

## IZOLOVANJE ANTIOKSIDANASA POSTUPKOM NATKRITIČNE EKSTRAKCIJE

*Sintetski antioksidansi danas se sve više zamenjuju prirodnim antioksidansima, zbog njihove toksičnosti i sumnje da su izazivači kancera. Prirodni antioksidansi mogu pokazivati ekvivalentno ili jače antioksidativno dejstvo od endogenih i sintetskih antioksidanasa. Natkritična ekstrakcija (NKE) pokazala se kao jedan od najboljih postupaka za izdvajanje aktivnih komponenti iz biljnog materijala važnih za prehranbenu i farmaceutsku industriju, pre svega što se ovim postupkom dobijaju ekstrakti bez trago-va rastvarača, što nije slučaj sa konvencionalnim načinima ekstrakcije. U ovom radu opisane su različite konfiguracije procesa NKE koje se koriste za ekstrakciju antioksidativnih jedinjenja iz biljne biomase. Dat je prikaz literaturnih podataka o antioksidativnoj aktivnosti natkritičnih ekstrakata ruzmarina i žalfije u poređenju sa aktivnošću sintetskih, komercijalnih i ekstrakata dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom.*

Većina prirodnih antioksidanasa su fenolna jedinjenja tj. polifenoli, a najvažnije grupe prirodnih antioksidanasa su tokoferoli, flavonoidi i fenolne kiseline [1]. Prva sistematska studija o antioksidativnim osobinama biljaka je nastala pedesetih godina dvadesetog veka, kada su Chipault i saradnici [2] izvršili upoređivanje antioksidativne aktivnosti 72 različita začina u različitim supstratima. Chipault i saradnici [2,3] pokazali su da 32 začina poseduju antioksidativnu aktivnost, među kojima ruzmarin i žalfija predstavljaju najbolje izvore antioksidanasa. Pored njih, piment, karanfilić, muskatni orah, čubar, origano, kurkuma, đumbir, majoran, menta i timijan takođe pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost. Brojne kasnije studije potvrdile su antioksidativnu aktivnost ruzmarina i žalfije i dovele do komercijalne primene ovih biljaka [4]. Antimikrobno i antioksidativno dejstvo začina je različito i zavisi od sadržaja aktivnih komponenti tj. od sadržaja etarskih ulja i fenolnih jedinjenja. Aktivne komponente prisutne u začинима koje pokazuju antioksidativne osobine su fenolne kiseline, flavonoidi, prirodni pigmenti (npr. kapsaicin u paprici) i terpeni (npr. rosmanol, karnosol, karnosolna kiselina, epirosmanol, izorosmanol iz ruzmarina i žalfije) [5]. Prirodni antioksidansi igraju veoma važnu ulogu u različitim sistemima:

– u biljkama, deluju kao zaštitno sredstvo protiv zračenja i mikrobnih infekcija,

– u hrani oni inhibiraju ili potpuno sprečavaju nastajanje toksičnih produkata koji nastaju pri oksidaciji lipida, i na taj način održavaju nutritivni kvalitet i produžavaju rok trajanja namirnica i

– u biološkim sistemima, zajedno sa endogenom odbranom (enzimi, vitamini, proteini itd.), antioksidansi u obliku dijetetskih preparata mogu sprečiti ili usporiti oksidativni stres prouzrokovan slobodnim radikalima [6].

U prehranbenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji najčešće se koriste sintetski antioksidansi BHA (smeša izomera 2-*terc*-butil-4-hidroksianizola i 3-*terc*-butil-4-hidroksianizola) i BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol). Upotreba sintetskih antioksidanasa je zabranjena u nekoliko zemalja zbog njihovih neželjenih dugoročnih toksikoloških efekata, uključujući mutagene, karcinogene i teratogene efekte. Takođe, upotreba sintetskih antioksidanasa je ograničena zbog sve većih zahteva potrošača za hranom bez aditiva. [7,8]. Stoga, poslednjih nekoliko decenija veliki broj istraživanja bio je usmeren prema identifikaciji novih antioksidanasa iz prirodnih izvora [1].

U primeni su razni procesi za dobijanje biljnih ekstrakata koji sadrže antioksidativna jedinjenja. Najvažniji uslovi koje dobijeni biljni ekstrakti treba da zadovolje su antioksidativno dejstvo pri malim koncentracijama (0,01 do 0,1% u odnosu na supstrat) i da su procesom iz antioksidativnih ekstrakata uklonjene komponente koje mogu dodeliti ukus, miris i boju tretiranom prehranbenom proizvodu. Proces ekstrakcije kojima se mogu dobiti antioksidativni ekstrakti su: 1) ekstrakcija sa polarnim i nepolarnim rastvaračima, npr. etanolom, etil-acetatom, heksanom, acetonom, metil-hloridom [9–12]; 2) vodeno-alkalna ekstrakcija [13]; 3) ekstrakcija sa biljnim uljima i/ili monogliceridima i digliceridima [14]; 4) destilacija vodenom parom; 5) molekulska destilacija; i najsavremenija, 6) natkritična ekstrakcija sa ugljenik(IV)-oksidom [15].

Biljne vrste familije Lamiaceae, poput ruzmarina, žalfije, origana i timijana poznate su po svojim antioksidativnim svojstvima. Fenolna jedinjenja koja najviše doprinose antioksidativnoj aktivnosti Lamiaceae ekstrakata su ruzmarinska kiselina (u ruzmarinu, žalfiji i origanu, matišnjak), karnosol i karnosolna kiselina (u ruzmarinu i žalfiji) i bifenilna jedinjenja (u timijanu) [16–24]. Među ostalim biljnim vrstama iz familije Lamiaceae, ruzmarin je najviše proučavan kao izvor prirodnih antioksidanasa i jedini začín koji je komercijalno dostupan kao antioksidans [25]. Antioksidativna aktivnost Lamiaceae ekstrakata, dobijenih konvencionalnim načinima ekstrakcije ispitivana je u brojnim studijama [26–

Autor za prepisku: N. Babović, Fakultet za primenjenu ekologiju "Futura", Univerzitet Singidunum, Maršala Tolbuhina 13–15, 11000 Beograd.

E-pošta: nbabovic@singidunum.ac.rs

Rad primljen: 13. jul 2010.

Rad prihvaćen: 1. novembar 2010.

–35]. Međutim, ne postoji mnogo radova u kojima su objavljeni podaci o antioksidativnoj aktivnosti natkritičnih ekstrakata biljaka koje pripadaju porodici Lamiaceae.

U ovom radu opisane su različite konfiguracije procesa NKE koje se koriste za ekstrakciju antioksidativnih jedinjenja iz biljne biomase. Dat je prikaz literaturnih podataka o antioksidativnoj aktivnosti natkritičnih ekstrakata iz ruzmarina i žalfije u poređenju sa aktivnošću sintetskih, komercijalnih i ekstrakata dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom.

## PREDNOSTI NATKRITIČNE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija sa konvencionalnim rastvaračima je ponekad okarakterisana niskom selektivnošću i potrebom za visokim temperaturama, što može dovesti do degradacije željenih jedinjenja. Natkritična ekstrakcija (NKE) mnogo je selektivnija od konvencionalnih načina ekstrakcije što se postiže podešavanjem uslova ekstrakcije (temperature i pritiska). Takođe, NKE predstavlja optimalno rešenje kada se zahtevaju proizvodi bez tragova rastvarača (npr. za prehrambene, kozmetičke i farmaceutske proizvode). NKE je postupak ekstrakcije fluidom koji se nalazi u natkritičnom stanju tj. u stanju „ugušćenog gasa“ – na temperaturi iznad svoje kritične temperature i pritisku iznad svog kritičnog pritiska. Gustina fluida u natkritičnom stanju je relativno visoka pa je zbog toga velika i rastvorljivost komponenti u natkritičnom fluidu. Gustina fluida se može lako menjati sa malim promenama pritiska i temperatura, uglavnom u oblasti blizu kritične tačke. Kao najpogodniji rastvarač u procesima NKE pokazao se ugljenik(IV)-oksid zbog toga što je „generalno prihvaćen kao siguran“ (eng. *generally recognized as safe*, GRAS), zbog netoksičnosti, nezapaljivosti, lake dostupnosti, niske cene i niskih vrednosti kritičnih parametara (31 °C i 7,38 MPa) koji omogućuju ekstrakciju na relativno niskim temperaturama i njegovo lako odvajanje od supstance koja je rastvorena u ugljenik(IV)-oksidu snižavanjem pritiska ili temperature ispod njegovih kritičnih vrednosti, a što je od velikog značaja za ekstrakciju termički degradibilnih supstanci. Natkritični ugljenik(IV)-oksid (NK-CO<sub>2</sub>) je dobar rastvarač za hidrofobna i slabo hidrofobna jedinjenja. Za ekstrakciju polarnih jedinjenja često se dodaju kosolventi u NK-CO<sub>2</sub> koji povećavaju polarnost a samim tim i rastvaranje u NK-CO<sub>2</sub>. Etanol, etil-acetat i voda su najbolji kosolventi za dobijanje ekstrakata u prehrambenoj industriji [36]. Ranija istraživanja [37] pokazala su da je temperaturni opseg 90–110 °C najpogodniji za izolovanje antioksidativnih frakcija iz biljnih vrsta porodice Lamiaceae i da na temperaturama većim od 110 °C može doći do degradacije komponenti u izolovanom ekstraktu. Nadalje, pokazano je da je najpogodnije koristiti čist NK-CO<sub>2</sub> bez dodatka kosolventa jer bi to imalo za posledicu smanjenje selektivnosti NK-

-CO<sub>2</sub> (povećanje prinosa ekstrakcije koekstrakcijom jedinjenja koja ne poseduju antioksidativne osobine).

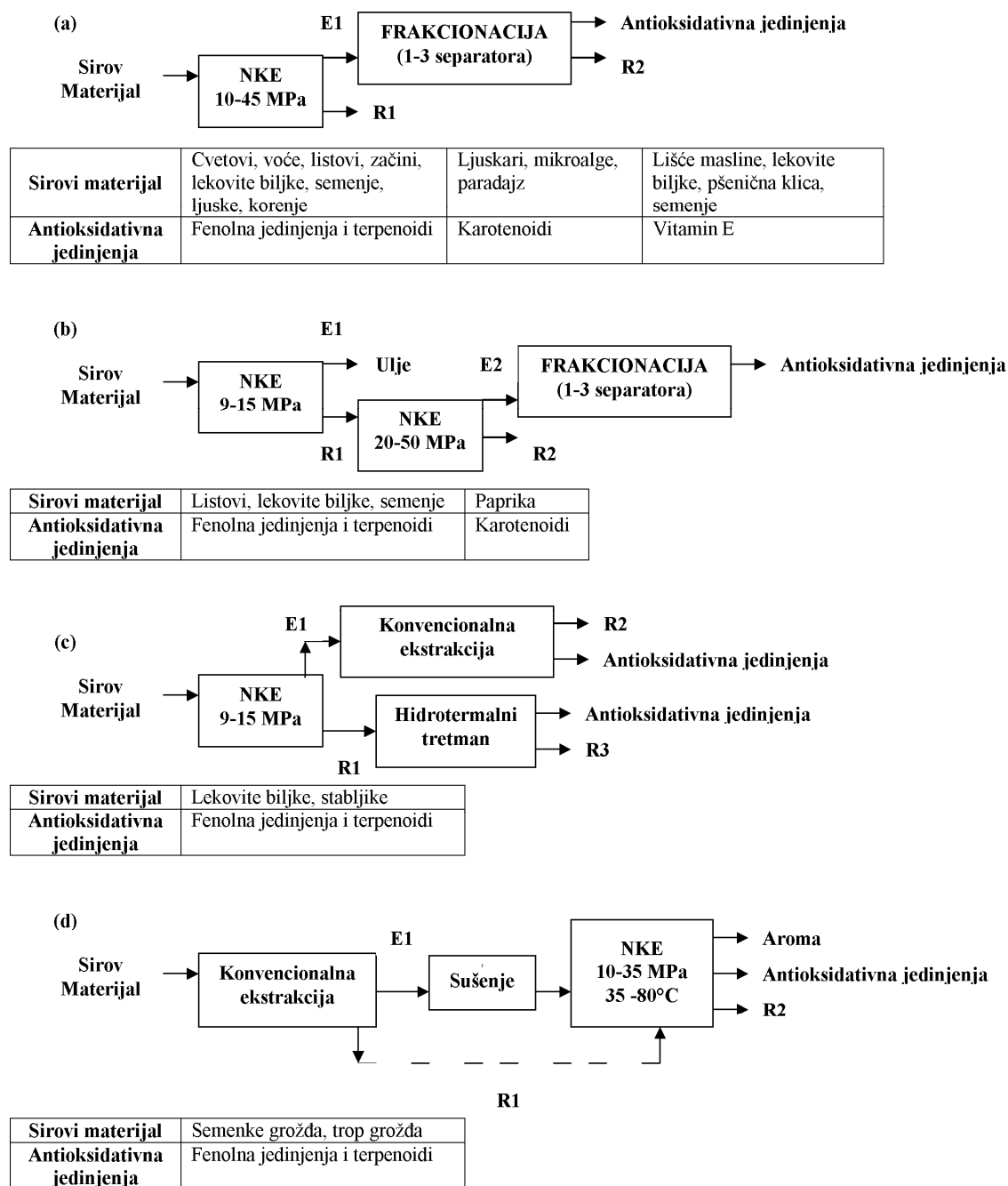
Glavni operativni parametri koji utiču na NKE antioksidanasa (pritisak, temperatura, izbor rastvarača, protok rastvarača, odnos mase rastvarača i mase čvrstog materijala, vrsta i koncentracija kosolventa) moraju biti optimizovani pre procesa. Pored pomenutih faktora, hemijski sastav, pa prema tome i antioksidativna aktivnost dobijenih natkritičnih ekstrakata, najviše zavisi od mesta kultivacije i postupka predtretmana biljne sirovine [38–41]. Uticaj pritiska i temperature na prinos fenolnih jedinjenja i terpenoida ispitivan je na primeru crnog bibera [42], koriandera [43], ginko bilobe [44], ruzmarina [45], planinskog čubra [46] i indijske urme [47].

Ekstrakcija organskim rastvaračima ima niz mana koje se odnose na negativan uticaj na životnu sredinu i zdravlje ljudi (emisija volatilnih organskih jedinjenja, emisija supstanci koje oštećuju ozonski omotač). Pored neželjenog ostatka organskog rastvarača u ekstraktu, tu je i nedovoljna selektivnost organskih rastvarača prema antioksidativnim komponentama tako da dolazi do ekstrakcije i aromatskih komponenti. Rastvorljivost rastvorka u natkritičnom fluidu je slična rastvorljivosti rastvorka u organskim rastvaračima, međutim natkritični fluidi imaju veću difuzivnost, manju viskoznost i manji površinski napon od organskih rastvarača što utiče na kraće vreme procesa i manju potrošnja rastvarača [48].

## ŠEME PROCESA ZA DOBIJANJE ANTIOKSIDANASA POMOĆU NKE-CO<sub>2</sub>

Najviše proučavani antioksidansi ekstrahovani iz biljne biomase pomoću NKE-CO<sub>2</sub> su fenolna jedinjenja, terpenoidi, karotenoidi i tokoferoli. Kako dostupni podaci pokazuju uporedno višu antioksidativnu aktivnost imaju fenolna jedinjenja i detaljniji literaturni podaci su dostupni za ova jedinjenja. Zavisno od sirovog materijala i proizvoda koji se želi dobiti, različite konfiguracije procesa su predložene za ekstrahovanje glavnih grupa antioksidativnih jedinjenja (fenoli, terpenoidi, karotenoidi, i tokoferoli). Ostale grupe jedinjenja (kao što su proteini, oligosaharidi, i produkti Maillard-ove reakcije) takođe pokazuju antioksidativnu aktivnost, ali njihova rastvorljivost u NK-CO<sub>2</sub> je niska. Na slikama 1a do 1d prikazane su uobičajene procesne šeme za NKE antioksidativnih jedinjenja iz prirodnih izvora:

- Jednostepena ekstrakcija i frakciono odvajanje u nekoliko separatora [37,49–56].
- Frakciona ekstrakcija sa postepenim povećavanjem pritiska [22,37,57–62].
- Kombinacija NKE-CO<sub>2</sub> i konvencionalne ekstrakcije [37,63–66].
- Prečišćavanje ekstrakata dobijenog konvencionalnom ekstrakcijom pomoću NKE-CO<sub>2</sub> [67–70].



Slika 1. Procesne šeme za ekstrakciju antioksidativnih jedinjenja pomoću NKE-CO<sub>2</sub>. Oznake: E1, E2: ekstrakti; R1, R2, R3: čvrsti ostaci.

Figure 1. Processing schemes for extraction of the antioxidant compounds involving SFE-CO<sub>2</sub> stages. Nomenclature: E1, E2: extracts; R1, R2, R3: solid residues.

## ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST NATKRIČNIH EKSTRAKTA

Ruzmarinski ekstrakt pokazuje veliku antioksidativnu aktivnost i ima široku primenu u prehrambenoj industriji. Fenolna jedinjenja prisutna u ekstraktu ruzmarina mogu se podeliti u tri grupe: fenolni diterpeni, flavonoidi i fenolne kiseline. Jedinjenja koja najviše dopri-

nose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta ruzmarina su fenolni diterpeni kao što su karnosolna kiselina, karnosol, rosmanol, 7-metilepi-rosmanol, izorosmanol, rosmadiol, i metil karnosat; i fenolne kiseline poput kafeinske i ruzmarinske kiseline. Među svim ovim jedinjenjima veruje se da najveću antioksidativnu aktivnost pokazuju karnosolna kiselina i karnosol, usled uzajamnog dejstva njihovih *o*-fenolnih grupa sa njihovim izopropil-

-grupama. Tokom skladištenja i ekstrakcije iz ruzmarina karnosolna kiselina se može delimično transformisati u karnosol ili neki drugi diterpen kao što je rosmanol. Karnosolna kiselina, karnosol i ruzmarinska kiselina imaju ulogu jakih inhibitora lipidne peroksidacije i ulogu helata metala. Osim jake antioksidativne aktivnosti ruzmarinski ekstrakt pokazuje i dobru termičku stabilnost. Antioksidativna aktivnost ruzmarinskog ekstrakta može se povećati dodatkom askorbinske kiseline, askorbil-palmitata, limunske kiseline ili  $\alpha$ -tokoferola zbog sinergizma između ovih jedinjenja i karnosolne kiseline. Najvažnija antioksidativna jedinjenja identifikovana u natkritičnom ekstraktu ruzmarina data su u tabeli 1. Podaci o antioksidativnoj aktivnosti natkritičnih ruzmarinskih ekstrakata upoređivanim sa aktivnošću sintetskih, komercijalnih i ekstrakata dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom prikazani su u tabeli 2. Zajedno sa ruzmarinom (*Rosmarinus officinalis* L.), žalfija (*Salvia officinalis* L.) poseduje najjaču antioksidativnu aktivnost me-

đu ostalim biljkama. Podaci o antioksidativnoj aktivnosti natkritičnih ekstrakata iz žalfije upoređivanim sa aktivnošću sintetskih, komercijalnih i ekstrakata dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom prikazani su u tabeli 3. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ruzmarina i žalfije dobijenih natkritičnom ekstrakcijom sa ugljenik(IV)-oksidom je upoređiva sa aktivnošću sintetskih antioksidanasa kao što su BHA i BHT bez citotoksičnog i kancerogenog rizika koji imaju sintetski antioksidansi. Antioksidativna aktivnost ekstrakata žalfije pripisuje se prisustvu fenolnih diterpena kao što su karnosol i karnosolna kiselina, rojleanonska kiselina i 7-metoksirosmanol, metil-karnosat, rosmanol, epirosmanol, rosmadial, rosmanol-9-etil etar; flavonoida kao što su genkvanin, cirstimaritin i skutelarein; i fenolnih kiselina kao što je ruzmarinska kiselina [71–76].

Tabela 1. Hemijski sastav natkritičnog ruzmarinskog ekstrakta  
Table 1. Chemical composition of rosemary supercritical extract

<i>p</i> ; <i>t</i> , kosolvent	Identifikovana antioksidativna jedinjenja	Literatura
25 MPa; 60 °C; metanol	Karnosol i karnosolna kiselina	[77]
15–35 MPa; 60 °C; –	Epirosmanol, skutelarein, rosmanol, rosmanol izomer, genkvanin, epirosmanol metil etar, karnosol, karnosol izomer, karnosolna kiselina, rosmadial, metil karnosat, cirsimaritin	[54]
30–35 MPa; 40–60 °C; etanol	Rosmanol, epirosmanol, skutelarein, karnosol, karnosol izomer, karnosolna kiselina, rosmadial, cirsimaritin, metil karnosat	[78]
35 MPa; 100 °C; –	Karnosol i karnosolna kiselina	[22,79]
34,5 MPa; 80 °C; –	Ruzmarinska kiselina, karnosol, karnosolna kiselina, metil karnosat, 12-metoksikarnosolna kiselina	[80]
30 MPa; 100 °C; –	Karnosol i karnosolna kiselina	[81]

Tabela 2. Antioksidativna aktivnost natkritičnog ruzmarinskog ekstrakta (NKE)  
Table 2. Antioxidant activity of rosemary supercritical extract (NKE)

<i>p</i> ; <i>t</i>	Supstrat	Antioksidativna aktivnost	Literatura
50 MPa; 100 °C	Mast	PV <sup>a</sup> : NKE > BHA:BHT <sup>b</sup>	[37]
30 MPa; 40 °C	Linoleinska kiselina	LK- $\beta$ k <sup>c</sup> : NKE > $\beta$ k	[45]
25 MPa; 40 °C	DPPH	DPPH <sup>d</sup> : AK <sup>e</sup> > NKE	[45]
30 MPa; 40 °C	Linoleinska kiselina	LK- $\beta$ k: BHT > NKE > KE <sup>f</sup>	[52]
NKE <sub>1</sub> : 10 MPa; 40 °C	DPPH	DPPH: NKE <sub>2</sub> > NKE <sub>1</sub>	[60]
NKE <sub>2</sub> : 40 MPa; 60 °C			
40 MPa; 60 °C	Linoleinska kiselina	LK- $\beta$ k: BHT > NKE	[82]
35 MPa; 100 °C	DPPH	DPPH: BHA > Flavor' Plus <sup>TM</sup> > NKE	[22]
	OH <sup>h</sup>	OH: Flavor' Plus <sup>TM</sup> > NKE > BHA	
35 MPa; 100 °C	Suncokretovo ulje	PV: NKE > BHA > Flavor' Plus <sup>TM</sup>	[62]
NKE <sub>1</sub> : 30 MPa; 40 °C	DPPH	DPPH: BHA > Flavor' Plus <sup>TM</sup> > NKE <sub>1</sub> = NKE <sub>2</sub>	[81]
NKE <sub>2</sub> : 30 MPa; 100 °C	OH	OH: Flavor' Plus <sup>TM</sup> > BHA > NKE <sub>2</sub> > NKE <sub>1</sub>	
10 MPa; 30 °C	Suncokretovo ulje	PV: NKE > KE	[67]
20 MPa; 60 °C	DPPH	DPPH: KE > NKE	[68]

<sup>a</sup>Peroksidni broj; <sup>b</sup>smeša 1:1; <sup>c</sup>linoleinska kiselina- $\beta$ -karoten; <sup>d</sup>1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal; <sup>e</sup>askorbinska kiselina; <sup>f</sup>ekstrakt dobijen konvencionalnom ekstrakcijom; <sup>g</sup>komercijalni ruzmarinski ekstrakt; <sup>h</sup>hidroksil radikal

Tabela 3. Antioksidativna aktivnost natkritičnog ekstrakta žalfije (NKE)  
Table 3. Antioxidant activity of sage supercritical extract (NKE)

<i>p; t</i>	Supstrat	Antioksidativna aktivnost	Literatura
50 MPa; 100 °C	Mast	PV <sup>a</sup> : NKE > BHA:BHT <sup>b</sup>	[37]
30 MPa; 40 °C	Linoleinska kiselina	LK-βk <sup>c</sup> : BHT > NKE > KE <sup>d</sup>	[52]
25–35 MPa; 100 °C	Ulje uljane repice	PF <sup>e</sup> : NKE > BHT	[55]
20–40 MPa; 60 °C	Suncokretovo ulje	PV: NKE > BHT > KE	[70]
35 MPa; 100 °C	DPPH	DPPH <sup>f</sup> : BHA > Flavor' Plus <sup>TM</sup> > NKE	[22]
	OH <sup>h</sup>	OH: Flavor' Plus <sup>TM</sup> > NKE > BHA	
35 MPa; 100 °C	Suncokretovo ulje	PV: BHA > NKE > Flavor' Plus <sup>TM</sup>	[62]
NKE <sub>1</sub> :30 MPa; 40 °C	DPPH	DPPH: BHA > Flavor' Plus <sup>TM</sup> > NKE <sub>2</sub> = NKE <sub>1</sub>	[81]
NKE <sub>2</sub> :30 MPa; 100 °C	OH	OH: Flavor' Plus <sup>TM</sup> > BHA > NKE <sub>2</sub> > NKE <sub>1</sub>	

<sup>a</sup>Peroksidni broj; <sup>b</sup>smeša 1:1; <sup>c</sup>linoleinska kiselina-β-karoten; <sup>d</sup>ekstrakt dobijen konvencionalnom ekstrakcijom; <sup>e</sup>zaštitni faktor; <sup>f</sup>1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal; <sup>g</sup>komercijalni ruzmarinski ekstrakt; <sup>h</sup>hidroksil radikal

## ZAKLJUČAK

Jedan od najvažnijih tendencija u prehrambenoj industriji danas je potražnja za prirodnim antioksidansima iz biljnog materijala. Ekstrakti izolovani iz biljne biomase predstavljaju važan izvor za proizvodnju i primenu u prehrambenoj industriji nutritivnih suplemenata, komponenata funkcionalne hrane ili antioksidanasa. Težnja zamene sintetskih jedinjenja sa prirodnim aktivnim komponentama usmerava istraživanja u pravcu ispitivanja različitih biljnih materijala i identifikovanja novih jedinjenja sa antioksidativnim dejstvom koji se mogu iz njih izolovati. Zbog toga su veliki naponi uloženi s ciljem pronalaženja jeftinih izvora prirodnih antioksidanasa, kao i za razvoj efikasnih i selektivnih tehnika ekstrakcije. U brojnim studijama Lamiaceae ekstrakti dobijeni postupkom NKE su pokazali jaču antioksidativnu aktivnost u poređenju sa aktivnošću sintetskih, komercijalnih i ekstrakata dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom. Natkritični ekstrakti iz odabranih predstavnika začinskog bilja koji pripadaju familiji Lamiaceae mogu se koristiti u prehrambenoj industriji ne samo zato što štite proizvod od oksidacije već i zbog svojih brojnih bioloških i farmakoloških aktivnosti. Budući razvoj u ekstrakciji antioksidanasa biće sigurno vezan za postupak natkritične ekstrakcije, koji zauzima posebno mesto s obzirom na porast restriktivnih mera u zakonskoj regulativi koja se odnosi na životnu sredinu, toksikologiju i zdravlje ljudi.

## Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (E! 3490 Functional Food Ingredients from Plant Products) na finansijskoj podršci.

## LITERATURA

- [1] N.V. Yanishlieva, in: J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in food: Practical Applications*, CRC Press, Cambridge, 2001, pp. 23–56.
- [2] J.R. Chipault, G.R. Mizuno, J.M. Hawkins, W.O. Lundberg, *Antioxidant properties of natural spices*, *Food Res.* **17** (1952) 46–55.
- [3] J.R. Chipault, G.R. Mizuno, J.M. Hawkins, W.O. Lundberg, *The antioxidant properties of spices in foods*, *Food Technol.* **10** (1956) 209–211.
- [4] U. Bracco, J. Loeliger, J.L. Viret, *Production and use of natural antioxidants*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58** (1981) 686–690.
- [5] M.E. Cuvelier, C. Berset, H. Richard, *Separation of major antioxidants in sage by high performance liquid chromatography*, *Sci. Aliment.* **14** (1994) 811–815.
- [6] J.K. Willcox, S.L. Ash, G.L. Catignani, *Antioxidants and prevention of chronic disease*, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44** (2004) 275–295.
- [7] J. Pokorny, in: *Antioxidants in food: Practical Applications*, J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (Eds.), CRC Press, Cambridge, 2001, pp. 1–7.
- [8] S.S.H. Rizvi, *Supercritical fluid processing of food and biomaterials*, Blackie Academic & Professional, London, 1994.
- [9] S.S. Chang, B. Ostric-Matijaseric, O.A.L. Hsieh, C. Huang, *Natural antioxidants from rosemary and sage*, *J. Food Sci.* **42** (1977) 1102–1106.
- [10] Y. Kimura, T. Kanamori, *Process for producing preservatives*, U.S. Patent 4,380,506, 1983.
- [11] R. Aeschbach, G. Philippossian, *Process for the preparation of an antioxidant extract of spices*, U.S. Patent 5,026,550, 1991.
- [12] P.H. Todd, *Herb flavoring and/or antioxidant composition and process*, U.S. Patent 4,877,635, 1989.
- [13] R. Viani, *Process for extracting antioxidants*, U.S. Patent 4,012,531, 1977.
- [14] D.L. Berner, G.A. Jacobson, *Spice antioxidant principle and process for the extraction thereof*, U.S. Patent 3,732,111, 1973.
- [15] F. Tateo, M. Fellin, *Rosmarinus officinalis* L. extract production, antioxidant and antimutagenic activity, *Perfum. Flavor.* **13** (1988) 48–54.
- [16] K. Schwarz, W. Ternes, *Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis*, *Z. Lebensm. Unters. F. A* **195** (1992) 99–103.

- [17] N. Okamura, Y. Fujimoto, S. Kuwabara, A. Yagi, High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*, *J. Chromatogr. A* **679** (1994) 381–386.
- [18] E.M. Cuvelier, H. Richard, C. Berset, Antioxidant activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73** (1996) 645–652.
- [19] K. Miura, N. Nakatani, Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.), *Agr. Biol. Chem.* **53** (1989) 3043–3045.
- [20] N. Nakatani, K. Miura, T. Inagaki, Structure of New Deodorant Biphenyl Compounds from thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their activity against methyl mercaptan, *Agr. Biol. Chem.* **53** (1989) 1375–1381.
- [21] K. Okazaki, K. Kawazoe, Y. Takaishi, Human platelet aggregation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris* L.), *Phytother. Res.* **16** (2002) 398–399.
- [22] N. Babovic, S. Djilas, M. Jadranin, V. Vajs, J. Ivanovic, S. Petrovic, I. Zizovic, Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **11** (2010) 98–107.
- [23] N. Aničić, S. Dimitrijević, M. Ristić, S. Petrović, S. Petrović, Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Melissa officinalis* L., Lamiaceae, *Hem. Ind.* **59** (2005) 243–247.
- [24] A. Dapkevicius, T.A. van Beek, G.P. Lelyveld, A. van Veldhuizen, A. de Groot, J.P.H. Linssen, R. Venskutonis, Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves, *J. Nat. Prod.* **65** (2002) 892–896.
- [25] N.V. Yanishlieva, E. Marinova, J. Pokorny, Natural antioxidants from herbs and spices, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108** (2006) 776–793.
- [26] K. Rižnar, Š. Čelan, Ž. Knez, S. Mojca, D. Bauman, R. Glaser, Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary extract in chicken frankfurters, *J. Food Sci.* **71** (2006) 425–429.
- [27] D. Georgantelis, G. Blekas, P. Katikou, I. Ambrosiadis, D.J. Fletouris, Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers, *Meat Sci.* **75** (2007) 256–264.
- [28] J. Ahn, I.U. Grun, L.N. Fernando, Antioxidant properties of natural plant extract containing polyphenolic compounds in cooked ground beef, *J. Food Sci.* **67** (2002) 1364–1369.
- [29] J.G. Sebranek, V.J.H. Sewalt, K.L. Robbins, T.A. Houser, Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage, *Meat Sci.* **69** (2005) 289–296.
- [30] J. Iriarte, M.R. Villanueva, J.M. Iturri, Comparative study of antioxidants in meat products: effects of substitution with extract of rosemary, *Aliment. Equipos y Tecnol.* **11** (1992) 87–92.
- [31] Z. Formanek, J.P. Kerry, F.M. Higgins, D.J. Buckley, P.A. Morrissey, J. Farkas, Addition of synthetic and natural antioxidants to  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation, *Meat Sci.* **58** (2001) 337–341.
- [32] K. Thongtan, R. Toma, W. Reiboldt, A. Z. Daoud, Effect of rosemary extract on lipid oxidation and sensory evaluation of frozen, precooked beef patties, *Foodserv. Res. Int.* **16** (2005) 93–104.
- [33] L.R. Nissen, L. Mansson, G. Bertelsen, H.B. Tuong, L.H. Skibsted, Protection of dehydrated chicken meat by natural antioxidants as evaluated by electron spin resonance spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 5548–5556.
- [34] D.D. Duxbury, Extract of rosemary provides natural solution to dehydrated products, *Food Process.* **53** (1992) 102–104.
- [35] J. Pokorny, Z. Reblova, W. Janitz, Extracts from rosemary and sage as natural antioxidants for fats and oils, *Czech J. Food Sci.* **16** (1998) 227–234.
- [36] M. Mukhopadhyay, Natural extracts using supercritical carbon dioxide, CRC Press, Boca Raton, FL, 2000.
- [37] U. Nguyen, G. Frankman, D.A. Evans, Process for extracting antioxidants from Labiateae herbs, U.S. Patent 5,017,397, 1991.
- [38] E. Reverchon, Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *J. Supercrit. Fluids* **10** (1997) 1–37.
- [39] J.M. del Valle, J.C. de la Fuente, D.A. Cardarelli, Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin America, *J. Food Eng.* **67** (2005) 35–57.
- [40] G. Brunner, Supercritical fluids: Technology and application to food processing, *J. Food Eng.* **67** (2005) 21–37.
- [41] E. Reverchon, I. De Marco, Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *J. Supercrit. Fluids* **38** (2006) 146–166.
- [42] N. Tipsrisukond, L.N. Fernando, A.D. Clarke, Antioxidant effects of essential oil and oleoresin of black pepper from supercritical carbon dioxide extractions in ground pork, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 4329–4333.
- [43] B. Yopez, M. Espinosa, S. Lopez, G. Bolanos, Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction, *Fluid Phase Equilib.* **194** (2002) 879–884.
- [44] C. Yang, Y.R. Xu, W.X. Yao, Extraction of pharmaceutical components from *Ginkgo biloba* leaves using supercritical carbon dioxide, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 846–849.
- [45] R.N. Carvalho, L.S. Moura, P.T.V. Rosa, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity, *J. Supercrit. Fluids* **35** (2005) 197–204.
- [46] M.M. Esquivel, M.A. Ribeiro, M.G. Bernardo-Gil, Supercritical extraction of savory oil: Study of antioxidant activity and extract characterization, *J. Supercrit. Fluids* **14** (1999) 129–138.
- [47] S. Luengthanaphol, D. Mongkholkhajornsilp, S. Douglas, P.L. Douglas, Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat-preliminary experiments, *J. Food Eng.* **63** (2004) 247–252.

- [48] H.C. Wang, C.R. Chen, C.J. Chang, Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides, *Food Chem.* **72** (2001) 505–509.
- [49] P.F. Leal, F.C.M. Chaves, L.C. Ming, A.J. Petenate, M.A.A. Meireles, Global yields, chemical compositions and antioxidant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) extracts obtained by supercritical fluid extraction, *J. Food Process Eng.* **29** (2006) 547–559.
- [50] H. Fadel, F. Marx, A. El-Sawy, A.H. El-Ghorab, Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf oils, *Z. Lebensm. Unters. Forsh.* **208** (1999) 212–216.
- [51] A.H. El-Ghorab, K.F. El-Massry, F. Marx, H.M. Fadel, Antioxidant activity of egyptian *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf extracts, *Nahrung* **47** (2003) 41–45.
- [52] A. Dapkevicius, R. Venskutonis, T.A. van Beek, J.P.H. Linssen, Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania, *J. Sci. Food Agric.* **77** (1998) 140–146.
- [53] E. Vagi, E. Rapavi, M. Hadolin, K.P. Vasarhelyine, A. Balazs, A. Blazovics, B. Simandi, Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 17–21.
- [54] S. Cavero, L. Jaime, J.P. Martin-Alvarez, F.J. Senorans, G. Reglero, E. Ibanez, In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), *Eur. Food Res. Technol.* **221** (2005) 478–486.
- [55] E. Dauksas, P.R. Venskutonis, V. Povilaityte, B. Sivik, Rapid screening of antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extracts obtained by supercritical carbon dioxide at different extraction conditions, *Nahrung* **45** (2001) 338–341.
- [56] B. Simandi, V. Hajdu, K. Peredi, B. Czukur, A. Nobik-Kovacs, A. Kery, Antioxidant activity of pilot-plant alcoholic and supercritical carbon dioxide extracts of thyme, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103** (2001) 355–358.
- [57] M. Ashraf-Khorassani, L.T. Taylor, Sequential fractionation of grape seeds into oils, polyphenols, and procyanidins via a single system employing CO<sub>2</sub>-based fluids, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 2440–2444.
- [58] B. Simandi, M. Oszagyan, E. Lemberkovics, A. Kery, J. Kaszacs, F. Thyron, T. Matyas, Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin, *Food Res. Int.* **31** (1998) 723–728.
- [59] B. Marongiu, S. Porcedda, A. Piras, A. Rosa, M. Deiana, M.A. Dessi, Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* subsp. *Inodora*, *Phytotherapy Res.* **18** (2004) 789–792.
- [60] G. Reglero, J. Tabera, E. Ibanez, S. Lopez-Sebastian, E. Ramos, L. Ballester (1999) Proceso de extracción con fluidos supercríticos para la producción de antioxidantes naturales y antioxidantes obtenidos mediante dicho proceso, Spanish Patent, ES2128996.
- [61] L. Ibanez, A. Kubatova, F.J. Senorans, S. Cavero, G. Reglero, S.B. Hawthorne, Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 375–382.
- [62] N. Babović, I. Žižović, S. Saičić, J. Ivanović, S. Petrović, Oxidative stabilisation of sunflower oil by antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q*, DOI:10.2298/CICEQ100210030B
- [63] J.M. del Valle, C. Godoy, M. Asencio, J.M. Aguilera, Recovery of antioxidants from boldo (*Peumus boldus* M.) by conventional and supercritical CO<sub>2</sub> extraction, *Food Res. Int.* **37** (2004) 695–702.
- [64] A. T. Quitain, S. Katoh, T. Moriyoshi, Isolation of antimicrobials and antioxidants from moso-bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and subsequent hydrothermal treatment of the residues, *Ind. Eng. Chem. Res.* **43** (2004) 1056–1060.
- [65] M.A. Ribeiro, M.G. Bernardo-Gil, M.M. Esquivel, *Melissa officinalis* L.: Study of antioxidant activity in supercritical residues, *J. Supercrit. Fluids* **21** (2001) 51–60.
- [66] T. Nakatsu, A. Yamasaki, Water-soluble anti-oxidation agents, U.S. Patent US6123945, 2000.
- [67] M. Hadolin, H.A. Rižner, D. Bauman, Ž. Knez, Isolation and concentration of natural antioxidants with high-pressure extraction, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **5** (2004) 245–248.
- [68] S. Lopez-Sebastian, E. Ramos, E. Ibanez, J.M. Bueno, L. Ballester, J. Tabera, G. Reglero, Dearomatization of antioxidant rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 13–19.
- [69] E. Ibanez, S. Lopez-Sebastian, J. Fernandez, J. Tabera, J.M. Bueno, L. Ballester, G. Reglero, Influence of the CO<sub>2</sub> quality in the antioxidant activity of rosemary extracts dearomatized by supercritical fluid extraction, *Food Sci. Technol. Int.* **7** (2001) 177–182.
- [70] Z. Đarmati, R.M. Jankov, E. Schwirtlich, B. Đulinac, A. Đordjevic, High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO<sub>2</sub> extraction, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68** (1991) 731–734.
- [71] J. Ivanović, N. Aničić, I. Žižović, S. Petrović, Natkritični CO<sub>2</sub> biljni ekstrakti kao dodaci u proizvodnji i preradi mesa, *Tehnol. mesa* **48** (2007) 236–241.
- [72] S. Đilas, N. Aničić, J. Ivanović, I. Žižović, S. Petrović, Isolation of antioxidant fraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.) with supercritical carbon dioxide, 9th International Symposium Interdisciplinary Regional Research, Novi Sad, 2007.
- [73] J. Ivanović, N. Aničić, I. Žižović, S. Petrović, Supercritical CO<sub>2</sub> plant extracts as additives for meat industry, Internacional 54<sup>th</sup> Meat Industry Conference, Vrnjačka Banja, 2007.
- [74] J. Ivanović, S. Đilas, N. Babović, I. Žižović, S. Petrović, Antioxidant activity of the supercritical extracts of Lamiaceae herbs, 47th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, 2009, pp. 91–94.
- [75] N. Babović, I. Žižović, J. Ivanović, S. Petrović, S. Saičić, M. Jadranić, Oxidative stability of sunflower oil by an-

- tioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs, 48th Meeting of the Serbian Chemical Society, Novi Sad, 2010, 48–51.
- [76] N. Babović, Antioksidativne osobine frakcija dobijenih iz odabranih biljaka familije Lamiaceae postupkom natkritične ekstrakcije, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2010.
- [77] C. Bicchi, A. Binello, P. Rubiolo, Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis, *Phytochem. Anal.* **11** (2000) 236–242.
- [78] F.J. Senorans, E. Ibanez, S. Cavero, J. Tabera, G. Reglero, Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants, *J. Chromatogr. A* **870** (2000) 491–499.
- [79] O. Yesil-Celiktas, P. Nartop, A. Gurel, E. Bedir, F. Vardar-Sukan, Determination of phenolic content and anti-oxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*' calli, *J. Plant Physiol.* **164** (2007) 1536–1542.
- [80] C.H. Peng, J.D. Su, C.C. Chyau, T.Y. Sung, S.S. Ho, C.C. Peng, R.Y. Peng, Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71** (2007) 2223–2232.
- [81] J. Ivanović, S. Đilas, M. Jadranin, V. Vajs, N. Babović, S. Petrović, I. Žižović, Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.), *J. Serb. Chem. Soc.* **74** (2009) 717–732.
- [82] E. Ibanez, A. Oca, G. de Murga, S. Lopez-Sebastian, J. Tabera, G. Reglero, Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 1400–1404.

## SUMMARY

### OBTAINING OF THE ANTIOXIDANTS BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION

Nada V. Babović<sup>1</sup>, Slobodan D. Petrović<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Applied Ecology "Futura", Singidunum University, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup>Hemofarm Stada, Vršac, Serbia

(Review paper)

One of the important trends in the food industry today is demand for natural antioxidants from plant material. Synthetic antioxidants such as butylated hydroxytoluene (BHT), and butylated hydroxyanisole (BHA) are now being replaced by the natural antioxidants because of their possible toxicity and as they may act as promoters of carcinogens. The natural antioxidants may show equivalent or higher antioxidant activity than the endogenous or the synthetic antioxidants. Thus, great effort is being devoted to the search for alternative and cheap sources of natural antioxidants, as well as to the development of efficient and selective extraction techniques. The supercritical fluid extraction (SFE) with carbon dioxide is considered to be the most suitable method for producing natural antioxidants for the use in food industry. The supercritical extract does not contain residual organic solvents as in conventional extraction processes, which makes these products suitable for use in food, cosmetic and pharmaceutical industry. The recovery of antioxidants from plant sources involves many problematic aspects: choice of an adequate source (in terms of availability, cost, difference in phenolic content with variety and season); selection of the optimal recovery procedure (in terms of yield, simplicity, industrial application, cost); chemical analysis of extracts (for optimization purposes a fast colorimetric method is more preferable than a chromatographic one); evaluation of the antioxidant power (preferably by the different assay methods). The paper presents information about different operational methods for SFE of bioactive compounds from natural sources. It also includes the various reports on the antioxidant activity of the supercritical extracts from Lamiaceae herbs, in comparison with the activity of the synthetic antioxidants and the extracts from Lamiaceae herbs obtained by the conventional methods.

Ključne reči: Lamiaceae • Natkritična ekstrakcija ugljenik(IV)-oksidom • Prirodni antioksidansi • Antioksidativna aktivnost

Key words: Lamiaceae • Supercritical carbon dioxide extraction • Natural antioxidants • Antioxidant activity