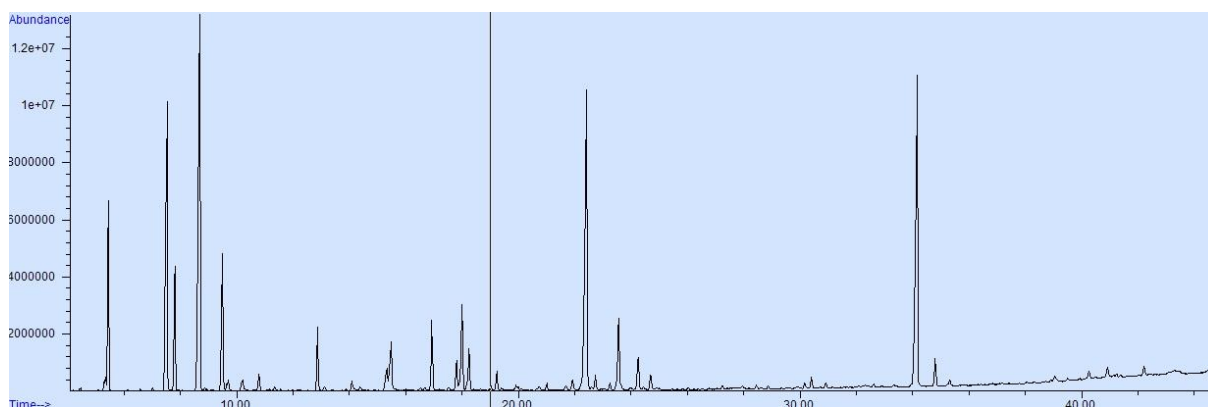
Slika P18. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (200 bara, 40°C i 0,2 kg CO₂/h)



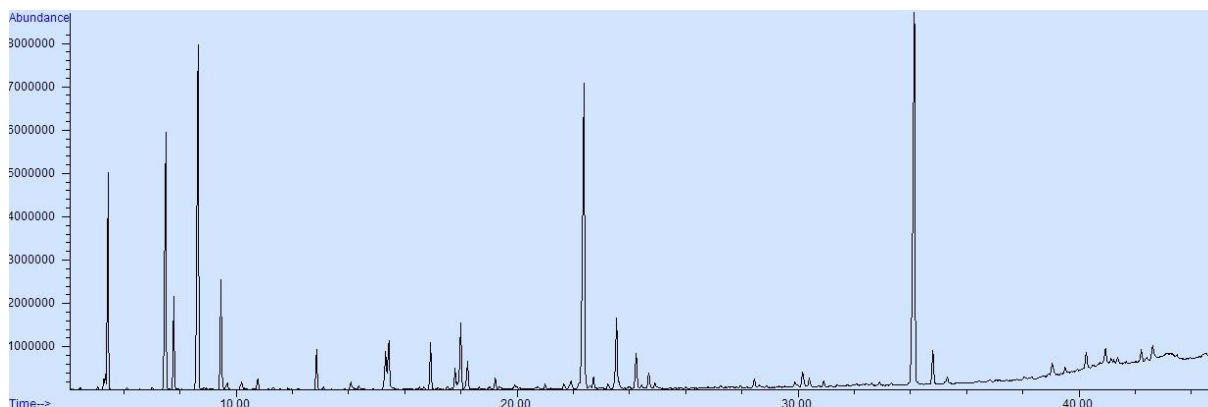
Slika P19. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (300 bara, 60°C i 0,3 kg CO₂/h)



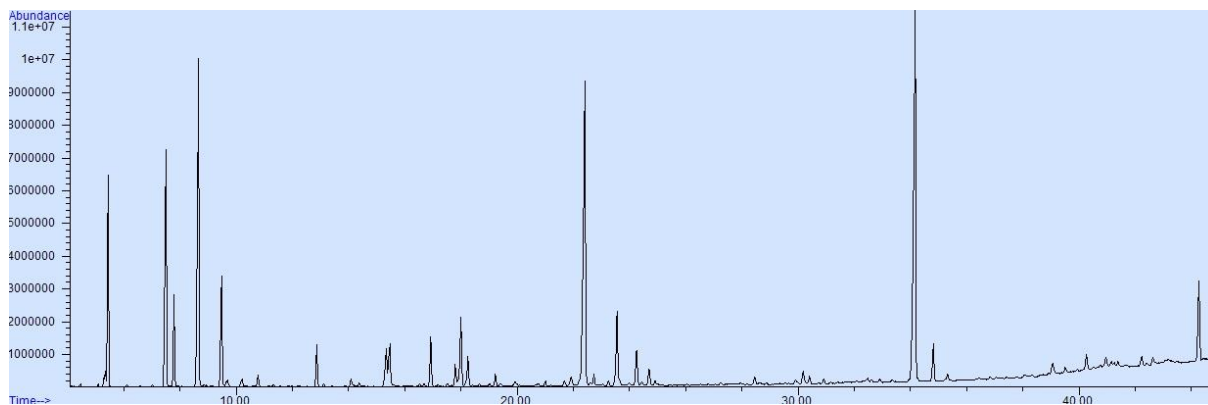
Slika P20. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (100 bara, 40°C i 0,4 kg CO₂/h)



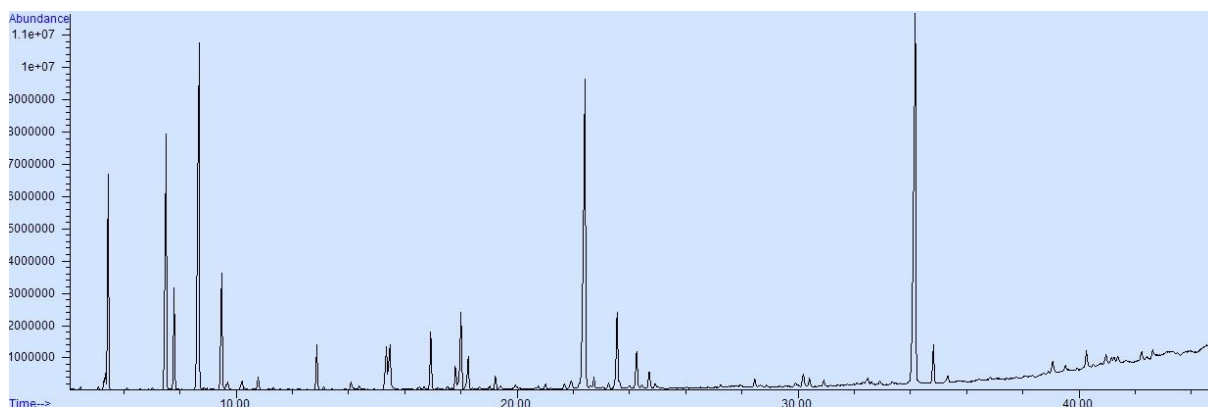
Slika P21. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (100 bara, 50°C i 0,2 kg CO₂/h)



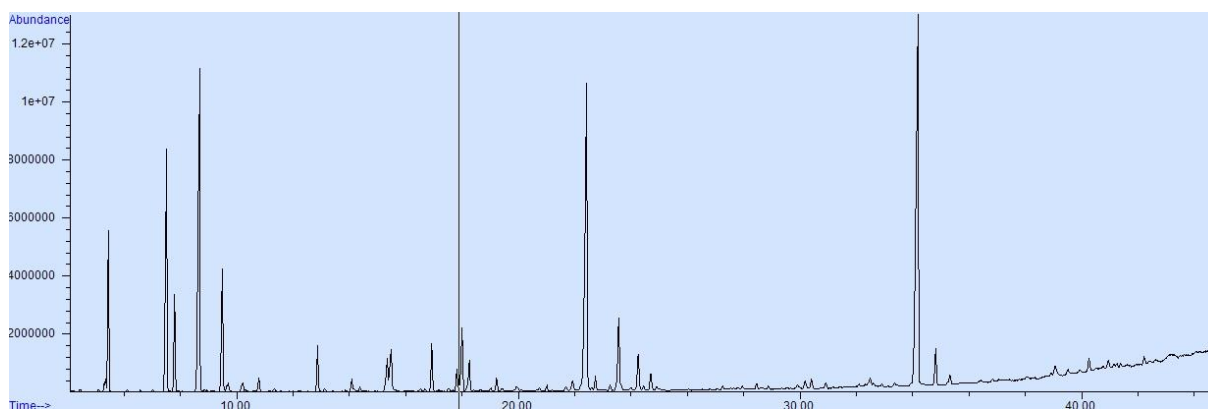
Slika P22. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (300 bara, 40°C i 0,3 kg CO₂/h)



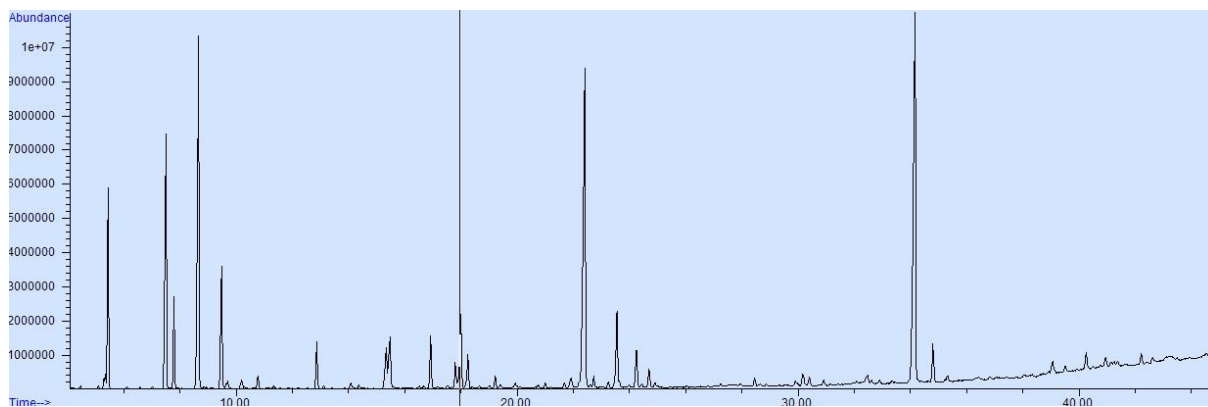
Slika P23. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (200 bara, 60°C i 0,4 kg CO₂/h)



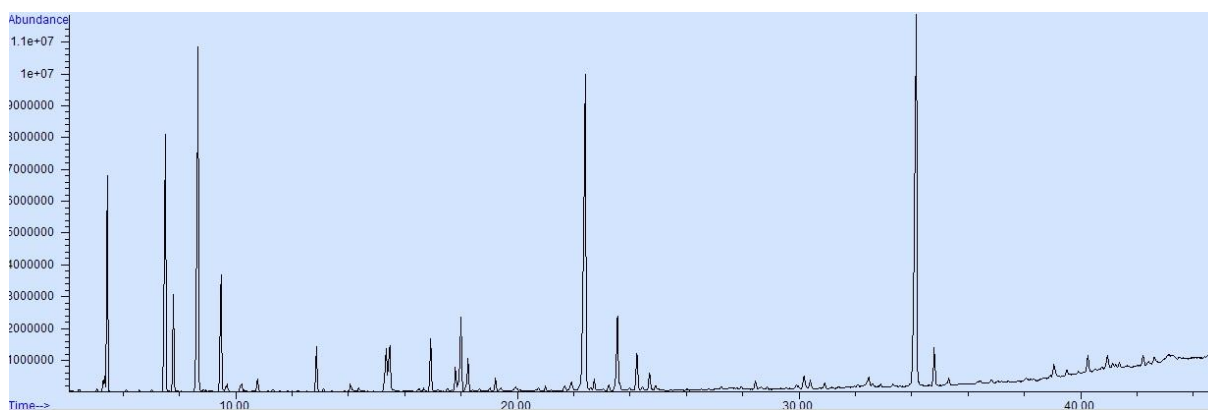
Slika P24. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (200 bara, 50°C i 0,3 kg CO₂/h)



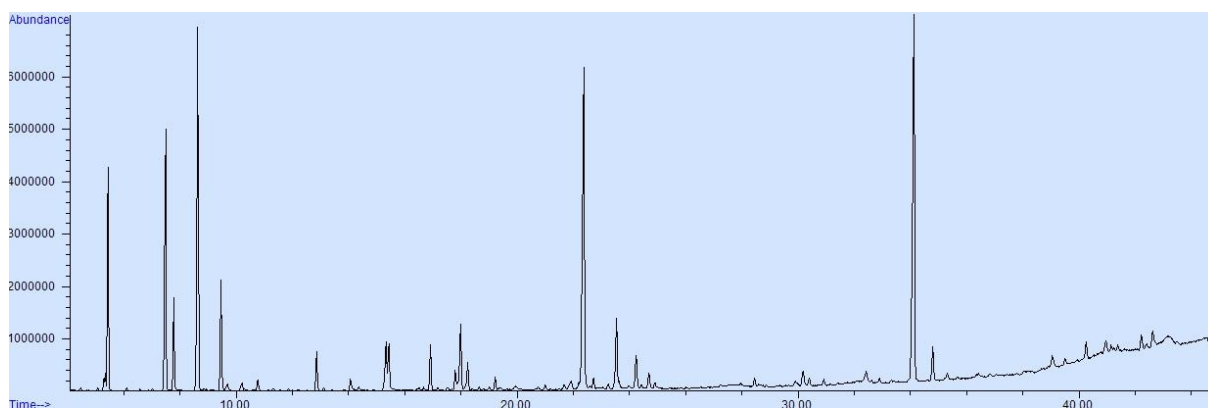
Slika P25. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (100 bara, 40°C i 0,3 kg CO₂/h)



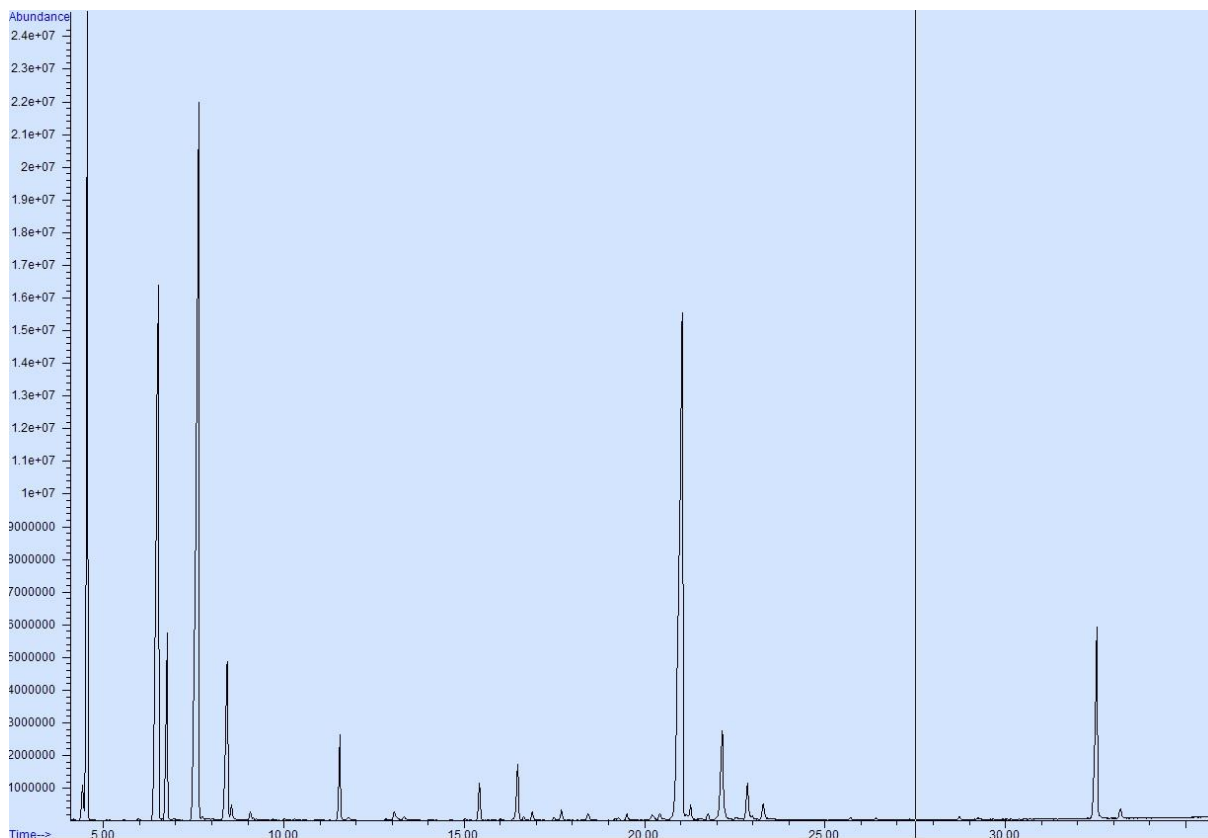
Slika P26. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (200 bara, 50°C i 0,3 kg CO₂/h)



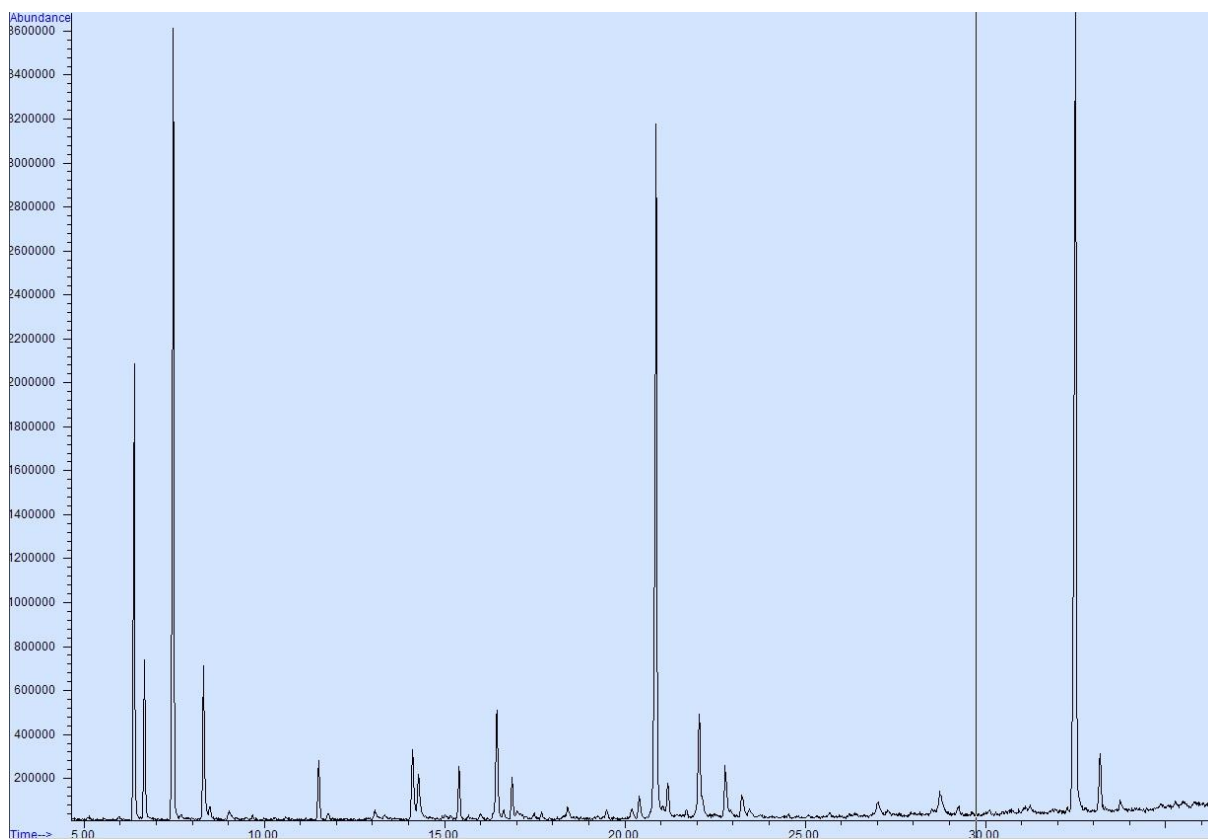
Slika P27. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (200 bara, 50°C i 0,3 kg CO₂/h)



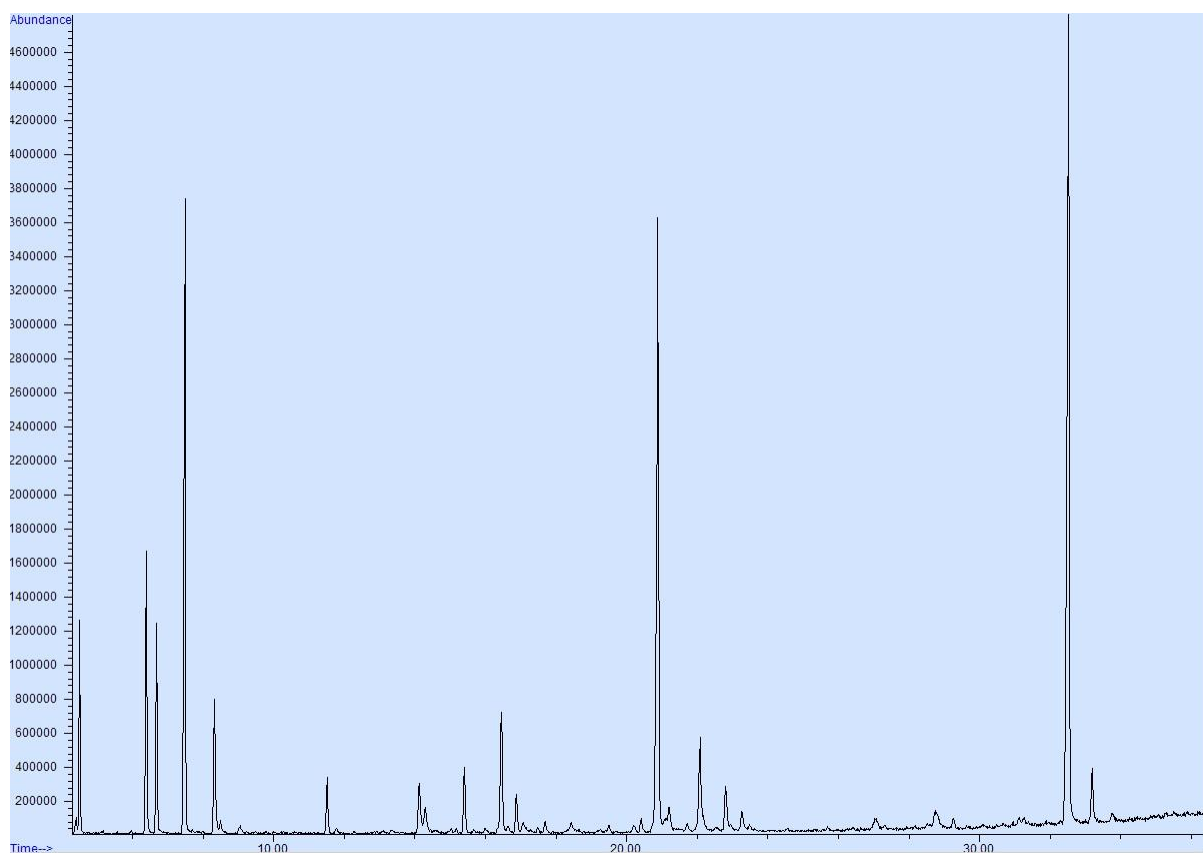
Slika P28. GC hromatogram superkritičnog ekstrakta SPŽ (300 bara, 50°C i 0,4 kg CO₂/h)



Slika P29. GC hromatogram etarskog ulja SPŽ



Slika P30. GC hromatogram ekstrakta SPŽ dobijenog Soxhlet ekstrakcijom (metilen hlorid)



Slika P31. GC hromatogram ekstrakta SPŽ dobijenog Soxhlet ekstrakcijom (*n*-heksan)

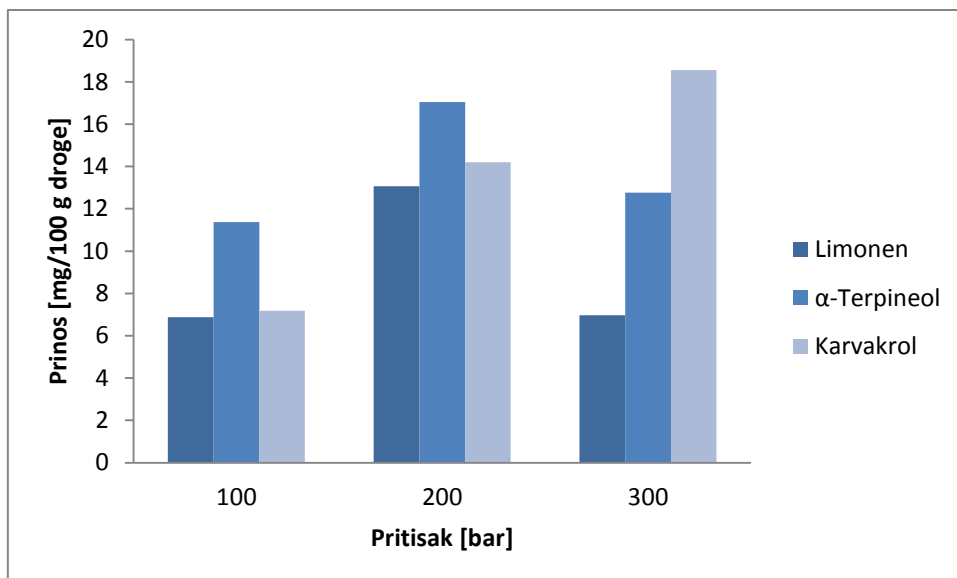
Tabela P32. Sadržaj pojedinačnih monoterpena u etarskom ulju i lipofilnim ekstraktima SPŽ dobijenim superkritičnom i Soxhlet ekstrakcijom

Jedinjenje	Sadržaj [g/100 g ekstrakta]																			EU ^a	Sox-MeCl ^b	Sox-Hex ^c
	SFE-1	SFE-2	SFE-3	SFE-4	SFE-5	SFE-6	SFE-7	SFE-8	SFE-9	SFE-10	SFE-11	SFE-12	SFE-13	SFE-14	SFE-15	SFE-16	SFE-17	SFE-18				
d-Limonen	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	1,3	0,1	0,1	
Eukaliptol	1,9	2,8	2,4	3,4	2,8	1,8	3,8	3,2	2,5	3,1	3,0	3,1	2,8	3,3	2,2	1,6	2,2	2,4	10,3	2,1	2,0	
γ-Terpinen	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1	
Linalool	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	
α-Terpineol	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	<0,1	<0,1	<0,1	
Metil-havikol	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,3	<0,1	<0,1
Geraniol	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Karvakrol	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	<0,1	<0,1	
α-Pinen	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	1,7	0,5	0,5
β-Pinen	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Kamfor	9,7	7,7	6,1	10,5	7,5	4,5	13,7	12,2	6,4	8,2	8,3	10,4	8,3	9,2	5,3	4,2	8,7	5,7	17,7	3,1	3,1	
Eugenol	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
α-Tujon	6,8	5,9	4,7	7,9	6,1	3,6	11,9	10,0	5,2	6,5	6,5	8,9	6,5	7,3	4,3	3,2	7,4	4,7	17,0	1,7	1,2	

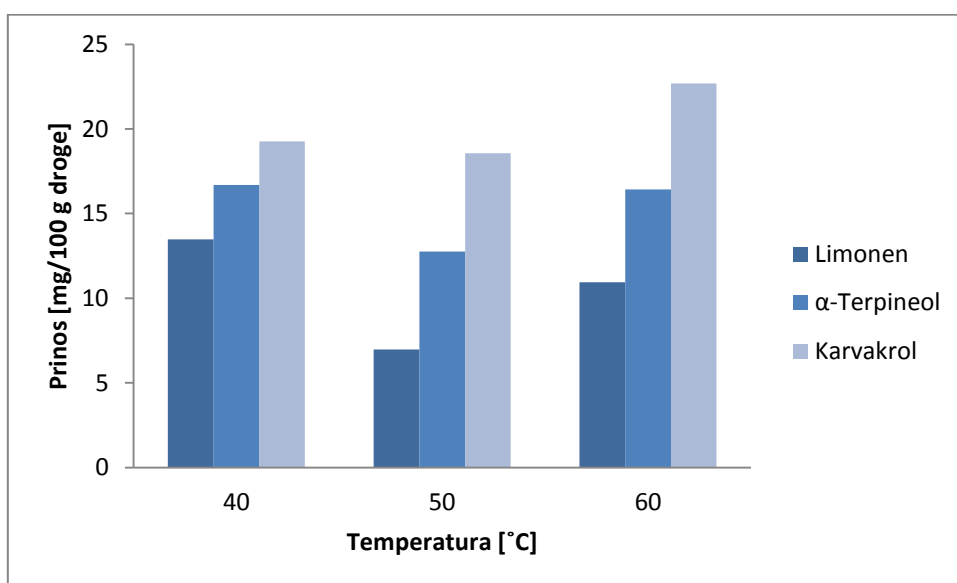
^a etarsko ulje dobijeno destilacijom vodenom parom,

^b Soxhlet ekstrakt dobijen metilen hloridom,

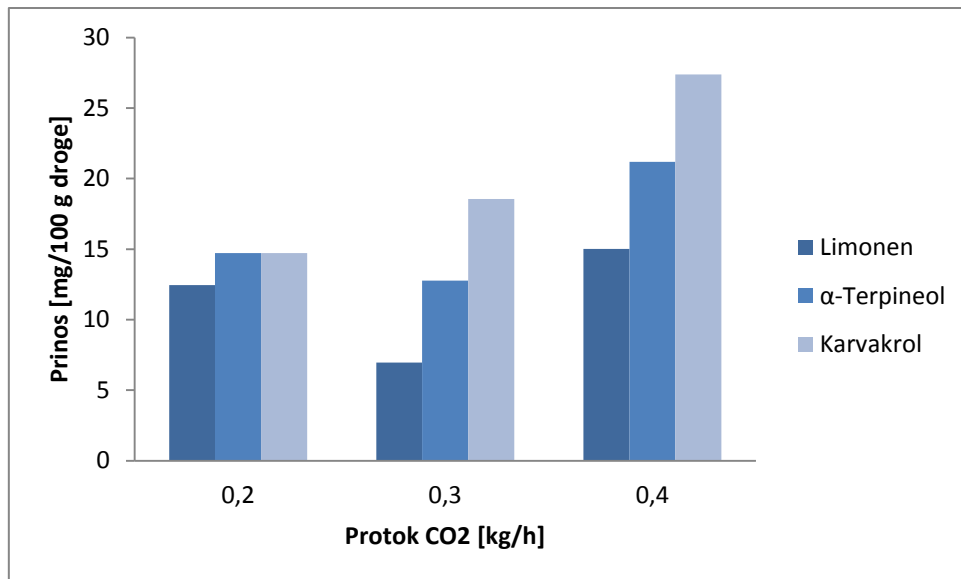
^c Soxhlet ekstrakt dobijen *n*-heksanom.



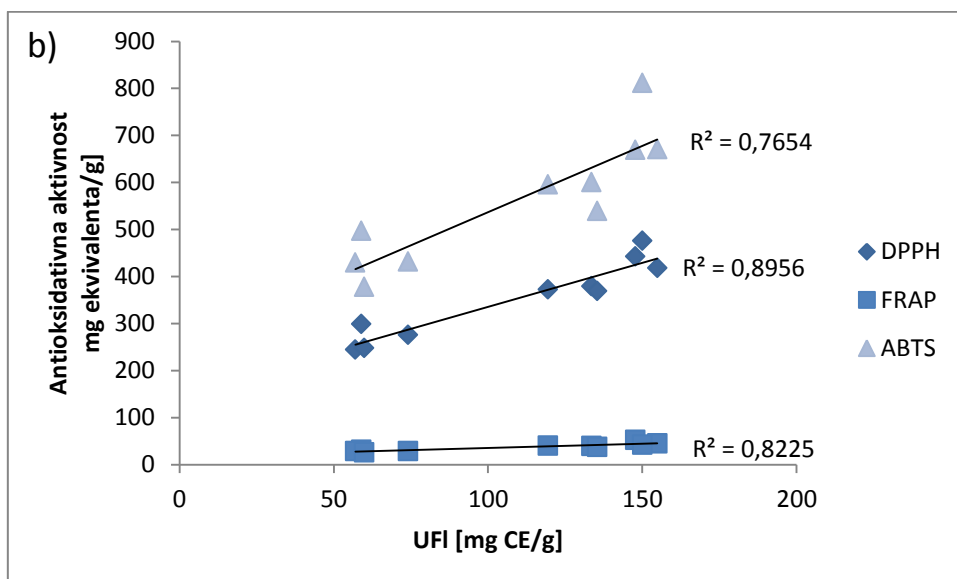
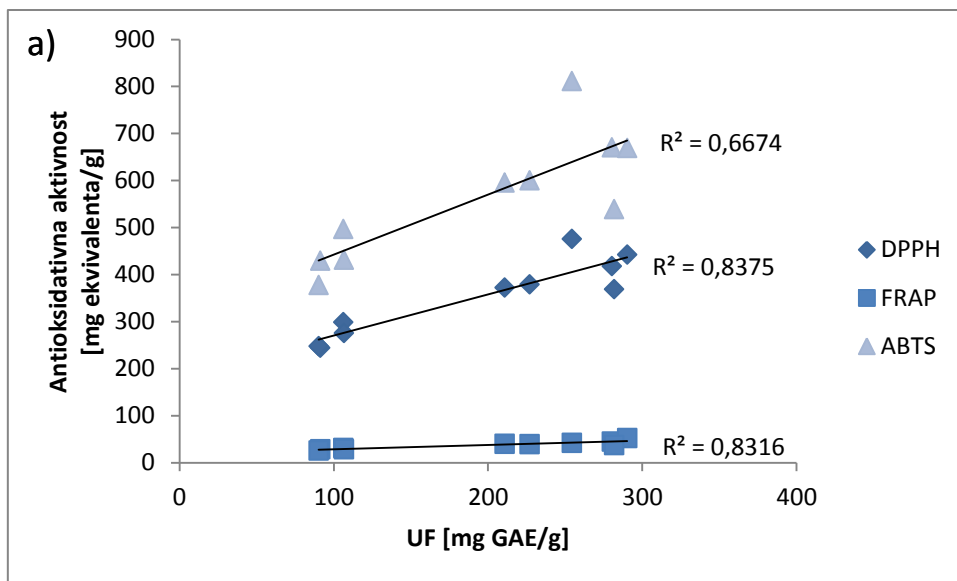
Slika P33. Uticaj pritiska na prinos ekstrakcije „sporednih“ monoterpena pri konstantnoj temperaturi (50°C) i protoku CO₂ (0,3 kg/h)



Slika P34. Uticaj temperature na prinos ekstrakcije „sporednih“ monoterpena pri konstantnom pritisku (300 bar) i protoku CO₂ (0,3 kg/h)



Slika P35. Uticaj protoka CO₂ na prinos ekstrakcije „sporednih“ monoterpena pri konstantnom pritisku (300 bar) i temperaturi (50°C)



Slika P36. Linearna veza između parametara antioksidativne aktivnosti (DPPH, FRAP i ABTS) i sadržaja a) UF i b) UFI u suvim ekstraktima SPŽ