

# Odabir "zelenih" otapala u ekstrakcijama bioaktivnih komponenata i eteričnih ulja putem digitalnog predviđanja

---

Kovač, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:565015>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2019.

Ana Kovač  
1096/PI

ODABIR „ZELENIH“ OTAPALA U  
EKSTRAKCIJAMA BIOAKTIVNIH  
KOMPONENATA I ETERIČNIH  
ULJA PUTEM DIGITALNOG  
PREDVIĐANJA

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Marinele Nutrizio, mag. nutr.

*Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa "zelenim otapalima" primjenom visokonaponskog pražnjenja“ (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.*

## **ZAHVALA**

Želim se zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak najprije što je udijelila svoje mentorstvo te prenijela svoje znanje i olakšala sami kraj mog studiranja.

Želim se zahvaliti i mag. nutr. Marineli Nutrizio na pomoći u izradi diplomskog rada što je odvojila vrijeme kako bi moj diplomski rad bio uspješno proveden.

Također se želim zahvaliti kolegama koji su pomogli u eksperimentalnom provođenju diplomskog rada.

I na kraju velika hvala roditeljima koji su me poticali i dijelili savjete bez čega ne bih uspjela.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### ODABIR „ZELENIH“ OTAPALA U EKSTRAKCIJAMA BIOAKTIVNIH KOMPONENATA I ETERIČNIH ULJA PUTEM DIGITALNOG PREDVIĐANJA

Ana Kovač, 1096/PI

**Sažetak:** Cilj ovog istraživanja bio je provesti ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz kadulje (*Salvia officinalis* L.) i origana (*Origanum vulgare* L.) klasičnom ekstrakcijom i ekstrakcijom ultrazvukom visoke snage. Naglasak je bio utvrditi te odabrati zelena otapala za provođenje ekstrakcija, te predvidjeti topivost bioaktivnih komponenata u otapalima što je utvrđeno putem Conductor-like Screening Model for Real Solvents (COSMO-RS) i Hansen softverskim paketima. Nadalje, cilj je bio eksperimentalno utvrditi predviđene rezultate topljivosti. Tijekom istraživanja uzorci kadulje (*Salvia officinalis* L.) i origana (*Origanum vulgare* L.) tretirani su ultrazvukom visoke snage pri amplitudi 75 i 100 %. Ekstrakcija tretiranih i netretiranih uzoraka (1 g uzorka u 50 mL otapala) provodila se 3 i 9 min s vodom, 25 %-tnim i 50 %-tnim etanolom te etil-acetatom, dimetil karbonatom, limonenom i  $\alpha$ -pinenom. Najveći prinos ukupnih fenola dobiven je kod uzorka origana tretiranog 3 min pri amplitudi od 100 % u otopini 25 %-tnog etanola. Korištenjem metode ultrazvuka dokazana je viša antioksidacijska aktivnost uzoraka u usporedbi s konvencionalnom metodom.

**Ključne riječi:** kadulja, origano, COSMO-RS, Hansen-ovi parametri topljivosti, ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost

**Rad sadrži:** 50 stranica, 4 slike, 16 tablica, 41 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

**Pomoć pri izradi:** Marinela Nutrizio, mag. nutr.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić
2. Prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak
3. Doc. dr. sc. Filip Šupljika
4. Izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (zamjena)

**Datum obrane:** 29. listopada 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Food Processes Engineering

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### SELECTION OF "GREEN" SOLVENTS IN EXTRACTIONS OF BIOACTIVE COMPONENTS AND ESSENTIAL OILS BY DIGITAL PREDICTION

*Ana Kovač, 1096/PI*

**Abstract:** *The aim of this study was to conduct extractions of bioactive components from sage (*Salvia officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using classical extraction and extraction by means of high power ultrasound. The goal was to identify and select the green solvents that can be used for further extractions, and to predict the solubility of the bioactive components in solvents as determined through "Conductor-like Screening Model for Real Solvents (COSMO-RS)" and "Hansen" softwares. Furthermore, the aim was to experimentally determine/evaluate the predicted solubility results. Samples of sage (*Salvia officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) were treated by means of high power ultrasound using amplitude rate of 75 % and 100 %. Extraction of treated and untreated samples (1 g of sample in 50 mL of solvent) were treated for 3 and 9 min using solvents: water, 25 % and 50 % ethanol and ethyl acetate, dimethyl carbonate, limonene and  $\alpha$ -pinene. Largest yield of total phenolics was obtained with an oregano sample that was treated for 3 min, using amplitude of 100 % in a solution of 25 % ethanol. Utilization of ultrasound method showed higher antioxidant activity of the samples, as compared to the samples that were subjected to the conventional method.*

**Keywords:** *sage, oregano, COSMO-RS, Hansen solubility parameters, total phenolic compounds, antioxidant activity*

**Thesis contains:** 50 pages, 4 figures, 16 tables, 41 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD. Anet Režek Jambrak, Full professor*

**Technical support and assistance:** *Marinela Nutrizio, M.Sc.*

**Reviewers:**

1. PhD. *Mojca Čakić Semenčić*, Assistant professor
2. PhD. *Anet Režek Jambrak*, Full professor
3. PhD. *Filip Šupljika*, Assistant professor
4. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 29<sup>th</sup> october 2019

Sadržaj	stranica
<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Korištenje softverskih paketa u predviđanjima otapanja pojedinih komponenti u otapalimA .....	2
2.1.1. Conductor-like Screening Model for Real Solvents (COSMO-RS) .....	2
2.1.1.1. Ograničenja COSMO-RS .....	3
2.1.2. Hansen-ovi parametri topljivosti (HSP, eng. <i>Hansen Solubility Parameters</i> ) .....	3
2.1.3. Metode molekularnog dizajna (CAMD).....	4
2.2. Ekstrakcija.....	5
2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima .....	5
2.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidima .....	6
2.2.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom .....	7
2.2.4. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem .....	7
2.2.5. Visokonaponsko električno pražnjenje – plazme u ekstrakciji .....	8
2.2.6. Subkritična vodena ekstrakcija .....	8
2.2.7. Usporedba s konvekcionalnom ekstrakcijom .....	8
2.3. Zelena otapala.....	10
2.4. Bioaktivne komponente.....	11
2.4.1. Polifenoli .....	11
2.4.2. Alkaloidi.....	12
2.4.3. Terpenoidi .....	12
2.4.4. Karotenoidi.....	12
2.5. Mediteranske biljke.....	13
2.5.1. Kadulja.....	13
2.5.2. Origano .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
3.1. Materijali .....	16
3.1.1. Uzorci.....	16
3.1.2. Kemikalije .....	16
3.1.3. Aparatura i pribor.....	18
3.2. Metode rada.....	18
3.2.1. Priprema uzoraka .....	18
3.2.2. Označavanje uzoraka .....	18
3.2.3. Hansenovi parametri topljivosti .....	20
3.2.4. COSMO-RS izračuni .....	20
3.2.5. Tretiranje ultrazvukom visoke snage .....	20
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....	21



3.2.7. Određivanje ukupnih fenola .....	22
3.2.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom .....	23
3.2.9. Određivanje pH vrijednosti i vodljivosti .....	24
3.2.10. Određivanje oksidacijsko-redukcijskog potencijala .....	24
3.2.11. Određivanje boje .....	25
3.2.12. Reološka analiza uzoraka .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>27</b>
4.1. Rezultati COSMO-RS izračuna .....	28
4.2. Rezultati Hansen proračuna .....	31
4.3. Utjecaj ultrazvuka na pH, električnu provodnost i oksidacijsko-redukcijski potencijal .....	33
4.4. Utjecaj ultrazvuka na ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost .....	36
4.4.1. Rezultati statističke obrade za prinos fenola i antioksidacijske aktivnosti .....	39
4.5. Utjecaj ultrazvuka na boju uzoraka .....	41
4.5.1. Rezultati statističke obrade za boju .....	43
4.6. Rezultati reoloških svojstava otapala .....	44
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>47</b>

## 1. UVOD

Kadulja (*Salvia officinalis* L.) je aromatična biljka poznata po sadržaju eteričnog ulja. Jedna je od najcjenjenijih biljaka zbog bogatstva sadržaja esencijalnog ulja i njegovih brojnih biološki aktivnih spojeva. Smatra se da ima najveći prinos esencijalnog ulja među vrstama *Salvia*. Eterično ulje kadulje sadrži monoterpene  $\alpha$ - i  $\beta$ -tujon, kamfor, 1,8-cineole i borneol, a ponekad i u većim količinama seskviterpene  $\alpha$ -humulen i  $\beta$ -kariofilen. Kadulja je poznata ljekovita i kulinarska biljka koja se široko koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Koristi se kao antidijabetičko, antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, antivirusno, gastroprotektivno i antimutagensko sredstvo. Origano (*Origanum vulgare* L.) je također aromatična i ljekovita biljka koju karakterizira velika raznolikost u kemijskom sastavu. Ima mnoštvo sastojaka, među ostalim esencijalna ulja timol i karvakrol, sabinen, *cis*-ocimen, *p*-cimen, flavonoide (antioksidansi), ružmarinsku kiselinu, vitamine A i C, te brojne minerale. Zbog baktericidna, antiviralnog, fungicidnog, antireumatskog i antitoksičnog djelovanja cijenjen je kao ljekovita vrsta. U ovom radu istraživat će se topljivost bioaktivnih komponenata mediteranskog bilja odabirom zelenih otapala klasičnom ekstrakcijom i ekstrakcijom ultrazvukom visoke snage, gdje je topljivost predviđena putem COSMO-RS i Hansen softverskim paketima. Posebna pozornost posvećena je topljivosti fenola koji djeluju antioksidativno, neutraliziraju nastale slobodne radikale ili sprječavaju njihovo nastajanje. Klasične metode koje se koriste za ekstrakciju primjenjuju visoke temperature, veliku potrošnju energije i organskih otapala štetnih za okoliš te dulje vrijeme ekstrakcije. Kako bi se ti uvjeti poboljšali koriste se netopliinske metode ekstrakcije koje skraćuju vrijeme ekstrakcije, koriste niže temperature pa se mogu ekstrahirati i termolabilni spojevi, te korištenje zelenih otapala koja zamjenjuju upotrebu heksana koji je zapaljiv. Jedna od tih metoda je ekstrakcija ultrazvukom, koja poštuje načela zelene kemije i korištena je u ovom istraživanju. Zelena otapala su obnovljivi izvori proizvedeni iz biomase kao što su drvo, škrob, biljna ulja i voće. Ona imaju dobru moć otapanja, biorazgradivost, netoksičnost i nezapaljivost. U istraživanju osim fenola i antioksidacijske aktivnosti, cilj je bio odrediti fizikalno-kemijske parametre ekstrakata (pH, temperatura, električna provodnost, oksidacijsko-redukcijski potencijal, viskoznost te boja ekstrakata).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KORIŠTENJE SOFTVERSKIH PAKETA U PREDVIĐANJIMA OTAPANJA POJEDINIH KOMPONENTI U OTAPALIMA

#### 2.1.1. Conductor-like Screening Model for Real Solvents (COSMO-RS)

COSMO-RS je program za izračunavanje razlika kemijskih potencijala molekula u tekućinama. Ta razlika kemijskih potencijala transformirat će se u svojstva kao što su topljivost, aktivnosti ili tlakovi pare (Anonymus 1). Ova metoda se koristi u mnogim područjima, od kemijskog inženjerstva, farmaceutskih studija za razvoj lijekova do modeliranja termodinamičkih svojstava ionskih tekućina (Toure, 2014). Glavna primjena softvera: nekompresibilne tekućine i idealni plinovi, ravnotežna svojstva, male do srednje molekule otopljene tvari, te temperature između 170 i 600 K (Anonymus 1; Klamt, 2003). COSMO-RS je softver koji kombinira kvantni proračun i statističku termodinamiku koju su uveli Klamt i Schuurmann (Bavoh i sur., 2016). Glavna prednost COSMO-RS je ta što koristi kvantne kemijski stvorene površine gustoće naboja za opisivanje svake molekule i njenih interakcija s drugim molekulama. On se stoga može primijeniti bez grupnih parametara ili bilo kojeg specifičnog podešavanja sustava, te automatski uključuje elektroničke grupne učinke kao što su induktivni i mezomerni utjecaji na polaritet kao i intramolekularne interakcije kao što je vodikova veza (Anonymus 1). Za razliku od metoda grupnog doprinosa, koje ovise o iznimno velikom broju eksperimentalnih podataka, COSMO-RS izračunava termodinamičke podatke iz raspodjele polarnih molekulskih površina, koje su rezultat kvantno-kemijskih proračuna pojedinih spojeva u smjesi. Određuje se površinska gustoća naboja molekule i koristi se za izračunavanje kemijskog potencijala svake vrste u otopini. Dobiveni kemijski potencijali temelj su za druge termodinamičke karakteristike poput koeficijenta aktivnosti, topljivosti, tlaka pare i slobodne energije otapanja (Klamt, 2010). COSMO-RS koristi intermedijarne rezultate kvantne kemije na pojedinačnim molekulama za predviđanje termodinamičkih svojstava smjesa tih molekula. Opisan je kao najprecizniji kvantno kemijski model za predviđanje energija otapanja. Također, omogućuje predviđanje svih vrsta termodinamičkih ravnotežnih svojstava tekućina. Globalni prikaz dva glavna koraka COSMO-RS algoritma su kvantni COSMO izračuni i termodinamički izračuni. Prvi korak uključuje računanje elektrostatske energije i određivanje gustoće površinskog naboja. Drugi

korak uključuje termostatičku obradu interakcija parnih segmenta, koncept profila i završava izračunom kemijskih potencijala svake molekule (Toure, 2014).

#### 2.1.1.1. Ograničenja COSMO-RS

Unatoč nekoliko uspješnih primjena na ionske sustave COSMO-RS nije u stanju opisati opću termodinamiku elektrolita. COSMO-RS bolje opisuje ionske sustave što je više delokaliziran naboj na ionima, odnosno što je manja gustoća površinske polarizacije. Ograničenje je i nemogućnost pravilnog predstavljanja interakcija sekundarnih i tercijarnih amina s vodikovim vezama ili otapalima (Klamt i sur., 2010).

#### 2.1.2. Hansen-ovi parametri topljivosti (HSP, eng. *Hansen Solubility Parameters*)

Već više od 50 godina Hansen-ovi parametri topljivosti (HSP, eng. *Hansen Solubility Parameters*) pokazali su se praktičnim načinom za objašnjenje pitanja topljivosti, disperzije, difuzije, kromatografije i dr. (Anonymus 1). HSP su fizikalno-kemijski parametri i široko se koriste za procjenu vrste interaktivnih sila odgovornih za kompatibilnost između materijala (Lapuerta i Canoira, 2016). Princip se temelji na ukupnoj kohezivnoj energiji gustoće koja je aproksimalna zbroju gustoća energije potrebnih za prevladavanje:

- a) sile atomske disperzije ( $\delta^2_d$ ),
- b) molekularne polarne sile koja proizlazi iz dipolnih momenata ( $\delta^2_p$ )
- c) vodikove veze (razmjena elektrona, proton donor / akceptor) između molekula ( $\delta^2_h$ ) (Aissou i sur., 2017).

HSP se koristi u industriji i akademskim krugovima svakodnevno radi rješavanja stvarnih problema: polimera, otapala, nanočestica, difuzije, mirisa i okusa, sigurnosti, organskih fotonaponskih sustava, plastifikatora, znanosti o hrani (Anonymus 1). Prilikom izračuna parametara programski paket HSPiP (eng. *Hansen Solubility Parameters in Practice*) primjenjuje nekoliko metoda grupnog doprinosa za određivanje vrijednosti Hansenovih parametara: Van Krevelenova metoda, Stefani-Panayiotou metoda, Hoy ili Yamamoto metoda. HSPiP je softver, zbirka skupova podataka i radnih primjera, sve u jednom paketu. Ključ uspjeha HSPiP-a je u tome što osigurava prediktivnu moć HSP-a u jedinstvenom paketu sa svim informacijama i alatima za izračun koji su spremni za djelovanje. Softver, osim što izračunava i vizualizira HSP u 3D, ima i otapalo za optimizaciju (do 8 otapala, plus grafički prikaz

promjena smjese otapala ovisno o relativnim stopama isparavanja, koeficijentima aktivnosti i temperaturi), te kalkulator polimera (Anonymus 1).

a) *Metoda Stefani-Panayiotou:*

Metoda raščlanjuje molekulu u prvom stupnju u molekularnu strukturu spoja i u drugom stupnju na funkcionalne skupine, koje imaju vlastite parametre. Ova metoda je prikladna samo za molekule jednostavne strukture.

b) *Van Krevelenova metoda:*

Poseban doprinos ovog postupka je uvođenje funkcije simetričnosti koja omogućuje izračunavanje vrijednosti Hansenovih parametara koje odgovaraju ravnini simetrije u molekulama.

c) *Hoyeova metoda:*

Ova metoda je slična raščlambi molekularne strukture drugog stupnja na funkcionalne skupine kao u Stefani-Panayiotou metodi, uz dodatno razmatranje utjecaja različitih prstenastih struktura i mogućih doprinosa izomernih oblika.

d) *Yamamotova metoda:*

Omogućuje automatski unos strukturnih elemenata prvog stupnja prema SMILES (eng. *Simplified Molecular Input Entry System*) ili InChI (eng. *International Chemical Identifier*) kodu koji strukturnu formulu spoja prevodi u linearan zapis razumljiv programu, koji dalje stvara podgrupe strukture spoja.

Hansenov pristup ne razmatra Van der Waalove veze (inducirani dipol), niti kiselinsko-bazne učinke.

Korištenje Hansenovih parametara topljivosti (HSP) je korisna teorijska pomoć za odabir otapala te se koristi za predviđanje topljivosti prirodnih bioaktivnih spojeva u različitim otapalima zbog svoje visoke točnosti i dobre interpretabilnosti (Li i sur., 2014).

### 2.1.3. Metode molekularnog dizajna (CAMD)

Osim COSMO-RS, koriste se računalno potpomognute metode molekularnog dizajna (CAMD). U CAMD-u se dizajn kemijskih proizvoda kombinira s metodama predviđanja svojstava. Uspjeh CAMD metoda snažno se oslanja na temeljnu metodu svojstava. Obično se CAMD temelji na metodama grupnog doprinosa prvog reda (plinska kromatografija, GC, eng. *gas chromatography*), koje pojednostavljuju temeljnu termodinamičku sliku pretpostavljajući aditivnost molekularnih skupina. GC metode nadalje zahtijevaju primarne pokuse za parametrizaciju, što je posebno problematično za nove spojeve. Ograničenja GC metoda mogu

se prevladati *ab initio* kvantno-mehaničkim izračunima, koji daju vrlo točna predviđanja, ali mogu biti računski zahtjevni. Uravnotežen kompromis između točnosti i računске učinkovitosti postignut je termodinamičkim modelom COSMO-RS. Time COSMO-RS osigurava točne i računski učinkovite izračune, a ne zahtijeva nikakve eksperimentalne podatke (Scheffczyk i sur., 2016).

## 2.2. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija se koristi od otkrivenja vatre, Egipćani i Feničani, Židovi i Arapi, Indijci i Kinezi, Grci i Rimljani, pa čak i Maje i Azteci, svi su posjedovali inovativne procese ekstrakcije i destilacije koji se koriste za parfeme, kozmetiku ili hranu. Danas ne možemo pronaći proizvodnu liniju u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, nutritivnoj ili bioenergetskoj industriji koja ne koristi ekstrakcijske procese (Chemat i sur., 2017). Uobičajene tehnike ekstrakcije temelje se na ekstrakcijskoj snazi različitih otapala, pri uporabi i primjeni topline i/ili miješanja. Klasične tehnike ekstrakcije su: ekstrakcija po Soxhlet-u, maceracija i hidrodestilacija (Shahid i sur., 2016). Uz sve veće troškove energije i zahtjevom za smanjenjem emisija stakleničkih plinova, prehrambena i biljna kemijska industrija imaju izazov pronaći nove tehnologije. Takvim tehnologijama bi se smanjila potrošnja energije, zadovoljili zakonski zahtjevi za emisije, sigurnost proizvoda i procesa te smanjili troškovi i povećala kvaliteta. U posljednja dva desetljeća ovi nedostaci doveli su do razmatranja uporabe poboljšanih i učinkovitih tehnika ekstrakcije podložnih automatizaciji, poput ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka. Kraće vrijeme ekstrakcije, smanjena potrošnja organskog otapala te ušteda energije i smanjenje troškova bili su glavni zadaci koji su se izvršavali. Vođeni tim ciljevima, napredak ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka rezultirao je nizom inovativnih tehnika poput ultrazvučne ekstrakcije Soxhlet-a, destilacije Clevenger-a pomoću ultrazvuka, kontinuirane ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka i kombinacije ultrazvuka s drugim tehnikama kao što su mikrovalna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidima, pulsirajućim električnim poljem itd. (Chemat i sur., 2017).

### 2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi s frekvencijskim rasponom od 0,1–3 GHz. Sadrže komponente električnog i magnetskog polja u širenju elektromagnetske energije, koje djeluju

kao neionizirajuće zračenje koje uzrokuje molekularno gibanje iona i rotaciju dipola, ali ne utječe na molekularnu strukturu. Kad se dielektrični materijali koji sadrže trajne ili inducirane dipole postave u mikrovalno polje, rotacija dipola u izmjeničnom polju proizvodi toplinu. Primijenjeno mikrovalno polje uzrokuje da molekule u prosjeku troše nešto više vremena orijentirajući se u smjeru električnog polja, a ne u drugim smjerovima. Kada se ukloni električno polje, toplinsko miješanje vraća molekule u neuredno stanje u vremenu opuštanja i oslobađa se toplinska energija. Grijanje mikrovalovima rezultat je raspršivanja elektromagnetskih valova u ozračenom mediju. Snaga koja se rasipa u mediju ovisi o složenoj propusnosti materijala i lokalnoj jakosti električnog polja. Mikrovalovi pružaju beskontaktni izvor topline, koji ne samo da može grijanje učiniti učinkovitijim i selektivnijim, već također pomoći ubrzavanju prijenosa energije, pokretanju i reakciji na regulaciju grijanja te smanjiti toplinski gradijent, veličinu opreme i radne jedinice (Chemat i sur., 2015a).

### 2.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Superkrična tekućina je fluid pri temperaturi i tlaku iznad kritične točke, gdje ne postoje različite faze tekućine i plina. Superkrična tekućina ima tipičnu gustoću tekućine, viskoznost sličnu plinu i difuzni međuprodukt između tekućine i plina. Zbog svoje niske viskoznosti i velike difuznosti superkrične tekućine posjeduju mnogo bolja transportna svojstva od tekućina. Važna prednost superkričnih fluida je ta što se gustoća fluida može mijenjati promjenom temperature i tlaka fluida, a time i snaga otapanja fluida može biti promijenjena promjenama temperature i tlaka, jer ovisi o gustoći tekućine. Superkrični fluid nudi brzu stopu ekstrakcije i visoki prinos te je ekološki prihvatljiv postupak s minimalnom ili nikakvom uporabom organskih otapala (Shahid i sur., 2016). Najčešće korištena tvar za superkrične ekstrakcijske procese je ugljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ ). Ima nisku kritičnu temperaturu ( $31,1\text{ }^\circ\text{C}$ ), nije toksičan i siguran je za korištenje (Barba i sur., 2015). Jedina mana superkričnog  $\text{CO}_2$  (SC- $\text{CO}_2$ ) je njegova mala polarnost. Pogodna otapala superkričnog  $\text{CO}_2$  čine ga idealnim za ekstrakciju nepolarnih spojeva poput ugljikovodika, dok mu veliki kvadrapolni moment omogućuje i otapanje nekih umjereno polarnih spojeva poput alkohola, estera, aldehida i ketona (Shahid i sur., 2016).

### 2.2.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija jedna je od najnovijih modernih tehnika ekstrakcije biljnih fenolnih spojeva. Ultrazvučni valovi su visokofrekventni zvučni valovi iznad ljudskog kapaciteta sluha ( $> 20$  kHz), koji mogu prolaziti kroz krute, plinske i tekuće medije. Ultrazvuk je klasificiran prema frekvencijskom rasponu kao ultrazvuk snage (20–100 kHz) i dijagnostički ultrazvuk (1–10 MHz). Poznato je da ovi valovi stvaraju kavitacije u tekućem mediju osim drugih mehaničkih učinaka poput disperzije, otplinjavanja, difuzije i intenzivnog miješanja tekućine. Kolaps ovih kavitacijskih mjehurića izaziva mehanički stres na stanice i posljedični poremećaj stanica i prodiranje otapala u stanice što povećava otapanje spoja i na kraju ekstrakcijski prinos. Kavitacija blizu granica faza tekuće-kruto usmjerava brzi tok tekućine kroz šupljinu na površini. Ispiranje ovih mikrojetova dovodi do površinskog ljuštenja, erozije i raspada čestica, što olakšava oslobađanje bioaktivnih spojeva iz biološkog matriksa. Ovaj učinak povećava učinkovitost ekstrakcije povećanjem prijenosa mase vrtložnim i unutrašnjim difuzijskim mehanizmima. Ultrazvučna ekstrakcija omogućuje miješanje, omogućuje brži prijenos energije, omogućuje selektivnu ekstrakciju, smanjuje toplinske gradijente i temperaturu ekstrakcije, daje brži odziv na kontrolu procesa ekstrakcije, brzo pokretanje i povećanu proizvodnju. Zbog jednostavnosti, lakoće rukovanja, manjih troškova, manje potrošnje organskih otapala i tehnike smanjenja vremena ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija postaje sve popularnija i mogla bi biti vrlo obećavajuća, pouzdana i izvediva metoda za ekstrakciju biljnih fenola u budućnosti (Shahid i sur., 2016).

### 2.2.4. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem

Proces pulsirajućeg električnog polja (PEF, eng. *pulsed electric field*) brz je, netermalan i vrlo učinkovit način za ekstrakciju unutarstaničnih spojeva. Djeluje otvaranjem tj. oštećenjem stanične membrane tzv. elektroporacijom, gdje tekuća hrana ili drugi proizvodi, prolaze kroz malu komoru za obradu, gdje su izloženi kratkom impulsu vrlo visokog napona. Tijekom suspenzije žive stanice u električnom polju, električni potencijal prolazi kroz membranu te stanice, a na temelju dipolne prirode membranskih molekula električni potencijal razdvaja molekule prema njihovom naboju u staničnoj membrani. Nakon prelaska kritične vrijednosti od otprilike 1 V transmembranskog potencijala dolazi do odbojnosti između molekula koje nose naboj koji formira pore u slabim područjima membrane i uzrokuje drastično povećanje propusnosti (Shahid i sur., 2016).



### 2.2.5. Visokonaponsko električno pražnjenje – plazme u ekstrakciji

Tijekom električnog pražnjenja dolazi do razaranja stanične strukture biološkog materijala, omogućuje se bolji kontakt otapala s materijalom odnosno dolazi do olakšane ekstrakcije bioaktivnih molekula. Primjenom visokog napona između dvije elektrode u vodenoj otopini dolazi do tzv. elektroporacije („električnog sloma“) koji utječe na fizikalne i kemijske promjene u svome okruženju. Formiranjem usmjerenog gibanja elektrona između elektroda uz odgovarajući izvor napona dolazi do pulsirajućeg električnog pražnjenja pri čemu se otpušta energija u okolinu što rezultira stvaranjem lokalizirane plazme (ionizira se plin) koja emitira ultraljubičasto zračenje (UV) visokog intenziteta u vidljivom spektru (Boussetta i Vorobiev, 2014).

### 2.2.6. Subkritična vodena ekstrakcija

Subkritična vodena ekstrakcija (SCWE, eng. *sub-critical water extraction*) još je jedna ekološki prihvatljiva tehnika koja dobiva sve veću pažnju u cilju smanjenja ili uklanjanja upotrebe organskih otapala i poboljšavanja ekstrakcije. Voda, nezapaljiva, netoksična, lako dostupna i ekološki prihvatljivo otapalo još uvijek se većinom ne koristi kao analitičko otapalo za ekstrakciju biljnih materijala jer je previše polarna da bi mogla učinkovito otapati većinu organskih tvari koje su povezane s botaničkom proizvodnjom. Subkritična voda je topla voda pri temperaturama između 100 i 374 °C pod visokim tlakom u tekućem stanju. Dielektrična konstanta koja se može mijenjati temperaturom najvažniji je čimbenik kada se voda koristi kao ekstrakcijsko otapalo. Pri subkritičnim uvjetima dielektrična konstanta vode smanjuje se zbog pucanja intermolekularnih vodikovih veza. Dielektrična konstanta vode smanjuje se s 80 °C (na sobnoj temperaturi) na 27 °C (na 250 °C), što je gotovo jednako vrijednosti etanola pri sobnoj temperaturi. U posljednje vrijeme sve se veća pažnja posvećuje istraživanjima u kojima se SCWE tehnika koristi za ekstrakciju biljaka (Shahid i sur., 2016).

### 2.2.7. Usporedba s konvekcionalnom ekstrakcijom

Velika ograničenja povezana s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije kao što su duže vrijeme ekstrakcije, visoka čistoća otapala, isparavanje ogromne količine otapala, niska selektivnost ekstrakcije i termička razgradnja termolabilnih spojeva, doveli su do razvoja novih i

perspektivnih tehnika ekstrakcije. Ovo područje ima veliki potencijal za širenje i promociju napretka u suvremenim postupcima ekstrakcije bioaktivnih komponenti biljaka i može naći širu primjenu zbog povećane potražnje za biljnim proizvodima (Shahid i sur., 2016).

Primjena modernih metoda ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim metodama rezultira većom efikasnošću ekstrakcije, utroškom manjeg volumena otapala i većim prinosom, odnosno većim masenim udjelom željenih bioaktivnih komponenti iz čvrstog biljnog materijala (Yousif Mutalib, 2015).

### 2.3. ZELENA OTAPALA

„Zelena“ ekstrakcija se temelji na otkrivanju i osmišljavanju ekstrakcijskih procesa koji bi smanjili potrošnju energije, omogućili upotrebu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda te osigurali siguran i kvalitetan ekstrakt/proizvod. Na ekstrakciju posebno utječu ekološki i ekonomski čimbenici koji zahtijevaju masivno smanjenje potrošnje energije i proizvedenog otpada. Postoje četiri načina za smanjenje potrošnje energije: optimiziranje postojećih procesa, rekuperacija energije oslobođene tijekom procesa ekstrakcije, pomaganje postojećim procesima intenziviranjem i potpuna inovacija procesa. Primjeri smanjene potrošnje energije ponovnom uporabom energije i primjene inovativnih tehnologija su ekstrakcije mikrovalovima i/ili ultrazvukom, primjena alternativnih otapala kao što su superkritični fluidi (CO<sub>2</sub> i voda), ionske kapljevine i eutektička otapala (Chemat i sur., 2012). Učinkovitost ekstrakcije ovisi o nekoliko parametara, poput karakteristika otapala, omjera krutina/tekućina, temperature, vremena i postupaka. Odabir odgovarajućeg otapala izuzetno je važan te zbog toga treba uzeti u obzir selektivnost, polarnost, vrelište, viskoznost, toksičnost itd. (Chaabani i sur., 2019). Viskoznost otapala mora biti dovoljno niska da otapalo može lako proći sloj krutih čestica, a također veći protok otapala smanjuje granični sloj između koncentrirane otopine i površine čestica te time povećava brzinu ekstrakcije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Među organskim otapalima heksan se najviše koristi za ekstrakciju aroma s obzirom na brojne prednosti poput topljivosti, selektivnosti, relativno niskog vrelišta i niske cijene. Međutim, ovo otapalo, dobiveno iz nafte, nedavno je kategorizirano kao reprotoksična tvar kategorije 2 prema Uredbi Europske direktive i registracije, procjene, autorizacije i ograničavanja kemikalija (REACH) i kao vodena kronična toksična kategorija 2. Zbog novog naglaska na zaštiti okoliša i razvoja zelene kemije, pronalazak alternativnih otapala petrokemijskim otapalima postao je glavna briga za kemičare. Alternativna otapala su obnovljivi izvori proizvedeni iz biomase kao što su drvo, škrob, biljna ulja i voće. Ova zelena otapala imaju dobru moć otapanja, biorazgradivost, netoksičnost i nezapaljivost. Doista, mnoga su istraživanja pokazala potencijal alternativnih otapala u ekstrakciji prirodnih proizvoda kao što su ekstrakcija  $\alpha$ -mangostina iz *Garcinia mangostana* L. korištenjem alternativnih otapala poput dimetilkarbonata (DMC), etil-acetata (EtOAc), te ekstrakcija aroma, npr. ekstrakcija aroma sjemena kumine primjenom EtOAc ili DMC umjesto heksana (Chaabani i sur., 2019).

## 2.4. BIOAKTIVNE KOMPONENTE

Bioaktivne komponente su nenutritivni spojevi koji su u hrani obično prisutni u malim udjelima. Intenzivno se proučavaju kako bi se utvrdio njihov povoljan utjecaj na zdravlje. Na osnovi znanstvenih, epidemioloških istraživanja učinjen je značajan napredak u definiranju uloge bioaktivnih komponenata u smanjenju rizika od mnogih kroničnih bolesti kao i objašnjenju osnovnih bioloških mehanizama takvog djelovanja. Ti sastojci se međusobno razlikuju, kako po kemijskoj strukturi, tako i po funkciji. Bioaktivne komponente biljaka se razvrstavaju u dvije skupine prema njihovoj funkciji: primarni i sekundarni metaboliti. Primarni metaboliti uključuju bilo koji spoj neophodan za osnovni metabolizam biljke, a time i preživljavanje. S druge strane sekundarni metaboliti služe za zaštitu od biljnih i mikrobioloških infekcija. Primarni metaboliti su gliceridi, lipidi, aminokiseline i proteini. Sekundarni metaboliti su uključeni u razvoj specifičnih svojstava biljke, kao što su boja i okus (npr. cvjetovi) i stoga igraju ulogu u ekološkim funkcijama biljaka (terpeni, polifenoli, alkaloidi, karotenoidi). Okusi i mirisi se uglavnom mogu pripisati esencijalnim uljima sadržanim u aromatičnim biljkama. U industriji se eterična ulja formuliraju za proizvodnju okusa i mirisa za širok raspon krajnjih namjena, kao što su sapuni, kozmetički proizvodi, parfemi, sladoled, aerosoli, sirupi i farmaceutski pripravci. Eterična ulja karakterizira jak miris i pojavljuju se kao hlapljive i čiste tekućine. Potreban je oprez kod doziranja jer neki spojevi utječu na biološke sustave. Ova svojstva omogućuju da takvi spojevi budu bioaktivni. Bernhoft je predložio definiranje bioaktivnih spojeva: sekundarni metaboliti biljaka koji izazivaju farmaceutski ili toksikološki učinak na ljude i životinje (Chemat i sur., 2015b).

### 2.4.1. Polifenoli

Polifenoli ili fenoli predstavljaju široku skupinu biljnih sekundarnih metabolita koji posjeduju brojne biološke aktivnosti uključujući antioksidacijske, antimikrobne, protuupalne, antialergijske, hepatoprotektivne i antikancerogene. Stoga postoji sve više istraživanja usmjerenih ka izolaciji tih fitokemikalija iz biljnih materijala, s ciljem da se proizvede sigurna, prirodna i jeftina alternativa sintetičkim spojevima (Jovanović i sur., 2017). Polifenoli su osjetljivi na oksidaciju. Visoka temperatura i alkalno okruženje uzrokuju njihovu degradaciju. Stoga je potreban veliki oprez prilikom ekstrakcije polifenola (Dent i sur., 2013). Polifenolni spojevi mogu biti jednostavni spojevi poput fenolnih kiselina, ali i visokopolimerizirane

molekule poput lignina i tanina (Balasundram i sur., 2006). Općenito, tekući i osušeni biljni ekstrakti (bogatim aktivnim sastojcima) široko se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. S obzirom da polifenoli iz različitih biljaka uvelike variraju u svojoj strukturi, nije moguće uspostaviti standardni protokol za ekstrakciju koji bi izdvojio sve ciljane spojeve iz svakog izvora biljke (Jovanović i sur., 2017).

#### 2.4.2. Alkaloidi

Općenito, alkaloidi su definirani kao spojevi koji sadrže dušik. Posjeduju jake farmakološke učinke. Alkaloidi su biosintetizirani počevši od različitih aminokiselina i lakše ih je klasificirati u odnosu na njihov prekursor, a ne na temelju strukture. Alkaloidi koji potječu od L-glutamata transformirani u L-ornitin sadrže pirolidinski prsten. Sustav pirolizidinskog prstena je druga struktura dobivena iz L-arginina. Druga skupina alkaloida proizlazi iz L-lizinske aminokiseline koja tvori strukturu piperidinske jezgre. Jedan od najpoznatijih alkaloida na temelju ove strukture je piperin koji se nalazi u crnom papru (Chemat i sur., 2015b).

#### 2.4.3. Terpenoidi

Terpenoidi pokrivaju veliki raspon različitih spojeva: identificirano je do 25 000 terpenoida. Zbog njihovih aromatičnih svojstava, terpenoidi su uglavnom poznati kao glavni sastojci eteričnih ulja. Isoprenoidi su građevni blokovi terpenoidne obitelji i sintetizirani su putem mevalonatnog puta ili puta deoksiksiluloze. Terpenoidi se razvrstavaju prema broju izoprenskih jedinica (Chemat i sur., 2015b).

#### 2.4.4. Karotenoidi

Karotenoidi su skupina od oko 700 organskih spojeva koji su odgovorni za žuto, narančasto, crveno ili ljubičasto pigmentiranje mnogih voća i povrća. Karotenoidi ugljikovodika (tj.  $\beta$ -karoten, likopen) poznati su kao karoteni, dok se oksigenirani derivati nazivaju ksantofili. Karotenoidi su jedna od glavnih skupina prirodnih pigmenta i stoga njihovo dodavanje prehrambenim proizvodima kao što su bezalkoholna pića, mliječni proizvodi, deserti, umaci i začini mogu biti koristan alat za modificiranje njihove boje, a istodobno i poboljšanje njihovih antioksidativnih i nutritivnih svojstava (Rosello-Soto i sur., 2015).

## 2.5. MEDITERANSKE BILJKE

### 2.5.1. Kadulja

Kadulja (*Salvia officinalis* L.) pripada obitelji Lamiaceae, aromatična je biljka poznata po sadržaju eteričnog ulja (Antolić i sur., 2018). Rod *Salvia* je najveći rod porodice Lamiaceae koji obuhvaća oko 1000 vrsta. Raste širom svijeta, obilno je rasprostranjena u Europi oko Sredozemlja, u Jugoistočnoj Aziji te Srednjoj i Južnoj Americi. Kadulja je višegodišnja zimzelena biljka s kratkim drvenastim stabljikama koje narastu do 60 cm. Prekrivena je dlakama i sivozelene je boje. Na vrhu stapke nalaze se ljubičasti cvjetovi *S. officinalis* L. jedna je od najcjenjenijih biljaka zbog bogatstva sadržaja esencijalnog ulja i njegovih brojnih biološki aktivnih spojeva. Smatra se da ima najveći prinos esencijalnog ulja među vrstama *Salvia*. Eterično ulje je izuzetno složena mješavina različitih aktivnih spojeva. Dvije glavne kemijske klase sekundarnih metabolita identificirane su kao tipični proizvodi biljke: terpenoidi i fenoli (Grdiša i sur., 2015). Eterično ulje kadulje sadrži monoterpene  $\alpha$ - i  $\beta$ -tujon, kamfor, 1,8-cineole i borneol, a ponekad i u većim količinama seskviterpene  $\alpha$ -humulen i  $\beta$ -kariofilen.



**Slika 1.** Kadulja (Anonymus 2, 2019)

U posljednje vrijeme, polifenoli pronađeni u kadulji bili su u fokusu istraživanja zbog svojih antioksidativnih i antimikrobnih svojstava. Flavonoidi, glavni polifenoli uz fenolne kiseline, opsežno su proučavani zbog njihove zaštitne uloge u prevenciji tromboze (Antolić i sur., 2017).

Zajedno s *Rosmarinus officinalis* L., pokazalo se da *S. officinalis* L. ima snažno oksidacijsko djelovanje među biljem. Pokazalo se da su glavni efektivni antioksidativni fenolni spojevi derivati karnosola i flavonoidi, ružmarinska kiselina, karnozna kiselina i karnozol, a zatim kafeinska kiselina, rosmanol, rosmadial (Santos-Gomes i sur., 2002).

Prinos esencijalnog ulja i njegov kemijski sastav ovisi o različitim čimbenicima poput lokaliteta, uvjeta okoliša, godišnjeg doba, fizioloških faza (tj. vrijeme žetve), te biljnim dijelovima koji se koriste za ekstrakciju esencijalnog ulja. Zbog snažnog utjecaja ovih čimbenika, sastav i prinos esencijalnog ulja često ne odgovaraju profilu prema standardu ISO 9909, a prema Brunetonu (1999) su:  $\alpha$ -tujon (18-43%),  $\beta$ -tujon (3-8,5%), kamfor (4,5-24,5%), 1,8-cineol (5,5- 13%),  $\alpha$ -humulen (0-12%),  $\alpha$ -pinen (1-6,5%), kamfen (1,5-7%), limonen (0,5-3%), linalool i bornil acetat (maksimum 2,5%). Kadulja je poznata ljekovita i kulinarska biljka koja se široko koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Koristi se kao antidijabetičko, antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, antivirusno, gastroprotektivno i antimutagensko sredstvo (Grdiša i sur., 2015).

### 2.5.2. Origano

Origano – divlji mažuran (*Origanum vulgare* L.) je višegodišnja, aromatična, ljekovita i medonosna biljka iz porodice usnača (Lamiaceae) koju karakterizira velika raznolikost u kemijskom sastavu. Pod nazivom „origano“ svjetski je poznat kao neophodan začin za pizzu. Zbog baktericidnog antiviralnog, fungicidnog, antireumatskog i antitoksičnog djelovanja cijijenjen je i kao ljekovita vrsta. Naraste do visine od 60 cm. Stabljika ima male tamnozeleno listiće, na vrhu zašiljene, ima crveno-ljubičaste cvjetove. Kad se list gleda prema svjetlu izgleda istočkan, a točkice predstavljaju žlijezde u kojima se nalazi eterično ulje. Biljka cvate od lipnja do kraja kolovoza (Carović i sur., 2004).



**Slika 2.** Origano (Anonymus 3, 2019)

Kao aromatična i ljekovita biljka vrlo je bogata eteričnim uljima koja cijeloj biljci daju ugodan miris. Glavne sastavnice eteričnog ulja su: karvakrol, timol, *p*-cimen, *cis*-ocimen,  $\gamma$ -kardinen. Osim eteričnih ulja sadrži i gorke tvari, tanin i dr. Na sadržaj eteričnih ulja značajan utjecaj imaju ekološki čimbenici i klimatske prilike u kojima biljka raste. Broj i veličina žlijezda na listovima kao i pricvjetnih listova i cvjetova znatno se razlikuju u uzorcima bilja ovisno o području prikupljanja. U našoj se zemlji idući od juga prema sjeveru oni znatno smanjuju, a time i sadržaj eteričnog ulja u pojedinoj biljci. Vrijeme prikupljanja također može znatno utjecati na količinu eteričnog ulja i na količinu njegovih glavnih sastavnica. Količina eteričnog ulja kod biljaka prikupljenih u ljetnom periodu značajno je viša od one kod biljaka prikupljenih u jesenskom periodu (Carović i sur., 2004). Djelovanje i uporaba origana: potiče probavu, poboljšava rad jetre i žučnog mjehura (Toplak-Galle, 2001). Ulje origana se koristi za proizvodnju sapuna, deterdženata i parfema (Carović i sur., 2004).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Cilj istraživanja je bio pomoću programskih paketa COSMO-RS i Hansen predvidjeti moguću topljivost bioaktivnih komponenti mediteranskog bilja odabirom zelenih otapala te klasičnom ekstrakcijom i ekstrakcijom ultrazvukom visoke snage potvrditi upotrebu predloženih otapala. Vrijeme ekstrakcije tretiranih (klasična ekstrakcija) i netretiranih uzoraka je 3 i 9 min, amplituda ultrazvuka se provodila na 100 % i 75 %. Određivali su se fizikalno-kemijski parametri (pH, električna provodnost, temperatura, viskoznost, oksidacijsko-redukcijski potencijal i boja) i analitički (ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost).

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci

- samljeveni origano i kadulja (biljna drogerija Suban, Samobor, Hrvatska).

##### 3.1.2. Kemikalije

- Otapala: destilirana voda, 25 % etanol, 50 % etanol, dimetilkarbonat (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, SAD), etil acetat, pinen i limonen (ACROS ORGANICS, New Jersey, SAD),
- 100 %-tni metanol (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Val de Reuil, Francuska),
- 0,5 mM otopina 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

Priprema: 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvaže u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernejkvici od 100 mL. DPPH je potrebno čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.

- Standard troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (0,02 M), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu troloxa u koncentraciji 0,02 mol L<sup>-1</sup>, 500 mg troloxa se odvaže u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjernejkvici od 100 mL. Otopinu troloxa potrebno je

čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.

- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina), (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- Standard galne kiseline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- Natrijev acetat trihidrat (Kemika d.d. Zagreb, Hrvatska)
- Octena kiselina (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland)
- 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6

Priprema: 1,55 g natrijevog acetata trihidrata otopi se u 8 mL ledene octene kiseline u odmjernoj tikvici od 500 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- 20 mM otopina željezovog(III)-klorida,  $\text{FeCl}_3$  (GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska)

Priprema: 0,0541 g  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  otopi u 10 mL destilirane vode, otopina se priprema svježa.

- 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), (ACROS ORGANICS, Geel, Belgija)

Priprema: 0,0312 g TPTZ otopi se u odmjernoj tikvici od 10 mL s 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake. Otopina se uvijek priprema svježa.

- Standard željezo (II)-sulfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), (Honeywell GmbH, Seelze, Njemačka)

Priprema: potrebno je pripremiti 1 mM otopinu željezo (II)-sulfata heptahidrat, Odvaži se 0,139 g željezo (II)-sulfata heptahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 0,5 L te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- HCl (Kemika d.d. Zagreb, Hrvatska)
- FRAP reagens

Priprema: Pomiješa se 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL  $\text{FeCl}_3$  (omjer 10:1:1).

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### Aparatura:

- Spektrofotometar (Spectrophotometer Secomam Uviline 9400, Ales, Francuska)
- Tehnička vaga (točnosti  $\pm 0,01$  g), (Axis Sp. d.o.o., Gdansk, Poljska)

#### Pribor:

- Staklene kivete
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL i 1 L
- Epruvete
- Stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Plastična lađica za vaganje
- Laboratorijske čaše
- Stakleni štapići

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Priprema uzoraka

Priprema netretiranog uzorka započinjala je vaganjem određene mase uzorka u laboratorijsku čašu te dodavanjem otapala uz lagano miješanje staklenim štapićem (ekstrahiranje) 3 ili 9 min. Nakon provedene ekstrakcije, otopina se profiltrirala kroz filter papir. Tretirani uzorci su pripremljeni na isti način, ali se ekstrakcija provodila ultrazvukom.

### 3.2.2. Označavanje uzoraka

Netretirani uzorci su označeni drugačije nego tretirani; broj označuje vrijeme ekstrakcije u minutama, "N" je oznaka netretiranog uzorka, "K" je oznaka za kadulju, a "OR" za origano, sljedeći broj 0, 25 ili 50 označava postotak etanola u korištenom vodenom otapalu i skraćenice za otapala, etil-acetat (EA), dimetil karbonat (DMC), limonen (LIM), pinen (PIN), US-ultrazvuk te brojevi 75 i 100 označavaju korištenu amplitudu ultrazvuka (Tablica 1.).

**Tablica 1.** Označavanje uzoraka

<b>Uzorak</b>	<b>Otapalo</b>
<b>3NK-0 % /OR</b>	voda
<b>9NK-0 % /OR</b>	voda
<b>3NK-25 % /OR</b>	25 %-tni etanol
<b>9NK-25 % /OR</b>	25 %-tni etanol
<b>3NK-50 % /OR</b>	50 %-tni etanol
<b>9NK-50 % /OR</b>	50 %-tni etanol
<b>3NK-EA /OR</b>	etil-acetat
<b>9NK-EA/OR</b>	etil-acetat
<b>3NK-DMC/OR</b>	dimetil karonat
<b>9NK-DMC/OR</b>	dimetil karbonat
<b>3NK-LIM/OR</b>	limonen
<b>9NK-LIM)OR</b>	limonen
<b>3NK-PIN/OR</b>	pinen
<b>9NK-PIN/OR</b>	pinen
<b>US3K-(0/25/50) % (75)</b>	voda/25 i 50 %-tni etanol
<b>US9K-(0/25/50) % (100)</b>	voda/25 i 50 %-tni etanol
<b>US3K-DMC/EA</b>	dimetil karbonat/etil-acetat
<b>US9K-DMC/EA</b>	dimetil karbonat/etil-acetat
<b>US3OR-(0/25/50) %</b>	voda/25 i 50 %-tni etanol
<b>US9OR-(0/25/50) %</b>	voda/25 i 50 %-tni etanol
<b>US3OR-DMC/EA</b>	dimetil karbonat/etil-acetat
<b>US9OR-DMC/EA</b>	dimetil karbonat/etil-acetat
<b>US3OR-LIM/PIN</b>	limonen/pinen
<b>US9OR-LIM/PIN</b>	limonen/pinen

K-kadulja, OR-origano, N-netretirani uzorak, US-uzorak tretiran ultrazvukom

### 3.2.3. Hansenovi parametri topljivosti

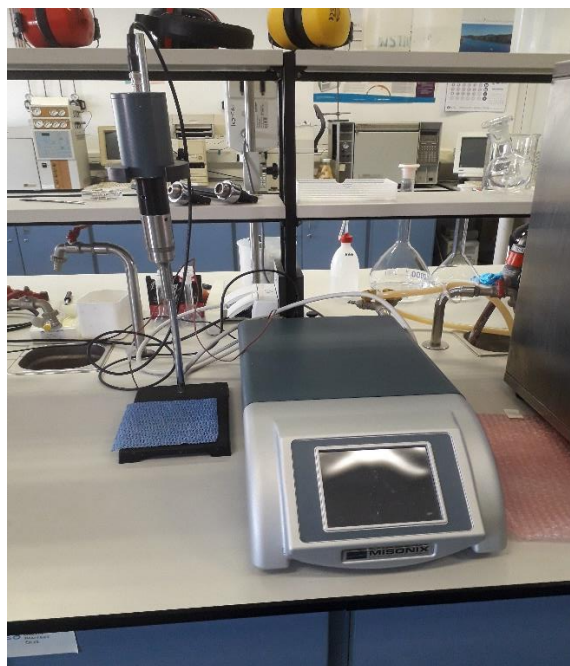
Izračunom Hansenovih parametara procjenjuje se sposobnost otapala da otapa glavne komponente ekstrakata i eteričnih ulja (flavonoide, monoterpene i monoterpenoide, diterpene, triterpenoide, fenilpropanoide i ostale sekundarne metabolite). Parametri su određeni pomoću programskog paketa HSPiP korištenjem metode doprinosa grupe po Yamamotu.

### 3.2.4. COSMO-RS izračuni

Simulacija COSMO-RS (COSMO*therm*, COSMO*logic* GmbH & Co. KG, Leverkusen, Njemačka) također je provedena kako bi se odredila relativna topljivost  $\log(x\text{-solub})$  flavonoida, monoterpena i monoterpenoida, diterpena, triterpenoida, fenilpropanoida i ostalih sekundarnih metabolita u različitim ispitivanim otapalima.

### 3.2.5. Tretiranje ultrazvukom visoke snage

Uzorci su tretirani ultrazvukom SONICATOR S-4000 (Misonix Sonicators, Newtown, Connecticut, SAD). Termočlanak i ultrazvučna sonda (model HI 9063, Hanna Instruments Ltd, Leighton, Buzzard LU7 4AD, UK) isperu se destiliranom vodom te urone u uzorak. Korištena sonda je promjera 12,7 mm. Prije tretiranja, na zaslonu uređaja podešavaju se parametri eksperimenta (vrijeme trajanja – 3 i 9 min te amplituda ultrazvuka – 75 i 100 %). Termočlanak se uranja radi praćenja temperature. Pritiskom na *display* započinje ultrazvučni tretman, a temperatura se bilježi svakih 30 sekundi. Kako bi se održala željena temperatura uzorka pri tretmanu, staklena čaša s uzorkom uranja se u čašu s ledom. Potrebno je održavati stalnu temperaturu kako bi rezultati odgovarali utjecaju ultrazvučnog tretiranja na uzorak, a ne temperature. Nakon tretmana uzorak se filtrira na filter papiru.



**Slika 3.** Ultrazvučni procesor model S-4000 (MisonixSonicators, Newtown, Connecticut, SAD)

### 3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Protokolom je definirana metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode. Ova metoda razvijena je za određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva u hrani uporabom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani oblik DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

Postupak određivanja:

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakata te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100 %-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Od izmjerene apsorbancije kontrole potrebno je oduzeti apsorbanciju uzorka. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 mL 100 % metanola.

Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0 ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti na način da se izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

Izrada baždarnog pravca za trolox (0,5 mM DPPH):

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL.

Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150  $\mu\text{M}$ .

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100 %-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 % metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0067x - 0,0299 \quad /1/$$

$$R^2 = 0,9798$$

gdje je:

y = razlika kontrole i apsorbancije uzorka pri 517 nm

x = ekvivalent troloxa (TAE) ( $\mu\text{M}$ ).

### 3.2.7. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola provodi se u ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta, 200  $\mu\text{L}$  Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri  $T=50\text{ }^\circ\text{C}$  (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerneji tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L<sup>-1</sup>. Iz svake tikvice otpipetira se 100 µL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 µL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbanija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel 2016 pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg L<sup>-1</sup>), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbanija pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0023x + 0,0581 \quad /2/$$

$$R^2 = 0,9954$$

gdje je:

y – apsorbanija pri 765 nm,

x – koncentracija galne kiseline (mg L<sup>-1</sup>).

### 3.2.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Metoda se temelji na sposobnosti ekstrakta da reducira Fe<sup>3+</sup> ione u Fe<sup>2+</sup> ione u otopini TPTZ pri nižem pH. Redukcija se prati mjerenjem promjene apsorbanija pri 595 nm, Rezultati su izraženi kao µmol Fe<sup>2+</sup> ekvivalenta (FE)/mL uzorka (Benzie i Strain, 1996).

Princip određivanja:

U staklene epruvete redom se otpipetira 240 µL destilirane vode, 80 µL uzorka (prethodno adekvatno razrijeđenog) i 2080 L FRAP reagensa, dobro se promiješa te 5 min termostatira na temperaturi 37 °C. Zatim se mjeri apsorbanija pri 595 nm. Slijepa proba sadržava sve osim



uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0 ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti na način da se izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose 0,1-0,9.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 500 mL 1mM otopine željezo (II)-sulfata heptahidrata od koje se pripreme razrjeđenja u koncentracijama: 0, 25, 100, 250, 500 i 750  $\mu\text{M}$  na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetira, 0; 0,25; 1; 2,5 i 7,5 mL alikvot otopine željezo (II)-sulfata heptahidrata te do oznake nadopuni destiliranom vodom.

U odmjerne tikvice od 10 mL redom se otpipetira 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  otopine standarda i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa, kratko pomiješa te 5 min termostatira. Zatim se mjeri apsorbancija pri 595 nm. Slijepa proba sadržava se osim uzorka umjesto kojeg se dodaje destilirana voda. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarni pravac pomoću računala s vrijednostima koncentracije  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  na apcisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijska aktivnost uzorka određena FRAP metodom.

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0007x - 0,0007 \quad /3/$$

$$R^2 = 0,9932$$

gdje je:

y = apsorbancija pri 595 nm,

x = ekvivalent  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

### 3.2.9. Određivanje pH vrijednosti i električne vodljivosti

Mjerenje pH-vrijednosti i provodnosti provodi se na digitalnom pH-metru (Hanna instruments, HI2550 pH/ORP & EC/TDS/NaCl Meter, Woonsocket, RI, SA) u netretiranim i tretiranim uzorcima.

### 3.2.10. Određivanje oksidacijsko-redukcijskog potencijala

Mjerenje oksidacijsko-redukcijskog potencijala (ORP) se provodilo elektrodom EXTECH instruments (ExStik Model RE300, waterproof ORP meter, Townsend West, Nashua, SAD).

### 3.2.11. Određivanje boje

Određivanje boje uzoraka provodilo se kolorimetrom CM-3500d (Konica Minolta, Japan) pri čemu su se mjerile  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti. Kontrola mjerenja se obavljala softverom SpectraMagic NX.  $L^*$  označava svjetlinu (0-100) gdje se s 0 označava crno, a sa 100 bijelo. Koordinata  $a^*$  je za crveno (+) i zeleno (-), a koordinata  $b^*$  za žuto (+) i plavo (-). Za analizu je uzeto 10 mL uzorka, koje je stavljeno u plastične kivete dimenzija (v/š/d 5/3,5/1 cm). Sva mjerenja bila su u SCI (Specular Component Included) modu. Ukupna promjena boje ( $\Delta E$ ) izračuna se na temelju izmjerenih vrijednost boje uzorka ( $L^*a^*b$ ) prema formuli :

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \sqrt{a^2 + b^2}} \quad /4/$$

### 3.2.12. Reološka analiza uzoraka

Reološka svojstva otapala određivana su na rotacijskom reometru Rheometric Viscometer (Model RM 180, Rheometric Scientific, Inc. Piscataway, USA), gdje su primijenjenom smičnom brzinom ( $D$ ), smičnim naprezanjem ( $\tau$ ) i prividnom viskoznošću ( $\eta$ ), određivani reološki parametri koeficijent konzistencije ( $k$ ) i indeks tečenja ( $n$ ).



**Slika 4.** Reometar (RM 180, Rheometric Scientific, Inc., Piscataway, USA)

Nakon što je mjerni sustav pravilno sastavljen i pričvršćen na reometar, potrebno je mjernu posudu s otapalom učvrstiti i uroniti vreteno u otopinu do oznake na posudi, u našem slučaju

32 mL te vreteno spojiti preko produžne spojke i matice te učvrstiti na reometar. Početna kutna brzina vrtnje vretena bila je  $150 \text{ s}^{-1}$ , te se postepeno povećavala do maksimalne brzine od  $1290 \text{ s}^{-1}$ , a potom smanjivala do  $150 \text{ s}^{-1}$ . Vrijednosti smičnog naprezanja i prividne viskoznosti očitani su na ekranu instrumenta.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Cilj eksperimentalnog dijela ovog rada bio je odrediti pomoću softvera COSMO-RS i Hansen topljivost bioaktivnih komponenti mediteranskog bilja te provedbom ekstrakcije ultrazvukom visoke snage, utvrditi da li je predviđenu procjenu topljivosti moguće potvrditi nakon tretiranja ultrazvukom. Uz navedeno određivali su se fizikalno-kemijski parametri: pH, električna provodnost, oksidacijsko-redukcijski potencijal, boja i viskoznost, te analitički parametri: ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost. Varijable koje su se mijenjale su amplituda ultrazvuka i vrijeme tretmana. Uzorci su tretirani i klasičnom ekstrakcijom da se usporede s ultrazvučnim tretmanom.

Analiza varijance (ANOVA) korištena je za statističku obradu eksperimentalno dobivenih podataka kako bi se ustanovilo koji od rezultata su bili značajni.

#### 4.1. REZULTATI COSMO-RS IZRAČUNA

**Tablica 2.** Vjerojatnost topljivosti bioaktivnih komponenata biljke origano u odabranim otapalima\*

Otapala	<i>Etil-acetat</i>	<i>Etanol</i>	<i>Limonen</i>	<i>alfa-pinen</i>	<i>Dimetil karbonat</i>	<i>Voda</i>
<b><i>Spojevi</i></b>						
<b>Monoterpeni</b>						
Karvakrol	100	100	30,9	16,98	100	0,02
Timol	100	100	38,9	24,54	100	0,007
$\beta$ -mircen	81,28	11,22	95,49	81,28	39,81	$9,55 \cdot 10^{-5}$
Cimen	85,11	13,8	95,49	81,28	45,7	0,0003
$\alpha$ -pinen	42,65	10,47	95,49	100	16,59	0,0002
$\beta$ -pinen	57,54	12,58	97,94	99,08	22,38	0,0004
Kamfan	51,28	12,58	97,94	99,31	22,38	0,0005
Sabinen	66,06	13,48	99,98	93,97	30,9	0,0004
$\alpha$ -felandren	63,09	12,3	100	95,49	28,84	0,0002
$\alpha$ -terpinen	60,25	12,02	100	95,49	27,54	0,0002
$\delta$ -terpinen	58,88	11,48	99,9	95,49	26,91	0,0002
$\alpha$ -terpinolen	61,65	12,02	99,77	93,32	28,18	0,0002
$\beta$ -felandren	69,18	12,88	100	93,32	32,35	0,0003
cis- $\beta$ -ocimen	83,17	11,48	95,49	79,43	42,65	0,0001
trans- $\beta$ -ocimen	83,17	11,48	95,49	79,43	42,65	0,0001
Menton	79,43	36,3	89,12	69,18	42,65	0,02
Pulegon	91,2	53,7	89,12	63,09	56,23	0,06
<b><i>Oksigenirani monoterpeni</i></b>						
Eukaliptol	58,88	44,66	97,72	89,12	27,54	0,018
Borneol	100	85,11	17,78	13,48	38,01	0,01
$\alpha$ -terpineol	75,85	60,25	20,41	14,45	31,62	0,02
$\alpha$ -Kadinol	100	41,68	42,65	35,48	30,9	0,0001
Linalol	100	52,48	25,7	17,37	48,97	0,005
Piperiton	100	91,2	72,44	46,77	70,79	0,06
<b><i>Seskviterpeni</i></b>						
$\beta$ -kariofilen	53,7	794	100	100	18,19	$1,12 \cdot 10^{-5}$
Kopean	31,62	6,02	93,32	100	8,91	$5,62 \cdot 10^{-6}$
$\alpha$ -kubeben	37,15	6,3	97,72	100	10,96	$4,90 \cdot 10^{-6}$
$\beta$ -elemen	79,43	10	100	91,2	32,35	$1,62 \cdot 10^{-5}$
$\beta$ -kadinen	45,7	7,07	99,83	100	14,45	$6,03 \cdot 10^{-6}$
$\delta$ -kadinen	47,86	7,76	99,54	100	15,13	$1,17 \cdot 10^{-5}$
<b><i>Oksigenirani Seskviterpeni</i></b>						
Kariofilen oksid	64,86	13,59	100	89,49	24,21	$7,46 \cdot 10^{-5}$
Isospathulenol	99,9	47,86	21,87	16,21	28,84	0,0007
<b><i>Ostali oksigenati</i></b>						
Palmitinska kiselina	100	87,09	5,49	2,69	28,84	$4,68 \cdot 10^{-5}$

\*Niska vjerojatnost topljivosti (0-20 %)

Srednja vjerojatnost topljivosti (20-60 %)

Visoka vjerojatnost topljivosti (60-100 %)

**Tablica 3.** Vjerojatnost topljivosti bioaktivnih komponenata biljke kadulja u odabranim otapalima\*

Otapala	<i>Etil-acetat</i>	<i>Etanol</i>	<i>Limonen</i>	<i>alfa-pinen</i>	<i>Dimetil-karbonat</i>	<i>Voda</i>
<b><i>Spojevi</i></b>						
<b>Monoterpeni</b>						
$\alpha$ -tujen	51,28	10,47	98,4	98,85	21,37	0,0002
$\alpha$ -pinen	42,65	10,47	95,49	100	16,59	0,0002
$\beta$ -pinen	57,54	12,58	97,94	99,08	22,38	0,0004
Kamfan	51,28	12,58	97,94	99,31	22,38	0,0005
$\alpha$ -tujon	92,16	32,21	82,6	59,73	55,85	0,02
<b><i>Oksigenirani monoterpeni</i></b>						
Eukaliptol	58,26	44,03	96,18	87,69	27,19	0,01
Kamfor	86,97	44,05	85,15	63,08	53,75	0,09
Borneol	100	85,11	17,78	13,48	38,01	0,01
Bornil acetat	80,08	27,74	94,86	72,04	38,56	0,003
<b><i>Seskviterpeni</i></b>						
$\beta$ -kariofilen	53,7	7,94	100	100	18,19	$1,12 \cdot 10^{-5}$
$\gamma$ -elemen	62,95	8,04	100	96,22	22,75	$6,40 \cdot 10^{-6}$
$\alpha$ -murolen	41,44	7,21	98,08	100	12,96	$9,90 \cdot 10^{-6}$
<b><i>Oksigenirani Seskviterpeni</i></b>						
Kariofilen oksid	64,86	13,59	100	89,49	24,21	$7,46 \cdot 10^{-5}$
<b>Diterpeni</b>						
Sklareol	100	100	1,96	1,01	19,7	0,001
<b>Fenolne kiseline</b>						
Kumarin	100	100	0,0001	$3,50 \cdot 10^{-6}$	100	0,03
Salvianolna kiselina	100	100	0,0005	$2,70 \cdot 10^{-5}$	100	0,2
Sagerinska kiselina	100	100	$1,90 \cdot 10^{-6}$	$1,80 \cdot 10^{-6}$	100	3,43
Kafeinska kiselina	100	100	$5,60 \cdot 10^{-6}$	$5,00 \cdot 10^{-7}$	20,89	85,11
<b>Flavonoidi</b>						
Hispidulin	100	100	0,25	0,05	100	0,004

\*Niska vjerojatnost topljivosti (0-20 %)

Srednja vjerojatnost topljivosti (20-60 %)

Visoka vjerojatnost topljivosti (60-100 %)

Simulacija COSMO-RS je provedena kako bi se odredila relativna topljivost  $\log(x\text{-solub})$  flavonoida, monoterpena i monoterpenoida, diterpena, triterpenoida, fenilpropanoida i ostalih sekundarnih metabolita u različitim ispitivanim otapalima. Kako je logaritam najbolje topljivosti postavljen na 0, a učinkovitost svih drugih otapala dana je relativno prema najboljem otapalu, može se primijetiti iz vjerojatnosti računatih iz  $\log(x\text{-solub})$  da etil-acetat, pinen i limonen smatraju kao otapala izbora s dobrim pretpostavkama topljivosti za većinu spojeva, osim za diterpene, fenolne kiseline i flavonoide kod kadulje. S obzirom na njihovu relativnu topljivost, otapala se mogu klasificirati na: etil-acetat>etanol>limonen>alfa-pinen>dimetil karbonat>voda (Tablice 2. i 3.). U radu Chaabani i sur. (2019) simulacijom COSMO-RS ekstrakcije arome lišća *Pistacia lentiscus*, otapala DMC, EtOH su teoretski dobra otapala samo za ekstrakciju oksidacijskih monoterpena. Prema istraživanju koje su proveli Aissou i sur. (2017) upotrebom COSMO-RS za predviđenje topljivosti limonena, dobili su rezultate da je limonen dobro otapalo za monoterpene, seskviterpene i ostale oksigenate kima (Aissou i sur., 2017). S obzirom na relativnu topljivost sterola uljane repice, korištena otapala mogu se klasificirati na sljedeći način: etilacetat>etanol>limonen (Sicaire i sur., 2015).

## 4.2. REZULTATI HANSEN PRORAČUNA

Tablica 4. Relativne razlike energija (RED) za biljku origano\*

Otapala	Etil-acetat	Etanol	Limonen	Alfa-pinen	Dimetil-karbonat	Voda
<i><b>Spojevi</b></i>						
<i><b>Monoterpeni</b></i>						
Karvakrol	1,21	3,43	0,96	1,64	1,76	9,34
Timol	1,21	3,43	0,96	1,64	1,76	9,34
β-mircen	1,45	4,5	0,67	0,32	2,36	10,49
p-Cimen-7-ol	1,37	2,97	1,48	2,17	1,66	8,84
α-pinen	1,75	4,77	0,72	0	2,65	10,75
β-pinen	1,79	4,82	0,83	0,11	2,69	10,8
Kamfen	1,79	4,82	0,83	0,11	2,69	10,8
Sabinen	1,74	4,78	0,7	0,15	2,6	10,77
α-felandren	1,48	4,46	0,46	0,32	2,38	10,44
α-terpinen	1,46	4,34	0,3	0,47	2,35	10,32
δ-terpinen	1,42	4,33	0,34	0,46	2,32	15,5
α-terpinolen	1,46	4,25	0,06	0,69	2,3	10,22
β-felandren	1,52	4,53	0,63	0,26	2,43	10,52
cis-β-ocimen	1,44	4,41	0,47	0,36	2,35	10,39
trans-β-ocimen	1,52	4,45	0,49	0,33	2,44	10,43
Menton	1,23	4,39	0,94	1,01	1,89	10,37
Pulegon	1,15	4,08	0,92	1,29	1,7	10,03
<i><b>Oksigenirani monoterpeni</b></i>						
Eukaliptol	1,42	4,51	0,57	0,47	2,25	10,5
Borneol	0,91	3,33	0,9	1,5	1,63	9,3
α-terpineol	0,98	3,26	0,97	1,58	1,67	9,22
α-Kadinol	1,24	3,95	0,32	0,99	2,02	9,91
Linalol	1,02	3,49	0,73	1,32	1,82	9,46
Piperiton	1,18	4,22	0,74	1,02	1,86	10,19
<i><b>Seskviterpeni</b></i>						
β-kariofilen	1,73	4,68	0,61	0,14	2,63	10,65
Kopaen	1,97	4,99	0,83	0,29	2,83	10,97
α-kubeben	1,75	4,67	0,52	0,25	2,64	10,64
β-elemen	1,77	5,92	0,87	0,18	2,65	10,84
β-kadinen	1,69	4,64	0,55	0,18	2,58	10,62
δ-kadinen	1,85	4,86	0,77	0,1	2,73	10,84
<i><b>Oksigenirani seskviterpeni</b></i>						
Isospathulenol	1,26	3,84	0,39	1,09	2,05	9,79
<i><b>Ostali oksigenati</b></i>						
Palmitinska kiselina	0,81	3,67	0,73	1,1	1,73	9,67

\*RED (0-1) – savršena topljivost

RED (1-3) – srednja topljivost

RED (> 3) – niska topljivost



**Tablica 5.** Relativne razlike energija (RED) za biljku kadulja\*

Otapala	<i>Etil-acetat</i>	<i>Etanol</i>	<i>Limonen</i>	<i>Alfa-pinen</i>	<i>Dimetil-karbonat</i>	<i>Voda</i>
<b><i>Spojevi</i></b>						
<b>Monoterpeni</b>						
$\alpha$ -tujen	1,7	4,73	0,63	0,2	256	10,72
$\alpha$ -pinen	1,75	4,77	0,72	0	2,65	10,75
$\beta$ -pinen	1,79	4,82	0,83	0,11	2,69	10,8
Kamfen	1,79	4,82	0,83	0,11	2,69	10,8
$\alpha$ -tujon	1,4	4,52	1,16	1,22	1,94	10,48
<b>Oksigenirani monoterpeni</b>						
Eukaliptol	1,42	4,51	0,57	0,47	2,25	10,5
Kamfor	1,42	4,49	1,02	1,14	1,99	10,45
Borneol	0,91	3,33	0,9	1,5	1,63	9,3
Bornil acetat	1,33	4,39	0,48	0,52	2,18	10,38
<b>Seskviterpeni</b>						
$\beta$ -kariofilen	1,73	4,68	0,61	0,14	2,63	10,65
$\gamma$ -elemen	1,71	4,73	0,66	0,08	2,6	10,71
$\alpha$ -murolen	1,75	4,57	0,52	0,25	2,64	10,64
<b>Diterpeni</b>						
Sklareol	1,22	4,06	0,3	0,88	2,02	10,03
<b>Fenolne kiseline</b>						
Kumarin	3,11	4,56	2,42	3,01	3,33	9,94
Salvianolna kiselina	3,37	5,65	2,52	2,80	3,67	11,25
Sagerinska kiselina	3,95	6,16	2,85	3,09	4,37	11,7
Kafeinska kiselina	4,03	2,46	4,38	5,09	3,71	6,66
<b>Flavonoidi</b>						
Hispidulin	2,88	3,14	2,8	3,52	2,85	8,38

\*RED (0-1) – savršena topljivost

RED (1-3) – srednja topljivost

RED (> 3) – niska topljivost

Tablice 4. i 5. prikazuju izračunate relativne razlike energija *RED* za odabrana otapala s monoterpenima i monoterpenoidima, diterpenima, triterpenoidima, fenilpropanoidima i ostalim sekundarnim metabolitima. Sva otapala ( $0 < RED < 1$ ) koja su bila blizu ishodišta ( $RED=0$ ) mogu se smatrati dobrim otapalima za svaku otopljenu tvar. Prema rezultatima, čini se da su alfa-pinen i limonen najprikladnija otapala za monoterpene i seskviterpene dok na ostale spojeve slabije djeluju. Ostala otapala, voda, etil-acetat, dimetil karbonat i etanol imaju lošiji učinak. Etil-acetat i dimetil karbonat pokazuju srednju topljivost spojeva dok kod kadulje ima lošiji učinak topljivosti fenolnih kiselina. Voda i etanol su se pokazali kao najlošija otapala i imaju nisku topljivost navedenih spojeva. S obzirom na rezultate izračuna ekstrakcije alfa mangostana

iz mangostina redosljed otapala je idući: etanol>DMC>etilacetat (Bundeedomchok i sur., 2016).

#### 4.3. UTJECAJ ULTRAZVUKA NA pH, PROVODNOST I OKSIDACIJSKO-REDUKCIJSKI POTENCIJAL

**Tablica 6.** Rezultati mjerenja pH, električne provodnosti i oksido-redukcijskog potencijala netretiranih uzoraka kadulje i origana\*

Uzorak	pH(poč)	pH(kon)	Električna provodnost ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	ORP (poč) (mV)	ORP(kon) (mV)
3NK0%	6,78	6,05	482	145	128,5
9NK0%	7,03	6,03	750	116	127,5
3NK25%	7,21	5,90	195,5	112,5	106
9NK25%	6,64	5,78	324,5	100,5	108
3NK50%	6,63	5,84	70,95	95,5	134,5
9NK50%	6,97	5,9	143,1	96,5	119,5
3NK-EA	4,47	5,13	n.d.	n.d.	n.d.
9NK-EA	4,05	3,56	n.d.	n.d.	n.d.
3NOR-0%	6,33	5,92	672,5	n.d.	n.d.
9NOR-0%	5,69	5,75	894	n.d.	n.d.
3NOR-25%	5,77	5,82	208,4	n.d.	n.d.
9NOR-25%	5,79	5,86	320	n.d.	n.d.
3NOR-50%	6,03	5,78	128,3	n.d.	n.d.
9NOR-50%	6,22	5,92	181,55	n.d.	n.d.

\*n.d.- nije detektirano

Prema rezultatima iz Tablice 6. vidi se da je pH početni viši od pH konačnog kod vodenih i etanolnih uzoraka kadulje, a kod origana je obrnuto. Električna provodnost uzoraka nakon 3 minute manja je od onih nakon 9 minuta, ORP početni je manji od konačnog, dok je kod uzoraka 3NK0% i 3NK25% veći od konačnog. Zbog puknuća elektroda za pH, provodnost i ORP nema rezultata za određene uzorke pa je zato oznaka n.d.

Električna provodnost uzoraka ovisi o udjelu etanola u vodenoj otopini. Voda je poznata kao dobar vodič električne struje, stoga je bilo i očekivano da će uzorci kod kojih je korišteno

otapalo sa nižim udjelom etanola pokazivati veću električnu provodnost od onih uzoraka za čiju je ekstrakciju korišteno otapalo s većim udjelom etanola. Tretirani uzorci pokazuju manju provodnost električne struje od netretiranih uzoraka.

**Tablica 7.** Rezultati mjerenja pH, električne provodnosti, ORP-a, temperature, snage i energije tretiranih uzoraka kadulje i origana ultrazvukom

<b>Uzorak</b>	<b>pH</b>	<b>Električna provodnost (<math>\mu\text{S cm}^{-1}</math>)</b>	<b>ORP (kon) (mV)</b>	<b>Temp (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>Snaga (W)</b>	<b>Energija (J)</b>
<b>US3K-0 % (75)</b>	6,21	736	108	19,3	61	10,083
<b>US9K-0 % (75)</b>	6,11	936	110	24,3	65	30,346
<b>US3K-0 % (100)</b>	6,14	875	106,5	25,4	58	12,0475
<b>US9K-0 % (100)</b>	6,11	920	109,5	21,5	48	28,745
<b>US3K-25 % (75)</b>	5,86	383,5	103,5	29,0	67	12,557
<b>US9K-25 % (75)</b>	5,93	425	99	27,4	76	32,9215
<b>US3K-25 % (100)</b>	5,94	269,15	110	20,1	45	9,3905
<b>US9K-25 % (100)</b>	5,93	331,55	94,5	26,8	52,5	28,767
<b>US3K-50 % (75)</b>	5,87	134,95	124	24,7	46,5	10,367
<b>US9K-50 % (75)</b>	5,9	213,95	106	27,7	49,5	29,045
<b>US3K-50 % (100)</b>	5,73	134,2	96	24,0	48,5	10,9055
<b>US9K-50 % (100)</b>	5,94	206,95	105	25,7	45	26,6965
<b>US3K-EA</b>	4,61	n.d.	238,5	18,7	55	10,376
<b>US9K-EA</b>	4,58	n.d.	258	23,5	43,5	26,9715
<b>US3K-DMC</b>	n.d.	n.d.	n.d.	20,6	54	13,390
<b>US9K-DMC</b>	n.d.	n.d.	n.d.	26,5	66	27,253
<b>US3OR-0 %</b>	5,93	937	n.d.	29,1	97,5	16,912
<b>US9OR-0 %</b>	5,88	1060	n.d.	33,0	84	51,0015
<b>US3OR-25 %</b>	5,69	486	n.d.	32,5	114	21,5245
<b>US9OR-25 %</b>	5,82	425,5	n.d.	32,4	98	52,558

<b>US3OR-50 %</b>	5,65	245,65	n.d.	27,3	94	17,4485
<b>US9OR-50 %</b>	5,89	250,45	n.d.	29,2	78	45,262
<b>US3OR-DMC</b>	n.d.	n.d.	n.d.	22,0	63	11,352
<b>US9OR-DMC</b>	n.d.	n.d.	n.d.	23,3	68	33,82
<b>US3OR-EA</b>	n.d.	n.d.	n.d.	22,5	47	9,702
<b>US9OR-EA</b>	n.d.	n.d.	n.d.	27,6	60	31,059

pH tretiranih uzoraka veća je od netretiranih. Fenoli su spojevi s hidroksilnom skupinom koja je bazičnog karaktera pa povisuje pH vrijednost otopine. Kako se u tretiranim uzorcima nalazi više fenola samim time i pH vrijednost je viša. Provodnost vodenih uzoraka veća je od etanolnih, provodila se pri amplitudama 100 i 75 %. ORP se kretao između 96 i 110 mV kod uzoraka s vodom i etanolom dok su uzorci s etil acetatom prelazili 200 mV. Srednja temperatura se kretala između 18,7 i 33 °C što je <35 °C te provedenu ekstrakciju možemo smatrati netermalnom tehnikom. Snaga je bila između 40 i 114 W. Uzorci kadulje su tretirani s amplitudom od 75 i 100 %. U početku se uzorak lijepio za sondu pri amplitudi 100 %, pa je amplituda smanjena na 75 %. S obje amplitude, tretmani su bili uspješni. Najmanja energija bila je 9,3905 J kod US3K-25 %, a najveća 52,558 J US9OR-25 %. Oznaka n.d. znači da rezultati nisu detektirani. Navedeni rezultati vidljivi su u Tablici 7.

#### 4.4. UTJECAJ ULTRAZVUKA NA UKUPNE FENOLE I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

**Tablica 8.** Prikaz koncentracije ukupnih fenola (TPC) i antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP)

Uzorak	TPC	DPPH	FRAP
	mg GAE g <sup>-1</sup> uzorka	μmol TAE g <sup>-1</sup> uzorka	μmol FE g <sup>-1</sup> uzorka
<b>3NK-0 %</b>	18,47	17,51	153,27
<b>9NK-0 %</b>	41,12	17,95	142,41
<b>3NK-25 %</b>	18,67	20,79	130,56
<b>9NK-25 %</b>	39,34	20,59	279,63
<b>3NK-50 %</b>	16,27	21,19	305,70
<b>9NK-50 %</b>	38,82	20,92	348,91
<b>US3K-0 % (75)</b>	37,43	91,76	405,83
<b>US9K-0 % (75)</b>	51,08	89,31	459,69
<b>US3K-0 % (100)</b>	45,32	92,09	454,40
<b>US9K-0 % (100)</b>	52,58	91,13	465,83
<b>US3K-25 % (75)</b>	49,23	97,18	462,54
<b>US9K-25 % (75)</b>	57,40	95,06	554,11
<b>US3K-25 % (100)</b>	29,71	96,30	318,26
<b>US9K-25 % (100)</b>	50,49	95,99	534,83
<b>US3K-50 % (75)</b>	38,12	99,26	371,97
<b>US9K-50 % (75)</b>	65,56	97,88	670,26
<b>US3K-50 % (100)</b>	36,80	98,56	442,97
<b>US9K-50 % (100)</b>	65,25	99,62	595,11
<b>3NK-DMC</b>	3,01	17,84	56,20
<b>9NK-DMC</b>	4,43	17,94	59,63
<b>US3K-DMC</b>	3,90	17,75	56,49
<b>US9K-DMC</b>	5,52	17,64	57,49
<b>3NK-EA</b>	0,93	17,54	64,49
<b>9NK-EA</b>	1,39	17,36	89,41
<b>US3K-EA</b>	1,56	16,45	123,91
<b>US9K-EA</b>	3,66	16,33	166,06

**Tablica 9.** Prikaz koncentracije ukupnih fenola (TPC) i antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP)

Uzorak	TPC	DPPH	FRAP
	mg GAE g <sup>-1</sup> uzorka	μmol TAE g <sup>-1</sup> <sup>1</sup> uzorka	μmol FE g <sup>-1</sup> uzorka
<b>3NOR-0 %</b>	56,51	89,88	532,51
<b>9NOR-0 %</b>	72,64	88,58	776,80
<b>US3OR-0 %</b>	69,52	87,43	1039,37
<b>US9OR-0 %</b>	77,13	85,21	993,37
<b>3NOR-25 %</b>	41,24	88,41	355,66
<b>9NOR-25 %</b>	69,34	87,77	584,51
<b>US3OR-25 %</b>	114,71	83,10	928,80
<b>US9OR-25 %</b>	83,71	110,67	653,94
<b>3NOR-50 %</b>	53,82	112,92	510,23
<b>9NOR-50 %</b>	79,09	113,30	733,09
<b>US3OR-50 %</b>	105,79	112,09	1032,80
<b>US9OR-50 %</b>	98,46	111,81	1130,80
<b>3NOR-DMC</b>	0	0,85	2,69
<b>9NOR-DMC</b>	0	1,54	3,30
<b>US3OR-DMC</b>	0	2,24	5,87
<b>US9OR-DMC</b>	3,25	16,02	38,51
<b>3NOR-EA</b>	0	0,44	3,48
<b>9NOR-EA</b>	0	0,75	4,19
<b>US3OR-EA</b>	2,13	7,05	18,55
<b>US9OR-EA</b>	4,52	16,66	48,19

Ukupni fenoli su se određivali s Folin-Ciocalteu reagensom koji je smjesa fosforvolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni.

Prema Tablicama 8. i 9. vidi se da koncentracija ukupnih fenola kod kadulje se kreće između 18,5 i 115 mg GAE g<sup>-1</sup> uzorka gdje su korišteni voda, i etanol, a kod zelenih otapala konc. je znatno niža, te nije prelazila 6 mg GAE g<sup>-1</sup> uzorka. Kod origana raspon je veći, 41-115 mg GAE g<sup>-1</sup> uzorka (voda i etanol), a zelena otapala imala su loše rezultate, najviše 4,52 mg GAE g<sup>-1</sup>

uzorka. Najveći udio ukupnih fenola dobiven je u uzorku US3OR-25 %, i iznosi 114,71 mg GAE g<sup>-1</sup> uzorka, a najmanji udio je kod 3NK-EA, 0,93 mg GAE g<sup>-1</sup> uzorka. Rezultati su pokazali da ultrazvuk daje veću učinkovitost ekstrakcije korištenjem zelenih otapala u usporedbi s konvencionalnom metodom. Prinos fenola veći je kod ultrazvuka kao netoplinske tehnike ekstrakcije u odnosu na netretirane uzorke što smo i dokazali. Temperatura i vrijeme ultrazvučnih tretmana su bili statistički značajni parametri za ekstrakciju fenola, što se vidi i na rezultatima. Duže vrijeme tretmana daje veći prinos, a temperatura utječe na topljivost i brzinu prijenosa ciljanih spojeva u otapalu (Sun i sur., 2011). Shahid i sur. (2016) ekstrahirali su fenole iz komine jabuke. Oni su pokazali da je TPC dobiven ultrazvukom bio 30 % veći od sadržaja dobivenog konvencionalnom ekstrakcijom (Shahid i sur., 2016). Najveći ukupni fenolni sadržaj proveden na majoranu (9,62 g GAE / 100 g uzorka) zabilježen je u ekstraktima dobivenim ultrazvukom pri 35 °C i vremenu od 10 min tretmana. Među čimbenicima, amplituda je pokazala najveći učinak praćen temperaturom, snagom i vremenom. Veća amplituda ultrazvuka mogla je oštetiti više staničnih zidova, pri čemu je dostupno više otapala, uključujući bolji prijelaz fenolnih spojeva u otapala. Produljeno vrijeme ekstrakcije omogućilo je da otapala dulje budu u kontaktu s otapalom, kako bi se olakšala veća difuzija ciljnih spojeva (Hossain i sur., 2012).

Antioksidacijska aktivnost dobivena DPPH rezultat je detektiranja antioksidanasa koji reduciraju ion željeza doniranjem svog elektrona. Uzorku se dodaje žuto obojeni kompleks Fe<sup>3+</sup>-TPTZ koji redukcijom prelazi u plavo obojeni oblik Fe<sup>2+</sup>-TPTZ čija koncentracija se mjeri na spektrofotometru i taj ekvivalent željeza predstavlja antioksidacijsku aktivnost određenih vrsta fenolnih spojeva. Rezultati pokazuju da je etanol učinkovitiji od vode i ostalih zelenih otapala. Pogledom na tablicu 8. uočljivo je da su više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene kod uzoraka koji su bili tretirani ultrazvukom za razliku od onih koji su dobiveni klasičnom ekstrakcijom bez tretmana. Najviše vrijednosti dobivene su kod uzorka 9NOR-50 % - 113,30 μmol TAE g<sup>-1</sup> uzorka, a najmanje kod 3NOR-EA i iznosi 0,44 μmol TAE g<sup>-1</sup> uzorka. Ispitivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti ekstrakata primjenom DPPH testa koje je provedeno na ružmarinu pokazalo je da pod ultrazvučnom ekstrakcijom etanol daje veće povećanje ukupnih prinosa antioksidanata u usporedbi s metanolom (Paniwnyk i sur., 2009).

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom se kretala između 2,69 i 1130,80 μmol FE g<sup>-1</sup> uzorka. Najveći prinos pokazuje uzorak (US9OR-50 %) tretiran ultrazvukom u trajanju od 9 min s 50 %-tnim etanolom, a najmanji netretirani uzorak s DMC-om (3NOR-DMC) u

trajanju od 3 min. Sva tri faktora (amplituda, vrijeme, temperatura) imala su značajan utjecaj na povećanje FRAP vrijednosti ekstrakta kadulje i origana. Učinak temperature i vremena bio je u skladu s nalazom Hossain i sur. (2012) koji su istraživali antioksidacijsku aktivnost. Možemo zaključiti da tretman od 9 min daje veći prinos fenola, antioksidacijske aktivnosti od tretmana od 3 min. Prinos se povećava povećanjem snage ultrazvuka, ovisno o kojem otapalu se radi, a s 50 %-tnim etanolom su najveći rezultati. Što znači da je etanol prodro do stanica pa je ekstrakcijski prinos s njim bio najveći.

Možemo zaključiti da je prinos svih navedenih vrijednosti veći s vodom i etanolom od DMC-a i etil-acetata. I što je veća snaga, veća je i koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet. Rezultati antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom veći su od rezultata DPPH metode.

#### 4.4.1. Rezultati statističke obrade za prinos fenola i antioksidacijske aktivnosti

**Tablica 10.** Statistička značajnost varijabli za prinos fenola i antioksidacijske aktivnosti- kadulja

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F - omjer	p-vrijednost
Između grupa	2311724	2	1155862	18,7138	0,000000565
Unutar grupa	3520617	57	61765,21		
<b>Ukupno</b>	<b>5832341</b>	<b>59</b>			

**Tablica 11.** Statistička značajnost varijabli za prinos fenola i antioksidacijske aktivnosti- origano

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F - omjer	p-vrijednost
Između grupa	1152029	2	576014,7	43.3457 3	0,000000000000308
Unutar grupa	996663,4	75	13288,85		
<b>Ukupno</b>	<b>2148693</b>	<b>77</b>			



Statistička obrada eksperimentalno dobivenih podataka (Tablice 10. i 11.) pokazuje kako ima statistički značajnog utjecaja odabranih ulaznih varijabli (vrijednosti rezultata TPC-ukupni fenoli, te DPPH i FRAP-antioksidacijska aktivnost)  $p < 0,05$ . Kod kadulje  $p$  iznosi  $0,000000565$ , ovaj statistički značajan rezultat može se pripisati etanolu, jer je zahvaljujući njemu prinos etanolnih uzoraka bio veći od ostalih otapala, vode, dimetil karbonata i etil-acetata, a kod origana je isti slučaj,  $p$  je također  $< 0,05$  i iznosi  $3,08^{-13}$ .

Odgovarajuće otapalo je od velike važnosti za ekstrakciju bioaktivnih komponenti. Ovo je povezano s činjenicom da će polarna otapala izdvojiti polarne aktivne spojeve, a nepolarni će se izdvojiti nepolarnim otapalima. Za postupke ekstrakcije obično se koriste otapala poput vode, etanola, kloroforma, etil-acetata, metanola itd. Za ekstrakciju polifenola koristi se kombinacija vode i etanola što rezultira stvaranjem umjerene polarnosti otapala koji uzrokuje bubrenje biljnog materijala, otapalo prodire dublje pa je učinak ekstrakcije veći (Ngaha Njila i sur., 2017). Što potvrđuju i naši rezultati da je ekstrakcija najučinkovitija s 25 i 50 %-tnim etanolom.

#### 4.5. UTJECAJ ULTRAZVUKA NA BOJU UZORAKA

**Tablica 12.** Prikaz podataka za boju ekstrakta kadulje

<b>Uzorak</b>	<b>L</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b><math>\Delta E</math></b>	<b><math>\Delta E^2</math></b>	<b><math>\Delta H</math></b>
<b>US3K-0 % (75)</b>	77,17	2,60	41,55	26,20	694,72	4,31
<b>US9K-0 % (75)</b>	60,50	9,60	53,31	29,50	870,01	6,79
<b>US3K-0 % (100)</b>	67,23	6,97	50,13	39,78	1584,19	7,24
<b>US9K-0 % (100)</b>	61,69	8,91	52,37	27,88	777,26	6,29
<b>US3K-25 % (75)</b>	74,50	4,72	46,49	35,52	1263,06	4,85
<b>US9K-25 % (75)</b>	60,88	8,18	50,19	34,22	1187,86	6,74
<b>US3K-25 % (100)</b>	84,04	0,50	31,06	17,06	291,55	1,94
<b>US9K-25 % (100)</b>	69,32	5,34	46,62	24,73	616,54	4,58
<b>US3K-50 % (75)</b>	87,20	0,00	31,11	18,98	366,64	0,42
<b>US9K-50 % (75)</b>	82,93	1,31	44,79	17,51	307,56	1,56
<b>US3K-50 % (100)</b>	86,62	-0,45	31,54	19,59	389,16	0,54
<b>US9K-50 % (100)</b>	72,34	3,57	44,51	24,27	600,84	3,37
<b>3NK0 %</b>	93,22	-1,76	21,33			
<b>9NK0 %</b>	85,59	1,31	40,20			
<b>3NK25 %</b>	95,00	-1,19	18,09			
<b>9NK25 %</b>	89,65	-0,06	33,64			
<b>3NK50 %</b>	95,25	-0,55	13,96			
<b>9NK50 %</b>	90,75	-0,41	29,22			
<b>3NKDMC</b>	94,16	-8,35	34,50			
<b>9NKDMC</b>	91,15	-9,49	47,80			
<b>US3K-DMC</b>	90,03	-9,08	46,76	12,96	168,06	1,88
<b>US9K-DMC</b>	86,71	-8,87	57,49	10,68	114,04	2,28
<b>3NK-EA</b>	89,86	-9,56	50,95			
<b>9NK-EA</b>	87,18	-9,18	59,93			
<b>US3K-EA</b>	86,32	-8,34	53,40	4,50	22,34	1,61
<b>US9K-EA</b>	81,56	-7,19	64,56	7,63	60,33	2,57
<b>3NK-PIN</b>	96,58	-7,40	26,78			
<b>9NK-PIN</b>	96,58	-7,41	26,86			

<b>US3K-PIN</b>	92,82	-7,02	35,44	13,29	190,13	2,86
<b>US9K-PIN</b>	87,46	-6,14	47,21	18,69	351,17	4,75
<b>3NK-LIM</b>	94,63	-6,59	31,47			
<b>9NK-LIM</b>	92,22	-7,25	42,32			
<b>US3K-LIM</b>	91,69	-6,62	40,20	9,21	84,86	1,56
<b>US9K-LIM</b>	87,97	-6,14	51,89	10,54	111,01	2,45

**Tablica 13.** Prikaz podataka za boju ekstrakta origana

<b>Uzorak</b>	<b>L</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b><math>\Delta E</math></b>	<b><math>\Delta E^2</math></b>	<b><math>\Delta H</math></b>
<b>3NOR-0 %</b>	85,58	4,32	33,58			
<b>9NOR-0 %</b>	75,14	10,82	49,17			
<b>US3OR-0 %</b>	54,76	19,49	58,37	42,41	1835,06	8,83
<b>US9OR-0 %</b>	27,73	29,99	46,58	51,26	2632,10	18,70
<b>3NOR-25 %</b>	93,94	-0,08	18,45			
<b>9NOR-25 %</b>	88,31	2,18	32,48			
<b>US3OR-25 %</b>	54,80	19,43	62,37	61,99	3850,22	10,57
<b>US9OR-25 %</b>	70,46	11,76	53,71	29,35	863,90	6,28
<b>3NOR-50 %</b>	95,34	-1,36	16,68			
<b>9NOR-50 %</b>	92,38	-0,99	25,71			
<b>US3OR-50 %</b>	81,34	2,15	45,05	31,83	1016,98	3,54
<b>US9OR-50 %</b>	79,66	2,95	43,61	22,32	529,42	3,51
<b>3NOR-DMC</b>	98,90	-1,37	3,82			
<b>9NOR-DMC</b>	98,46	-2,05	5,95			
<b>US3OR-DMC</b>	97,66	-1,93	6,08	2,64	6,97	0,19
<b>US9OR-DMC</b>	87,03	-3,51	16,62	15,71	246,73	1,28
<b>3NOR-EA</b>	98,79	-1,17	3,58			
<b>9NOR-EA</b>	98,26	-1,71	5,45			
<b>US3OR-EA</b>	93,71	-1,84	8,47	7,08	50,12	0,58
<b>UZV9OR-EA</b>	85,07	-3,42	18,46	18,60	346,03	1,25
<b>3NOR-LIM</b>	99,56	-0,88	2,79			
<b>9NOR-LIM</b>	99,17	-1,12	3,92			
<b>US3OR-LIM</b>	95,17	-1,91	9,43	8,02	64,37	0,56
<b>US9OR-LIM</b>	92,36	-2,24	13,30	11,65	135,69	0,82

Rezultati boje (Tablice 12. i 13.) za netretirane uzroke služe kao standard za usporedbu s tretiranim uzorcima kadulje i origana. Svakom tretiranom uzorku pridružen je standard (netretirani uzorak) koji mu odgovara prema vremenu ekstrakcije i otapalu te se na taj način iz razlike vrijednosti određenih parametara uzorka i standarda nastoji prikazati razlika u jačini obojenja ekstrakta, a time i razlika u uspješnosti provedene ekstrakcije. Ukupna promjena boje ( $\Delta E$ ) najveća je kod vodenih uzoraka i 25 %-etanola, a s ostalim otapalima opada. Uzorak US3OR-25 % ima  $\Delta E=61.99$ , što znači da ima najveću vrijednost, za razliku od uzorka US3OR-DMC koji ima najmanju vrijednost, a iznosi 2,64.

#### 4.5.1. Rezultati statističke obrade za boju

**Tablica 14.** Statistička značajnost varijabli za boju-kadulja

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost
Između grupa	3999436	5	799887,3	33,27546	$5,16 \cdot 10^{-23}$
Unutar grupa	3749984	156	24038,36		
<b>Ukupno</b>	<b>7749420</b>	<b>161</b>			

**Tablica 15.** Statistička značajnost varijabli za boju-origano

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost
Između grupa	9374798	5	1874960	11,77753	0,00000000532
Unutar grupa	16238195	102	159198		
<b>Ukupno</b>	<b>25612993</b>	<b>107</b>			

Statistička obrada eksperimentalno dobivenih podataka (Tablice 14. i 15.) pokazuje kako su rezultati statistički značajnog utjecaja odabranih ulaznih varijabli ( $\Delta E$ ,  $\Delta E^2$ ,  $\Delta H$ )  $p < 0,05$ . Za kadulju  $p$  iznosi  $5,16 \cdot 10^{-23}$ , a za origano  $5,32 \cdot 10^{-9}$ .

Korištena metoda za dobivanje uzoraka, ultrazvuk visoke snage i odgovarajuća otapala potvrđuju statistički značajne rezultate kao što je prikazano u Tablicama 14. i 15. Možemo potvrditi kako je korištenje ultrazvuka učinkovito za izolaciju boje kadulje i origana.

#### 4.6. REZULTATI REOLOŠKIH SVOJSTAVA OTAPALA

**Tablica 16.** Prikaz podataka za viskoznost otapala

Otapala	Prividna viskoznost kod 1290 s <sup>-1</sup> (mPa s)	Koeficijent konzistencije <i>k</i> (Pa s <sup>n</sup> )	Indeks tečenja <i>n</i>	Koeficijent regresije R <sup>2</sup>
100 % glicerol	0,801	1,555	0,904	0,9982
50 % glicerol	0,026	0,012	1,110	0,9999
Etil-acetat	0,004	0,000094	1,830	0,9963
Voda	0,005	0,00010	1,552	0,9961
Dimetil karbonat	0,004	0,000025	1,723	0,9991
α-pinen	0,006	0,00023	1,452	0,9991
Limonen	0,005	0,00023	1,423	0,9851
25 % etanol	0,007	0,000262	1,45	0,9985
50 % etanol	0,008	0,000635	1,35	0,9976

Viskoznost je unutarnje trenje gibajućeg fluida, odnosno otpornost tvari prema tečenju. Povećanje temperature povećava topljivost ciljanog spoja, brzinu difuzije otapala i prijenos mase, dok se viskoznost otapala i površinska napetost smanjuju. Smanjena viskoznost i površinska napetost olakšavaju prodor otapala dublje u matricu uzorka što povećava učinkovitost ekstrakcije izlaganjem veće površine uzorka upotrijebljenom otapalu (Hossain i sur., 2012). Prema rezultatima iz Tablice 16. vidimo da je najveća viskoznost kod 100 %-tnog glicerola te prilikom tretiranja ultrazvukom s glicerolom nije dolazilo do ekstrakcije, zbog prigušenja zvučnog vala u otapalu. Najmanju vrijednost viskoznosti pokazuju etil-acetat i dimetilkarbonat, ali unatoč tome ekstrakcija nije imala dobar rezultat. Što se tiče limonena i α-pinena kako su to uljna otapala mjerenje u vodenom mediju (TPC i antioksidativne metode) nije bilo moguće provesti zbog nemogućnosti miješanja ulje-voda. Zbog toga je pokušano

dodatno ekstrahiranje iz tog ekstrakta vodom i etanolom te razdvajanje i uljne i vodene frakcije, ali su rezultati bili nula, tj. bioaktivne komponente se nisu ekstrahirale.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Prema simulaciji COSMO-RS i Hansen ne možemo potvrditi njihov odgovor o relativnoj topljivosti otapala za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz kadulje i origana gdje je navedeno da su alfa pinen i limonen najpogodnija otapala, to su uljna otapala pa mjerenja nije bilo moguće provesti u vodenom mediju zbog nemiješanja faza ulje-voda. Rezultati ekstrakcija pokazali su da je najveći prinos kod etanola i vode, a najmanji kod etil-acetata i dimetil karbonata dok je softver izračunao suprotno tome. Rezultati ne potvrđuju dobivene rezultate softvera.
2. Nema razlike pH netretiranih i tretiranih uzoraka.
3. Tretirani uzorci pokazuju veću električnu provodnost od netretiranih uzoraka.
4. Tretirani uzorci imaju sličan oksidacijsko-redukcijski potencijal kao i netretirani uzorci.
5. Prinos ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti se povećava povećanjem snage ultrazvuka, ovisi o temperaturi i vremenu i o kojem otapalu se radi, a s 50 %-tnim etanolom su postignuti najbolji rezultati. Koncentracija ukupnih fenola dosegla je 114,71 mg GAE g<sup>-1</sup> uzorka, a antioksidacijska aktivnost 1130,80 μmol FE g<sup>-1</sup> uzorka dobivena FRAP metodom. FRAP metoda je dokazano djelotvornija i daje veću antioksidacijsku aktivnost od DPPH metode. Tretirani uzorci daju veće prinose od netretiranih.
6. Ukupna promjena boje ( $\Delta E$ ) najveća je kod vodenih uzoraka i 25 %-etanola, a s ostalim otapalima opada.
7. Ultrazvuk se može koristiti za ekstrakciju toplinski osjetljivih bioaktivnih komponenti s obzirom da se provodi pri nižim temperaturama. Možemo opravdati korištenje ultrazvuka za ekstrakciju bioaktivnih komponenti.
8. Ekstrakti kadulje i origana dobiveni pomoću zelenih otapala koja su u skladu s načelima zelene kemije, omogućuju smanjenje energije i otapala te nisu štetna za okoliš.

## 6. LITERATURA

1. Aissou, M., Chemat-Djenni, Z., Yara-Varon, E., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. (2017) Limonene as an agro-chemical building block for the synthesis and extraction of bioactive compounds, *C.R. Chimie* **20**, 346-358.
2. Anonymus 1 (2019) Hansen Solubility Parameters <<https://hansen-solubility.com/>> Pristupljeno 9. srpnja 2019.
3. Anonymus 2 (2019) <<http://www.novihorizonti.ba/najljekovitije-biljke-svijeta-kadulja-sta-lijeci-kako-se-uzgaja-i-recepti-2/>> Pristupljeno 22. rujna 2019.
4. Anonymus 3 (2019) <<http://biljke-kao-lijek.blogspot.com/2013/04/obicni-mravinac-ili-origan.html>> Pristupljeno 22. rujna 2019.
5. Antolić, A., Maleš, Ž., Tomičić, M., Bojić, M. (2018) The Effect of Short-Toothed and Dalmatian Sage Extracts on Platelet Aggregation, *Food Technol, And Biotechnol.* **56**, 256-269.
6. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant acitivity, occurrence and potential uses, *Food Chem.* **99**, 191-203.
7. Barba, F.J., Brianceau S., Turk M., Boussetta N., Vorobiev E. (2015) Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace, *Food Bioprocess Technol.* **8**, 1139-1148.
8. Bavoh, C.B., Lal, B., Nashed, O., Khan, M.S., Keong, L.K., Bustam, M.A. (2016) COSMO-RS: An ionic liquid prescreening tool for gas hydrate mitigation, *Chinese J. Chem. Eng.* **24**, 1619–1624.
9. Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Anal. Biochem*, **239**, 70-76.
10. Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review, *C.R. Chimie.* **17**, 197 – 203.
11. Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I., (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J. Nat. Prod.* **64**, 892-895.
12. Bruneton J. (1999) Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants. Lavoisier Intercept, London.



13. Bundeasomchok, K., Filly, A., Rakotomanomana, N., Panichayupakaranant, P., Chemat, C. (2016) Extraction of a-mangostin from *Garcinia mangostana* L. using alternative solvents: Computational predictive and experimental studies. *LWT - Food Sci. Technol.* **65**, 297-303.
14. Carović, K., Kolak, I., Šatović, Z. (2004) Obični mravinac (*Origanum vulgare* L.). *Sjemenarstvo* **21**, 173-186.
15. Chaabani, E., Abert Vian, M., Bott, R., Ginies, C., Defoort, C., Ksouri, R., Chemat, F. (2019). Extraction of aromas from *Pistacia lentiscus* L. leaves using alternative solvents: COSMO-RS assisted solvent screening and GC-MS metabolites profiling. *Sep. Sci. Technol.* 1-12.
16. Chemat, F., Abert Vian, M., Cravotto, G. (2012) Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8615-8627.
17. Chemat, F., Fabiano-Tixier, A.S., Abert Vian, M., Allaf, T., Vorobiev, E. (2015a) Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends in Anal. Chem.* **71**, 157–168.
18. Chemat, F., Rombaut, N., Fabiano-Tixier, A.S., Pierson, J.T., Bily, A. (2015b) Green Extraction: From Concepts to Research, Education, and Economical Opportunities, U: *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*, 1, izd., (Chemat, F., Strube, J.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, 1-37.
19. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *Ultrason. Sonochem.* **34**, 540–560.
20. Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić M., Brnčić, M., Bosiljkov T., Levaj, B. (2013). The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia Officinalis* L.) Extracts. *Food Technol. Biotechnol.* **51**, 84–91.
21. Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33.
22. Grdiša, M., Jug-Dujaković, M., Lončarić, M., Carović-Stanko, K., Ninčević, T., Liber, Z., Radosavljević, I., Šatović, Z. (2015) Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): A Review of Biochemical Contents, Medical Properties and Genetic Diversity. *acs*, **80**, 69-78.

23. Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C. (2012) Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **19**, 582–590.
24. Jovanović A., Petrović, P., Đorđević, V., Zdunić G., Šavikin K., Bugarski, B. (2017) Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite sirovine*, **37**, 45-49.
25. Klamt, A. (2003) Prediction of the mutual solubilities of hydrocarbons and water with COSMO-RS. *Fluid Phase Equilibr.* **206**, 223–235.
26. Klamt, A., Ecert, F., Arlt, W. (2010) COSMO-RS: an alternative to simulation for calculating thermodynamic properties of liquid mixtures, *Annu. Rev. Chem. Biomol.* **1**, 101-122.
27. Lapuerta, M., Canoira, L. (2016) The Suitability of Fatty Acid Methyl Esters (FAME) as Blending Agents in Jet A-1 in Biofuels for Aviation: Feedstocks, Technology and Implementation, Chuck, C.J., Department of Chemical Engineering, University of Bath, Bath, United Kingdom, 47-84.
28. Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Ginies, C., Chemat, F. (2014) Direct green extraction of volatile aroma compounds using vegetable oils as solvents: Theoretical and experimental solubility study, *LWT - Food Sci. Technol.* **59**, 724-731.
29. Ngaha Njila, M.I., Mahdi, E., Massoma Lembe, D., M., Nde, Z., Nyonseu, D. (2017) Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. Proceedings of the International Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences. Kuala Lumpur, 67-72.
30. Paniwnyk, L., Cai, H., Albu, S., Mason, T.J., Cole, R. (2009) The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **16**, 287–292.
31. Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K., (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agri. Food Chem.* **53**, 4290-4302.
32. Roselló-Soto, E., Galanakis, C.M., Brnčić, M., Orlien, V., Trujillo, F.J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari, B.K., Barba, F.J. (2015). Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by products and algae assisted by ultrasound processing, Modeling approaches to optimize processing conditions, *Trends in Food Sci. Technol.* **42**, 134-149.

33. Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Fernandes-Ferreira, M. (2002) Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.* **162**, 981–987.
34. Scheffczyk, J., Fleitmann, L., Schwarza, A., Bardowa, A., Leonharda, K. (2016) Computer-Aided Molecular Design by Combining Genetic Algorithms and COSMO-RS. *Comput. Aided Chem. Eng.* **38**, 115-120.
35. Shahid, M., Yusuf, M., Mohammad, F. (2016) Plant phenolics: A Review on Modern extraction techniques, *RPMP*, **41**, 2-20.
36. Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014). Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.
37. Sicaire, A.G., Vian, M.A., Fine, F., Carré, P., Tostain, S., Chemat, F. (2015) Experimental approach versus COSMO-RS assisted solvent screening for predicting the solubility of rapeseed oil. *OCL*, **22**, D404.
38. Sun, Y., Liu, Z., Wang, J. (2011) Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim. *Sep. Purif. Technol.* **78**, 49–54.
39. Toplak Galle K. (2001) Hrvatsko ljekovito bilje, 1. izdanje, Mozaik knjiga, Zagreb.
40. Toure O. (2014) Prediction of the equilibrium properties in food and biological systems with the COSMO-RS model. Universite Blaise Pascal - Clermont-Ferrand.
41. Yousif Mutalib L. (2015) Comparasion between conventional and modern methods for extraction of *Rosmarinus officinalis* leaves, *Zanco J. of Med. Sci.* **19**, 1029–1034.

## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Kovač