



**УНИВЕРЗИТЕТ
У НИШУ**

Универзитетска
Библиотека
"Никола Тесла"

**UNIVERSITY
OF NIŠ**

University
Library
"Nikola Tesla"



**ДИГИТАЛНИ
РЕПОЗИТОРИЈУМ
УНИВЕРЗИТЕТА
У НИШУ**

Библиотека
Дисертације

**DIGITAL
REPOSITORY
OF THE UNIVERSITY
OF NIŠ**

Ph.D. Theses



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET
LESKOVAC



mr Ivana Karabegović

KINETIKA MIKROTALASNE EKSTRAKCIJE I
KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI
IZ LOVOR VIŠNJE (*PRUNUS LAUROCERASUS* L.)

doktorska disertacija

Leskovac, 2011.



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET
LESKOVAC



mr Ivana Karabegović

KINETIKA MIKROTALASNE EKSTRAKCIJE I
KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI
IZ LOVOR VIŠNJE (*PRUNUS LAUROCERASUS* L.)

doktorska disertacija

Mentor:

prof. dr Miodrag Lazić

Kandidat:

mr Ivana Karabegović

Leskovac, 2011.

Rezultati do kojih je u svojoj doktorskoj disertaciji došao kandidat, mr Ivana Karabegović, predstavljaju originalni naučni doprinos poznavanju kinetike ekstrakcije i destilacije aktivnih komponenti iz biljnih sirovina kao i karakterizacije dobijenih ekstrakata na primeru reliktna biljne vrste *Prunus laurocerasus* L. Model zasnovan na teoriji filma preporučuje se za matematičko opisivanje kinetike mikrotalasne ekstrakcije. Primenom većih snaga mikrotalasa i polarnijih rastvarača dobijaju se veći prinosi, a nezavisno od tehnike i uslova ekstrakcije najzastupljenija komponenta metanolnih ekstrakta lista i mesa ploda lovor višnje je hlorogena kiselina, dok se ulje srca koštica uglavnom sastoji od oleinske kiseline. Primena mikrotalasa drastično skraćuje proces destilacije etarskog ulja, čija je najzastupljenija komponenta benzaldehid.

Rezultate svog dosadašnjeg naučnoistraživačkog rada kandidat je objavio u 6 radova u časopisima međunarodnog značaja i četiri rada u časopisima nacionalnog značaja. Imajući u vidu iznete činjenice, Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološkog fakulteta u Leskovcu da doktorsku disertaciju mr Ivane Karabegović pod naslovom „**Kinetika mikrotalasne ekstrakcije i karakterizacija bioaktivnih komponenti iz lovor višnje (*Prunus laurocerasus* L.)**“ prihvati kao uslov za sticanje naučnog stepena doktora tehničkih nauka i kandidata pozove na usmenu odbranu.

Komisija:

U Leskovcu, Beogradu
08.02.2011.

Prof. dr Vlada Veljković
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Prof. dr Miodrag Lazić
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Prof. dr Slobodan Petrović
Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu

dr Nada Nikolić, v. prof.
Tehnološki fakultet u Leskovcu

SADRŽAJ

1. UVOD	7
2. BIOAKTIVNI PROIZVODI BILJNOG POREKLA	10
2.1. EKSTRAKTI	10
2.3. MASNA ULJA	18
3. DOBIJANJE BIOAKTIVNIH PROIZVODA IZ BILJNOG MATERIJALA	20
3.1. EKSTRAKCIJA RASTVARAČIMA	20
3.1.1. MIKROTALASNA EKSTRAKCIJA	22
3.1.1.1. Mikrotalasi	22
3.1.1.2. Dejstvo mikrotalasa	22
3.1.1.3. Upotreba mikrotalasa	27
3.1.1.4. Mikrotalasna ekstrakcija	29
3.2. EKSTRAKCIJA ČVRSTO-TEČNO	35
3.2.1. OSOBINE BILJNE SIROVINE	35
3.2.1.1. Izbor, prikupljanje i identifikacija biljnog materijala	35
3.2.1.2. Sušenje i čuvanje biljnog materijala	36
3.2.1.3. Step en usitnjenosti biljnog materijala	37
3.2.1.4. Bubrenje i adsorpciona sposobnost biljne sirovine	37
3.2.1.5. Relativna gustina, zapreminska i nasipna masa biljne sirovine	38
3.2.1.6. Mehaničke osobine biljne sirovine	38
3.2.2. HIDRODINAMIČKI I FIZIČKI USLOVI	39
3.2.2.1. Hidrodinamički uslovi	39
3.2.2.2. Uloga rastvarača	39
3.2.2.3. Uticaj temperature	39
3.2.2.4. Uticaj električnog, elektromagnetnog i magnetnog polja	40
3.3. MEHANIZAM I KINETIKA EKSTRAKCIJE ČVRSTO-TEČNO	40
3.3.1. MODEL ZASNOVAN NA NESTACIONARNOJ DIFUZIJU U BILJNOJ SIROVINI	42
3.3.2. MODEL ZASNOVAN NA TEORIJI FILMA	42
3.3.3. EMPIRIJSKI MODEL – HIPERBOLNA JEDNAČINA	43
3.4. DOBIJANJE ETARSKIH ULJA	44
3.4.1. MIKROTALASNA EKSTRAKCIJA ETARSKIH ULJA	46
4. ANALIZA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI BILJNIH PROIZVODA	50
4.1. SPEKTROSKOPSKE METODE	50
4.1.1. ULTRALJUBIČASTA I VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA	50
4.1.2. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA	53
4.1.3. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTROSKOPIJA	54
4.2. HROMATOGRFSKE METODE	55
4.2.1. GASNA HROMATOGRAFIJA	55
4.2.2. TEČNA HROMATOGRAFIJA	56

4.2.3. TANKOSLOJNA HROMATOGRAFIJA	57
5. LOVOR VIŠNJA - PRUNUS LAUROCERASUS L.	58
6. EKSPERIMENTALNI DEO	61
6.1. MATERIJAL	61
6.2. DOBIJANJE BIOAKTIVNIH PROIZVODA	61
6.2.1. MIKROTALASNA EKSTRAKCIJA	63
6.2.2. KLASIČNA EKSTRAKCIJA	63
6.2.3. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	63
6.2.4. EKSTRAKCIJA PO SOXHLET-U	64
6.2.5. HIDRODESTILACIJA ETARSKOG ULJA	64
6.2.6. HIDRODESTILACIJA ETARSKOG ULJA POD DEJSTVOM MIKROTALASA	64
6.2.7. SUVA DESTILACIJA ETARSKOG ULJA POD DEJSTVOM MIKROTALASA	64
6.2.8. DOBIJANJE SOKA PLODA LOVOR VIŠNJE	65
6.3. KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNIH PROIZVODA	65
6.3.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST, SADRŽAJ UKUPNIH FENOLNIH JEDINJENJA I FLAVONOIDA U EKSTRAKTIMA LISTA I MESA PLODA LOVOR VIŠNJE	65
6.3.1.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti - DPPH test	65
6.3.1.2. Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja	66
6.3.1.3. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida	66
6.3.2. TEČNA HROMATOGRAFIJA POD VISOKIM PRITISKOM EKSTRAKATA LISTA I MESA PLODA LOVOR VIŠNJE	67
6.3.3. GASNO HROMATOGRAFSKA ANALIZA ETARSKOG ULJA LISTOVA LOVOR VIŠNJE	67
6.3.4. ANALIZA MASNOG ULJA SRCA KOŠTICA PLODA LOVOR VIŠNJE	68
6.3.4.1. Dobijanje metil estara iz ulja srca koštica ploda lovor višnje	68
6.3.4.2. Gasno hromatografska analiza metil estara masnog ulja srca koštica ploda lovor višnje	68
6.4. EKSPERIMENTALNA I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	68
7. REZULTATI I DISKUSIJA	69
7.1. OSOBINE BILJNOG MATERIJALA	69
7.2. EKSTRAKCIJA RASTVARAČEM	70
7.2.1. MEHANIZAM MIKROTALASNE EKSTRAKCIJE BILJNOG MATERIJALA	70
7.2.1.1. Uticaj operativnih uslova na prinos ekstraktivnih materija	76
7.2.2. KINETIKA MIKROTALASNE EKSTRAKCIJE	77
7.2.2.1. Model zasnovan na nestacionrnoj difuziji u biljnoj sirovini	77
7.2.2.2. Model zasnovan na teoriji filma	83
7.2.2.3. Hiperbolni model	89
7.2.2.4. Poređenje modela korišćenih za modelovanje kinetike ekstrakcije	95
7.2.3. POREĐENJE TEHNIKA EKSTRAKCIJE PREMA PRINOSU EKSTRAKTA I ULJA	97
7.3. DESTILACIJA ETARSKOG ULJA LISTOVA LOVOR VIŠNJE	99
7.4. ANALIZA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ LOVOR VIŠNJE	101
7.4.1. ANALIZA UKUPNIH EKSTRAKTIVNIH MATERIJALA LISTA I MESA PLODA LOVOR VIŠNJE	101
7.4.1.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima	101
7.4.1.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata	104
7.4.2. SASTAV ULJA SRCA KOŠTICA LOVOR VIŠNJE	110
7.4.3. SASTAV ETARSKOG ULJA LISTOVA LOVOR VIŠNJE	114

8. ZAKLJUČAK	118
SAŽETAK	143
SUMMARY	144
BIOGRAFIJA	145
PRILOG	151

1. UVOD

U genofondu vaskularne flore južne Srbije posebnu vrednost predstavljaju ugrožene, retke i reliktno biljne vrste kao što je lovor višnja (*Prunus laurocerasus* L. var. *serbica* Pančić), koja u asocijaciji *Lauroceraso-Fagetum* (zajednica bukve sa lovor višnjom) raste samo na Ostrozubu i kao reliktna tercijska fitocenoza ukazuje na prošlost flore Grdeličke klisure i klimatske uslove koji su u njoj vladali (Jovanović, 1967). Bukova šuma na planini Ostrozub, u čijem jednom delu je i stanište lovor višnje, stavljena je pod zaštitu države 1950. godine, a vrsta je kao prirodna retkost u Srbiji zaštićena zakonom i obuhvaćena Akcionim planom očuvanja biodiverziteta Srbije (Žižić, 2009).

Prunus laurocerasus L. (lovor višnja, zeleniče) je zimzeleni žbun koji pripada porodici ruža – *Rosaceae* sa prirodnim staništem u Maloj Aziji, Zakavkazju, Kavkazu, Iranu, Peloponezu, Bugarskoj i Srbiji (Agencija za zaštitu životne sredine, 2004; Duke, 1992).

U tradicionalnoj turskoj medicini svi delovi ove biljne vrste od davnina se koriste kod problema sa digestivnim traktom i disajnim organima (list), u terapiji stomaknih čireva, digestivnih smetnji, bronhitisa, ekcema i hemoroida (seme) (Ayaz et al., 1998; Liyana-Pathirana et al., 2006; Yeşilada et al., 1999). Na području svog prirodnog staništa rasprostranjena je upotreba zrelog ploda u svežem ili osušenom stanju, u obliku džema, marmelade ili likera, kada se pored njegove nutritivne vrednosti ispoljava hipotenzivno i analgetičko dejstvo (Islam, 2002; Kolayli et al., 2003; Pieroni, 2000).

Svi delovi biljke sadrže amigdalini, prunasini i cijanovodonici, od kojih potiče karakterističan miris i aroma (Plants For A Future, 2004), dok su u listu prisutni i glukozidi, tanini, benzaldehid koji je ujedno i najzastupljenija komponenta etarskog ulja lista i ploda ove biljne vrste (oko 95 %) (Mchedlidze i Kharebava, 1988). Plod lovor višnje sadrži fruktozu, glukozu, sorbitol (Var i Ayaz, 2004), manitol, askorbinsku kiselinu (Ayaz, 1997), dijetetska vlakana, neke minerale (Kolayli et al., 2003; Rodriguez et al., 1992), a najzastupljenije fenolne kiseline su benzojeva, kafena i vanilinska (Ayaz, 2001). Seme lovor višnje sadrži oko 40 % ulja (Alasalvar et al., 2006) koje uglavnom sadrži oleinsku i linolnu kiselinu (Alasalvar et al., 2006; Ayaz et al., 1995; Erciyes et al., 2006).

Kao tercijski relik, lovor višnja na jugu Srbije (planina Ostrozub) predstavlja posebnu taksonomsku kategoriju, pa je uzimajući u obzir njena lekovita svojstva, naučni i dekorativni značaj, neophodno primeniti adekvatne mere zaštite i izvršiti karakterizaciju bioaktivnih komponenti koje ulaze u njen sastav.

Bioaktivni proizvodi prirodnog porekla, kao što su ekstrakti, masna, etarska ulja, smole i biljne gume, nalaze široku primenu u medicini, prehrambenoj, farmaceutskoj i hemijskoj industriji (Huie, 2002; Stanković, 2002), a zbog njihove sve veće mogućnosti primene poslednjih godina fitohemijska ispitivanja nalaze se na vrhu aktuelnosti naučnih istraživanja. U cilju dobijanja što

većeg prinosa bioaktivnih proizvoda, skraćivanja vremena i poboljšanja ekonomičnosti procesa, pored tradicionalnih metoda dobijanja, sve više se koriste nekonvencionalne tehnike ekstrakcije, kao što su: super- i sub-kritična ekstrakcija (Camel, 2001; Reverchon, 1997; Skala et al., 2002), vrtložna (turbo) ekstrakcija (Vinatoru, 2001) ili ekstrakcija pod dejstvom električne energije (Belaya et al. 2006; Stankiewicz, 2006), mikrotalasa (Chou et al., 2009; Hayes, 2002; Jones et al., 2002) i ultrazvuka (Stanisavljević et al., 2007, 2008; Veličković et al., 2006).

Mikrotalasna ekstrakcija je tehnika ekstrakcije čija primena u laboratorijskim i industrijskim uslovima ima za cilj skraćivanje vremena ekstrakcije, manju potrošnju rastvarača, povećanje prinosa, a veoma često i kvaliteta ekstrakta (Cravotto et al., 2008; Eskilsson i Björklund, 2000; Mahesar et al., 2008; Wang i Weller, 2006; Zigoneanu et al., 2008). Upotreba mikrotalasa u procesima ekstrakcije zasniva se na sposobnosti materije da apsorbuje energiju mikrotalasa i prevodi je u toplotu, putem dva istovremena mehanizma, jonske provodljivosti i dipolne rotacije (Eskilsson i Björklund, 2000). Mikrotalasi se već koriste u procesu ekstrakcije bioaktivnih materija koje su od interesa za prehrambenu i farmaceutsku industriju, na primer, polifenola iz aromatičnog bilja (Proestos i Komaitis, 2008), ploda jabuke (Ai et al., 2006), semena grožđa (Hong et al., 2001) i listova zelenog čaja (Pan et al., 2003), antioksidanata iz pirinčanih mekinja (Zigoneanu et al., 2008), hlorogenske kiseline iz pupoljka cveta *Lonicera japonica* Thunb. (Zhang et al., 2008), artemisinina iz *Artemisia annua* (Hao et al., 2002), solanesola iz listova duvana (Zhou i Liu, 2006) i izoflavona iz soje (Rostagno et al., 2007).

Dobijanje bioaktivnih proizvoda iz biljnih materijala zavisi od mnogo faktora (tehnike ekstrakcije, prirode biljnog materijala, osobina rastvarača, temperature, odnosa biljni materijal-rastvarač, trajanja procesa i stepena usitnjenosti). Pojedinačni i kombinovani uticaj ovih faktora na efikasnost postupka izolovanja može se proceniti statističkim metodama. Za pojednostavljen matematički opis i analizu postupka izolacije primenjuju se uprošćeni fizički modeli, najčešće model zasnovan na teoriji filma i nestacionarnoj difuziji u biljnom materijalu. Ovi modeli već su uspešno korišćeni za opisivanje procesa klasične (Veljković i Milenović, 2002) i ultrazvučne (Veličković, 2005) ekstrakcije, dok ne postoje podaci o njihovom korišćenju za modelovanje procesa mikrotalasne ekstrakcije. U literaturi nema podataka o primeni mikrotalasne ekstrakcije za dobijanje bioaktivnih proizvoda iz lovor višnje (listova, ploda, semena), kinetici i uslovima (vrsta rastvarača, odnos biljni materijal-rastvarač, snaga mikrotalasa). Takođe, nema dostupnih literaturnih podataka o izolovanju etarskog ulja iz listova lovor višnje pod dejstvom mikrotalasa, sa i bez prisustva vode, kao ni o hemijskom sastavu ekstrakata. Detaljna proučavanja tehnika dobijanja bioaktivnih proizvoda ove biljne vrste omogućavaju procenu njenog značaja kao potencijalnog izvora bioaktivnih jedinjenja i prirodnih antioksidanata.

U okviru ovog rada ispitivane su kinetika mikrotalasne ekstrakcije (klasična ekstrakcija potpomognuta dejstvom mikrotalasa) lista, ploda i srca koštica lovor višnje u opsegu snaga mikrotalasa od 300 do 600 W, rastvaračima različite polarnosti (voda, metanol, 2-propanol, *n*-

heksan) pri odnosima biljni materijal-rastvarač od 1:5 do 1:20 g/cm³, kao i mehanizam izolovanja etarskog ulja iz listova lovor višnje postupcima klasične hidrodestilacije, hidrodestilacije i suve destilacije pod dejstvom mikrotalasa. Sve destilacije izvedene su na aparaturi po Clevenger-u. Pri modelovanju kinetike korišćeni su poznati koncepti zasnovani na nestacionarnoj difuziji kroz čestice biljnog materijala, teoriji filma i hiperbolnoj jednačini. Sadržaj ukupnih ekstraktivnih komponenti i masnog ulja određen je metodom po Soxhlet-u. Kriterijum za optimizaciju postupka mikrotalasne ekstrakcije, izbor rastvarača i odnosa biljni materijal-rastvarač, bio je najveći prinos ekstraktivnih supstanci, a ekstrakti i masna ulja dobijeni pod ovim uslovima na sva tri nivoa snage (300, 450 i 600 W) i za sva tri korišćena biljna materijala poređeni su po prinosu i hemijskom sastavu sa onim dobijenim ekstrakcijom po Soxhlet-u, klasičnom i indirektnom ultrazvučnom ekstrakcijom. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i antioksidativnog dejstva određen je rutinskim spektrofotometrijskim metodama, a kvalitativni i kvantitativni sastav ekstrakata, masnih i etarskih ulja određen je savremenim hromatografskim tehnikama (GC, HPLC).

Ciljevi istraživanja

- analiza modela zasnovanog na nestacionarnoj difuziji, modela zasnovanog na teoriji filma i hiperbolne jednačine u cilju definisanja kinetike mikrotalasne ekstrakcije iz različitih delova biljne vrste *Prunus laurocerasus*,
- izbor optimalnog kinetičkog modela na osnovu jednostavnosti i tačnosti simulacije toka ekstrakcije
- poređenje antioksidativnog dejstva, ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i flavonoida ekstrakata dobijenih različitim tehnikama ekstrakcije iz lista i ploda lovor višnje,
- određivanje sastava dobijenih ekstrakata, masnih i etarskih ulja i
- poređenje mikrotalasne, ultrazvučne, klasične ekstrakcije i ekstrakcije po Soxhlet-u, na osnovu ostvarenih prinosa i hemijskog sastava dobijenih ekstrakata.

2. Bioaktivni proizvodi biljnog porekla

Bioaktivni proizvodi prirodnog porekla su čiste hemijske supstance ili složene smeše različitih klasa organskih jedinjenja alifatične, aromatične, aliciklične i heterociklične prirode nastalih biogenetskim putevima u metaboličkim procesima, koji nalaze široku primenu u prehrambenoj (korekcija senzornih, vizuelnih i nutritivnih karakteristika; konzervansi), farmaceutskoj (fitofarmaceutski preparati; korekcija senzornih i vizuelnih karakteristika; nosači; rastvarači i drugo) i hemijskoj (pigmenti; rastvarači; prekursori u organskoj i mikrobiološkoj sintezi; standardne supstance) industriji (Stanković, 2002).

2.1. Ekstrakti

Ekstrakti su čvrsti, tečni ili polučvrsti (meki) koncentrovani preparati, koji se obično dobijaju iz osušenih biljnih ili životinjskih droga (Ph. Jug. V, 2002). Ekstrakti se dobijaju postupkom maceracije ili perkolacije ili nekim drugim prikladnim i validiranim postupkom, pri čemu se kao rastvarač za ekstrakciju koristi etanol ili drugi pogodan rastvarač. Za izradu nekih preparata, droga za ekstrakciju se mora prethodno tretirati u cilju inaktivacije enzima, usitnjavanja ili odmašćivanja, dok se posle ekstrakcije, ako je to potrebno, otklanjaju balastne materije (Ph. Jug. V, 2002). U novije vreme je od izuzetne važnosti sa proizvodno-tehnološkog i farmakološkog aspekta da biljni ekstrakti za medicinsku, kozmetičku i prehrambenu upotrebu budu standardizovani, odnosno da imaju konstantni sadržaj aktivnih principa ili ujednačen sastav sa minimalnim odstupanjem između pojedinačnih serija proizvoda. Ovo se može postići standardizacijom postupaka ekstrakcije ili standardizacijom ekstrakta (Liu i Wang, 2008; Shan i Rodgers, 2007). Standardizovani ekstrakti se podešavaju na tačno određen sadržaj jedne komponente ili na sadržaje više komponenti, pri čemu se koristi neka inertna supstanca, ili isti ekstrakt kao i onaj koji se standardizuje, ali različite koncentracije (Ph. Jug. V, 2002).

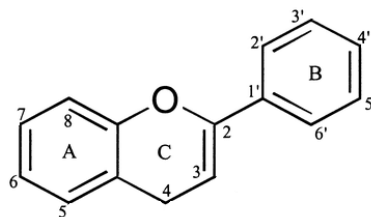
Iz razloga velike biološke i fiziološke aktivnosti, kompleksnosti hemijskog sastava, složenosti biosintetskog puta i metabolizma i sve veće mogućnosti primene u raznim oblastima industrije, biljni ekstrakti, posebno njihova fenolna i flavonoidna jedinjenja, nalaze se već dugi niz godina na vrhu aktuelnosti fundamentalnih i primenjenih istraživanja.

Biljna fenolna jedinjenja su sekundarni metaboliti karakteristične aromatične strukture sa hidroksilnim supstituentima (Đilas et al., 2002), koji se prema broju fenolnih subjedinica mogu podeliti na proste fenole (sa jednim fenolnim prstenom) i polifenole (sa dva i više fenolna prstena). Do sada je identifikovano oko 8000 jedinjenja koja pripadaju ovoj kategoriji (Robbins, 2003). Mada je izvestan broj polifenolnih jedinjenja zastupljen i u životinjskom svetu, većina ih je biljnog porekla. Njima se pripisuju zaštitna uloga i funkcije pigmenata, alelopatskih i antifungalnih

agenasa (Čanadanović-Brunet, 1998). Biljni polifenoli klasifikovani su u petnaest grupa prema osnovnom delu svog molekula, od kojih su flavonoidi, fenolne kiseline, acetofenoni, derivati fenilsirćetne kiseline, kumarini, bioflavanili samo neki od njih (Milić et al, 2000). Ova grupa jedinjenja obuhvata i polimerizovane strukture, kao što su: tanini, lignini, katehini i stilbeni (Petti i Scully, 2009; Tapiero et al., 2002). Najveću grupu biljnih polifenola čine flavonoidi (Rice-Evans et al., 1996) koji su prisutni u voću, povrću, cveću, biljnim plodovima, čaju, crvenom vinu, u listovima, semenu, kori i cvetovima biljaka (Merken i Beecher, 2000; Rice-Evans et al., 1996). Do sada je poznato oko 10000 različitih flavonoida (Tahara, 2007). Ova grupa jedinjenja obuhvata flavonole (kvercetin i kamferol, najprisutniji u hrani), flavone, izoflavone, flavanone, antocijanine, (biljni pigmenti od kojih potiče boja i miris većine biljaka) i flavanole (katehini – monomeri i proantocijanidini – polimeri, poznati kao kondenzovani tanini) čalkone i aurone, pri čemu se najčešće u prirodi javljaju u obliku glikozida (Cook i Samman, 1996; March i Brodbelt, 2008; Petti i Scully, 2009).

Biosinteza fenolnih jedinjenja u biljnom svetu vezana je za transformaciju šikimata, preko biosintetskog puta šikimske kiseline ili za transformaciju β -poliketo lanaca, dobijenog acil-polimalonatnim putem. Fenolna i polifenolna jedinjenja u biljnom materijalu javljaju se u slobodnom obliku, mada se mnogo češće javljaju u obliku svojih derivata. Najčešći su O-glikozidi flavonoida, posebno antocijanidini, O-metil i metilen-dioksi derivati polifenola, kao i sulfati flavonoida (Čanadanović-Brunet, 1998). Biosinteza flavonoida odvija se kroz deo fenilpropanoidnog biosintetskog puta kroz koji nastaju i drugi sekundarni metaboliti, kao što su fenolne kiseline, lignini, lignani i stilbeni, pri čemu su ključni prekursori fenilalanin (dobijen iz šikimatnog i arogenatnog biosintetskog puta) i malonil-CoA (izveden iz citrata dobijenog u Krebsovom ciklusu). Za većinu flavonoidnih biosintetskih enzima okarakterisanih do danas smatra se da funkcionišu u okviru enzimskih kompleksa smeštenih u citosolu. Krajnji flavonoidni proizvodi se transportuju do različitih subćelijskih i ekstraćelijskih lokacija, dok se flavonoidi zaduženi za pigmentaciju transportuju do vakuola (Davies i Schwinn, 2006).

Osnovni strukturni skelet flavonoida čini petnaest atoma ugljenika ($C_6-C_3-C_6$) od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C, benzo-1-piran-4-hinon), sa atomom kiseonika kao heteroatomom. Fenil grupe označavaju se kao prstenovi A i B, dok se središnji heterociklični prsten označava kao prsten C (slika 2.1) (Marais et al., 2006).



Slika 2.1 Strukturna formula flavonoidnih jedinjenja

Flavonoidna jedinjenja, se u zavisnosti mesta vezivanja prstena B za benzopiranski prsten, mogu podeliti na tri klase: vezivanje na poziciji dva - flavonoidi u užem smislu (2-fenilbenzopirani), na poziciji tri - izoflavonoidi (3-benzopirani) i na poziciji četiri neoflavonoidi (4-benzopirani) (Marais et al., 2006). Prema broju vezanih flavonoidnih jedinica sva flavonoidna jedinjenja dele se na monoflavone, bi-, tri-, tetra-, penta- i heksaflavone, dok se prema tome da li imaju vezanu šećernu komponentu dele na aglikone, one koji nemaju, i monoglikozilovane, di-, tri-, itd. koji imaju vezanu jednu, dve, tri ili više šećernih komponenti (Davies i Schwinn, 2006). Takođe, u zavisnosti od stepena oksidacije centralnog prstena C flavonoidi se mogu podeliti na više, strukturno različitih, klasa jedinjenja (Tapiero et al., 2002). Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture koje su uslovljene reakcijama hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanja neorganskog sulfata i glikolizacijom hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidnog jezgra (C-glikozidi) (Mimica-Dukić, 1992).

Biljni polifenoli, od onih prostih do vrlo složenih molekula, predstavljaju vrlo značajnu grupu prirodnih jedinjenja, prevashodno sa medicinskog i nutritivnog aspekta, jer su izuzetni agensi za regulaciju metaboličkog sindroma i nivoa krvnog pritiska (Stevenson i Hurst, 2007), sa preventivnom ulogom kod kancerogenih, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja (Bracke et al., 2008; Milić et al., 2000; Nichenametla et al., 2006; Scalbert et al., 2005; Stevenson i Hurst, 2007), vrlo značajnih osobina kao "hvatači" („skevindžeri” - eng. scavengers) slobodno-radikalnih vrsta, posebno hidroksi, peroksi- i sličnih oksid-slobodnih radikala (Milić et al., 2000). Takođe, dokazana je njihova antiviralna aktivnost (Naithani et al., 2008) i preventivna uloga kod osteoporoze i šećerne bolesti (Scalbert et al., 2005). Značajna je njihova uloga u prehrambenoj industriji za poboljšanje organoleptičkih osobina i očuvanje biološke vrednosti hrane, u toku tehnoloških postupaka i skladištenja (Čanadanović-Brunet, 1998). Neka polifenolna jedinjenja (tanini) koriste se za taloženje albumina, želatina i drugih proteina iz vodenog rastvora, zahvaljujući njihovom vezivanju za hidrofobnu površinu peptida pri čemu se formira polifenol-peptidni kompleks (Charlton et al., 2002; Zhu et al., 1997). Flavonoidna jedinjenja, pored uloge koju imaju kao biljni pigmenti, u biljnim sistemima imaju ulogu i u zaštiti od UV zračenja i slobodnih radikala, modulaciji aktivnosti enzima, alelopatiji, privlačenju i odbijanju insekata, zaštiti od virusa, bakterija i gljiva, klijanja polena i druge (Cook i Samman, 1996; Davies i Schwinn, 2006; Pourcel et al., 2006). Dobro su poznata i potvrđena antialergijska, antihipertenzivna, antimikrobna, antiinflamatorna, antimutagena, antikancerogena, anti-HIV i antivirusna aktivnost flavonoida, kao i pozitivni efekti u terapiji dijabetesa, astme, gastrointestinalnih, reumatskih i srčanih oboljenja (Di Carlo et al., 1999; García-Lafuente et al., 2009; Havsteen, 2002; Merken i Beecher, 2000). Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sistemima pripisuje se njihovoj sposobnosti „hvatanja” elektrona slobodnog radikala, helatiranja divalentnih katjona (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}),

aktiviranja antioksidacionih enzima i inhibiranja oksidaza (Cook i Samman, 1996; Pourcel et al., 2006).

Uprkos širokoj rasprostranjenosti i lekovitim osobinama polifenolnih jedinjenja, ozbiljnije proučavanje njihovih antioksidativnih i lekovitih dejstava počinje tek sredinom devedesetih godina prošlog veka (Scalbert et al., 2005). Utvrđeno je da polifenolna, kao i mnoga druga bioaktivna jedinjenja koja ulaze u sastav prirodnih bioaktivnih proizvoda, pokazuju antioksidativnu aktivnost, odnosno da njihovi molekuli, prisutni u malim količinama značajno inhibiraju ili u potpunosti sprečavaju oksidaciju lipida, proteina, ugljenih hidrata i DNK (Moon i Shibamoto, 2009; Halliwell i Whiteman, 2004).

U procesima oksidacije tokom normalnog aerobnog metabolizma nastaju slobodni radikali koji učestvuju u mnogim važnim biohemijskim reakcijama. Međutim, problem nastaje kada pri primopredaji elektrona u redoks reakcijama dođe do hiperprodukcije radikalskih vrsta koje nemaju potpuno sparene elektrone. Nespareni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti. Slobodni radikali nastaju: termolizom, elektromagnetnom radijacijom, redoks reakcijama, enzimskim procesima i hemijskim procesima i obuhvataju reaktivne kiseonične vrste (ROS - Reactive Oxygen Species), kao što su superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($HO^{\cdot}$), hidroperoksid ($HO_2^{\cdot}$), peroksid ($RO_2^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$) radikal, reaktivne azotne vrste gde spadaju azotoksidni ($NO^{\cdot}$) i azotdioksidni ($NO_2^{\cdot}$) radikal, a ne tako retko, nespareni elektron mogu imati i atomi halogena ($Cl^{\cdot}$), alkalnih metala ($Na^{\cdot}$) ili neki joni metala (Cu^{2+} , Fe^{3+}). U živim organizmima postoje i neradikalske reaktivne vrste kao što su singletni kiseonik (1O_2), vodonik peroksid (H_2O_2), ozon (O_3), hipohlorna ($HOCl$) i hipobromna ($HOBr$) kiselina i mnogi drugi (Halliwell i Whiteman, 2004; Pietta, 2000).

Reaktivne kiseonične vrste učestvuju u stvaranju ćelijske energije, fagocitozi, regulaciji rasta ćelije, unutar ćelijskom signalizovanju i sintezi biološki važnih jedinjenja (Pietta, 2000), ali mogu biti veoma štetne pošto mogu dovesti do oštećenja ćelijskih membrana, vitalnih ćelijskih komponenti ili genetskog materijala u nukleusu, kao i do inaktivacije enzima, što vodi do mnogih patoloških promena u ljudskom organizmu (Đilas et al., 2002), kao što su degenerativne i autoimune bolesti, dijabetes, karcinom, multipla skleroza, artritis, arterioskleroza, moždana disfunkcija i druge (Moon i Shibamoto, 2009; Pietta, 2000; Tsao i Deng, 2004).

Živi aerobni organizmi poseduju endogeni antioksidantni potencijal, skup antioksidanata koje proizvodi sam organizam da bi se zaštitio od stvaranja slobodnih radikala. Ovaj vid zaštite čine enzimi: selen glutation peroksidaza, katalaza i superoksid dizmutaza koji metabolišu vodonik peroksid, lipidne peroksidi i superoksidi sprečavajući nastanak toksičnog $HO^{\cdot}$ radikala. Dok drugi vid zaštite, neenzimatska odbrana, čine: glutation, histidin-peptidi, proteini sa vezanim gvožđem - transferin i feritin, dihidrolipoinna kiselina, redukovani koenzim Q_{10} , melatonin, urati, tioli (proteini plazme), čije se dejstvo zasniva na „hvatanju“ već stvorenih slobodnih radikala i sprečavanju propagacije lanca. Ove različite odbrane su komplementarne međusobno pošto

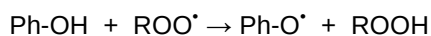
reaguju sa različitim vrstama i u različitim delovima ćelije. Antioksidativni sistem u organizmu ima i tzv. antioksidante za popravku sposobne da poprave oštećenja nastala dejstvom slobodnih radikala - proteaze, lipaze, transferaze i enzime za popravku DNK (Đilas et al., 2002; Pietta, 2000).

Usled nepotpune efikasnosti našeg endogenog odbrambenog sistema i pri postojanju nekih spoljnih agenasa i fiziopatoloških stanja (dim cigarete, zagađenje vazduha, pojačano UV zračenje, neki zapaljenski procesi, ishemija, stres, itd.) u kojima su reaktivne radikalske vrste proizvedene u višku i u pogrešno vreme na pogrešnom mestu, neophodni su dodatni antioksidanti (egzogeni antioksidanti tj. oni koje treba uneti hranom) da bi smanjili kumulativni efekat oksidativne štete za vrlo kratko vreme (Ichihashi et al., 2003; Pietta, 2000).

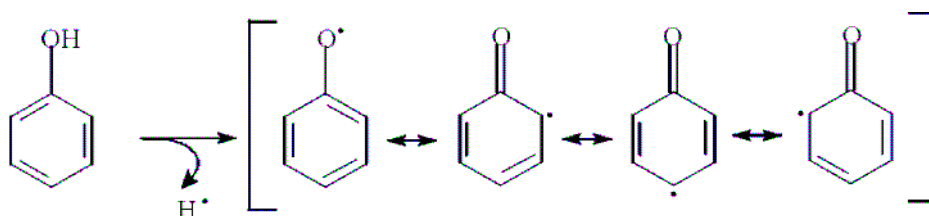
Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da (Čanadanović-Brunet, 1998):

- deluju kao „hvatači“ slobodnih radikala ili donori elektrona i H-atoma;
- stvaraju komplekse sa jonima metala, sprečavajući njihovu katalitičku funkciju u procesima razgradnje lipidnih hidro-peroksida i nastanku slobodnih radikala;
- razgrađuju hidro-perokside lipida, transformišući ih u neradikalske vrste;
- sprečavaju dejstvo singletnih oblika kiseonika;
- inhibiraju neke enzime;
- pokazuju sinergističke efekte;
- redukuju neka jedinjenja.

Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja uglavnom se zasniva na njihovim oksido-redukcionim osobinama, sposobnošću neutralisanja slobodnih radikala doniranjem vodonikovog atoma ili elektrona, heliranja metalnih jona u vodenim rastvorima, kao i u gušenju procesa formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (Petti i Scully, 2009; Khknen et al., 1999). Smatra se da antioksidativna aktivnost fenola zavisi od njihove strukture, od pozicije vodoničnog jona u njihovom molekulu (Es-Safi et al., 2007), kao i sposobnosti da budu donori vodoničnog jona, nakon čega nastaju manje reaktivni fenoksil radikali:

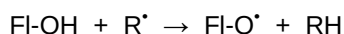


Relativno velika stabilnost fenoksil radikala se objašnjava delokalizacijom elektrona, uz postojanje više rezonantnih formi (slika 2.2) (Mišan, 2009).



Slika 2.2 Rezonantna stabilizacija fenoksil radikala

Zbog svoje specifične strukture flavonoidi su izuzetni prirodni antioksidanti. Prisustvo flavonoida dovodi do suzbijanja nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta inhibicijom enzima ili helatizacijom metala u tragovima koji učestvuju u stvaranju slobodnih radikala. Flavonoidi učestvuju i u regulaciji i zaštiti antioksidativnih odbrana, a njihovo prisustvo dovodi i do prekidanja slobodno-radikalskih reakcija. Antioksidativna aktivnost flavonoida i njihovih metabolita *in vitro* uslovljena je vrstom, brojem i rasporedom funkcionalnih grupa u strukturi (Pietta, 2000; Rice-Evans et al., 1996). Tako, na primer, kapacitet za „hvatanje“ slobodnih radikala prvenstveno se pripisuje velikoj reaktivnosti OH grupa u reakciji:



Hidroksilne grupe predaju vodonikov atom radikalima, a flavonoidi prelaze u slobodne radikale, rezonantno stabilizovane, koji nemaju dovoljno energije da pokrenu lančanu reakciju sa supstratom (Heim et al., 2002). Razlike u antioksidativnoj aktivnosti, na primer između polihidroksilovanih i polimetoksilovanih flavonoida, potiču uglavnom od razlika u hidrofobnosti i molekulskoj planarnosti, a utvrđeno je i da su aglikonski oblici mnogo snažniji antioksidanti od njihovih odgovarajućih glikozida (Heim et al., 2002). Dokazano je da je kvercetin bolji antioksidant od njegovih O-metilovanih i O-glikozilovanih derivata (Dugas et al., 2000).

Prirodni antioksidanti mogu biti fenolne komponente (flavonoidi, fenolne kiseline, tokoferoli), azotne komponente (alkaloidi, derivati hlorofila, aminokiseline i amini), karotenoidi ili askorbinska kiselina (Velioglu et al., 1998), fosfolipidi i steroli (Choe i Min, 2009). Nasuprot prirodnim, postoje sintetski antioksidanti, od kojih se u prehrambenim proizvodima najčešće koriste: butilovani hidroksitoluen - BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol), butilovani hidroksianizol - BHA (smeša izomera 2-*terc*-butil-4-hidroksianizola i 3-*terc*-butil-4-hidroksianizola), propilgalat (PG) i *terc*-butilhidrohinon (TBHQ). Međutim, u novije vreme sintetski antioksidanti se sve manje koriste, jer je utvrđeno da su neki od njih toksični i kancerogeni, te su sve veći zahtevi usmereni ka ispitivanju, izolovanju i korišćenju prirodnih antioksidanata (Moure et al., 2001; Velioglu et al., 1998).

Polifenoli su najzastupljeniji antioksidanti u ishrani i njihov preporučeni dnevni unos iznosi od 20 mg do 1 g/dan, što je mnogo više nego za bilo koju drugu klasu fitonutritijenta (deset puta više nego vitamina C i sto puta više nego vitamina E i karotenoida) (Rice-Evans et al., 1996; Scalbert et al., 2005). Flavonoidna jedinjenja zastupljena su u gotovo svim biljnim vrstama, pri čemu su flavonoidi u užem smislu najrasprostranjeniji. Veoma često se flavanoni i flavoni sreću zajedno (citrusne vrste), dok su flavoni i flavanoli, kao i flavanoni i antocijanini kombinacije flavonoidnih jedinjenja koje se javljaju veoma retko (Rice-Evans et al., 1996). Velika razlika u preporučenim dnevnim dozama prema različitim autorima, potiče od nedostatka informacija o njihovoj apsorpciji, kasnijoj distribuciji, metabolizmu i ekskreciji kod ljudi. Na apsorpciju i

metabolizam polifenola iz hrane primarno utiče njihova hemijska struktura, konjugacija sa drugim fenolima, molekulska masa, rastvorljivost i stepen polimerizacije (Wollgast i Anklam, 2000).

Glavni izvor polifenolnih jedinjenja je voće, pića dobijena od biljnih materijala (sokovi, čajevi, kafa i crvena vina), povrće, čokolada i mahunaste biljke (Ferrazzano et al., 2009; Scalbert et al., 2005). Sadržaj polifenola u biljnom materijalu kreće se od nekoliko miligrama do nekoliko stotina miligrama u 100 g svežeg biljnog materijala, što je u pojedinim slučajevima i do sto puta više od sadržaja vitamina sa antioksidativnim osobinama u biljnom materijalu (Fukushima et al., 2009).

2.2. Etarska ulja

Etarska ulja su složene smeše lako isparljivih komponenti nastalih kao proizvod sekundarnog metabolizma biljaka koja imaju zaštitnu (antibakterijsko, antivirusno, antifungalno dejstvo, odbijanje neželjenih insekata i biljojeda) i ulogu u oprašivanju (privlačenje insekata koji raznose polenov prah i seme) (Bakkali et al., 2008). To su tečne, isparljive, bistre i često bezbojne tečnosti, rastvorne u mastima i organskim rastvaračima, gustine manje od vode. Etarska ulja se u biljnom materijalu nalaze u sekretornim ćelijama, sekretornim šupljinama, sekretornim kanalima i žlezdanim trihomama (Bakkali et al., 2008; Bendahou et al., 2008), a mogu se sintetisati u svim biljnim delovima (cvet, list, stabljika, seme, plod, kora, koren) kroz neke od glavnih metaboličkih puteva (Bakkali et al., 2008; Smith et al., 2005). Tokom biosintetskog puta preko šikiminske kiseline sintetišu se amino kiseline fenilalanin i tirozin čijim deaminovanjem, oksidacijom ili redukcijom nastaju važne aromatične supstance kao što su cimetaldhid i eugenol. Lipoksigenaznom oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina dobijaju se niskomolekularni aldehidi (2-heksenal), alkoholi (2,6-nonadienol) i estri karakterističnog mirisa i arome. Kroz izoprenoidni biosintetski put nastaju terpeni, najzastupljenija jedinjenja etarskih ulja, kao što su: ciklični terpeni (limonen), alkoholi (mentol), aldehidi (citral), ketoni (karvon), mnoge kiseline i estri. Neka jedinjenja koja ulaze u sastav etarskih ulja nastaju u peptidnim ili fotosintetskim putevima biosinteze (Smith et al., 2005). Hemijski sastav etarskih ulja zavisi od odnosa ovih biosintetskih puteva, dakle od genetskih, ali u mnogome i od ekoloških faktora. Biljna vrsta i podvrsta, lokalitet i vreme ubiranja biljnog materijala, kao i metod izolovanja bitno utiču na krajnji sastav etarskog ulja (Smith et al., 2005). Za većinu komercijalizovanih etarskih ulja farmakopejske monografije propisuju njihove fizičko-hemijske karakteristike, kvalitativni i kvantitativni sastav (Smith et al., 2005).

Etarska ulja mogu biti veoma jednostavnog sastava, kao u slučaju etarskog ulja karanfilića u čiji sastav ulaze samo četiri komponente: eugenol, 64,3 %; beta-kariofilen, 19,6 %; eugenol acetat, 13,8 % i humulen, 2,3 % (Meireles, 2008), do veoma složenih kompozicija kada se u njihovom sastavu može naći veliki broj komponenti, najčešće terpeni i terpenoidi, ali i

alkoholi, aldehidi, ketoni, fenoli, laktoni, etri, estri (Smith et al., 2005), a ponekad čak i potencijalno štetne komponente koje sadrže azot (alkilpirazini i akilmetoksipirazini pronađeni u etarskom ulju korijandera) (Schnaubelt, 1999). Jedna biljna vrsta može proizvoditi više različitih etarskih ulja, na primer, etarsko ulje korena i semena angelike (*Angelica archangelica*) ima potpuno različit sastav, miris i terapeutsko dejstvo (Buckle, 2006).

Dobijanje i korišćenje etarskih ulja potiče još iz starog Egipta, Persije, Grčke i Rima, kada su upotrebljavana u balsamovanju i konzerviranju hrane zbog svog antimikrobnog dejstva (Burt, 2004), dok se od srednjeg veka koriste i kao lekovi za smirenje, protiv upalnih procesa, kao spazmolitici, antiparazitici ili lokalni anestetici. Do današnjih dana, ove karakteristike se nisu bitno izmenile samo što je proučen njihov sastav i razjašnjen mehanizam delovanja, pogotovo na mikroorganizmima (Bakkali et al., 2008). Danas je poznat veliki broj etarskih ulja, od kojih se oko 300 komercijalno koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, u poljoprivredi, proizvodnji prirodnih lekova, parfema, konzervanasa i aditiva u prehrambenoj industriji (Bakkali et al., 2008; Chemat et al., 2007). Etarska ulja koriste se u prevenciji i lečenju kancerogenih i kardiovaskularnih oboljenja, arterioskleroze, dijabetesa, tromboze (Edris, 2007), a pokazuju i spazmolitičko, mukolitičko, antiseptičko, antiinflamatorno i antioksidativno dejstvo (Pisseri et al., 2008). Dokazano je izuzetno antimikrobno dejstvo etarskih ulja na bakterije, kvasce, filamentozne gljive i viruse, što ih čini posebno važnim u borbi protiv patogenih mikroorganizama koji su tokom vremena, zbog široke i neopravdane upotrebe postojećih anti-infektivnih agenasa, postali rezistentni na njih (Burt, 2004; Reichling et al., 2009). Neka etarska ulja pokazuju snažno analgetsko dejstvo, kao što je slučaj ulja korena anđelike (*Angelicae dahuricae*) koje smanjujući nivo monoamina, nervnog transmitera, u krvi dovodi do analgezije (Yu et al., 2008). U pojedinim kozmetičkim formulacijama zamenom veštačkih konzervanasa prirodnim agensima, etarskim uljima i ekstraktima, dobijaju se proizvodi poboljšanih dermo-kozmetičkih osobina (Varvaresou et al., 2009). Neka od često korišćenih etarskih ulja aromatičnih biljaka u proizvodima za ličnu higijenu i negu kože (sapuni, paste za zube, gelovi za tuširanje, šamponi, dezodoransi i losioni za telo) su timijan (*Thymus vulgaris*), lavanda (*Lavandula officinalis*), ruzmarin (*Rosmarinus officinalis*), cimet (*Cinnamomum zeylanicum*), čajno drvo (*Melaleuca alternifolia*) kanadski ljutić (*Hydrastis canadensis*), divlji bosiljak (*Calamintha officinalis*). U našoj zemlji najviše korišćene samonikle aromatične biljke su: kleka (*Juniperus communis*), žalfija (*Salvia officinalis*), lovor (*Laurus nobilis*), smilje (*Helichrysum arenarium*), bor (*Pinus*), jela (*Abies alba*), kantarion (*Hypericum perforatum*) i hajdučka trava (*Achillea millefolium*), dok se plantažno najčešće gaje: kamilica (*Matricaria chamomilla*), pitoma nana (*Mentha piperita*), korijander (*Coriandrum sativum*), ruzmarin (*Rosmarinus officinalis*), timijan (*Thymus vulgaris*), matičnjak (*Melissa officinalis*), anđelika (*Angelica archangelica*), peršun (*Petroselinum crispum*), estragon (*Artemisia dracunculus*), selen (*Levisticum officinale*) i valerijana (*Valeriana officinalis*) (Sovilj i Spasojević, 2001).

2.3. Masna ulja

Masna ulja se uglavnom sastoje od triglicerida masnih kiselina sa lancem dužine C8 - C24 (najčešće C16 i C18), slobodnih masnih kiselina, vode, sterola, fosfolipida, mirisnih komponenti i primese nekih nečistoća (Dyer et al., 2008; Harwood, 1998; Lessire et al., 2009). U biljnim ćelijama predstavljaju rezerve energije u stabilnoj, lako metabolizirajućoj formi, učestvuju u izgradnji ćelijskih membranskih struktura i poseduju zaštitnu ulogu. Pokrivajući nadzemne delove biljke lipidnim slojevima, kao što su voskovi i kutin ili podzemne delove suberinom, biljke se štite od gubitka vode, UV zračenja, oštećenja, mikroorganizama i drugih štetnih agenasa. Pod dejstvom lipooksigenaza, lipidi daju specifične proizvode koji učestvuju u ćelijskom metabolizmu (Harwood, 1998).

Biosinteza masnih kiselina odvija se u plastidima biljnih ćelija, pri čemu pod dejstvom enzima acetil-CoA karboksilaze uz utrošak molekula ATP-a i bikarbonata (izvor bikarbonata je CO₂), a u prisustvu Mg²⁺ jona, acetil-CoA karboksiliše u malonil-CoA. Ovom reakcijom karboksilacije aktivira se C atom iz metil grupe acetil ostatka, koji služi za vezivanje još jednog acil ostatka i dobijanje prvog međuproizvoda sa 4 C atoma (butiril ostatka), a kasnije i ostalih međuproizvoda tokom sinteze palmitinske kiseline. Sintaza palmitinske kiseline se ostvaruje delovanjem sintaznog sistema palmitinske kiseline, koja predstavlja multienzimski kompleks sačinjen od šest karakterističnih enzima i jednog proteinskog nosača acil ostatka (ACP-acyl carrier protein) (Slabas et al., 1998). Sistem sintetaze palmitinske kiseline nije u mogućnosti da sintetiše masne kiseline veće dužine od 16 C atoma, ali se zahvaljujući mehanizmu elongacije omogućava produžavanje lanca do dužine od 22 ili 24 C atoma. Elongacija se vrši u endoplazmatičnom retikulumu i u mitohondrijama (Harwood, 1998). Prva reakcija elongacije je kondenzacija acetil-ACP i malonil-ACP uz otpuštanje CO₂. Sledi redukcija, dehidracija i ponovna redukcija. Redukciono sredstvo u obe reakcije je NADPH. Ovim reakcijama nastaje butiril-ACP, a kroz sedam krugova produženja nastaje palmitoil-ACP koji nakon hidrolize oslobađa palmitat (Slabas et al., 1998).

Masna biljna ulja dobijaju se najčešće iz ploda, semena ili koštica ekstrakcijom, presovanjem ili kombinacijom ove dve tehnike, pri čemu presovanje prethodi ekstrakciji rastvaračem (Young et al., 1994). Kod presovanja ili hladnog ceđenja, neophodno je biljni materijal prethodno pripremiti, što obuhvata operacije čišćenja (mehanički ili pneumatski sistemi u kojima se odstranjuju nečistoće) i sušenja (postizanje preporučenog sadržaja vlage, od 5 do 7 %). Ljuštenjem semena i odvajanjem ljuske, kao u slučaju semena suncokreta, soje, lana, ricinusa, konoplje i repice, osigurava se bolji prinos i smanjuje prisustvo nečistoća u ulju (Swern, 1972). Seme se, takođe, mora usitniti, da bi se razorilo biljno tkivo i olakšalo isticanje ulja. Dok termički predtretman biljnog materijala čini ulje manje viskoznim i dovodi do potpunijeg razaranja ćelijskih zidova, detoksikacije neželjenih komponenti (gosipol u ulju semena pamuka),

koagulacije proteina čime ćelijski zidovi postaju propusniji za ulje, a u pojedinim slučajevima i do sterilizacija semena. Moderne prese koje se koriste u dobijanju ulja iz semena uljarica daju visok prinos, sa zaostalim sadržajem ulja u semenoj pogači do 6 % što zavisi od vrste biljnog materijala (Young et al., 1994). Potpuna ekstrakcija ulja se može postići samo primenom velike količine rastvarača u odnosu na količinu ulja u semenu. U praksi se koriste različiti tipovi postrojenja za ekstrakciju, a najčešće su u upotrebi baterija ekstraktora i kontinualni protivstrujni ekstraktor (Veljković et al., 2006). Za ekstrakciju ulja najčešće se koristi parafinska naftna frakcija, koja se uglavnom sastoji od *n*-heksana i metilpentana ili sam *n*-heksan. Nedostaci ekstrakcije rastvaračem su: velika investiciona ulaganja zbog skupog postrojenja za ekstrakciju i opasnost od požara i eksplozije pri primeni zapaljivih rastvarača (Young et al., 1994). Masna ulja bez primesa organskih rastvarača mogu se dobiti ekstrakcijom natkritičnim ugljen(IV) oksidom na visokim pritiscima (25 – 35 MPa). Ulja bogata masnim nezasićenim kiselinama tokom ovog postupka ekstrakcije ne izlažu se dejstvu kiseonika i visoke temperature kao kod konvencionalnih metoda ekstrakcije, čime se štite od oksidacije (Skala et al., 2002).

Biljna ulja koriste se prvenstveno za ljudsku i stočnu ishranu, u medicinske svrhe, mada se sve više koriste kao obnovljivi izvori industrijskih sirovina i goriva (Dyer et al., 2008). Svetska proizvodnja biljnih ulja iznosila je oko 127 miliona tona u 2006 godini, što predstavlja povećanje od oko 50 miliona tona u poređenju sa samo 10 godina ranije (Dyer et al., 2008). Poređenja radi, godišnja proizvodnja životinjskih masti (loj, svinjska mast) je oko 22 miliona tona, a ribljeg ulja oko milion tona (Gunstone, 2007). Većina biljnih ulja (oko 79 % ukupne proizvodnje) dobijaju se od samo četiri biljne vrste, suncokreta, uljane repice, palme i soje (Dyer et al., 2008). Sastav biljnih ulja, udeo pojedinih masnih kiselina, dužina njihovog lanca, kao i prisustvo određenih funkcionalnih grupa, utiče u mnogome na karakteristike i upotrebu ovih ulja i njihovih derivata. Na primer, masne kiseline srednje dužine lanca, kao što je laurinska kiselina, odlični su tenzidi koji se često koriste u industriji sapuna i deterdženata, dok se derivati glicerola koriste u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, kao i u proizvodnji eksploziva, obradi celuloze i duvana (Dyer et al., 2008).

3. Dobijanje bioaktivnih proizvoda iz biljnog materijala

Poslednjih godina došlo je do porasta interesa za prirodnim, odnosno biljnim lekovima u svetu, delimično zbog saznanja da moderna medicina ne može pružiti "lek za sve", ali i zbog činjenice da je prisustvo neželjenih dejstava gotovo neizbežno. Za razliku od sintetskih lekova koji uglavnom sadrže jednu, biljni ekstrakti sadrže veliki broj aktivnih komponenti. Prirodna jedinjenja sadržana u ovim "biljnim koktelima" mogu delovati sinergistički unutar ljudskog tela i mogu imati izvanredna terapijska dejstva uz minimalna ili nikakva neželjena dejstva (Huie, 2002). Proizvodnja kvalitetnih biljnih ekstrakata predstavlja osnov za proizvodnju biljnih preparata i izolaciju bioaktivnih komponenti koje nalaze široku primenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj ili prehrambenoj industriji. Za njihovo dobijanje uglavnom se koriste klasične tehnike, ekstrakcija rastvaračima (perkolacija, maceracija, ekstrakcija toplim i hladnim mastima i ključanje u vodi) i presovanje ili ceđenje, mada se u poslednje vreme sve više koriste novije nekonvencionalne tehnike ekstrakcije (Vinatoru, 2001).

3.1. Ekstrakcija rastvaračima

Pod pojmom ekstrakcija rastvaračem podrazumeva se preuzimanje neke supstance iz jedne faze u kojoj je ona rastvorena ili suspendovana u drugu, tečnu fazu. Ovom tehnološkom operacijom se rastvorljivi sastojak čvrste ili tečne faze izoluje odgovarajućim rastvaračem. Ukoliko se rastvorljiva supstanca ekstrahuje iz čvrstog materijala, govori se o ekstrakciji čvrsto-tečno ili luženju, a ako se ekstrahuje iz tečnosti, onda se govori o ekstrakciji tečno-tečno (Ponomarev, 1976).

Klasična ekstrakcija ili maceracija se najčešće primenjuje za dobijanje preparata prirodnih jedinjenja. Ona se izvodi šaržno, tako što se biljni materijal potapa u rastvarač, pri određenoj temperaturi i odnosu biljni materijal-rastvarač. Iscrpljenom biljnom materijalu, može se dodati sveži rastvarač, što predstavlja remaceraciju, odnosno dvostruku maceraciju. Perkolacija se izvodi polušaržno, tako što rastvarač protiče kontinualno kroz nepokretan sloj čvrstog materijala odozgo naniže. Fino usitnjeni materijal, koji se može lako održati suspendovan u rastvaraču podvrgava se maceraciji, dok se ekstrakcija krupnijeg, komadnog materijala vrši perkolacijom (Ponomarev, 1976). Pri postupku ekstrakcije ključalom vodom, dolazi do bubrenja biljnog materijala i hidrodifuzije sastojaka biljnog materijala kroz membranu (Vinatoru et al., 1999). Proces ekstrakcije toplim i hladnim mastima, zapravo je maceracija mastima (svinjska mast ili loj) iz koje se, zatim, vrši desorpcija ekstraktivnih supstanci odgovarajućim rastvaračima, najčešće etanolom (Vinatoru et al., 1999). Anfleraž postupak izvodi se pomoću staklenih ploča

koje su sa obe strane premazane smešom goveđeg loja i svinjske masti između kojih se nalaze cvetovi (Pekić, 1983). Ekstrakcije toplim i hladnim mastima se u uglavnom koriste samo za dobijanje najfinijih etarskih ulja iz svežih cvetova. Metoda sublimacije se koristi za izdvajanje čvrstih bioaktivnih supstanci pod sniženim pritiskom iz biljnih tkiva (azuleni iz cveta kamilice i hajdučke trave; kumarini iz sena) (Stanković, 2002). Presovanje ili ceđenje koristi se najčešće za dobijanje etarskih ulja iz kore citrusnog voća ili ulja iz semena uljarica. U ove svrhe koriste se različita tehnička rešenja - od primitivnih, kao što su poluga, klin ili vijak, do modernih hidrauličkih i pužnih presa (Swern, 1972).

Pored dobrih prinosa, klasične tehnike ekstrakcije imaju nedostatke kao što su: dugo vreme trajanja, velika potrošnja rastvarača, pojava degradacije bioaktivnih materija, zahtevi za dodatnim koracima u obradi ekstrakata (filtriranje, koncentrisanje) i čišćenje šaržnih postrojenja pre početka novih ciklusa koji povećavaju cenu i umanjuju ekonomičnost čitavog procesa (Camel, 2001; Huie, 2002). Postrojenja za filtraciju, uparavanje ili koncentrisanje, dodatno, predstavljaju potencijalna mesta pojave gubitaka i kontaminacije (Camel, 2001).

U novije vreme, u cilju dobijanja većeg prinosa ukupnog ekstrakta ili željene komponente iz različitog bilja, ekstrakti se sve više dobijaju primenom nekonvencionalnih tehnika ekstrakcije, kao što su: super- i sub-kritična ekstrakcija, vrtložna (turbo) ekstrakcija ili ekstrakcija pod dejstvom električne energije, povišenog pritiska, mikrotalasa i ultrazvuka (Huie, 2002; Vinatoru et al., 1997; Vinatoru, 2001).

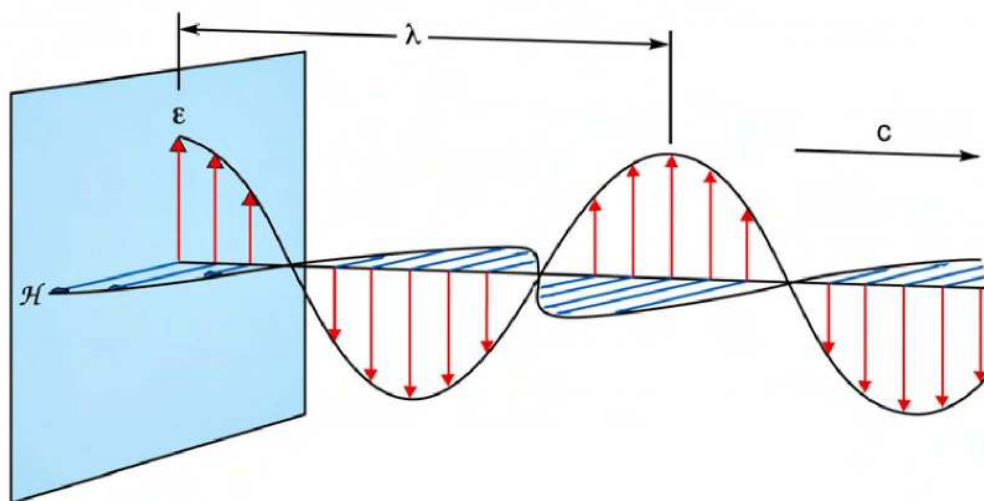
Natkritična ekstrakcija je postupak ekstrakcije fluidima (ugljenik(IV) oksid, propan, butan, freoni) koji se nalaze na temperaturi i pritisku iznad svojih kritičnih vrednosti, odnosno u natkritičnom stanju. Osobine ovih fluida koji se nalaze između gasova i tečnosti zavise od pritiska, temperature i sastava fluida. Generalno, ovi fluidi imaju manji viskozitet od tečnosti i veći difuzioni koeficijent, čime se omogućava efikasnija ekstrakcija. Osim toga, podešavanjem pritiska i temperature, pružaju mogućnost selektivnije i efikasnije ekstrakcije i olakšavaju optimizaciju procesa (Camel, 2001). Na ovaj način moguće je dobiti ekstrakte bez tragova organskih rastvarača i u originalnom sastavu, koji najčešće čine slabo isparljive i termički degradabilne supstance srednjih molekulskih masa i relativno male polarnosti. Zbog lakog rukovanja, inertnosti i niske cene, najveću primenu u ovoj metodi je našao ugljenik(IV) oksid (Skala et al., 2002) koji ima osobine lipofilnog rastvarača, a omogućava super-kritičnu ekstrakciju na temperaturama blizu sobne (Reverchon, 1997). U slučaju vrtložne (turbo) ekstrakcije i ekstrakcija pod dejstvom električne energije ili ultrazvuka povećanje prinosa i skraćanje vremena trajanja procesa pripisuje se dejstvu kavitacionih mehura i njihovih silovitih kolapsa na samoj granici sa biljnim materijalom. U prvom slučaju ovi mehuri nastaju korišćenjem mešalica sa velikim brojem obrtaja u jedinici vremena, u drugim slučajevima pod dejstvom električne energije ili ultrazvučnih talasa (Vinatoru, 2001). Dokazano je da izlaganje biljnog materijala neposredno pre ekstrakcije pulsnom električnom polju značajno utiče na prinos i poboljšanje kvaliteta dobijenog masnog ulja

(Guderjan et al., 2009), dok se enzimskim predtretmanom kod semenki suncokreta, uljane repice, pamuka i maslina prinos može povećati za do 35, 29, 52 i 152 %, respektivno (Szydłowska-Czerniak et al., 2010). Povišen pritisak pri ekstrakciji, pri takozvanoj klasičnoj ekstrakciji sa pregrejanim rastvaračem ili pod povišenim pritiskom, omogućava prisustvo rastvarača u tečnom stanju i na temperaturama iznad njegove tačke ključanja (100 – 200 °C), što pozitivno utiče na brzinu prenosa mase, penetraciju rastvarača u ćelije biljnog materijala, poboljšava rastvorljivost bioaktivnih komponenti i dovodi do smanjenja viskoznosti rastvarača (Camel, 2001; Huie, 2002).

3.1.1. Mikrotalasna ekstrakcija

3.1.1.1. Mikrotalasi

Mikrotalasi su zajednički naziv za decimetarsko, centimetarsko i milimetarsko područje radio talasa koji predstavljaju nejonizujuće elektromagnetno zračenje talasne dužine od 1 mm do 1 m, što odgovara frekvencijama od 300 GHz do 300 MHz, respektivno (Bogdal, 2005; Fantom, 1988). Ovi talasi predstavljaju kombinaciju električnog i magnetnog polja koja su postavljena upravno jedno na drugo (slika 3.1) (Kappe i Stadler, 2005; Kaufmann i Christen, 2002). Za upotrebu mikrotalasa u hemiji i industriji električna komponenta talasa je važnija, dok magnetna komponenta ima važnost u slučaju magnetnih materijala (metalni oksidi, organski magneti) (Kappe i Stadler, 2005).



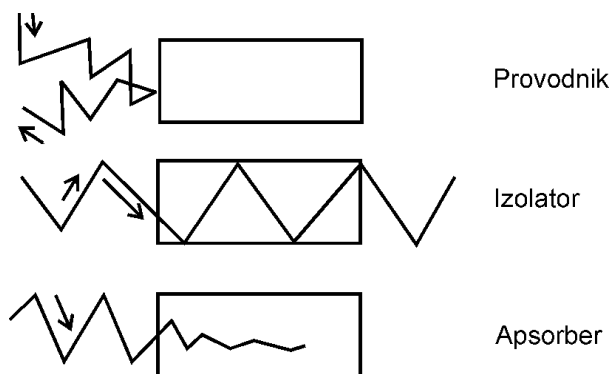
Slika 3.1 Mikrotalasi: ϵ – električno polje, H – magnetno polje, λ – talasna dužina (12,2 cm za 2450 MHz) i c – brzina svetlosti (adaptirano prema Hayes, 2002)

3.1.1.2. Dejstvo mikrotalasa

Pri konvencionalnom zagrevanju materije energija se prenosi kondukcijom, konvekcijom i zračenjem toplote sa površine grejnog tela, dok se pri grejanju pod dejstvom mikrotalasa energija prenosi direktno kroz molekulsku interakciju sa elektromagnetnim poljem. Mikrotalasi, prodirući kroz materijal, prenose elektromagnetnu energiju čija konverzija u toplotnu energiju rezultuje generisanjem toplote kroz čitavu zapreminu, odnosno, brzim i uniformnim zagrevanjem (Thostenson i Chou, 1999). Toplotni efekat mikrotalasa rezultat je sposobnosti materije da apsorbuje energiju mikrotalasa i prevodi je u toplotu, putem dva istovremena mehanizma, jonske provodljivosti i dipolne rotacije (Eskilsson i Björklund, 2000).

Prema sposobnosti materije da apsorbuje energiju mikrotalasa i prevodi je u toplotu materijali se mogu ponašati kao (Bogdal, 2005; Jones et al., 2002):

- električni provodnici (metali, grafit) – elektroni iz provodnika prate promene električnog polja mikrotalasa bez kašnjenja u fazi, sami emituju elektromagnetne talase, te postaju efikasni reflektori mikrotalasnog zračenja. Prodiranje mikrotalasa u metale je izuzetno malo, polarizacija se dešava samo u veoma tankom površinskom sloju i nema efektivnog zagrevanja.
- izolatori (kvarcno staklo, porcelan, keramika, teflon) – mikrotalasi prodiru kroz materijal bez ikakve apsorpcije, gubitaka ili generisanja toplote. Ovi materijali su izuzetno loši provodnici i transparentni su za mikrotalase.
- apsorberi (materijali velikih dielektričnih konstanti, dipolne materije, na primer voda) – materijali koji apsorbuju energiju mikrotalasa, zavisno od dielektričnih osobina što rezultuje generisanjem toplote.



Slika 3.2 Apsorpcija mikrotalasa od strane različitih materijala
(adaptirano prema Jones et al., 2002)

Jedan od važnih specifičnih efekata mikrotalasa je selektivno heterogeno zagrevanje koje nastaje u prisustvu dobro apsorbujućih heterogenih katalizatora ili reagenasa u manje polarnom reakcionom medijumu. Ovaj efekat objašnjava razlike u prinosima kod reakcija koje su katalizovane heterogenim katalizatorima koji dobro apsorbuju energiju mikrotalasa.

Kada se izlože dejstvu mikrotalasa, dipolni molekuli orijentišu se shodno električnom polju, međutim, neprestalnim praćenjem promene smera električnog polja ($4,9 \times 10^9$ puta u sekundi) dolazi do gubitka energije i zagrevanja uzrokovanih trenjem (Chen et al., 2007; Kappe i Stadler, 2005; Lidström et al., 2001). Količina generisane toplote direktno zavisi od sposobnosti molekula da prate oscilatorne promene električnog polja. Ako molekul ne može da prati ove promene (visoko frekventno zračenje), kada je reorijentacija ili suviše brza ili suviše spora (nisko frekventno zračenje), ne dolazi do zagrevanja. Frekvencija od 2,45 GHz, koja se najčešće koristi, nalazi se između ova dva ekstremna slučaja i obezbeđuje dipolnim molekulima dovoljno vremena da promene orijentaciju, ali ne i da se kreću u tom smeru. Gasovi se ne mogu zagrevati pod dejstvom mikrotalasa, jer je rastojanje između molekula gasa preveliko (Kappe i Stadler, 2005; Lidström et al., 2001). Takođe, led je gotovo transparentan za mikrotalase, jer su molekuli vode vezani u kristalnu rešetku i ne mogu se slobodno kretati, za razliku od vode u tečnom stanju (Kappe i Stadler, 2005).

Drugi važan mehanizam zagrevanja zasniva se na jonskoj provodljivosti. Rastvorene naelektrisane čestice (najčešće joni) osciluju pod dejstvom električne komponente mikrotalasnog zračenja, pri čemu se sudaraju sa susednim molekulima ili atomima što dovodi do kretanja i zagrevanja. Mehanizam jonske provodljivosti ima veći udeo u generisanju toplote pod dejstvom mikrotalasa od dipolarne rotacije. To je ujedno i razlog što se rastvori koji sadrže jone brže zagrevaju pod dejstvom mikrotalasa u odnosu na polarne rastvarače, kao i što se česmenska voda brže zagreva od destilovane vode (Kappe i Stadler, 2005; Lidström et al., 2001).

U cilju poređenja sposobnosti dva rastvarača da transformišu energiju mikrotalasa u toplotnu energiju neophodno je poznavati njihove mikrotalasne karakteristike. Ove osobine rastvarača i sistema mogu se razmatrati preko disipacionog faktora, koji se najčešće izražava u formi tangensa gubitaka ($\tan \delta$), koji predstavlja sposobnost materijala da prevodi elektromagnetnu energiju u toplotnu, pri datoj frekvenci i temperaturi, a izražava se pomoću jednačine 3.1. On zavisi od: frekvence elektromagnetnih talasa, temperature, fizičkog stanja i sastava materije (Galema, 1997).

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (3.1)$$

gde je: ϵ' - dielektrična konstanta ili relativna permitivnost i ϵ'' - faktor gubitaka.

Dielektrična konstanta ili relativna permitivnost ϵ' predstavlja sposobnost dielektričnog materijala da apsorbira električnu potencijalnu energiju pod dejstvom električnog polja, odnosno ova konstanta je mera sposobnosti molekula (ili grupe molekula) dipola da se reorijentišu pod dejstvom električnog polja. Faktor gubitaka ϵ'' izražava količinsku efikasnost prevođenja dielektrične energije u toplotu (Galema, 1997; Lidström et al., 2001). Vrednosti tangensa gubitaka presudni su za kvantifikaciju apsorpcije mikrotalasa, a za pojedine rastvarače neke od mikrotalasnih konstanti i karakteristika mogu se videti u Prilogu (tabele 10.1 i 10.2). Dielektrične konstante acetona i etanola, na primer, veoma su bliske po vrednosti, ali mnogo veća vrednost tangensa gubitaka kod etanola razlog je njegovog većeg porasta temperature pri mikrotalasnom zagrevanju (Mijin i Petrović, 2005).

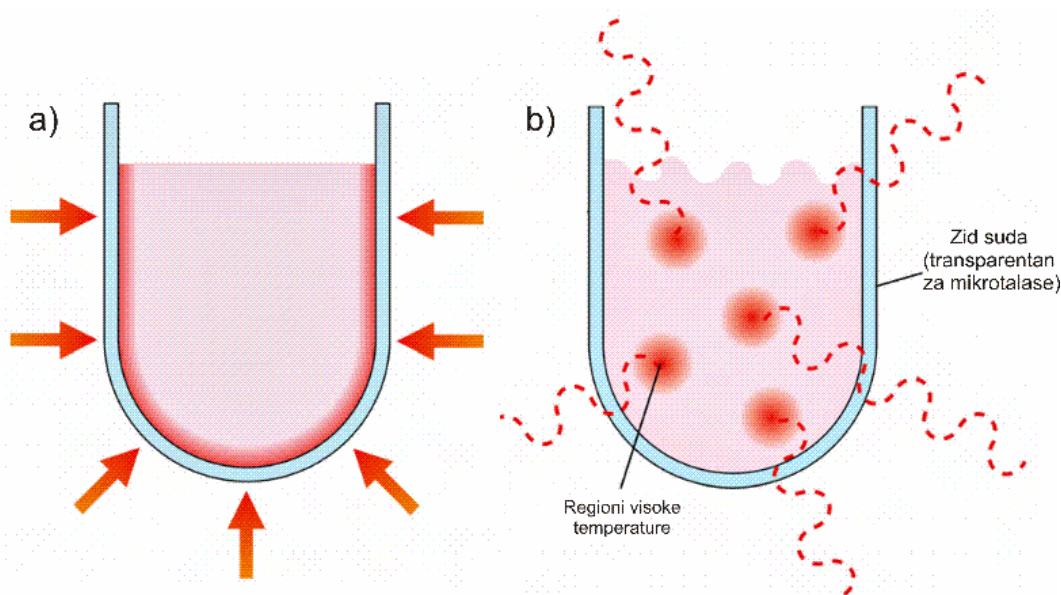
Zahvaljujući jedinstvenoj prirodi mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja, javlja se i efekat pregrevanja tečnosti, odnosno pojava da se tečnosti izložene dejstvu mikrotalasa mogu zagrejati iznad tačke ključanja bez pojave ključanja (Kappe i Stadler, 2005; Perreux i Loupy, 2001). Ova pojava može se objasniti preko dielektričnih osobina tečnosti. Dielektrično relaksaciono vreme τ je vreme koje je potrebno molekulu da se vrati za 36,8 % od njegovog početnog položaja kad dejstvo elektromagnetnog polja prestane. Ovo vreme zavisi od temperature i smanjuje se sa porastom temperature. Pošto su vrednosti ϵ' i ϵ'' takođe zavisne od relaksacionog vremena, sposobnost materije da prevodi mikrotalasnu energiju u toplotu ne zavisi samo od frekvence nego i od temperature. Stoga, će organskim rastvaračima relaksacionog vremena manjeg od 65 ps koji su izloženi zračenju frekvence 2,45 GHz vrednost $\tan \delta$ rasti sa porastom temperature. Ovaj fenomen dovodi do pojave da tačke ključanja pojedinih tečnosti mogu biti i za 26 °C više od onih pod normalnim uslovima (Lidström et al., 2001). Efekat pregrevanja može se izbeći dodavanjem kuglica za ključanje ili mešanjem (Kappe i Stadler, 2005).

Zagrevanje pod dejstvom mikrotalasa ima još jednu veliku prednost, a to je efekat koji se može objasniti kao „naglo uključanje i isključanje“, odnosno pojavu da je u momentu isključenja mikrotalasnog izvora latentna toplota jedino što ostaje u sistemu. Ovaj efekat drastično olakšava kontrolu i automatizaciju procesa (Hayes, 2002).

Važna karakteristika grejenja pod dejstvom mikrotalasa je i fenomen formiranja regiona veoma visoke temperature, „hotspot“-ova, što vodi neuniformnom zagrevanju. Smatra se da ovaj fenomen nastaje kada se nepolarna supstanca izlaže dejstvu mikrotalasa u polarnom medijumu pri čemu dolazi do termičke nestabilnosti uzrokovane nelinearnom zavisnošću elektromagnetnih i toplotnih osobina materijala od temperature (Jones et al., 2002; Kappe i Stadler, 2005; Reimbert et al. 1996). Formiranje stojećih talasa unutar dela aparata u kome se material izlaže dejstvu mikrotalasa dovodi do pojave da pojedini regioni bivaju izloženi većoj energiji od ostalih. Ovo rezultuje povećanjem brzine zagrevanja u tim regijama dovodeći do nelinearne zavisnosti. Dizajn dela aparata u kome se materijal izlaže dejstvu mikrotalasa veoma je važan faktor za kontrolu, ali i pravilno iskorišćenje „hotspot“ fenomena. (Jones et al., 2002).

U poređenju sa drugim konvencionalnim tehnikama, zagrevanje putem mikrotalasa nudi više prednosti (Chou et al., 2009; Hayes, 2002; Jones et al., 2002):

- veća brzina zagrevanja,
- nema direktnog kontakta materije koja se greje sa toplotnim izvorom,
- može se postići selektivno grejanje,
- lakša kontrola procesa,
- manje dimenzije uređaja, i
- manja količina otpada.



Slika 3.3 Šematski prikaz zagrevanja, prenos toplote
a) kondukcijom i b) mikrotalasima (adaptirano prema Hayes, 2002)

Najvažniji parametri kod upotrebe mikrotalasa su apsorbovana snaga mikrotalasa (P) i dubina mikrotalasne penetracije (D). Za razliku od konvencionalnog zagrevanja, ovi parametri veoma zavise od dielektričnih osobina materijala. Mikrotalasno grejanje je rezultat apsorpcije mikrotalasne energije od strane materijala koji se izloži elektromagnetnom i bazira se na apsorbovanoj snazi po jedinici zapremine (Clark et al., 2000):

$$P = \sigma |E|^2 = 2\pi f \epsilon_0 \epsilon'' |E|^2 = 2\pi f \epsilon_0 \epsilon' \tan \delta |E|^2 \quad (3.2)$$

gde je: E - apsolutna vrednost električnog polja, ϵ_0 - dielektrična konstanta vakuuma, f - frekvencija mikrotalasa i σ - ukupna efektivna provodljivost. Kao što se može videti iz jednačine 3.2, dielektrične karakteristike materijala (ϵ' , ϵ'' i $\tan \delta$) igraju najvažniju ulogu u određivanju količine

apsorbovane snage, čiji najveći deo biva preveden u toplotu unutar materijala, kao što pokazuje jednačina 3.3:

$$\frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{2\pi f \epsilon_0 \epsilon'' |E|^2}{\rho C_p} \quad (3.3)$$

gde je: T - temperatura, t - vreme, ρ - gustina i C_p - toplotni kapacitet.

Dielektrične osobine materijala zavise od temperature, sadržaja vlage, gustine i geometrije materijala (Jones et al., 2002) i važan su parametar u određivanju dubine do koje će mikrotalasi prodrati u materijal. Kao što se može videti iz jednačine 3.4, što je veća vrednost $\tan \delta$, to je manja dubina penetracije za specifičnu talasnu dužinu:

$$D = \lambda_0 \sqrt{\frac{\epsilon'}{\epsilon''}} \quad (3.4)$$

gde je: D - dubina penetracije, a λ_0 - talasna dužina mikrotalasnog zračenja.

Dubina penetracije mikrotalasa je važna jer određuje uniformnost zagrevanja materijala (Galema, 1997). Visoke frekvence i velike vrednosti dielektričnih osobina rezultuju površinskim zagrevanjem, dok u suprotnom slučaju dolazi do uniformnog zapreminskog zagrevanja (Clark et al., 2000).

3.1.1.3. Upotreba mikrotalasa

Postojanje elektromagnetnih talasa poznato je još s kraja XIX veka, ali se početak primene i proučavanja mikrotalasa vezuju za ime Percy Spenser, vreme Drugog Svetskog rata i razvoj radara (Kappe i Stadler, 2005). Kasnih šesdesetih godina prošlog veka mikrotalasi su upotrebljavani u eksperimentima gde su bili neophodni nagli skokovi temperature, dok njihova primena u hemijskim istraživanjima počinje tek ranih 1980-tih (Galema, 1997; Lidström et al., 2001).

Danas se mikrotalasi koriste u gotovo svakoj kuhinji, za termičku obradu hrane, ali i u prehrambenoj industriji, medicini, hemiji, komunikacionim tehnologijama i različitim industrijskim granama (tabela 3.1).

Tabela 3.1 Primena mikrotalasa

Oblast primene	Primena	Napomena	Referenca
Prehrambena industrija	Kuvanje, zagrevanje, sušenje, topljenje, pasterizacija, sterilizacija.	Kraće vreme, ušteda u energiji. Termički tretman hrane.	Ku et al., 2002; Venkatesh i Raghavan, 2004
Sinteza prirodnih jedinjenja i njihovih analoga	Sinteza različitih alkaloida i sekundarnih metabolita izolovanih iz životinjskih i biljnih ćelija. Modifikacija prirodnih jedinjenja.	Drastično skraćanje vremena i povećanje prinosa u odnosu na klasične metode. Sinteza novih klasa bioaktivnih jedinjenja manje toksičnosti.	Appukkuttan i Van der Eycken, 2006
Organska hemija	Sinteza organskih jedinjenja.	Veći prinos, skraćanje vremena procesa, povećana reaktivnost pojedinih reaktanata.	Giguere et al., 1986; Langa et al., 1997; Perreux i Loupy, 2001; Yu et al., 1992.
Medicina i farmaceutska industrija	Dijagnostika i terapija onkoloških oboljenja. Sinteza sirovina za farmaceutsku industriju.	U kombinaciji sa X-zracima, aplikacija koja se zasniva na lokalnom zagrevanju.	Hayes, 2002; Scott, 1993.
Obrada i proizvodnja keramike		Skraćuje proizvodno vreme, poboljšava prinos, mikrostruktura i uniformnost.	Ku et al., 2002
Hemija polimera	Polimerizacione reakcije. Lepljenje gume (vulkaniziranje).	Ubrzavanje procesa, smanjenje cene, olakšana automatizacija i kontrola procesa. Sa ekološkog aspekta prihvatljiviji postupak.	Kappe i Stadler, 2005; Ku et al., 2002; Thostenson i Chou, 1999
Sinterovanje	Sinterovanje kompozitnih materijala.	Kraće vreme, pojeftinjenje postupka, manja prosečna veličina čestica, veća gustina, bolja čvrstoća i izdržljivost materijala pri savijanju.	Agrawal, 1998; Thostenson i Chou, 1999
Remedijacija zemljišta	»In situ« remedijacija zemljišta kontaminiranog isparljivim komponentama ili teškim metalima.	Drastično manja cena postrojenja.	Kawala i Atamaczuk, 1998.
Tretman različitih vrsta otpada	Mešani otpad, pepeo iz peći, otpadna voda iz industrije elektronskih komponenti.	Brzo i selektivno zagrevanje, redukcija zapremine, mogućnost tretmana »in situ«, jednostavnost opreme i kontrole procesa.	Jones et al., 2002
Poljoprivreda	Biološko dejstvo.	Uništavanje insekata, naklijavanje semena.	Venkatesh i Raghavan, 2004.
Obrada minerala, metalurgija i auto industrija.	Kaljenje i termička obrada ruda. Regeneracija aktivnog uglja pri eksploataciji zlata. Pirometalurgija, zavarivanje, topljenje.	Viši nivo bezbednosti i automatizacije pri radu, brzo zapreminsko zagrevanje.	Baranski i Czerski, 1976; Jones et al., 2002
Radar	Navigacija, radarski altimeter, GPS (Global Positioning System) sistem, radiolokatori.	Radar odašilje mikrotalase koji se odbijaju o telo i iz povratne informacije određuje se brzina, rastojanje, smer, visina.	Scott, 1993.
Komunikacija	Mobilni telefoni, satelitska komunikacija, bežični LAN protokoli.	Mikrotalasni predajnici, antene, kablovka televizija, pristup internetu, koriste niskofrekventne mikrotalase.	Scott, 1993.

Da bi se izbeglo preklapanje i ometanje sa radarskim i telekomunikacionim frekvencama, za upotrebu u industriji, naučnim istraživanjima i medicini rezervisane su, od strane Federalne komisije za komunikaciju (Federal Communications Commission-FCC), tri frekvence: 27,12 i 915 MHz i 2,45 GHz, što odgovara talasnim dužinama od 11,05 m i 37,24 i 12,24 cm (Kappe i Stadler, 2005; Thostenson i Chou, 1999; Zhang i Hayward, 2006). Mikrotalasne pećnice za upotrebu u domaćinstvu i mikrotalasni sistemi za upotrebu u industriji i laboratorijama najčešće rade pri frekvenci od 2,45 GHz.

Mikrotalasni foton koji odgovara frekvenci od 2,45 GHz ima energiju približno 0,0016 eV (~ 1 kJ/mol), koja nije dovoljna da raskine vodoničnu vezu ili izazove hemijsku reakciju (Kappe i Stadler, 2005). Stoga, hemijske reakcije i transformacije pod dejstvom mikrotalasa podstaknute su jedino zagrevanjem materijala koji apsorbuje energiju mikrotalasa i prevodi je u toplotu (Kappe i Stadler, 2005).

3.1.1.4. Mikrotalasna ekstrakcija

Mikrotalasna ekstrakcija, odnosno ekstrakcija pod dejstvom mikrotalasa, je tehnika ekstrakcije čija primena u laboratorijskim i industrijskim uslovima ima za cilj manju potrošnju rastvarača, skraćenje vremena ekstrakcije, povećanje prinosa, a veoma često i kvaliteta ekstrakta (Cravotto et al., 2008; Eskilsson i Björklund, 2000; Mahesar et al., 2008; Wang i Weller, 2006; Zigoneanu et al., 2008). Mikrotalasi se već koriste u procesu ekstrakcije bioaktivnih materija koje su od interesa za prehrambenu i farmaceutsku industriju, kao na primer, polifenola iz aromatičnog bilja (Proestos i Komaitis, 2008), ploda jabuke (Ai et al., 2006), semena grožđa (Hong et al., 2001) i listova zelenog čaja (Pan et al., 2003), antioksidanata iz ulja pirinčanih mekinja (Zigoneanu et al., 2008), hlorogenske kiseline iz pupoljka cveta *Lonicera japonica* Thunb. (Zhang et al., 2008), artemisinina iz *Artemisia annua* (Hao et al., 2002), solanesola iz listova duvana (Zhou i Liu, 2006), izoflavona iz soje (Rostagno et al., 2007), obojenih pigmenata iz paprike (Csiktusnadi Kiss et al., 2000).

Primenom mikrotalasa u ekstrakciji policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz morskih sedimenata dobijaju se slični rezultati kao pri ekstrakciji po Soxhlet-u, ali se umesto šesnaestočasovnog postupka ekstrakcije jednog uzorka na ovaj način može ekstrahovati dvanaest uzoraka za 30 minuta (Chee et al., 1996). Mikrotalasna ekstrakcija je kratkotrajnija metoda ekstrakcije koja iziskuje manju količinu rastvarača (5 do 10 puta) u odnosu na ekstrakciju po Soxhletu, jedina loša strana je neophodnost filtracije po završetku ekstrakcije (Camel, 2000). U slučaju ekstrakcije tanšinsona mikrotalasna ekstrakcija u trajanju od 2 minuta daje iste prinose kao ekstrakcija na sobnoj temperaturi, zagrevanje sa refluksom, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija pod dejstvom ultrazvuka za 24 h, 45, 75 i 90 minuta, respektivno (Pan et al., 2002). Pri poređenju sa ultrazvučnom i ekstrakcijom po Soxhletu, najbolji prinos lipofilnih markera

(uglavnom alkamida) iz ehinacee (*Echinacea purpurea* L.) dobijen je mikrotalasnom ekstrakcijom 70 % etanolom. Poređenjem sa ultrazvučnom ekstrakcijom i korišćenjem vodeno-metanolnih rastvora različitih koncentracija, mikrotalasna ekstrakcija daje značajno bolje prinose u slučaju 70-100 % metanola, dok su dobijeni slični rezultati pri ekstrakciji sa 60 % metanolom (Hudaib et al., 2003). Veći prinos (više od 50 %) ukupnih triterpenoidnih saponina iz *Ganoderma atrum* za drastično kraće vreme (5 minuta) postiže se mikrotalasnom ekstrakcijom u odnosu na klasičnu ekstrakciju sa mešanjem (12 h), zagrevanje sa refluksom (2 h), ultrazvučnu (30 minuta) i superkritičnu (3 h) ekstrakciju, pri velikoj uštedi u rastvaraču (Chen et al., 2007). Slični rezultati, u poređenju sa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, zapaženi su pri ekstrakciji, saponina iz *Panax notoginseng* (Vongsangnak et al., 2004) triterpena iz listova masline (Sanchez-Avila et al., 2009), bioaktivnih komponenti iz listova *Lochroma gesnerioides* (Kaufmann et al., 2001).

Elektronskom mikroskopijom utvrđeno je da u svežim listovima pelina (*Artemisia annua*) pri kratkotrajnom izlaganju mikrotalasima (2 minuta) i bez prisustva rastvarača dolazi do oštećenja hloroplasta, granica zrna skroba biva narušena i javlja se odvajanje citoplazme od zida ćelije, dok u prisustvu rastvarača, ovi efekti bivaju još izraženiji, javlja se plazmoliza i oštećenje struktura ćelijskih organela (Han et al., 2004). Slični efekti nastaju pri klasičnoj ekstrakciji rastvaračem duže vreme (30 minuta, 50 °C) što upućuje na zaključak da mikrotalasno zračenje ubrzava proces ekstrakcije izazivanjem mikrostrukturnih promena u biljnom materijalu (Han et al., 2004). Prema izveštaju Parea i njegovih saradnika (1991) pri dejstvu mikrotalasa u ćelijama biljnog materijala raste temperatura sve do onog momenta kada pritisak unutar ćelije prevaziđe sposobnost širenja ćelijskog zida što rezultuje eksplozijom ćelijskog zida i oslobađanja materijala iz unutrašnjosti ćelije. Elektronskim mikroskopom utvrđeno je da je nivo oštećenja ćelija listova kanadske nane (*Mentha piperita*) nakon 20 sekundi dejstva mikrotalasa identičan onom koji nastaje nakon 2 h parne destilacije, odnosno 6 h ekstrakcije po Soxhlet-u (Pare et al., 1991). Mikrotalasi uzrokuju značajne promene u fizičkoj strukturi listova ruzmarina (Bousbia et al., 2009; Chen i Spiro, 1994; Chen i Spiro, 1995) i nane (Chen i Spiro, 1994; Sprio i Chen, 1995). Ćelije epiderma koje sadrže isparljive komponente pod dejstvom mikrotalasa (15 minuta) bivaju razorene, za razliku od ćelija biljnog materijala koji je podvrgnut klasičnoj hidrodestilaciji (3 h) gde gotovo da i nema promena u poređenju sa ćelijama svežeg, netretiranog materijala (Bousbia et al., 2009). Mehanički napor koji nastaje pod naglom dekompresijom usled brzog isparavanja vode tokom tretmana mikrotalasima uzrok je dva glavna efekta: dehidratacija usled isparavanja i promena u površinskom naponu na zidovima ćelija koji prevazilazi kapacitet širenja ćelijskog zida, što dovodi do nagle rupture (Bousbia et al., 2009; Chen i Spiro, 1994). Značajno oštećenje ćelijskih struktura dokazano je u slučaju suve destilacije pod dejstvom mikrotalasa u slučaju ekstrakcije etarskog ulja kardamoma (*Elettaria cardamomum*) (Lucchesi et al., 2007).

Chen i Spiro (1994) pokazali su u eksperimentima sa listovima nane i ruzmarina, da uticaj mikrotalasa na nivo oštećenja ćelijskih struktura ne zavisi samo od dielektričnih osobina

rastvarača. U slučaju ekstrakcije listova ruzmarina heksanom, veći deo mikrotalasne energije biva apsorbovan od strane biljnog materijala, što dovodi do potpune dezintegracije ćelijskih struktura u kojima se nalaze isparljive komponente, za razliku od ekstrakcije etanolom gde je većina ćelijskih struktura očuvana. U slučaju rastvarača sa manjom dielektričnom konstantom ovaj efekat je izraženiji pri većem udelu biljnog materijala u ekstrakcionoj smeši (Chen i Spiro, 1995). Takođe, efikasnost mikrotalasne ekstrakcije zavisi od sadržaja vode u biljnom materijalu (Spiro i Chen, 1995).

Za upotrebu mikrotalasa u procesima ekstrakcije razvijeni su specijalni laboratorijski mikrotalasni ekstraktori. Primena mikrotalasa u laboratorijskim ekstraktorima zasniva se, generalno, na dve različite tehnologije: hermetička (u zatvorenim sudovima, pod kontrolisanim uslovima pritiska i temperature) ili fokusirana (u otvorenim sudovima, pod atmosferskim pritiskom) mikrotalasna ekstrakcija. U zatvorenim sudovima rastvarači se mogu grejati iznad temperature ključanja na atmosferskom pritisku, što poboljšava efikasnost i brzinu ekstrakcije. U ovakvim sistemima postoji mogućnost regulacije temperature i najčešće su konstruisani tako da se u isto vreme može vršiti ekstrakcija u više uzoraka. U takozvanim, otvorenim sistemima, ekstrakcija se odvija pod atmosferskim pritiskom, pri čemu je maksimalna temperatura procesa određena temperaturom ključanja rastvarača na tom pritisku. Kod ovakvih sistema koriste se fokusirani mikrotalasi pa je zagrevanje uzoraka homogeno i veoma efikasno (Camel, 2000).

I pored postojanja specijalno dizajniranih reaktora za mikrotalasnu ekstrakciju i dalje su u upotrebi, u cilju laboratorijskih istraživanja, mikrotalasne pećnice namenjene domaćinstvu (tabela 3.2).

Tabela 3.2 Pregled primene mikrotalasne pećnice u ekstrakciji bioaktivnih proizvoda

Materijal za ekstrakciju	Tehnika mikrotalasne ekstrakcije, vreme, snaga mikrotalasa, rastvarač, odnos materijal za ekstrakciju rastvarač	Napomena	Ekstraktivna materija	Literatura
Listovi zelenog čaja (<i>T. sinensis</i> L.)	45 s uključen izvor mikrotalasa (zagrevanje do 85-90 °C) zatim 10 s isključen, nakon toga po 3 s uključen (zagrevanje) i 10 s isključen (hlađenje) do ukupnog vremena ekstrakcije (0,5-8 min). Etanol (koncentracija 0-100 %, v/v), odnos biljni materijal-rastvarač (10:1-25:1 ml g ⁻¹).	Veći prinos obe ekstraktivne materije pri mikrotalasnoj ekstrakciji (4 min) od klasične ekstrakcije na sobnoj temperaturi (20 h), ultrazvučne ekstrakcije (90 min) i zagrevanja sa refluksom (45 min).	Polifenoli iz čaja i kofein	Pan et al., 2003
Osušeni listovi grčkih aromatičnih biljaka ¹	45 s uključen izvor mikrotalasa (750 W), zatim 30 s isključen, nakon toga još 15 s uključen, pa hlađenje do sobne temperature. Četiri ovakva ciklusa (4 min. dejstva mikrotalasa). Rastvarači: 60 % aceton, 60 % metanol, voda i etilacetat/voda, odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/ml.	Drastično kraće ekstrakciono vreme (4 min umesto 2 h), duplo manji utrošak rastvarača, veći prinos fenolnih komponeneti u poređenju sa konvencionalnom metodom (refluks)	Fenolne komponente	Proestos i Komaitis, 2008
Koren sladića (<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.)	Tri puta po 15 s uljučen i 15 s isključen izvor mikrotalasa (do temperature od 85–90 °C) nakon toga po 3 s uključenja radi zagrevanja i 15 s isključenja radi hlađenja do ukupnog vremena ekstrakcije (60 minuta). Mešanje magnetnom mešalicom. Rastvarači: voda, etanol, etanol/voda i rastvori amonijaka različitih koncentracija, odnos biljni materijal-rastvarač 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 g/ml.	Za isti prinos desetostruko kraće vreme, manja upotreba rastvarača.	Glicirizinska kiselina	Pan et al., 2000

Osušeni listovi pelina (<i>Artemisia annua</i> L.)	Nakon 60 s pod dejstvom mikrotalasa, sud se hladi pod mlazom hladne vode a procedura ponavlja sve do postizanja kumulativnog dejstva mikrotalasa od 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 i 18 min. Rastvarači: etanol, trihlormetan, cikloheksan, n-heksan, petrol etar (30–60 °C i 60–90 °C), 30 g biljnog materijala sa 100, 150, 180, 220, 240, 250, 300, 350 ml, respektivno.	Drastično skraćanje vremena i najveća brzina ekstrakcije u odnosu na ekstrakciju po Soxhlet-u, klasičnu i super-kritičnu ekstrakciju. Dugotrajno izlaganje mikrotalasima dovodi do degradacije artemisina.	Artemisinin	Hao et al., 2002
Osušeni listovi duvana (<i>N. tabacum</i> L.)	45 s uključen izvor mikrotalasa (700 W) (zagrevanje do 60 °C) zatim 10 s isključen, nakon toga po 3 s uključen (zagrevanje) i 9 s isključen (hlađenje) do ukupnog vremena ekstrakcije (60 minuta). 10 g usitnjenog uzorka sa 100 ml ekstrakcionog rastvarača – heksan, etanol i heksan:etanol: 1:1, 1:3 i 3:1 (v/v)	Četiri puta kraće vreme u odnosu na konvencionalnu metodu ekstrakcije (refluks) kao i veći prinos. Elektronskom mikroskopijom dokazano je razaranje ćelija pod dejstvom mikrotalasa.	Solanesol	Zhou i Liu, 2006
Osušeni listovi origana (<i>O. Glandulosum</i>)	Ekstrakciono vreme 2 min, temperatura 60–80 °C, a mikrotalasna snaga 850 W. 25 g biljnog materijala i 200 ml heksana.	Veći sadržaj aktivne komponente (timol) za oko 50 %. Prinos 1 % za 2 minuta u poređenju sa klasičnom hidrodestilacijom gde je prinos 4,8 % za 240 minuta.	Ulje	Bendahou et al., 2008
Koncentrat za piliće	Nakon 20 s pod dejstvom mikrotalasa (900 W), sud se hladi pod mlazom hladne vode. Ova procedura ponavlja se sve do postizanja ukupnog dejstva mikrotalasa od 10 minuta. 5 g usitnjene hrane za piliće i 12 ml heksana	Skraćivanje vremena ekstrakcije sa 6 h na manje od 40 min. Prema AOAC 920.39 metodi i više nego dvostruko veći prinos u poređenju sa ultrazvučnom	Ukupno ulje	Mahesar et al., 2008

ekstrakcijom.

Osušeni koren <i>Salvia miltiorrhiza bunge</i>	25 s uljučen izvor mikrotalasa (do temperature od 80 °C) nakon toga po 2 s uključenja radi zagrevanja i 10 s isključenja radi hlađenja do ukupnog vremena ekstrakcije (5 minuta). 95 % (v/v) ethanol, metanol, aceton, n-butanol, etil acetat, n-butil acetat i glacijalna sirćetna kiselina, odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/ml.	Isti prinos tanšinsona se dobija nakon 2 minuta mikrotalsne, 75 minuta ultrazvučne, 90 minuta Soxhlet ekstrakcije, 45 minuta zagrevanja sa refluksom ili 24 h klasične ekstrakcije na sobnoj temperaturi.	Kriptotanšinson, tanšinson I i tanšinson IIA	Pan et al., 2002
--	---	---	--	------------------

¹ *Rosmarinus officinalis*, *Vitex agnus-cactus*, *Origanum dictamnus*, *Origanum majorana*, *Syrax officinalis*, *Teucrium polium*

3.2. Ekstrakcija čvrsto-tečno

Ekstrakcija čvrsto-tečno je operacija prenosa mase kojom se jedna ili više supstanci izdvaja iz čvrstog materijala pomoću pogodnog rastvarača (Ponomarev, 1976). Jedan deo čvrstog materijala, koji, po pravilu, sadrži željenu supstancu, rastvara se u rastvaraču, a zatim se rastvor odvaja od iscrpljenog, nerastvornog dela čvrstog materijala. Čvrst materijal je najčešće biljna ili mineralna sirovina, dok se voda, organski rastvarači i rastvori kiselina, baza i soli koriste kao rastvarači. Deo čvrstog materijala koji se rastvara predstavlja ekstraktivne materije, dok se dobijeni rastvor naziva ekstrakt ili lug (Veljković i Milenović, 2002). Efikasnost ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz biljnih materijala zavisi u mnogome od rastvorljivosti, stabilnosti i funkcionalnih grupa željene komponente. Ekstrakciona tehnika, kako za dobijanje sirovog (neprerađenog) ekstrakta tako i za prečišćavanje, mora biti odabrana tako da onemogući razlaganje željene komponente, kao i bočne i nepoželjne reakcije (Silva et al., 1998).

Faktori od kojih zavisi kinetika i efikasnost procesa ekstrakcije su (Ponomarev, 1976):

- osobine i kvalitet biljnog materijala (geografsko poreklo, sadržaj vlage, sadržaj aktivnih materija, stepen usitnjenosti, poroznost biljne sirovine i dr.),
- rastvarač (polarni ili nepolarni),
- vreme trajanja ekstrakcije,
- temperatura procesa ekstrakcije i
- tehnika ekstrakcije.

3.2.1. Osobine biljne sirovine

3.2.1.1. Izbor, prikupljanje i identifikacija biljnog materijala

Od biljnih sirovina koriste se kultivisane ili divlje rastuće lekovite, aromatične, poljoprivredne, baštenske ili vrtne, sveže, suve biljke, njihovi delovi i mešavine (rizom, koren, stablo, grančice, grane, pupoljci, lišće, cvetovi, plodovi, seme, nadzemni delovi) (Stanković, 2002). Izbor biljne vrste vrši se na osnovu hemijskog sastava, medicinskog dejstva, etnofarmakoloških i hemotaksonomskih podataka ili prema geografskom poreklu. Izbor biljne vrste može biti i potpuno slučajan, ali to nosi rizik od ponavljanja postojećih istraživanja (Jones i Kinghorn, 2006; Silva et al., 1998). Najčešće birane bilje vrste interesantne su sa medicinskog aspekta ili su to one o kojima ima malo raspoloživih podataka u literaturi. Najnoviji pristup u odabiru biljne vrste uključuje upotrebu kompjuterskog selekcionog metoda (L.I.S.T. – Literature Information Selection Technique) koji na osnovu podataka o biološkoj

aktivnosti, botaničkih činjenica i hemotaksonomskih informacija koristeći NAPRALERT® bazu podataka vrši selekciju. Taksonomska identifikacija, pravljenje herbarijumskih uzorka i vaučera u početnoj fazi fitohemijskih istraživanja je veoma važna jer može pomoći u kasnijoj identifikaciji komponenta kao i obezbeđivanju reproducibilnosti rezultata (Silva et al., 1998).

Ubrani primerci biljke moraju biti neoštećeni i zdravi, jer mikrobna infekcija može dovesti do promene metaboličkih proizvoda uz formiranje fitoaleksina (Krishnaswamy, 2003; Silva et al., 1998). Profil sekundarnih metabolita u biljnom materijalu može veoma varirati, u kvalitativnom i kvantitativnom smislu, u zavisnosti od stepena razvoja, starosti biljke i uslova rasta (klima, nadmorska visina, zemljište). Različiti biljni delovi proizvode i akumuliraju različite grupe sekundarnih metabolita, pa su tako, flavonoidi uglavnom prisutni u cvetu i listu, tropanski alkaloidi u korenu, dok su seskviterpenski laktoni i etarska ulja ograničeni na žlezdane ćelije i dlačice.

3.2.1.2. Sušenje i čuvanje biljnog materijala

Svež i ravnomerno raspoređen biljni materijal suši se na vazduhu, na sobnoj temperaturi (do 30 °C) zaštićen od sunčeve svetlosti (UV zračenje može dovesti do nepoželjnih hemijskih reakcija i transformacija) (Silva et al., 1998). Korišćenjem solarnih sistema u procesu sušenja ostvaruje se ušteda energije, dobar kvalitet sušenog materijala i optimalno vreme sušenja (Tolmač, 2004). Gusto pakovanje svežeg biljnog materijala (veliki sadržaj vode, minimalna cirkulacija vazduha) može dovesti do razvoja mikroorganizama, samozagrevanja i pojave fermentacije (Silva et al., 1998). U slučajevima kad je neophodno koristiti svež biljni materijal, neposredno nakon ubiranja, biljni materijal treba potopiti na kratko u metanol ili etanol kako bi se inaktivirali enzimi i sprečili enzimski procesi koji počinju odmah po ubiranju biljnog materijala ili tokom sitnjenja (Jones i Kinghorn, 2006). U pojedinim slučajevima se preporučuje odvajanje delova biljke i njihova posebna obrada, zbog različitog sadržaja ulja i različitog hemijskog sastava (Silva et al., 1998).

Propisno osušen biljni materijal pakuje se u različitu ambalažu (papirne, jutane ili platnene vreće, odnosno sanduci i kutije od kartona, drveta, metala, plastike) zavisno od količine i vrste biljnog materijala. Dobro zapakovan osušeni biljni materijal se čuva na suvom mestu, u provetrenim prostorijama zaštićen od uticaja sunca. Relativna vlažnost vazduha u skladištima bi trebala biti ispod 60 %, a temperatura ne viša od 25 °C (Ph. Jug. V, 2002).

Primećeno je da se tokom čuvanja svežeg biljnog materijala neke bioaktivne komponente mogu razgraditi. Tako, na primer, kod ruzmarina karnosolna kiselina se delimično razlaže i prelazi u karnosol ili u druge diterpene, kao što je rosmanol (Yanishlieva et al., 2006), a u slučaju ploda muskatnog oraha, dužim čuvanjem povećava se sadržaj miristicina dok se sadržaj isparljivih jedinjenja smanjuje (Krishnaswamy, 2003). Čuvanjem spanaća na 4 °C u toku jedne nedelje ne menja se sadržaj glavnih flavonoida i fenolnih jedinjenja (Bottino et al., 2009), dok se čuvanjem na ambijentalnoj temperaturi za tri dana

gubi oko 90 % vitamina C (Diplock et al., 1998). Kod sitnog bobičastog voća (jagoda, malina, borovnica), čuvanjem na temperaturama od 0 do 30 °C u toku 8 dana, povećavaju se sadržaji fenola, antocijana i vitamina C, kao i antioksidativna aktivnost, jer metabolički procesi nastavljaju da teku i dalje (Kalt et al., 1999).

3.2.1.3. Step en usitnjenosti biljnog materijala

Za usitnjavanje biljnog materijala može se koristiti različita oprema, od mlinova za začine i kafu, blendera, do sečiva, makaza i noževa (Silva et al., 1998), dok je kvalitet usitnjavanja određen veličinom čestica, površinom čestica i brojem razorenih ćelija (Ponomarev, 1976). Važno je u slučaju termolabilnih i lako isparljivih sekundarnih metabolita izbeći ovu fazu kako bi se izbegao gubitak željenih bioaktivnih komponenti. U takvim slučajevima, biljni materijal može biti zamrznut upotrebom tečnog azota i usitnjen u avanu neposredno pre upotrebe (Silva et al., 1998). Step en usitnjenosti biljne sirovine ima veliki uticaj na efikasnost ekstrakcije jer se razaranjem ćelija koje nose bioaktivne materije povećava kontaktna površina biljni materijal-rastvarač i smanjuje otpor prenosu mase, a samim tim olakšava i ubrzava proces ekstrakcije. Iz razrušenih ćelija proces ekstrakcije je nekoliko puta brži i zavisi od hidrodinamičkih uslova, dok je proces difuzije iz nerazrušenih ćelija sporiji i zavisi od koeficijenta prenosa mase unutar biljnog materijala. Efikasnost ekstrakcije u periodu brze ekstrakcije određena je količinom materije koja slobodno difunduje iz razrušenih ćelija. Ako je u usitnjenosti materiji broj razrušenih ćelija mali, proces ekstrakcije je usporen i određen je brzinom difuzije materije iz biljnog materijala. U tehnološkim istraživanjima određuje se površina jedinice mase čvrstog materijala, tzv. specifična površina, koja predstavlja površinu kontakta između čestica usitnjene biljne sirovine i rastvarača računatu po jedinici mase biljnog materijala (Ponomarev, 1976).

3.2.1.4. Bubrenje i adsorpciona sposobnost biljne sirovine

U opštem slučaju, ekstrakcija čvrsto-tečno odvija se u dve faze: najpre kvašenje i bubrenje materijala, a zatim ekstrakcija (Ponomarev, 1976), pri čemu pod bubrenjem podrazumevamo sposobnost biljnog materijala da u kontaktu sa rastvaračem povećava svoju masu i zapreminu (World Health Organization, 1998), što je opisano apsorpcionim koeficijentom K istepenom bubrenja α (Plyusnin i Tikhonova, 1996).

U slučaju ekstrakcije suvog biljnog materijala, proces je složeniji jer mu prethodi faza kvašenja i bubrenja ćelija biljnog materijala, a zatim rastvaranje sasušene ekstrakativne materije unutar ćelija, dok u slučaju svežeg biljnog materijala rastvarač odmah rastvara i ispira ekstraktivne materije sa površine razorenih biljnih ćelija, a ekstraktivne materije iz unutrašnjosti nerazorenih biljnih ćelija prenose se difuzijom kroz membranu biljnih ćelija, a zatim dalje u masu rastvora (Ponomarev, 1976).

Dodavanjem površinski-aktivnih materija (na primer Tween-20) brzina bubrenja raste. Ispitivanjem procesa bubrenja u vodeno-etanolnim rastvorima, opažena je najveća brzina u prvih 10 minuta, posle čega se proces usporava (Vinatoru, 2001). Bubrenje biljne sirovine treba izvoditi zagrejanim rastvaračem, da bi se skratilo vreme bubrenja (2-3 puta).

Pri bubrenju se zapaža kretanje rastvarača unutar ćelija biljne sirovine i uvećanje zapremine ćelija sirovine. Brzina kretanja rastvarača unutar biljne sirovine raste sa povećanjem temperature. Osim temperature, na brzinu prodiranja rastvarača može uticati i pritisak. Brzina prodiranja rastvarača u biljnu sirovinu je ograničena prisustvom vazduha u kapilarama i ćelijama biljnog tkiva. Analogna pojava opaža se pri vakumiranju biljne sirovine. Brzina kretanja rastvarača kroz sirovinu raste ako se vazduh zameni lako rastvornim gasom (ugljenik(IV)-oksid ili amonijak). Na apsorpcionu sposobnost sirovine utiče i stepen usitnjenosti biljne sirovine (Ponomarev, 1976).

3.2.1.5. Relativna gustina, zapreminska i nasipna masa biljne sirovine

Relativna gustina biljne sirovine predstavlja odnos gustine biljne sirovine i gustine vode, dok je zapreminska masa odnos mase prosušene biljne sirovine i njene zapremine. Zapreminska masa se određuje potapanjem izmerene biljne sirovine u tečnost, a nasipna masa merenjem zapremine izmerene porcije biljne sirovine (Ponomarev, 1976).

3.2.1.6. Mehaničke osobine biljne sirovine

U mehaničke osobine biljne sirovine spadaju: unutrašnje i spoljašnje trenje, elastičnost, početni otpor rezanju ili drugim vidovima usitnjavanja (Ponomarev, 1976). Unutrašnje trenje se javlja između čestica biljne sirovine i karakteriše njihovu sposobnost premeštanja. Veličina unutrašnjeg trenja se izražava kroz veličinu ugla prirodnog nagiba, koji određuju geometrijski parametri konusa, a koji se obrazuje pri slobodnom nasipanju čestica na ravnu površinu. Ugao, pri kojem telo ostaje nepokretno na površini, naziva se ugao trenja. Veličina ugla prirodnog nagiba za jednu biljnu sirovinu menja se u zavisnosti od stepena vlaženja. Pri kretanju biljne sirovine unutar ekstrakcionih aparata značajno je ne samo unutrašnje nego i spoljašnje trenje, tj. sposobnost biljne sirovine da klizi po površini aparata. Spoljašnje trenje se izražava uglom nagiba površine pri kojem se biljna sirovina još uvek zadržava na njoj. Veličina ugla zavisi, kako od disperznosti i vlažnosti biljne sirovine, tako i od svojstava površine, na koju naleže sirovina. Veličina ugla se menja u zavisnosti od materijala i vlažnosti površine (Ponomarev, 1976).

3.2.2. Hidrodinamički i fizički uslovi

3.2.2.1. Hidrodinamički uslovi

Hidrodinamički uslovi imaju uticaj na prenos mase kroz difuzioni granični sloj i u masi rastvora. Sa povećanjem brzine strujanja rastvora oko čestice biljne sirovine, debljina difuzionog graničnog sloja se smanjuje, a molekulski mehanizam prenosa u rastvoru zamenjuje bržim, konvektivnim. Povoljniji hidrodinamički uslovi postižu se mešanjem, vibracijom, cirkulacijom itd. Hidrodinamički uslovi ekstrakcije mogu se promeniti dejstvom ultrazvuka, elektrohidrauličkim udarima i visokim naponom (Ponomarev, 1976).

3.2.2.2. Uloga rastvarača

Izbor rastvarača od presudnog je uticaja na stepen i prinos ekstrakcije, ali i na ekonomičnost procesa. Najčešće korišćeni rastvarači su: etanol, glicerol, etilacetat, propilenglikol i petrol etar, dok se drugi organski rastvarači ređe koriste zbog svoje toksičnosti (Vinatoru et al., 1999). Pri izboru rastvarača treba posebno obratiti pažnju na hidrofilnost, dielektričnu konstantu, viskoznost i površinski napon rastvarača (Milenović, 2002). Izbor rastvarača za ekstrakciju zavisi od stepena hidrofilnosti ekstraktivnih materija, prema čemu se supstance koje se ekstrahuju iz biljne sirovine mogu podeliti na rastvorne u polarnim (hidrofilne supstance), slabo polarnim i u nepolarnim (hidrofobne supstance) rastvaračima. Polarne supstance sa visokim vrednostima dielektrične konstante, dobro se rastvaraju u polarnim rastvaračima i obratno (Ponomarev, 1976).

Veliki uticaj na rastvorljivost i brzinu difuzije ekstraktivnih materija imaju viskoznost i površinski napon. Povećanje viskoznosti proporcionalno smanjuje koeficijent difuzije, dok se smanjenje površinskog napona povoljno odražava na brzinu ekstrakcije. Radi smanjenja površinskog napona obično se dodaju različite površinski aktivne supstance.

3.2.2.3. Uticaj temperature

Sa povećanjem temperature smanjuje se viskoznost rastvarača, povećava koeficijent difuzije bioaktivnih materija kroz rastvarač, skraćuje vreme bubrenja i prodiranja rastvarača u ćelije biljnog materijala, dok se pri temperaturi ključanja rastvarača značajno poboljšavaju hidrodinamički uslovi, što sve pozitivno utiče na proces ekstrakcije (Huie, 2002; Ponomarev, 1976). Ekstrakcija se ubrzava prethodnim zamrzavanjem biljne sirovine što dovodi do razaranja strukture ćelija (Ponomarev, 1976).

3.2.2.4. Uticaj električnog, elektromagnetnog i magnetnog polja

U električnom polju povećava se koeficijent prenosa mase nekoliko puta, dok se koeficijent prenosa toplote povećava u pojedinim slučajevima i do deset puta, generiše se mikrocirkulacija u električnom polju, što sve utiče na povećanje prinosa i dovodi do skraćivanja vremena ekstrakcije (Belaya et al., 2006; Stankiewicz, 2006). Dodatna optimizacija elektroekstrakcije postiže se odabirom rastvarača veće električne provodljivosti, što pozitivno utiče i na kvašenje i bubrenje biljnog materijala (Gribova et al., 2008).

Kada se izlože dejstvu kombinacije električnog i magnetnog polja (mikrotalasima), dipolarni molekuli rotiraju velikom brzinom, a kao rezultat trenja koje nastaje generiše se toplota. Ovaj efekat zavisi od dielektričnih osobina materije, odnosno sposobnosti materijala da apsorbuje mikrotalase i prevodi ih u toplotu (Stankiewicz, 2006).

3.3. Mehanizam i kinetika ekstrakcije čvrsto-tečno

Pri ekstrakciji čvrsto-tečno rastvarač natapa biljni materijal kroz kapilare i međućelijski prostor dolazeći u kontakt sa površinom ćelijskih zidova biljnog materijala (Meireles, 2008). Prenos ekstraktivnih materija vrši se difuzijom kroz ćelijski rastvor i ćelijski zid, a brzina prenosa mase zavisi od broja i veličine pora u ćelijskom omotaču i debljine ćelijskog omotača koja zavisi od biljne vrste i organa. Materijal ćelijskih zidova odlikuje se uglavnom hidrofilnim osobinama (Ponomarev, 1976). Usitnjavanje biljnog materijala povećava kontaktnu površinu između rastvarača i biljnog materijala i skraćuje put ekstraktivnih materija kroz čestice do granice faza, dok povišena temperatura povećava rastvorljivost supstanci, što sve pozitivno utiče na brzinu difuzije i proces ekstrakcije (Meireles, 2008; Ponomarev, 1976). Zbog vazduha koji se nalazi u kapilarama i ćelijama biljnog materijala, vreme prodiranja rastvarača može biti veoma veliko. Istovremeno sa prodiranjem rastvarača u biljnu sirovinu, odigrava se i proces kvašenja koji zavisi od hemijske sličnosti ekstraktivnih materija i rastvarača. Površinski aktivne supstance poboljšavaju proces kvašenja i prodiranja rastvarača u biljnu sirovinu (Ponomarev, 1976).

Pojednostavljeno, mehanizam procesa ekstrakcije ekstraktivnih materija iz biljne sirovine može se opisati kroz dve faze (Ponomarev, 1976; Stanković et al., 1994):

- ispiranje (brza ekstrakcija) - neposredno po potapanju biljnog materijala u rastvarač dolazi do brzog ispiranja i rastvaranja ekstraktivnih materija koje se nalaze na površini biljnog materijala. Brzina ove faze zavisi od rastvorljivosti ekstraktivnih materija u rastvaraču i hidrodinamičkih uslova u suspenziji, i
- unutrašnja difuzija (spora ekstrakcija) – rastvaranje ekstraktivnih materija i njihova difuzija iz unutrašnjosti nerazorenih ćelija biljnog materijala prema spoljašnjoj površini, kroz ćelijsku membranu, a od spoljašnje površine čestica kroz granični sloj u masu rastvora.

Difuzija ekstraktivnih materija kroz unutrašnjost čestica biljne sirovine je, po pravilu, najsporija faza, dok je rastvaranje ekstraktivnih materija relativno brz proces i on uglavnom ne utiče na brzinu čitavog procesa (Ponomarev, 1976). Veličina čestica biljnog materijala jedan je od faktora čijim se variranjem bitno i lako utiče na koeficijent difuzije u slučajevima kada je difuzija rastvorka kroz unutrašnjost čestica veoma spora (Murav'ev et al., 1973; Ponomarev, 1976), dok se u slučajevima kada je difuzija ekstraktivnih materija sa površine čestica prema rastvoru limitirajući faktor potrebno obezbediti intenzivnije mešanje suspenzije (Ponomarev, 1976).

Ovakav mehanizam je potvrđen u slučaju klasične ekstrakcije rezinoida kokotca (*Melilotus officinalis* L.) (Stanković et al., 1994) i kantariona (*Hypericum perforatum* L.) (Milenović et al., 2002), kao i u slučaju klasične i ultrazvučne ekstrakcije ekstraktivnih materija iz listova bokvice (*Plantago major* L.) (Stanisavljević et al., 2008), nadzemnih delova ehinacee (*Echinacea purpurea*) (Stanisavljević et al., 2009a), divljeg (*Artemisia vulgaris* L.) i poljskog (*Artemisia campestris* L.) pelina (Stanisavljević et al., 2011), obične (*Salvia officinalis* L.) i lepljive (*Salvia glutinosa* L.) žalfije (Veličković et al., 2006), listova čuvarkuće (*Sempervivum marmoreum*) (Stojičević et al., 2008) i ulja iz semena duvana (Stanisavljević et al., 2007).

Matematički opis ekstrakcije čvrsto-tečno veoma je složen zbog složenosti samog procesa prenosa mase ekstraktivnih materija iz unutrašnjosti čestica biljnog materijala u masu rastvora, ali se znatno pojednostavljuje primenom uprošćenih fizičkih modela, od kojih se najčešće koriste model zasnovan na nestacionarnoj difuziji u biljnom materijalu i model zasnovan na teoriji filma (Ponomarev, 1976). Ovi modeli su bazirani na uprošćenim opisima difuzije ekstraktivnih materija iz biljnog materijala u rastvor, s tim što prvi uzima u obzir i ispiranje ekstraktivnih materija sa površine čestica biljne sirovine. Zbog fizičke zasnovanosti, relativne jednostavnosti i dobrog slaganja sa eksperimentalnim podacima modeli zasnovani na teoriji filma i nestacionarne difuzije kroz čvrst materijal već su uspešno korišćeni ne samo za opisivanje procesa klasične (Kitanović et al., 2008; Veljković i Milenović, 2002) nego i ultrazvučne (Kitanović et al., 2008; Stanisavljević et al., 2007; Stanisavljević et al., 2008; Stanisavljević et al., 2009a; Stanisavljević et al., 2011; Stojičević et al., 2008; Veličković et al., 2006) ekstrakcije više različitih biljnih materijala.

Empirijske jednačine se takođe primenjuju za modelovanje procesa u inženjerskoj praksi iako nemaju fizičku osnovu i predstavljaju samo matematički opis promene količine ekstraktivnih materija u biljnoj sirovini ili tečnom ekstraktu tokom ekstrakcije (Kitanović et al., 2008; Veljković i Milenović, 2002). Do sada su empirijski modeli, kao što su: ortogonalna polinomna jednačina, hiperbolna jednačina, Freundlich-ova jednačina, Weibull-ova jednačina i modifikovana Elovich-ova jednačina, uspešno korišćeni za modelovanje luženja različitih supstanci iz čvrstih materijala (Bucić-Kojić et al., 2007; Kim et al., 2002; Paterson et al., 1999; Plećaš, 2003; Seidel i Zimmels, 1998; Sinclair i Peppas, 1984) i za modelovanje kinetike klasične i ultrazvučne ekstrakcije ekstraktivnih supstanci različitih biljnih materijala, pri čemu su najmanje srednje vrednosti relativnog standardnog odstupanja zabeležene kod Weibull-ove i modifikovane Elovich-ove jednačine (Kitanović et al., 2008).

3.3.1. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji u biljnoj sirovini

Prenos mase kroz biljni materijal pri ekstrakciji čvrsto-tečno odigrava se mehanizmom difuzije, gde se brzina prenosa mase ekstraktivnih materija može opisati Fikovim zakonima. Uslovi difuzije pri ekstrakciji čvrsto-tečno su, po pravilu, nestacionarni pa se promene koncentracije rastvora u uslovima kada ne dolazi do hemijske reakcije opisuju jednačinom II Fikovog zakona čiji diferencijalni oblik, kada se prenos mase odigrava u jednom pravcu, ima sledeći oblik (Treybal, 1985):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (3.5)$$

Jednačinu (3.5) je moguće analitički rešiti u slučaju prostijih geometrijskih oblika čvrstih čestica (ravna ploča, cilindar i sfera) integrisanjem uz primenu odgovarajućih početnih i graničnih uslova (Veljković i Milenović, 2002). Kao rezultat se dobija zavisnost relativne promene sadržaja ekstraktivnih supstanci u biljnoj sirovini na početku q_0 , i posle nekog određenog vremena ekstrakcije, q od vremena:

$$\frac{q}{q_0} = (1 - b') \cdot e^{-k' \cdot t} \quad (3.6)$$

Za jednostavnije izračunavanje parametara jednačine (3.6) koristi se njen linearizovani oblik:

$$\ln \frac{q}{q_0} = \ln(1 - b') - k' \cdot t \quad (3.7)$$

gde je b' - koeficijent ispiranja, a k' - koeficijent spore ekstrakcije (Veljković i Milenović, 2002).

Parametri jednačine (3.7) mogu se izračunati analitički, pri čemu se odsečak i nagib pravolinijske zavisnosti izračunavaju metodom najmanjeg kvadrata. Ovaj pristup korišćen je za određivanje koeficijenta ispiranja i koeficijenta spore ekstrakcije (Ponomarev, 1976; Stanisavljević et al., 2007; Stanisavljević et al., 2009a; Stanković et al., 1994; Stojičević et al., 2008; Veljković i Milenović, 2002).

3.3.2. Model zasnovan na teoriji filma

Definisanje brzine prenosa mase ekstraktivnih materija iz biljnog materijala u rastvor, prema modelu koji se zasniva na teoriji filma, predviđa da se oko čestica obrazuje tanak difuzioni sloj. Bilans mase ekstraktivnih materija u tečnoj fazi, uz uvođenje određenih pretpostavki vodi sledećoj diferencijalnoj jednačini (Veljković i Milenović, 2002):

$$V \frac{dc}{dt} = \frac{D_{ef}}{\delta} \cdot (c_s - c)A \quad (3.8)$$

gde je c – aktuelna koncentracija rastvora, c_s – koncentracija zasićenog rastvora, A – spoljašnja površina čestice, V – zapremina čestice, δ – debljina tečnog difuzionog filma, D_{ef} – efektivni koeficijent difuzije i t – vreme.

Na početku, u skladu sa pretpostavkom da se ispiranje rastvorka iz razorenih biljnih ćelija na spoljašnjoj površini čestice odvija trenutno, koncentracija rastvora je c_w i ako se uvedu smene: $b = \frac{c_w}{c_s}$ i $k = \frac{D_{ef} A}{\delta V}$, gde je b – koeficijent ispiranja, a k – koeficijent spore ekstrakcije, onda je:

$$\left(1 - \frac{c}{c_s}\right) = (1 - b) \cdot e^{-k \cdot t} \quad (3.9)$$

Vrednosti koeficijenta ispiranja i koeficijenta spore ekstrakcije mogu se izračunati iz odsečka i koeficijenta pravca linearizovanog oblika jednačine (3.9):

$$\ln\left(1 - \frac{c}{c_s}\right) = \ln(1 - b) - k \cdot t \quad (3.10)$$

Ovaj pristup je primenjen za izračunavanje kinetičkih parametara procesa ekstrakcije rezinoida iz kokotca (Stanković et al., 1994) i kantariona (Veljković i Milenović, 2002) tehnikom maceracije, kao i ultrazvučne ekstrakcije ekstraktivnih materija iz obične i lepljive žalfije (Veličković et al., 2006).

3.3.3. Empirijski model – Hiperbolna jednačina

Ovaj model se zasniva na hiperbolnoj funkciji:

$$c = c_{\max} \frac{t}{K_s + t} \quad (3.11)$$

gde je c – koncentracija ekstraktivnih materija u trenutku t , $c_{\max}$ – maksimalna koncentracija ekstraktivnih materija koja se može postići pod datim uslovima ekstrakcije, K_s – vreme posle kojeg koncentracija ekstrakta dostiže vrednost $c_{\max}/2$ (Milenović, 2002).

Hiperbolna jednačina je kao dvoparametarski, neeksponencijalni model, pod imenom Peleg-ova jednačina, korišćena za modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih polifenola iz semenki grožđa (Bucić-Kojić et al., 2007), ukupnih rastvornih materija i polifenola iz usitnjenog mesnatog dela grožđa (Boussetta et al., 2009) kao i za modelovanje kinetike ekstrakcije rezinoida kantariona (Kitanović et al., 2008; Milenović, 2002). Ova jednačina više puta je uspešno korišćena kod modelovanja kinetike hidratacije i rehidratacije različitih biljnih materijala (Goula i Adamopoulos, 2009; Marques et al., 2009; Sopade i Kaimur, 1999; Vega-Gálvez et al., 2009)

Linearizovani oblik jednačine (3.11) ima oblik:

$$\frac{1}{c} = \frac{K_s}{c_{\max}} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{c_{\max}} \quad (3.12)$$

3.4. Dobijanje etarskih ulja

Etarska ulja dobijaju se korišćenjem klasičnih metoda, kao što su: hidrodestilacija, hladno presovanje i ekstrakcija rastvaračem (Bousbia et al., 2009; Skala et al., 1999; Sovilj i Spasojević, 2001).

Hidrodestilacija je opšti pojam postupka za dobijanje etarskih ulja iz biljnog materijala koja se može izvesti na tri različita načina: destilacija vodom, destilacija vodom i vodenom parom i destilacija vodenom parom (Smith et al., 2005; Sovilj i Spasojević, 2001).

Kod destilacije vodom biljni materijal je sve vreme u direktnom kontaktu sa ključalom vodom, pri čemu formirana vodena para odnosi aromatične komponente iz materijala. Pored relativno niskog stepena iskorišćenja, nedostaci ovog postupka su degradacija estara iz biljnog materijala, što vodi dobijanju etarskih ulja lošijeg kvaliteta i gubitak velike količine vode putem isparavanja. S druge strane, nastala vodena para često je pregrejana, što otežava kondenzaciju i razdvajanje etarskog ulja i vode. Ovakav vid hidrodestilacije se danas retko koristi, a biljne vrste koje se podvrgavaju ovakvom tretmanu su: lavanda, timijan i ruža (Sovilj i Spasojević, 2001).

Pri destilaciji vodom i vodenom parom kontakt biljnog materijala i vode, kao i vreme destilacije za jednu šaržu znatno je kraće nego u slučaju destilacije vodom, dok je potrošnja energije za izdvajanje etarskih ulja najmanja u poređenju sa ostalim postupcima. Pored osnovnog suda u kome se biljni materijal dovodi u kontakt sa vodenom parom i vodom, neophodno je obezbediti separator, gde se, nakon kondenzacije pare iz procesa, razdvajaju organska (ulje) i vodena faza, kao i parogeneratore u slučaju sudova većih kapaciteta. Pored visokog stepena iskorišćenja u ovom postupku prednost je i dobijanje ulja u čistijem obliku. Nedostatak destilacije sa vodom i vodenom parom je ograničen kapacitet uređaja, što se može kompenzovati korišćenjem više tipskih uređaja povezanih u vidu baterije čime se može postići kapacitet i do 1000 dm³ (Sovilj i Spasojević, 2001).

Destilacija vodenom parom je jedan od najčešće korišćenih postupaka za dobijanje etarskih ulja iz biljnog materijala. Preporučuje se u slučajevima kada polazna sirovina sadrži relativno visok procenat etarskog ulja, kada su komponente ulja nerastvorne u vodi i stabilne na povišenim temperaturama. Pri destilaciji vodenom parom, zasićena ili pregrejana vodena para provodi se kroz sloj biljnog materijala, nakon čega se mešavina para (voda i etarsko ulje) kondenzuje i vrši separacija ulja od vode u posebnom uređaju. Osim zagrevanja vodenom parom, ceo sistem se još može dodatno zagrevati preko duplikatora osnovnog suda. Vreme trajanja destilacije sa vodenom parom je najkraće od svih poznatih postupaka, a prinos etarskih ulja visok. Destilacija vodenom parom se može voditi i sa manjom snagom u dužem vremenskom periodu (Sovilj i Spasojević, 2001). U pojedinim slučajevima pre podvrgavanja parnoj destilaciji neophodan je enzimski predtretman biljnog materijala (Smith, 2005).

Ekstrakcija etarskih ulja organskim rastvaračima (petrol etar, benzen, aceton, alkohol i dr.) se primenjuje kada biljni materijal sadrži termolabilna jedinjenja. Obično se odvija u kolonskim uređajima. Biljni materijal se nalazi na perforiranoj pregradi i višestruko se ispira

organskim rastvaračem (Skala et al., 1999; Sovilj i Spasojević, 2001). U rastvaraču se rastvaraju ekstraktivne materije iz biljnog materijala, kao što su: nearomatični voskovi, pigmenti i lako isparljive aromatične komponente. Dobijeni rastvor, koji sadrži rastvarač i rastvorene komponente, se nakon ekstrakcije filtrira. Rastvarač se iz filtrata uklanja destilacijom pri sniženom pritisku i temperaturi, čime se dobija mirisna masa kao željeni proizvod. Mirisna masa sadrži najčešće oko 55 % isparljivih ulja. Ona se dalje tretira etanolom da bi se etarsko ulje odvojilo od masnih ulja i drugih nepoželjnih materija. Na ovaj način se dobijaju fina etarska ulja koja se najčešće koriste u industriji parfema i kozmetičkoj industriji. Voskovi, preostali nakon ekstrakcije etanolom, koriste se za proizvodnju sveća, kozmetičkih krema i losiona. Prednost ovakvog postupka dobijanja etarskih ulja je u tome što ulja zadržavaju prirodan miris na biljku od koje se dobijaju (Sovilj i Spasojević, 2001). Prisustvo zaostalih organskih rastvarača može biti problem za dobijanje ekstrakata koji se mogu koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Skala et al., 1999).

Etarska ulja mogu se dobiti hladnim presovanjem, odnosno mehaničkim putem, ukoliko su ona smeštena u perifernim rezervoarima biljke (perikarp agruma). Na ovaj način dobija se emulzija etarskog ulja i soka biljne sirovine, iz koje se etarsko ulje izdvaja centrifugiranjem, filtriranjem, primenom enzima ili naknadnom destilacijom. Dobijeno etarsko ulje je boljeg kvaliteta od ulja dobijenog destilacijom vodenom parom (Skala et al., 1999).

U novije vreme, razvijene su tehnike za dobijanje etarskih ulja iz biljnih materijala, a sve u cilju skraćivanja vremena trajanja procesa, smanjenja količine neophodnog rastvarača, povećanja prinosa i poboljšanja kvaliteta etarskih ulja. Destilacija pod dejstvom mikrotalasa, u prisustvu ili bez prisustva rastvarača ("solvent-free") su neke od novijih tehnika koje predstavljaju dobru alternativu postojećim (Bendahou et al., 2008; Flamini et al., 2007, Lucchesi et al., 2004a, b; Presti et al., 2005; Stashenko et al., 2004b; Tigrine et al., 2006).

Natkritična ekstrakcija je postupak ekstrakcije fluidom koji se nalazi na temperaturi i pritisku iznad svojih kritičnih vrednosti, odnosno u natkritičnom stanju. Ovaj način ekstrakcije se pokazao kao efikasan za izolaciju supstanci srednjih molekulskih masa i relativno male polarnosti, a dobijeni proizvodi su visokog kvaliteta, oslobođeni zaostalog rastvarača i degradacionih produkata. Najčešće korišćen rastvarač u procesima natkritične ekstrakcije je ugušćeni ugljen-dioksid, zbog toga što je hemijski čist, nereaktivan, netoksičan, nekorozivan, nezapaljiv i neeksplozivan, bez ukusa i mirisa, ekonomičan i lako dostupan, ne predstavlja zagađenje za okolinu, a vrednosti kritičnih parametara (temperatura 304 K i pritisak 7,38 MPa) su takve da omogućuju ekstrakciju na niskim temperaturama i njegovo lako odvajanje od ekstraktivnih materija (Glišić et al., 2006; Skala et al., 2002). Rastvorljivost polarnijih supstanci u natkritičnom ugljen-dioksidu može se poboljšati dodatkom malih količina drugih polarnih supstanci (kosolvenata). Osnovna prednost natkritične ekstrakcije u odnosu na druge vidove separacija je što se ona izvodi na umerenim temperaturama, te se može primeniti na separaciju slabo isparljivih i termički degradabilnih jedinjenja. Stoga je ovaj način ekstrakcije od posebnog interesa za prehrambenu, farmaceutsku industriju i biotehnologiju (Skala et al., 2002).

3.4.1. Mikrotalasna ekstrakcija etarskih ulja

Mikrotalasi se uspešno mogu primeniti u izolaciji etarskih ulja sa i bez prisustva rastvarača pri atmosferskom pritisku, pri čemu se drastično skraćuje vreme trajanja procesa, štedi energija (Bendahou et al., 2008; Bousbia et al., 2009; Flamini et al., 2007; Lucchesi et al., 2004a; Lucchesi et al., 2004b), dobija manje otpadnih materija, povećava antimikrobna i antioksidativna aktivnost ulja i dobija kvalitetnije ulje sa većim sadržajem oksidovanih komponenti (Bousbia et al., 2009). Primenom mikrotalasa u okviru predtretmana biljnog materijala postiže se isti prinos za znatno kraće vreme, što je pokazano u slučaju dobijanja etarskog ulja iz drvnog zelenila četinara (jela, smrča, bor, kleka i duglazija) (Balaban-Marjanović i Miletić, 2005). Poređenjem različitih tehnika ekstrakcije (tročasovna destilacija vodenom parom, osmominutna mikrotalasna i tridesetominutna super-kritična ekstrakcija) etarskog ulja iz svežih delova tri različite vrste bosiljka najbolji prinos dobijen je parnom destilacijom, dok ulja dobijena mikrotalasnom ekstrakcijom imaju najmanji sadržaj eugenola, a najveći sadržaj 1,8-cineola i seskviterpena (De Vasconcelos Silva et al., 2004). Parnom destilacijom etarskog ulja lavande u trajanju od 90 minuta dobija se ulje istog sastava i kvaliteta kao ulje dobijeno destilacijom pod dejstvom mikrotalasa u trajanju od 10 minuta (Chemat et al., 2006). Povećanjem efektivne snage mikrotalasa povećava se prinos etarskog ulja i brzina destilacije u slučaju ekstrakcije osušenih listova lovora (Günes i Alma, 2008), čubure, vreska (Rezvanpanah et al., 2008) i ruzmarina, ali prevelika snaga mikrotalasa može dovesti do gubitaka isparljivih komponenti etarskih ulja (Bousbia et al., 2009).

Dejstvu mikrotalasa sistem može biti podvrgnut u specijalnim ekstraktorima (Chemat et al., 2006; Iriti et al., 2006) ili u modifikovanim mikrotalasnim pećnicama namenjenim domaćinstvu (tabela 3.3).

Novi koncept u izolaciji etarskih ulja je kombinacija mikrotalasa sa suvom destilacijom, „solvent free“ mikrotalasna destilacija. Za izdvajanje prvih kapi ulja u slučaju bosiljka (*Ocimum basilicum* L.), kudrave nane (*Mentha crispa* L.) timijana (*Thymus vulgaris* L.), indijskog kima (*Cuminum cyminum*) i japanskog anisa (*Illicium anisatum*) (Lucchesi et al., 2004a; Lucchesi et al., 2004b) potrebno je samo nekoliko minuta. Drastično skraćanje vremena trajanja destilacije zapaženo je i u slučaju osušenih listova origana (*Origanum glandulosum* Desf.), uz duplo veći udeo aktivne komponente u ulju, timola (Bendahou et al., 2008).

Tabela 3.3 Pregled primene mikrotalasne pećnice u destilaciji etarskih ulja

Materijal za ekstrakciju	Vreme, snaga mikrotalasa, tehnika destilacije, odnos materijala za ekstrakciju i rastvarača	Napomena	Literatura
Sveži listovi origana (<i>Origanum vulgare</i> L.)	Mikrotalasna destilacija bez prisustva rastvarača. Četiri nivoa snage mikrotalasa: 100 % (622 W), 80 % (498 W), 60 % (373 W) i 40 % (249 W). Ekstrakcija je trajala do prestanka izdvajanja ulja.	Sa porastom snage mikrotalasa povećava se prinos. Veći prinos pri svim nivoima snage u poređenju sa hidrodestilacijom.	Bayramoglu et al., 2008
Osušeni listovi lovora (<i>Laurus nobilis</i> L.)	Mikrotalasna destilacija bez prisustva rastvarača. Dva nivoa snage mikrotalasa 622 i 249 W. 150 g osušenih listova potopljeno je na 1 h u 700 ml vode, nakon čega je višak vode odliven.	Vreme trajanja procesa bilo je 195, 130 i 85 minuta za hidrodestilaciju, mikrotalasnu destilaciju bez prisustva rastvaračana na 249 W i 622 W, respektivno. Sva ulja imala su iste vrednosti indeksa refrakcije i specifične gustine.	Bayramoglu et al., 2009
Sušeni listovi origana (<i>Origanum glandulosum</i>)	20 minuta pri snazi od 850 W. 25 g suvog biljnog materijala potapa se u 60 ml vode, nakon 60 minuta voda se ocedi a nakvašeni biljni material podvrgava ekstrakciji.	Veći prinos ulja za kraće vreme. Veći prinos aktivne komponente (timol). Veća antibakterijska i antifugalna aktivnost ulja dobijenog pod dejstvom mikrotalasa.	Bendahou et al., 2008
Sveži nadzemni delovi timijana (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	60 minuta pri snazi od 990 W. Hidrodestilacija. 60 g biljnog materijala i 1200 ml dejonizovane vode.	Za duplo kraće vreme veći prinos uz tri puta manji sadržaj olova u ulju dobijenom pod dejstvom mikrotalasa.	Golmakani i Rezaei, 2008

Osušeni listovi lovara (<i>Laurus nobilis</i> L.)	20 minuta, tri nivoa snage mikrotalasa (300, 600 i 900 W), 50 g biljnog materijala i 100 ml vode. Hidrodestilacija (3 h), 50 g biljnog materijala i 300 ml vode.	Prinos nakon 20 minuta manji u poređenju sa hidrodestilacijom. Povećanjem snage mikrotalasa povećava se prinos etarskog ulja. Veći sadržaj monoterpena u ulju dobijenom pod dejstvom mikrotalasa.	Günes i Alma, 2008
Sveži listovi cimeta (<i>Cinnamomum iners</i>)	200 g boiljnog materijala, 30 minuta (800 W). Hidrodesilacija (700 g biljnog materijala, 5 h). Clevenger-tip aparata.	Veći prinos za kraće vreme. Dobijena ulja razlikuju se po sastavu, ali pokazuju istu antioksidativnu aktivnost.	Phutdhawong et al., 2007
Osušeni listovi vreska (<i>Satureia hortensis</i>) i vreska (<i>Satureja montana</i>)	Tri nivoa snage mikrotalasa: 220, 440 i 660 W. Hidrodestilacija je trajala do prestanka izdvajanja ulja. Clevenger-tip aparata. Solvimodul 1:20 g/ml,	Povećanjem snage mikrotalasa ubrzava se proces destilacije, a najveći prinos dobija se pri najvećoj snazi.	Rezvanpanah et al., 2008
Osušeni plodovi <i>Xylopija aromatica</i> L.	100 g biljnog materijala i 2 l vode, 30 minuta pri maksimalnoj snazi (800 W). Hidrodestilacija, 2 h, 500 g biljnog materijala i 4 l vode. Destilacija pod dejstvom mikrotalasa bez prisustva rastvarača. Natkritična ekstrakcija ulja.	Dobijena ulja sličnog su sastava i kvaliteta sem ulja dobijenog pod dejstvom mikrotalasa bez prisustva rastvarača, ujedno ovaj postupak najkraće traje, čak četiri puta kraće od trajanja hidrodestilacije.	Stashenko et al., 2004a
Sveži listovi lantane (<i>Lippia alba</i> Mill.)	30 minuta pri maksimalnoj snazi (800 W). Hidrodestilacija. 100 g biljnog	Sastav ulja dobijen mikrotalasnom i klasičnom hidrodestilacijom je sličan, ali se isti prinos	Stashenko et al., 2004b

	materijala i 1000 ml vode.	dobija za četiri puta kraće vreme.	
Kim (<i>Cuminum cyminum</i> L.) i kineski bodljikavi jasen (<i>Zanthoxylum bungeanum</i> Maxim.)	30 minuta pri snazi od 85 W (100 °C) uz mešanje. Hidrodestilacija. 50 g biljnog materijala i 300 ml dejonizovane vode. Destilacija bez prisustva rastvarača 100 g biljnog materijala sa dodatkom 20 g dobro apsorbjućeg mikrotalasnog medijuma (CIP).	Uz mikrotalase proces se duplo skraćuje. Dodatak dobro apsorbjućeg mikrotalasnog medijuma umesto vode, dodatno skraćuje proces u poređenju sa mikrotalasnom destilacijom bez prisustva rastvarača.	Wang et al., 2006

4. Analiza bioaktivnih komponenti biljnih proizvoda

Proučavanje prirodnih proizvoda predstavlja multidisciplinarnu nauku u čijem fokusu je kvalitativna i kvantitativna analiza biljnih proizvoda, mehanizmi delovanja, interakcije sa makromolekulima i potencijalna toksičnost, kao i tehnike izolovanja i stabilnosti bioaktivnih jedinjenja. Ova proučavanja važan su deo strategije vezane za očuvanje biodiverziteta, otkrivanje novih lekova i poboljšanje kvaliteta života siromašnih seoskih zajednica (Alviano i Alviano, 2009). Potraga za novim, farmakološki aktivnim, agensima dobijenih iz prirodnih izvora kao što su biljni ekstrakti dovela je do otkrića mnogih klinički korisnih lekova koji igraju važnu ulogu u lečenju ljudskih bolesti. Lekovi prirodnog porekla su podeljeni na: prave prirodne proizvode, proizvode izvedene semisintetski iz prirodnih proizvoda i sintetske proizvode na bazi modela prirodnih proizvoda. Oko 60 % antiinfektivnih i antikancerogenih agenasa, koja su komercijalno dostupna ili su u kasnim fazama kliničkih ispitivanja, prirodnog su porekla (Shu, 1998). Međutim, procenjeno je da je samo 5-15 % od oko 250000 vrsta viših biljaka detaljno ispitano do sada (Cragg et al., 1997).

Bioaktivne komponente biljnog materijala se mogu kvalitativno i kvantitativno određivati primenom različitih tehnika, od kojih se najčešće koriste spektroskopske (ultraljubičasta, infracrvena, nuklearna magnetna rezonanca), hromatografske (GC, TLC, HPLC) i razne standardne instrumentalne metode (polarimetrija, refraktometrija i mnoge druge) (Stalikas, 2007).

4.1. Spektroskopske metode

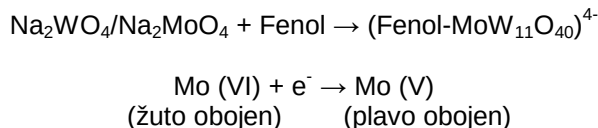
Za rutinsko određivanje bioaktivnih komponenti i antioksidativne aktivnosti koriste se brojne spektroskopske metode koje se baziraju na različitim principima.

4.1.1. Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija

Ultraljubičasta i vidljiva (UV VIS) spektroskopija zasnivaju se na osobini molekula da apsorbuju elektromagnetno zračenje ultraljubičastog (100-380 nm) i vidljivog (380-800 nm) dela spektra. VIS spektrofotometrija koristi se pretežno za ispitivanje neorganskih supstanci, dok je primena UV spektrofotometrije mahom skoncentrisna na ispitivanje organskih jedinjenja (Mišović i Ast, 1987). Postoji veliki broj laboratorijski prihvaćenih i rutinskih metoda za dokazivanje prisustva i procenu sadržaja bioaktivnih jedinjenja u biljnim proizvodima.

Folin–Denis-ova metoda jedna je od prvih metoda za brzo određivanje ukupnih fenola u biljnim materijalima, a zasniva se na redukciji Folin–Denis reagensa u baznoj sredini do plavo obojenog kompleksa (Stalikas, 2007). Jedna od najčešće korišćenih metoda za određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja je originalna metoda po Folin-Ciocalteu (Prior et al.,

2005) ili njena modifikovana forma (Singelton i Rossi, 1965), koja se zasniva na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon, redukujući Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol-MoW₁₁O₄₀)⁴⁻ (Apak et al., 2007; Mišan, 2009):



Ovom metodom dobijaju se uglavnom vrednosti za ukupan saržaj fenolnih jedinjenja, koje mogu biti veće za 4,5 do 24 % od vrednosti dobijenih HPLC analizom istih uzoraka (Tsao i Yang, 2003). Prisustvo proteina ili komponenti koji se ponašaju kao redukujući agensi (aromatični amini, sumpor dioksid, askorbinska kiselina, Cu(I), Fe(II)) (Magalhaes et al., 2008; Stalikas, 2007) u uzorcima može dovesti do razlika u rezultatima u poređenju sa vrednostima koje daje HPLC analiza (Escarpa i Gonzalez, 2001; Tsao i Yang, 2003). Metoda po Folin-Ciocalteu koristi se za određivanje ukupnih fenola prirodnih proizvoda, ali se zasniva na oksido-redukcionoj reakciji, te se smatra i metodom za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti (Prior et al., 2005).

Vanilinski test specifičan je za određivanje flavan-3-ola, dihidročalkona i proantocijanidina koji imaju jednostruku vezu na 2,3-poziciji i slobodnu metoksi grupu na B prstenu, koristeći katehin kao standard (Stalikas, 2007). Reakcija 3-hidroksi i 4-keto grupe flavonoidnih jedinjenja sa aluminijumovim (Al³⁺) jonima, temelj je spektroskopske metode određivanja ukupnog sadržaja flavonoida u ekstraktima u prisustvu drugih fenolnih jedinjenja (Petry et al., 2001). Modifikacijom ove metode i korišćenjem sposobnosti fenolnih jedinjenja da grade komplekse sa aluminijumovim (Al³⁺) jonima nastale su metode za određivanje kafeine kiseline i ukupnih tanina (Stalikas, 2007). Razvijene su direktne spektrofotometrijske metode za određivanje grupa fenolnih jedinjenja, kao što su fenolne kiseline i tanini ili specifičnih fenolnih komponenti kao što su sinapin i sinapinska kiselina (Shahidi i Naczk, 1995). Dihidroflavonoli u reakciji sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom u kiselj sredini grade obojene fenilhidrazone koji se spektrofotometrijski određuju na 486 nm korišćenjem pinocembrina kao standarda (Stalikas, 2007). Kvantitativnu analizu antocijanina moguće je spektrofotometrijski izvesti pH diferencijalnom metodom (Lee et al., 2008).

Nedostatak direktnih spektrofotometrijskih metoda kod određivanja bioaktivnih komponenti pripisuje se lošoj selektivnosti reagenasa i nepreciznom određivanju sadržaja, međutim ove metode su i dalje svuda u širokoj upotrebi kao brze analitičke metode za procenu sadržaja bioaktivnih komponenti u biljnim proizvodima (Escarpa i Gonzalez, 2001).

Brojne spektroskopske metode koriste se i za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti čistih komponenti, biljnih ekstrakata, hrane ili bioloških sistema i one se mogu podeliti na dva tipa, one koje se zasnivaju na praćenju lipidne peroksidacije i one koje mere sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala (Sánchez-Moreno, 2002), odnosno one koje se baziraju na reakcijama transfera vodonikovog atoma ili reakcijama primopredaje elektrona

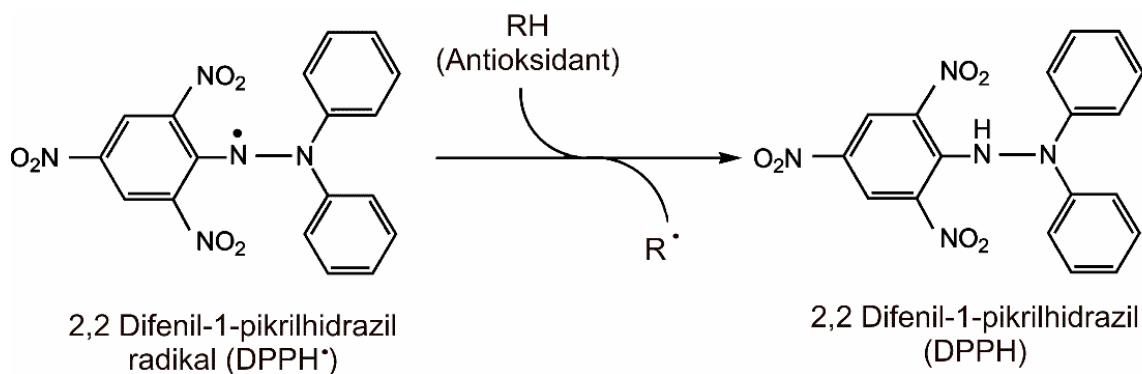
(Huang et al., 2005). Pregled najčešće korišćenih metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti nalazi se u tabeli 4.1 (Moon i Shibamoto, 2009; Huang et al., 2005).

Tabela 4.1 Najčešće korišćene spektrofotometrijske metode za određivanje antioksidativne aktivnosti „*in vitro*“

Metode bazirane na transferu vodonikovog atoma $ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet}$ $ROO^{\bullet} + LH \rightarrow ROOH + L^{\bullet}$	• ORAC (oxygen radical absorbance capacity) - kapacitet apsorpcije kiseoničnih radikala • TRAP (total radical trapping antioxidant parameter) – parametar koji definiše ukupnu sposobnost hvatanja radikala • Metoda zasnovana na izbeljivanju krocina • Inhibicija oksidacije linolne kiseline • Inhibicija oksidacije lipida male gustine (LDL)
Metode bazirane na reakcijama sa transferom elektrona $M^{(n)} + e \text{ (iz AH)} \rightarrow AH^{n+} + M^{(n-1)}$	• TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) – antioksidantni kapacitet izražen kao ekvivalent troloksa • FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter) - parametar koji definiše sposobnost antioksidanta da redukuje feri jon • DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) test • ABTS (2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) test • FTC (gvožđe tiocijanat) • Metoda zasnovana na redukciji bakra(II) • Metoda određivanja ukupnih fenola sa Folin-Ciocalteu reagensom

Većina metoda koje u osnovi imaju transfer vodonikovog atoma zasnivaju se na konkurentskoj reakciji između antioksidanta i supstrata prema generisanim radikalima, dok metode bazirane na transferu elektrona mere kapacitet antioksidanta u redukciji oksidanta, koji menja boju kada se redukuje. Stepem promene boje u korelaciji je sa koncentracijom antioksidanta u uzorku (Huang et al., 2005).

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal je zbog svoje relativno dobre stabilnosti i lake identifikacije veoma često korišćen standard za procenu antioksidativnih osobina (Staško et al., 2007). To je radikalska vrsta stabilizovana delokalizacijom elektrona, apsorbuje u vidljivom delu spektra sa maksimumom apsorpcije na 517 nm i njena ljubičasta boja se gubi usled reakcije antioksidantima i nastanka odgovarajućeg hidrazina žute boje (Sanchez-Moreno, 2002).



Slika 4.1 Reakcija DPPH radikala sa antioksidantom
(Adaptirano prema Moon i Shibamoto, 2009)

DPPH test baziran je na reakciji transfera elektrona, mada se uporedno dešava i transfer vodonikovih jona (Magalhaes et al., 2008). Kao i u slučaju drugih metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti zasnovanih na reakcijama transfera elektrona, rastvarač i pH vrednost sistema veoma su važni parametri, a pokazano je i da postoji limit za prisustvo vode u mešano vodeno-etanolim sistema. Sadržaj vode preko 60 % smanjuje antioksidativni kapacitet jer deo DPPH radikala, koji je generalno slabo rastvoran u vodi, koaguliše i postaje teško pristupačan za reakciju sa antioksidantima (Staško et al., 2007). Rezultati DPPH testa se najčešće izražavaju kao EC_{50} vrednost ("Efficient Concentration") koja se definiše kao koncentracija supstrata dovoljna da smanji početnu koncentraciju DPPH radikla za 50 %. Veća vrednost EC_{50} označava manju antioksidativnu aktivnost. U cilju standardizacije dobijenih rezultata često se koristi troloks, komercijalni vitamin E, a rezultati se izražavaju u troloks ekvivalentima, odnosno μg ili mmola trolokso po 100 grama uzorka (Moon i Shibamoto, 2009).

DPPH test se smatra dobrim i jednostavnim testom za procenu antioksidativne aktivnosti bioaktivnih komponenti (vitamini, flavonoidi, fenoli) (Hirose et al., 2010; Staško et al., 2007), hrane (Sanchez-Moreno, 2002), voća, povrća (Durmaz i Alpaslan, 2007; González-Montelongo et al., 2010; Guo et al., 2001; Peschel et al., 2006), pića, ekstrakata lekovitog i aromatičnog bilja (Choi et al., 2002; Gioti et al., 2009; Sanchez-Moreno, 2002; Stanisavljević et al., 2008; Stanisavljević et al., 2009a), etarskih ulja (Burits i Bucar, 2000; Tepe et al., 2006; Yadegarinia et al., 2006).

4.1.2. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena (IR) spektroskopija se zasniva na merenju apsorpcije infracrvenog zračenja (iznad 760 nm) od strane uzorka i omogućava da se odredi hemijski sastav, tj. strukturno-grupni sastav, jer su vibracione frekvencije karakteristične za svaku određenu funkcionalnu grupu (npr. za karbonilne grupe većina traka se pojavljuje na $1650\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$, a

za ugljenik-vodonik veze se blizu 3000 cm^{-1}). Ove karakteristične vibracije se zovu grupne frekvencije i koriste se za identifikaciju i određivanje strukture nepoznatih čistih jedinjenja. Ako se promena intenziteta propuštenog infracrvenog zračenja pomoću infracrvenog spektrofotometra predstavi u zavisnosti od frekvencije i/ili talasne dužine dobija se infracrveni spektar (Milosavljević, 1994).

Ovo je izuzetno brza spektrofotometrijska metoda, koja u kombinaciji sa spektralnom bankom podataka predstavlja moćnu metodu za analizu nepoznatih smeša (Marston i Hostettmann, 2009).

4.1.3. Elektron spin rezonantna spektroskopija

Elektron spin rezonancija (ESR) je spektroskopska metoda koja se zasniva na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju. Ova metoda se često naziva i elektron paramagnetna rezonanca (EPR), jer se njome mogu ispitivati paramagnetne supstance, odnosno supstance koje sadrže atome, jone ili molekule sa nesparenim elektronima (Čanadanović-Brunet et al., 2005).

Metoda ESR omogućuje da se odredi prisustvo i broj nesparenih elektrona u jednom molekulu, kao i njihova raspodela. Ovakvi podaci su od naročitog značaja za hemiju slobodnih radikala, te je ESR spektroskopija osnovna ekperimentalna tehnika za ispitivanje oksido-redukcionih procesa, biradikalskih i triplet stanja molekula, strukture i reakcije polimera, mehanizma organskih reakcija slobodnih radikala (Čanadanović-Brunet, 1998).

Elektron spin rezonantna spektroskopija je najsavremenija, neinvazivna, veoma osetljiva i jedina metoda za direktnu detekciju slobodnih radikala, kojom se mogu detektovati koncentracije slobodnih radikala niže od 10^{-10} mol/dm^3 , pod uslovom da su radikali stabilni u ispitivanom sistemu onoliko vremena koliko je potrebno da se detektuju (Tepić, 2009).

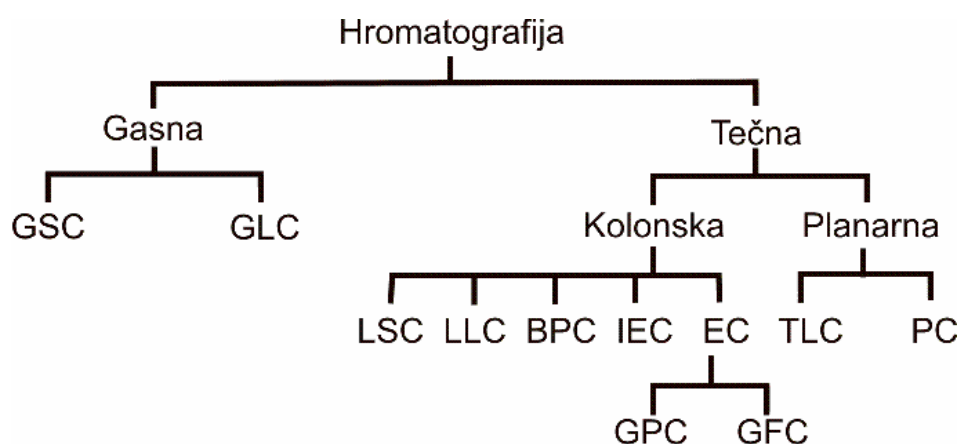
Homogeno magnetno polje promenljive jačine proizvodi se elektromagnetom sa precizno izrađenim polovima, a kao izvor mikrotalasnog zračenja najčešće se koristi klistron. Za analizu hidroksil, alkoksil i peroksil radikala koji su nestabilni najčešće se primenjuje metoda hvatanja radikala, tzv. "spin-trapping" metoda. U sistem sa reaktivnim radikalima dodaju se određena jedinjenja, tzv. "spin-trap"-ovi (hvatači radikala). Interakcijom prisutnih komponenti nastaju relativno stabilni radikali, tzv. "spin-adukti", pogodni za detekciju ESR spektroskopijom (Čanadanović-Brunet, 1998).

Ova metoda korišćena je za ispitivanje ekstrakata lekovitog i aromatičnog bilja (Čanadanovic-Brunet et al., 2005; Polovka i Suhaj, 2010; Raffi et al., 2000; Stojičević et al., 2008), listova duvana (Morsy i Khaled, 2001), zelenog i crnog čaja (Morsy i Khaled, 2002), vina (Staško et al., 2006).

4.2. Hromatografske metode

Hromatografija je zbirni naziv za grupu laboratorijskih analitičkih metoda namenjenih prvenstveno za razdvajanje, a zatim i za identifikaciju i kvantitativno određivanje različitih supstanci koje čine komponente neke smeše. Razdvajanje komponenata smeše zasniva se na njihovoj različitoj raspodeli između dve faze koje se ne mešaju, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne). Stacionarna faza može biti čvrsta supstanca ili tečnost, a mobilna faza može biti gas ili tečnost koja prelazi preko stacionarne faze.

Hromatografske metode se generalno mogu podeliti na osnovu različitih kriterijuma (mehanizam razdvajanja, priroda faza, tehnika izvođenja). Na slici 4.2 prikazana je podela hromatografskih metoda prema prirodi mobilne i stacionarne faze (Grinberg, 1990).



Slika 4.2 Klasifikacija hromatografskih metoda na osnovu prirode stacionarne i mobilne faze (GSC-Gasno-čvrsta hromatografija, GLC-Gasno-tečna hromatografija, LSC-Tečno-čvrsta hromatografija, LLC-Tečno-tečna hromatografija, BPC-Hromatografija vezanih faza, IEC-Jonoizmenjivačka hromatografija, EC- Ekskluziona hromatografija, TLC-Tankoslojna hromatografija, PC-Hromatografija na papiru, GPC- Gel permeabilna hromatografija i GFC- Gel filtraciona hromatografija)

4.2.1. Gasna hromatografija

Gasna hromatografija (GC) je hromatografska metoda razdvajanja i detekcije organskih jedinjenja, kod koje je mobilna faza obično inertni (argon ili helijum) ili gas koji ne reaguje sa ispitivanim uzorkom (azot) zajedno sa parama jedinjenja koja se razdvajaju. U zavisnosti od primenjene stacionarne faze, gasna hromatografija može biti gas-čvrsta, koja se koristi za razdvajanje permanentnih gasova ili ugljovodonika niske molekulske mase, odnosno gas-tečna hromatografija koja je daleko više u upotrebi. Gas-tečna hromatografija primenjuje se za analizu svih jedinjenja koja se mogu bez degradacije prevesti u parno stanje, a njihovo razdvajanje se zasniva na različitoj rastvorljivosti para u tečnoj fazi. Stacionarna

faza je kapilarni sloj tečnosti ravnomerno raspoređen po inernom nosaču (u pakovanim kolonama) ili po unutrašnjem zidu kolone (kapilarne kolone) (Milosavljević, 1994).

Razdvajanje komponenti vrši se u zavisnosti od fizičkih i hemijskih osobina komponenti kao i od njihovih mogućih uzajamnih odnosa sa stacionarnom fazom, odnosno punjenjem kolona, sa različitim vremenskim zadržavanjem u koloni, odnosno retencionim vremenom. Detektovanjem retencionih vremena moguća je identifikacija pojedinih komponenti, jer pod datim operativnim uslovima (temperatura kolone, protok nosećeg gasa, veličina klone, količina tečne faze) ovo vreme je karakteristično za to jedinjenje i primenjenu tečnu fazu. Po izlasku iz kolone, razdvojena jedinjenja, zajedno sa nosećim gasom, prolaze kroz detektor gde se registruju kao električni signali. Ovako dobijena kriva zavisnosti, gasni hromatogram, pruža podatke o broju komponenti u smeši, njihovom kvantitativnom odnosu, kao i o njihovoj prirodi (često je moguća potpuna identifikacija nepoznatog jedinjenja na osnovu retencionog vremena) (Milosavljević, 1994).

Ova metoda nalazi široku primenu u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi hrane (Lehotay i Hajšlová, 2002), hranljivih i bioaktivnih komponenti kao što su ugljeni hidrati, aminokiseline (Xie et al., 2010), fenolne kiseline (Ju et al., 2010), lipidi, lipofine komponente, masne kiseline (Aluyor et al., 2009; Ratnayake i Galli, 2009; Ruiz-Rodriguez et al., 2010; Stanisavljević et al., 2009b), etarska ulja (Pisseri et al., 2008; Veličković, 2003; Ye, 2009), arome i mirisne komponente (Perez-Cacho i Rouseff, 2008; Sinha et al., 2008), takođe se može koristiti za utvrđivanje prisustva pesticida (Hercegová et al., 2007; Soler et al., 2008) i veštačkih zaslađivača u hrani (Zygler et al., 2009).

Na široku primenu ove metode u velikoj meri utiče i relativno kratko vreme trajanja analize (do desetak minuta), velika osetljivost detektora (10^{-9} – 10^{-14} g), lako rukovanje aparatom i jednostavnost u interpretaciji hromatograma (Milosavljević, 1994).

4.2.2. Tečna hromatografija

Tečna hromatografija može biti klasična, gde se koriste velike kolone, dužine i do 60 cm, ispunjene adsorbensom kao stacionarnom fazom. Na vrh kolone nanosi se mala količina analizirane smeše, a zatim se kontinuirano propušta mobilna faza čime se postiže razdvajanje komponenti. Najčešće se eluiranje vrši slobodnim proticanjem rastvarača kroz kolonu, ređe primenom vakuuma ili pod pritiskom, što kao rezultat ima mali protok mobilne faze (za kolonu od 40 x 3 cm, 3-4 cm³/min) te ovu metodu čini sporom i slabo efikasnom (Marković et al., 1998).

Tečna hromatografija visokih performansi, odnosno visoko pritiska tečna hromatografija (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) je moderna analitička tehnika kod koje tečna (mobilna) faza pod pritiskom (do 10^6 Pa) nosi uzorak kroz porozni medijum kolone (silikatni ili polimerni materijal veoma razučene površine). Uzorak nakon razdvajanja na koloni podleže detekciji, najčešće se koriste UV detektori.

U zavisnosti od interakcije analita sa površinom stacionarne faze zavisi vreme zadržavanja u koloni i razdvajanje komponenti smeše. Vrsta stacionarne i mobilne faze, kao i

uslovi analize razlikuju se u zavisnosti od komponenti smeše (Kazakevich i LoBrutto, 2007). Tako, na primer za analizu fenolnih jedinjenja vrlo često koristi se reverzno fazna HPLC sa kolonom C18 (Tsao i Yang, 2003) ili C8 (Escarpa i Gonzalez, 2001) "diode array" detektorom i metanolni ili acetonitrilni vodeni rastvor kao mobina faza, pri čemu dodatak malih količina mravlje, sirćetne kiseline i fosfatnog pufera znatno poboljšavaju razdvajanje (Wang et al., 2000). Ne retko, u ove svrhe koristi se binarni sistem rastvarača, vodeni rastvor sirćetne, mravlje ili fosforne kiseline (mobilna faza A) i polarni organski rastvarač, uglavnom čist ili zakišljen metanol ili acetonitril (mobilna faza B). Separacija obično traje do 1 h sa protokom od 1,0–1,5 ml/min (Tsao i Yang, 2003).

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom pokazuje najveću tačnost i linearnost u širokom rasponu koncentracija, objedinjujući prednosti simultane separacije i kvantifikacije što je čini jednom od najčešće korišćenih metoda. Termolabilna jedinjenja mogu biti analizirana ovom metodom na sobnoj temperaturi.

Visokopritisna tečna hromatografija (HPLC) je izuzetno efikasna metoda razdvajanja i kvantifikacije proteina, peptida, aminokiselina, lipida, ugljenih hidrata, steroida, vitamina (Fallon et al., 1987), fenola, flavonoida (Biesaga et al., 2009; de Rijke et al., 2006; Pyrzynska i Biesaga, 2009; Volpi i Bergonzini, 2006), biljnih proizvoda (Jiang et al., 2010; Marston i Hostettmann, 2009; van Beek i Montoro, 2009; Wolfender, 2009).

4.2.3. Tankoslojna hromatografija

Tankoslojna hromatografija (TLC - Thin Layer Chromatography) jedna je od brzih i pouzdanih metoda analize bioaktivnih komponenti biljnih materijala, koja se koristi za dokazivanje njihovog prisustva i razdvajanje, najčešće u preparativne svrhe (Reich i Schibli, 2007). Odvija se u zatvorenoj komori, na tankom sloju adsorbensa (0,1 do 0,25 mm) nanešenom na čvrst nosač (staklene, aluminijumske, plastične ploče), gde mobilnu fazu čine odabrani rastvarači ili smeša rastvarača (najčešće organskih, niske polarnosti) i njihove zasićene pare (Wall, 2005).

Na osnovu jedno- i dvodimenzionalne tankoslojne hromatografske analize moguće je utvrditi prisustvo različitih bioaktivnih komponenti (Gocan i Cimpan, 2004; Ligor i Buszewski, 2007; Ćetković et al., 2003) i sekundarnih metabolita (Cieśla i Waksmundzka-Hajnos, 2009) u biljnim ekstraktima, kao i vitamina, lipida, aminokiselina i ugljenih hidrata u različitim uzorcima (Fried i Sherma, 1999).

Neke od prednosti TLC metode su jednostavnost, ekonomičnost, istovremena analiza velikog broja uzoraka za relativno kratko vreme (Marston i Hostettmann, 2009; Reich i Schibli, 2007), mogućnost analize "prljavih" uzoraka bez prečišćavanja i utvrđivanja prisustva nečistoća u složenim sistemima (farmaceutski i prehrambeni proizvodi) (Ferenczi-Fodor et al., 2006), dok su nemogućnost automatizacije i u pojedinim slučajevima loša reproducibilnosti, neke od loših strana (Marston, 2007).

5. LOVOR VIŠNJA - *Prunus laurocerasus* L.

Vegetacija Srbije karakteriše se visoko izraženim diverzitetom, kao i značajnim brojem endemičnih i reliktnih biljnih zajednica koji nastanjuju specifična staništa, pre svega kanjonske doline reka, planinske vrhove i enklave stepskih područja u Vojvodini. Jedan od ugroženih relikata na Balkanskom poluostrvu je *Prunus laurocerasus* L. (lovor višnja, zeleniče), vrsta iz roda *Prunus* koja pripada familiji ruža - *Rosaceae*. To je zimzeleni žbun, ili nisko drvo, visoko 6-8 metara. Cveta od aprila do maja meseca, a plodonosi u avgustu i septembru na šta utiče više činilaca: osobine samog genotipa, klimatske prilike, zemljišni uslovi, nadmorska visina, ekspozicija terena, insolacija, uslovi mikroklimata. Rasprostranjena je u Zakavkazju, Kavkazu, Iranu, Maloj Aziji, Peloponezu, Bugarskoj i Srbiji (Agencija za zaštitu životne sredine, 2004; Duke, 1992). U Srbiji, asocijacija *Lauroceraso-Fagetum*, retka i specifična reliktna zajednica bukve sa zeleničetom, nalazi se samo na planini Ostrožub (jugoistočna Srbija, predeo Grdelice). Prostire se na svega nekoliko hektara, na 1200-1300 m nadmorske visine, na vlažnom, vrlo hladnom, skeletnom, jako kiselom smeđem zemljištu, na prореđenim delovima čiste sastojine bukove šume. Šuma bukve sa zeleničetom, kao reliktna tercijerna fitocenoza, ukazuje na prošlost flore Grdeličke klisure i klimatske uslove koji su u njoj vladali (Agencija za zaštitu životne sredine, 2004). Kao tercijerni reliktni na granici svog današnjeg prirodnog areala, lovor višnja na Ostrožubu predstavlja posebnu taksonomsku kategoriju, *Prunus laurocerasus* L. var. *serbica* Pančić. Prema Crvenoj knjizi flore Srbije lovor višnja je kategorisana kao krajnje ugrožen takson Srbije (CR-Srb B1+2c). Takson nije uvršten u evropsku i svetsku crvenu listu flore, ali se u susednoj Rumuniji nalazi u kategoriji ranjivog taksona (VU) (Stevanović et al., 1999). Vrsta je, kao prirodna retkost u Srbiji, zaštićena zakonom (Sl.gl. R.Srbije br. 66/91, 83/92 i 50/93), dok je bukova šuma na planini Ostrožub, u čijem jednom delu je i stanište lovor višnje, stavljena pod zaštitu države još 1950. godine. Zaštićena površina, strogi prirodni rezervat "Zeleničje", iznosi ukupno 41,7 ha i nalazi se na području opština Leskovac i Crna Trava (Agencija za zaštitu životne sredine, 2004).

Sveži listovi ove biljke imaju antispazmatično, narkotično i sedativno dejstvo, a koriste se u terapiji kašlja, astme i kod problema sa digestivnim traktom (Plants For A Future, 2004). U Turskoj narodnoj medicini listovi lovor višnje zagrejavani iznad vatre stavljaju se na čelo kod lečenja glavobolje i povišene telesne temperature (Yeşilada et al., 1999). Svi delovi biljke sadrže amigdalini, prunasini i cijanovodonici, od kojih potiče karakterističan miris i aroma, a koji u reakciji sa vodom daju cijanovodoničnu kiselinu. U malim količinama, u kojima je ovaj toksin prisutan u svim delovima biljke, cijanovodonik stimuliše disanje i poboljšava varenje (Plants For A Future, 2004). U listu ima još glukoze, tanina i benzaldehida, dok se u semenu mogu naći proteini i masne kiseline (miristinska, oleinska, stearinska, palmitinska, linolenska) (Duke, 1992). Listovi su zeleni, sjajni, zimzeleni, a njihova zaštitna kutikula (mase 280 mg/m² i 830 mg/m², za gornju i donju površinu lista, respektivno) se sastoji od smeše alkana (70 - 80 %), ursolne i oleanolne kiseline, aldehida (Jetter et al., 2000), masnih kiselina, primarnih

alkohola (Jetter et al., 2000; Stammenti et al., 1996). Bez obzira na identifikovane bioaktivne komponente prisutne u listovima etanolni ekstrakt listova lovor višnje dobijen ekstrakcijom po Soxhlet-u ne pokazuje antimikrobno dejstvo ni na jedan od dvanaest testiranih mikroorganizama, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra* i *Kluyveromyces fragilis* (Dulger i Gonuz, 2004). U etarskom ulju lista i ploda lovor višnje identifikovano je oko 58 komponenti, pri čemu je najzastupljeniji u oba ulja benzaldehid, sa oko 95 % (Mchedlidze i Kharebava, 1988). Od ostalih komponenti dokazano je prisustvo heksanala, trans-2-heksenala, heksanola, cis-3-heksenola, furfurola, benzil hlorida, oktanola, 5-metilfurfurola, α -nerolidola, β -nerolidola, metilantranilata i benzojeve kiseline (čiji se sadržaj povećava tokom čuvanja). Uočeno je da su ulja lista i ploda lovor višnje veoma sličnog sastava, ali ima komponenti koje su bile prisutne samo u jednom ulju (Mchedlidze i Kharebava, 1988). List i plod lovor višnje koriste se u industriji boja i parfema (Akdeniz i Gündoğdu, 2007).



Slika 5.1 Lovor višnja (*Prunus laurocerasus* L. var. *serbica* Pančić)
u svom prirodnom staništu

Jestivi deo ploda lovor višnje odličan je izvor fruktoze (23,6 %), glukoze (20,8 %), sorbitola (13,4 %) (Var i Ayaz, 2004), manitola, askorbinske kiseline (Ayaz, 1997). On sadrži dijetetska vlakana (do 3 %), malo proteina (0,98-1,27 %), masti (oko 0,15 %), minerala (K, Mg, Ca, Na, u tragovima su detektovani Mn, Fe, Zn i Cu) i antioksidanata (Kolayli et al., 2003;

Rodriguez et al., 1992). Najzastupljenije fenolne kiseline u plodu su benzoeva, kafena i vanilinska kiselina, dok su identifikovane i ferulinska, 4-hidroksibenzoeva, i 3,4-dihidroksibenzoeva kiselina i *p*-kumarin (Ayaz, 2001). Zeleni plodovi lovor višnje su otrovni, ali ne i u fazi zrelosti, koju dostižu nakon tri meseca od faze cvetanja, narastajući do 8 mm (kod pojedinih vrsta i do 12 mm) u prečniku kada postaju tamno ljubičaste boje. Zreo plod se konzumira u svežem i osušenom stanju, konzervisan ili zakišljen, u obliku džema, marmelade ili likera, kada pored svoje nutritivne vrednosti pokazuje hipotenzivno dejstvo i pomaže u lečenju glavobolje (Islam, 2002; Kolayli et al., 2003; Pieroni, 2000).



Slika 5.2 Plod lovor višnje *Prunus laurocerasus* L.

Seme lovor višnje sadrži oko 40 % ulja (Alasalvar et al., 2006), čiji je glavni sastojak oleinska kiselina (Alasalvar et al., 2006; Erciyes et al., 2006), odnosno oleinska i linolna kiselina (Ayaz et al., 1995). Spada u kategoriju nesusivih ulja (Erciyes et al., 2006). Kod divljih formi ove biljke u ulju semena zastupljenija je linolna kiselina, dok je u ulju semena gajenih formi više zastupljena oleinska kiselina (Ayaz et al., 1995). U Turskoj tradicionalnoj medicini lovor višnja se već godinama koristi u terapiji stomaknih čireva, digestivnih smetnji, bronhitisa, ekcema, hemoroida (seme), kao diuretik (ceo plod) (Ayaz et al., 1998; Liyana-Pathirana et al., 2006; Yeşilada et al., 1999).

Drvenasti deo ove biljke, sadrži uglavnom celulozu (36 %) i lignin (29 %), a procesima termohemijske konverzije, likvifikacijom, može se prevesti u sirovinu dobrih energetskih osobina. U ruralnim predelima Tuske, ovaj deo biljke koristi se za ogrev (Akdeniz i Gündoğdu, 2007).

6. EKSPERIMENTALNI DEO

6.1. Materijal

U eksperimentalnom delu ovog rada korišćeni su svež list i plod lovor višnje (*Prunus laurocerasus* L.) sa područja Grdelice (jugoistočna Srbija, kraj avgusta 2007). Biljni materijal je opran nakon ubiranja i korišćen za potrebe eksperimenta ne duže od 4 dana tokom kojih je čuvan u termostatu na temperaturi od +4 °C. Sveži listovi (odvojeni od drški i grančica) i meso ploda (odvojeno od koštica) mleveni su u električnom mlinu. Srce koštica je osušeno na promajnom mestu i neposredno pre ekstrakcije usitnjeno u električnom mlinu. Sadržaj vlage u listu, mesu ploda i srcu koštica je određivan po standardnom postupku koji propisuje Ph. Jug. V (2000). Mase ploda, koštica i srca koštica određene su na uzorku od 50 plodova pojedinačnim merenjem na analitičkoj vagi, a dimenzije pomoću nonijusa.

Metanol, 2-propanol, *n*-heksan i hloroform (HPLC čistoće) su nabavljeni kod J.T. Baker (Deventer, Holland), a 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), galna kiselina, rutin, troloks, Folin Ciocalteu reagens, standardi metil estara masnih kiselina, hlorogena kiselina, luteolin, luteolin-7-O-glukozid, luteolin-6-metoksid, kemferol, kvercetin, apigenin, apigenin-5-O-glukozid kod Sigme (St. Louis, MO). Natrijum karbonat, natrijum sulfat, kalijum acetat, aluminijum hlorid, orto-fosforna kiselina i apsolutni etanol kupljeni su od Merck-Alkaloid (Skoplje). Svi uzorci i rastvarači korišćeni pri HPLC analizi filtrirani su pre analize kroz membranske filtre sa veličinom pora 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA).

6.2. Dobijanje bioaktivnih proizvoda

Za ekstrakciju biljnog materijala primenjene su četiri tehnike ekstrakcije: mikrotalasna, ultrazvučna, klasična i ekstrakcija po Soxhlet-u. Kao rastvarači, za mikrotalasnu ekstrakciju ekstraktivnih materija iz lista i mesa ploda korišćeni su voda, metanol i 2-propanol, dok je masno ulje iz srca koštica ekstrahovano *n*-heksanom i sistemom *n*-heksan:voda-9:1. Mikrotalasne karakteristike korišćenih rastvarača date su u tabeli 6.1. Klasična i ultrazvučna ekstrakcija izvedene su sa rastvaračem koji je dao maksimalni prinos pri mikrotalasnoj ekstrakciji, metanolom.

Tabela 6.1 Mikrotalasne fizičke konstante rastvarača (Eskilsson i Björklund, 2000; Meireles, 2008)

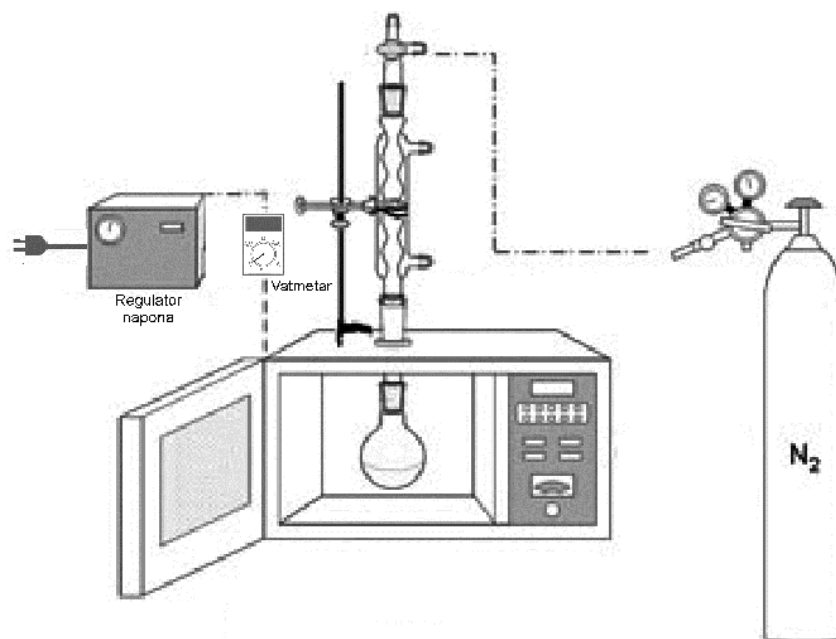
Rastvarač	Dielektrična konstanta ^a ϵ'	Faktor gubitaka ϵ''	Dipolni moment ^b	Disipacioni faktor, $\tan \delta$ (10^{-4})	Temperatura ključanja ^c , K	Temperatura u zatvorenim mikrotalasnim sistemima ^d , K
Voda	78,3	9,89	2,30	1570	373	-
Metanol	32,6	21,48	2,87	6400	338	424,2
2-propanol	19,9	14,62	1,66	6700	355	418,2
<i>n</i> -Heksan	1,89	0,038	0,10	200	342	-

^a na 293K, ^b na 298K, ^c na 101,325 kPa, ^d na 1207 kPa

Za izvođenje mikrotalasne ekstrakcije, hidrodestilacije i suve destilacije pod dejstvom mikrotalasa korišćena je modifikovana mikrotalasna pećnica ("SAMSUNG", Tip M1712N, Malaysia), dimenzija 485 x 275 x 379 mm, unutrašnje zapremine 23 dm³ (330 x 211 x 329 mm), snage 1200 W, koja radi pri frekvenci od 2450 MHz. Na gornjem zidu pećnice bio je napravljen kružni otvor (prečnika 55 mm), tako da se ne oštete magnetron (mikrotalasni generator) i usmerivač talasa, a da kroz njega može da prođe šlifovani stakleni nastavak, čija je svrha bila povezivanje suda koji se nalazi unutar mikrotalasne pećnice sa kondenzatorom ili aparaturom po Clevenger-u. Regulatorom napona redno vezanim za izvor električne energije omogućeno je dobijanje različitih izlaznih snaga magnetrona. Magnetron je radio bez prekida, a njegova snaga praćena digitalnim vatmetrom. Efektivna mikrotalasna snaga određena je klasičnom fizičkom metodom koja se zasniva na merenju početne i krajnje temperature sistema poznate zapremine i toplotnog kapaciteta izloženog dejstvu mikrotalasa u određenom vremenskom intervalu pomoću sledeće jednačine:

$$P = c_p m \frac{T_0 - T}{t} \quad (6.1)$$

gde je P – efektivna akustična snaga, c_p – toplotni kapacitet vode (4183 kJ/kgK), m – masa vode (1 kg), T_0 – početna temperatura (18 °C), T – krajnja temperatura i t – vreme izlaganja sistema dejstvu mikrotalasa (5 minuta). Nezavisno od ulaznog napona (180 – 220 V) utvrđeno je da je efektivna mikrotalasna snaga 78,2±2,3 % očitavanja na displeju vatmetra. Električnom i mehaničkom modifikacijom pećnice omogućeno je izlaganje ekstrakcionog sistema dejstvu mikrotalasa konstantne snage sve vreme trajanja procesa, kao i sklapanje otvorenog ekstrakcionog sistema i vršenje procesa pri atmosferskom pritisku. U smešu biljnog materijala i rastvarača izloženu dejstvu mikrotalasa, sve vreme je, kroz silikonsko crevo na čijem se kraju nalazio distributor gasa, uduvavan azot, u cilju mešanja, obezbeđivanja uniformnosti sastava i temperature sistema. Šema sistema prikazana je na slici 6.1.



Slika 6.1 Šema sistema korišćenog za mikrotalasnu ekstrakciju

6.2.1. Mikrotalasna ekstrakcija

Erlenmajeri sa šlifovanim zatvaračem (500 cm³) u kome su se nalazili rastvarač (400 cm³) i usitnjeni biljni materijal mase 20, 40 i 80 g, u odnosu biljni materijal-rastvarač 1:5, 1:10 i 1:20 g/cm³, respektivno, postavljani su u modifikovanu mikrotalasnu pećnicu i staklenim nastavkom bili su spajani sa kondenzatorom, a ekstrakcija je vršena u trajanju od 1, 2,5, 5, 10, 15, 20 i 30 minuta, pri različitim mikrotalasnim snagama (300, 450 i 600 W). Po završetku ekstrakcije, tečni ekstrakt je odvajan od iscrpljenog biljnog materijala pod vakuumom na Büchner-ovom levku i uparavan do konstantne mase na rotacionom vakuum uparivaču na 40 °C. Prinos ekstraktivnih materija (u g/100 g biljnog materijala) je izračunavan iz mase izdvojenog ekstrakta i mase sveže biljne sirovine u slučaju lista i mesa ploda, odnosno suve biljne sirovine u slučaju srca koštica plodova lovor višnje.

6.2.2. Klasična ekstrakcija

Erlenmajeri sa šlifovanim zatvaračem (500 cm³) u kojima se nalazio rastvarač (400 cm³) i 20 g usitnjenog biljnog materijala, u odnosu biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm³, odnosno 40 g usitnjenog biljnog materijala (odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³) u slučaju ekstrakcije srca koštica ploda lovor višnje, stavljeni su u vodeno kupatilo gde je temperatura održavana konstantnom na nivou $\pm 0,1$ °C. Ekstrakcija je vršena u trajanju od 15 minuta na temperaturi ključanja rastvarača, 64,7 i 69 °C, za metanol i *n*-heksan, respektivno. U cilju mešanja i obezbeđivanja uniformnosti sastava i temperature ekstrakcionog sistema sve vreme je, kroz silikonsko crevo na čijem se kraju nalazio distributor gasa, u smešu biljnog materijala i rastvarača uduvavan azot. Po završetku ekstrakcije, tečni ekstrakt je odvajan od iscrpljenog biljnog materijala i dalje tretiran na identičan način kao u slučaju mikrotalasne ekstrakcije.

6.2.3. Ultrazvučna ekstrakcija

Erlenmajeri sa šlifovanim zatvaračem (500 cm³) u kojima se nalazio rastvarač (400 cm³) i 20 g usitnjenog biljnog materijala, u odnosu biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm³, odnosno 40 g usitnjenog biljnog materijala (odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³) u slučaju ekstrakcije srca koštica ploda lovor višnje, stavljeni su na rešetku u ultrazvučnoj kadi tipa "SONIC", Niš, snage 150 W, koja radi pri frekvenci od 40 kHz. Kada je bila napunjena destilovanom vodom do 1/3 ukupne zapremine (oko 2,5 dm³). Voda je cirkulisala kroz termostatisano kupatilo i kadu pomoću centrifugalne crpke, tako da je njena temperatura održavana konstantnom na nivou $\pm 0,1$ °C. Ekstrakcija je vršena u trajanju od 15 minuta na temperaturi ključanja rastvarača, 64,7 i 69 °C, za metanol i *n*-heksan, respektivno. U ekstrakcionom sistemu sve vreme trajanja ekstrakcije je uduvavan azot, a po završetku

ekstrakcije, tečni ekstrakt je odvajan od iscrpljenog biljnog materijala i dalje tretiran na identičan način kao u slučaju mikrotalasne ekstrakcije.

6.2.4. Ekstrakcija po Soxhlet-u

Usitnjeni biljni materijal (10 g) spakovan je u filter papir i postavljen u Soxhlet-ov aparat. U ekstrakcionu sud sipano je 100 cm³ odgovarajućeg rastvarača koji je zagrevan do temperature ključanja. Ekstrakcija je u slučaju svih biljnih materijala i rastvarača trajala od 120 do 195 minuta. Nakon završene ekstrakcije ekstrakt je uparavan na vakuum uparivaču do konstantne mase. Prinos ekstraktivnih materija (u g/100 g biljnog materijala) je izračunavan iz mase izdvojenog ekstrakta i mase sveže biljne sirovine u slučaju lista i mesa ploda, odnosno suve biljne sirovine u slučaju srca koštica plodova lovor višnje.

6.2.5. Hidrodestilacija etarskog ulja

Usitnjeni sveži listovi lovor višnje (100 g) podvrgnuti su hidrodestilaciji u balonu aparata po Clevenger-u pri odnosu biljnog materijala i destilovane vode 1:10 g/cm³. Zagrevanje je vršeno električnom grejnom oblogom 150 minuta (na temperaturi ključanja) pri brzini destilacije od 6,9±0,05 cm³/min, a vreme je mereno od momenta kada je prva kap etarskog ulja dospela u separator aparata. Dobijeno ulje je sušeno bezvodnim natrijum sulfatom, filtrirano i čuvano na +4 °C u dobro zatvorenim, tamnim staklenim bočicama do GC–MS analize. Hidrosol, vodeni deo iz balona zaostao nakon hidrodestilacije, odvojen je od iscrpljenog biljnog materijala pod vakuumom na Büchner-ovom levku odmah podvrgnut daljim analizama.

6.2.6. Hidrodestilacija etarskog ulja pod dejstvom mikrotalasa

Balon sa šlifovanim zatvaračem i ravnim dnom (2000 cm³) sa usitnjenim svežim listovima lovor višnje (100 g) i destilovanom vodom (1000 cm³) postavljen je u modifikovanu mikrotalasnu pećnicu i šlifovanim staklenim nastavkom spojen sa aparaturom po Clevenger-u. Sistem je bio podvrgnut hidrodestilaciji pri različitim mikrotalasnim snagama, 300, 450 i 600 W, pri čemu su brzine destilacije bile 6,4±1,0; 8,9±1,5 i 10,1±0,9 cm³/min, respektivno. Dobijeno ulje dalje je tretirano, čuvano i analizirano kao i ulje dobijeno hidrodestilacijom. Hidrosolovi su odvajani od iscrpljenog biljnog materijala pod vakuumom na Büchner-ovom levku odmah podvrgnut daljim analizama.

6.2.7. Suva destilacija etarskog ulja pod dejstvom mikrotalasa

Balon sa šlifovanim zatvaračem i ravnim dnom (2000 cm³) sa usitnjenim svežim listovima lovor višnje (100 g) postavljen je u modifikovanu mikrotalasnu pećnicu i šlifovanim staklenim nastavkom spojen sa aparaturom po Clevenger-u. Suva destilacija pod dejstvom

mikrotalasa vršena je pri različitim mikrotalasnim snagama, 300, 450 i 600 W na atmosferskom pritisku, pri brzinama destilacije od $6,2 \pm 0,1$; $8,8 \pm 1,4$ i $10,3 \pm 1,1$ cm³/min, respektivno. Dobijeno ulje dalje je tretirano, čuvano i analizirano kao i ulje dobijeno hidrodestilacijom.

6.2.8. Dobijanje soka ploda lovor višnje

Sveži plodovi lovor višnje (50 g) ručno su ceđeni, a dobijeni sok ($28,4 \pm 1,3$ cm³) filtriran je pod vakuumom na Büchner-ovom levku i odmah podvrgnut daljim analizama. Sadržaj suvog ostatka ceđenog soka ploda lovor višnje je određen po standardnom postupku koji propisuje Ph. Jug. V (2000) i iznosio je $12,4 \pm 0,0$ mg suve materije/cm³ soka.

6.3. Karakterizacija bioaktivnih proizvoda

6.3.1. Antioksidativna aktivnost, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima lista i mesa ploda lovor višnje

6.3.1.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti - DPPH test

Antioksidativna aktivnost analiziranih metanolnih ekstrakata lista i mesa ploda, hidrosolova dobijenih nakon hidrodestilacija i sveže ceđenog soka plodova lovor višnje ispitana je DPPH testom (Choi et al., 2002). Serije ekstrakata različitih koncentracija ($1-0,01$ mg/cm³, sedam različitih koncentracija) kao i razblaženja hidrosolova i svežeg soka (razblaženja od 5 do 50 puta) pripremljene su u metanolu. Zatim, su ekstrakti određene koncentracije, hidrosolovi i svež sok određenog razblaženja ($2,5$ cm³) pomešani sa 1 cm³ rastvora DPPH radikala u metanolu (3×10^{-4} mol/dm³). Nakon 30 minuta inkubacije, na sobnoj temperaturi u mraku, merena je apsorbanca na talasnoj dužini od 517 nm spektrofotometrom (VARIAN Cary-100). Kao blank rastvor korišćen je metanol (1 cm³) i rastvori ekstrakta, hidrosolova i svežeg soka ($2,5$ cm³), a kao kontrola rastvor DPPH u metanolu. Kapacitet neutralisanja DPPH radikala izračunat je korišćenjem formule:

$$\text{Kapacitet neutralisanja DPPH radikala (\%)} = 100 - \left(\frac{A_U - A_B}{A_K} \cdot 100 \right) \quad (6.2)$$

A_U = Apsorbancija „uzorka“ na 517 nm ($2,5$ cm³ rastvora ekstrakata, razblaženja hidrosolova i soka tretirano 1 cm³ rastvora DPPH radikala)

A_B = Apsorbancija „blank-a“ na 517 nm ($2,5$ cm³ rastvora ekstrakata, razblaženja hidrosolova i soka u 1 cm³ metanola)

A_K = Apsorbancija „kontrole“ na 517 nm (1 cm³ rastvora DPPH radikala koncentracije 3×10^{-4} mol/dm³ u $2,5$ cm³ metanola)

Vrednost EC_{50} izračunavana je na osnovu eksperimentalnih podataka korišćenjem sigmoidne nelinearne metode pomoću programa SigmaPlot 2000Trial, a kao referentna supstanca korišćen je metanolni rastvor komercijalnog antioksidanta troloksa, koncentracija od 25 do 800 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ čija je vrednost za EC_{50} bila $82,9 \pm 1,7 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Prilog, slika 11.1).

6.3.1.2. Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja

Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja određivan je metodom sa Folin Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Analizirani metanolni rastvori ekstrakta lista i mesa ploda ($0,2 \text{ cm}^3$, $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), hidrosolova i svežeg soka ploda lovor višnje ($0,2 \text{ cm}^3$, desetostruko razblaženje) mešani su sa Folin Ciocalteu reagensom (1 cm^3) i vodenim rastvorom Na_2CO_3 ($0,8 \text{ cm}^3$; 7,5 %). Nakon inkubacije na tamnom mestu i sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta, merena je absorbanca reakcione smeše na 765 nm na spektrofotometru (VARIAN Cary-100). Snimanjem absorbanci serije standardnih rastvora galne kiseline dobijene su kalibraciona kriva (Prilog, slika 11.2) i jednačina standardne krive:

$$\text{Absorbanca na } 765 \text{ nm} = 12,722 c_{\text{galna kiselina}} (\mu\text{g}/\text{cm}^3) + 0,0034, R^2 = 0,9994 \quad (6.3)$$

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je izražen kao mg galne kiseline/g suvog ekstrakta, odnosno mg galne kiseline/ cm^3 nerazblaženog hidrosola ili svežeg soka.

6.3.1.3. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u analiziranim metanolnim ekstraktima listova i mesa ploda, hidrosolovima i sveže ceđenom soku ploda lovor višnje određen je spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum hloridom, koja se bazira na stvaranju kompleksa flavonoid-aluminijum (Chang et al., 2002). U metanolni rastvor ekstrakta (2 cm^3 , $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), odnosno u desetostruko razblaženi hidrosol ili sveži sok (2 cm^3) dodato je $0,1 \text{ cm}^3$ aluminijum hlorida (10 %), $0,1 \text{ cm}^3$ kalijum acetata ($1 \text{ mol}/\text{dm}^3$) i $2,8 \text{ cm}^3$ destilovane vode. Posle inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta, merena je absorbanca reakcione smeše u odnosu na destilovanu vodu na 415 nm. Snimanjem absorbanci serije standardnih rastvora rutina dobijene su kalibraciona kriva (Prilog, slika 11.3) i jednačina standardne krive:

$$\text{Absorbanca na } 415 \text{ nm} = 7,2328 c_{\text{rutin}} (\mu\text{g}/\text{cm}^3) - 0,2286, R^2 = 0,9919 \quad (6.4)$$

Ukupan sadržaj flavonoida je izražen kao mg rutina/g suvog ekstrakta, odnosno mg rutina/ cm^3 nerazblaženog hidrosola ili svežeg soka.

6.3.2. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom ekstrakata lista i mesa ploda lovor višnje

Analiza fenolnih jedinjenja u ekstraktima lista i mesa ploda lovor višnje izvršena je tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu Agilent 1100 Series i UV-DAD (Diode Array Detector) detektorom po originalnoj metodi (Veit et al., 1995). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Agilent Eclipse XDB-C18 kolona, 5 μm , 150 x 4,6 mm, 80 Å, zapremina injektiranja bila je 20 μl , a hromatogrami su snimljeni na talasnoj dužini od 350 nm. Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A - 0,15 % fosforna kiselina u smeši voda:metanol (77:23, pH=2) i B – metanol, pri protoku od 1 cm^3/min i primenom sledećeg elucionog profila: 0-3,6 min 100 % A; 3,6-24 min 80,5 % A; 24-30 min izokratski, 30-60 min. linearno 51,8 % A, 60-67,2 min 100 % B.

Fenolne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. Potvrda identifikacije i određivanje sadržaja hlorogene kiseline, apigenin-7-O-glukozida i luteolin-7-O-glukozida u ekstraktima određena je metodom eksternih standarda. Za svaki pojedinačni standard je pripremljen osnovni rastvor standarda koncentracije 1,0 mg/cm^3 , rastvaranjem u metanolu, kao i serija razblaženih rastvora koncentracija u opsegu 0,0001 – 0,200 mg/cm^3 . Konstruisana je kalibraciona kriva, za svaki standard, na osnovu dobijenih površina pikova u zavisnosti od koncentracije standarda (Prilog, slike 11.4-11.6). Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su koncentracije komponenti u uzorcima.

6.3.3. Gasno hromatografska analiza etarskog ulja listova lovor višnje

Kvalitativna i kvantitativna analiza etarskih ulja listova lovor višnje izvršena je gasno hromatografski, uz korišćenje plameno jonizujućeg (FID) i maseno spektrometrijskog detektora (MS) pri sledećim uslovima:

GC-FID: Korišćen je Hewlett Packard 5890 II Gas Chromatograph aparat sa vodonikovim plameno-jonizacionim detektorom (FID), opremljen kapilarnom kolonom sa HP 5 stacionarnom fazom (25 m x 0,32 mm, debljina filma 0,53 μm). Temperatura kolone je linearno povećavana od 40 do 280 $^{\circ}\text{C}$ (porast temperature 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), dok je temperatura injektora iznosila 250 $^{\circ}\text{C}$, a detektora 280 $^{\circ}\text{C}$. Noseći gas bio je helijum (1 cm^3/min).

GC-MS: Analiza je sprovedena na Hewlett Packard aparatu, model G1800 C, GCD System, GCD Series II, sa kolonom MS (30 m x 250 μm , debljina filma 0,25 μm), nosačem HP-5, energijom jonizacije 70 eV i opsega masa 35-400 u već opisanom režimu. Noseći gas bio je helijum (1 cm^3/min).

Rastvor etarskih ulja u apsolutnom etanolu (0,5 %, 1 μl) injektiran je u "split" odnosu (1:30), a identifikacija individualnih komponenti izvršena je uz korišćenje baze podataka Wiley sa 275.000 spektara i literature (Adams, 2001).

6.3.4. Analiza masnog ulja srca koštica ploda lovor višnje

Sastav masnog ulja srca koštica, posle prevodjenja triglicerida masnih kiselina u metil estre masnih kiselina (Kandpal i Madan, 1995), određivan je gasnom hromatografijom.

6.3.4.1. Dobijanje metil estara iz ulja srca koštica ploda lovor višnje

Masno ulje srca koštica (1 g) i rastvor natrijum metoksida u metanolu (10 cm^3 , 1 mol/dm^3) sipani su u balon (100 cm^3) i zagrevani uz refluks jedan sat na temperaturi ključanja. Nakon toga, balon sa reakcionom smešom je hlađen pod mlazom hladne vode, uz postepeno dodavanje 10 cm^3 destilovane vode u koju je prethodno dodato 3-4 kapi koncentrovane sumporne kiseline. Metil estri su ekstrahovani hloroformom ($3\times 5\text{ cm}^3$) u levku za odvajanje (donja, hloroformska faza). Prisutna voda u uzorku je uklanjana bezvodnim natrijum sulfatom.

6.3.4.2. Gasno hromatografska analiza metil estara masnog ulja srca koštica ploda lovor višnje

Metil estri masnih kiselina ulja srca koštica ploda lovor višnje su analizirani na gasnom hromatografu Agilent 6850 sa kapilarnom kolonom (DB WAX, $30\text{ m} \times 250\text{ }\mu\text{m} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$) i plameno jonizujućim detektorom. Temperaturni režimi: kolone $\rightarrow 50\text{ }^\circ\text{C}$ tokom jednog minuta, 50 do $200\text{ }^\circ\text{C}$ brzinom $25\text{ }^\circ\text{C/min}$ i 200 do $230\text{ }^\circ\text{C}$ brzinom $3\text{ }^\circ\text{C/min}$, injektora $\rightarrow 250\text{ }^\circ\text{C}$ i detektora $\rightarrow 280\text{ }^\circ\text{C}$. Protoci azota (noseći gas), vodonika i vazduha: 20 , 30 i $400\text{ cm}^3/\text{min}$. Injektirana zapremina smeše metil estara je bila $0,2\text{ }\mu\text{l}$. Azot je korišćen kao noseći gas, za razliku od originalne metode gde je korišćen helijum (David et al., 2002). Metil estri najvažnijih masnih kiselina identifikovani su upoređivanjem njihovih retencionih vremena sa retencionim vremenima standarda tih metil estara i literaturnim podacima za primenjene uslove. Važno je naglasiti da je identifikacija metil estara masnih kiselina moguća i samo na osnovu retencionih vremena (David et al., 2002).

6.4. Eksperimentalna i statistička obrada podataka

Svi eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja, a rezultati predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Obrada eksperimentalnih podataka vršena je primenom programa Origin 6.1, Excell 2003 i SigmaPlot 2000Trial. Srednje vrednosti dobijenih rezultata upoređivane su primenom Studentovog t -testa sa nivoom značajnosti od 95% ($p < 0,05$).

7. Rezultati i diskusija

7.1. Osobine biljnog materijala

Plodovi lovor višnje, *Prunus laurocerasus* L. var. *serbica* Pančić, su okrugle koštunice tamno ljubičaste boje raspoređenih u grozd (prosečni broj plodova u grozdu $14,9 \pm 2,2$), prečnika $14,2 \pm 1,1$ mm, čiji središnji deo zauzima koštica dimenzija $6,7 \times 5,7$ mm (standardna devijacija je u slučaju merenja obe dimenzije iznosila $\pm 0,50$ mm). Manje dimenzije u odnosu na plodove ubrane 1999. i 2000. (Islam, 2002) i 2001. godine (Kolayli et al., 2003) u provinciji Trabzon (Turska) (oko 20 mm) i nešto veći u odnosu dimenzije zabeležene od strane Ayaza i saradnika (1997a) (od 8 do 12 mm) potiču najverovatnije od različitih klimatskih uslova, kao i od vrste lovor višnje. Mehaničkom analizom svežih plodova određeni su prosečna masa celog ploda ($2,4 \pm 0,2$ g) i koštice ($0,5 \pm 0,1$ g), kao i maseni udeli mesa ploda, srca i opni koštica u svežim plodovima čije su srednje vrednosti date u tabeli 7.1.

Tabela 7.1 Maseni udeli mesa ploda, srca i opni koštica u svežim plodovima lovor višnje

	Meso ploda, %	Srce koštice, %	Opna koštice, %
Srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija	$78,7 \pm 0,6$	$12,9 \pm 0,1$	$8,3 \pm 0,6$

Najzastupljeniji deo ploda lovor višnje je meso ploda (pulpa ili mezokarp), dok na košticu (seme) koja se sastoji od opne (endokarp) i srca, otpada $21,3 \pm 0,6$ %. Utvrđeno je da je sadržaj vlage u mesu ploda i srcu koštica neposredno pre korišćenja u eksperimentima iznosio $77,4 \pm 3,2$ i $4,0 \pm 0,6$ %, respektivno. Sadržaj vlage u mesu ploda lovor višnje korišćene u ovom radu u skladu je sa rezultatima $77,3 \pm 0,6$ i $81,2 \pm 0,7$ objavljenim za plodove lovor višnji varijeteta Kiraz i Findik, respektivno (Alasalvar et al., 2005).

Poređenjem sa plodovima lovor višnje ubranih u Akçaabat-u (Turska) (Kolayli et al., 2003) zapaženo je da je sadržaj vlage, kao i masa koštica slična kao u slučaju plodova ubranih u Srbiji i korišćenih u ovom radu, dok je masa plodova gotovo duplo manja u poređenju sa masom plodova ubranih u provinciji Trabzon u Turskoj (Bostan, 2001; Islam, 2002) a nalazi se blizu donje granice mase plodova ubranih u Riza oblasti, takođe u Turskoj (od $2,63$ do $5,65$ g) (Islam i Vardal, 2009).

Sveži listovi su tamno zelene boje, sjajne površine, prosečne dužine $13,9 \pm 0,8$ cm i širine $5,3 \pm 0,2$ cm, sa sadržajem vlage $61,9 \pm 2,9$ %. Sadržaj vlage nalazi se u granicama prosečnog sadržaja vlage u listovima trešnje (od 58 do 75 %) i višnje (od 59 do 71 %) (Rade et al., 2008), koje takođe pripadaju rodu *Prunus*.

Sadržaj ekstraktivnih materija lista i mesa ploda lovor višnje, kao i sadržaj masnog ulja srca koštica, određen je ekstrakcijom po Soxhlet-u, sa metanolom, vodom i 2-propanolom

u slučaju lista i mesa ploda, odnosno *n*-heksanom u slučaju srca koštica, a rezultati su prikazani u tabeli 7.2.

Tabela 7.2 Prinosi ekstraktivnih materija lista, mesa ploda i masnog ulja iz srca koštica plodova lovor višnje dobijenih ekstrakcijom po Soxhlet-u

Rastvarač	Prinos ekstraktivnih materija, g/100 g svežeg biljnog materijala		
	List	Meso ploda	Srce koštica ploda
Metanol	14,7±0,5	42,8±0,7	-
Voda	13,7±0,2	37,2±0,6	-
2-Propanol	10,6±0,8	19,8±0,4	-
<i>n</i> -Heksan	-	-	41,9±0,7 ^a

Vrednosti u tabeli date su kao srednja vrednost tri merenja±standardna devijacija ^a g/100 g suvog biljnog materijala

Najveći prinos ekstraktivnih materija u slučaju lista i mesa ploda dobija se ekstrakcijom metanolom. Studentovim *t*-testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p<0,05$) u prinosima ekstraktivnih materija dobijenih ekstrakcijom različitim rastvaračima u slučaju istog biljnog materijala. Za list i meso ploda lovor višnje je karakteristično da je sadržaj ekstraktivnih materija rastvornih u polarnim rastvaračima (voda i metanol) veći u odnosu na sadržaj ekstraktivnih materija rastvornih u manje polarnom rastvaraču (2-propanol), pri čemu je ova razlika izraženija kod mesa ploda.

Poređenjem sadržaja masnog ulja srca koštica plodova lovor višnje poreklom iz Srbije i Turske (tabela 7.3), dobijenih različitim tehnikama ekstrakcije *n*-heksanom utvrđeno je da je ove vrste lovor višnje sadrže sličan udeo ulja u srcu koštica, dok je razlog velike razlike u sadržaju masnog ulja dobijenog od strane Özgül-Yücel (2005) najverovatnije nedovoljno vreme i niska temperatura ekstrakcije.

Tabela 7.3 Prinosi ulja iz srca koštica plodova lovor višnje dobijenih ekstrakcijom *n*-heksanom

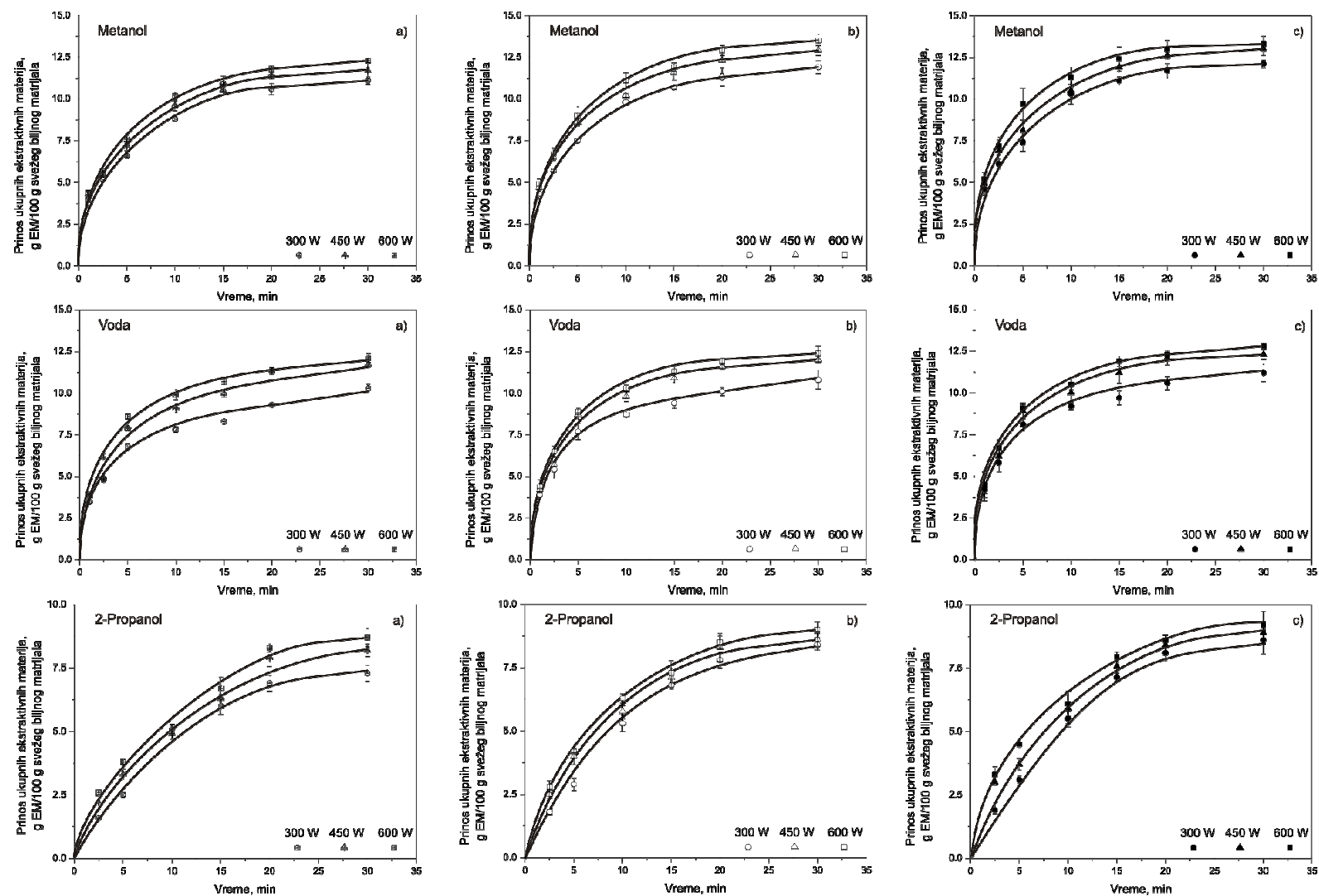
Srce koštica lovor višnje tipa	Prinos ulja, g/100 g osušenih srca koštica
var. serbica Pančić	41,9±0,7 ^a
Kiraz	38,1±0,3 ^b
Findik	41,6±0,0 ^b
- ^c	18,3 ^d

Vrednosti u tabeli date su kao srednja vrednost tri merenja±standardna devijacija ^a Ovaj rad, ekstrakcija po Soxhlet-u ^b AOCS Method Am 2-93 (Alasalvar et al., 2006) ^c plod ubran u blizini Istambula (Turska) 2003 i 2004. godine ^d sobna temperatura, 4h (Özgül-Yücel, 2005)

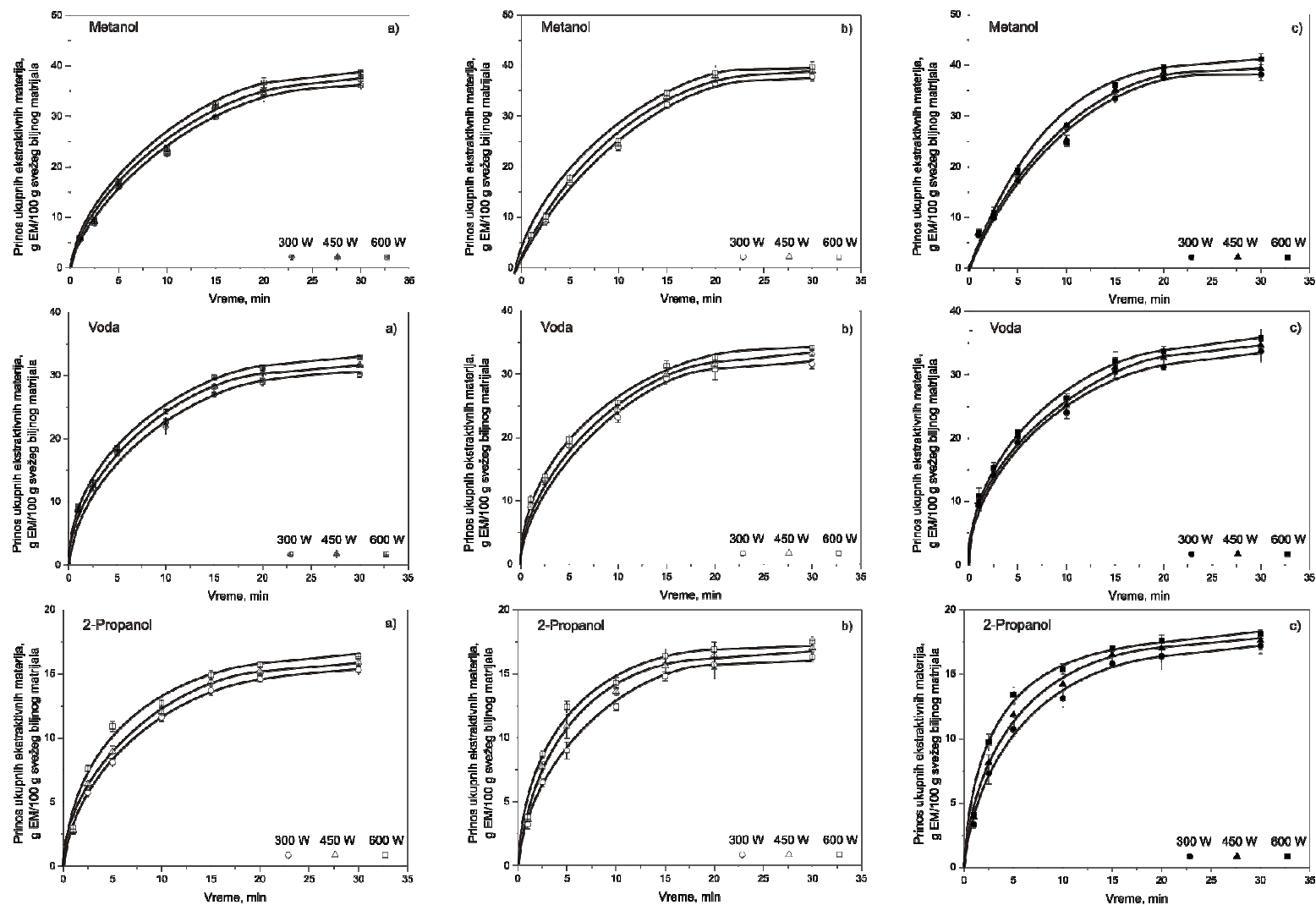
7.2. Ekstrakcija rastvaračem

7.2.1. Mehanizam mikrotalasne ekstrakcije biljnog materijala

Prinos ukupnih ekstraktivnih materija u toku mikrotalasne ekstrakcije lista i mesa ploda lovor višnje metanolom, vodom i 2-propanolom pri odnosima biljni materijal-rastvarač 1:5, 1:10 i 1:20 g/cm³ i pri različitim mikrotalasnim snagama (300, 450 i 600 W), prikazan je na slikama 7.1 i 7.2. Eksperimentalni podaci dati su u Prilogu (tabele 10.3 - 10.8).

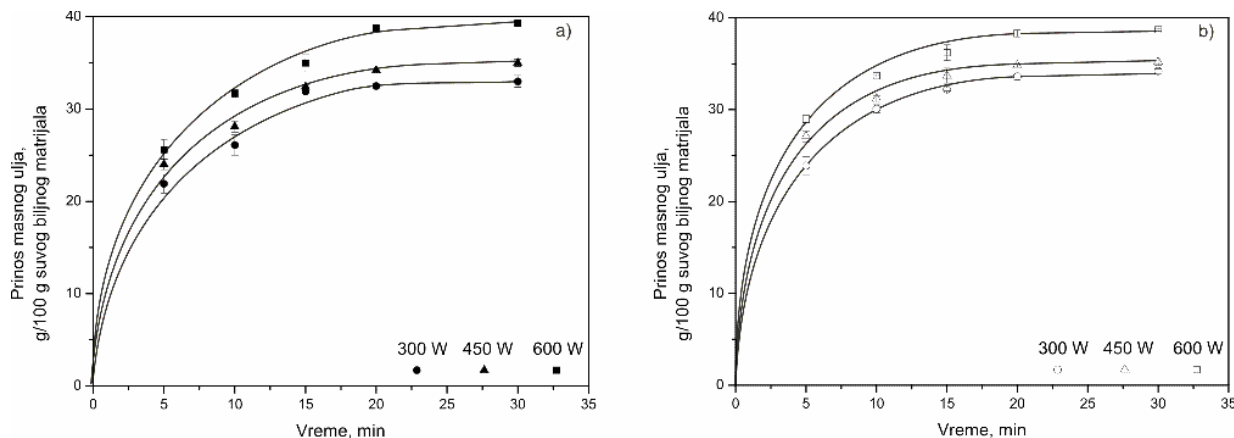


Slika 7.1 Prinos ukupnih ekstraktivnih materija u toku mikrotalasne ekstrakcije lista lovor višnje pri različitim operativnim uslovima i odnosima biljni materijal-rastvarač a) 1:5 g/cm³, b) 1:10 g/cm³ i c) 1:20 g/cm³



Slika 7.2 Prinos ukupnih ekstraktivnih materija u toku mikrotalasne ekstrakcije mesa ploda lovor višnje pri različitim operativnim uslovima i odnosima biljni materijal-rastvarač a) 1:5 g/cm³, b) 1:10 g/cm³ i c) 1:20 g/cm³

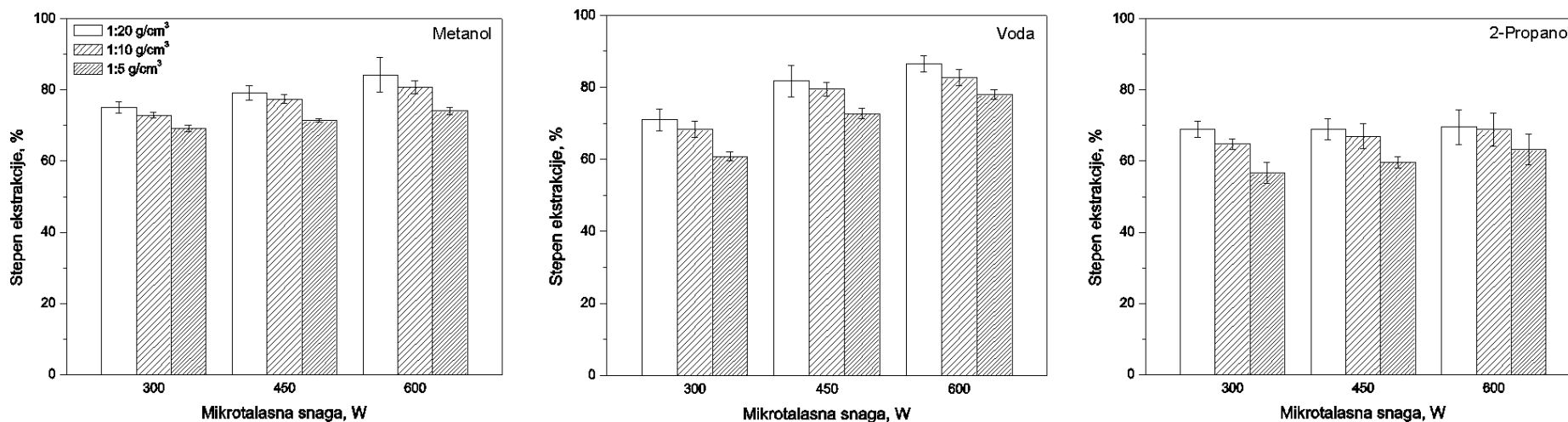
Na slici 7.3 prikazana je promena prinosa masnog ulja iz srca koštica ploda lovor višnje *n*-heksanom i sistemom *n*-heksan:voda – 9:1 pri različitim mikrotalasnim snagama (300, 450 i 600 W) i odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³ (Tabela 10.9 u Prilogu).



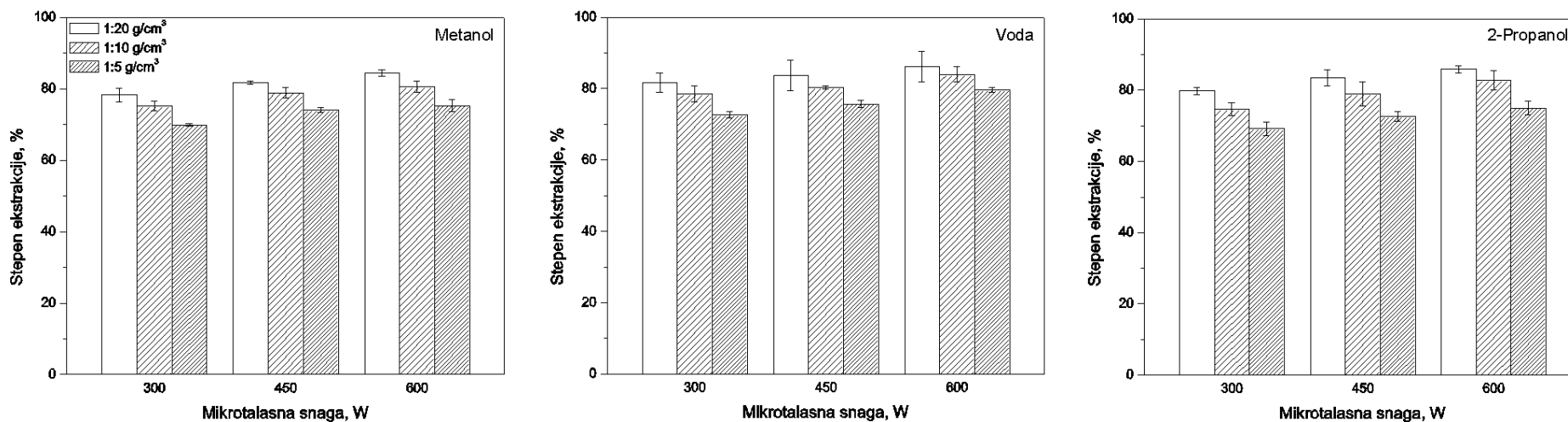
Slika 7.3 Prinos masnog ulja iz srca koštica ploda lovor višnje u toku mikrotalasne ekstrakcije
a) *n*-heksanom i b) sistemom *n*-heksan:voda – 9:1 pri različitim mikrotalasnim snagama i
odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³

Oblik zavisnosti promene prinosa ekstraktivnih materija i masnog ulja tokom mikrotalasne ekstrakcije pri različitim operativnim uslovima sličan je sa oblikom krivih za mikrotalasnu ekstrakciju mentola iz listova nane (Dai et al., 2010; Spiro i Chen, 1995), kao i ekstrakcije ulja iz presovanih plodova masline (Amarni i Kadi, 2010), anthrahinona iz korena biljne vrste *Morinda citrifolia* (Hemwimon et al., 2007), glicirizinske kiseline iz korena sladića (Pan et al., 2000), polifenolnih jedinjenja i kofeina iz zelenih listova čaja (Pan et al., 2003) i masnog ulja iz koštica plodova biljne vrste *Hylocereus undatus* (Rui et al., 2009).

Mikrotalasna ekstrakcija, nezavisno od biljnog materijala, odvija se u dve faze. U prvoj fazi, faza brze ekstrakcije (ispiranje), ekstrakcija je brz proces zbog rastvaranja ekstraktivnih materija sa površine usitnjenog biljnog materijala i u okviru ove faze postiže se prinos ekstraktivnih materija koji se vrlo malo menja sa produženjem procesa (ne više od 10 %). Trajanje ove faze zavisi od vrste biljnog materijala, rastvarača, snage mikrotalasa i raspoložive količine rastvarača. U slučaju mikrotalasne ekstrakcije lista i mesa ploda lovor višnje, bez obzira na korišćeni rastvarač, ova faza trajala je oko 15 minuta. Nezavisno od biljnog materijala, za sva tri korišćena rastvarača, stepen ekstrakcije (procentualno izražen prinos ekstraktivnih materija od prinosa ostvarenog ekstrakcijom po Soxhlet-u) u ovoj fazi nalazi se u granicama od 56,7±3,0 do 86,6±2,2 %. Njegova vrednost povećava se sa porastom mikrotalasne snage, kao i sa smanjenjem odnosa biljni materijal-rastvarač u opsegu od 1:5 do 1:20 g/cm³. Razlika u vrednostima stepena ekstrakcije izraženija je pri manjim mikrotalasnim snagama, a vrednosti se povećavaju sa povećanjem polarnosti rastvarača.

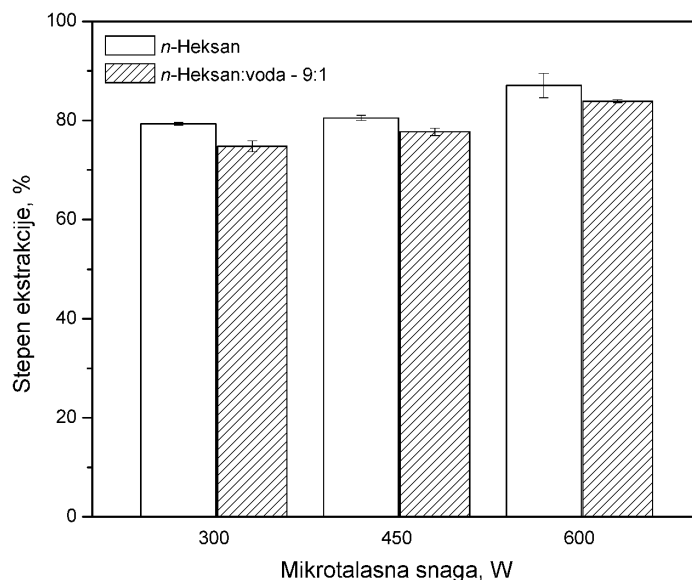


Slika 7.4 Stepen ekstrakcije ostvaren ekstrakciom lista lovor višnje pri različitim mikrotalasnim snagama i primenom različitih rastvarača



Slika 7.5 Stepen ekstrakcije ostvaren ekstrakciom mesa ploda lovor višnje pri različitim mikrotalasnim snagama i primenom različitih rastvarača

Brza faza ekstrakcije (ispiranje) pri mikrotalasnoj ekstrakciji masnog ulja iz srca koštica traje 15 minuta, odnosno 10 minuta kod ekstrakcije *n*-heksanom, odnosno sistemom *n*-heksan:voda – 9:1. Utvrđeno je da je stepen ekstrakcije veći od 50 % već nakon 5 minuta ekstrakcije u oba slučaja, ali se u početnoj fazi bolji rezultati dobijaju ekstrakcijom u prisustvu vode (slika 7.6).



Slika 7.6 Stepen ekstrakcije ostvaren ekstrakcijom pri različitim mikrotalasnim snagama *n*-heksanom i sistemom *n*-heksan:voda – 9:1

Heksan je transparentan za mikrotalase jer ne apsorbuje mikrotalasno zračenje, pa temperatura celog ekstrakcionog sistema pod dejstvom mikrotalasa raste zahvaljujući prisustvu određenog procenta vlage u biljnom materijalu (Degen et al., 1999; Pare et al., 1991) ili dodatku veoma polarnog rastvarača, u ovom slučaju vode. Sredina koja je transparentna za mikrotalase definiše se kao sredina niskih vrednosti dielektrične konstante (heksan – 1,9; ugljentetrahlorid – 2,2; tečni CO₂ – 1,6 na 0 °C i 50 atm.) (Pare et al., 1991). Veoma je često dodavanje malih količina vode (10 %) rastvaračima koji ne apsorbuju mikrotalase (heksan, ksilen ili toluen) u cilju povećanja brzine zagrevanja i korekcije polarnosti ekstrakcionog sistema (Eskilsson i Björklund, 2000). Toplota generisana od strane biljnog materijala ili dodatog veoma polarnog rastvarača prenosi se na rastvarač transparentan za mikrotalase. Ovaj proces se ubrzava intenzivnim mešanjem u sistemu za ekstrakciju (Carro et al., 1997).

Nakon završetka faze ispiranja, nastupa spora faza procesa ekstrakcije u kojoj prinos ekstraktivnih materija, odnosno masnog ulja, blago raste sa vremenom na račun difuzije ekstraktivnih materija, odnosno ulja iz unutrašnjosti nerazorenih ćelija biljnog materijala, do i kroz njihovu spoljnu površinu u masu rastvora. Produžetkom ove faze postigao bi se veći stepen ekstrakcije ali na račun smanjenja ekonomičnosti celog procesa. Postojanje brze (ispiranje) i spore faze mikrotalasne ekstrakcije zabeleženo je u slučaju ekstrakcije ulja iz plodova masline (Amarni i Kadi, 2010).

Imajući u vidu prinos ekstraktivnih materija i masnog ulja, odnosno stepene ekstrakcije, optimalno vreme ekstrakcije u slučaju sva tri biljna materijala i nezavisno od drugih operativnih uslova, je oko 15 minuta pri čemu se postiže koncentracija ekstrahovanih materija u tečnim ekstraktima koja se praktično ne menja sa produženjem procesa.

7.2.1.1. Uticaj operativnih uslova na prinos ekstraktivnih materija

Uticaj snage mikrotalasa. Nezavisno od vrste biljnog materijala, rastvarača i odnosa biljni materijal-rastvarač, najveći prinos ekstraktivnih materija je postignut pri najvećoj snazi mikrotalasa (600 W), a najmanji pri najmanjoj snazi (300 W). Niži prinos ekstraktivnih materija pri nižoj snazi mikrotalasa je, verovatno, uzrokovano sporijim zagrevanjem ekstrakcionog sistema i nedovoljnim razaranjima ćelijskih zidova biljnog materijala. Najizraženiji uticaj snage mikrotalasa je u slučaju ekstrakcije listova lovor višnje vodom, gde sa porastom snage od 300 na 600 W prinos raste do 30 %, dok se u ostalim slučajevima, nevezano za biljni materijal, rastvarač i odnos biljni materijal-rastvarač, prinos se povećava za oko 10 %. Dobijeni rezultati su u skladu sa objavljenim rezultatima da se veći prinosi dobijaju pri većim mikrotalasnim snagama, sa napomenom da treba izbegavati dugotrajno izlaganje mikrotalasima ekstremno visoke snage jer može dovesti do oštećenja i curenja teflonskih ekstraktora. Ovo je razlog što je za optimalnu mikrotalasnu snagu izabran nivo od 66 % nominalne snage mikrotalasnog ekstraktora pri ekstrakciji organskih zagađivača, ugljovodonika i pesticida iz morskih sedimenata (Pastor et al., 1997). Pri mikrotalasnoj ekstrakciji askorbinske kiseline iz plodova guave, koristeći različite nivoe snage mikrotalasa (200, 400 i 600 W), nezavisno od ostalih ekstrakcionih uslova, najveća ekstrakciona efikasnost zabeležena je pri ekstrakciji na 400 W u trajanju od 10 minuta (Yu et al., 2009).

Uticaj rastvarača. Najveći prinos ekstraktivnih materija, u slučaju ekstrakcije listova i mesa plodova lovor višnje, dobija se metanolom, a najniži 2-propanolom. Generalno, polarniji rastvarači (metanol i voda) daju bolji prinos ekstraktivnih materija, što ukazuje da su ekstrahovani biljni materijali bogatiji supstancama rastvorljivim u polarnim rastvaračima. Manji prinos ekstraktivnih materija dobijen ekstrakcijom vodom u odnosu na prinos dobijen ekstrakcijom metanolom može se objasniti većom vrednošću za $\tan \delta$ za metanol (0,64) nego za vodu (0,16) od koje direktno zavisi apsorpcija mikrotalasa (Li et al., 2004). Metanol daje za oko 10 % veće prinose ekstraktivnih materija od vode u slučaju oba biljna materijala, dok oba rastvarača daju u proseku za oko 50 % veće prinose u odnosu na 2-propanol u slučaju lista i skoro duplo veće prinose u slučaju ekstrakcije mesa ploda. Sistemom *n*-heksan:voda dobijaju se neznatno veći prinosi ulja nego ekstrakcijom čistim rastvaračem. Studentovim *t*-testom pokazano je i da postoji statistički značajna razlika između ovih vrednosti ($p < 0,05$). Nakon 15 minuta ekstrakcije, pri većim mikrotalasnim snagama ovaj porast je oko 3 %, a ekstrakcijom na 300 W dodatak vode ekstrakcionom sistemu povećava prinos tek za oko 1 %.

Uticaj odnosa biljni materijal-rastvarač. Generalno, nezavisno od drugih uslova ekstrakcije, prinos ekstraktivnih materija se povećava sa smanjenjem odnosa biljni materijal-rastvarač u opsegu od 1:5 do 1:20 g/cm³. Smanjenjem odnosa biljni materijal-rastvarač od 1:5 na 1:20 g/cm³, prinos

ekstraktivnih materija iz lista i mesa ploda lovor višnje, povećava se u proseku za oko 12 %, odnosno 15 %, respektivno. Uticaj odnosa biljni materijal-rastvarač je značajniji kada se kao rastvarač koristi 2-propanol nego polarniji rastvarači. Zbog veće ekonomičnosti ekstrakcije pri manjem utrošku rastvarača i male razlike u prinosima za četiri puta veće količine upotrebljenog rastvarača, za optimalni odnos biljni materijal-rastvarač usvojen je odnos 1:5 g/cm³.

Pozitivan efekat povećanja količine raspoloživog rastvarača na prinos ekstraktivnih materija tokom mikrotalasne ekstrakcije u ovom radu u skladu je sa ranije objavljenim rezultatima (Hao et al., 2002; Spigno i de Faveri, 2009; Xiao et al., 2008). Ako se zapremina ekstrakcionog sistema održava konstantnom, pri ostalim nepromenjenim uslovima i temperatura sistema će biti skoro konstantna. Međutim, ako je masa biljnog materijala konstantna a zapremina rastvarača se povećava u cilju povećanja odnosa biljni materijal-rastvarač onda temperatura sistema neće biti konstantna zbog karakteristika mikrotalasnog zagrevanja, pri čemu je brzina grejanja određena zapreminom sistema, sposobnošću apsorpcije i dielektričnim svojstvima sistema (Spigno i Faveri, 2009).

Uticaj vrste biljnog materijala. Bez obzira na operativne uslove, daleko više ekstraktivnih materija može se izolovati iz mesa plodova nego iz listova lovor višnje. Dielektrične osobine, sadržaj vlage i fizička struktura biljnog materijala utiču na mikrotalasne osobine ekstrakcionih sistema, a samim tim i na prinos ukupnih ekstraktivnih materija. Chen i Spiro (1994) izmerili su vrednosti dielektrične konstante, faktora gubitaka, tangens gubitaka i dubinu penetracije mikrotalasa za listove nane i ruzmarina i utvrdili da listovi nane bolje apsorbuju mikrotalase što se poklapa sa većim sadržajem vlage u ovom biljnom materijalu.

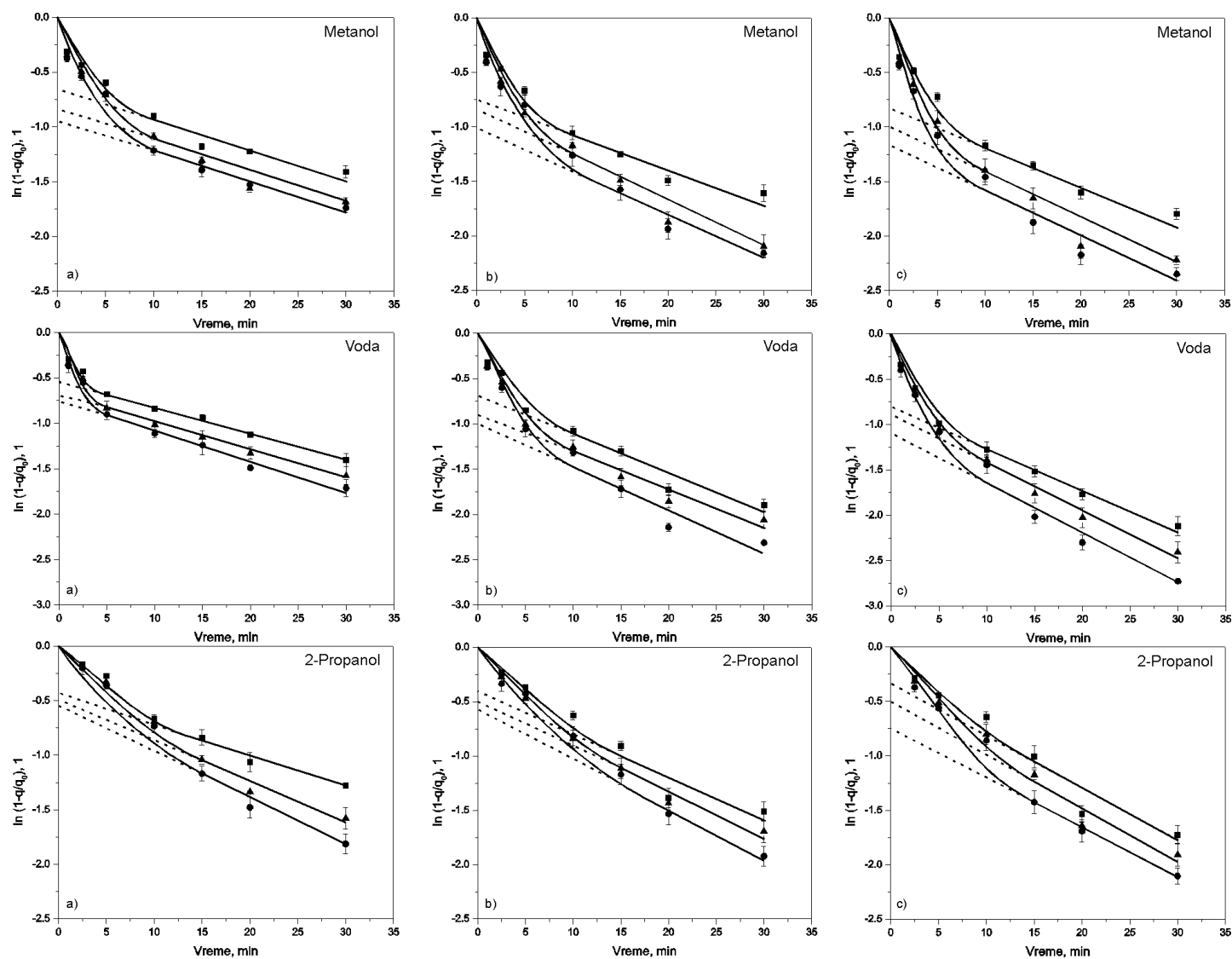
Na osnovu ostvarenog prinosa, ali vodeći računa o ekonomičnosti procesa, odabrani su operativni uslovi mikrotalasne ekstrakcije za dalja istraživanja, i to: za ekstrakciju ekstraktivnih materija lista i mesa ploda lovor višnje metanol i odnos 1:5 g/cm³, a za masna ulja iz srca koštica *n*-heksan pri odnosu 1:10 g/cm³. Ostvareni prinosi ulja mikrotalasnom ekstrakcijom srca koštica lovor višnje ukazuju na to da je sistem *n*-heksan:voda pogodniji za ekstrakciju, međutim za potrebe poređenja sa ostalim tehnikama ekstrakcije dodavanje vode pri ekstrakciji hidrofobnog ulja nije bilo opravdano.

7.2.2. Kinetika mikrotalasne ekstrakcije

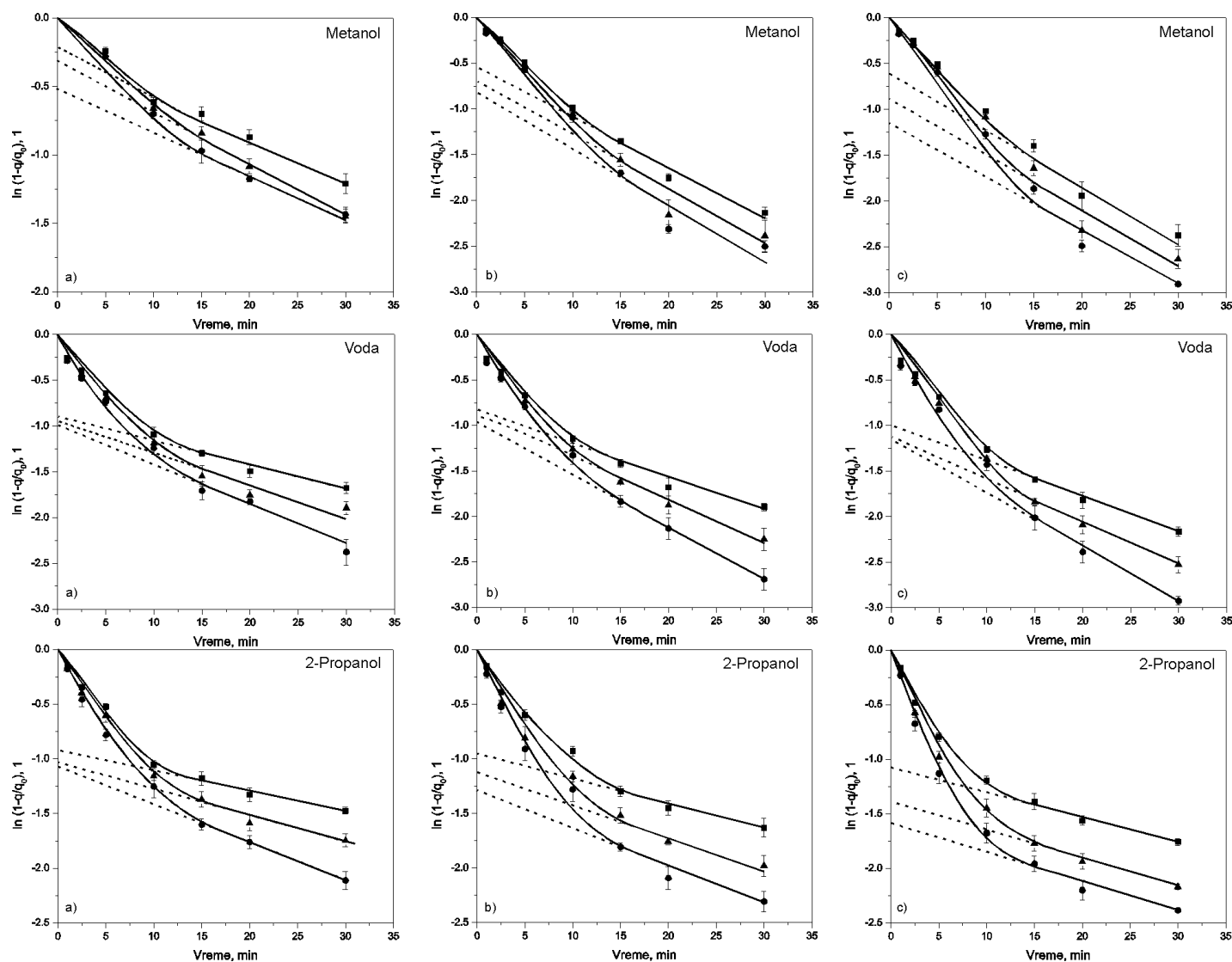
Za modelovanje procesa mikrotalasne ekstrakcije ekstraktivnih materija iz listova i mesa ploda kao i ulja iz srca koštica lovor višnje korišćena su tri dvoparametarska modela: model zasnovan na teoriji nestacionarne difuzije kroz čvrst materijal, model zasnovan na teoriji filma i hiperbolni model.

7.2.2.1. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji u biljnoj sirovini

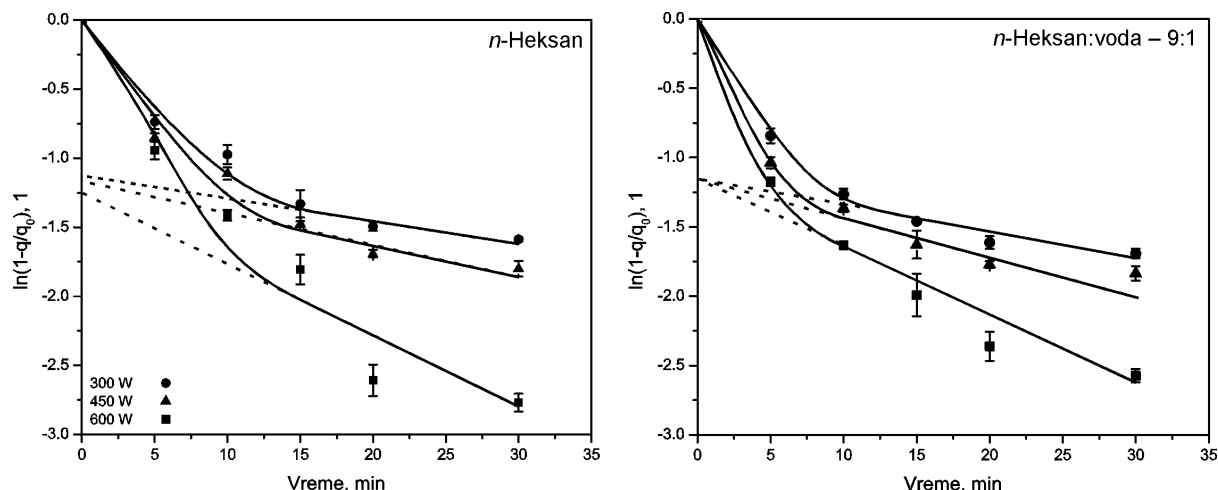
Za izračunavanje parametara modela zasnovanog na teoriji nestacionarne difuzije kroz čvrst materijal korišćeni su samo eksperimentalni podaci iz perioda spore ekstrakcije, nakon 15-og minuta ekstrakcije, a izračunavanje je vršeno pomoću metode linearne regresije (slike 7.7 i 7.8 i 7.9).



Slika 7.7 Linearizovan oblik kinetičke jednačine modela baziranog na teoriji nestacionarne difuzije mikrotalasne ekstrakcije lista lovor višnje pri mikrotalasnoj snazi a) 300 i b) 450 i c) 600 W i različitim odnosima biljni materijal-rastvarač (1:20 g/cm³ - ●, 1:10 g/cm³ - ▲, 1:5 g/cm³ - ■)



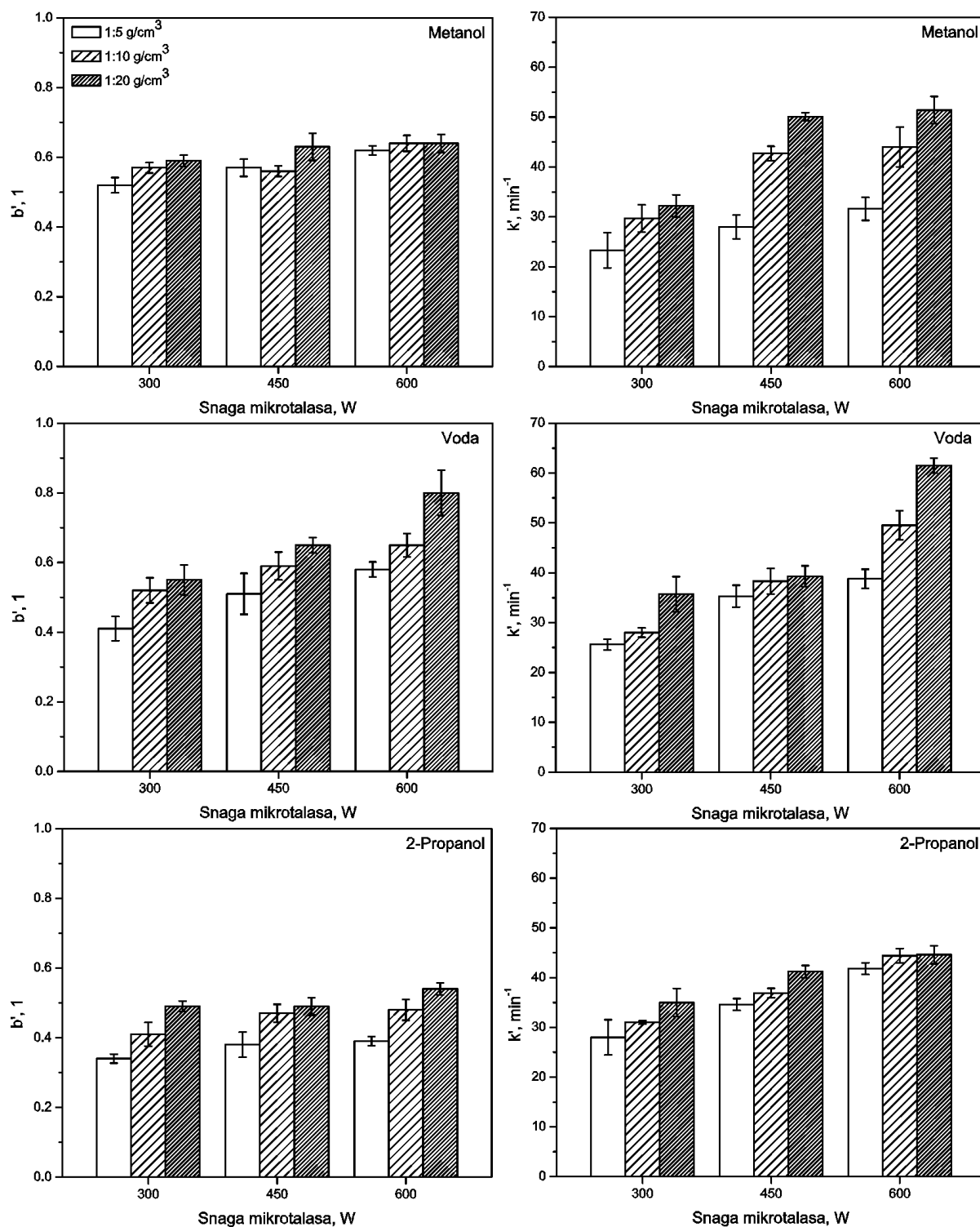
Slika 7.8 Linearizovan oblik kinetičke jednačine modela baziranog na teoriji nestacionarne difuzije mikrotalasne ekstrakcije mesa ploda lovor višnje pri mikrotalasnoj snazi a) 300 i b) 450 i c) 600 W i različitim odnosima biljni materijal-rastvarač (1:20 g/cm³ - ●, 1:10 g/cm³ - ▲, 1:5 g/cm³ - ■)



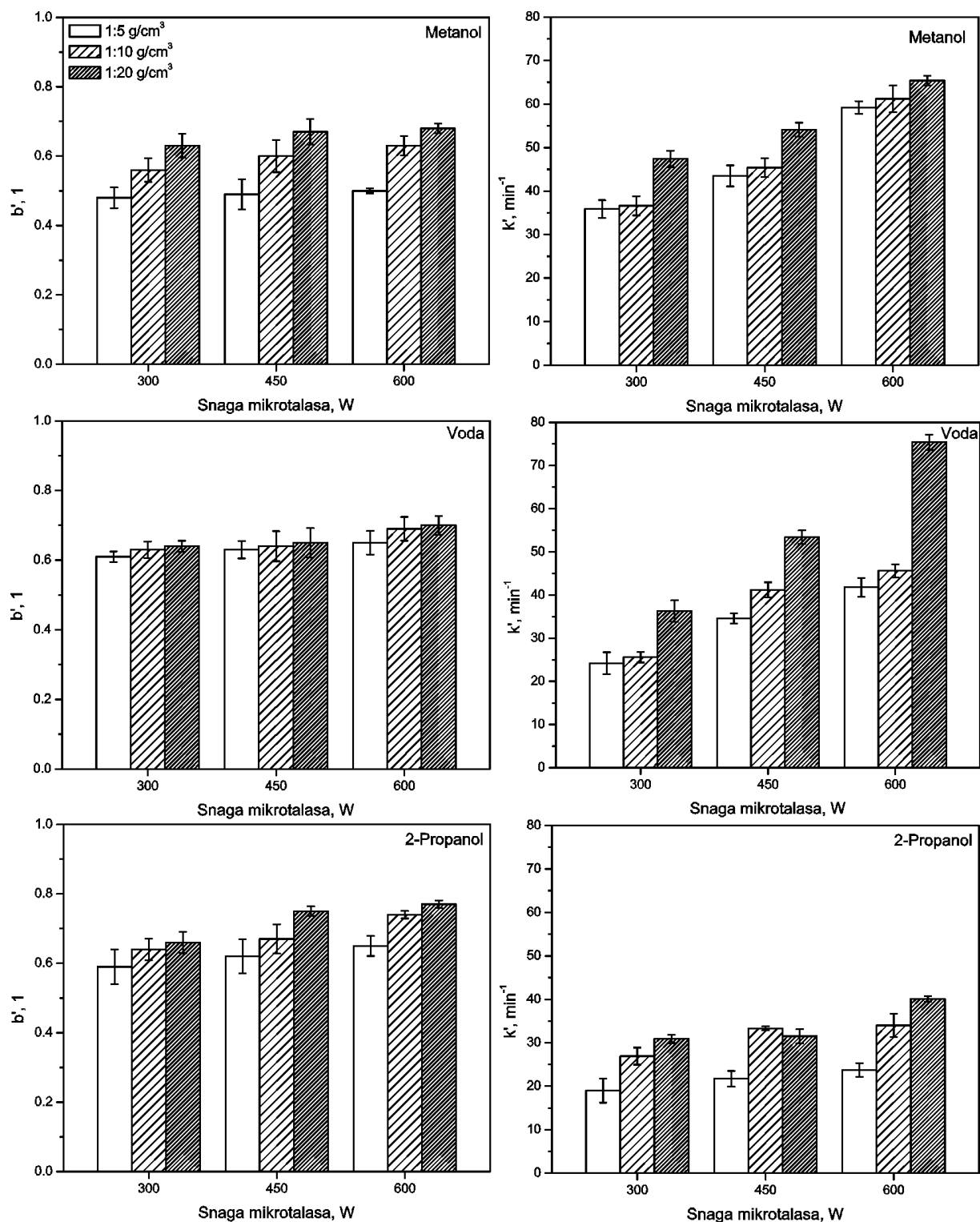
Slika 7.9 Linearizovan oblik kinetičke jednačine modela zasnovanog na nestacionarnoj difuziji mikrotalasne ekstrakcije srca koštica lovor višnje pri različitim mikrotalasnim snagama i odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³

Koeficijent linearne korelacije je bio veći od 0,94 u slučaju listova, mesa ploda i srca koštica lovor višnje. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji pokazuje dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima u periodu ekstrakcije od 15-og minuta u slučaju sva tri biljna materijala i sva tri korišćena rastvarača, sem u slučaju ekstrakcije masnog ulja iz srca koštica lovor višnje sistemom *n*-heksan:voda - 9:1 gde se dobro „fitovanje“ eksperimentalnih podataka zapaža već od 10-og minuta ekstrakcije. Kinetički parametri modela zasnovanog na nestacionarnoj difuziji mikrotalasne ekstrakcije ekstraktivnih materija iz listova, mesa ploda i ulja iz srca koštica lovor višnje zavise od mikrotalasne snage, vrste rastvarača, odnosa biljni materijal-rastvarač i vrste biljnog materijala (slike 7.10, 7.11 i 7.12). Vrednosti parametara date su u Prilogu (tabele 10.10 – 10.16).

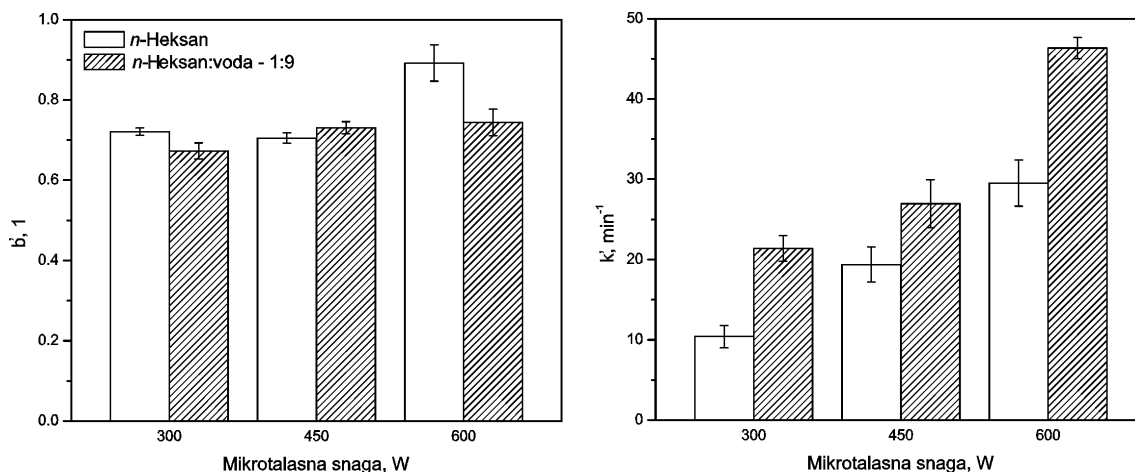
Vrednost koeficijenta ispiranja povećava se i do 95 % sa porastom snage od 300 do 600 W. Veće vrednosti mikrotalasne snage dovode do bržeg rasta temperature sistema i povećanja rastvorljivosti ekstraktivnih materija i masnih ulja u rastvaračima. Najizraženiji uticaj promene snage na koeficijent ispiranja zapaža se u slučaju lista, a najmanji u slučaju mesa ploda. Koeficijenti ispiranja u slučaju oba korišćena rastvarača pri mikrotalasnoj ekstrakciji srca koštica lovor višnje sa porastom snage od 300 do 600 W rastu u proseku za oko 20 %. Uticaj promene mikrotalasne snage na koeficijent ispiranja zavisi od tipa rastvarača, ali i vrste biljnog materijala. Tako se u slučaju ekstrakcije lista najveći koeficijenti dobijaju pri ekstrakciji metanolom, sem u slučaju većih odnosa biljni materijal-rastvarač i pri većim snagama (600 W), gde je koeficijent ispiranja veći za vodu (oko 2 do 20 %). Kod ekstrakcije mesa ploda vrednost koeficijenta ispiranja opada u nizu 2-propanol → voda → metanol.



Slika 7.10 Zavisnost kinetičkih parametara modela nestacionarne difuzije od snage mikrotalasa i odnosa biljni materijal-rastvarač za mikrotalasnu ekstrakciju ekstraktivnih materija iz lista lovor višnje korišćenjem različitih rastvarača



Slika 7.11 Zavisnost kinetičkih parametara modela nestacionarne difuzije od snage mikrotalasa i odnosa biljni materijal-rastvarač za mikrotalasnu ekstrakciju ekstraktivnih materija iz mesa ploda lovor višnje korišćenjem različitih rastvarača

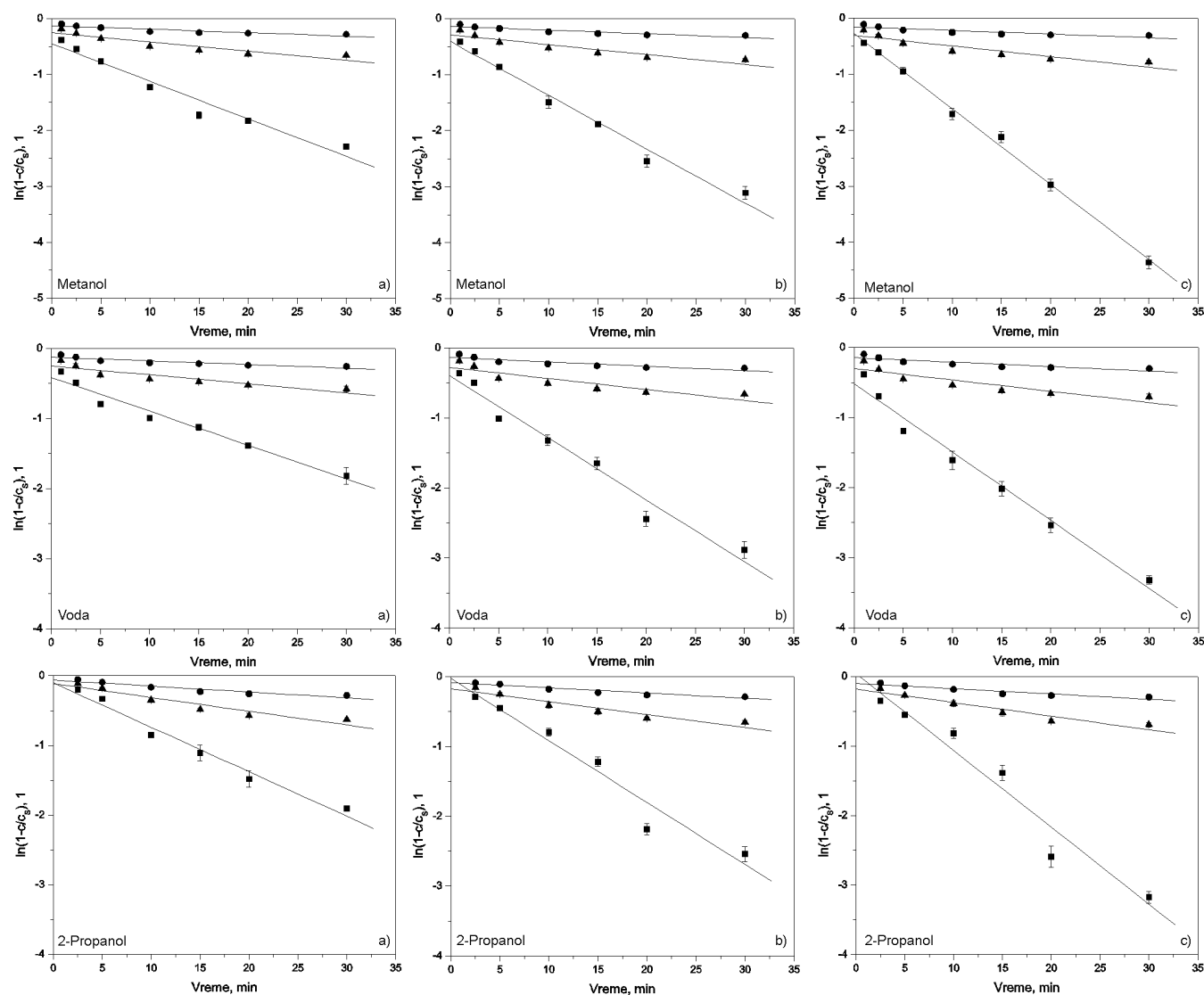


Slika 7.12 Zavisnost kinetičkih parametara modela nestacionarne difuzije od snage mikrotalasa pri odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³ za mikrotalasnu ekstrakciju masnog ulja iz srca koštica lovor višnje

Generalno, sa smanjenjem odnosa biljni materijal-rastvarač od 1:5 do 1:20 g/cm³, povećava se vrednost koeficijenta ispiranja nezavisno od ostalih uslova, verovatno kao rezultat povećanja raspoložive zapremine rastvarača po jedinici mase biljnog materijala i porasta pogonske sile prenosa mase od površine čestica biljnog materijala u masu tečnog ekstrakta. U slučaju ekstrakcije srca koštica lovor višnje sistemom n -heksan:voda dobija se koeficijent ispiranja veći nego u slučaju ekstrakcije čistim rastvaračem. Pri mikrotalasnoj snazi od 600 W koeficijent ispiranja je veći (oko 5 %) u slučaju čistog rastvarača, jer se pri većim snagama vlaga prisutna u biljnom materijalu ($4,0 \pm 0,6$ %) veoma brzo zagreva i prenosi toplotu na čitav sistem, zbog čega se povećava rastvorljivost ulja i smanjuje viskoznost rastvarača. U slučaju ekstrakcije masnog ulja iz srca koštica lovor višnje porast mikrotalasne snage ima izraženiji uticaj na koeficijent spore ekstrakcije pri ekstrakciji čistim rastvaračem nego pri ekstrakciji sistemom rastvarač:voda, u prvom slučaju koeficijet raste tri, a u drugom oko dva puta. Dodatak vode pri ekstrakciji na višim snagama, kao i u slučaju koeficijenta ispiranja, daje manji koeficijent spore ekstrakcije za oko 17 %. Manji koeficijent spore difuzije verovatno potiče od smanjene rastvorljivosti hidrofobnog ulja u sistemu koji sadrži vodu u odnosu na čist n -heksan. Najizraženiji uticaj porasta snage na koeficijent spore ekstrakcije, u slučaju ekstrakcije lista i mesa ploda lovor višnje, zapažen je u slučaju vode, a najmanji u slučaju ekstrakcije 2-propanolom. Sa smanjenjem odnosa biljni materijal-rastvarač od 1:5 do 1:20 g/cm³, povećava se vrednost koeficijenta spore ekstrakcije, pri čemu je ovaj porast izraženiji pri većim snagama mikrotalasa.

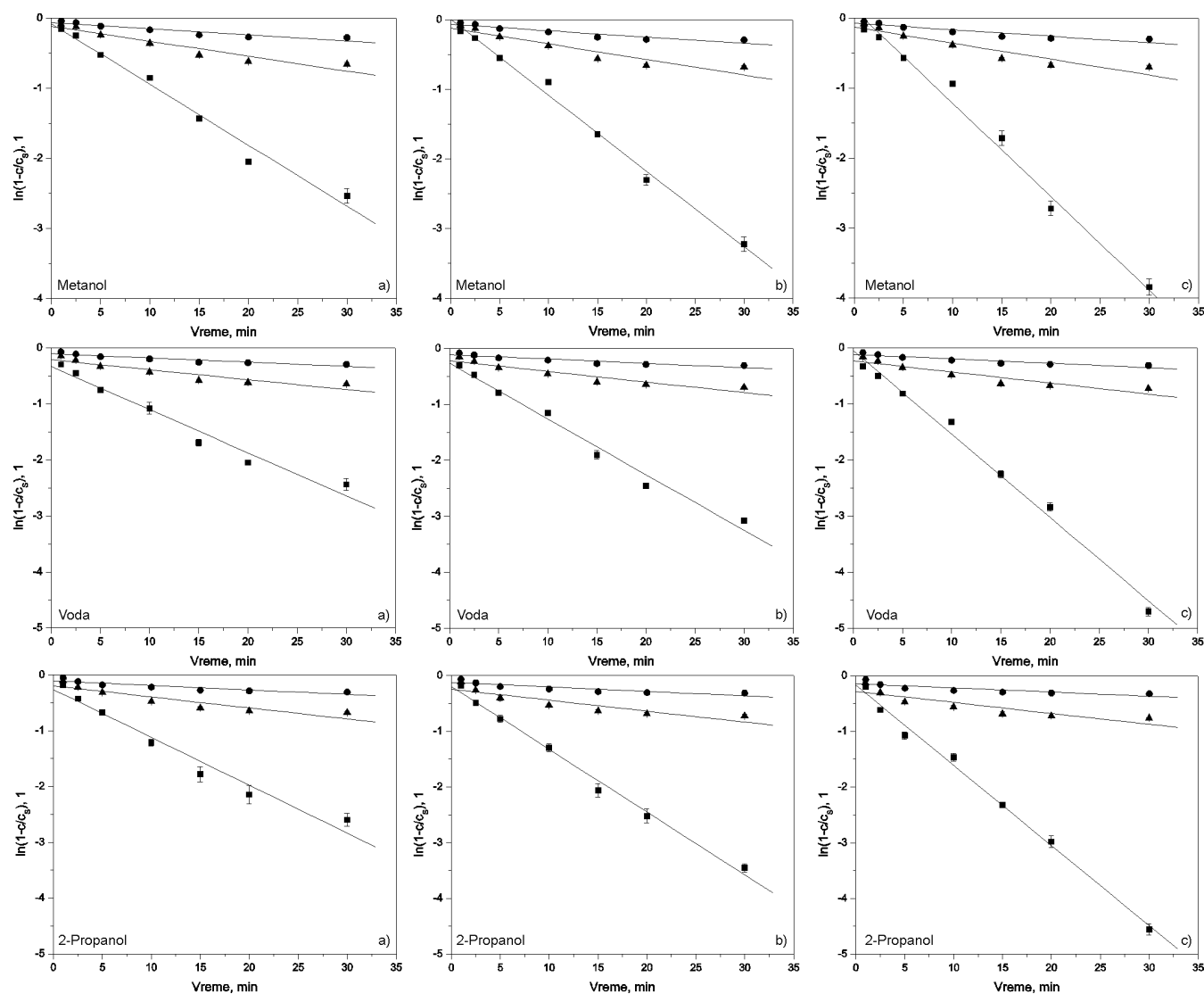
7.2.2.2. Model zasnovan na teoriji filma

Za izračunavanje parametara modela zasnovanog na teoriji filma pomoću metode linearne regresije korišćeni su eksperimentalni podaci iz celokupnog perioda ekstrakcije (slike 7.13 - 7.15).

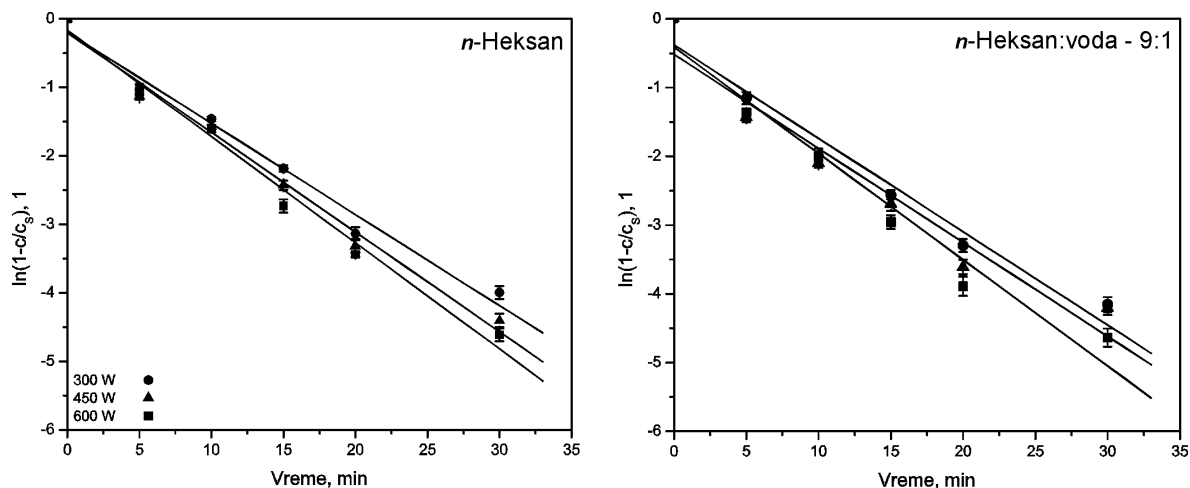


Slika 7.13 Linearizovan oblik kinetičke jednačine modela baziranog na teoriji filma mikrotalasne ekstrakcije lista lovor višnje pri mikrotalasnoj snazi

a) 300 i b) 450 i c) 600 W i različitim odnosima biljni materijal-rastvarač (1:20 g/cm³ - ●, 1:10 g/cm³ - ▲, 1:5 g/cm³ - ■)



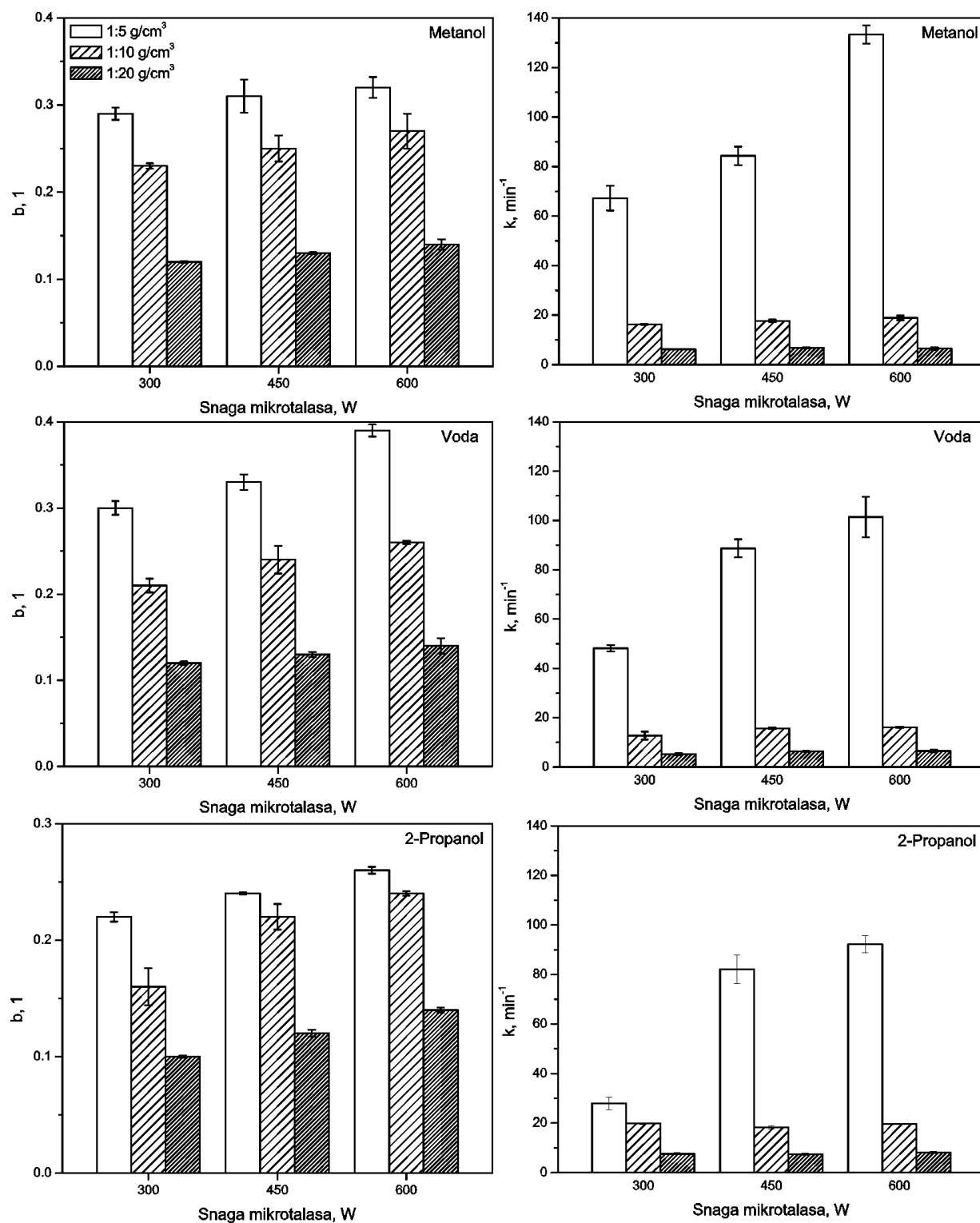
Slika 7.14 Linearizovan oblik kinetičke jednačine modela baziranog na teoriji filma mikrotalasne ekstrakcije mesa ploda lovra višnje pri mikrotalasnoj snazi a) 300 i b) 450 i c) 600 W i različitim odnosima biljni materijal-rastvarač (1:20 g/cm³ - ●, 1:10 g/cm³ - ▲, 1:5 g/cm³ - ■)



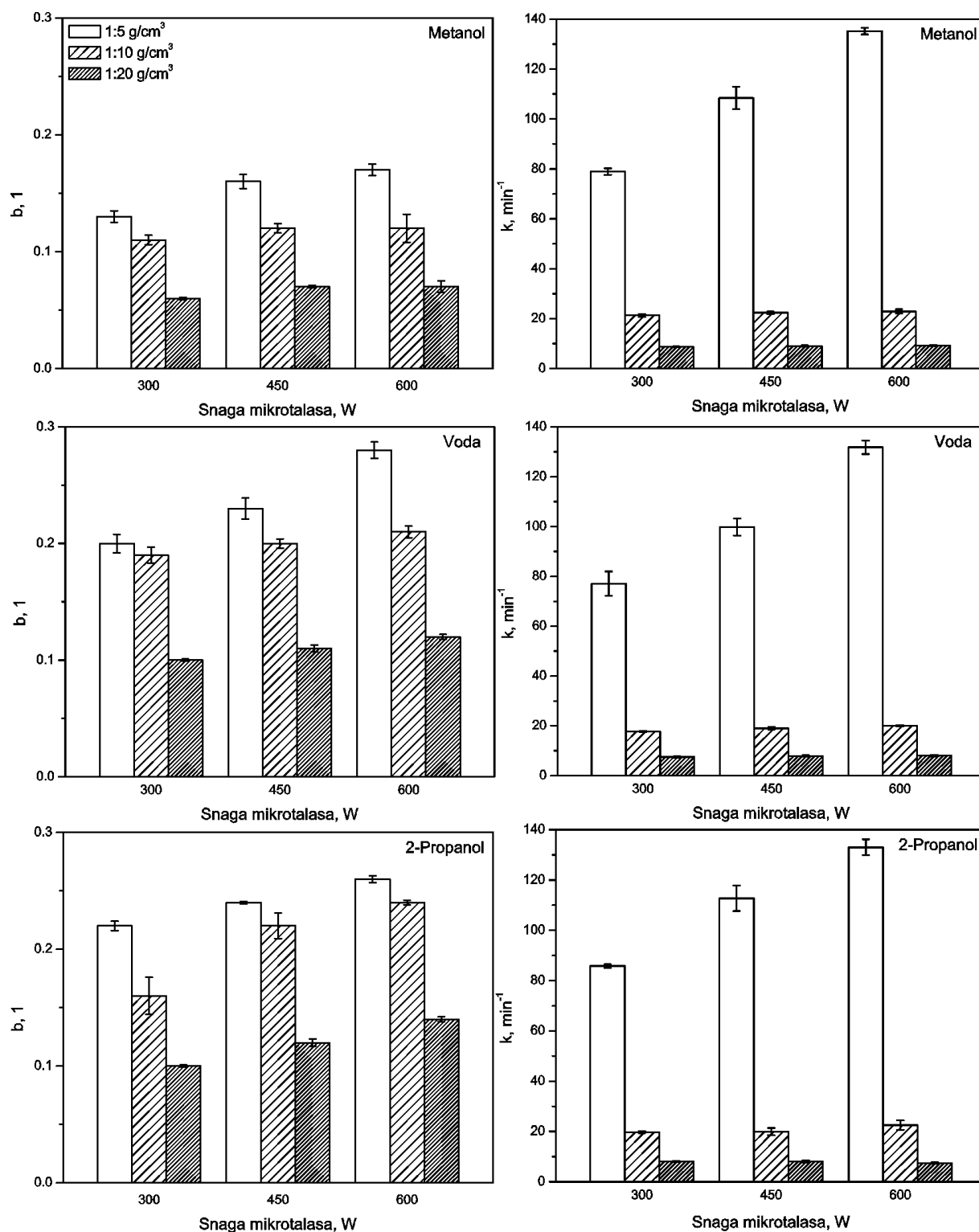
Slika 7.15 Linearizovan oblik kinetičke jednačine modela zasnovanog na teoriji filma mikrotalasne ekstrakcije srca koštica lovor višnje pri različitim mikrotalasnim snagama i odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³

Model zasnovan na teoriji filma pokazuje dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima u toku celog perioda ekstrakcije u slučaju sva tri biljna materijala i sva tri korišćena rastvarača, sa koeficijentom linearne korelacije većim od 0,97. Utvrđeno je da kinetički parametri ovog modela zavise od mikrotalasne snage, vrste rastvarača, odnosa biljni materijal-rastvarač i vrste biljnog materijala (slike 7.16 - 7.18), a vrednosti parametara dati su u Prilogu (tabele 10.17 – 10.23).

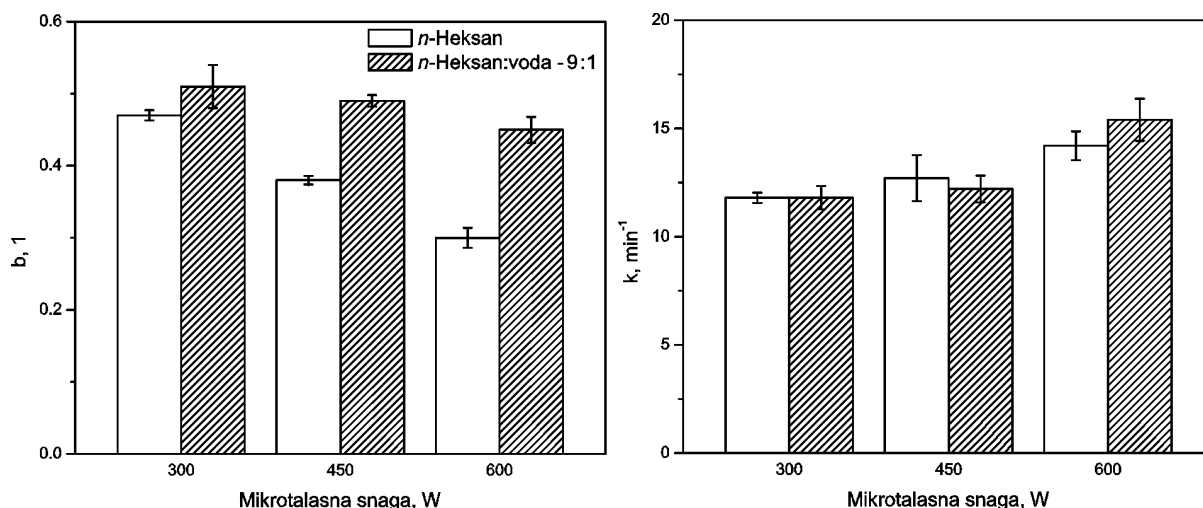
Vrednost koeficijenta ispiranja po modelu zasnovanom na teoriji filma, u slučaju ekstrakcije lista i mesa ploda lovor višnje, povećava se sa porastom snage od 300 do 600 W. Efekat porasta snage na vrednost koeficijenta ispiranja izraženiji su kod polarnijih rastvarača, u slučaju ekstrakcije lista vodom vrednost koeficijenta veća je kod većih odnosa biljni material-rastvarač i do 100 %. Za razliku od lista i mesa ploda, kod ekstrakcije srca koštica zapaža se smanjenje vrednosti koeficijenta ispiranja sa porastom snage i to u slučaju oba korišćena rastvarača. Uticaj promene snage na vrednosti koeficijenta ispiranja najviše zavisi od vrste i strukture biljnog materijala, odnosno najverovatnije od sadržaja vlage u biljnom materijalu. Sadržaj vlage u mesu ploda je veći za oko 20 %, odnosno za oko dvadeset puta u odnosu na sadržaj vlage u listu i srcu koštica, respektivno. U proseku, dva puta manje vrednosti koeficijenta ispiranja dobijaju se ekstrakcijom 2-propanolom, u odnosu na vrednosti dobijene za ekstrakciju lista lovor višnje metanolom i vodom. Pokazano je da dodatak etanola heksanu (10 mol%) desetostruko povećava sposobnost apsorpcije mikrotalasa novonastalog ekstrakcionog sistema (Chen i Spiro, 1994). Dodatak vode heksanu, u ovom radu, pozitivno utiče na vrednost koeficijenta ispiranja kod ekstrakcije masnih ulja, koja raste sa porastom polarnosti rastvarača. Odstupanje od ovog pravila u slučaju ekstrakcije mesa ploda lovor višnje, gde su najveće vrednosti koeficijenta kod ekstrakcije vodom a najmanje kod ekstrakcije metanolom, verovatno potiče od velikog sadržaja vode u biljnom materijalu (oko 77 %).



Slika 7.16 Zavisnost kinetičkih parametara modela zasnovanog na teoriji filma od snage mikrotalasa i odnosa biljni materijal-rastvarač za mikrotalasnu ekstrakciju ekstraktivnih materija iz lista lovor višnje korišćenjem različitih rastvarača



Slika 7.17 Zavisnost kinetičkih parametara modela zasnovanog na teoriji filma od snage mikrotalasa i odnosa biljni materijal-rastvarač za mikrotalasnu ekstrakciju ekstraktivnih materija iz mesa ploda lovor višnje korišćenjem različitih rastvarača

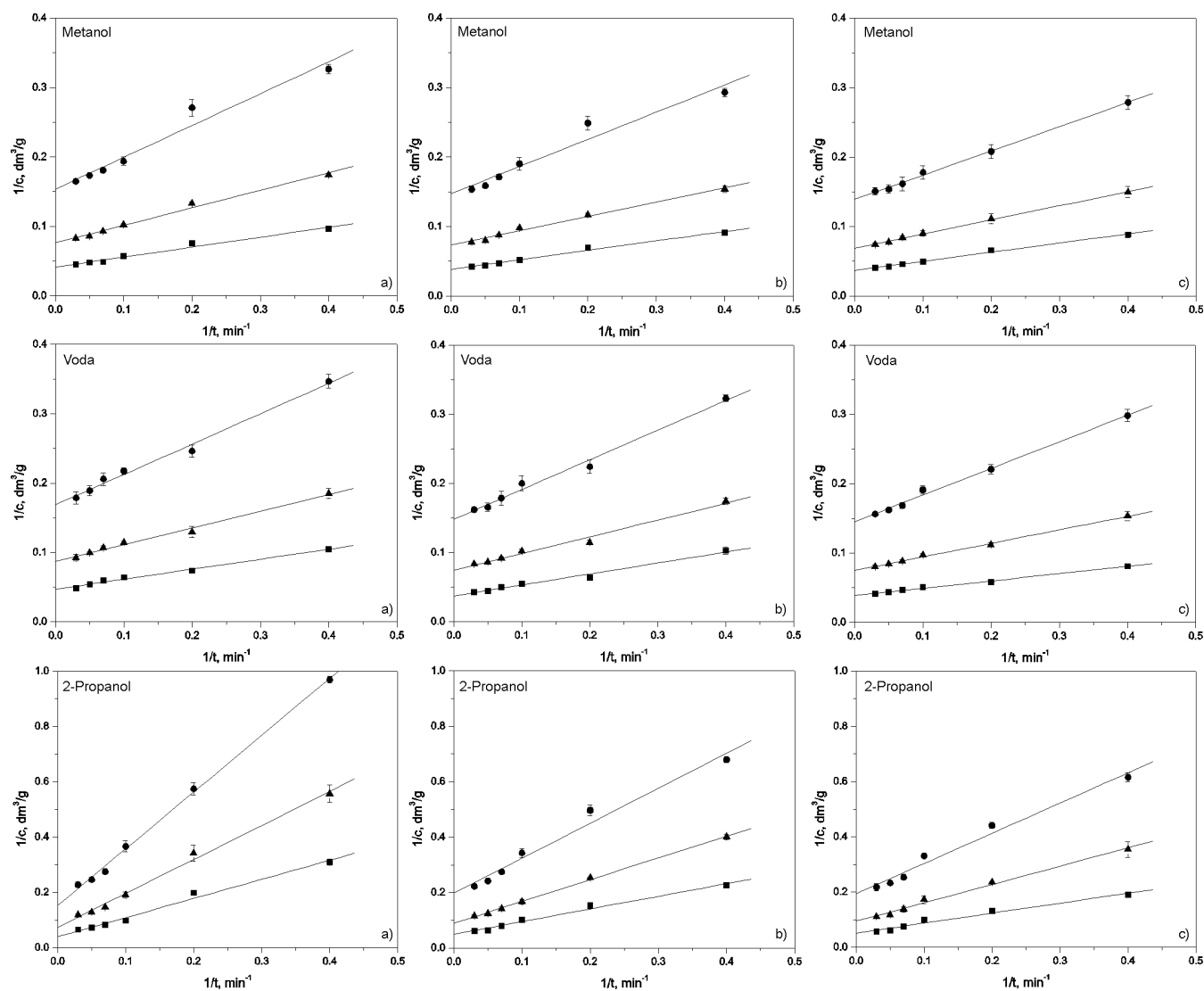


Slika 7.18 Zavisnost kinetičkih parametara modela zasnovanog na teoriji filma od snage mikrotalasa pri odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³ za mikrotalasnu ekstrakciju masnog ulja iz srca koštica lovor višnje

Sa smanjenjem odnosa biljni materijal-rastvarač od 1:5 do 1:20 g/cm³ kod mikrotalasne ekstrakcije lista i mesa ploda lovor višnje smanjuje se vrednost koeficijenta ispiranja i spore ekstrakcije nezavisno od ostalih uslova. Vrednost koeficijenta spore ekstrakcije po modelu zasnovanom na teoriji filma, u slučaju sva tri biljna materijala (list, meso ploda i srce koštica), povećava se sa porastom snage od 300 do 600 W. Veće vrednosti mikrotalasne snage dovode do bržeg rasta temperature sistema i povećanja koeficijenta difuzije, poboljšanja rastvorljivosti ekstraktivnih materija i masnih ulja u rastvaračima, a i do razaranja ćelijskih zidova i olakšavanja ekstraktivnim materijama i masnim uljima da dospeju do mase rastvarača (Chen i Spiro, 1994). Ovaj efekat je najizraženiji kod većih odnosa biljni materijal-rastvarač (1:5 g/cm³). Nezavisno od ostalih operativnih uslova, manji odnosi biljni materijal-rastvarač daju vrednosti koeficijenta spore ekstrakcije koje su i do 20 puta veće u odnosu na vrednosti dobijene za ekstrakcije pri odnosima 1:10 i 1:20 g/cm³. Ovakav rezultat je očekivan jer je zapremina rastvarača u svim slučajevima bila ista dok je masa biljnog materijala varirala zavisno od odnosa biljni materijal-rastvarač, te je u slučaju najmanjeg odnosa bilo prisutno najviše biljnog materijala. Dodatak vode pri ekstrakciji srca koštica lovor višnje, ne utiče na koeficijent spore ekstrakcije. Studentovim *t*-testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u vrednostima dobijenim korišćenjem oba ekstrakciona sistema.

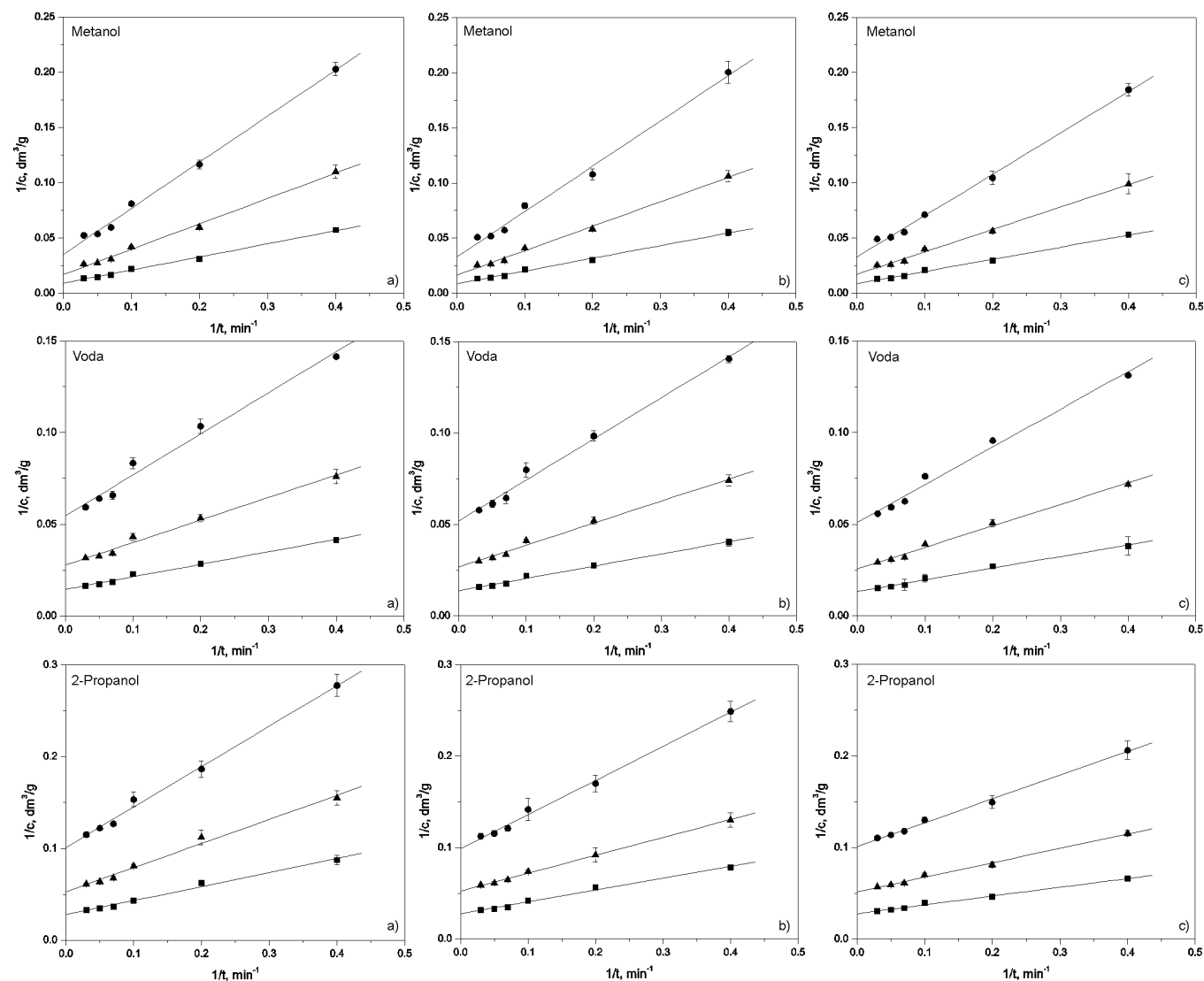
7.2.2.3. Hiperbolni model

Za izračunavanje parametara empirijskog modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini korišćeni su eksperimentalni podaci iz celokupnog perioda ekstrakcije, a izračunavanje je vršeno pomoću metode linearne regresije (slike 7.19 - 7.21).

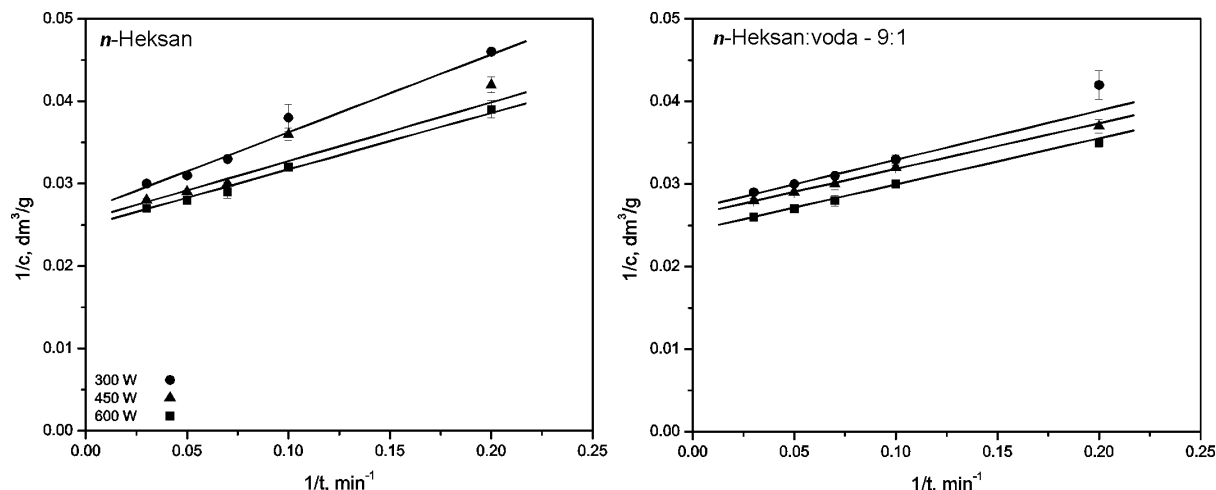


Slika 7.19 Linearizovan oblik kinetičke jednačine hiperbolnog modela mikrotalasne ekstrakcije lista lovor višnje pri mikrotalasnoj snazi

a) 300 i b) 450 i c) 600 W i različitim odnosima biljni materijal-rastvarač (1:20 g/cm³ - ●, 1:10 g/cm³ - ▲, 1:5 g/cm³ - ■)



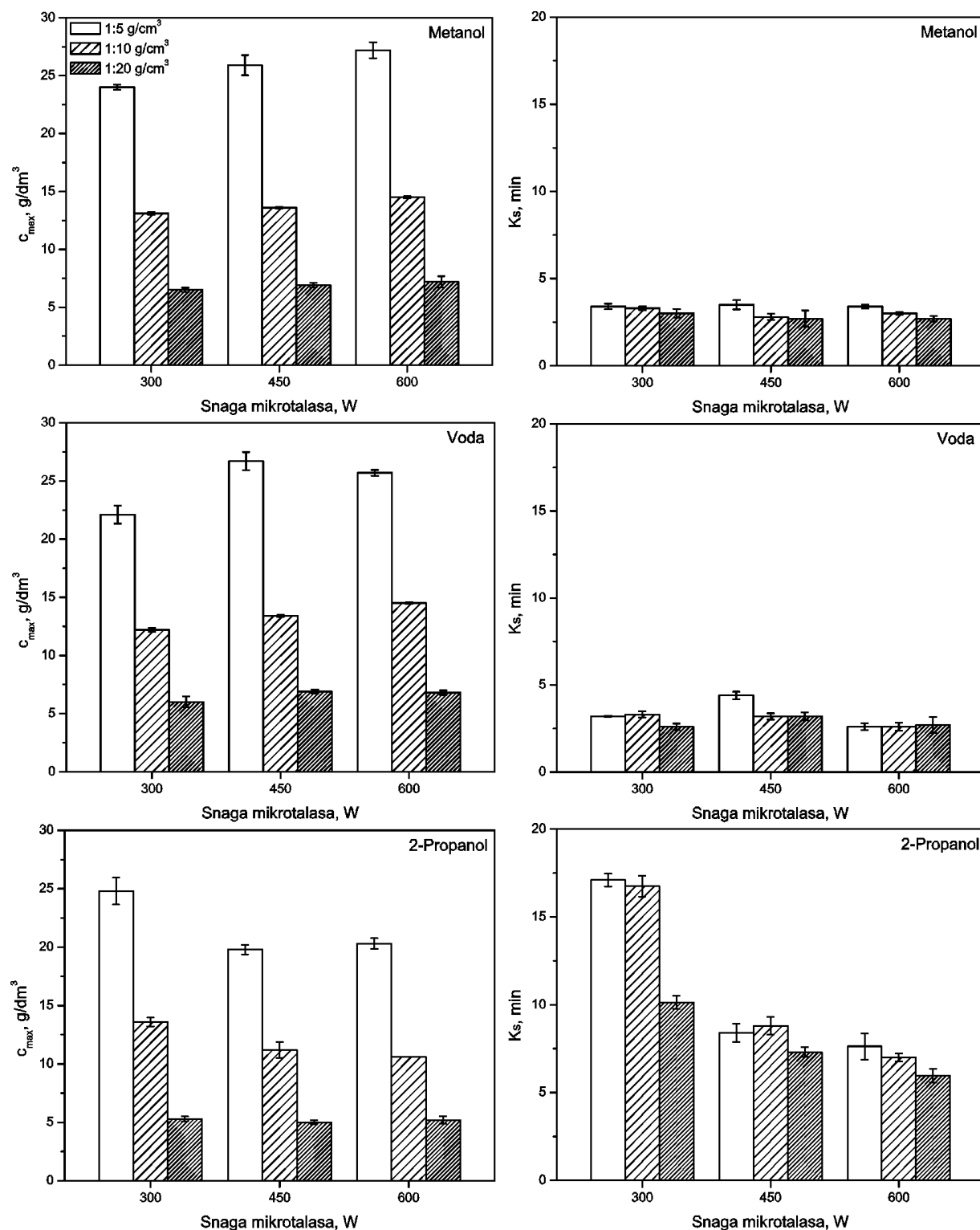
Slika 7.20 Linearizovan oblik kinetičke jednačine hiperbolnog modela mikrotalasne ekstrakcije mesa ploda lovor višnje pri mikrotalasnoj snazi
a) 300 i b) 450 i c) 600 W i različitim odnosima biljni materijal-rastvarač (1:20 g/cm³ - ●, 1:10 g/cm³ - ▲, 1:5 g/cm³ - ■)



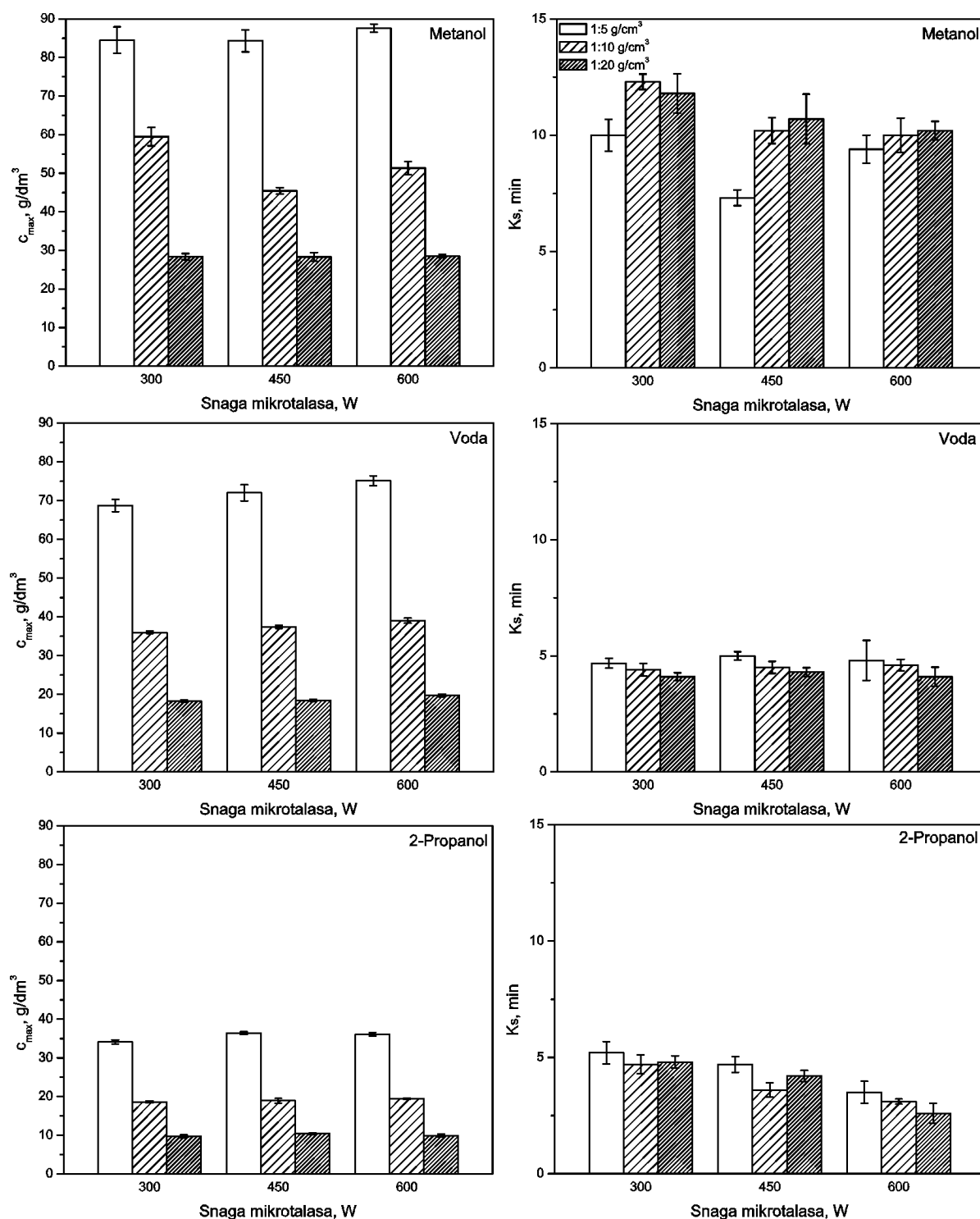
Slika 7.21 Linearizovan oblik kinetičke jednačine modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini mikrotalasne ekstrakcije srca koštica lovor višnje pri različitim mikrotalasnim snagama i odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³

Koeficijent linearne korelacije je bio veći od 0,96 u slučaju svih operativnih uslova. Ovaj model pokazuje dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima u toku celog perioda ekstrakcije u slučaju sva tri biljna materijala i sva tri korišćena rastvarača. Kinetički parametri modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini mikrotalasne ekstrakcije ekstraktivnih materija iz listova, mesa ploda i ulja iz srca koštica lovor višnje zavise od mikrotalasne snage, vrste rastvarača, odnosa biljni materijal-rastvarač i vrste biljnog materijala (slike 7.22 - 7.24). Vrednosti parametara date su u Prilogu (tabele 10.24 – 10.30).

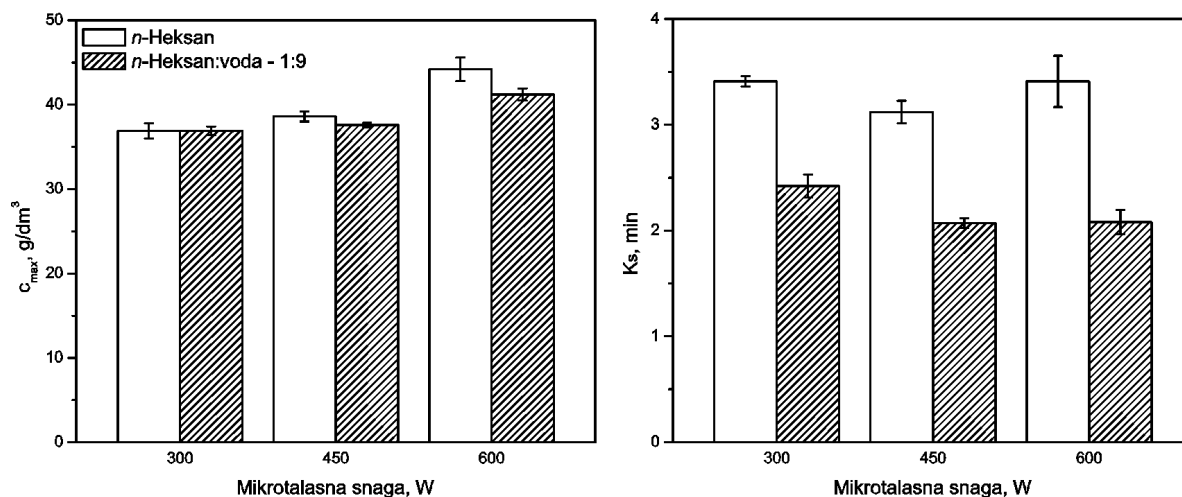
Maksimalna koncentracija ekstraktivnih materija iz lista ($27,2 \pm 0,7$ g/dm³) i mesa ploda ($88,6 \pm 2,7$ g/dm³) izračunatih prema modelu zasnovanom na hiperbolnoj jednačini dobijena je pri ekstrakciji metanolom, pri najvećoj mikrotalasnoj snazi (600 W) i najmanjem korišćenom odnosu biljni materijal-rastvarač (1:5 g/cm³), dok se maksimalna koncentracija masnog ulja iz srca koštica ($44,2 \pm 1,4$ g/dm³) dobija pri ekstrakciji čistim rastvaračem (*n*-heksan) i pri najvećoj mikrotalasnoj snazi (600 W). Dodatkom vode, odnosno ekstrakcijom srca koštica sistemom *n*-heksan:voda – 9:1, nešto manji prinos (oko 3 %) dobija se za u proseku 35 % kraće vreme. Generalno porastom snage 300 na 600 W, u slučaju ekstrakcije sva tri biljna materijala i nezavisno od ostalih operativnih uslova, maksimalna koncentracija ekstraktivnih materija i ulja izračunata pomoću hiperbolnog modela raste u proseku do 10 %, dok se vreme potrebno da koncentracija ekstrahovanih materija dostigne polovinu svoje maksimalne vrednosti skraćuje. Najveće skraćenje vremena potrebnog da koncentracija ekstrahovanih materija dostigne polovinu svoje maksimalne vrednosti, u proseku do 50 %, zabeleženo je u slučaju ekstrakcije 2-propanolom. Uticaj promene snage na parametre hiperbolnog modela izraženiji je pri većim odnosima biljni materijal-rastvarač (1:5 g/cm³) zbog prisustva veće količine biljnog materijala u ekstrakcionim sistemima. Skraćenje vremena potrebnog da koncentracija 1,8 cineola dostigne polovinu svoje maksimalne vrednosti sa porastom snage mikrotalasa zabeležena je u slučaju ekstrakcije ulja iz listova ruzmarina i nane (Chen i Spiro, 1994).



Slika 7.22 Zavisnost kinetičkih parametara modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini od snage mikrotalasa i odnosa biljni materijal-rastvarač za mikrotalasnu ekstrakciju ekstraktivnih materija iz lista lovor višnje korišćenjem različitih rastvarača



Slika 7.23 Zavisnost kinetičkih parametara modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini od snage mikrotalasa i odnosa biljni materijal-rastvarač za mikrotalasnu ekstrakciju ekstraktivnih materija iz mesa ploda lovor višnje korišćenjem različitih rastvarača



Slika 7.24 Zavisnost kinetičkih parametara modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini od snage mikrotalasa pri odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm^3 za mikrotalasnu ekstrakciju masnog ulja iz srca koštica lovor višnje

Najveće vrednosti maksimalne koncentracije ekstraktivnih materija dobijene su u slučaju ekstrakcije metanolom. Kod ekstrakcije lista lovor višnje izračunati parametar c_{max} veći je u proseku od izračunatih vrednosti za ekstrakciju vodom i 2-propanolom za 4 i 17,8 %, respektivno, dok se u slučaju ekstrakcije mesa ploda ekstrakcijom metanolom dobijaju vrednosti veće u proseku za 25,6 i 62,1 % od vrednosti dobijenih vodom i 2-propanolom, respektivno. Korišćenje sistema *n*-heksan:voda pri ekstrakciji ulja iz srca koštica lovor višnje ne utiče značajnije na izračunatu vrednost maksimalne koncentracije masnog ulja pomoću hiperbolnog modela (manje od 5 % u proseku), ali skraćuje vreme potrebno da koncentracija ulja dostigne polovinu svoje maksimalne vrednosti za 34 % u proseku, nezavisno od ostalih operativnih uslova. Dodatak vode ekstrakcionom sistemu koji se sastoji od rastvarača transparentnog za mikrotalase i biljnog materijala koji sadrži neznatnu količinu vlage pozitivno utiče na brzinu zagrevanja sistema što dovodi do smanjenja viskoznosti rastvarača i olakšavanja penetracije u biljni materijal. Generalno, veće vrednosti oba parametra hiperbolnog modela dobijaju se pri ekstrakciji mesa ploda lovor višnje, nezavisno od ostalih operativnih uslova. Velika razlika u prinosu može se pripisati većem sadržaju ekstraktivnih materija ali i prisustvu ekstraktivnih materija bolje rastvornih u korišćenim rastvaračima kod mesa ploda u odnosu na list lovor višnje.

7.2.2.4. Poređenje modela korišćenih za modelovanje kinetike ekstrakcije

Modeli zasnovani na teorijama nestacionarne difuzije kroz čvrst material i teoriji filma su fizički zasnovani na pojednostavljenim opisima difuzije ekstraktivnih materija iz biljnog materijala, dok hiperbolni model nema fizičku osnovu i predstavlja matematički opis promene koncentracije

ekstraktivnih materija sa vremenom. Vrednosti izračunatih kinetičkih parametara zavise od više faktora (snaga mikrotalasa, vrsta rastvarača, biljni materijal, odnos biljni materijal-rastvarač) i njihovog međusobnog odnosa koji se ne može lako uočiti zbog kompleksnosti procesa ekstrakcije.

Poređenjem parametara izračunatih za modele zasnovane na teorijama nestacionarne difuzije kroz čvrst material i teoriji filma, u slučaju sva tri ekstrahovana biljna materijala i bez obzira na ostale operativne uslove, utvrđeno je da se veće vrednosti koeficijenta ispiranja dobijaju kod modela zasnovanog na teoriji nestacionarne difuzije. Koeficijenti spore ekstrakcije izračunati po modelu zasnovanom na teoriji filma veći su od koeficijenata izračunatih po modelu zasnovanom na teoriji nestacionarne difuzije, bez obzira na ostale operativne uslove, u slučaju ekstrakcije masnog ulja dok je u slučaju ekstrakcije lista i mesa ploda veći samo u slučajevima manjih odnosa biljni materijal-rastvarač (1:10 i 1:20 g/cm³).

Rezultati dobijeni na osnovu hiperbolnog modela dobro se slažu sa eksperimentalnim podacima. Najveće maksimalne koncentracije ekstraktivnih materija izračunate po ovom modelu, nezavisno od biljnog materijala postižu se pri većim mikrotalasnim snagama (600 W) i odnosu biljni materijal-rastvarač (1:5 g/cm³), a ujedno su za te uslove dobijene uglavnom najveće vrednosti koeficijenata spore ekstrakcije po modelu zasnovanom na teoriji filma.

Prihvatljivost kinetičkog modela je ocenjivana na osnovu slaganja kinetičkih jednačina sa eksperimentalnim podacima, odnosno na osnovu vrednosti koeficijenata linearne korelacije i vrednosti korena kvadrata srednjeg odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti prinosa ekstraktivnih materija. Usvojeno je da je model prihvatljiv za inženjerske svrhe ukoliko je srednja vrednost odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti prinosa ekstraktivnih supstanci manja od ± 10 %. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 7.4 može se zaključiti da su model zasnovan na teoriji filma i jednačina hiperbolnog modela primenljivi za opisivanje kinetike celog perioda ekstrakcije, dok je model zasnovan na nestacionarnoj difuziji primenljiv samo u periodu spore ekstrakcije.

Imajući ovo u vidu, kao i zbog svoje relativne jednostavnosti i fizičke zasnovanosti, model zasnovan na teoriji filma može se preporučiti za matematičko opisivanje kinetike mikrotalasne ekstrakcije ekstraktivnih materija iz listova i mesa ploda, kao i masnih ulja iz srca koštica lovor višnje.

Tabela 7.4 Vrednosti korena kvadrata srednjeg odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti prinosa ekstraktivnih materija, %

Biljni materijal	Broj eksperimentalnih podataka	Kinetički model		
		Hiperbolni	Teorija filma	Nestacionarna difuzija ^a
List	162	1,6	2,1	5,3
Plod	162	1,8	2,6	4,8
Srce koštica	30	2,0	4,7	2,5

^a Period spore ekstrakcije

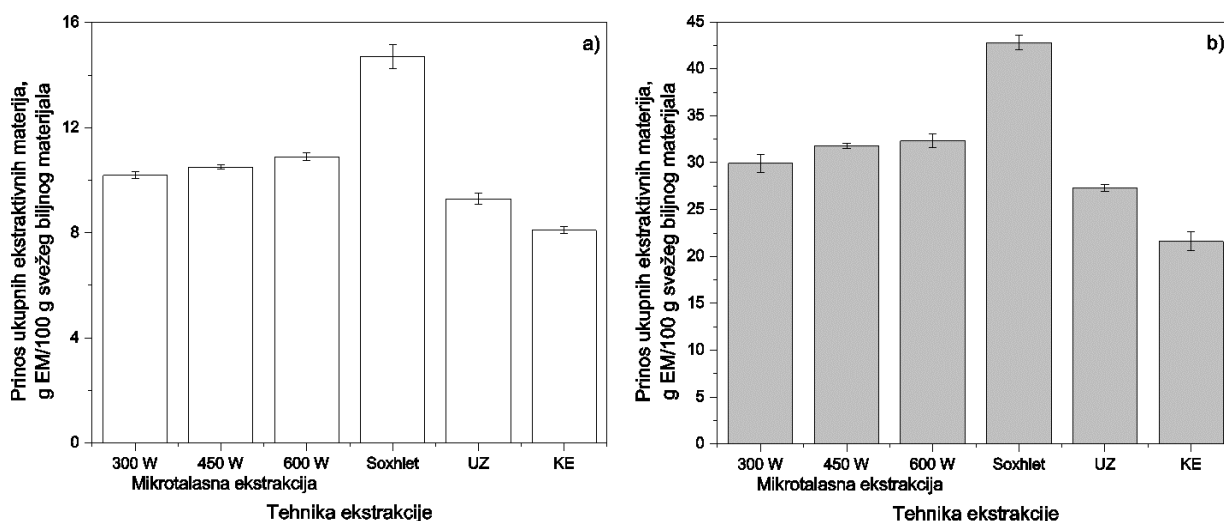
Analiza primenljivosti modela kinetike ekstrakcije iz različitih delova (nadzemni delovi, suvi i sveži listovi, koren, cvet i seme) deset biljnih vrsta (kantaron, obična žalfija, lepljiva žalfija, ehinacea,

bokvica, čuvarkuća, lincura, neven, duvan i peršun) nezavisno od biljne vrste i tehnike i operativnih uslova ekstrakcije pokazala je da su Weibull-ova i modifikovana Elovich-ova jednačina optimalni (sa odstupanjem manjim od $\pm 10\%$) empirijski modeli kinetike, dok je od fizičkih modela optimalan model zasnovan na teoriji filma koji daje najmanju srednju vrednost relativnog odstupanja ($\pm 3,20\%$) (Kitanović, 2009).

7.2.3. Poređenje tehnika ekstrakcije prema prinosu ekstrakta i ulja

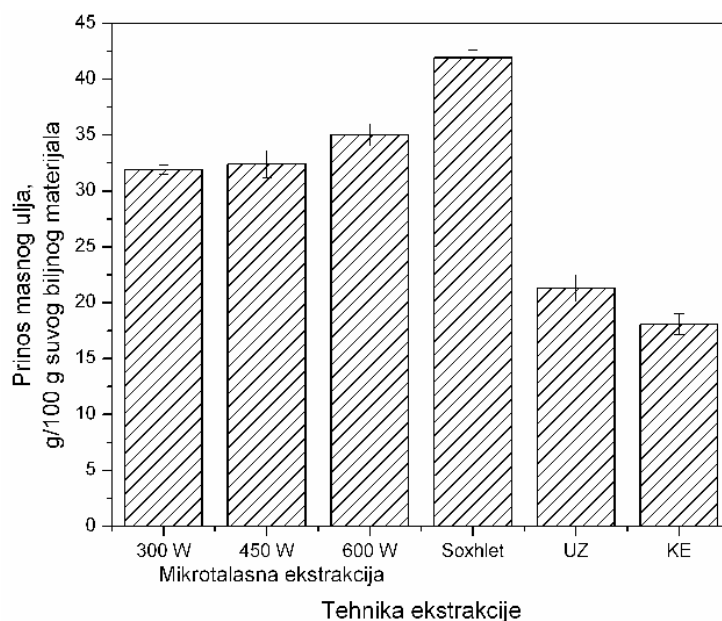
U cilju poređenja sa drugim tehnikama ekstrakcije, u slučaju sva tri biljna materijala, mikrotalasna ekstrakcija izvođena je na tri nivoa snage (300, 450 i 600 W) u trajanju od po 15 minuta. Ekstrakti i masna ulja dobijeni pod ovim uslovima poređeni su po prinosu i hemijskom sastavu sa onim dobijenim drugim tehnikama ekstrakcije (ekstrakcija po Soxhlet-u, klasična ekstrakcija i indirektna ultrazvučna ekstrakcija). Zavisnost prinosa ukupnih ekstraktivnih materija lista i mesa ploda, kao i masnog ulja srca koštica lovor višnje od primenjene tehnike ekstrakcije prikazana je na slikama 7.25 i 7.26.

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da primenjena tehnika ekstrakcije znatno utiče na prinos, kako ukupnih ekstraktivnih materija, tako i masnog ulja. U slučaju sva tri biljna materijala najveći prinos dobija se ekstrakcijom po Soxhlet-u, pri čemu treba uzeti u obzir da je proces trajao 120, 130 i 180 minuta pri ekstrakciji mesa ploda, lista i srca koštica ploda lovor višnje, respektivno. Prinosi ostvareni ekstrakcijom po Soxhlet-u ujedno predstavljaju maksimalni prinos ekstraktivnih materija, odnosno masnih ulja.



Slika 7.25 Prinos ukupnih ekstraktivnih materija dobijen različitim tehnikama ekstrakcije

a) lista i b) mesa ploda lovor višnje metanolom, pri odnosu biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm³ i u trajanju od 15 minuta (UZ - ultrazvučna ekstrakcija, KE - klasična ekstrakcija)



Slika 7.26 Prinos masnog ulja iz srca koštica ploda lovor višnje dobijen različitim tehnikama ekstrakcije *n*-heksanom pri odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³ i u trajanju od 15 minuta (UZ - ultrazvučna ekstrakcija, KE - klasična ekstrakcija)

Poređenjem ostalih tehnika ekstrakcija, za isto vreme (15 minuta), isti rastvarač i biljni materijal, najveći prinosi ostvaruju se mikrotalasnom ekstrakcijom pri većim snagama, a najmanji klasičnom ekstrakcijom na temperaturi ključanja. Pozitivan uticaj dejstva mikrotalasa izraženiji je kod ekstrakcije masnog ulja iz srca koštica lovor višnje u odnosu na ostale biljne materijale. Generalno, u slučaju masnog ulja, primenom mikrotalasa dobija se u proseku oko 80 % prinosa ostvarnog ekstrakcijom po Soxhletu, dok je u slučaju ultrazvučne i klasične ekstrakcije ovaj procenat manji i iznosi oko 50 i 43 %, respektivno. Primenom mikrotalasa u procesu ekstrakcije lista i mesa ploda lovor višnje dobija se u proseku oko 72 % prinosa ostvarnog ekstrakcijom po Soxhlet-u, dok su prinosi ostvareni ultrazvučnom i klasičnom ekstrakcijom 62 % i 53 % prinosa ostvarnog ekstrakcijom po Soxhlet-u, respektivno. Slični rezultati zabeleženi su kod ekstrakcije semena, lista i mesa ploda pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides*) (Sharma et al., 2008), anthrahinona iz korena biljne vrste *Morinda citrifolia*, gde je najveći prinos zabeležen kod ekstrakcije po Soxhlet-u, zatim kod mikrotalasne, ultrazvučne ekstrakcije, dok je najmanji prinos dobijen klasičnom ekstrakcijom. I pored toga što je temperatura pri kojoj je vršena ekstrakcija bila u slučaju svih tehnika ekstrakcije ista, temperatura ključanja rastvarača, zagrevanje pod dejstvom mikrotalasa se pokazalo kao najbrže, te je sinergističkim dejstvom morfoloških promena unutar biljnog materijala i veće brzine prenosa mase nastalih pod dejstvom povišene temperature ova tehnika dala najbolje prinose za najkraće vreme (Hemwimon et al., 2007). U istom radu, poređenjem mikrotalasne i ultrazvučne ekstrakcije, gde na brzinu ekstrakcije utiče kavitacioni efekat i akustične osobine rastvarača, pokazalo se da je inicijalno brži porast temperature i veći prinos usled dejstva mikrotalasa, ali da se nakon osamnaestog minuta prinosi izjednačavaju.

Primenom mikrotalasa najmanje snage (300 W) u odnosu na ekstrakciju pod dejstvom ultrazvučnih talasa dobijaju se prinosi veći u proseku za oko 50 %, odnosno za oko 12 % u slučaju ekstrakcije masnog ulja, odnosno ukupnih ekstraktivnih materija, respektivno. Ova razlika u prinosu u korist mikrotalasne ekstrakcije još je izraženija poređenjem sa klasičnom ekstrakcijom, gde je prinos masnog ulja veći za 76 %, a prinosi ukupnih ekstraktivnih materija lista i mesa ploda u proseku za oko 30 %. Na efikasnost različitih tehnika ekstrakcije veoma utiču mikrotalasne i akustične osobine korišćenih rastvarača, kao i sadržaj vlage i struktura biljnog materijala.

Ranija istraživanja pokazuju da se postupkom dvostepene maceracije listova lovor višnje na sobnoj temperaturi, vodom i 96 % etanolom, dobija 38,1 i 29,3 g ekstraktivnih materija/100 g biljnog materijala, što je 2,8 puta veći prinos (u slučaju ekstrakcije vodom) u odnosu na rezultat dobijen u ovom radu (ekstrakcija po Soxhlet-u, voda, list lovor višnje), mada nema pouzdanih podataka o trajanju ekstrakcije, usitnjenosti materijala, kao i prisustvu vlage u biljnom materijalu (Erdemoglu et al., 2003).

7.3. Destilacija etarskog ulja listova lovor višnje

Promena prinosa etarskog ulja tokom klasične hidrodestilacije, mikrotalasne hidrodestilacije i suve destilacije (destilacija bez prisustva rastvarača pri atmosferskom pritisku) pod dejstvom mikrotalasa iz usitnjenih svežih listova lovor višnje prikazana je na slici 7.27.

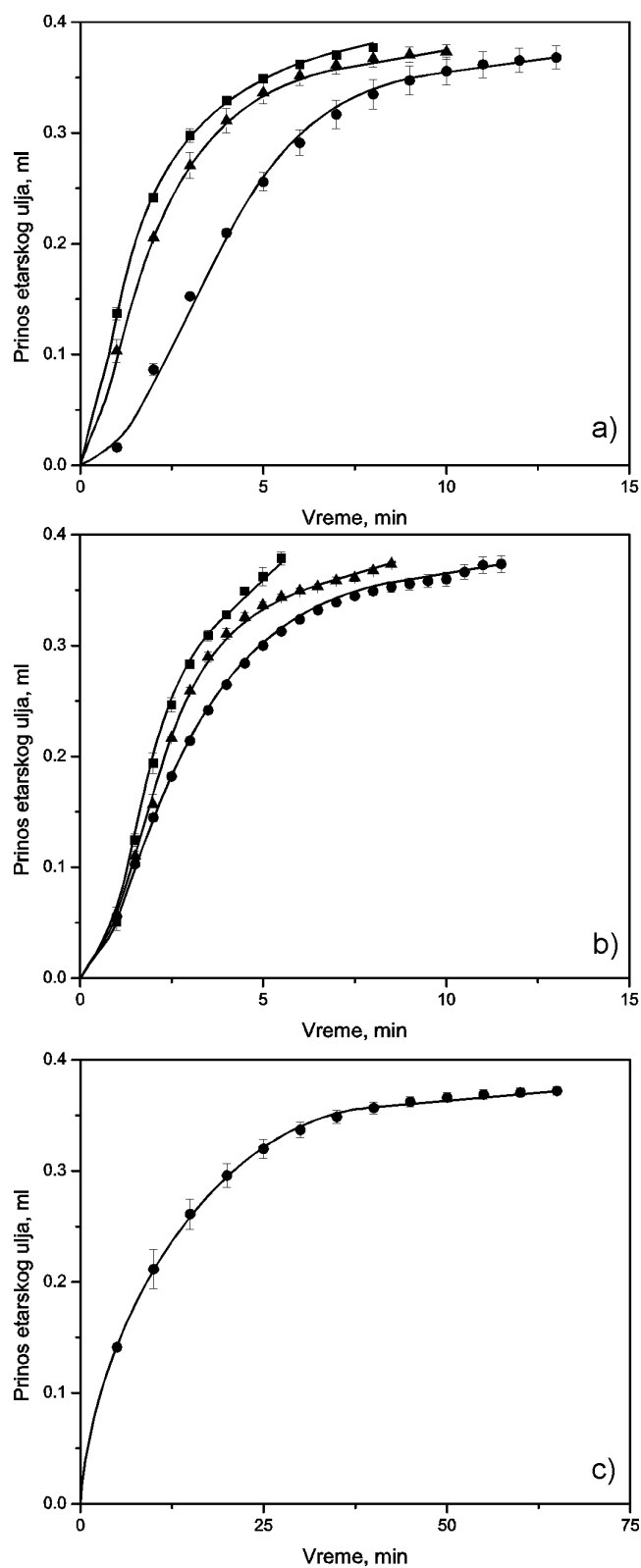
Utvrđeno je da je zavisnost promene prinosa etarskog ulja tokom klasične hidrodestilacije, mikrotalasne hidrodestilacije i suve destilacije pri različitim snagama ista sa oblikom krivih dobijenih u slučaju klasične hidrodestilacije i suve destilacije suvih listova origana (Bayramoglu et al., 2008), suvih nadzemnih delova iranske lekovite biljne vrste *Zataria multiflora* Boiss (Golmakani i Rezaei, 2008a) i svežih nadzemnih delova timijana (Golmakani i Rezaei, 2008; Lucchesi et al., 2004b).

Ukupni sadržaj etarskog ulja u svežim listovima lovor višnje je $0,38 \pm 0,01$ cm³/100 g svežeg biljnog materijala, nezavisno od primenjene tehnike destilacije. U svim eksperimentima računanje vremena je počelo od momenta uključenja izvora mikrotalasa, odnosno izvora toplote i trajalo je do prestanka izdvajanja ulja, pri čemu su beležena vremena pojave prve kapi ulja i ukupnog trajanja procesa destilacije (tabela 7.5).

Tabela 7.5 Vreme trajanja destilacije ulja iz svežih listova lovor višnje različitim tehnikama (min)

Snaga mikrotalasa	Hidrodestilacija pod dejstvom mikrotalasa			Suva destilacija pod dejstvom mikrotalasa			Klasična hidrodestilacija		
	t ₁	t ₂	t _{uk}	t ₁	t ₂	t _{uk}	t ₁	t ₂	t _{uk}
600 W	10,5±0,7	7,5±0,7	18,0±1,4	2,5±0,0	5,2±0,1	7,8±0,2			
450 W	19,5±0,7	9,1±0,3	28,6±0,5	4,0±0,0	8,4±0,2	12,4±0,1			
300 W	31,0±1,4	13,6±3,4	44,6±2,4	7,5±0,7	11,4±0,1	18,9±0,4			
							35±0,0	66,1±2,1	101,1±1,1

Vrednosti u tabeli date su kao srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija t₁ - Vreme od momenta uključenja izvora toplote ili mikrotalasa do pojave prve kapi etarskog ulja, min; t₂ - Vreme potrebno da svo ulje predestiluje, min; t_{uk} - Ukupno vreme trajanja procesa destilacije t₁+ t₂, min



Slika 7.27 Kinetika destilacije etarskog ulja svežih listova lovor višnje hidrodestilacijom pod dejstvom mikrotalasa (a), suvom destilacijom pod dejstvom mikrotalasa (b) i klasičnom hidrodestilacijom (c) pri različitim snagama (300 W - ●, 450 W - ▲, 600 W - ■)

Primenom mikrotalasa, uz dobijanje istog prinosa, ukupno vreme trajanja procesa destilacije se skraćuje, kao i u ranijim istraživanjima (Chemat et al., 2006; Lucchesi et al., 2004b; Rezvanpanah et al., 2008). Primenom mikrotalasa male snage (220 W) u slučaju dobijanja etarskih ulja biljnih vrsta *Satureja hortensis* i *Satureja montana* vreme do pojave prve kapi etarskog ulja je duže u odnosu na isto vreme kod postupka klasične hidrodestilacije, ali se ukupno vreme procesa ipak skraćuje (Rezvanpanah et al., 2008). Najizraženije skraćenje vremena trajanja procesa je u slučaju najveće primenjene snage mikrotalasa (600 W) do 3 puta do pojave prve kapi ulja odnosno do 9 puta za vreme potrebno da svo ulje predestiluje, kao i u eksperimentima izvedenim bez prisustva vode (suva destilacija), do 14 puta do pojave prve kapi ulja odnosno do 12 puta za vreme potrebno da svo ulje predestiluje. U slučaju suve destilacije pod dejstvom mikrotalasa 80 % od ukupno prisutnog etarskog ulja destiluje za 5, 3,5 odnosno 3 minuta (računato od momenta izdvajanja prve kapi etarskog ulja), pri snazi mikrotalasa od 300, 450 i 600 W, respektivno. U prisustvu vode (hidrodestilacija pod dejstvom mikrotalasa) pri istim snagama mikrotalasa za postizanje identičnog prinosa potrebno je nešto više vremena (za 17 % više vremena u proseku). Vreme potrebno da se izdvoji 80 % etarskog ulja postupkom klasične hidrodestilacije iznosi 20 minuta, nakon čega se za sledećih 20 minuta, izdvaja još oko 15 % etarskog ulja od ukupne količine.

7.4. Analiza bioaktivnih komponenti iz lovor višnje

Postupcima ekstrakcije i destilacije, pod dejstvom mikrotalasa kao i klasičnim metodama, dobijeni su ekstrakti i masna i etarska ulja čija je analiza izvršena hromatografskim i spektrofotometrijskim metodama.

7.4.1. Analiza ukupnih ekstraktivnih materija lista i mesa ploda lovor višnje

7.4.1.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida, prikazani u tabelama 7.6 i 7.7 ukazuju da su ekstrakti lista bogatiji fenolnim jedinjenjima i flavonoidima u odnosu na ekstrakte mesa ploda lovor višnje, kao i da tehnika ekstrakcije ima uticaja na sadržaj ovih bioaktivnih jedinjenja u analiziranim ekstraktima.

Povećanjem snage mikrotalasa u opsegu od 300 do 600 W povećava se sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima lista i mesa ploda, za 9 %, odnosno 4 %, respektivno. Pri istoj promeni snage mikrotalasa sadržaj flavonoida se neznatno povećava u ekstraktima lista (za oko 3 %), dok ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju flavonoida u ekstraktima mesa ploda lovor višnje dobijenih pri dejstvu mikrotalasa različitih snaga.

Tabela 7.6 Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja

Tehnika ekstrakcije		Ukupni fenoli, mg galne kiseline/g suvog ekstrakta			
		Ekstrakt lista	Ekstrakt mesa ploda	Hidrosol	Sok
Mikrotalasna ekstrakcija^a	300 W	119,4±1,1	46,3±1,4	12,7±0,4	
	450 W	128,0±2,2	47,1±1,3	13,0±0,2	
	600 W	130,5±2,1	48,1±0,5	13,5±0,3	
Ultrazvučna ekstrakcija		114,7±1,7	42,2±1,8		
Klasična ekstrakcija		116,0±2,2	41,3±1,3		
Ekstrakcija po Soxhlet-u		85,4±1,4	36,2±0,6		
Klasična hidrodestilacija				12,2±0,2	
Ceđenje					3,8±0,1

Vrednosti u tabeli date su kao srednja vrednost tri merenja±standardna devijacija (MeOH, 15 min., 1:5 g/cm³, 65 °C)

^a Mikrotalasna hidrodestilacija u slučaju hidrosola

Tabela 7.7 Ukupni sadržaj flavonoida

Tehnika ekstrakcije		Ukupni flavonoidi, mg rutina/g suvog ekstrakta			
		Ekstrakt lista	Ekstrakt mesa ploda	Hidrosol	Sok
Mikrotalasna ekstrakcija^a	300 W	66,6±0,2	13,7±0,5	9,1±0,2	
	450 W	66,8±0,3	13,8±0,3	9,6±0,1	
	600 W	68,8±0,4	13,7±0,5	9,6±0,2	
Ultrazvučna ekstrakcija		64,4±0,3	13,5±0,4		
Klasična ekstrakcija		63,5±0,9	13,5±0,2		
Ekstrakcija po Soxhlet-u		61,3±1,6	12,9±0,2		
Klasična hidrodestilacija				8,8±0,2	
Ceđenje					1,8±0,0

Vrednosti u tabeli date su kao srednja vrednost tri merenja±standardna devijacija (MeOH, 15 min., 1:5 g/cm³, 65 °C)

^a Mikrotalasna hidrodestilacija u slučaju hidrosola

Ranija istraživanja mikrotalasne ekstrakcije biljne vrste *Buddleia officinalis* pokazala su da povećanje mikrotalasne snage u opsegu od 300 do 900 W značajno povećava udeo flavonoida u etanolnim ekstraktima (za oko 20 %), kao i da sa produžetkom vremena trajanja ekstrakcije sadržaj flavonoida pokazuje trend rasta do dvadesetpetog minuta, a nakon tog vremena lagano počinje da opada (Pan et al., 2010). Slični rezultati zapaženi su i u slučaju flavonoida ekstrakata korena biljne vrste *Astragalus mongolicus* (Xiao et al., 2008), fenola u ekstraktima opne kikirikija (Yu et al., 2005) i popularnog benda crnog čaja (Spigno i De Faveri, 2009) dobijenim pod dejstvom mikrotalasa različite snage. Li i sar. (2004) su pokazali da se sa porastom snage od 10 do 90 % nominalne snage mikrotalasa modifikovane mikrotalasne pećnice, pri mikrotalasnoj ekstrakciji polifenolnih kiselina iz biljne vrste *Eucommia ulmoides* najbolji prinosi dobijaju sa snagom od 50 do 70 % nominalne vrednosti. Daljim porastom snage dolazi do blagog smanjenja sadržaja ovih jedinjenja u ekstraktima. Veći sadržaj bioaktivnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom mikrotalasa veće snage rezultat

su prisustva veće količine elektromagnetne energije koja se brže prenosi sistemu za ekstrakciju pri većim mikrotalasnim snagama i povećava efikasnost ekstrakcije (Xiao et al., 2008). Uočene razlike u uticaju promene snage mikrotalasa na sadržaj bioaktivnih jedinjenja u ekstraktima najverovatnije su posledica različite strukture biljnih materijala i sadržaja vlage, kako lista i mesa ploda lovor višnje korišćenih u ovom radu, tako i u poređenju sa ranijim istraživanjima.

Uticaj tehnike ekstrakcije na prinos bioaktivnih komponenti u ekstraktima je izraženiji u slučaju ekstrakcije lista lovor višnje. Nezavisno od biljnog materijala, veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida zabeležen je kod ekstrakata dobijenih pod dejstvom mikrotalasa, a najniži udeo ovih bioaktivnih jedinjenja je prisutan u ekstraktu dobijenom ekstrakcijom po Soxhlet-u. Manji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom po Soxhlet-u u odnosu na ekstrakte dobijene drugim tehnikama ekstrakcije u skladu je sa ranijim istraživanjima (Pan et al., 2010; Stojičević et al., 2008), dok je u slučaju ekstrakcije korena biljne vrste *Astragalus mongolicus* najveći prinos flavonoida u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom po Soxhlet-u (Xiao et al., 2008). Studentovim *t*-testom utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u sadržaju fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima lista i mesa ploda lovor višnje dobijenim klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom. Dosadašnja istraživanja pokazala su da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima čuvaruče (Stojičević et al., 2008), ehinacee (Stanisavljević et al., 2009a) i bokvice (Stanisavljević et al., 2008) dobijenim klasičnom ekstrakcijom veći u odnosu na njihov sadržaj u ekstraktima dobijenim pod dejstvom ultrazvuka, dok je u vodenim ekstraktima semenci bora sadržaj ukupnih fenola bio najveći u ekstraktu dobijenom pod dejstvom ultrazvuka u poređenju sa ekstraktima dobijenim klasičnom ekstrakcijom sa mešanjem i mikrotalasnom ekstrakcijom (Liazid et al., 2010). Najveći udeo polifenola i kofeina pri ekstrakciji listova zelenog čaja zabeležen je u ekstraktima dobijenim pod dejstvom mikrotalasa u poređenju sa njihovim sadržajem u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom pod dejstvom ultrazvuka i zagrevanjem sa reflusom (Pan et al., 2003). U ranijim istraživanjima dokazano je da je primena mikrotalasa podesna za ekstrakciju fenolnih jedinjenja i pored postizanja relativno visokih temperatura koje bi mogle dovesti do njihove degradacije (110-150 °C) (Casazza et al., 2010), kao i da se ovom tehnikom, u poređenju sa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, dobija veći prinos polifenolnih jedinjenja (Spigno i De Faveri, 2009). Poređenjem ovih rezultata može se zaključiti da uticaj tehnike ekstrakcije na sadržaj bioaktivnih jedinjenja u ekstraktima zavisi u mnogome od vrste i strukture biljnog materijala.

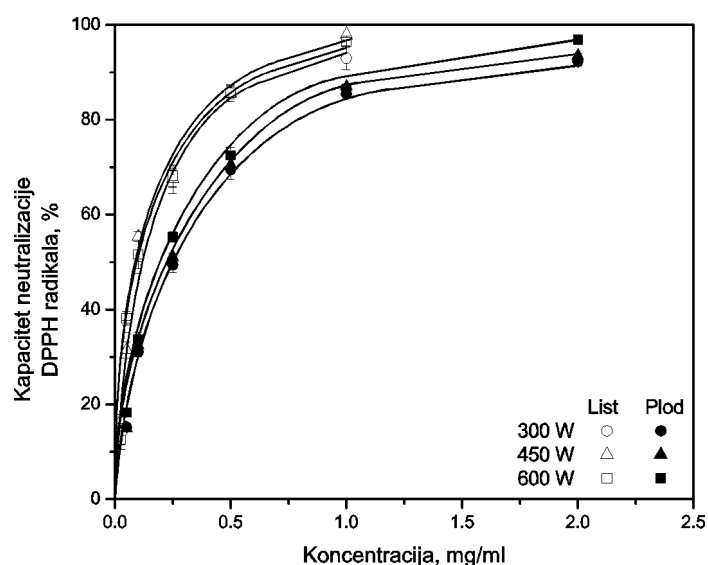
Nerazblaženi hidrosol može biti dobar izvor fenolnih jedinjenja i flavonoida. U hidrosolu dobijenom u procesu klasične hidrodestilacije prisutno je najmanje fenolnih jedinjenja i flavonoida u poređenju sa hidrosolovima dobijenim u postupcima hidrodestilacije pod dejstvom mikrotalasa. Kada se mikrotalasna snaga kojoj je izlagan sistem tokom hidrodestilacije poveća u opsegu od 300 do 600 W sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u hidrosolu raste za 6,2, odnosno 5,5 %, respektivno, što znači da promena mikrotalasne snage ne utiče značajno na sadržaj ovih komponenti. Prisustvo fenolnih jedinjenja i flavonoida dokazano je i u nerazblaženom sveže ceđenom soku ploda lovor višnje.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida određen standardnim spektrofotometrijskim metodama ne pruža pravu sliku o kvantitetu i kvalitetu fenolnih jedinjenja u ekstraktima, zbog

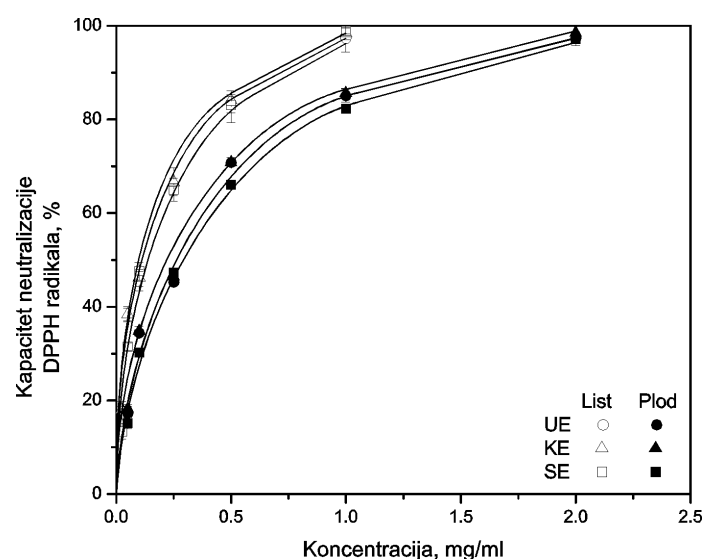
moгуćeg prisustva interferirajućih jedinjenja (redukujući šećeri, aromatični amini, sumpor-dioksid, vitamin C, organske kiseline, Fe(II) i ostale supstance koje nisu polifenolnog porekla) koja utiču na nerealno povećanje rezultata (Georgé et al., 2007; Padma i Picha, 2007; Stalikas, 2007). Zbog toga je kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakata lista i mesa ploda lovor višnje izvršena primenom HPLC tehnike.

7.4.1.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata

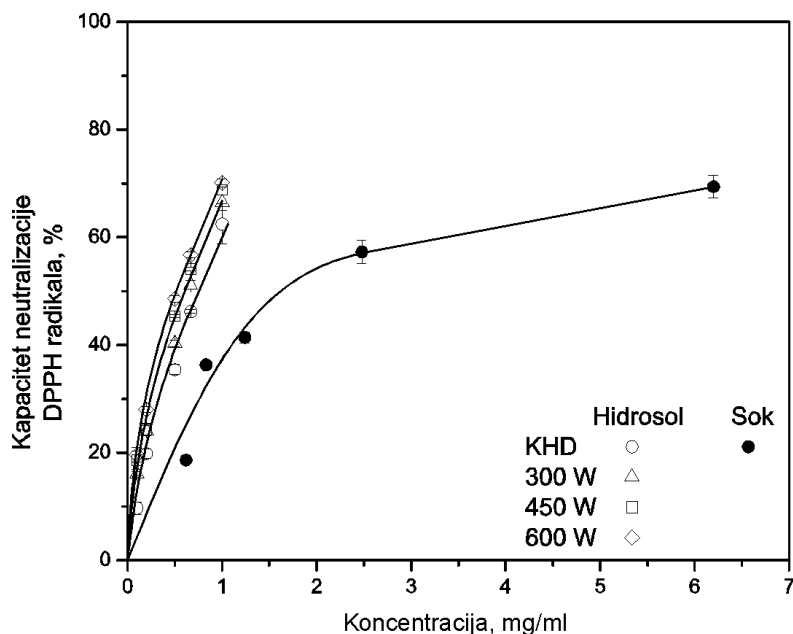
Antioksidativna aktivnost ekstrakata lista i mesa ploda, hidrosolova zaostalih nakon destilacija i soka ploda lovor višnje, utvrđena merenjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH radikale, prikazana je na slikama 7.30 – 7.32.



Slika 7.30 Antioksidativna aktivnost ekstrakata lista i mesa ploda dobijenih pri različitim snagama mikrotalasa



Slika 7.31 Antioksidativna aktivnost ekstrakata lista i mesa ploda dobijenih ultrazvučnom (UE), klasičnom (KE) i ekstrakciom po Soxhlet-u (SE)



Slika 7.32 Antioksidativna aktivnost hidrosolova dobijenih klasičnom hidrodestilacijom (KHD) i hidrodestilacijama pri različitim snagama listova i soka ploda lovor višnje

Procenat neutralisanja DPPH radikala iskazuje se vrednošću EC_{50} , odnosno koncentracijom ekstrakta koja je potrebna za neutralizaciju 50 % DPPH radikala (Villaño et al., 2007). Vrednosti EC_{50} izračunate na osnovu eksperimentalnih podataka prikazane su u tabeli 7.8.

Tabela 7.8 Antioksidativna aktivnost

Tehnika ekstrakcije		EC_{50} , $\mu\text{g}/\text{cm}^3$			
		Ekstrakt lista	Ekstrakt mesa ploda	Hidrosol	Sok
Mikrotalasna ekstrakcija ^a	300 W	108,1±7,7	236,9±3,1	681,9±10,9	
	450 W	104,1±1,9	225,3±5,2	630,4±4,9	
	600 W	102,1±5,1	206,8±6,5	589,9±6,3	
Ultrazvučna ekstrakcija		117,9±3,5	245,7±3,4		
Klasična ekstrakcija		115,4±2,8	237,2±4,6		
Ekstrakcija po Soxhlet-u		124,5±1,9	271,2±7,6		
Klasična hidrodestilacija				762,1±33,9	
Ceđenje					1645,0±15,6

Vrednosti u tabeli date su kao srednja vrednost tri merenja±standardna devijacija (MeOH, 15 min., 1:5 g/cm³, 65 °C)

^aMikrotalasna hidrodestilacija u slučaju hidrosola

Nezavisno od biljnog materijala, porast mikrotalasne snage dovodi do blagog povećanja antioksidativnog kapaciteta ekstrakata i hidrosolova. Studentovim *t*-testom utvrđeno je da jedino razlika između antioksidativne aktivnosti u slučaju ekstrakata lista dobijenih primenom mikrotalasa različite snage nije statistički značajna ($p < 0,05$). Ovi rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima koja

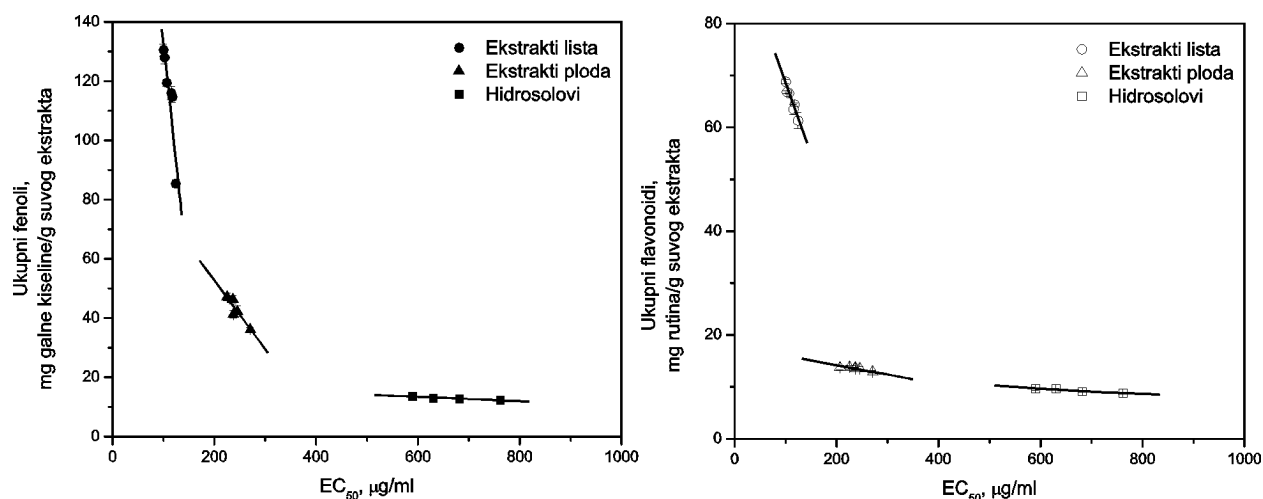
su pokazala da sa porastom snage mikrotalasa raste antioksidativna aktivnost ekstrakata na račun olakšanog oslobađanja nevezanih fenolnih kiselina. Međutim, dugotrajno izlaganje mikrotalasima velike snage dovodi do degradacije flavonoida u ekstraktima plodova mandarine (Hayat et al. 2010). Spigno i de Faveri (2009) utvrdili su da promena snage mikrotalasa i vreme izlaganja njihovom dejstvu ne utiču na antioksidativnu aktivnost crnog čaja pripremljenog u mikrotalasnoj pećnici.

Ekstrakti dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom lista i mesa ploda lovor višnje pokazuju nešto veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte dobijene klasičnom ekstrakcijom, međutim Studentovim *t*-testom pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika između ovih vrednosti ($p < 0,05$). Najmanju antioksidativnu aktivnost, u slučaju oba biljna materijala, pokazuju ekstrakti dobijeni ekstrakcijom po Soxhlet-u. Najverovatnije je razlog najmanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u oksidacija ili degradacija bioaktivnih jedinjenja nastala pri dugotrajnom dejstvu visoke temperature.

U ranijim istraživanjima, utvrđeno je da je u slučaju ekstrakata korena biljne vrste *Morinda citrifolia* najveća antioksidativna aktivnost kod ekstrakta dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u, nešto manja kod ekstrakta dobijenih pod dejstvom mikrotalasa, a značajno manja kod ekstrakata dobijenih ultrazvučnom i klasičnom ekstrakcijom. Klasična ekstrakcija trajala je 3 dana, pa je degradacija komponenti sa antioksidativnim dejstvom pripisana dugotajnom delovanju kiseonika i izloženosti svetlosti, a u slučaju ultrazvučne ekstrakcije dejstvu slobodnih radikala formiranih u tečnoj sredini. Pretpostavlja se da je smanjena antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih pod dejstvom mikrotalasa u odnosu na ekstrakte dobijene ekstrakcijom po Soxhlet-u rezultat mikrotalasnog zračenja (Hemwimon et al., 2007). Za razliku od ekstrakata korena biljne vrste *Morinda citrifolia*, a u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu, etanolni ekstrakti biljne vrste *Buddleia officinalis* Maxim (Pan et al., 2010) i kore tropskog voća (*Dimocarpus Longan* Lour.) (Pan et al., 2010) dobijeni ekstrakcijom po Soxhlet-u pokazuju manju antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte dobijene pod dejstvom mikrotalasa.

Troloks, komercijalni referentni antioksidant, pokazuje najveću sposobnost neutralizacije DPPH radikala u odnosu na ostale ispitivane uzorke, sa vrednošću EC_{50} od $82,9 \pm 1,7 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Ranijom analizom vodenog, etanolnog i acetonskog ekstrakta ploda lovor višnje utvrđeno je da najveću antioksidativnu aktivnost ima vodeni ekstrakt, kao i da je to značajno manja vrednost u odnosu na referentnu komponentu, troloks (Kolayli et al., 2003), što je u skladu sa rezultatima u ovom radu.

Analizom rezultata dobijenih u ovom radu utvrđeno je da postoje dobre korelacije ukupnog sadržaja fenola u ekstraktima lista ($R=0,92$), mesa ploda ($R=0,96$) i hidrosolovima ($R=0,99$), kao i ukupnog sadržaja flavonoida u ekstraktima lista ($R=0,96$), mesa ploda ($R=0,95$) i hidrosolovima ($R=0,95$) dobijenih pri različitim uslovima sa antioksidativnom aktivnošću, što je prikazano na slici 7.33.



Slika 7.33 Korelacija sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima i hidrosolovima lovor višnje sa antioksidativnom aktivnošću

Dobra korelacija ukupnog sadržaja bioaktivnih komponenti (fenola i flavonoida) i antioksidativnog dejstva pokazana je u slučajevima ekstrakata nadzemnog dela biljne vrste *Potentilla atrosanguinea* (Kalia et al., 2008), ekstrakata semena, lista i ploda pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides*) (Sharma et al., 2008), ekstrakata lanenog semena (Velioglu et al., 1998) i zobi (Emmons et al., 1999).

7.4.1.3. Karakterizacija ekstrakata lista i mesa ploda lovor višnje

Analizom metanolnih ekstrakata lista i mesa ploda lovor višnje dokazano je u proseku prisustvo 38, odnosno 25 komponenti, respektivno, od kojih su identifikovane hlorogena kiselina, apigenin-5-O-glukozid i luteolin-7-O-glukozid. Sadržaj identifikovanih komponenti prikazan je u tabelama 7.9 i 7.10, a neki od hromatograma na slikama 7.34 – 7.36.

Tablea 7.9 Sadržaj identifikovanih komponenti (g/100 g suvog ekstrakta) u metanolnim ekstraktima lista lovor višnje*

Komponenta	Mikrotalasna ekstrakcija			Ultrazvučna ekstrakcija	Klasična ekstrakcija	Ekstrakcija po Soxhlet-u
	300 W	150 W	300 W			
Hlorogena kiselina	28,56	30,44	27,83	15,57	18,70	14,87
Apigenin-5-O-glukozid	0,69	0,65	0,56	0,75	0,73	0,59
Luteolin-7-O-glukozid	1,74	1,73	1,75	0,63	0,65	1,04

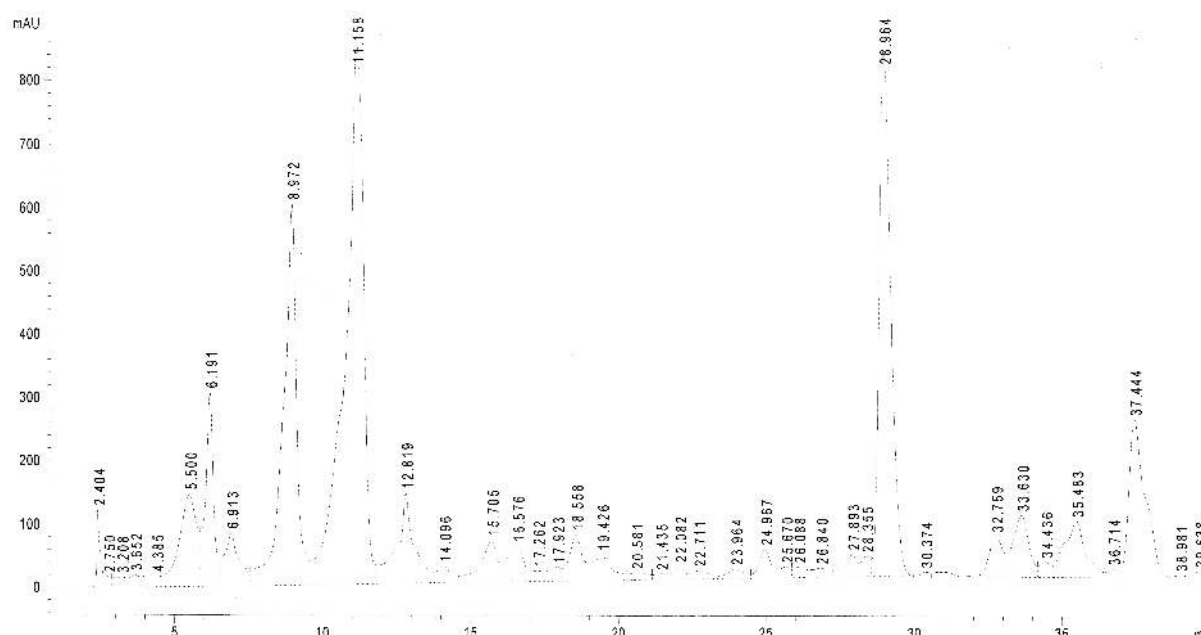
* MeOH, 15 min., 1:5 g/cm³, 65 °C

Tabela 7.10 Sadržaj identifikovanih komponenti (g/100 g suvog ekstrakta) u metanolnim ekstraktima mesa ploda lovor višnje*

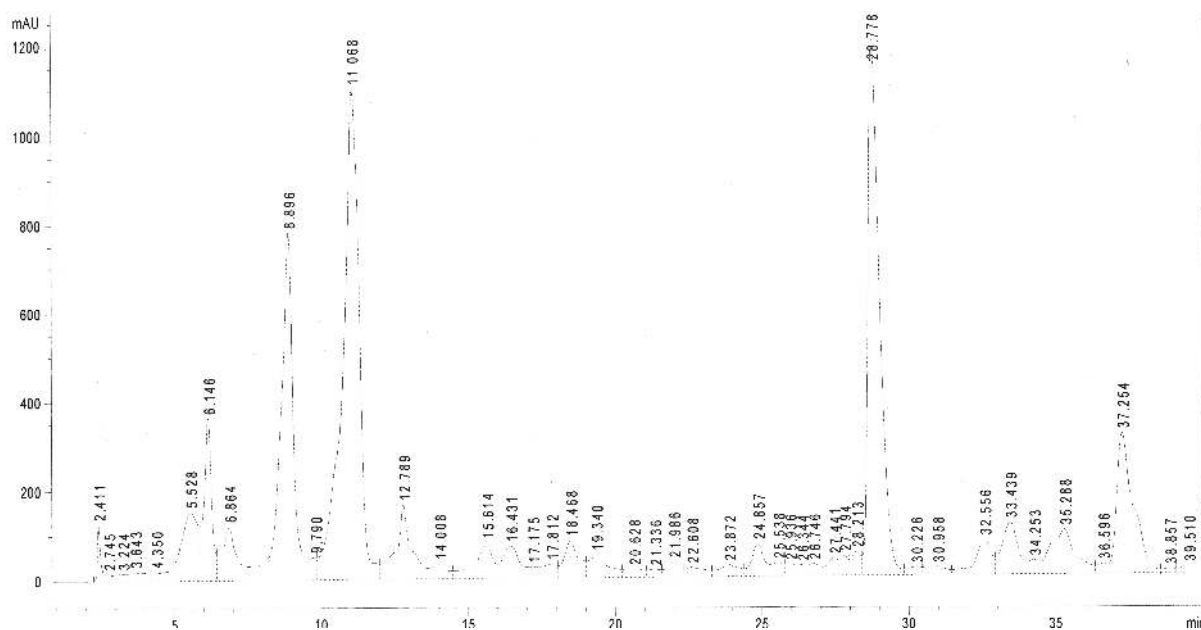
Komponenta	Mikrotalasna ekstrakcija			Ultrazvučna ekstrakcija	Klasična ekstrakcija	Ekstrakcija po Soxhlet-u
	300 W	450 W	300 W			
Hlorogena kiselina	35,21	40,03	35,17	40,83	36,49	30,39
Apigenin-5-O-glukozid	0,03	0,05	0,13	0,12	0,11	0,06
Luteolin-7-O-glukozid	0,23	0,98	0,81	1,12	0,40	0,69

* MeOH, 15 min., 1:5 g/cm³, 65 °C

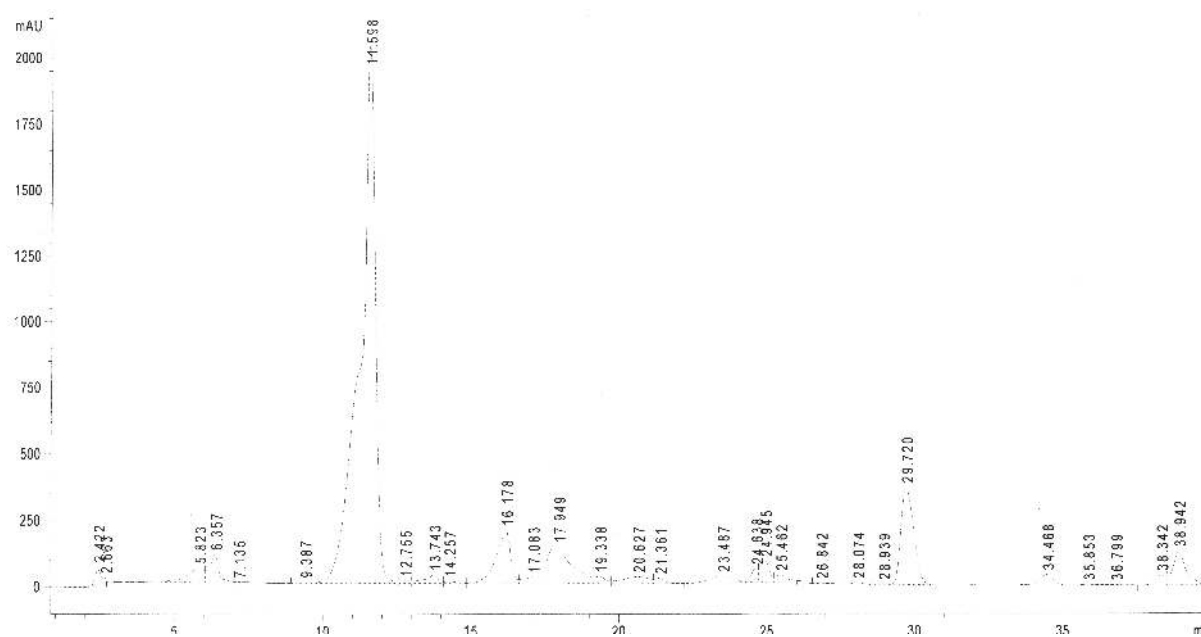
Upoređivanjem hromatograma ekstrakata lista i mesa ploda lovor višnje utvrđeno je da se oni razlikuju kvantitativno i kvalitativno, ali je poređenjem retencionih vremena utvrđeno da je većina komponenti prisutnih u ekstraktima mesa ploda prisutna i u ekstraktima lista. Nezavisno od biljnog materijala, tehnike i uslova ekstrakcije najzastupljenija komponenta u analiziranim ekstraktima je hlorogena kiselina. Ovakvi rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima koja su analizom ekstrakata i pekmeza ploda lovor višnje pokazala da je zastupljenost hlorogene kiseline 52,8; 51,2 i 65,3 % u odnosu na ukupne identifikovane slobodne fenolne kiseline u Kiraz i Findik varijetetu i pekmezu, respektivno (Alasalvar et al., 2005).



Slika 7.34 HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta lista lovor višnje dobijenog mikrotalasnom ekstrakcijom pri mikrotalasnoj snazi od 300 W



Slika 7.35 HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta lista lovor višnje dobijenog mikrotalasnom ekstrakcijom pri mikrotalasnoj snazi od 600 W



Slika 7.36 HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta ploda lovor višnje dobijenog mikrotalasnom ekstrakcijom pri mikrotalasnoj snazi od 450 W

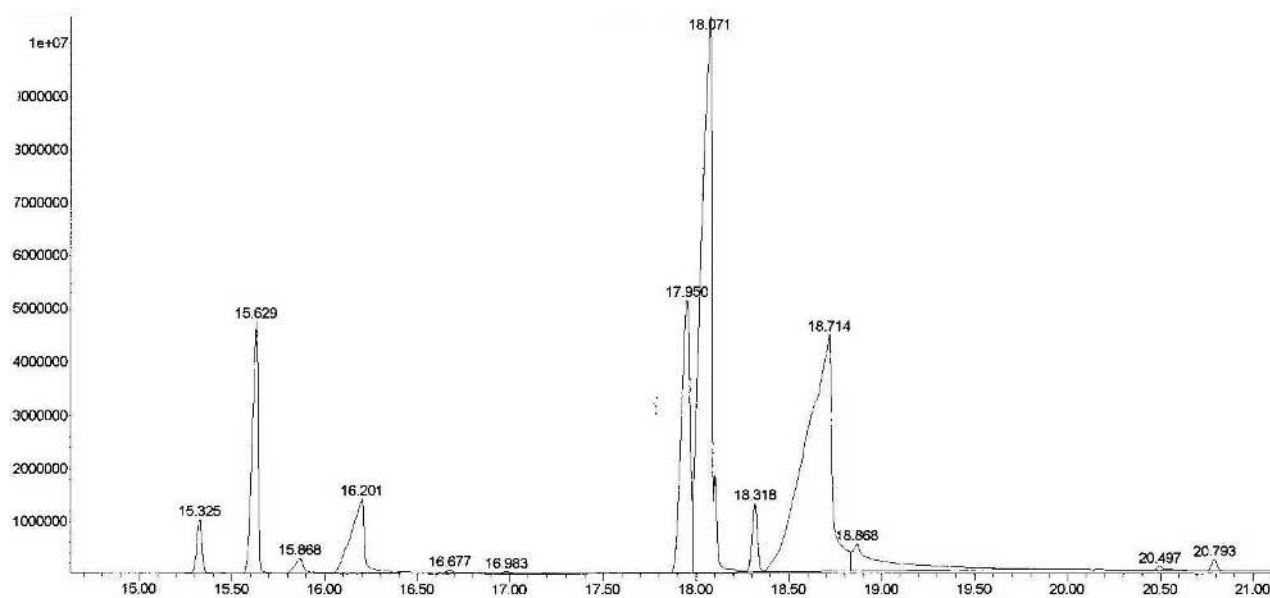
Ostale identifikovane komponente u plodovima lovor višnji ispitivanih varijeteta u ovom radu su: vanilinska, kafena, *p*-kumarinska kiselina i derivati hidroksibenzojeve kiseline (Alasalvar et al., 2005). Analizom fenolnih kiselina ploda lovor višnje (*Laurocerasus officinalis* 'Oxygemmis') utvrđeno je da su najzastupljenije kiseline benzojeva, kafena i vanilinska sa 2,53, 1,05 i 0,86 mg/100g suve materije, respektivno, dok je detektovano i prisustvo *p*-kumarinske, ferulinske, 4-hidroksi benzojeve i 3,4-dihidroksi benzojeve kiseline (Ayaz, 2001). Ayaz i sar. (1997a) su u svojim istraživanjima pokazali da je najzastupljenija komponenta u plodovima lovor višnje, divlje i uzgajane vrste, vanilinska kiselina, kao i da njen udeo varira i zavisi od vrste ali i načina uzgajanja lovor višnje.

Hlorogena kiselina je široko rasprostranjena u biljnom svetu, a veliki udeo ove komponente u odnosu na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja zabeležen je i u ekstraktima ploda domaće višnje (Nakatani et al., 2000), listova vreska (Silva et al., 2009), korena i nadzemnog dela zečije lobode (Stanojević et al., 2007), u krtoli krompira (De la Rosa et al., 2010), zrnu kafe (Jaiswal et al., 2010), borovnici, grožđu, krušci, jabuci (Kasai et al., 2000). U slučaju lista lovor višnje najveći sadržaj hlorogene kiseline prisutan je u ekstraktima dobijenim pod dejstvom mikrotalasa, dok je u slučaju mesa ploda lovor višnje ekstrakt dobijen pod dejstvom ultrazvuka najbogatiji ovom kiselinom. Identična situacija je i sa sadržajem luteolin-7-O-glukozida. U slučaju oba biljna materijala najmanji sadržaj hlorogene kiseline prisutan je u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom po Soxhlet-u. Udeo apigenin 5-O-glukozida u ekstraktima dobijenim pod dejstvom mikrotalasa opada sa porastom snage kod ekstrakta lista, dok kod ekstrakta mesa ploda lovor višnje pri istim uslovima raste. Različit uticaj mikro i ultrazvučnih talasa kako na sadržaj hlorogene kiseline, tako i na sadržaj derivata apigenina i luteolina u ekstraktima lista i mesa ploda lovor višnje verovatno potiče od razlika u prirodi i strukturi biljnog materijala, kao i od različitog sadržaja vode.

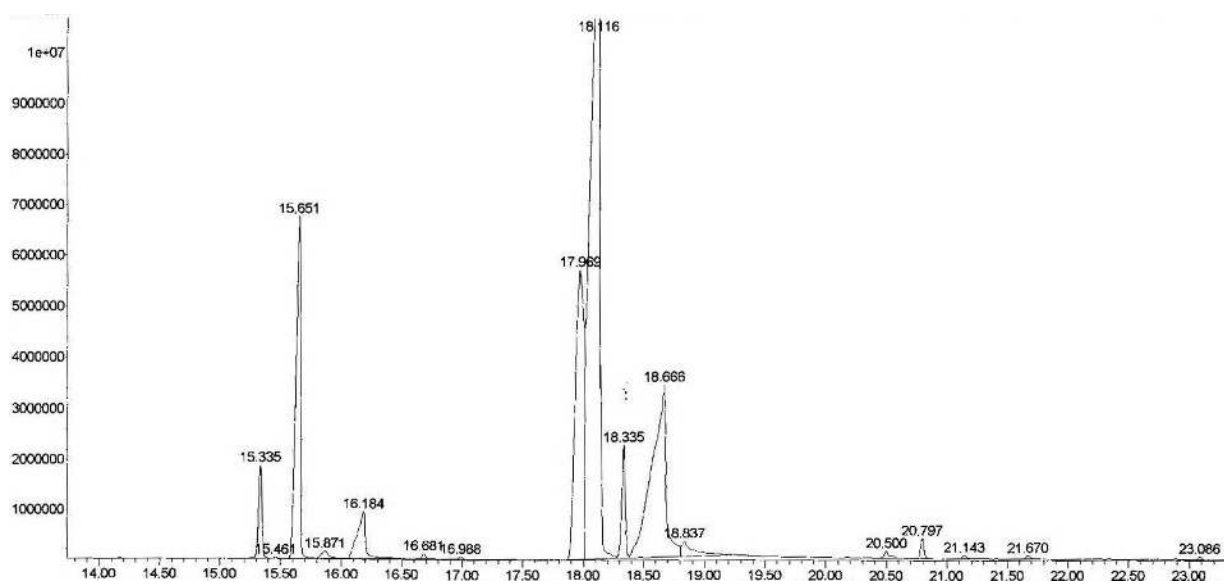
7.4.2. Sastav ulja srca koštica lovor višnje

Gasno-hromatografskom analizom metil estara masnih kiselina ulja srca koštica lovor višnje utvrđeno je da je, nezavisno od ekstrakcione tehnike i rastvarača, najzastupljenija oleinska kiselina (62,42-76,46 %), a zatim palmitinska (11,85-14,77 %), linolna (5,28-16,96 %) i stearinska (1,47-6,71 %). Ostale identifikovane masne kiseline ukupno učestvuju u sastavu ulja sa manje od 4 %, što je prikazano u tabeli 7.11, dok se primeri nekih gasnih hromatograma mogu videti na slikama 7.37 - 7.39.

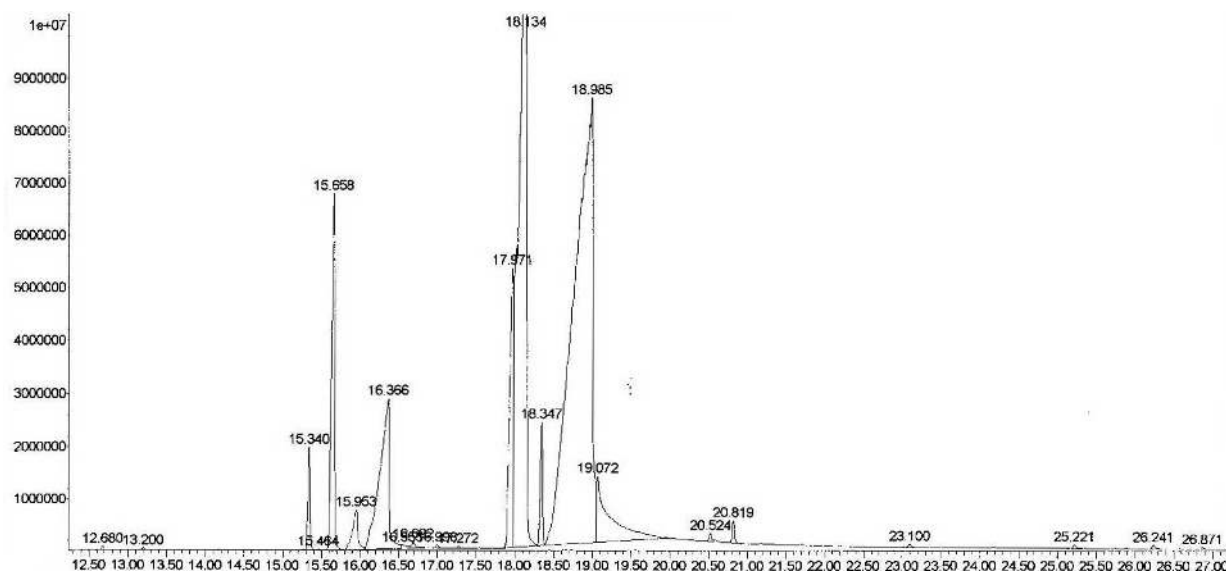
Nezavisno od tehnike ekstrakcije, ulja srca koštica lovor višnje sadrže najviše oleinske kiseline, čiji je udeo najveći u uljima koja su podvrgnuta kratkotrajnom tretmanu na temperaturi ključanja rastvarača (klasična ekstrakcija), a smanjuje se dugotrajnim tretmanom na temperaturi ključanja rastvarača (Soxhlet) i pod dejstvom mikrotalasa za oko 8 % u proseku, dok tretman ultrazvukom dovodi do smanjenja udela oleinske kiseline u ulju za oko 20 %. Sadržaj zasićenih masnih kiselina najveći je kod ulja dobijenih pod dejstvom mikrotalasa, dok ulja dobijena pod dejstvom ultrazvuka sadrže najviše polinezasićenih, a najmanje mononezasićenih masnih kiselina.



Slika 7.37 GC hromatogram metil estara masnog ulja srca koštica lovor višnje dobijenog mikrotalasnom ekstrakcijom *n*-heksanom pri mikrotalasnoj snazi od 450 W



Slika 7.38 GC hromatogram metil estara masnog ulja srca koštica lovor višnje dobijenog ultrazvučnom ekstrakcijom *n*-heksanom



Slika 7.39 GC hromatogram metil estara masnog ulja srca koštica lovor višnje dobijenog mikrotalasnom ekstrakcijom sistemom *n*-heksan:voda – 9:1 pri mikrotalasnoj snazi od 300 W

Ukupan udeo nezasićenih masnih kiselina u svim uljima je sličan i iznosi od 79 do 84 %, ali se udeo poli i mono nezasićenih kiselina razlikuje. U uljima koja sadrže više poli-nezasićenih kiselina, manji je udeo mono-nezasićenih i obrnuto, pri čemu postoji i dobra korelacija između ukupnog sadržaja ovih kiselina u uljima srca koštica lovor višnje dobijenih različitim tehnikama ekstrakcije (koeficijent korelacije $R > 0,92$).

Uočeno je da ulja dobijena ekstrakcijom pod dejstvom mikrotalasa imaju veći sadržaj stearinske kiseline, za oko dva puta odnosno za oko četiri puta u proseku u poređenju sa udelom ove kiseline u ulju dobijenom ultrazvučnom i ekstrakcijom po Soxhlet-u. Karakteristično za ova ulja je i da porast mikrotalasne snage nema većeg uticaja na sastav ulja, kao i da nezavisno od mikrotalasne snage, ulja dobijena pri ekstrakciji sistemom *n*-heksan:voda ne sadrže u svom sastavu margarinsku kiselinu. Takođe, u uljima dobijenim ekstrakcijama pod dejstvom mikrotalasa identifikovano je dva puta više lignocerinske kiseline, pri čemu prisustvo vode u sistemu za ekstrakciju, kao i promena snage mikrotalasa nema nikakvog uticaja na udeo ove kiseline.

Kod biljnih ulja podvrgnutih dejstvu mikrotalasa dolazi do stvaranja reaktivnih slobodnih radikala koji dovode do stvaranja hidroperoksida, primarnih i sekundarnih oksidacionih proizvoda, nastanka dimera i polimera, kao i smanjenja količine tokoferola (Chiavaro et al., 2010; Tan et al., 2001). Mikrotalasnim tretmanom biljnih ulja, sa vremenom, raste udeo slobodnih masnih kiselina (izražen u % oleinske kiseline) i peroksidni broj ulja (Chiavaro et al., 2010). Izvođenje ekstrakcija u atmosferi azota u ovom radu onemogućava ili usporava oksidativne procese. Kao i u ovom radu, primenom različitih tehnika ekstrakcije (mikrotalasna, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija po Soxhlet-u) ulja iz semena šipka (*Rosa canina* L.) dobijaju se ulja veoma sličnog sastava, dok je najveći prinos zabeležen pri ekstrakciji pod dejstvom mikrotalasa (Szentmihályi et al., 2002).

Tabela 7.11 Sastav ulja srca koštica lovor višnje

Metil estri masne kiseline	Mikrotalasna ekstrakcija						Ultrazvučna ekstrakcija	Klasična ekstrakcija	Ekstrakcija po Soxhlet-u
	Heksan			n-heksan:voda – 9:1					
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W			
Miristinska (C14:0)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,08	0,07	0,05
Palmitinska (C16:0)	11,98	12,79	12,11	11,85	12,17	12,77	14,03	14,77	13,74
Palmitoleinska (C16:1)	1,70	1,82	1,70	1,63	1,65	1,75	2,40	1,28	1,47
Margarinska (C17:0)	0,11	0,10	0,16	-	-	-	0,07	0,04	0,04
Stearinska (C18:0)	5,63	6,03	6,71	6,43	5,74	5,98	2,76	1,47	1,93
Oleinska (C18:1)	70,71	70,03	70,9	70,99	71,4	71,75	62,42	76,46	70,06
Linolna (C18:2)	8,74	7,11	7,31	7,79	8,02	6,63	16,96	5,28	12,11
Arahidonska (C20:4)	0,68	0,63	0,60	0,55	0,56	0,61	0,51	0,29	0,33
Behenska (C22:0)	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,08	0,05	0,05
Lignocerinska (C24:0)	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,08	0,05	0,05
Cerotinska (C26:0)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	-	-	-
Skvalen	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,06	0,06	
Sitosterol	-	-	0,14	0,14	0,09	0,12	-	-	-
Ukupno	99,85	98,83	99,95	99,7	99,96	99,93	99,45	99,82	99,83
Zasićene masne kiseline	17,98	19,2	19,26	18,56	18,2	19,03	17,1	16,45	15,86
Nezasićene masne kiseline	81,83	79,59	80,51	80,96	81,63	80,74	82,29	83,31	83,97
Mono-nezasićene masne kiseline	72,41	71,85	72,6	72,62	73,05	73,5	64,82	77,74	71,53
Polinezasićene masne kiseline	9,42	7,74	7,91	8,34	8,58	7,24	17,47	5,57	12,44

Primena mikrotalasa u slučaju ekstrakcije koštica plodova biljne vrste *Hylocereus undatus*, daje ulja koja u poređenju sa uljem dobijenim ekstrakciom po Soxhlet-u imaju dva puta manje pamtinske i oleinske, dva i po puta manje stearinske i tri odnosno četiri puta više arahidonske i eikosenske kiseline, respektivno (Rui et al., 2009). Ovakvi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima ovog rada gde u uljima dobijenim pod dejstvom mikrotalasa ima tri puta više stearinske, do duplo manje linolne i skoro isto oleinske kiseline. Poređenjem ulja ekstrahovanih iz klica soje i morske trave dobijenih ekstrakcijom po Soxhlet-u i primenom ultrazvuka utvrđeno je da su dobijena ulja gotovo identičnog sastava (Cravotto et al., 2008), dok se u slučaju ovog rada ulja dobijena primenom ove dve tehnike znatno razlikuju u pogledu sadržaja palmitoleinske, stearinske, oleinske i linolne kiseline. Ovo upućuje na zaključak da sastav ulja prvenstveno zavisi od biljnog materijala, a zatim od tehnike i uslova ekstrakcije.

Ulja dobijena ekstrakcijom srca koštica ploda lovor višnje dobar su izvor mono-nezasićenih masnih kiselina (pogotovo oleinske kiseline) koje imaju zaštitno dejstvo, snižavaju nivo LDL holesterola, usporavaju proces arteroskleroze, povoljno deluju na cirkulaciju i centralni nervni sistem (Covas, 2007; Funari et al., 2003; Lopez-Huertas, 2010; Terés et al., 2008). Visok sadržaj oleinske kiseline je u saglasnosti sa dosadašnjim ispitivanjima ulja srca koštica plodova lovor višnje poreklom iz Turske (Alasalvar et al., 2006), a utvrđeno je da masnokiselinski sastav kao i udeo pojedinih masnih kiselina u ulju varira tokom sazrevanja ploda (Ayaz i Kadioglu, 2000). Poređenjem sa drugim biljnim uljima, ulja dobijena ekstrakcijom srca koštica lovor višnje svojim masnokiselinskim sastavom veoma podećaju na maslinovo ulje, koje sadrži najviše oleinske kiseline (65-78 %), palmitinsku (10-15 %), linolnu (6-13 %) i stearinsku (3-5 %) u zavisnosti od sorte i uslova gajenja (Aparicio i Harwood, 2000; D'Imperio et al., 2007; Manai et al., 2008).

7.4.3. Sastav etarskog ulja listova lovor višnje

Etarsko ulje dobijeno iz svežih listova lovor višnje je bistra, bezbojna tečnost, karakterističnog oštrog mirisa na gorki badem koji potiče od benzaldehida. Teže je od vode, rastvara se u toluenu, a gotovo je nerastvorno u vodi.

Prema gasno-hromatografskoj analizi etarskih ulja svežih listova lovor višnje utvrđeno je da je, nezavisno od tehnike dobijanja, najzastupljenija komponenta ulja benzaldehid, sa ukupnim procentualnim udelom u svim dobijenim etarskim uljima od preko 77 %. Benzojeva kiselina i mandelonitril, sa udelima manjim od 14 % i 6 %, respektivno kao i neznatne količine 2-heksanala sastavni su deo etarskih ulja dobijenih različitim tehnikama destilacije svežih listova lovor višnje.

Sastav etarskih ulja u zavisnosti od tehnike desilacije i primer gasnih hromatograma dati su u tabeli 7.12 i na slikama 7.40 – 7.42.

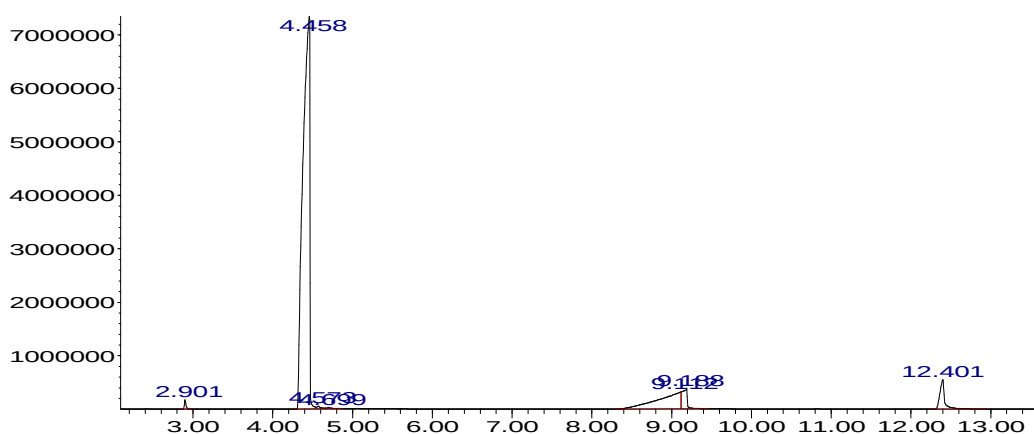
Najdužim ukupnim vremenom izlaganja sistema dejstvu mikrotalasa, u slučaju mikrotalasne hidrodestilacije pri snazi od 300 W, dobija se ulje sa najmanjim sadržajem

benzaldehida. Generalno, udeo benzaldehida se, kod obe tehnike destilacije pod dejstvom mikrotalasa, povećava sa porastom snage mikrotalasa. Velike količine benzaldehida u etarskom ulju listova lovor višnje, kao i prisustvo mandelonitrila najverovatnije potiču od amigdalina koji se u prisustvu vode i enzima lista (β -glukozidaze) razgrađuje najpre do mandelonitrila, a zatim do benzaldehida i cijanovodonične kiseline (Hui, 2006; Strugala et al., 1986). Amigdalín, disaharid koji se sastoji iz dve jedinice glukoze i cijano grupe vezane za benzenov prsten, jedinjenje je koje je karakteristično i nalazi se u listovima (Santamour, 1998) i svim tkivima biljnih vrsta *Prunus*, ali je najzastupljeniji u koštici (Haisman i Knight, 1967). Benzaldehid se u prisustvu vazduha oksiduje do benzoee kiseline (Guo et al., 2005), što objašnjava prisustvo benzoee kiseline u svim uljima, kao i najveći udeo u ulju dobijenom najdugotrajnijem postupkom (klasična hidrodestilacija; 101,1 min). Sa porastom snage povećava se udeo benzoee kiseline, a smanjuje udeo mandelonitrila u uljima nezavisno od tehnike destilacije, što najverovatnije potiče od ubrzanja razgradnje mandelonitrila i oksidacije benzaldehida pri većim snagama mikrotalasa.

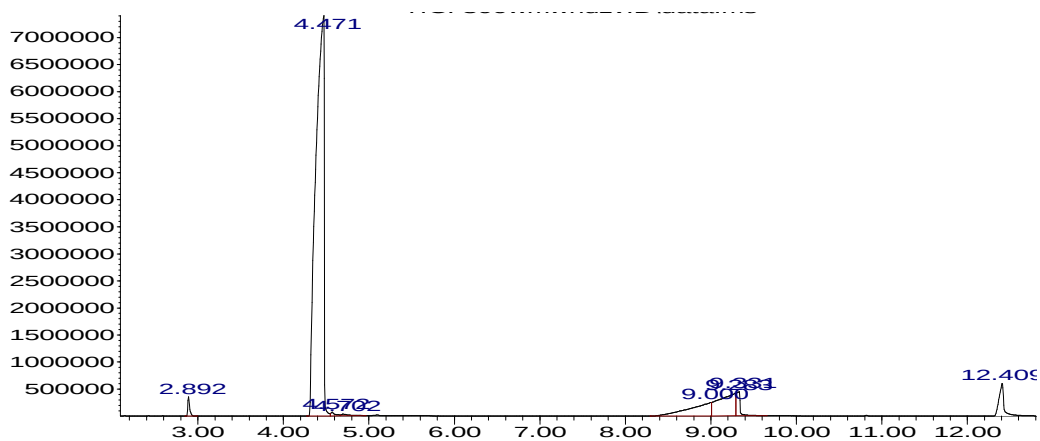
Tabela 7.12 Sastav etarskih ulja svežih listova lovor višnje dobijenih različitim tehnikama destilacije (u %)

Komponenta	Retenciono vreme	Tehnika destilacije						
		Mikrotalasna hidrodestilacija			Suva mikrotalasna destilacija			Hidrodestilacija
		300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	
2-Heksanal	2,905	0,82	0,59	0,81	1,15	1,19	1,10	0,46
Benzaldehid	4,456	77,83	83,09	84,29	81,64	82,95	83,57	80,66
Benzoeva kiselina	9,110	6,65	11,80	12,35	4,56	5,87	13,67	14,83
Mandelonitril	12,399	3,78	2,72	2,55	5,31	2,82	1,44	4,15
Ukupno identifikovano		89,08	98,20	100	92,66	92,83	99,78	96,80

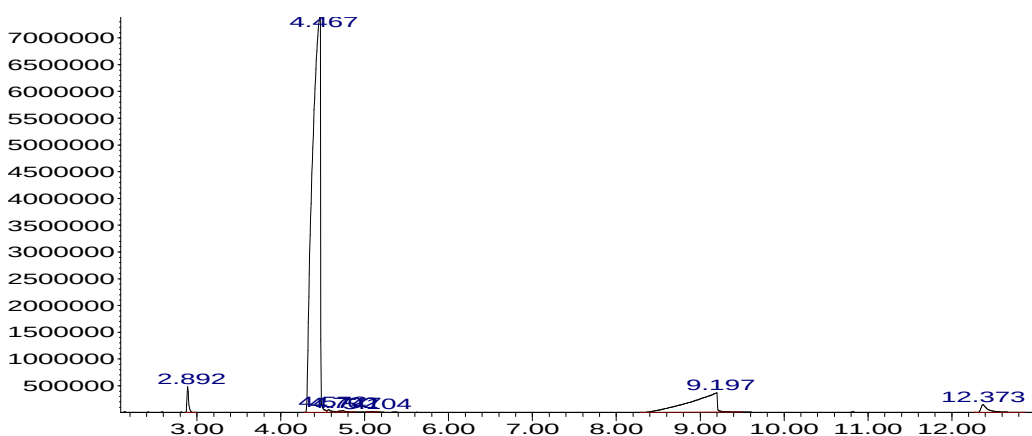
Sastav etarskih ulja dobijenih u ovom radu sličan je po velikom procentualnom udelu benzaldehida etarskom ulju lista i ploda lovor višnje sa procentnim udelom benzaldehida od 95 i 94,6 %, respektivno. U ovim uljima identifikovano je još oko 58 komponenata, koje su se razlikovale u slučaju ulja dobijenog iz lista i ploda (Mchedlidze i Kharebava, 1988).



Slika 7.40 GC hromatogram etarskog ulja listova lovor višnje dobijenih klasičnom hidrodestilacijom



Slika 7.41 GC hromatogram etarskog ulja listova lovor višnje dobijenih hidrodestilacijom pri snazi mikrotalasa od 300 W



Slika 7.42 GC hromatogram etarskog ulja listova lovor višnje dobijenih suvom destilacijom pri snazi mikrotalasa od 600 W

Zaključak da su nezavisno od primenjene tehnike destilacije, sva etarska ulja dobijena u ovom radu sličnog sastava u skladu je sa već objavljenim istraživanjima po kojima su etarska ulja dobijena primenom klasične hidrodestilacije i tehnika pod dejstvom mikrotalasa kvantitativno i kvalitativno slična (Chemat et al., 2006; Golmakania i Rezaei, 2008; Lucchesi et al., 2004b; Özek et al., 2010; Stashenko et al., 2004a, b).

Primena mikrotalasa drastično skraćuje i ubrzava proces destilacije bez uzrokovanja značajnijih promena u sastavu dobijenih etarskih ulja, dok se primenom suve destilacije pod dejstvom mikrotalasa, pored uštede u vremenu, ostvaruje i značajna ušteda energije i vode, što je ranije već opisano u literaturi (Lucchesi et al., 2004; Okoh et al., 2010).

8. Zaključak

Na osnovu ispitivanja sprovedenih u okviru ovog rada mogu se izvesti zaključci koji se odnose na kinetiku i mehanizam mikrotalasne ekstrakcije, određivanje optimalnih operativnih uslova na osnovu ostvarenih prinosa, uporednu analizu sa drugim tehnikama ekstrakcije, kao i karakterizaciju biljnog materijala i bioaktivnih komponenti lovor višnje.

- Sveži listovi lovor višnje, *Prunus laurocerasus* L. var. *serbica* Pančić, su tamno zelene boje, sjajne površine, sa prosečnim sadržajem vlage u granicama objavljenim za druge biljne vrste koje pripadaju rodu *Prunus*, dok su plodovi okrugle koštunice, tamno ljubičaste boje, dimenzija, mase i sadržaja vlage koji je u skladu je sa ranije objavljenim rezultatima.
- Ukupan sadržaj ekstraktivnih materija određen je ekstrakcijom usitnjenog biljnog materijala rastvaračima različite polarnosti metodom po Soxhlet-u. Najveći prinos u slučaju lista ($14,7 \pm 0,5$ g/100 g svežeg biljnog materijala) i mesa ploda ($42,8 \pm 0,7$ g/100 g svežeg biljnog materijala) ostvaren je ekstrakcijom metanolom.
- Ukupan sadržaj ulja, određen ekstrakcijom po Soxhlet-u sa *n*-heksanom iznosi $41,9 \pm 0,7$ g/100 g semena (računato na suhu masu semena).
- Nezavisno od biljnog materijala i operativnih uslova, utvrđeno je da se mikrotalasna ekstrakcija odvija u dve faze: faza brze ekstrakcije (ispiranje) i faza spore ekstrakcije (difuzija) čije vreme trajanja zavisi od vrste biljnog materijala, rastvarača, snage mikrotalasa i raspoložive količine rastvarača.
- Nezavisno od biljnog materijala stepen ekstrakcije u brznoj fazi ekstrakcije nalazi se u granicama od $56,7 \pm 3,0$ do $86,6 \pm 2,2$ % od prinosa ostvarenog ekstrakcijom po Soxhlet-u. U okviru ove faze postiže se prinos ekstraktivnih materija koji se vrlo malo menja sa produženjem procesa (ne više od 10 %).
- Najuticajniji faktor na prinos tokom ekstrakcije ima vrsta biljnog materijala, kao i njegove dielektrične osobine, sadržaj vlage i fizička struktura.
- U slučaju sva tri biljna materijala primenom većih snaga mikrotalasa, polarnijih rastvarača i manjeg odnosa biljnog materijala i rastvarača dobijaju se bolji prinosi.
- Na bolji prinos ekstraktivnih materija polarnijim rastvaračima (metanol i voda) utiču njihove mikrotalasne karakteristike, ali i činjenica da se u ekstrahovanim biljnim materijalima nalazi više supstanci rastvornih u polarnim rastvaračima.
- Korišćenjem modela zasnovanih na teoriji nestacionarne difuzije kroz čvrst materijal, teoriji filma i hiperbolnog modela za modelovanje procesa mikrotalasne ekstrakcije utvrđeno je da vrednosti izračunatih kinetičkih parametara prema svim modelima zavise

od snage mikrotalasa, rastvarača, biljnog materijala, odnosa biljni materijal-rastvarač, ali i kombinovanog odnosa svih ovih faktora koji se ne može lako uočiti zbog kompleksnosti procesa ekstrakcije.

- Dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima u celom periodu ekstrakcije zapaženo je kod modela zasnovanog na teoriji filma i jednačine hiperbolnog modela, dok model zasnovan na nestacionarnoj difuziji dobro „fituje“ eksperimentalne podatke samo u sporij fazi procesa ekstrakcije, od 15 minuta.
- Zbog svoje relativne jednostavnosti, fizičke zasnovanosti i dobrog slaganja kinetičke jednačine sa eksperimentalnim podacima (srednja vrednost odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti prinosa ekstraktivnih supstanci manja od $\pm 5\%$) model zasnovan na teoriji filma može se preporučiti za matematičko opisivanje kinetike mikrotalasne ekstrakcije ekstraktivnih materija iz listova i mesa ploda, kao i masnih ulja iz srca koštica lovor višnje.
- Kriterijum za izbor optimalnih uslova ekstrakcije bio je najveći prinos ukupnih ekstraktivnih materija iz lista i mesa ploda, masnih ulja iz srca koštica, pri čemu su izabrani metanol i *n*-heksan za ekstrakciju ekstraktivnih materija i masnih ulja, respektivno, dok su za optimalno vreme trajanja procesa mikrotalasne ekstrakcije i odnos biljni materijal-rastvarač, uzimajući u obzir stepen ekstrakcije, ekonomičnost i isplativost procesa, odabrani 15 minuta i 1:5 g/cm³.
- Ekstrakti i masna ulja dobijeni pod optimalnim uslovima na tri nivoa snage (300, 450 i 600 W) i za sva tri korišćena biljna materijala poređeni su po prinosu i hemijskom sastavu sa onim dobijenim ekstrakcijom po Soxhlet-u, klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom, pri čemu je dokazano da se najveći prinos dobija ekstrakcijom po Soxhlet-u, ali za znatno duže vreme. Poređenjem ostalih tehnika ekstrakcija, za isto vreme (15 minuta) i operativne uslove, najveći prinosi ostvaruju se mikrotalasnom ekstrakcijom pri većim snagama, a najmanji klasičnom ekstrakcijom na temperaturi ključanja, pri čemu na efikasnost različitih tehnika ekstrakcije veoma utiču mikrotalasne i akustične osobine korišćenih rastvarača, sadržaj vlage i struktura biljnog materijala.
- Ukupni sadržaj etarskog ulja u svežim listovima lovor višnje je $0,38 \pm 0,01$ cm³/100 g svežeg biljnog materijala, nezavisno od primenjene tehnike destilacije, ali se primenom mikrotalasa kao i izvođenjem destilacije bez prisustva vode vreme trajanja celokupnog procesa drastično smanjuje.
- Ekstrakti lista bogatiji su fenolnim jedinjenjima i flavonoidima u odnosu na ekstrakte mesa ploda lovor višnje.
- Nezavisno od biljnog materijala, najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida dobijen je ekstrakcijom pod dejstvom mikrotalasa.

- Porast snage mikrotalasa u opsegu od 300 do 600 W pozitivno se odražava na antioksidativnu aktivnost i sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima lista i mesa ploda, dok ne utiče u značajnijoj meri na sadržaj flavonoida, što je najverovatnije posledica različitosti strukture biljnih materijala i sadržaja vlage.
- Najmanji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida i najslabiju antioksidativnu aktivnost u slučaju oba biljna materijala, pokazuju ekstrakti dobijeni ekstrakcijom po Soxhlet-u, za šta je najverovatnije odgovorna degradacija bioaktivnih jedinjenja nastala pri dugotrajnom dejstvu visoke temperature.
- Analizom nerazblaženog sveže ceđenog soka ploda i hidrosolova dobijenih u postupcima klasične i mikrotalasne hidrodestilacije utvrđeno je da ovi materijali mogu biti dobar izvor fenolnih jedinjenja i flavonoida.
- Na primeru svih analiziranih bioaktivnih proizvoda dokazano je da postoji dobra korelacija saržaja ukupnih fenola i flavonoida sa antioksidativnim dejstvom.
- HPLC analizom metanolnih ekstrakta lista i mesa ploda lovor višnje identifikovano je prisustvo hlorogene kiseline, apigenin-5-O-glukozida i luteolin-7-O-glukozida.
- Nezavisno od biljnog materijala, tehnike i uslova ekstrakcije najzastupljenija komponenta u ekstraktima lista i mesa ploda lovor višnje je hlorogena kiselina.
- Najveći sadržaj hlorogene kiseline i luteolin-7-O-glukozida prisutan je u ekstraktima lista dobijenim pod dejstvom mikrotalasa, dok je u slučaju mesa ploda ekstrakt dobijen pod dejstvom ultrazvuka najbogatiji ovom kiselinom, oba ekstrakta dobijena ekstrakcijom po Soxhlet-u sadrže najmanje hlorogene kiseline. Utvrđeno je da sa porastom snage mikrotalasa udeo apigenin-5-O-glukozida u ekstraktima lista smanjuje, dok kod ekstrakta mesa ploda pri istim uslovima raste. Ovakvi zaključci objašnjavaju se različitostu u prirodi i strukturi biljnog materijala i sadržaju vlage.
- Analizom metil estara masnih kiselina ulja srca koštica lovor višnje utvrđeno je da je, nezavisno od ekstrakcione tehnike i rastvarača, najzastupljenija kiselina oleinska, zatim palmitinska, linolna i stearinska, dok miristinska, plamitoleinska, margarinska, arahidonska, behenska, lignocerinska, cerotinska kiselina, skvalen i sitosterol zajedno učestvuju u sastavu ulja sa manje od 4 %.
- Uočeno je da ulja dobijena ekstrakcijom pod dejstvom mikrotalasa imaju veći sadržaj stearinske kiseline, kao i da porast mikrotalasne snage nema većeg uticaja na sastav ulja.
- Udeo oleinske kiseline najveći je u uljima koja su podvrgnuta kratkotrajnom tretmanu na temperaturi ključanja rastvarača (klasična ekstrakcija), a smanjuje se dugotrajnim tretmanim na tempemeraturi ključanja rastvarača (Soxhlet), pod dejstvom mikro i ultrazvučnih talasa.

- Udeo nezasićenih masnih kiselina u svim uljima je sličan dok se udeo poli i mono nezasićenih kiselina razlikuje.
- Utvrđeno je da postoji dobra korelacija između ukupnog sadržaja poli- i mono nezasićenih masnih kiselina.
- U etarskom ulju svežih listova lovor višnje, nezavisno od tehnike dobijanja, najzastupljenija komponenta je benzaldehid (preko 77 %), dok su u svim analiziranim uljima prisutne benzoeva kiselina, mandelonitril i neznatne količine 2-heksanala.
- Udeo benzaldehida u uljima dobijenim tehnikama destilacije pod dejstvom mikrotalasa, povećava sa porastom snage mikrotalasa.
- Sa porastom snage povećava se udeo benzoeve kiseline u ulju, a smanjuje udeo mandelonitrila u uljima nezavisno od tehnike destilacije, što najverovatnije potiče od ubrzanja razgradnje mandelonitrila i oksidacije benzaldehida pri većim snagama mikrotalasa.
- Primena mikrotalasa drastično skraćuje i ubrzava proces destilacije bez uzrokovanja značajnijih promena u sastavu dobijenih etarskih ulja, dok se primenom suve destilacije pod dejstvom mikrotalasa, pored uštede u vremenu, ostvaruje i značajna ušteda energije i vode.

9. LITERATURA

Adams R.P. (2001), Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.

Agencija za zaštitu životne sredine (2004), *Prunus laurocerasus* L. (zeleniče, lovorvišnja) - ugroženi relik na Balkanskom poluostrvu, 08.12.2007., <<http://www.sepa.sr.gov.yu/index.php?menu=12&id=9000&akcija=showAll>>

Agrawal D.K. (1998), Microwave processing of ceramics, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 3 (5), 480-485.

Ai Z., Quo J., Wang Y., Liu Y., Zhao Q. (2006), Microwave-assisted extraction technique of apple polyphenols in apple pomace, *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* 22 (6), 188-191.

Akdeniz F., Gündoğdu M. (2007), Direct and alkali medium liquefaction of *Laurocerasus officinalis* Roem., *Energy Conversion and Management* 48 (1), 189-192.

Alasalvar C., Wanasundara U., Zhong Y., Shahidi F. (2006), Functional lipid characteristics of cherry laurel seeds (*Laurocerasus officinalis* roem.), *Journal of Food Lipids* 13 (3), 223-234.

Aluyor E.O., Ozigagu C.E., Oboh O.I., Aluyor P. (2009), Chromatographic analysis of vegetable oils: A review, *Scientific Research and Essays* 4 (4), 191-197.

Alviano D.S., Alviano C.S. (2009), Plant extracts: Search for new alternatives to treat microbial diseases, *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10 (1), 106-121.

Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Özyurt D. (2007), Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules* 12 (7), 1496-1547.

Appukkuttan P., Van der Eycken E. (2006), Microwave-assisted natural product chemistry, u: *Microwave Methods in Organic Synthesis*, Springer Berlin/Heidelberg.

Amarni F., Kadi H. (2010), Kinetics study of microwave-assisted solvent extraction of oil from olive cake using hexane. Comparison with the conventional extraction, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11 (2), 322-327.

Ayaz F.A. (1997), Studies on water soluble sugar and sugar alcohol in cultivars and wild forms of *Laurocerasus officinalis* roem., *Pakistan Journal of Botany* 29 (2), 331-336.

Ayaz F.A. (2001), Changes in phenolic acids of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* 'Oxygemmis') fruit during maturation, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 43, 23-26.

Ayaz F.A., Kadioglu A. (2000), Changes in fatty acid composition of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* 'Globigemmis') fruit during maturation, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 28 (3), 209-212.

Ayaz F.A., Kadioglu A., Reunanen M., Var M. (1997a), Phenolic acid and fatty acid composition in the fruits of *Laurocerasus officinalis* Roem. and its cultivars, *Journal of food composition and analysis* 10, 350-357.

- Ayaz F.A., Kadioglu A., Hayirlioglu-Ayaz S. (1998), Determination of some low molecular weight carbohydrates in the fruits of wild cherry laurel *Laurocerasus officinalis* Roem. using gas chromatography, Turkish Journal of Botany 22 (2), 65-68.
- Ayaz F.A., Reunanen M., Küçükislamoglu M., Var M. (1995), Seed fatty acid composition in wild form and cultivars of *Laurocerasus officinalis* Roem. Pakistan Journal of Botany, 27 (2), 305-308.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008), Biological effects of essential oils - A review, Food and Chemical Toxicology 46 (2), 446-475.
- Baranski S., Czerski P. (1976), Biological effects of microwaves, Dowden, Hutchinson & Ross Inc., Stroudsburg, PA.
- Bayramoglu B., Sahin S., Sumnu G. (2008), Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano, Journal of Food Engineering 88 (4), 535-540.
- Bayramoglu B., Sahin S., Sumnu G. (2009), Extraction of essential oil from laurel leaves by using microwaves, Separation Science and Technology 44 (3), 722-733.
- Belaya N.I., Filippenko T.A., Belyi A.V., Gribova N.Yu., Nikolaevskii A.N., Biryukova A.A. (2006), Electric-field-assisted extraction of antioxidants from bearberry (*Arctostaphylos adans*) leaves, Journal Pharmaceutical Chemistry Journal 40 (9), 504-506.
- Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J., Bernardini A., Costa J. (2008), Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation, Food Chemistry 106 (1), 132-139.
- Berdowska I., Marcinkowska A., Zieliński B., Fecka I., Banaś T. (2007), The effect of selected herb extracts on superoxide dismutase activity in Jurkat cells, Advances in Clinical and Experimental Medicine 16 (3), 361-364.
- Biesaga M., Ochnik U., Pyrzynska K. (2009), Fast analysis of prominent flavonoids in tomato using a monolithic column and isocratic HPLC, Journal of Separation Science 32 (15-16), 2835-2840.
- Bogdal D. (2005), Microwave-assisted organic synthesis: One hundred reaction procedures, Elsevier, ISBN 0080446213.
- Bottino A., Degl'Innocenti E., Guidi L., Graziani G., Fogliano V. (2009), Bioactive compounds during storage of fresh-cut spinach: The role of endogenous ascorbic Acid in the Improvement of Product Quality, Journal of Agricultural and Food Chemistry 57 (7), 2925-2931.
- Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B.Y., Chemat F. (2009), Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity, Food Chemistry 114 (1), 355-362.
- Boussetta N., Lanoisellé J.-L., Bedel-Cloutour C., Vorobiev E. (2009), Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments, Journal of Food Engineering 95 (1), 192-198.
- Bracke M.E., Vanhoecke B.W.A., Derycke L., Bolca S., Possemiers S., Heyerick A., Stevens C.V., De Keukeleire D., Depypere H.T., Verstraete W., Williams C.A., McKenna S.T., Tomar S., Sharma D., Prasad A.K., DePass A.L., Parmar V.S. (2008), Plant polyphenolics as anti-invasive cancer agents, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 8 (2), 171-185.

- Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Bilić M., Velić D. (2007), Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds, *Journal of Food Engineering* 81 (1), 236-242.
- Buckle J. (2006), Essential oils: Management and treatment of gynecologic infections and stressors, *Sexuality, Reproduction and Menopause* 4 (1), 38-41.
- Burits M., Bucar F. (2000), Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, *Phytotherapy Research* 14 (5), 323-328.
- Burt S. (2004), Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review, *International Journal of Food Microbiology* 94 (3), 223-253.
- Camel V. (2000), Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples, *Trends in analytical chemistry* 19 (4), 229-248.
- Camel, V. (2001), Recent extraction techniques for solid matrices - Supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: Their potential and pitfalls, *Analyst* 126 (7), 1182-1193.
- Carro N., Garcia C.M., Cella R. (1997), Microwave-assisted extraction of monoterpenols in must samples, *Analyst* 122 (4), 325-329.
- Casazza A.A., Aliakbarian B., Mantegna S., Cravotto G., Perego P. (2010), Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques, *Journal of Food Engineering* 100 (1), 50-55.
- Chang C., Yang M., Wen H., Chern J. (2002), Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal of Food and Drug Analysis* 10 (3), 178-182.
- Charlton A.J., Baxter N.J., Khan M. L., Moir A.J.G., Haslam E., Davies A.P., Williamson M.P. (2002), Polyphenol/peptide binding and precipitation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (6), 1593-1601.
- Chee K.K., Wong M.K., Lee H.K. (1996), Optimization of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction system with high-performance liquid chromatography/fluorescence detection and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 723 (2), 259-271.
- Chemat F., AbertVian M., Dangles O. (2007), Essential oils as antioxidants, *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 1 (1), 4-15.
- Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G., Visinoni F. (2006), Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach, *Analytica Chimica Acta* 555 (1), 157-160.
- Chen S.S., Spiro M. (1995), Kinetics of microwave extraction of rosemary leaves in hexane, ethanol and a hexane + ethanol mixture, *Flavour and Fragrance Journal* 10 (2), 101-112.
- Chen S.S., Spiro M. (1994), Study of microwave extraction of essential oil constituents from plant materials, *The Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy* 29 (4), 231-241.
- Chen Y., Xie M.Y., Gong X. F. (2007), Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*, *Journal of Food Engineering* 81 (1), 162-170.
- Choe E., Min D.B. (2009), Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8 (4), 345-358.

- Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Y., Park S.H., Kim S.K., (2002), Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison, *Plant Science*, 163 (6), 1161-1168.
- Chou S.Y., Lo S.L., Hsieh C.H., Chen C.L. (2009), Sintering of MSWI fly ash by microwave energy, *Journal of Hazardous Materials* 163 (1), 357-362.
- Cieśla Ł., Waksmundzka-Hajnos M. (2009), Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites, *Journal of Chromatography A* 1216 (7), 1035-1052.
- Clark D.E., Folz D.C., West J.K. (2000), Processing materials with microwave energy, *Materials Science and Engineering A* 287 (2), 153-158.
- Cook N.C., Samman S. (1996), Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Journal of Nutritional Biochemistry* 7 (2), 66-76.
- Cragg G.M., Newman D.J., Snader K.M. (1997), Natural products in drug discovery and development, *Journal of Natural Products* 60 (1), 52-60.
- Cravotto G., Boffa L., Mantegna S., Perego P., Avogadro M., Cintas P. (2008), Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrasonics Sonochemistry* 15 (5), 898-902.
- Csiklusnadi Kiss G.A., Forgacs E., Cserhati T., Mota T., Morais H., Ramos A. (2000), Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annuum* L.) powders, *Journal of Chromatography A* 889 (1-2), 41-49.
- Čanadanović-Brunet J. (1998), Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti, *Zadužbina Andrejević, Beograd*.
- Čanadanovic-Brunet J.M., Đilas S.M., Cetković G.S., Tumbas V.T. (2005), Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (2), 265-272.
- Četković G.S., Đilas S.M., Čanadanović-Brunet J.M., Tumbas V.T. (2003), Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L.) extracts, *Acta periodica technologica* 34, 93-102.
- Dai J., Orsat V., Vijaya Raghavan G.S., Yaylayan V. (2010), Investigation of various factors for the extraction of peppermint (*Mentha piperita* L.) leaves, *Journal of Food Engineering* 96 (4), 540-543.
- Davies K.M., Schwinn K.E. (2006), *Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis*, u "Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications", urednici Andersen O.M., Markham K.R, CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton.
- Degen T., Poppy G., Städler E. (1999), Extracting oviposition stimulants for carrot fly from host-plant leaves, *Journal of Chemical Ecology* 25 (1), 89-104.
- De Vasconcelos Silva M.G., De Abreu Matos F.J., Lopes P.R.O., Silva F.O., Holanda T.M. (2004), Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation and supercritical CO₂ extraction, *ARKIVOC* vi, 66-71.

- De la Rosa L.A., Alvarez-Parrilla E., González-Aguilar G.A. (2010), *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*, Blackwell Publishing, Ames, IA, USA.
- De Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.T. (2006), Analytical separation and detection methods for flavonoids, *Journal of Chromatography A*, 1112 (1-2), 31-63.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. (1999), Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences* 65 (4), 337-353.
- Diplock A. T., Charleux J.L., Crozier-Willi G., Kok F.J., Rice-Evans C., Roberfroid M., Stahl W., Viña-Ribes J. (1998), Functional food science and defence against reactive oxygen species, *British Journal of Nutrition* 80, S77-S112.
- Dugas A.J. Jr., Castaneda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W. (2000), Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships, *Journal of Natural Products* 63 (3), 327-331.
- Duke J.A. (1992), *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*, Boca Raton, FL. CRC Press,
<<http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/plantdisp.xsql?taxon=791>>
- Dulger B., Gonuz A. (2004), Antimicrobial activity of some Turkish medicinal plants, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 (9), 1559-1562.
- Durmaz G., Alpaslan M. (2007), Antioxidant properties of roasted apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel, *Food Chemistry* 100 (3), 1177-1181.
- Dyer J.M., Stymne S., Green A.G., Carlsson A.S. (2008), High-value oils from plants, *Plant Journal* 54 (4), 640-655.
- Đilas S., Čanadanović-Brunet J., Četković G. (2002), Antioxidants in Food, *Chemical Industry* 56 (3), 105-112.
- Edris A.E. (2007), Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review, *Phytotherapy Research* 21 (4), 308-323 (2007)
- Emmons C.L., Peterson D.M., Paul G.L. (1999), Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (12), 4894-4898.
- Erciyes A.T., Tüter-Erim M., Kabasakal O.S., Dandik L. (2006), Seed oil characteristics of *Onopordum tauricum* Willd. and *Prunus laurocerasus* L., *Fat Science Technology*, 97 (10), 387-388.
- Erdemoglu N., Küpeli E., Yeşilada E. (2003), Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine, *Journal of Ethnopharmacology* 89 (1), 123-129.
- Escarpa A., Gonzalez M.C. (2001), Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods, *Analytica Chimica Acta* 427 (1), 119-127.
- Esilsson C.S., Björklund E. (2000), Analytical-scale microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, 902 (1), 227-250.

- Es-Safi N.E., Ghidouche S., Ducrot P.H. (2007), Flavonoids: Hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity, *Molecules* 12 (9), 2228-2258.
- Fallon A., Booth R.F.G., Bell L.D. (1987), Applications of HPLC in biochemistry, Volume 17 of Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, urednici Burdon R.H., van Knippenberg P.H., Elsevier Science Publishers B.V., 1000 AE Amsterdam, The Netherlands.
- Fantom A (1988), Power Measurement Microwave, IET-The Institution of Engineering and Technology, ISBN 0863411207.
- Ferenczi-Fodor K., Vegh Z., Renger B. (2006), Thin-layer chromatography in testing the purity of pharmaceuticals, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 25 (8), 778-789.
- Ferrazzano F.G., Amato I., Ingenito A., De Natale A., Pollio A. (2009), Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea), *Fitoterapia* 80 (5), 255-262.
- Flamini G., Tebano M., Cioni P.L., Ceccarini L., Ricci A.S., Longo I. (2007), Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven, *Journal of Chromatography A* 1143 (1-2), 36-40.
- Fried B., Sherma J. (1999), Thin-layer Chromatography, Chromatographic science series, Volume 81, Marcel Dekker, Inc., New York, NY 10016.
- Fukushima Y., Ohie T., Yonekawa Y., Yonemoto K., Aizawa H., Mori Y., Watanabe M., Takeuchi M., Hasegawa M., Taguchi C., Kondo K. (2009), Coffee and Green Tea As a Large Source of Antioxidant Polyphenols in the Japanese Population, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (4), 1253-1259.
- García-Lafuente A., Guillamón E., Villares A., Rostagno M.A., Martínez J.A. (2009), Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease, *Inflammation Research* 58 (9), 537-552.
- Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot M.J. (2005), Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (5), 1370-1373.
- Giguere R.J., Bray T.L., Duncan S.M., Majetich G. (1986), Application of commercial microwave ovens to organic synthesis, *Tetrahedron Letters* 27 (41), 4945-4948.
- Gioti E.M., Fiamegos Y.C., Skalkos D.C., Stalikas C.D. (2009), Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece, *Food Chemistry* 117 (3), 398-404.
- Glišić S.B., Popadić S.V., Skala D.U. (2006), Kantarion (*Hypericum perforatum* L.) - natkritična ekstrakcija, antimikrobna i antidepresivna aktivnost ekstrakta i pojedinih komponenti, *Hemijska industrija* 60 (3-4), 61-71.
- Gocan S., Cimpan G. (2004), Review of the analysis of medicinal plants by TLC: Modern approaches, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 27 (7-9), 1377-1411.
- Golmakani M.T., Rezaei K. (2008), Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Food Chemistry* 109 (4), 925-930.
- Golmakani M.T., Rezaei, K. (2008a), Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* Boiss, *European Journal of Lipid Science and Technology* 110 (5), 448-454.

- González-Montelongo R., Gloria Lobo M., González M. (2010), Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds, *Food Chemistry* 119 (3), 1030-1039.
- Goula A.M., Adamopoulos K.G. (2009), Modeling the rehydration process of dried tomato, *Drying Technology* 27 (10), 1078-1088.
- Gribova, N.Yu., Belaya, N.I., Filippenko, T.A., Nikolaevskii, A.N., Belyi, A.V., Zaets, V.A. (2008), Electric-field-assisted extraction of antioxidants from bearberry leaves, *Pharmaceutical Chemistry Journal* 42 (3), 127-129.
- Grinberg N. (1990), *Modern thin-layer chromatography, Chromatographic science Volume 52*, Marcel Dekker, Inc., Madison Avenue, New York.
- Guderjan M., Elez-Martínez P., Knorr D. (2007), Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8 (1), 55-62.
- Gunstone F.D., Harwood J.L., Dijkstra A.J. (2007), *The lipid handbook*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL.
- Guo C.C., Liu Q., Wang X.T., Hu H.Y. (2005), Selective liquid phase oxidation of toluene with air, *Applied Catalysis A: General* 282 (1-2), 55-59.
- Guo J.T., Lee H.L., Chiang S.H., Lin F.I., Chang C.Y. (2001), Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan, *Journal of Food and Drug Analysis* 9 (2), 96-101.
- Günes, M., Alma, M.H. (2008), The effects of microwave irradiation power on the chemical composition of essential oil from the leaves of turkish bay laurel, *Journal of Electromagnetic Waves and Applications* 22 (16), 2205-2216.
- Haisman D.R., Knight D.J. (1967), The enzymic hydrolysis of amygdalin, *Biochemical Journal* 103 (2), 528-534.
- Halliwell B., Whiteman M. (2004), Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology* 142 (2), 231-255.
- Han W., Hao J.Y., Huang R.H., Deng X. (2004), Microstructure changes of fresh leaves of *Artemisia Annua* L. in the process of microwave-assisted extraction (MAE), u "Proceedings of the 4th International Conference on Separations Science and Technology: Frontiers on Separation Science and Technology", Nanning, Guangxi, China, 18-21 February 2004, urednici Tong Z., Kim S.H., World Scientific, 2004, 226-230 <<http://books.google.com/books?id=a-pqFvflbwC>>
- Hanasaki Y., Ogawa S., Fuku S. (1994), The correlation between active oxygens scavenging And antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biology & Medicine* 16 (6), 845-850.
- Hao J., Han W., Huang S., Xue B., Deng X. (2002) Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L., *Separation and Purification Technology* 28 (3) 191-196.
- Harwood, J.L. (1998), *Plant Lipid Biosynthesis: Fundamentals and Agricultural Applications*, Cambridge University Press, Cambridge.

- Havsteen B.H. (2002), The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacology and Therapeutics*, 96 (2-3), 67-202.
- Hayat K., Zhang X., Farooq U., Abbas S., Xia S., Jia C., Zhong F., Zhang J. (2010), Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace, *Food Chemistry* 123 (2), 423-429.
- Hayes, B. L. (2002), *Microwave synthesis: Chemistry at the speed of light*, CEM Publishing, Matthew, NC.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002), Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (10), 572–584.
- 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.
- Hercegová A., Dömötörövá M., Matisová E. (2007), Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination, *Journal of Chromatography A* 1153 (1-2), 54-73.
- Hirose Y., Fujita T., Ishii T., Ueno N. (2010), Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan, *Food Chemistry* 119 (4), 1300-1306.
- Hong N., Yaylayan V.A., Vijaya Raghavan G.S., Paré J.R.J., Bélanger J.M.R. (2001), Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed, *Natural Product Letters* 15 (3), 197-204.
- Huang D., Boxin O.U., Prior R.L. (2005), The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (6), 1841-1856.
- Hudaib M., Gotti R., Pomponio R., Cavrini V. (2003), Recovery evaluation of lipophilic markers from *Echinacea purpurea* roots applying microwave-assisted solvent extraction versus conventional methods, *Journal of Separation Science* 26 (1-2), 97–104.
- Hui Y.H. (2006), *Handbook of food science, technology, and engineering - 4 Volume Set*, Food science and technology - Volume 2, CRC Taylor & Francis, ISBN 0849398479.
- Ichihashi M., Ueda M., Budiyo A., Bito T., Oka M., Fukunaga M. (2003), UV-induced skin damage, *Toxicology* 189 (1-2), 21-39.
- Iriti M., Colnaghi G., Chemat F., Smadja J., Faoro F., Visinoni F.A. (2006), Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: A comparative study, *Flavour and Fragrance Journal* 21 (4), 704-712.
- Islam A. (2002), 'Kiraz' cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 30, 301–302.
- Jaiswal R., Patras M.A., Eravuchira P.J., Kuhnert N. (2010), Profile and characterization of the chlorogenic acids in green Robusta coffee beans by LC-MSn: Identification of seven new classes of compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (15), 8722-8737.
- Jetter R., Schäffer S., Riederer M. (2000), Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and

mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L., Plant, Cell and Environment 23, 619–628.

Jiang Y., David B., Tu P., Barbin Y. (2010), Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines-A review, *Analytica Chimica Acta* 657 (1), 9-18.

Jones W.P., Kinghorn A.D. (2006), Extraction of Plant Secondary Metabolites, u „Natural products isolation“ urednici Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I., Humana Press, Totowa.

Jovanović B. (1967), Fitocenoza sa zeleničetom na Ostrozubu (*Lauroceraso-Fagetum*), Pančićev zbornik u spomen 150. godišnjice njegovog rođenja, SANU, Beograd, 126-137.

Ju H.K., Chung H.W., Hong S.S., Park J.H., Lee J., Kwon S.W. (2010), Effect of steam treatment on soluble phenolic content and antioxidant activity of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*), *Food Chemistry* 119 (2), 619-625.

Kalia K., Sharma K., Singh H.P., Singh B. (2008), Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *potentilla atrosanguinea* lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (21), 10129-10134.

Kalt W., Forney C.F., Martin A., Prior R.L. (1999), Antioxidant capacity, Vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (11), 4638-4644.

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

Kasai H., Fukada S., Yamaizumi Z., Sugie S., Mori H. (2000), Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model, *Food and Chemical Toxicology* 38 (5), 467-471.

Kaufmann B., Christen P. (2002), Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, *Phytochemical Analysis* 13 (2), 105 – 113.

Kaufmann B., Christen P., Veuthey J.L. (2001), Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides, *Phytochemical Analysis* 12 (5), 327 – 331.

Kawala Z., Atamaczuk T. (1998), Microwave-enhanced thermal decontamination of soil, *Environmental Science & Technology* 32 (17), 2602-2607.

Kazakevich Y., LoBrutto R. (2007), *HPLC for pharmaceutical scientists*, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Khknen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., M.H. (1999), Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (10), 3954-3962

Kim J.Y., Kim C.L., Chung C.H. (2002), Modeling of nuclide release from low-level radioactive paraffin waste: a comparison of simulated and real waste, *Journal of Hazardous Materials* 94 (2), 161-178.

Kimbaris A.C., Siatis N.G., Daferera D.J., Tarantilis P.A., Pappas C.S., Polissiou M.G. (2006), Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*), *Ultrasonics Sonochemistry* 13 (1), 54-60.

- Kitanović S., Milenović D., Veljković V.B. (2008), Empirical kinetic models for the resinoid extraction from aerial parts of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.), Biochemical Engineering Journal 41 (1), 1-11.
- Kitanović S. (2009), magistarski rad, Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Krishnaswamy N.R. (2003), Chemistry of Natural Products: A Laboratory Handbook, Orient Blackswan.
- Kolayli S., Küçük M., Duran C., Candan F., Dinçer B. (2003), Chemical and antioxidant properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (cherry laurel) fruit grown in the Black Sea region, Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 (25), 7489-7494.
- Ku H. S., Siores E., Taube A., Ball J. A. R. (2002), Productivity improvement through the use of industrial microwave technologies, Computers & Industrial Engineering 42 (2-4), 281-290.
- Langa F., de la Cruz P., de la Hoz A., Díaz-Ortiz A., Díez-Barra E. (1997), Microwave irradiation: more than just a method for accelerating reactions, Contemporary Organic Synthesis 4, 373-386.
- Lee J., Rennaker C., Wrolstad R.E. (2008), Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods, Food Chemistry 110 (3), 782-786.
- Lehotay S.J., Hajšlová J. (2002), Application of gas chromatography in food analysis, TrAC - Trends in Analytical Chemistry 21 (9-10), 686-697.
- Lessire R., Cahoon E., Chapman K., Dyer J., Eastmond P., Heinz E. (2009), Highlights of recent progress in plant lipid research, Plant Physiology and Biochemistry 47 (6), 443-447.
- Li H., Chen B., Nie L., Yao S. (2004), Solvent effects on focused microwave assisted extraction of polyphenolic acids from *Eucommia ulmoides*, Phytochemical Analysis 15 (5), 306-312.
- Liaid A., Schwarz M., Varela R.M., Palma M., Guillén D.A., Brigui J., Macías F.A., Barroso C.G. (2010), Evaluation of various extraction techniques for obtaining bioactive extracts from pine seeds, Food and Bioproducts Processing 88 (2-3), 247-252.
- Lidström P., Tierney J., Wathey B., Westman J. (2001), Microwave assisted organic synthesis - a review, Tetrahedron 57 (45), 9225-9283.
- Ligor M., Buszewski B. (2007), Thin layer chromatographic techniques (TLC, OP TLC) for determination of biological activated compounds from herb extracts, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 30 (17), 2617-2628.
- Liu Y., Wang M.W. (2008), Botanical drugs: Challenges and opportunities, Life Sciences 82 (9-10), 445-449.
- Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F., Alasalvar C. (2006), Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice, Food Chemistry 99 (1), 121-128.
- Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. (2004a), An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices, Flavour and Fragrance Journal 19 (2), 134-138.
- Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. (2004b), Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, Journal of Chromatography A 1043 (2), 323-327.

- Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F. (2007), Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil, *Journal of Food Engineering* 79 (3), 1079-1086.
- Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. (2008), Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta* 613 (1), 1-19.
- Mahesar S.A., Sherazi S.T.H., Abro K., Kandhro A., Bhanger M.I., van de Voort F.R., Sedman J., (2008), Application of microwave heating for the fast extraction of fat content from the poultry feeds, *Talanta* 75 (5), 1240-1244.
- Marais J.P.J., Deavours B., Dixon R.A., Ferreira D. (2006), *The Stereochemistry of Flavonoids*, u "Science of Flavonoids" urednik Grotewold E., Springer Science Business Media, Inc., 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA
- Marković D., Cakić S., Nikolić G. (1997), *Hromatografija – Teorijske osnove sa praktikumom*, Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Marston A. (2007), Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry, *Phytochemistry* 68 (22-24), 2786-2798.
- Marjanović-Balaban Ž., Miletić P. (2005), Uticaj mikrotalasa na brzinu destilacije i prinos eteričnog ulja iz drvnog zelenila četinara, *Hemijska industrija* 59 (9-10), 259-262.
- Marques L.G., Prado M.M., Freire J.T. (2009), Rehydration characteristics of freeze-dried tropical fruits, *LWT - Food Science and Technology* 42 (7), 1232-1237.
- Marston A., Hostettmann K. (2009), Natural product analysis over the last decades, *Planta Medica* 75 (7), 672-682.
- Mchedlidze V.B., Kharebava L.G. (1988), Volatile compounds of cherry laurel, *Subtropicheskie Kul'tury* 5, 106-110 (Journal written in Russian).
- Meireles A. (2008), *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*, CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Merken H.M., Beecher G.R. (2000), Measurement of food flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (3), 577-599.
- Mijin D.Ž., Petrović S.D. (2005), Microwaves in organic chemistry and organic chemical technology, *Hemijska industrija* 59 (9-10), 224-229.
- Milenović D. (2002), *Analiza kinetike procesa ekstrakcije čvrsto-tečno*, magistarski rad, Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Milenović D., Veljković V., Todorović Z., Stanković M. (2002), Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.) I. Efikasnost i optimizacija ekstrakcije, *Hemijska industrija* 56 (2), 54-60.
- Milojević S.Ž., Stojanović T.D., Palić R., Lazić M.L., Veljković V.B. (2008), Kinetics of distillation of essential oil from comminuted ripe juniper (*Juniperus communis* L.) berries, *Biochemical Engineering Journal* 39 (3), 547-553.
- Milosavljević S. (1994), *Strukturne instrumentalne metode*, Hemijski fakultet, Beograd.

Mimica-Dukic N. (1992), Ispitivanje sekundarnih biomolekula u nekim vrstama roda *Mentha*, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.

Mišan A. (2009), Antioksidantna svojstva lekovitog bilja u hrani, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.

Mišović J., Ast T. (1987), Instrumentalne metode hemijske analize, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.

Moon J.K., Shibamoto T. (2009), Antioxidant assays for plant and food components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (5), 1655-1666.

Morsy M.A., Khaled M.M. (2001), Direct electron paramagnetic resonance study of tobacco. 1. Manganese(II) as a marker, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2), 683-686.

Morsy M.A., Khaled M.M. (2002), Novel EPR characterization of the antioxidant activity of tea leaves, *Spectrochimica Acta Part A* 58 (6), 1271-1277.

Moure A., Cruz J.M., Franco D., Manuel Dominguez J., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Carlos Parajo J. (2001), Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry* 72 (2), 145-171.

Murav'ev I.A., Ponomarev V.D., Pshukov Y.G. (1973), Diffusion coefficients of substances in the extraction of dry and swollen vegetable raw material, *Pharmaceutical Chemistry Journal* 7 (4), 242-244.

Naithani R., Huma L.C., Holland L.E., Shukla D., McCormick D.L., Mehta R.G., Moriarty R.M. (2008), Antiviral activity of phytochemicals: A comprehensive review, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 8 (11), 1106-1133.

Nakatani N., Kayano S.I., Kikuzaki H., Sumino K., Katagiri K., Mitani T. (2000), Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11), 5512-5516.

Németh A.S., Márczy J.S., Samu Z., Hágér-Veress A., Szajáni B. (2004), Biocatalytic production of 2(E)-hexenal from hydrolysed linseed oil, *Enzyme and Microbial Technology* 34 (7), 667-672.

Nichenametla S.N., Taruscio T.G., Barney D.L., Exon J.H. (2006), A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46 (2), 161-183.

Okoh O.O., Sadimenko A.P., Afolayan A.J. (2010), Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods, *Food Chemistry* 120 (1), 308-312.

Özek G., Demirci F., Özek T., Tabanca N., Wedge D.E., Khan S.I., Başer K.H.C., Duran A., Hamzaoglu E. (2010), Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity, *Journal of Chromatography A* 1217 (5), 741-748.

Özgül-Yücel S. (2005), Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82 (12), 893-897.

Padda M.S., Picha D.H. (2007), Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots, *Journal of Food Science* 72 (7), C412-C416.

- Pan X., Liu H., Jia G., Shu Y. (2000), Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root, *Biochemical Engineering Journal* 5 (3), 173-177.
- Pan X., Niu G., Liu H. (2002), Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* bunge, *Biochemical Engineering Journal* 12 (1), 71-77.
- Pan X., Niu G., Liu H. (2003), Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves, *Chemical Engineering and Processing* 42 (2), 129-133.
- Pan Y., He C., Wang H., Ji X., Wang K., Liu P. (2010), Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component, *Food Chemistry* 121 (2), 497-502.
- Pan Y., Wang K., Huang S., Wang H., Mu H., He C., Ji X., Zhang J., Huang F. (2008), Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel, *Food Chemistry* 106 (3), 1264-1270.
- Pare J. R.J., Sigouin M., Lapointe J. (1991), Microwave-assisted natural products extraction, US Patent 5002784.
- Pastor A., Vázquez E., Ciscar R., De La Guardia M. (1997), Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments, *Analytica Chimica Acta* 344 (3), 241-249.
- Paterson I.F., Chodhry B.Z., Leharne S.A. (1999), Polycyclic aromatic hydrocarbon extraction from a coal tar-contaminated soil using aqueous solutions of nonionic surfactants, *Chemosphere* 38 (13), 3095-3107.
- PDQ, National Cancer Institute online database, Laetrile/Amygdalin (2007), 12.04.2008. http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/cam/laetrile/patient/23.cdr#Section_23
- Pekić, B. (1983): Hemija i tehnologija farmaceutskih proizvoda (alkaloidi i etarska ulja). Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Perez-Cacho P.R., Rouseff R.L. (2008), Fresh squeezed orange juice odor: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48 (7), 681-695.
- Perreux L., Loupy A. (2001), A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations, *Tetrahedron* 57 (45), 9199-9223.
- Peschel W., F. Sánchez-Rabaneda, Diekmann W., Plescher A., Gartzía I., Jiménez D., Lamuela-Raventós R., Buxaderas S., Codina C. (2006), An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes, *Food Chemistry* 97 (1), 137-150.
- Petry R.D., González Ortega G., Silva W.B. (2001), Flavonoid content assay: Influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride - Flavonoid complex, *Pharmazie* 56 (6), 465-470.
- Petti S., Scully C. (2009), Polyphenols, oral health and disease: A review, *Journal of Dentistry* 37 (6), 413-423.
- Ph. Jug. V (2000), Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Beograd.

- Phutdhawong W., Kawaree R., Sanjaiya S., Sengpracha W., Buddhasukh D. (2007), Microwave-assisted isolation of essential oil of *Cinnamomum iners* Reinw. ex Bl.: Comparison with conventional hydrodistillation, *Molecules* 12 (4), 868-877.
- Pieroni A. (2000), Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy, *Journal of Ethnopharmacology* 70 (3), 235-273.
- Pietta P.G. (2000), Flavonoids as Antioxidants, *Journal of Natural Products* 63 (7), 1035-1042.
- Pisseri F., Bertoli A., Pistelli L. (2008), Essential oils in medicine: principles of therapy, *Parassitologia* 50 (1-2), 89-91.
- Plants For A Future (2004), *Prunus laurocerasus* - L. Cherry Laurel, 24.10.2007.
<http://www.pfaf.org/database/plants.php?Prunus+laurocerasus>
- Plečaš I.B. (2003), Comparison of mathematical interpretation in radioactive waste leaching, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 258 (2), 435-437.
- Plusnin A.N., Tikhonova L.A. (1996), Swelling kinetics of plant raw materials for drugs. Swelling of gentian leaves in water and water-alcohol mixtures, *Pharmaceutical Chemistry Journal* 30 (2), 110-113.
- Пономарев В.Д. (1976), Экстрагирование лекарственного сырья, Медицина, Москва.
- Pourcel L., Routaboul J.-M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. (2007), Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions, *Trends in Plant Science* 12 (1), 29-36.
- Presti M.L., Ragusa S., Trozzi A., Dugo P., Visinoni F., Fazio A., Dugo G., Mondello L. (2005), A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil, *Journal of Separation Science* 28 (3), 273-280.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005), Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (10), 4290-4302.
- Polovka M., Suhaj M. (2010), Detection of caraway and bay leaves irradiation based on their extracts' antioxidant properties evaluation, *Food Chemistry* 119 (1), 391-401.
- 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.
- 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.
- Pyrzyska K., Biesaga M. (2009), Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 28 (7), 893-902.
- Raffi J., Yordanov N.D., Chabane S., Douifi L., Gancheva V., Ivanova S. (2000), Identification of irradiation treatment of aromatic herbs, spices and fruits by electron paramagnetic resonance and thermoluminescence, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 56 (2), 409-416.
- Ratnayake W.M.N., Galli C. (2009), Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper, *Annals of Nutrition and Metabolism* 55 (1-3), 8-43.

- Reichling J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R. (2009), Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties - An overview, *Forschende Komplementarmedizin* 16 (2), 79-90.
- Reimbert G.C., Minzoni A.A., Smyth N.F. (1996), Effect of radiation losses on hotspot formation and propagation in microwave heating, *IMA Journal of Applied Mathematics (Institute of Mathematics and Its Applications)* 57 (2), 165-179.
- Reverchon E. (1997) , Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *Journal of Supercritical Fluids* 10 (1), 1-37.
- Rezvanpanah S., Rezaei K., Razavi S. H., Moini S. (2008), Use of microwave-assisted hydrodistillation to extract the essential oils from *Satureja hortensis* and *Satureja montana*, *Food Science and Technology Research* 14 (3), 311-314.
- Reich E, Schibli A. (2007), High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants, Thieme Medical Publishers Inc., New York, NY 10001.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996), Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine* 20 (7), 933-956.
- Robbins R.J. (2003), Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (10), 2866-2887.
- Rodriguez R., Oderiz V., Hernandez L., Lozano S. (1992), Study on chemical composition - physical characteristics and ripeness index of *Prunus laurocerasus* L. and *Sambucus nigra* L., *Industrie Alimentari* 31 (308), 911-917.
- Rostagno M.A., Palma M., Barroso C.G. (2007), Microwave assisted extraction of soy isoflavones, *Analytica Chimica Acta* 588 (2), 274-282.
- Rui H., Zhang L., Li Z., Pan Y. (2009), Extraction and characteristics of seed kernel oil from white pitaya, *Journal of Food Engineering* 93 (4), 482-486.
- Ruiz-Rodriguez A., Reglero G., Ibañez E. (2010), Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (2), 305-326.
- Sanchez-Avila N., Priego-Capote F., Ruiz-Jimenez J., Luque de Castro M.D. (2009), Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction, *Talanta* 78 (1), 40-48.
- Sanchez-Moreno C. (2002), Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science and Technology International* 8 (3), 121-137.
- Santamour Jr.F.S. (1998), Amygdalin in *Prunus* leaves, *Phytochemistry* 47 (8), 1537-1538.
- Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M. (2005), Polyphenols: antioxidants and beyond, *The American Journal of Clinical Nutrition* 81 (1 Suppl), 215S-217S.
- Schnaubelt, K. (1999), Medical aromatherapy, healing with essential oils, Chapter 11, 1st edition CA: North Atlantic Books.
- Scott A.W. (1993), Understanding microwaves, John Wiley & Sons, Inc, Canada.

- Shahidi F., Naczk M. (1995), Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications, Technomic Publishing Co., Lancaster, PA.
- Seidel A., Zimmels Y. (1998), Mechanism and kinetics of aluminum and iron leaching from coal fly ash by sulfuric acid, Chem. Eng. Sci. 53 (1998) 3835-3852.
- Shan J.J., Rodgers K., Lai C.T., Sutherland S.K. (2007), Challenges in natural health product research: The importance of standardization, Proceedings of the Western Pharmacology Society 50, 24-30.
- Sharma U.K., Sharma K., Sharma N., Sharma A., Singh H.P., Sinha A.K. (2008), Microwave-assisted efficient extraction of different parts of Hippophae rhamnoides for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (2), 374-379.
- Shu Y.Z. (1998), Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry Perspective, Journal of Natural Products 61 (8), 1053-1071.
- Silva G.L., Lee I.S., Kinghorn A.D. (1998), Special Problems with the Extraction of Plants, u „Natural products isolation“ urednici Richard J. P. Cannell Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Silva F.V.M., Martins A., Salta J., Neng N.R., Nogueira J.M.F., Mira D., Gaspar N., Justino J., Grosso C., Urieta J.S., Palavra A.M.S., Rauter, A.P. (2009), Phytochemical profile and anticholinesterase and antimicrobial activities of supercritical versus conventional extracts of *Satureja montana*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 57 (24), 11557-11563.
- Sinclair G.W., Peppas N.A., (1984), Analysis of non-fickian transport in polymers using simplified exponential expression, Journal of Membrane Science 17 (3), 329-331.
- 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.
- Sinha A.K., Sharma U.K., Sharma N. (2008), A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents, International Journal of Food Sciences and Nutrition 59 (4), 299-326.
- Skala D., Žižović I., Petrović S. (1999), Etarska ulja – Destilacija, ekstrakcija, izbor tehnologije i kvalitet, Hemijska Industrija 53 (4-5), 123-138.
- Skala D., Žižović I., Gavrančić S. (2002), Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, Hemijska industrija 56 (5), 179 - 190.
- Slabas A.R., Fawcett T., Griffiths G., Stobard K. (1993), Biochemistry and molecular biology of lipid biosynthesis in plants: potential for genetic manipulation, u "Biosynthesis and manipulation of plant products", Plant biotechnology, Vol. 3, urednik Grierson D., Cambridge University Press, Cambridge.
- Smith R.L., Cohen S.M., Doull J., Feron V.J., Goodman J.I., Marnett L.J., Portoghese P.S., Waddell W.J., Wagner B.M., Hall R.L., Higley N.A., Lucas-Gavin C., Adams T.B. (2005), A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: Essential oils, Food and Chemical Toxicology 43 (3), 345-363.
- Soler C., Mañes J., Picó Y. (2008), The role of the liquid chromatography-mass spectrometry in pesticide residue determination in food, Critical Reviews in Analytical Chemistry 38 (2), 93-117.

- Sopade P.A., Kaimur K. (1999), Application of Peleg's equation in desorption of food systems. A case study with sago (*Metroxylon sagu* rottb.) starch, *Drying Technology* 17 (4-5), 975–989.
- Sovilj, M., Spasojević, M. (2001), Proizvodnja i primena etarskih ulja iz domaćeg lekovitog bilja, *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi / PTEP* 5 (1-2), 34-38.
- Sparr Eskilsson C., Björklund E. (2000), Analytical-scale microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A* 902 (1), 227-250.
- Spigno G., De Faveri D.M. (2009), Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study, *Journal of Food Engineering* 93 (2), 210-217.
- Spiro M., Chen S.S. (1995), Kinetics of isothermal and microwave extraction of essential oil constituents of peppermint leaves into several solvent systems, *Flavour and Fragrance Journal* 10 (4), 259-272.
- Stalikas C.D. (2007), Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *Journal of Separation Science* 30 (18), 3268-3295.
- Stammitti L., Derridj S., Garrec J.P. (1996), Leaf epicuticular lipids of *Prunus laurocerasus*: importance of extraction methods, *Phytochemistry* 43 (1), 45-48.
- Stanisavljević I.T., Lazić M.L., Veljković V.B. (2007), Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds, *Ultrasonics Sonochemistry* 14 (5), 646-652.
- Stanisavljević I., Stojićević S., Veličković D., Lazić M., Veljković V. (2008), Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from plantain (*Plantago major* L.) leaves, *Separation Science and Technology* 43 (14), 3652-3662.
- Stanisavljević I., Stojićević S., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2009a), Antioxidant and antimicrobial activities of echinacea (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction, *Chinese Journal of Chemical Engineering* 17 (3), 478-483.
- Stanisavljević I., Stojićević S., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2011), Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp. recovered by different extraction techniques, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, IN PRESS.
- Stanisavljević I.T., Veličković D.T., Todorović Z.B., Lazić M.L., Veljković V.B. (2009b), Comparison of techniques for the extraction of tobacco seed oil, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111 (5), 513 – 518.
- Stankiewicz A. (2006), Energy matters - Alternative sources and forms of energy for intensification of chemical and biochemical processes, *Chemical Engineering Research and Design* 84 (A7), 511-521.
- Stanković M.Z. (2002), Bioaktivni proizvodi prirodnog porekla, *Zbornik radova Tehnološkog fakulteta, Leskovac*, 12, 33-51.
- Stanković M.Z., Cakić M.D., Cvetković D.M., Veljković V.B. (1994), Kinetics of extraction of resinoids from overground parts of sweet clover (*Melilotus officinalis* L.), *Journal of the Serbian Chemical Society* 59 (10), 735-741.
- Stanojević Lj., Stanković M., Nikolić Lj., Nikolić V. (2007), The influence of the operation conditions and the extraction techniques on the yield, kinetics and the composition of ethanol extracts of *Hieracium pilosella* L., *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 13 (4), 199-204.

- Stashenko E.E., Jaramillo B.E., J. R. Martínez (2004a), Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography, *Journal of Chromatography A* 1025 (1), 105-113.
- Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martínez J.R. (2004b), Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity, *Journal of Chromatography A* 1025 (1), 93-103.
- Staško A., Brezová V., Biskupič S., Mišić V. (2007), The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents, *Free Radical Research* 41 (4), 379-390.
- Staško A., Polovka M., Brezová V., Biskupič S., Malík F. (2006), Tokay wines as scavengers of free radicals (an EPR study), *Food Chemistry* 96 (2), 185-196.
- Stevanović V. ed. (1999), Crvena knjiga flore Srbije 1 - iščezli i krajnje ugroženi taksoni, Ministarstvo za životnu sredinu Republike Srbije, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu i Zavod za zaštitu prirode Republike Srbije, ISBN 86-7078-012-7.
- Stevenson D.E., Hurst R.D. (2007), Polyphenolic phytochemicals - Just antioxidants or much more?, *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (22), 2900-2916.
- Stojičević S., Stanisavljević I., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2008), Comparative screening of antioxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques, *Journal of the Serbian Chemical Society* 73 (6), 597-607.
- Strugala G.J., Rauws A.G., Elbers R. (1986), Intestinal first pass metabolism of amygdalin in the rat in vitro, *Biochemical Pharmacology* 35 (13), 2123-2128.
- Swern D. (1972), Industrijski proizvodi ulja i masti po Baileyju, Nakladni zavod Znanje, Zagreb.
- Szydłowska-Czerniak A., Karlovits G., Hellner G., Szlyk E. (2010), Effect of enzymatic and hydrothermal treatments of rapeseeds on quality of the pressed rapeseed oils: part II. Oil yield and oxidative stability, *Process Biochemistry* 45 (2010) 247-258
- Tahara S. (2007), A Journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71 (6), 1387-1404.
- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen Ba G., Mathe G. (2002), Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies?, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56 (4), 200-207.
- Tepe B., Akpulat H.A., Sokmen M., Daferera D., Yumrutas O., Aydin E., Polissiou M., Sokmen A. (2006), Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisatum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey, *Food Chemistry* 97 (4), 719-724.
- Tepić A. (2009), Karakteristike oleorizina mlevene začinske paprike dobijenog klasičnom i ekstrakcijom superkričnim ugljen-dioksidom, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Thostenson E.T., Chou T.W. (1999), Microwave processing: Fundamentals and applications, *Composites part A: Applied Science and Manufacturing* 30 (9), 1055-1071.
- Tigrine-Kordjani N., Meklati B.Y., Chemat F. (2006), Microwave 'dry' distillation as an useful tool for extraction of edible essential oils, *International Journal of Aromatherapy* 16 (3-4), 141-147.

- Tolmač D. (2004), Tehnološko rešenje sušare za lekovito bilje, Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi - PTEP 8 (1-2), 50-51.
- Treybal R.E. (1985), Mass transfer operations, 3th ed., McGraw-Hill, Singapore.
- Tsao R., Deng Z. (2004), Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 812 (1-2 SPEC. ISS.), 85-99.
- Tsao R., Yang R. (2003), Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A 1018 (1), 29-40.
- Van Beek T.A., Montoro P. (2009), Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals, Journal of Chromatography A 1216 (11), 2002-2032.
- Var M., Ayaz F.A. (2004), Changes in sugar composition in cherry laurel (cv oxygemmis) fruit during development and ripening, Pakistan Journal of Botany 36 (2), 389-394.
- Varvaresou A., Papageorgiou S., Tsirivas E., Protopapa E., Kintziou H., Kefala V., Demetzos C. (2009), Self-preserving cosmetics, International Journal of Cosmetic Science 31 (3), 163-175.
- Vega-Gálvez A., Notte-Cuello E., Lemus-Mondaca R., Zura L., Miranda M. (2009), Mathematical modelling of mass transfer during rehydration process of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller), Food and Bioproducts Processing 87 (4), 254-260.
- Veit M., Beckert C., Hohne C., Bauer K., Geiger H. (1995), Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus Equisetum subgenus Equisetum, Phytochemistry 38 (4), 881-891.
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. (1998), Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (10), 4113-4117.
- Veličković D. (2005), Kinetika ultrazvučne ekstrakcije i hemijski sastav ekstrakta biljnih vrsta žalfije (*Salvia* L.), doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu, Leskovac.
- Veličković D. (2003), Vrste roda žalfija – hemijski sastav i antimikrobno delovanje, Zadužbina Andrejević, Beograd.
- 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.
- Veljković, V., Milenović, D. (2002), Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.) II. Poređenje modela kinetike ekstrakcije, Hemijska industrija 56 (2), 60-67.
- Venkatesh M.S., Raghavan G.S.V. (2004), An overview of microwave processing and dielectric properties of agri-food materials, Biosystems Engineering 88 (1), 1-18.
- Villaño, D., Fernandez-Pachon, M. S., Moya, M. L., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. C. (2007), Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, Talanta, 71 (1), 230-235
- Vinatoru M. (2001), An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, Ultrasonic Sonochemistry 8 (3), 303-313.

- Vinatoru M., Maricela T., Mason T.J. (1999), Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents, *Advances in Sonochemistry* 5, 209-248.
- Vinatoru M., Toma M., Radu O., Filip P.I., Lazurca D., Mason T.J. (1997), The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials, *Ultrasonic Sonochemistry* 4 (2), 135-139.
- Volpi N., Bergonzini G. (2006), Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42 (3), 354-361.
- Vongsangnak W., Gua J., Chauvatcharin S., Zhong J.J. (2004), Towards efficient extraction of notoginseng saponins from cultured cells of *Panax notoginseng*, *Biochemical Engineering Journal* 18 (2), 115-120.
- Wang H., Provan G.J., Helliwell K. (2000), Tea flavonoids: Their functions, utilisation and analysis, *Trends in Food Science and Technology* 11 (4-5), 152-160.
- Wang L., Weller C.L. (2006), Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science and Technology* 17 (6), 300-312.
- Wang Z., Ding L., Li T., Zhou X., Wang L., Zhang H., Liu L., Li Y., Liu Z., Wang H., Zeng H., He H. (2006), Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim., *Journal of Chromatography A* 1102 (1-2), 11-17.
- Wall P.E. (2005), Thin-layer chromatography: a modern practical approach, Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge CB4 0WF, UK.
- Wolfender J.L. (2009), HPLC in natural product analysis: The detection issue, *Planta Medica* 75 (7), 719-734.
- Wollgast J., Anklam E. (2000), Polyphenols in chocolate: Is there a contribution to human health?, *Food Research International* 33 (6), 449-459.
- World Health Organization (1998), Quality control methods for medicinal plant materials, World Health Organization, Geneva.
- Xiao W., Han L., Shi B. (2008), Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*, *Separation and Purification Technology* 62 (3), 614-618.
- Xie J.H., Xie M.Y., Nie S.P., Shen M.Y., Wang Y.X., Li C. (2010), Isolation, chemical composition and antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja, *Food Chemistry* 119 (4), 1626-1632.
- Yadegarinia D., Gachkar L., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I. (2006), Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils, *Phytochemistry* 67 (12), 1249-1255.
- Yanishlieva N., Marinova E., Pokorný J. (2006), Natural antioxidants from herbs and spices, *European Journal of Lipid Science and Technology* 108 (9), 776-793.
- Ye J. (2009), Application of gas chromatography-mass spectrometry in research of traditional Chinese medicine, *Chemical Papers* 63 (5), 506-511.

- Yeşilada E., Sezik E., Honda G., Takashi Y., Takeda Y., Tanaka T. (1999), Traditional medicine in Turkey IX. Folk medicine in North-West Anatolia, *Journal of Ethnopharmacology* 64 (3), 195-210.
- Young F.V.K., Poot C., Biernoth E., Krog N., Davidson N.G.J., Gunstone F.D. (1994), Processing of fat and oils, u "The Lipid handbook" urednici Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley F.B., Chapman & Hall, London, UK.
- Yu H.M., Chen S.T., Wang K.T. (1992), Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation, *Journal of Organic Chemistry* 57 (18), 4781-4784.
- Yu J., Ahmedna M., Goktepe I. (2005), Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics, *Food Chemistry* 90 (1-2), 199-206.
- Yu S., Xu L., Wei P., Qin Z., Li J., Peng H. (2008), Study on analgesic effect of traditional Chinese medicine, *Chinese Journal of Integrative Medicine* 14 (2), 151-156.
- Yu Y., Chen B., Chen Y., Xie M., Duan H., Li Y., Duan G. (2009), Nitrogen-protected microwave-assisted extraction of ascorbic acid from fruit and vegetables, *Journal of Separation Science* 32 (23-24), 4227-4233.
- Zhang B., Yang R., Liu C.Z. (2008), Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb., *Separation and Purification Technology* 62 (2), 480-483.
- Zhang X., Hayward D.O. (2006), Applications of microwave dielectric heating in environment-related heterogeneous gas-phase catalytic systems, *Inorganica Chimica Acta* 359 (11), 3421-3433.
- Zhou H.Y., Liu C.Z. (2006), Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves, *Journal of Chromatography A* 1129 (1), 135-139.
- Zhu M., Phillipson J.D., Greengrass P.M., Bowery N.E., Ya C. (1997), Plant polyphenols: Biologically active compounds or non-selective binders to protein?, *Phytochemistry* 44 (3), 441-447.
- Zigoneanu I.G., Williams L., Xu Z., Sabliov C.M. (2008), Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method, *Bioresource Technology* 99 (11), 4910-4918.
- Zygler A., Wasik A., Namieśnik J. (2009), Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 28 (9), 1082-1102.
- Žižić D. (2009), Biodiverzitet - osnov održivog razvoja grada Leskovca, *Ecologica* 16 (55), 384-390.

Sažetak

U okviru ovog rada ispitani su kinetika i mehanizam mikrotalasne ekstrakcije lista, mesa ploda i srca koštica lovor višnje (*Prunus laurocerasus* L. var. *serbica* Pančić) pri različitim operativnim uslovima, kao i mehanizam dobijanja etarskog ulja iz listova lovor višnje (klasična hidrodestilacija, hidrodestilacija i suve destilacija pod dejstvom mikrotalasa). List i meso ploda ekstrahovani su rastvaračima različite polarnosti (voda, metanol, 2-propanol), dok su za ekstrakciju srca koštica korišćeni *n*-heksan i sistem *n*-heksan:voda.

Utvrđeno je da se mikrotalasna ekstrakcija odvija kroz fazu brze (ispiranje) i spore (difuzija) ekstrakcije. Najpogodniji model za opisivanje kinetike mikrotalasne ekstrakcije je model zasnovan na teoriji filma. Vrednosti izračunatih kinetičkih parametara korišćenih modela zavise od snage mikrotalasa, rastvarača, biljnog materijala i odnosa biljni materijal-rastvarač. Nezavisno od biljnog materijala, bolji prinosi dobijaju se primenom mikrotalasa većih snaga, polarnijih rastvarača i manjeg odnosa biljnog materijala i rastvarača.

Izvršeno je poređenje prinosa i hemijskog sastava ekstrakata i masnih ulja dobijenih pod optimalnim uslovima mikrotalasne ekstrakcije i ekstrakcije po Soxhlet-u, klasične i ultrazvučne ekstrakcije. Najveći prinos dobija se ekstrakcijom po Soxhlet-u, ali za značajno duže vreme, a zatim mikrotalasnom ekstrakcijom pri većim snagama. Najmanji prinos ostvaruje se klasičnom ekstrakcijom na temperaturi ključanja. Tehnika dobijanja etarskog ulja nema uticaja na prinos, dok se pod dejstvom mikrotalasa i izvođenjem suve destilacije vreme trajanja celokupnog procesa smanjuje.

Analizom ekstrakata lista i mesa ploda, nerazblaženog soka ploda i hidrosolova dobijenih u postupcima klasične i mikrotalasne hidrodestilacije utvrđeno je da ovi materijali mogu biti dobar izvor fenolnih jedinjenja i flavonoida i da pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost.

HPLC analizom metanolnih ekstrakata lista i mesa ploda lovor višnje identifikovano je prisustvo hlorogene kiseline, apigenin-5-O-glukozida i luteolin-7-O-glukozida. Nezavisno od biljnog materijala, tehnike i uslova ekstrakcije najzastupljenija je hlorogena kiselina.

GC analizom metil estara masnih kiselina ulja srca koštica lovor višnje utvrđeno je da je nezavisno od uslova ekstrakcije, najzastupljenija oleinska kiselina, zatim palmitinska, linolna i stearinska. Najzastupljenija komponenta etarskog ulja listova lovor višnje je benzaldehid (preko 77 %), uz prisustvo benzojeve kiseline, mandelonitrila i neznatnih količina 2-heksanala.

Summary

THE KINETICS OF THE MICROWAVE EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUND FROM CHERRY LAUREL (*PRUNUS LAUROCERASUS* L.)

The subject of the doctoral dissertation was the kinetics and the mechanism of the microwave extraction of the cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.) leaves, fruits and seeds under different operating conditions, as well as the mechanisms of isolating the essential oil from the leaves (classical hydrodistillation, hydrodistillation and solvent free distillation under the influence of the microwaves). Solvents of different polarity (water, methanol, 2-propanol) were used for the extraction of the leaves and fruits, whereas *n*-hexane and system *n*-hexane:water for the extraction of the seeds.

It was determined that the microwave extraction went through the phase of fast (washing out) and slow (diffusion) extraction. The most suitable model for describing the kinetics of the microwave extraction was the one based on the film theory. The values of the calculated parameters of the models used depended on the microwave power, solvents, plant material and plant material-to-solvent ratio. Independently of the plant material, better yields were obtained using the microwaves of the higher power, more polar solvents and lower plant material-to-solvent ratio.

The comparison between the yields and the chemical composition of the extracts and seed oils, that were isolated under the optimal conditions of the microwave and Soxhlet extraction, classical and ultrasound extraction, was made. The highest yield was obtained using Soxhlet extraction, that took more time, and then by the microwave extraction of the higher power. The lowest yield was obtained using the classical extraction at the boiling point. The technique of isolating the essential oil had no effect on the yield, while the amount of time used for the whole process is reduced under the influence of the microwaves and solvent free distillation.

The analysis of the leaves and fruits extracts, undiluted fruit juice and hydrosols obtained in the procedures of classical and microwave hydrodistillation showed that these materials could be a good source of phenol compounds and flavonoids and that they had shown an important antioxidant activity. HPLC analysis of the methanol extracts of the cherry laurel leaves and fruit identified the presence of chlorogenic acid, apigenin-5-O-glucoside and luteolin-7-O-glucoside. Independently of the plant material, techniques and the extraction conditions, the most frequent compound was chlorogenic acid. GC analysis of the fatty acid methyl esters of the cherry laurel seed oils showed that independently of the extraction conditions, the most frequent acid was oleic, then palmitic, linoleic and stearic acid. The most frequent component of the cherry laurel leaves' essential oil was benzaldehyde (over 77 %), along with benzo acid, mandelonitrile and the minor amounts of 2-hexenal.

Biografija

Ivana Karabegović rođ. Stanisavljević

Datum rođenja: 28.09.1976.

Adresa: Jurija Gagarina 141/126, Beograd

Telefon: +381 63 43 85 85

+381 11 21 61 338

E-mail: icaneca@gmail.com



RADNO ISKUSTVO

Tehnološki fakultet, Leskovac

Asistent za užu naučnu oblast prehrambeno biotehnoško inženjerstvo	2008-
Saradnik na realizaciji projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj broj 172047 "Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnos i primena"	2011-
Saradnik na realizaciji projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj broj 142073 "Izolovanje, karakterizacija, biološka aktivnost i transformacija prirodnih jedinjenja i sinteza katalizatora primenom nadkritičnih fluida, mikrotalasa i ultrazvuka"	2008-2010
Saradnik na realizaciji projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj broj TR 19062 "Kontinualna proizvodnja biodizela"	Maj-oktobar 2008
Saradnik na realizaciji projekta Ministarstva nauke i zaštite životne sredine broj TR-6742B "Razvoj tehnologije sinteze biodizela"	2006-2008
Istraživač pripravnik	2005-2006

OBRAZOVANJE

Doktor tehničkih nauka

2011.

Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu

Naslov disertacije - Kinetika mikrotalasne ekstrakcije i karakterizacija bioaktivnih komponenti iz lovor višnje (*Prunus laurocerasus* L.)

Oblast - Biohemijsko inženjerstvo

Magistar tehničkih nauka

2006.

Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu

Naslov magistarske teze - Ultrazvučna ekstrakcija ulja iz semena duvana (*Nicotiana tabacum* L.) tipa Otlja

Oblast - Hemijsko inženjerstvo

Diplomirani inženjer hemijskog i biohemijskog inženjerstva

2001.

Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu

Naslov diplomskog rada - Dobijanje medovine

Oblast - Biohemijsko inženjerstvo

POZNAVANJE JEZIKA

Engleski (napredni nivo)- Certificate of studies – English language course (upper intermediate – B2a), Lingua Academy, Foreign Language School, Leskovac, Serbia, 2009.

RAD SA RAČUNAROM

MS Office, Origin, CorelDraw, Adobe Photoshop, SigmaStat, SigmaPlot

OSTALO

Član Srpskog hemijskog društva i internacionalnog društva za proučavanje lekovitog bilja i prirodnih proizvoda (Society for Medicinal Plant and Natural Product Research).

Sertifikat internog proverivača sistema upravljanja bezbednošću hrane koji je baziran na seriji standarda ISO 22000:2005 (Internal Auditor, auditing the Quality Management Systems ISO 22000, HACCP), koji potvrđuje veštine u planiranju, sprovođenju i izveštavanju sa internih provera u skladu sa ISO 19011.

STRUČNA BIBLIOGRAFIJA

Rad u vodećem časopisu od međunarodnog značaja M21: 8x1=8

- Stanisavljević I.T., Lazić M.L., Veljković V.B. (2007), Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds, *Ultrasonics Sonochemistry*, 14 (5), 646-652.
- Stanisavljević I.T., Veličković D.T., Todorović Z.B., Lazić M.L., Veljković V.B. (2009), Comparison of techniques for the extraction of tobacco seed oil, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111 (5), 513 – 518.

Rad u istaknutom časopisu od međunarodnog značaja M22: 5x2=10

- Stanisavljević I., Stojičević S., Veličković D., Lazić M., Veljković V. (2008), Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from plantain (*Plantago major* L.) leaves, *Separation Science and Technology*, 43 (14), 3652-3662.

Rad u časopisu od međunarodnog značaja M23: 3x5=15

- Stojičević S., Stanisavljević I., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2008), Comparative screening of antioxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73 (6), 597–607.
- Stanisavljević I., Stojičević S., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2009), Antioxidant and antimicrobial activities of echinacea (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17 (3), 478-483.
- Stanisavljević I.T., Stojičević S.S., Veličković D.T., Ristić M.S., Lazić M.L., Veljković V.B. (2010), Kinetics of hydrodistillation and chemical composition of essential oil from cherry laurel (*Prunus laurocerasus* var. *serbica* Pančić) leaves, *Journal of Essential Oil Research*, 22 (6), 564-567.
- Karabegović I., Stojičević S., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2011), Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp. recovered by different extraction techniques, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19 (3), 504-511.

Radovi saopšteni na skupu od međunarodnog značaja štampani u izvodu M34: 0,5x11=5,5

- Lazić M.L., Stanisavljević I.T., Lakićević S.H., Veljković V.B. (2005), The kinetics of maceration of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds, 29th International Conference on Solution Chemistry, Book of abstracts, 90 (AP 27), August 21st – 25th, 2005., Portorož, Slovenija.
- Stanisavljević I.T., Stamenković O.S., Lazić M.L., Veljković V.B. (2005), Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds, 1st Congress of SEECCHE, Book of abstracts, 67 (GCEN – 37), September 25-28, 2005, Belgrade, Serbia.
- Stanisavljević I., Stojičević S., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2007), The antioxidant and antimicrobial activities of *Echinacea purpurea* L. methanolic extracts, 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, *Planta medica*, 9 (73), 869 (P145), September 2-6, 2007, Graz, Austria.
- Lazić M., Stojičević S., Stanisavljević I., Veličković D., Veljković V. (2007), Effect of ultrasound on the kinetics of extraction, phenolic and flavonoid compounds from *Plantago major* L. leaves, 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, *Planta medica*, 9 (73), 1023 (P651), September 2-6, 2007, Graz, Austria.
- Stojičević S., Stanisavljević I., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2007), The antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts from houseleek (*Sempervivum marmoreum* L.) leaves, 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, *Planta medica*, 9 (73), 869 (P144), September 2-6, 2007, Graz, Austria.

- Stanisavljević I., Nikolova M., Veličković D., Stojičević S., Lazić M., Veljković V. (2008), The influence of extraction techniques on polyphenol content and *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia campestris* L. methanolic extracts' antioxidative activity, 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, Planta medica, 9 (74)(PC87), Avgust 3-8, 2008, Athens, Greece, DOI: 10.1055/s-0028-1084605.
- Stanisavljević I., Stojičević S., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2008), Comparison of techniques for the recovery of cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.) seed oil, 6th Euro Fed Lipid Congress, "Oils, Fats and Lipids in the 3rd Millennium", Book of abstracts 337 (PLALI-010), 7-10 September 2008, Athens, Greece.
- P. Vukosavljevic, M. Novakovic, B. Bukvic, M. Niksic, I. Stanisavljevic (2008), Microfiltration and antioxidant activities of herbs extracts, fruits and medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, Delegate Manual, P201, EFFoST - Firs European Food Congress, Ljubljana, Slovenia.
- Stanisavljevic I., Lazić M., Radulovic N., Veljkovic V. (2009), Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaves, 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Planta medica, 9 (75), 1027 (PI33), 16-20 August 2009, Geneva, Switzerland.
- Lazić M., Stanisavljević I., Radulovic N., Veljkovic V. (2009), Hydrodistillation of essential oil from cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaves: kinetics and chemical composition, 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Planta medica, 9 (75), 1027 (PI34), 16-20 August 2009, Geneva, Switzerland.
- P. Vukosavljevic, M. Novakovic, B. Bukvic, M. Niksic, I. Stanisavljevic (2009), Antioxidant activities of bitter 55 made from herbs extracts, fruits and medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, Abstracts of the 5th International Medicinal Mushrooms Conference, P-6A-2, 5-8 September 2009, Nantong, China.

Naučna knjiga i monografija od nacionalnog značaja M42: 5x1=5

- Stanisavljević I., (2008), Ultrazvukom do ulja iz duvana, Monografija, Zadužbina Andrejević, Beograd.

Rad u vodećem časopisu od nacionalnog značaja M51: 2x2=4

- Stanisavljević I., Lakićević S., Veličković D., Lazić M.L., Veljković V.B. (2007), The extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds, Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, 13 (1), 41-50.
- Vukosavljević P., Novaković M., Bukvić B., Niksić M., Stanisavljević I., Klaus A. (2009), Antioxidant activities of herbs, fruit and medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* extracts produced by microfiltration process, Journal of Agricultural Sciences 54 (1), 44-61.

Rad u časopisu od nacionalnog značaja M52: 1,5x1=1,5

- Lazić M., Stanisavljević I., Veljković V. (2008), Seme duvana kao obnovljiva sirovina/Tobacco seed as a renewable raw material, PTEP - časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi/Journal of processing and energy in agriculture, 12, (1-2), 70-73.

Rad u naučnom časopisu M53: 1x1=1

- Vukosavljević P., Novaković M., Bukvić B., Nikšić M., Stanisavljević I. (2009), Potencijalni antioksidativni kapacitet kompozicije lekovitih i aromatičnih biljaka i voća u bitter-u 54, *Hrana i ishrana*, 50 (1-2), 3–8.

Rad saopšten na skupu od nacionalnog značaja štampani u celini M63: 0,5x1=0,5

- Stanisavljević I., Lazić M., Veljković V. (2008), The ultrasound extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds, 20th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 17-20, 2008, Ohrid, Republic of Macedonia.

Radovi saopšteni na skupu od nacionalnog značaja štampani u izvodu M64: 0,2x9=1,8

- Stanisavljević I., Stamenković O., Lazić M., Kocić M., Veljković V. (2005), Uticaj prirode rastvarača na efektivnu snagu ultrazvuka, VI simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj" sa međunarodnim učešćem, Zbornik izvoda radova, 269 (HI-32), Tehnološki fakultet, Leskovac, 21-22. oktobar 2005, Leskovac.
- Stanisavljević I., Stojičević S., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2007), Validacija metoda za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i flavonoida, VII simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj" sa međunarodnim učešćem, Zbornik izvoda radova, 133 (HI-17), Tehnološki fakultet, Leskovac, 19-20. oktobar 2007, Leskovac.
- Stojičević S., Stanisavljević I., Veličković D., Veljković V., Lazić M. (2007), Sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom iz *Sempervivum marmoreum* L., VII simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj" sa međunarodnim učešćem, Zbornik izvoda radova, 125 (HI-9), Tehnološki fakultet, Leskovac, 19-20. oktobar 2007, Leskovac.
- Veličković D., Stanisavljević I., Stojičević S., Marinković V., Lazić M., Veljković V. (2008), Biološke aktivnosti otpadnog čvrstog materijala *Salvia* sp. nakon procesa hidrodestilacije etarskog ulja (Biological activities of waste solid residues from the *Salvia* sp. essential oil hydrodistillation process), XXVIII Savetovanje o lekovitim i aromatičnim biljkama, Zbornik apstrakata, 159-160, P44, Vršac.
- Vukosavljević P., Novaković M., Bukvić B., Nikšić M., Stanisavljević I. (2008), Potencijalni antioksidativni kapacitet kompozicije lekovitih i aromatičnih biljaka i voća u bitter-u 54, 11. Kongres o ishrani međunarodnim učešćem, Izvodi radova, 165-167 (U07.14), Jugoslovensko društvo za ishranu, 15-18. oktobar 2008, Beograd.
- Vukosavljević P., Novaković M., Stanisavljević I., Bukvić B., Nikšić M. (2009), Antioksidativna aktivnost jakog alkoholnog pića na bazi lekovitog bilja, voća i medicinske gljive *Ganoderma lucidum*, Matica Srpska, III naučni skup sa međunarodnim učešćem, Mikologija, mikotoksikologija i mikoze, 23-25 april 2009., Novi Sad.
- Stanisavljević I., Vukosavljević P., Novaković M., Lazić M. (2009), Antioksidativna aktivnost, sadržaj fenola i flavonoida u komercijalnim likerima (Bitter 54 i Bitter 55), VIII simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj" sa međunarodnim učešćem, Zbornik

- izvoda radova, 53 (BPT – 15), Tehnološki fakultet, Leskovac, 23-24. oktobar 2009, Leskovac.
- Vukosavljević P., Bukvić B., Stanisavljević I., Novaković M., Nikšić M. (2009), Antioksidativni potencijal proizvoda od maline sa dodatkom lekovitih biljaka, VIII simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj" sa međunarodnim učešćem, Zbornik izvoda radova, 54 (BPT-16), Tehnološki fakultet, Leskovac, 23-24. oktobar 2009, Leskovac.
 - Stanisavljević I., Stojičević S., Veličković D., Lazić M., Veljković V. (2009), Kinetika ekstrakcije ukupnih fenola i flavonoida iz poljskog (*Artemisia campestris*) i divljeg (*Artemisia vulgaris*) pelina, VIII simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj" sa međunarodnim učešćem, Zbornik izvoda radova, 139 (HI-12), Tehnološki fakultet, Leskovac, 23-24. oktobar 2009, Leskovac.
 - Đorđević B. Karabegović I., Veljković V., Lazić M. (2010), Hydrodistillation kinetics and chemical composition of ginger oil, 21th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 23-26, 2010, Ohrid, Republic of Macedonia.

Magistarska teza M72: 3x1=3

- Stanisavljević I. (2006), Ultrazvučna ekstrakcija ulja iz semenena duvana (*Nicotiana tabacum* L.) tipa Otlja, Magistarski rad, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, Leskovac.

Doktorska disertacija M71: 6x1=6

- Karabegović I. (2011), Kinetika mikrotalasne ekstrakcije i karakterizacija bioaktivnih komponenti iz lovor višnje (*Prunus laurocerasus* L.), Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, Leskovac.

Tehnička rešenja M84: 3x3=9

- Veljković V., Lazić M., Stamenković O., Stanisavljević I., Lakićević S., (2006) Laboratorijski tehnološki postupak za dobijanje ulja iz semena duvana, ev. br. 06-1827 od 11.12.2006., Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Veljković V., Lazić M., Stanisavljević I., Stamenković O., (2007) Laboratorijski tehnološki postupak za dobijanje ulja iz semena duvana ceđenjem, ev. br. 06-2155 od 10.12.2007., Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Veljković V., Lazić M., Todorović Z., Stamenković O., Lakićević S., Stanisavljević I., (2007) Laboratorijski tehnološki postupak za dobijanje metil estara masnih kiselina ulja semena duvana, ev. br. 06-2102 od 05.12.2007., Tehnološki fakultet, Leskovac.

Tehnička rešenja M81: 8x1=8

- Vukosavljević P., Nikšić M., Nikićević N., Novaković M., Stanisavljević I. (2010), Tehničko rešenje - Novi proizvod «Gorki biljni liker – gorki liker», Beograd.

PRILOG

Tabela 10.1 Vrednosti dielektrične konstante (ϵ'), $\tan \delta$ i dielektričnih gubitaka (ϵ'') za neke od najčešće korišćenih rastvarača merenih na sobnoj temperaturi i na 2450 MHz (Hayes, 2002)

Solvent (bp °C)	Dielectric Constant (ϵ')	Solvent	Tan δ	Solvent	Dielectric Loss (ϵ'')
Water (100)	80.4	Ethylene Glycol	1.350	Ethylene Glycol	49.950
Formic Acid (100)	58.5	Ethanol	.941	Formic Acid	42.237
DMSO (189)	45.0	DMSO	.825	DMSO	37.125
DMF (153)	37.7	2-Propanol	.799	Ethanol	22.866
Acetonitrile (82)	37.5	1-Propanol	.757	Methanol	21.483
Ethylene Glycol (197)	37.0	Formic Acid	.722	Nitrobenzene	20.497
Nitromethane (101)	36.0	Methanol	.659	1-Propanol	15.216
Nitrobenzene (202)	34.8	Nitrobenzene	.589	2-Propanol	14.622
Methanol (65)	32.6	1-Butanol	.571	Water	9.889
NMP (215)	32.2	Isobutanol	.522	1-Butanol	9.764
Ethanol (78)	24.3	2-Butanol	.447	NMP	8.855
Acetone (56)	20.7	2-Methoxyethanol	.410	Isobutanol	8.248
1-Propanol (97)	20.1	o-Dichlorobenzene	.280	2-Butanol	7.063
MEK (80)	18.5	NMP	.275	2-Methoxyethanol	6.929
2-Propanol (82)	18.3	Acetic Acid	.174	DMF	6.070
1-Butanol (118)	17.1	DMF	.161	o-Dichlorobenzene	2.772
2-Methoxyethanol (124)	16.9	1,2-Dichloroethane	.127	Acetonitrile	2.325
2-Butanol (100)	15.8	Water	.123	Nitromethane	2.304
Isobutanol (108)	15.8	Chlorobenzene	.101	MEK	1.462
1,2-Dichloroethane (83)	10.4	Chloroform	.091	1,2-Dichloroethane	1.321
o-Dichlorobenzene (180)	9.9	MEK	.079	Acetone	1.118
Dichloromethane (40)	9.1	Nitromethane	.064	Acetic Acid	1.079
THF (66)	7.4	Acetonitrile	.062	Chloroform	0.437
Acetic Acid (113)	6.2	Ethyl Acetate	.059	Dichloromethane	0.382
Ethyl Acetate (77)	6.0	Acetone	.054	Ethyl Acetate	0.354
Chloroform (61)	4.8	THF	.047	THF	0.348
Chlorobenzene (132)	2.6	Dichloromethane	.042	Chlorobenzene	0.263
o-Xylene (144)	2.6	Toluene	.040	Toluene	0.096
Toluene (111)	2.4	Hexane	.020	o-Xylene	0.047
Hexane (69)	1.9	o-Xylene	.018	Hexane	0.038

Tabela 10.2 Podela rastvarača prema sposobnosti da apsorbuju mikrotalase

Nivo apsorbancije	Rastvarači
Visok	Dimetil sulfoksid (DMSO), etanol, metanol, nitrobenzen, mravlja kiselina, etilen glikol
Srednji	Voda, dimetilformamid (DMF), metilpirilidon (NMP), butanol, acetonitril, heksametilfosforamid, metiletil keton, aceton i drugi ketoni, nitrometan, o-dihlor benzen, 1,2-dihlor etan, 2-metoksietanol, sirćetna kiselina, trihlor sirćetna kiselina
Nizak	Hloroform, dihlor metan, karbontetrahlorid, 1,4-dioksan, tetrahidrofuran, etilacetat, piridin, trietilamin, etil acetat, benzen, hlorbenzen, ksilen, pentan, heksan i drugi ugljovodonici.

Nazivi biljne vrste *Prunus laurocerasus* L. na drugim jezicima**Nemacki naziv:**

Kirschlorbeer, Kirschlorbeerbaum, Lorbeerkirsche, Gemeine Kirschlorbeer, Gemeine Lorbeerkirsche

Engleski naziv:

Cherry laurel, English Laurel, Laurel, Laurel-cherry, Cherry-bay, Zabel's cherry laurel

Francuski naziv:

Laurier-amande, Laurier-cerise

Italijanski naziv:

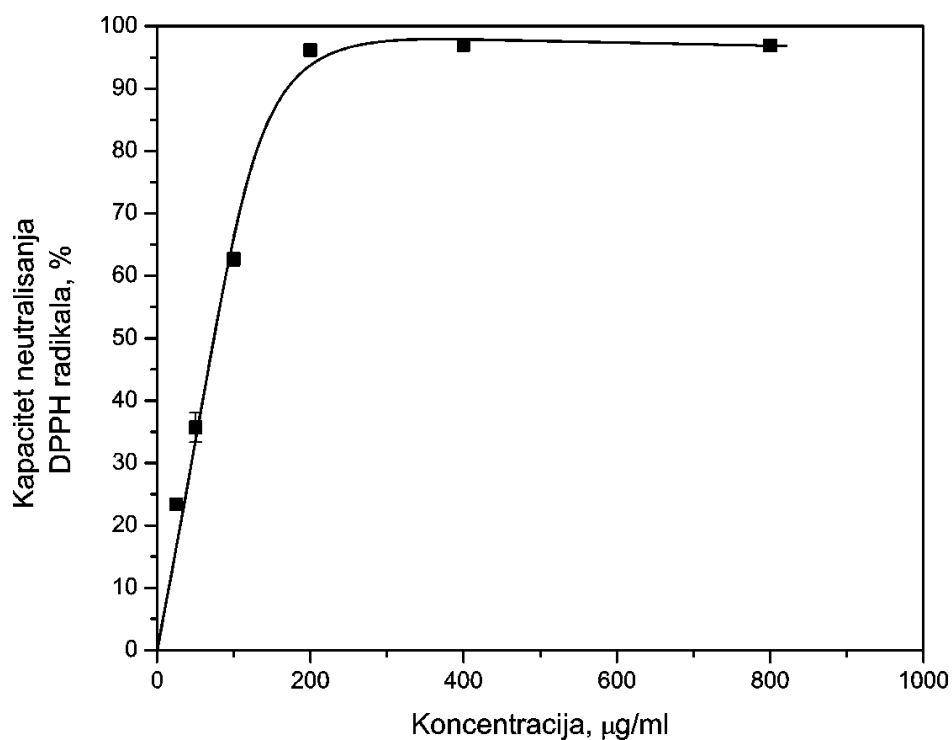
Lauro ceraso, Lauroceraso, Lauro regio

Španski naziv:

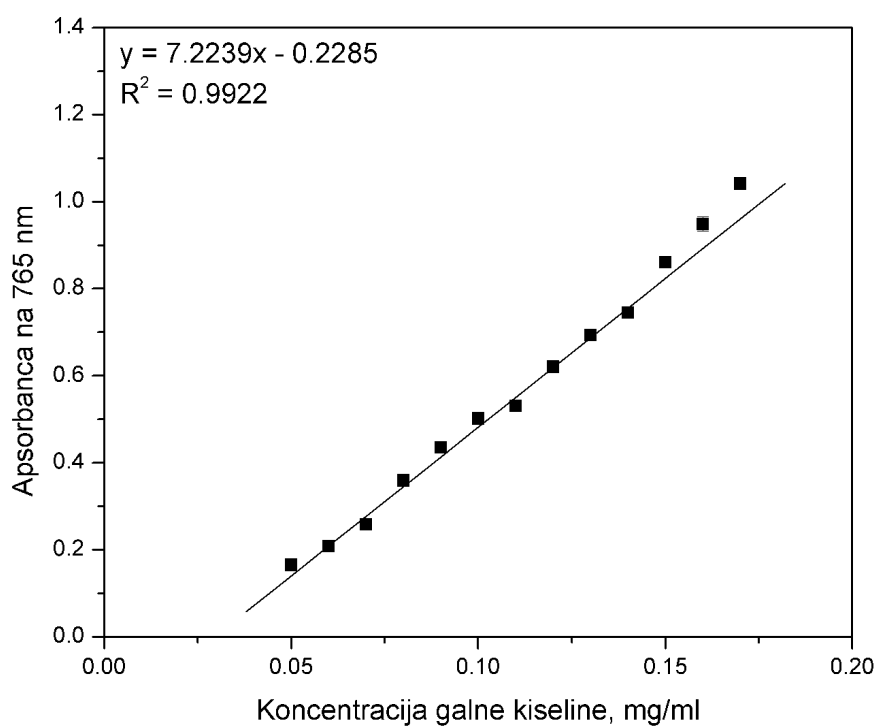
Laurela, Laurel cerezo, Laurel liso, Laurel real, Laurel romano, Lauroceraso, Lauro. Lauro-cerezo, Lauro real, Loro.

Ruski naziv:

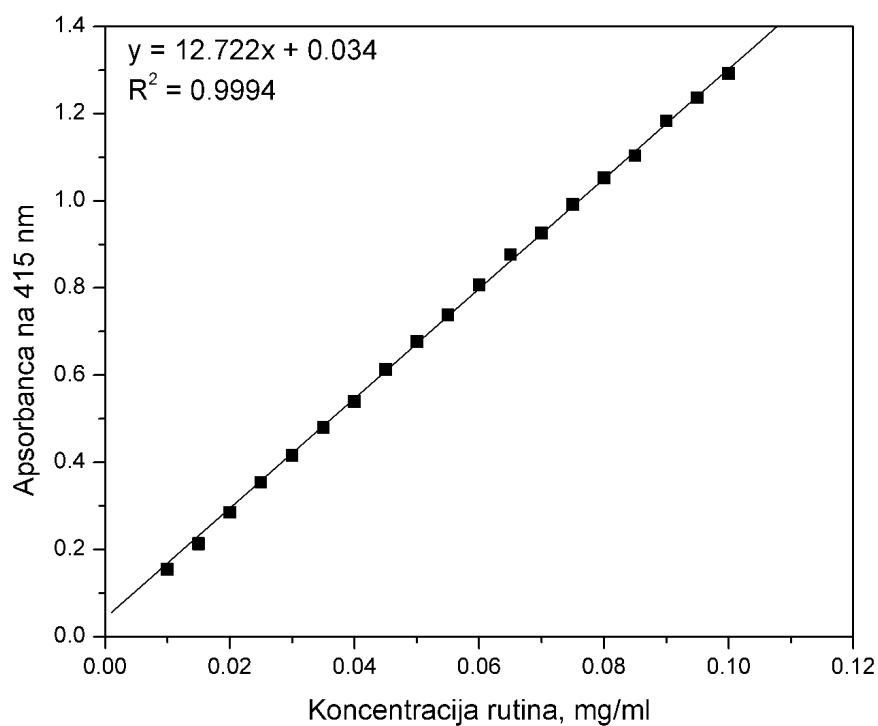
Европейский вишневый лавр, Лаврови́шня, Лавровишня аптечная, Лавровишня лекарственная



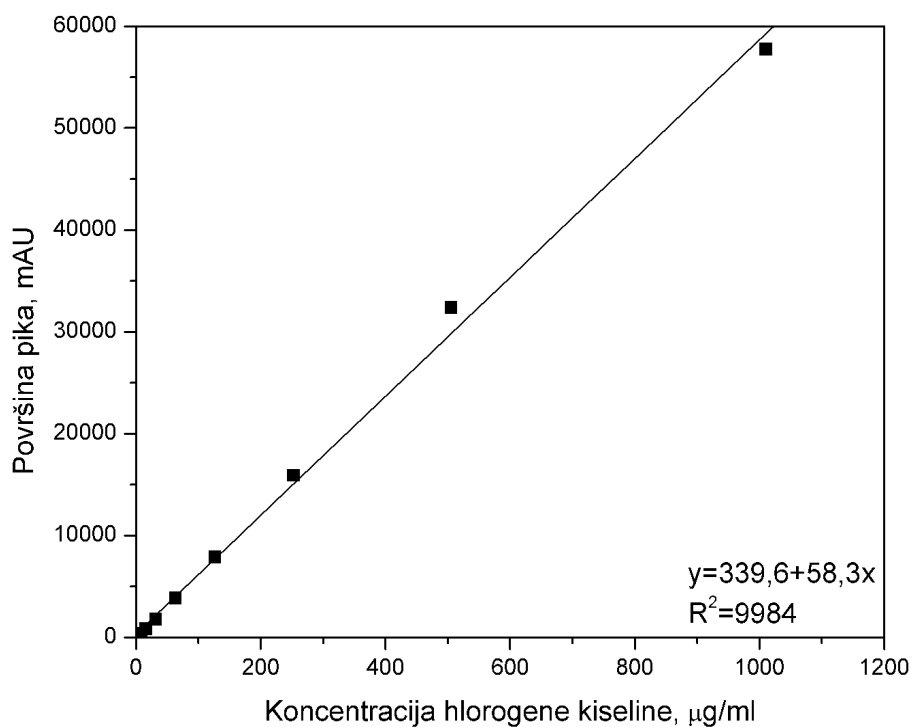
Slika 11.1 Antioksidativna aktivnost troloksa (referentnog standarda)



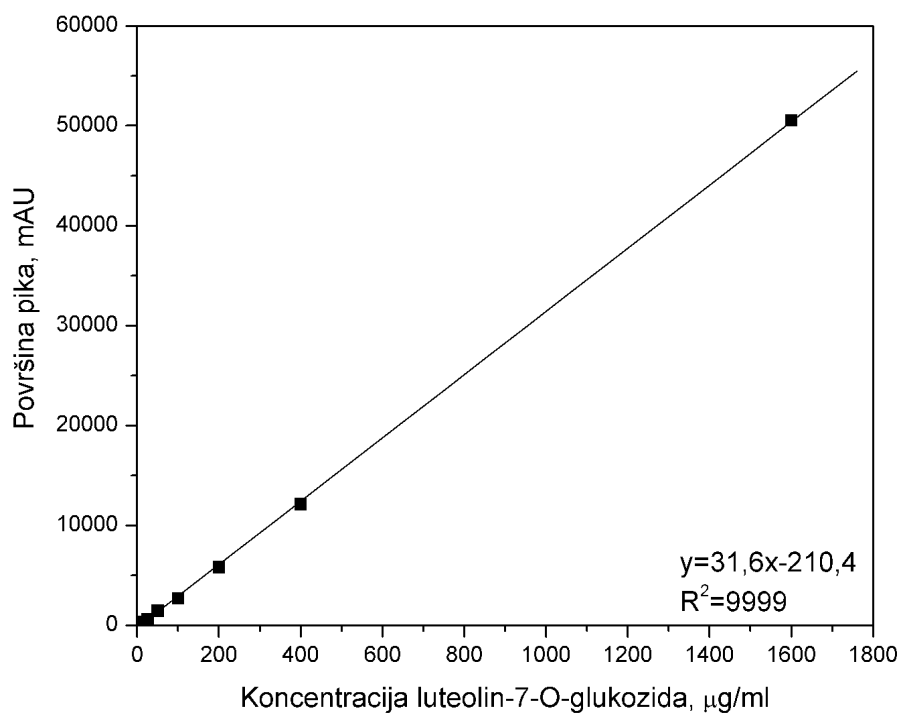
Slika 11.2 Kalibraciona kriva standardnog rastvora galne kiseline



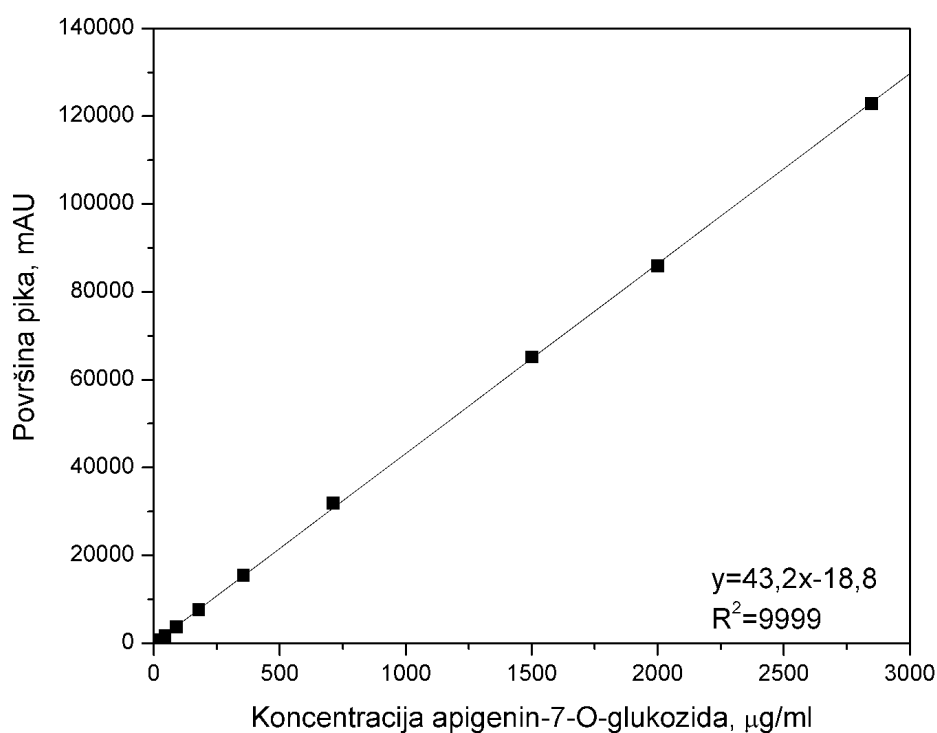
Slika 11.3 Kalibraciona kriva standardnog rastvora rutina



Slika 11.4 Kalibraciona kriva standardnog rastvora hlorogene kiseline



Slika 11.5 Kalibraciona kriva standardnog rastvora luteolin-7-O-glukozida



Slika 11.6 Kalibraciona kriva standardnog rastvora apigenin-7-O-glukozida

Tabela 11.3 Prinos ukupnih ekstraktivnih materija u toku mikrotalasne ekstrakcije lista lovor višnje metanolom

Vreme, min	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
1	4,0±0,15	4,2±0,25	4,4±0,13	4,3±0,25	4,7±0,15	4,9±0,35	4,6±0,35	4,9±0,31	5,2±0,40
2.5	5,2±0,14	5,5±0,15	5,7±0,28	5,7±0,06	6,5±0,20	6,7±0,36	6,1±0,31	6,9±0,64	7,2±0,53
5	6,6±0,06	7,2±0,28	7,6±0,28	7,5±0,10	8,6±0,21	9,0±0,56	7,4±0,53	8,1±0,58	9,7±0,95
10	8,8±0,13	9,6±0,30	10,2±0,23	9,8±0,15	10,2±0,12	11,1±0,47	10,3±0,61	10,5±0,50	11,3±0,61
15	10,2±0,13	10,5±0,08	10,9±0,15	10,7±0,12	11,4±0,17	11,9±0,26	11,1±0,23	11,7±0,31	12,4±0,72
20	10,4±0,09	11,4±0,15	11,8±0,17	11,6±0,12	12,5±0,21	12,9±0,30	11,5±0,12	12,6±0,20	13,0±0,53
30	11,1±0,21	11,8±0,34	12,3±0,13	12,0±0,10	12,9±0,30	13,5±0,40	12,1±0,12	13,0±0,40	13,3±0,46

Tabela 10.4 Prinos ukupnih ekstraktivnih materija u toku mikrotalasne ekstrakcije lista lovor višnje vodom

Vreme, min	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
1	3,5±0,08	3,8±0,05	4,0±0,13	3,9±0,21	4,2±0,25	4,4±0,38	4,2±0,69	4,3±0,31	4,5±0,76
2.5	4,8±0,08	4,9±0,23	6,2±0,19	5,4±0,51	5,7±0,15	6,5±0,31	5,8±0,53	6,2±0,35	6,7±0,50
5	6,8±0,18	7,9±0,13	8,6±0,15	7,7±0,47	8,7±0,26	8,9±0,21	8,1±0,31	8,9±0,42	9,1±0,31
10	7,8±0,13	9,1±0,26	9,9±0,33	8,7±0,12	9,8±0,30	10,3±0,20	9,2±0,20	10,0±0,53	10,5±0,31
15	8,3±0,18	10,0±0,21	10,7±0,18	9,4±0,31	10,9±0,26	11,3±0,31	9,7±0,42	11,2±0,60	11,9±0,31
20	9,3±0,10	11,3±0,16	11,4±0,14	10,1±0,25	11,6±0,15	11,9±0,20	10,6±0,40	12,1±0,42	12,3±0,12
30	10,3±0,23	11,7±0,13	12,1±0,26	10,8±0,55	12,0±0,15	12,4±0,40	11,2±0,53	12,3±0,31	12,8±0,20

Tabela 10.5 Prinos ukupnih ekstraktivnih materija u toku mikrotalasne ekstrakcije lista lovor višnje 2-propanolom

Vreme, min	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
2.5	1,6±0,06	2,2±0,26	2,6±0,13	1,8±0,10	2,5±0,17	2,8±0,23	1,9±0,50	3,0±0,53	3,3±0,31
5	2,5±0,08	3,3±0,20	3,8±0,10	2,9±0,25	4,0±0,32	4,2±0,06	3,1±0,95	3,7±0,23	4,5±0,12
10	5,1±0,19	4,9±0,23	5,0±0,28	5,3±0,32	6,0±0,46	5,8±0,46	5,5±0,31	5,9±0,58	6,1±0,50
15	6,0±0,32	6,3±0,17	6,7±0,45	6,8±0,15	7,1±0,38	7,3±0,49	7,3±0,23	7,3±0,31	7,9±0,83
20	6,9±0,31	7,9±0,35	8,3±0,16	7,8±0,31	8,0±0,15	8,5±0,26	8,1±0,31	8,3±0,23	8,6±0,20
30	7,6±0,06	8,2±0,25	8,7±0,36	8,4±0,21	8,6±0,26	9,0±0,29	8,8±0,40	9,0±0,20	9,2±0,53

Tabela 10.6 Prinos ukupnih ekstraktivnih materija u toku mikrotalasne ekstrakcije ploda lovor višnje metanolom

Vreme, min	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
1	5,7±0,32	5,8±0,15	6,0±0,23	6,0±0,20	6,2±0,40	6,4±0,64	6,5±0,31	6,9±0,42	7,0±0,80
2.5	8,7±0,28	9,1±0,43	9,4±0,15	9,1±0,50	9,4±0,42	10,1±0,64	9,9±0,31	10,0±0,53	10,9±1,15
5	16,1±0,36	16,7±0,36	17,1±0,45	16,8±0,67	17,2±0,44	17,8±0,61	17,2±0,53	18,6±0,80	19,2±1,06
10	22,6±0,43	23,3±0,25	23,9±0,30	23,9±0,65	24,5±0,56	25,1±0,40	24,7±0,64	25,2±0,92	28,1±0,76
15	29,9±0,15	31,8±0,30	32,3±0,74	32,2±0,55	33,8±0,61	34,5±0,67	33,5±0,83	35,0±0,20	36,2±0,40
20	34,3±0,18	35,4±0,30	36,7±0,95	36,3±0,36	37,9±0,85	38,5±1,40	37,3±0,12	38,6±0,20	39,5±0,42
30	36,2±0,33	37,8±0,29	38,8±0,46	37,8±0,85	38,9±0,67	39,7±1,02	38,2±0,35	39,3±0,23	40,8±0,40

Tabela 10.7 Prinos ukupnih ekstraktivnih materija u toku mikrotalasne ekstrakcije ploda lovor višnje vodom

Vreme, min	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
1	8,5±0,13	8,7±0,23	9,3±0,20	9,0±0,36	9,3±0,32	10,2±0,61	9,3±0,81	9,9±0,42	10,9±1,22
2.5	12,1±0,30	12,5±0,80	13,1±0,32	13,2±0,64	13,5±0,58	13,9±0,25	14,1±0,12	14,3±0,81	15,3±0,83
5	17,6±0,26	18,1±0,12	18,5±0,25	18,7±0,71	19,2±0,81	19,7±0,71	19,3±0,70	20,3±0,61	20,9±0,31
10	21,9±1,19	22,7±0,46	24,3±0,41	23,2±0,85	24,3±0,85	25,5±0,32	24,0±0,92	25,1±1,17	26,3±0,70
15	27,0±0,35	28,2±0,38	29,7±0,23	29,2±0,84	29,9±0,15	31,3±0,80	30,4±1,06	31,1±1,62	32,1±1,55
20	28,9±0,56	30,3±0,69	31,2±0,53	30,8±0,38	31,5±0,59	32,6±0,74	31,2±0,20	32,7±1,30	33,7±0,81
30	30,2±0,43	31,6±0,23	32,9±0,23	31,6±0,40	33,3±0,47	34,2±0,25	33,7±0,50	34,6±0,80	35,9±0,12

Tabela 10.8 Prinos ukupnih ekstraktivnih materija u toku mikrotalasne ekstrakcije ploda lovor višnje 2-propanolom

Vreme, min	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
1	2,7±0,18	2,8±0,18	3,0±0,10	3,2±0,31	3,6±0,25	3,8±0,17	3,3±0,23	3,9±0,64	4,1±0,31
2.5	5,7±0,29	6,4±0,25	7,6±0,25	6,5±0,32	7,7±0,44	8,7±0,25	7,3±0,81	8,1±0,64	9,7±0,64
5	8,1±0,33	8,9±0,50	10,9±0,38	9,0±0,64	10,9±0,93	12,4±0,42	10,7±0,50	11,8±0,87	13,4±0,60
10	11,6±0,30	12,0±0,34	12,7±0,25	12,4±0,30	13,6±0,30	14,3±0,45	13,1±0,70	14,2±1,25	15,4±0,40
15	13,7±0,38	14,4±0,25	14,9±0,38	14,8±0,35	15,5±0,31	16,4±0,56	15,8±0,20	16,5±0,46	17,0±0,20
20	14,6±0,31	15,2±0,30	15,7±0,18	15,7±0,31	16,4±0,45	16,9±0,21	16,4±0,20	17,3±0,42	17,6±0,20
30	15,3±0,14	15,9±0,33	16,4±0,10	16,3±0,21	17,0±0,57	17,5±0,06	17,4±0,20	17,8±0,40	18,1±0,31

Tabela 10.9 Prinos masnog ulja iz srca koštica ploda lovor višnje u toku mikrotalasne ekstrakcije *n*-heksanom i sistemom *n*-heksan:voda – 9:1

Vreme, min	<i>n</i> -Heksan			Sistem <i>n</i> -heksan:voda – 9:1		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
5	21,9±1,01	24,0±0,57	25,6±1,06	23,9±0,97	27,1±0,60	29,0±0,42
10	26,1±1,10	28,1±0,61	31,7±0,40	30,1±0,45	31,2±0,29	33,7±0,12
15	31,9±0,10	32,4±0,21	35,0±0,98	32,2±0,17	33,7±0,81	36,2±0,86
20	32,5±0,30	34,2±0,20	38,8±0,35	33,6±0,38	34,8±0,17	38,0±0,40
30	33,0±0,64	35,0±0,40	39,3±0,17	34,2±0,26	35,2±0,35	38,7±0,15

Tabela 10.10 Vrednosti koeficijenata b' i k' modela nestacionarne difuzije kroz biljni materijal za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije listova lovor višnje metanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,52±0,022	0,57±0,015	0,59±0,016	0,57±0,025	0,56±0,015	0,63±0,039	0,62±0,063	0,64±0,047	0,64±0,056
$k' 10^{-3}, \text{min}^{-1}$	23,3±1,54	28,0±1,37	31,6±2,31	29,7±2,73	42,7±2,44	44,0±3,97	32,2±2,22	50,1±0,79	51,4±2,74

Tabela 10.11 Vrednosti koeficijenata b' i k' modela nestacionarne difuzije kroz biljni materijal za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije listova lovor višnje vodom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,41±0,035	0,51±0,059	0,58±0,022	0,52±0,036	0,59±0,040	0,65±0,034	0,55±0,043	0,65±0,022	0,80±0,065
$k' 10^{-3}, \text{min}^{-1}$	25,6±1,09	35,3±2,19	38,8±1,92	28,0±0,94	38,3±2,61	49,5±2,90	35,7±2,54	39,3±2,10	61,5±1,52

Tabela 10.12 Vrednosti koeficijenata b' i k' modela nestacionarne difuzije kroz biljni materijal za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije listova lovor višnje 2-propanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,34±0,053	0,38±0,036	0,39±0,013	0,41±0,034	0,47±0,026	0,48±0,030	0,48±0,015	0,48±0,045	0,54±0,037
$k' 10^{-3}$ min ⁻¹	28,0±2,54	34,6±1,18	41,8±2,17	31,0±0,34	36,9±0,95	44,4±2,44	35,0±1,81	41,2±1,25	44,6±1,81

Tabela 10.13 Vrednosti koeficijenata b' i k' modela nestacionarne difuzije kroz biljni materijal za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije plodova lovor višnje metanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,48±0,030	0,49±0,043	0,50±0,007	0,56±0,054	0,60±0,046	0,63±0,058	0,63±0,064	0,67±0,037	0,68±0,040
$k' 10^{-3}$ min ⁻¹	35,9±2,04	43,5±2,41	59,2±1,44	36,6±2,19	45,4±2,15	61,2±3,59	47,4±1,87	54,1±1,61	65,4±2,08

Tabela 10.14 Vrednosti koeficijenata b' i k' modela nestacionarne difuzije kroz biljni materijal za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije plodova lovor višnje vodom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,61±0,015	0,63±0,025	0,65±0,034	0,63±0,024	0,64±0,043	0,69±0,034	0,64±0,016	0,65±0,042	0,70±0,027
$k' 10^{-3}$ min ⁻¹	24,2±1,79	30,4±1,88	38,4±1,78	25,6±1,24	41,2±1,76	45,6±1,56	36,3±2,50	53,4±1,59	75,4±1,76

Tabela 10.15 Vrednosti koeficijenata b' i k' modela nestacionarne difuzije kroz biljni materijal za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije plodova lovor višnje 2-propanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,59±0,050	0,62±0,049	0,65±0,029	0,64±0,031	0,67±0,042	0,74±0,061	0,66±0,031	0,75±0,024	0,77±0,061
$k'10^{-3}, \text{min}^{-1}$	19,0±2,77	21,7±1,81	23,9±1,57	26,9±1,97	33,3±0,46	34,0±2,67	30,9±0,97	31,5±2,64	40,1±0,67

Tabela 10.16 Vrednosti koeficijenata b' i k' modela nestacionarne difuzije kroz biljni materijal mikrotalasne ekstrakcije srca koštica lovor višnje pri odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³

	<i>n</i> -Heksan			Sistem <i>n</i> -heksan:voda – 9:1		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,72±0,009	0,70±0,013	0,89±0,045	0,72±0,016	0,76±0,030	0,85±0,030
$k'10^{-3}, \text{min}^{-1}$	10,4±1,40	19,4±2,18	29,5±2,86	14,3±2,57	16,1±3,74	24,5±2,16

Tabela 10.17 Vrednosti koeficijenata b i k modela zasnovanog na teoriji filma za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije listova lovor višnje metanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,29±0,007	0,31±0,019	0,32±0,012	0,23±0,003	0,25±0,015	0,27±0,007	0,12±0,001	0,13±0,001	0,14±0,006
$k'10^{-3}, \text{min}^{-1}$	67,2±4,96	84,3±3,73	143,3±3,71	16,3±0,16	17,7±0,49	18,9±0,87	6,2±0,06	6,7±0,22	6,5±0,53

Tabela 10.18 Vrednosti koeficijenata b i k modela zasnovanog na teoriji filma za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije listova lovor višnje vodom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,30±0,018	0,33±0,030	0,39±0,018	0,21±0,011	0,24±0,061	0,26±0,009	0,12±0,002	0,13±0,005	0,14±0,009
$k'10^{-3}$ min ⁻¹	48,2±3,36	88,7±6,69	101,4±8,20	12,8±1,61	15,7±0,34	16,1±0,64	5,3±0,38	6,31±0,59	6,5±0,48

Tabela 10.19 Vrednosti koeficijenata b i k modela zasnovanog na teoriji filma za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije listova lovor višnje 2-propanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,14±0,053	0,16±0,013	0,17±0,013	0,10±0,004	0,14±0,007	0,16±0,009	0,07±0,002	0,08±0,001	0,10±0,004
$k'10^{-3}$ min ⁻¹	28,0±2,54	82,1±5,76	92,2±3,38	19,8±0,40	18,3±0,71	19,56±0,82	7,6±0,47	7,4±0,43	8,1±0,47

Tabela 10.20 Vrednosti koeficijenata b i k modela zasnovanog na teoriji filma za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije plodova lovor višnje metanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,13±0,005	0,16±0,006	0,17±0,005	0,11±0,043	0,12±0,004	0,12±0,009	0,06±0,043	0,07±0,002	0,07±0,005
$k'10^{-3}$ min ⁻¹	78,9±1,32	108,4±4,51	135,2±1,32	21,3±0,60	22,4±0,50	22,9±0,67	8,7±0,18	9,0±0,10	9,2±0,22

Tabela 10.21 Vrednosti koeficijenata b i k modela zasnovanog na teoriji filma za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije plodova lovor višnje vodom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,14±0,010	0,23±0,031	0,28±0,007	0,19±0,007	0,20±0,004	0,21±0,005	0,1±0,001	0,11±0,001	0,12±0,002
$k' 10^{-3}, \text{min}^{-1}$	77,1±4,94	99,6±3,46	131,8±2,72	17,7±0,26	19,0±0,49	20,0±0,58	7,47±0,13	7,91±0,30	8,01±0,28

Tabela 10.22 Vrednosti koeficijenata b i k modela zasnovanog na teoriji filma za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije plodova lovor višnje 2-propanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b'	0,22±0,024	0,24±0,013	0,26±0,003	0,16±0,026	0,22±0,011	0,24±0,004	0,10±0,001	0,12±0,003	0,14±0,002
$k' 10^{-3}, \text{min}^{-1}$	85,8±0,70	112,7±5,04	133,0±3,14	19,7±0,35	19,9±1,41	22,5±1,89	8,1±0,13	8,0±0,46	7,4±0,17

Tabela 10.23 Vrednosti koeficijenata b i k modela zasnovanog na teoriji filma za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije srca koštica lovor višnje pri odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³

	<i>n</i> -Heksan			Sistem <i>n</i> -heksan:voda – 9:1		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
b	0,47±0,007	0,38±0,006	0,30±0,064	0,51±0,030	0,49±0,008	0,45±0,048
$K 10^{-3}, \text{min}^{-1}$	11,8±0,24	12,7±1,36	14,2±1,67	11,8±0,54	12,2±1,62	15,4±1,27

Tabela 10.24 Vrednosti parametara c_{max} i K_s , modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije listova lovor višnje metanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
c_{max} , g/dm ³	24,0±0,21	25,9±0,87	27,2±0,69	13,1±0,13	13,6±0,06	14,5±0,59	6,5±0,18	6,9±0,16	7,2±0,48
K_s , min	3,4±0,16	3,5±0,27	3,4±0,12	3,3±0,11	2,8±0,18	3,0±0,21	3,0±0,25	2,7±0,47	2,7±0,16

Tabela 10.25 Vrednosti parametara c_{max} i K_s , modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije listova lovor višnje vodom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
c_{max} , g/dm ³	22,1±0,77	26,7±0,78	25,7±0,25	12,2±0,16	13,4±0,08	13,3±0,03	6,0±0,47	6,9±0,17	6,8±0,19
K_s , min	3,2±0,03	4,4±0,22	2,6±0,20	3,3±0,18	3,2±0,18	2,6±0,23	2,6±0,80	3,2±0,22	2,7±0,46

Tabela 10.26 Vrednosti parametara c_{max} i K_s , modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije listova lovor višnje 2-propanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
c_{max} , g/dm ³	24,8±1,15	19,8±0,41	20,3±0,46	13,62±0,37	11,2±0,68	10,6±0,02	5,28±0,20	5,0±0,17	5,2±0,32
K_s , min	17,1±1,37	8,4±0,52	7,63±0,75	16,75±1,60	8,8±1,51	7,0±0,62	10,14±0,37	7,3±0,28	5,96±0,39

Tabela 10.27 Vrednosti parametara c_{max} i K_s , modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije plodova lovor višnje metanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
c_{max} , g/dm ³	84,5±6,42	84,3±2,84	88,6±2,67	59,5±5,40	45,4±0,84	51,3±1,68	28,4±0,82	28,3±1,14	28,5±0,40
K_s , min	10,0±0,69	7,31±0,34	9,4±0,60	12,3±1,13	10,2±0,56	10,0±0,74	11,8±0,84	10,7±1,27	10,2±0,40

Tabela 10.28 Vrednosti parametara c_{max} i K_s , modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije plodova lovor višnje vodom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
c_{max} , g/dm ³	68,7±1,58	72,0±2,08	75,1±1,26	36,0±0,30	37,4±0,41	39,0±0,67	18,3±0,26	18,5±0,29	19,7±0,4
K_s , min	4,68±0,21	5,0±0,18	4,8±0,26	4,4±0,27	4,5±0,26	4,6±0,25	4,1±0,17	4,3±0,19	4,1±0,41

Tabela 10.29 Vrednosti parametara c_{max} i K_s , modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije plodova lovor višnje 2-propanolom

	Odnos biljni materijal-rastvarač 1:5 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm ³			Odnos biljni materijal-rastvarač 1:20 g/cm ³		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
c_{max} , g/dm ³	34,1±0,55	36,4±0,39	36,1±0,47	18,6±0,28	18,9±0,61	19,4±0,16	9,7±0,43	10,4±0,50	9,9±0,32
K_s , min	5,2±0,48	4,7±0,34	3,5±0,28	4,7±0,04	3,6±0,31	3,1±0,11	4,8±0,26	4,2±0,24	2,6±0,43

Tabela 11,30 Vrednosti parametara c_{max} i K_s , modela zasnovanog na hiperbolnoj jednačini za različite uslove mikrotalasne ekstrakcije srca koštica lovor višnje pri odnosu biljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm³

	<i>n</i> -Heksan			Sistem <i>n</i> -heksan:voda – 9:1		
	300 W	450 W	600 W	300 W	450 W	600 W
c_{max} g/dm ³	36,9±0,89	38,6±0,58	44,2±1,40	36,9±0,51	37,6±0,24	41,2±0,71
K_s , min	3,41±0,051	3,12±0,116	3,41±0,242	2,42±0,208	2,07±0,046	2,08±0,165



**Универзитет у Нишу
Универзитетска библиотека**

Овај текст је део Дигиталног репозиторијума, јавно је доступан, и може се слободно користити за личне потребе, у образовне и научне сврхе. Ако користите текст, наведите извор.

Комерцијална употреба текста није дозвољена.

**University of Niš
University Library**

This text is a part of the Digital repository of public domain. Permission is granted for personal, educational and scientific use. If you do use the document, indicate the source.

No permission is granted for commercial use.

