

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

IVA ŠKARICA

**PRIMJENA METODE ODZIVNIH POVRŠINA U OPTIMIRANJU
UVJETA SUPERKRITIČNE CO₂ EKSTRAKCIJE PLODOVA MIRTE
(*Myrtus communis* L.)**

Zagreb, 2022.



Ovaj rad izrađen je na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Sandre Balbino i uz pomoć Daniele Cvitković, mag. ing. techn. aliment. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

Rad je izrađen u okviru projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ (KK.01.1.1.04.0093), koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj - Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. - 2020.



POPIS SIMBOLA I KRATICA

ANOVA – eng. *Analysis of variance*- analiza varijance

CO₂ – ugljikov dioksid

FID – eng. *Flame Ionization Detector* – plameno – ionizacijski detektor

GC – eng. *Gas Chromatography* - plinska kromatografija

MS – eng. *Mass Spectrometry* – masena spektrometrija

MUFA – eng. *Monounsaturated Fatty Acids* – mononezasićene masne kiseline

p_c – kritični tlak

PUFA – eng. *Polyunsaturated Fatty Acids* – polinezasićene masne kiseline

RSM – eng. *Response Surface Methodology* – metoda odzivnih površina

SCF – eng. *Supercritical Fluids* - superkritični fluidi

SFA – eng. *Saturated Fatty Acids* – zasićene masne kiseline

SFE – eng. *Supercritical Fluid Extraction* - ekstrakcija superkritičnim fluidima

scCO₂ – eng. *Supercritical Carbon Dioxide* - superkritični ugljikov dioksid

T_c – kritična temperatura

TLC – eng. *Thin Liquid Chromatography* – tankoslojna kromatografija

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. MIRTA	2
1.1.1. Ljekovita svojstva mirte	3
1.1.2. Kemijski sastav plodova mirte	3
1.1.2.1. Masne kiseline	3
1.1.2.2. Fitosteroli	5
1.1.2.3. Eterično ulje	6
1.2. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA	8
1.2.1. Superkritični CO ₂	9
1.2.2. Optimizacija SFE i utjecaj uvjeta scCO ₂ ekstrakcije na iskorištenje	10
1.2.3. Superkritična ekstrakcija lipofilnog ekstrakta iz plodova mirte	11
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Plodovi mirte	13
3.1.2. Aparatura i kemikalije	13
3.2. METODE	15
3.2.1. Ekstrakcija superkritičnim CO ₂	15
3.2.2. Određivanje sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom	16
3.2.3. Određivanje udjela i sastava fitosterola	17
3.2.4. Određivanje udjela hlapljivih spojeva	22
3.2.5. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka	23
4. REZULTATI	25
4.1. ISKORIŠTENJE LIPOFILNOG EKSTRAKTA	25
4.2. SASTAV MASNIH KISELINA	27
4.3. UDIO I SASTAV FITOSTEROLA	29
4.4. UDIO I SASTAV HLAPLJIVIH SPOJEVA	30
4.5. UTJECAJ UVJETA scCO ₂ EKSTRAKCIJE	32
5. RASPRAVA	33
5.1. ISKORIŠTENJE LIPOFILNOG EKSTRAKTA	33
5.2. SASTAV MASNIH KISELINA	33
5.3. UDIO I SASTAV FITOSTEROLA	35
5.4. UDIO I SASTAV HLAPLJIVIH SPOJEVA	37
5.5. UTJECAJ UVJETA scCO ₂ EKSTRAKCIJE NA ISKORIŠTENJE	39
5.6. UTJECAJ UVJETA scCO ₂ EKSTRAKCIJE NA UDIO VIŠESTRUKO NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA (PUFA)	41
5.7. UTJECAJ UVJETA scCO ₂ EKSTRAKCIJE NA PRINOS FITOSTEROLA	43
5.8. UTJECAJ UVJETA scCO ₂ EKSTRAKCIJE NA PRINOS HLAPLJIVIH SPOJEVA	46
5.9. REZULTATI OPTIMIRANJA UVJETA scCO ₂ EKSTRAKCIJE	48
6. ZAKLJUČCI	51
7. POPIS LITERATURE	52
8. SAŽETAK	61
9. SUMMARY	62

1. UVOD

Mirta (lat. *Myrtus communis* L.) je ljekovita biljka mediteranskih krajeva bogata mnoštvom bioaktivnih spojeva koja se u drevnim medicinskim tradicijama upotrebljavala kao lijek za liječenje raznih oboljenja (Giampieri i sur., 2020). Listovi mirte bogati su sastavnicama eteričnog ulja, flavonoidima te fenolnim kiselinama, a plodovi sadrže visoke udjele antocijana, tanina, masnih i organskih kiselina. Budući da listovi i plodovi mirte sadrže fitokemikalije s antioksidativnim djelovanjem, učinkoviti su u smanjenju oksidativnog stresa (Şan i sur., 2015). Plodovi mirte vrlo su bogati esencijalnom n-6 linolnom kiselinom, koju ljudsko tijelo ne može sintetizirati te u visokom udjelu sadrže oleinsku i palmitinsku masnu kiselinu (Correddu i sur., 2019). Mirta se upotrebljava u kulinarstvu te u kozmetičkim, farmaceutskim i prehrambenim proizvodima. Jedan od najpoznatijih proizvoda dobivenih iz plodova mirte jest poznati sardinijski slatki liker „Mirto di Sardegna“ koji sadrži veliku količinu antocijana i tanina te mu je priznata Oznaka zemljopisnog podrijetla (Giampieri i sur., 2020).

Ekstrakcija superkritičnim fluidima zasniva se na primjeni superkritičnog fluida kao otapala karakteriziranog svojom kritičnom temperaturom i tlakom. Ugljikov dioksid poprima superkritična svojstva na temperaturi iznad 31,1 °C te na tlaku višem od 73,8 bar, a otapa većinom lipofilne komponente poput triacilglicerola, fitosterola te hlapljivih sastavnica eteričnih ulja (Sahena i sur., 2009). Budući da se ekstrakcija superkritičnim CO₂ uobičajeno provodi pri niskim temperaturama, prikladna je za ekstrakciju bioaktivnih molekula zbog toga što ne uzrokuje oštećenja termolabilnih komponenti poput masnih kiselina (Ahmad i sur., 2019).

Istraživanja superkritične ekstrakcije mirte provelo je nekoliko grupa autora (Pereira i sur., 2013; Ghasemi i sur., 2011; Zermane i sur., 2014), međutim sve ove studije su uključivale listove mirte i bile su fokusirane na fenolne spojeve ili eterična ulja. Jedino istraživanje koje je uključilo i plod mirte proveli su Pereira i sur. (2016) koji su istraživali antioksidacijski kapacitet superkritičnih CO₂ ekstrakata lista i ploda mirte uz određivanje ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta. Rezultati su pokazali veći antioksidacijski kapacitet u superkritičnim ekstraktima koji je povezan s koncentracijom fenolnih spojeva flavonol glikozida i miricetin O-glikozida. Pregledom dostupne literature nije pronađeno nijedno istraživanje koje bi uključilo superkritičnu ekstrakciju plodova mirte s fokusom na lipofilne spojeve poput triacilglicerola odnosno masnih kiselina i fitosterola. Dodatno, sastav

fitosterola kao vrijednih bioaktivnih spojeva potencijalno prisutnih u plodu mirte još nije istražen.

1.1. MIRTA

Mirta (lat. *Myrtus communis* L.) aromatična je ljekovita biljka, tipična za obalna područja mediteranskih regija, poput sjeverne Afrike ili južne Europe, a nalazi se i u Južnoj Americi, Australiji te određenim područjima Himalaje. Pripada obitelji mirti (lat. *Myrtaceae*) koja obuhvaća oko 3000 vrsta te raste kao zimzelena grm ili malo stablo (Giampieri i sur., 2020). Ova biljka je samonikla u Iranu, Španjolskoj, Francuskoj, Grčkoj, Turskoj, Alžiru, Maroku, Hrvatskoj te Crnoj Gori. Osim navedenoga, mirta se zbog svojih mirisnih cvjetova uzgaja i u vrtovima, osobito u sjeverozapadnoj Indiji (Hussain i sur., 2021).

Biljka može doseći visinu od 2,5 m, a cvjetovi su joj zvjezdasti, mirisni te mogu biti bijeli ili ružičasti. Mirta je vrlo aromatična biljka zbog visokog udjela eteričnog ulja u žlijezdama lišća, cvijeta i ploda. Listovi mirte dugački su 3 - 5 cm te sadrže tanine, flavonoide i hlapljiva ulja (Aleksić i Knežević, 2014). Plodovi mirte sazrijevaju između listopada i veljače, jestivi su, sitni, okruglog oblika te sadrže mnogo sjemenki. Uglavnom su plavo-crne boje, kao što je prikazano na slici 1, međutim, postoje sorte koje karakteriziraju bijelo-žuti plodovi (Giampieri i sur., 2020).



Slika 1. Tamnoplavi plodovi mirte (Martin, 2008)

Mirta se uglavnom upotrebljava u kulinarstvu te u kozmetičkim, farmaceutskim i prehrambenim proizvodima. Primjerice jedan od najpoznatijih proizvoda dobivenih iz plodova mirte jest poznati sardinijski slatki liker „Mirto di Sardegna“. Liker sadrži veliku količinu antocijana i tanina te mu je priznata Oznaka zemljopisnog podrijetla (EZ Reg. br. 110/2008) (Giampieri i sur., 2020). Osim navedenoga, različiti dijelovi biljke te eterično ulje iz listova,

cvjetova i plodova naširoko se upotrebljavaju za aromatiziranje mesa i umaka (Şan i sur., 2015).

1.1.1. Ljekovita svojstva mirte

U drevnim medicinskim tradicijama, različiti dijelovi mirte, osobito plodovi, listovi, cvjetovi te eterična ulja, naširoko su se koristili kao lijek za liječenje kašlja; gastrointestinalnih poremećaja poput peptičkog ulkusa, dijareje i hemoroida; bolesti urinarnog trakta (tj. uretritisa) te kožnih bolesti poput crvenila kože, kao i za inaktivaciju mikroorganizama te za zacjeljivanje rana (Giampieri i sur., 2020). Budući da listovi i plodovi mirte sadrže brojne spojeve s antioksidativnim djelovanjem, učinkoviti su i u smanjenju oksidativnog stresa te uklanjanju slobodnih radikala. Eterično ulje dobiveno iz listova mirte koristi se uglavnom za liječenje plućnih bolesti (Şan i sur., 2015). Sva navedena ljekovita svojstva posljedica su širokog spektra i visokog udjela bioaktivnih spojeva prisutnih u različitim dijelovima mirte, poput polifenola, flavonoida, antocijanina, fenolnih kiselina, lignana, tanina, antioksidansa, organskih kiselina, masnih kiselina i minerala (Medjeldi i sur., 2022).

1.1.2. Kemijski sastav plodova mirte

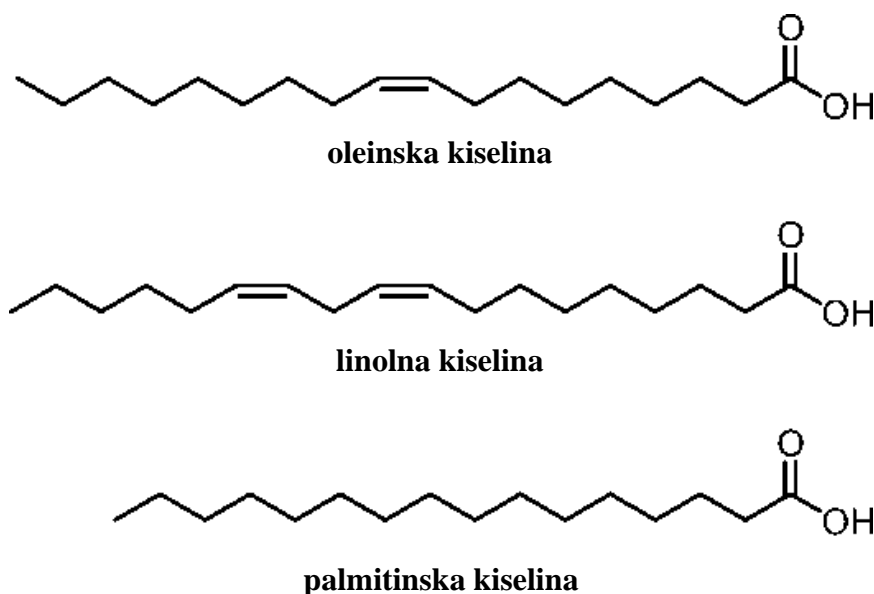
Glavni sekundarni metaboliti prisutni u listovima mirte su sastavnice eteričnog ulja, fenolne kiseline i flavonoidi, a plodovi mirte sadrže visoke udjele tanina, antocijana, masnih i organskih kiselina (Aleksić i Knežević, 2014). Prosječni kemijski sastav plodova mirte ovisi o nekoliko čimbenika poput genotipa biljke, geografskog područja uzgoja, klimatskih uvjeta te zrelosti (Giampieri i sur., 2020).

1.1.2.1. Masne kiseline

Masne kiseline dijele se na zasićene (eng. *Saturated Fatty Acids*, SFA), mono-nezasićene (eng. *Monounsaturated Fatty Acids*, MUFA) i višestruko nezasićene (eng. *Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFA), ovisno o broju dvostrukih veza koje posjeduju u svojoj molekularnoj strukturi (Saini i Keum, 2018) te ih definira metilna grupa na jednom kraju lanca (n- kraj lanca) i karboksilna grupa na drugom kraju lanca (De Carvalho i Caramujo, 2018). Budući da zasićene masne kiseline sadrže ugljikove atome međusobno povezane jednostrukim kovalentnim vezama, manje su reaktivne te su stoga stabilnije. Nezasićene masne kiseline, budući da sadrže jednu ili više dvostrukih kovalentnih veza, nestabilne su te im reaktivnost raste s porastom broja dvostrukih veza, što je posljedica mogućnosti njihovog pucanja (Nogueira i sur., 2019). Pojedine masne kiseline pomažu u prevenciji bolesti poput dijabetesa, bolesti srca te određenih vrsta karcinoma. Ljudsko tijelo može sintetizirati masne kiseline koje

su mu potrebne, s izuzetkom α -linolenske i linolne kiseline, koje se u organizam unose putem hrane (Tang i sur., 2018).

Ukupni udio ulja u plodovima različitih genotipova mirte iznosi od 3,83 do 5,90 %, a njihovim zrenjem raste ukupni udio masnih kiselina u plodovima (Şan i sur., 2015; Wannas i sur., 2010). Najzastupljenije masne kiseline su linolna (71 – 75 %), oleinska (9,25 – 9,41 %) te palmitinska (10,18 – 13,40 %) (Correddu i sur., 2019) čije su strukturne formule prikazane na slici 2.



Slika 2. Strukturne formule oleinske, linolne i palmitinske masne kiseline (Fey, 2020)

Şan i sur. (2015) navode kako je udio SFA u plodovima mirte 14,00 – 18,03 %, odnosno 19,97 % kako navode Serce i sur. (2010). Od SFA najzastupljenije su palmitinska i stearinska masna kiselina, pri čemu udio stearinske masne kiseline iznosi 2,93 – 4,34 % (Şan i sur., 2015), odnosno 3,99 – 4,26 % (Correddu i sur., 2019). Ostale SFA poput arahidonske i behenske kiseline prisutne su u vrlo niskim koncentracijama (manje od 1%) (Şan i sur., 2015).

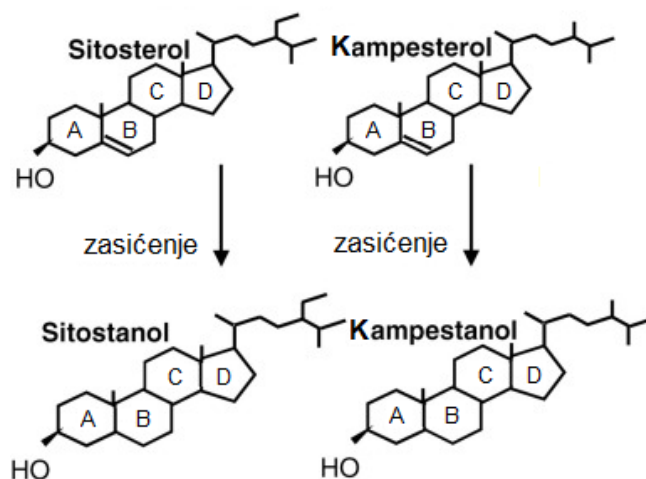
Udio nezasićenih masnih kiselina u plodovima mirte čini 81,09 – 83,97 % ukupnih, od čega je većina (otprilike 70 %) polinezasićenih (Şan i sur., 2015). Serce i sur. (2010) navode kako je udio nezasićenih masnih kiselina u plodovima mirte 73,68 %. Najzastupljenije MUFA u plodovima mirte su oleinska (10,14 – 13,48 %) te eikozenska masna kiselina (0,31 – 0,41 %). Od PUFA, zastupljene su linolna (69,47 – 71,71 %) te linolenska masna kiselina, čiji je udio u plodovima mirte niži od 1 %. Linolna kiselina vrlo je važna za ljudski organizam jer stabilizira strukturu staničnih membrana i kože (Şan i sur., 2015). Osim navedenoga, Wannas i sur. (2009)

navode kako su u plodovima mirte prisutne laurinska (0,36 %), miristinska (0,35 %) te palmitoleinska masna kiselina (0,32 %).

1.1.2.2. Fitosteroli

Steroidi su esencijalne triterpenoidne molekule prisutne u svim eukariotima koje moduliraju fluidnost i fleksibilnost staničnih membrana te služe kao signalne molekule koje su ključne za rast, razvoj i diferencijaciju višestaničnih organizama. Steroidi pripadaju jednoj od najistaknutijih skupina bioloških spojeva te su najvažniji prirodni produkti koji su široko rasprostranjeni u biljkama i životinjama. U skupinu steroida ubrajaju se fitosteroli (steroidni alkoholi) od kojih je u životinjskim stanicama najzastupljeniji kolesterol. Prekursor u sintezi steroida je linearni terpenoid skvalen koji je načinjen od 30 ugljikovih atoma, a svim steroidima zajednička strukturna karakteristika jest tetraciklički prstenasti sustav (Pollier i sur., 2019).

Fitosteroli, odnosno biljni steroli, slični su kolesterolu u pogledu strukture i biološke aktivnosti, a nalaze se većinom u biljnim uljima ($1500 - 12310 \text{ mg kg}^{-1}$) (Bai i sur, 2021), orašastim plodovima, voću i žitaricama. Ovu skupinu čini više od 200 različitih kemijskih spojeva te se dijele na sterole koji sadrže dvostruku vezu u B prstenu i zasićene stanole. U različitim biljnim vrstama najzastupljeniji steroli su kampesterol, stigmasterol i sitosterol dok su kampestanol i sitostanol najčešći stanoli (Nattagh-Eshtivani i sur., 2022) prikazani na slici 3.



Slika 3. Strukturne formule sitosterola, kampesterola, sitostanola i kampestanola (Plat i sur., 2005)

Smatra se da fitosteroli posjeduju čitav niz različitih farmakoloških svojstava od kojih najvažnija uključuju djelovanje na smanjenje razina ukupnog kolesterola i lipoproteina niske

gustoće čime utječu i na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti. Fitosterolima se često pripisuje i protuupalna, antimikrobna i imunomodulacijska aktivnost kao i djelovanje na smanjenje dijabetesa i tjelesne težine. Uz navedeno, određene studije ističu antikancerogeno djelovanje fitosterola, pri čemu prehrana bogata ovim spojevima može smanjiti rizik od pojave karcinoma za 20 % (Jiang i sur., 2019).

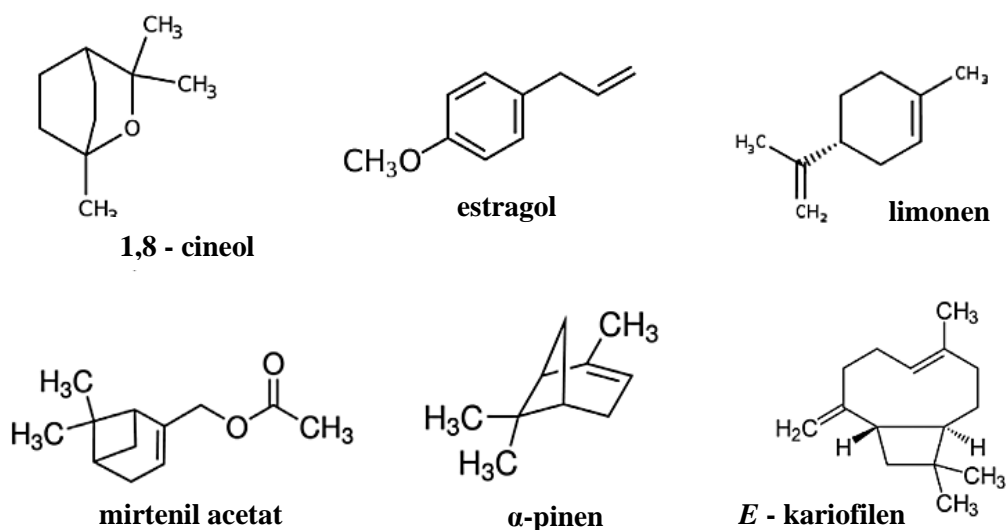
Budući da u dostupnoj literaturi nije pronađen niti jedan znanstveni rad koji iznosi podatke o fitosterolima prisutnim u plodovima mirte te obzirom na morfološku i kemijsku sličnost s mirtom, kao referenca za usporedbu navodi se udio i sastav fitosterola u pasjem trnu (lat. *Hippophae rhamnoides* L.). Udio fitosterola u pasjem trnu ovisi o podrijetlu te vremenu berbe plodova, kao i o metodama izolacije ulja. U svježim plodovima, udio fitosterola je u rasponu od 350 – 500 mg kg⁻¹, od čega je 70 – 80 % zastupljeno u pulpi dok ulje sjemenki sadrži oko 1 – 2 % fitosterola, a ulje pulpe 1 – 3 %. Sitosterol čini 60 – 70 % fitosterola u sjemenkama te do 80 % fitosterola pulpe dok Δ 5-avenasterol čini 10 – 20 % fitosterola sjemenki te 2 – 5 % fitosterola pulpe. Od ostalih fitosterola, u rasponu od 1 – 5 %, zastupljeni su kampesterol, stigmastanol, citrostadienol, Δ 7-avenasterol, cikloartenol, 24-metilen-cikloartanol, obtusifoliol (Yang i Kallio, 2002).

1.1.2.3. Eterično ulje

Eterična ulja mirisni su hlapljivi spojevi prisutni u 10 % biljnog carstva. Pohranjena su u posebnim krhkim sekretornim strukturama biljaka poput žlijezda, sekretornih dlačica, sekretornih kanala, sekretornih šupljina ili smolnih kanala. Ukupni udio eteričnog ulja u biljkama općenito je vrlo nizak te rijetko prelazi 1 % ukupne mase. Eterična ulja su hidrofobna te su stoga slabo topiva u vodi, a topiva su u alkoholu, nepolarnim ili slabo polarnim otapalima, voskovima i uljima. Većinom su bezbojna ili blijedožuta, tekuća te imaju manju gustoću od vode, a po svom su sastavu složene mješavine koje sadrže mnogo različitih spojeva (Bowles, 2003).

Spojevi koji čine eterična ulja mirte mogu se razvrstati u kategorije: terpeni (monoterpeni ugljikovodici i seskviterpeni ugljikovodici), terpenoidi (oksigenirani monoterpeni i oksigenirani seskviterpeni) i fenilpropanoidi te ugljikovodici i oksigenirani spojevi (Aleksić i Knežević, 2014). Prema Giampieri i sur. (2020) u eteričnom ulju plodova mirte najzastupljeniji su 1,8-cineol, α -pinen, limonen, geranil acetat, linalol, estragol, α -terpinil acetat, mirtenil acetat, bergamoten i *E*-kariofilen, a strukture nekih od navedenih spojeva prikazane su na slici 4. Eterična ulja zastupljena u plodovima mirte prikupljenim na Visu

sastoje se od mirtenil acetata (12,2 – 33,2 %), 1,8-cineola i limonena (10,9 – 21,1 %), α -pinena (4,0 – 15,3 %) te linalola (4,7 – 7,7 %) (Jerković i sur., 2002).



Slika 4. Monoterpeni i seskviterpeni pronađeni u eteričnom ulju plodova mirte (prema Giampieri i sur., 2020)

Na udio i sastav eteričnih ulja prisutnih u plodovima mirte može utjecati nekoliko čimbenika, uključujući sortu, kemotip, geografsko područje, vrstu ekstrakcije i sušenja biljnih dijelova, razvojnu fazu biljke i fazu sazrijevanja plodova, uvjete skladištenja te okolišne čimbenike (Giampieri i sur., 2020; Kaya i sur., 2020).

Prema istraživanjima različitih autora, kemijskim spojevima prisutnim u eteričnom ulju mirte pripisuju se različita biološka djelovanja poput antimikrobnog, antifungalnog i antioksidacijskog (Hennia i sur., 2019), kao i protektivna djelovanja kod gastroezofagealnog refluksa, ulceroznog kolitisa i dijareje (Giampieri i sur., 2020).

1.2. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (eng. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE) zasniva se na primjeni superkritičnog fluida kao otapala. Svaki fluid karakteriziran je kritičnom točkom, koja je definirana kritičnom temperaturom (T_c) te kritičnim tlakom (p_c). Tvar poprima superkritična svojstva kada je iznad svoje kritične temperature i kritičnog tlaka. Otapala koja se koriste kao superkritični fluidi su etilen ($T_c = 9,4$ °C, $p_c = 5,04$ MPa), etan ($T_c = 32,3$ °C, $p_c = 4,87$ MPa), *n*-heksan ($T_c = 234,5$ °C, $p_c = 3,01$ MPa), metanol ($T_c = 239,6$ °C, $p_c = 8,09$ MPa), etanol ($T_c = 240,9$ °C, $p_c = 6,14$ MPa), voda ($T_c = 374,1$ °C, $p_c = 22,06$ MPa) i CO₂ ($T_c = 31,1$ °C, $p_c = 7,38$ MPa) (Sahena i sur., 2009).

Metoda superkritične ekstrakcije ekološki je prihvatljivija u odnosu na druge konvencionalne metode ekstrakcije otapalima ili enzimima te se primjenjuje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Superkritični fluidi (eng. *Supercritical Fluids*, SCF) imaju poželjna svojstva koja ih čine prikladnima za ekstrakcije različitih skupina kemijskih spojeva. Najvažnija svojstva SCF-a su njihova gustoća, viskoznost, difuzivnost, toplinski kapacitet te toplinska vodljivost. Visoka gustoća SCF-a doprinosi većoj topivosti ciljnih spojeva, a niska viskoznost omogućuje prodiranje fluida u čvrsti materijal te protok uz manje trenje. Promjena temperature i tlaka iznad kritičnih točaka utječe na svojstva SCF-a te poboljšava njihovu sposobnost prodiranja i ekstrakcije (Ahangari i sur., 2021). Zbog odsutnosti toksičnih ostataka otapala u konačnom proizvodu, među ostalim prednostima, superkritični fluidi posebno su korisni za ekstrakciju vrijednih bioaktivnih spojeva kao što su arome, bojila i druge biomolekule te za uklanjanje nepoželjnih spojeva kao što su organski zagađivači, toksini i pesticidi (Mendiola i sur., 2013).

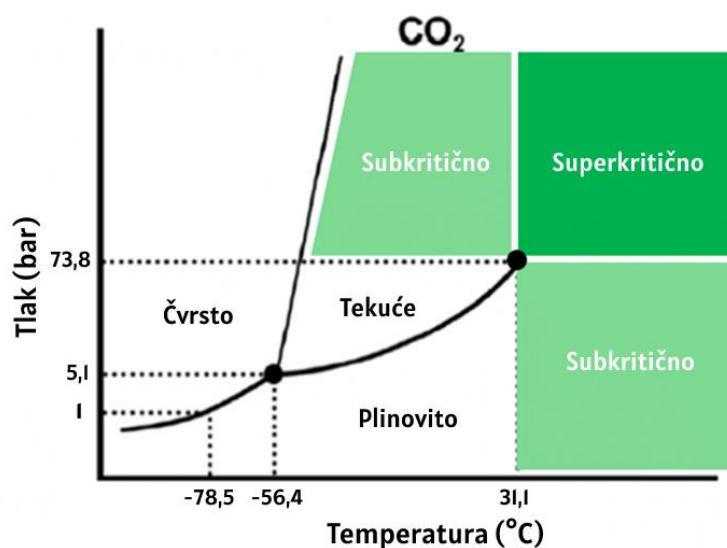
Prilikom ekstrakcije superkritičnim fluidima upotrebljavaju se kootapala. Kootapala su spojevi koji se dodaju primarnoj tekućini kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije. Primjerice, dodatkom različitih udjela metanola ili etanola kao kootapala za superkritičnu ekstrakciju ugljikovim dioksidom raste mogućnost ekstrakcije većeg broja polarnih komponenti iz medija koji se ekstrahira (Tyśkiewicz i sur., 2018).

Neke od glavnih prednosti SFE su da superkritični fluidi uz relativno nisku viskoznost imaju i visoku difuzivnost (difuzivnost SCF-a jest 10^{-4} cm² s⁻¹, a difuzivnost tekućih otapala jest 10^{-5} cm² s⁻¹), stoga SCF mogu prodrijeti u porozne čvrste materijale učinkovitije od tekućih otapala te mogu ostvariti mnogo brži prijenos mase što rezultira bržim ekstrakcijama. Prilikom superkritičnih ekstrakcija, snagom otapala može se manipulirati promjenom tlaka i/ili

temperature te se stoga može postići izrazito visoka selektivnost. Ova podesiva moć otapanja SCF-a osobito je korisna za ekstrakciju složenih uzoraka kao što su biljni materijali. Uglavnom se superkritične ekstrakcije provode pri niskim temperaturama te je stoga SFE idealna metoda za ekstrakciju termički labilnih spojeva. U SFE procesima velikih kapaciteta, fluid (najčešće CO₂) se može reciklirati ili ponovno upotrijebiti čime se smanjuje stvaranje otpada, što je važno s ekološkog aspekta (Grosso i sur., 2010).

1.2.1. Superkritični CO₂

Ugljikov dioksid poprima superkritična svojstva pri temperaturi iznad 31,1 °C te tlaku višem od 73,8 bar (slika 5) što ga čini idealnim otapalom za ekstrakciju toplinski osjetljivih materijala poput triacilglicerola. Štoviše, CO₂ je dobro otapalo za ekstrakciju spojeva topivih u lipidima i omogućuje visoka iskorištenja (Sahena i sur., 2009). Najčešće je korišteno superkritično otapalo koje se primjenjuje u prehrambenoj industriji jer je jeftin, lako dostupan, siguran za rukovanje te fiziološki bezopasan u niskim koncentracijama u kojima je prisutan u hrani (Brunner, 2005).



Slika 5. Fazni dijagram superkritičnog CO₂ (prema Brunner, 2005)

Superkritični CO₂ otapa nepolarne ili blago polarne spojeve, ima visoku sposobnost otapanja spojeva male molekulske mase te smanjenu sposobnost otapanja spojeva s višom molekulskom masom. Osim navedenoga, pokazuje visok afinitet prema oksigeniranim organskim spojevima srednje molekulske mase te nema mogućnost otapanja proteina, ugljikohidrata i mineralnih soli. Povišenjem tlaka pokazuje sposobnost odvajanja manje hlapljivih spojeva koji imaju veću molekulsku masu i/ili su polarni (Ahmad i sur., 2019).

1.2.2. Optimizacija SFE i utjecaj uvjeta scCO₂ ekstrakcije na iskorištenje

Tijekom osmišljanja i optimizacije procesa superkritične ekstrakcije potrebno je poznavati karakteristike sirovine poput početne koncentracije otopljene tvari, udjela vode te potrebe za predobradom sirovine sušenjem i mljevenjem. Osim navedenoga, nužno je prilagoditi parametre koji se primjenjuju prilikom ekstrakcije, a to su tlak, temperatura, brzina protoka otapala te podaci o ravnoteži tekuće faze (Ahangari i sur., 2021).

Prilikom pripreme uzorka za ekstrakciju, pažnju treba posvetiti veličini čestica koja definira površinu uzorka izloženog scCO₂, a na učinkovitost ekstrakcije utječe i udio vode u uzorku. Visok udio vode smanjuje kontakt scCO₂ s uzorkom zbog pastozne konzistencije uzoraka, a voda djeluje kao prepreka difuziji scCO₂ u materijal kao i difuziji lipida iz njega. Stoga se uzorci s visokim udjelom vode obično prije ekstrakcije scCO₂ suše klasičnim metodama ili sušenjem zamrzavanjem kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije (Laboureur i sur., 2015).

Kao i kod ostalih SCF, pri konstantnoj temperaturi porastom tlaka moć otapanja CO₂ raste te se povećava iskorištenje ekstrakcije. U blizini kritične točke, povećanjem tlaka dolazi do eksponencijalnog povećanja topljivosti, pri čemu komponente s višim tlakom pare imaju veću topljivost. Topljivost većine komponenti u scCO₂ također raste s povećanjem gustoće, što se isto postiže povećanjem tlaka ekstrakcije. Nadalje, na topljivost komponenti utječe i polarnost te molekulska masa komponenti kao i temperatura ekstrakcije. Slično općenitom principu, u SFE procesima s CO₂, topljivost komponenti se smanjuje kako se polarnost i/ili molekularna masa otopljenih tvari povećava. Povećanje temperature, pri konstantnom tlaku, potiče dva suprotna učinka: smanjuje snagu otapala CO₂ smanjenjem gustoće, a s druge strane povećava tlak pare otopljenih tvari koje lakše mogu penetrirati u superkritičnu fazu. Uravnoteženi učinak na topljivost otopljene tvari u superkritičnom otapalu stoga ovisi o radnom tlaku. U blizini kritičnog tlaka prevladava učinak gustoće tekućine, tako da umjereno povećanje temperature dovodi do velikog smanjenja gustoće tekućine, a time i do smanjenja topljivosti otopljene tvari. Međutim, pri visokim tlakovima prevladava porast tlaka pare pa se topljivost povećava s temperaturom. Navedena pojava se naziva retrogradno ponašanje topljivosti čvrste tvari. Nakon odabira tlaka i temperature ekstrakcije, važan je i utjecaj protoka superkritičnog fluida na iskorištenje ekstrakcije. Brzina protoka otapala mora biti dovoljno visoka da osigura dobar prinos ekstrakcije u kratkom vremenu, ali također treba omogućiti dovoljno vrijeme kontakta između otapala i otopljenih tvari (Mendiola i sur., 2013).

1.2.3. Superkrična ekstrakcija lipofilnog ekstrakta iz plodova mirte

Pereira i sur. (2016) navode kako su optimalni uvjeti za ekstrakciju eteričnog ulja iz plodova mirte temperatura od 45 °C, tlak od 230 bar, protok scCO₂ od 0,3 kg h⁻¹ (5 g min⁻¹) te protok kootapala (etanola) od 0,09 kg h⁻¹. Nadalje, navode kako je potrebno načiniti predtretman plodova mirte tako da ih se osuši na zraku, bez prisutnosti sunčeve svjetlosti te ih se samelje.

Prinos eteričnog ulja plodova mirte ekstrahiranih na ovaj način iznosi 0,07 – 0,11 %. S druge strane, Zermane i sur. (2014) optimizacijom uvjeta scCO₂ ekstrakcije listova mirte utvrdili su da se najveće iskorištenje eteričnog ulja od 4,89 % dobiva pri temperaturi od 40 °C, tlaku 300 bara i promjeru manjem od 0,315 mm.

Također, Pereira i sur. (2022) navode da je scCO₂ ekstrakt listova mirte siguran za primjenu i može umanjiti genotoksična oštećenja izazvana slobodnim radikalima.

Detaljnijom pretragom dostupne literature nije pronađen niti jedan znanstveni rad koji iznosi podatke o superkričnoj ekstrakciji lipofilnih spojeva iz plodova mirte, stoga ovaj znanstveni rad predstavlja prvu objavu navedenih podataka.

Istraživanjem ekstrakcije plodova pasjeg trna, Pavlović i sur. (2016) utvrdili su da u pogači nakon scCO₂ ekstrakcije zaostaje svega 0,58 % ulja. Autori stoga zaključuju kako je upotrebom scCO₂ moguće gotovo u potpunosti ekstrahirati lipide iz ovog biljnog materijala pri čemu je pogaču, zbog izostanka toksičnih spojeva, moguće koristiti i za daljnje ekstrakcije.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Zahvaljujući širokom spektru kemijskih spojeva s bioaktivnim djelovanjem, listovi i plodovi mirte (*Myrtus communis* L.) od davnina se koriste u tradicionalnoj medicini kod različitih respiratornih, gastrointestinalnih, urinarnih i dermatoloških poremećaja. Ova djelovanja potvrđena su i brojnim znanstvenim istraživanjima koja također ističu antioksidacijsko, antibakterijsko i antifungalno djelovanje ekstrakata mirte (Giampieri i sur., 2020).

Obzirom na razlike bioaktivnih spojeva u kemijskim strukturama, vezama unutar biljnog matriksa i polarnosti, za njihovu izolaciju koriste se različite metode ekstrakcije. Jedna od naprednih tehnika ekstrakcije koja u posljednje vrijeme ulazi u širu komercijalnu primjenu je i ekstrakcija superkričnim CO₂. Ova tehnika često je isticana kao dobro rješenje za ekstrakciju različitih, posebice lipofilnih spojeva, obzirom na očuvanje funkcionalnih svojstava, dostupnost CO₂ i izostanak rezidua otapala u ekstraktima (Ahmad i sur., 2019). Detaljnim pregledom dostupne literature utvrđeno je kako je učinkovitost ekstrakcije superkričnim CO₂ do sad ispitana u nekoliko istraživanja provedenih na listu mirte u kojima je praćena ekstrakcija polifenolnih i hlapljivih spojeva npr. Pereira i sur. (2016), Zermane i sur. (2014) i Ghasemi i sur. (2011). S druge strane, primjena scCO₂ ekstrakcije na plodovima mirte opisana je samo u jednom znanstvenom radu (Pereira i sur., 2016) koji se također fokusira na polifenolne spojeve, dok je skupina lipofilnih spojeva u potpunosti zapostavljena. Nadalje, bez obzira na njihovu iznimnu bioaktivnu vrijednost, pregledom literature nije pronađeno niti jedno istraživanje koje opisuje udio i sastav fitosterola u plodovima mirte.

Zbog navedenog nedostatka literaturnih podataka opći cilj rada bio je istražiti bioaktivni potencijal ekstrakata plodova mirte s naglaskom na lipofilne spojeve (masne kiseline, fitosterole i hlapljive spojeve) i utvrditi utjecaj uvjeta ekstrakcije superkričnim CO₂ (temperatura, tlak i protok) na iskorištenje ekstrakta i prinose navedenih spojeva. Nadalje, kao specifični cilj definirana je procjena prikladnosti primjene metode odzivnih površina (RSM) uz Box-Behnkenov dizajn eksperimenta u optimiranju ove ekstrakcije. Preporučeni optimalni procesni uvjeti postaviti će temelj za dobivanje formulacija ekstrakata specifičnih sastava bioaktivnih komponenti koji se mogu koristiti u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Plodovi mirte

U istraživačkom dijelu rada upotrijebljeni su plodovi mirte (lat. *Myrtus communis* L.) koji su prikupljeni na ekološki čistom području Mljeta u veljači 2021. godine. Plodovi su u svježem obliku transportirani u Zagreb te podvrgnuti postupku sušenja pri sobnoj temperaturi (21 ± 1 °C). Uzorci osušenih plodova mirte čuvali su se u zatvorenim staklenim posudama do provođenja pokusa te su prije ekstrakcije superkritičnim CO₂ dodatno sušeni u sušioniku.

3.1.2. Aparatura i kemikalije

Aparatura

- Centrifuga model Rotina 35, Hettich Zentrifugen (Westphalia, Njemačka)
- Električni mlin Sencor (Ričany, Republika Češka)
- Laboratorijska vaga model ABP 200-5DM, Kern (Balingen, Njemačka)
- Rotavapor Büchi (Flawil, Švicarska)
- Sušionik Inko (Zagreb, Hrvatska)
- Tresilica LLG-Vortex UnitEXER (Meckenheim, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex (Ettenheim, Njemačka)
- Uređaj za plinsku kromatografiju, Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD)
- Uređaj za superkritičnu ekstrakciju S51 Extratex-S.F.I (Neuves-Maisons, Francuska)
- Uređaj za određivanje udjela suhe tvari Ohaus (New York, SAD)

Kemikalije

- Aluminijev oksid (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- 40 % NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- Dietileter (Carlo Erba, Emmendingen, Njemačka)
- Etanol (96 %) (J. T. Baker, Avantor, Pennsylvania, SAD)
- Etil-acetat (Carlo Erba, Emmendingen, Njemačka)
- Etanolna otopina kalijevog hidroksida ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$)

Priprema: odvaže se 3 g kalijevog hidroksida, otopi u 5 mL vode i razrijedi etanolom do 100 mL.

- Interni standard, α -kolestanol (1,0 mg mL⁻¹, Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka)

Priprema: odvaže se 0,1 g α -kolestanola i razrijedi acetonom do 100 mL.

- Heksan (J. T. Baker, Avantor, Pennsylvania, SAD)
- Izooktan (J. T. Baker, Avantor, Pennsylvania, SAD)
- Izopropanol (J. T. Baker, Avantor, Pennsylvania, SAD)
- Kalijev hidroksid (J. T. Baker, Avantor, Pennsylvania, SAD)
- *n*-heksan (J. T. Baker, Avantor, Pennsylvania, SAD)
- Reagens za sililiranje (mješavina piridina, heksametilidisilazana trimetilklorsilana) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Standardna smjesa 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24, Supelco)
- Standardi fitosterola: kampesterol, stigmasterol i β -sitosterol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Standardi eteričnih ulja: Komercijalni standardi za (+)- α -pinen, kamfen, (-)- β -pinen, (R)-(-)- α -felandren, 3-karen, *p*-cimen, *o*-cimen, γ -terpinen, 1,8-cineol, mirtenol i mirtenil acetat te mješavina α -fenhil acetata, (+)-karvona, geraniola, karvakrola i standardne otopine alkana C7-C30 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD); mircen, butil butirat, linalool, α -terpineol i eugenol (Merck, Darmstadt, Njemačka); R-(+)-limonen i nerol (Fluka Analytical, München, Njemačka); α -terpinen (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka)

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija superkritičnim CO₂

Plodovi mirte sušeni su 18 sati u sušioniku pri 45 °C do udjela suhe tvari od 96,23 %. Na taj način osušeni plodovi usitnjeni su u laboratorijskom električnom mlinu Sencor. Nakon usitnjavanja plodovi su prosijani kroz sito veličine otvora 1,5 mm te čuvani staklenoj posudi u hladnjaku pri 4 °C do provedbe ekstrakcije superkritičnim CO₂. Ekstrakcija je provedena na uređaju za superkritičnu ekstrakciju S51 Extratex-S.F.I prikazanom na slici 6. U spremnik za ekstrakciju superkritičnim CO₂ doda se 30 ± 0,5 g prosijanih osušanih plodova mirte. Spremnik se potom pričvrsti na za to predviđeno mjesto u ekstraktoru te se podese parametri protoka, tlaka i temperature za pojedinu ekstrakciju dobiveni prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu prikazanom u tablici 4 (poglavlje 4.2.5.). Pojedina ekstrakcija provodi se u trajanju od 2 sata, a po završetku ekstrakcije ekstrakt iz separatora prikuplja se u prethodno izvagane staklene vijale i čuva pri -18 °C do daljnje analize. Izgled dobivenog ekstrakta prikazan je na slici 7.



Slika 6. Uređaj za superkritičnu ekstrakciju S51 Extratex-S.F.I (vlastita fotografija)

Dobivena masa ekstrakta određena je upotrebom laboratorijske vage modela ABP 200-5DM Kern s preciznošću od ± 0,0001 g. Po završetku pojedine ekstrakcije, uređaj se 20 minuta pročišćuje s 20 mL izopropanola pri protoku od 30 g min⁻¹. Izopropanol otapa ekstrakt zaostao u cjevovodima uređaja te se isti upari na rotavaporu pri 40 °C, a masa zaostalog ekstrakta odredi se vaganjem i pribroji masi čistog ekstrakta te se na taj način dobije ukupna masa ekstrakta radi određivanja iskorištenja. Iskorištenje ekstrakcije računa se prema izrazu [1]:

$$\text{Iskorištenje (\%)} = \frac{m_{\text{ekstrakta}}}{m_{\text{uzorka}}} \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

$m_{\text{ekstrakta}}$ = ukupna masa (g) ekstrakta

m_{uzorka} = masa (g) samljevenih osušenih plodova mirte korištena za ekstrakciju



Slika 7. Superkritični ekstrakt mirte (vlastita fotografija)

3.2.2. Određivanje sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom

Sastav masnih kiselina određuje se plinskom kromatografijom (GC) prije koje se masne kiseline prevode u svoje metilne estere metilacijom s metanolnom otopinom kalijevog hidroksida.

Priprema metilnih estera masnih kiselina

Prema metodi ISO 12966-2:2017 metilni esteri masnih kiselina određuju se na način da se najprije odvaži $0,1 \pm 0,0001$ mg uzorka scCO_2 ekstrakta plodova mirte koji se zatim otopi u 2 mL izooktana u epruveti volumena 10 mL s čepom na navoj. Potom se u epruvetu otpipetira 100 μL metanolne otopine KOH ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$) te se epruveta snažno protrese tijekom jedne minute. Epruveta s dodanim reagensima ostavi se na sobnoj temperaturi kako bi nastupila reakcija. Nakon 2 minute u reakcijsku smjesu otpipetira se 2 mL otopine NaCl (40 g NaCl-a u 100 mL vode) te se smjesa malo protrese. Izooktanski sloj se odvoji te se u njega doda bezvodni natrijev hidrogensulfat u količini od 1 g kako bi se uklonila zaostala voda te se smjesa protrese. Bistra otopina prebaci se u vijalu te se tako pripremljen uzorak analizira na plinskom kromatografu.

Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom

Pripremljeni uzorci analiziraju se prema metodi ISO 12966-4:2015 pomoću plinskog kromatografa Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) opremljenog sustavom za injektiranje s 8 mjesta i plameno-ionizacijskim detektorom (FID) spojenim na računalo s instaliranim ChemStation softverom (Agilent, Santa Clara, SAD). Uvjeti analize zadani su nakon provedenih preliminarnih ispitivanja prema kojima su odabrani optimalni uvjeti (temperatura kolone, detektora i injektora, protok plina te količina injektiranog uzorka) prikazani u tablici 1. Identifikacija masnih kiselina vrši se usporedbom retencijskog vremena metilnih estera pojedine masne kiseline s retencijskim vremenima metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 – C24, Supelco) poznatog sastava.

Tablica 1. Uvjeti rada plinskog kromatografa za određivanje sastava masnih kiselina

KOLONA	DB-23 kapilarna kolona (Agilent, Santa Clara, SAD); 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm debljina filma
STACIONARNA FAZA (SF)	(50 %-cijanopropil)-metilpolisiloksan
TEMPERATURNI PROGRAM KOLONE	60 do 220 °C uz 7 °C min ⁻¹ ; 220 °C 17 min
PLIN NOSITELJ	Helij
PROTOK PLINA NOSITELJA	1,5 mL min ⁻¹
TEMPERATURA INJEKTORA	250 °C
SPLIT	60 : 1
TEMPERATURA DETEKTORA	280 °C
KOLIČINA INJEKTIRANOG UZORKA	1,0 µL
TRAJANJE ANALIZE	39,86 min

3.2.3. Određivanje udjela i sastava fitosterola

Modifikacija metode HRN EN ISO 12228:2014-1 upotrijebljena je za određivanje udjela i sastava fitosterola u uzorcima lipofilnog ekstrakta plodova mirte.

Princip metode

Metoda je zasnovana na dodavanju α -kolestanola (unutarnji standard) $scCO_2$ ekstraktu plodova mirte dobivenom superkričnom ekstrakcijom s CO_2 . Potom se uzorku dodaje i etanolna otopina KOH kako bi nastupila saponifikacija te se neosapunjiva frakcija ekstrahira dodatkom dietiletera na koloni koja je ispunjena aluminijevim oksidom. Aluminijev oksid upotrebljava se kako bi zadržao anione masnih kiselina i propustio negliceridne komponente. Pomoću tankoslojne kromatografije (TLC) iz neosapunjive frakcije na bazičnom silikagelu izdvaja se sterolna frakcija koja se potom prevodi u trimetilsililestere te analizira plinskim kromatografom s plameno ionizacijskim detektorom (FID - detektor).

Priprema neosapunjive frakcije

Neosapunjiva frakcija priprema se na način da se u okruglu tikvicu s ravnim dnom (50 mL) izvaže $0,250 \pm 0,001$ g lipofilnog ekstrakta plodova mirte. Potom se u tikvicu s izvaganim uzorkom doda 1 mL prethodno pripremljenog α -kolestanola ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$), 5 mL KOH ($c = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$) i dvije do tri kuglice za vrenje. Tikvica se zatim spoji na povratno hladilo i zagrijava na grijačoj ploči te se ostavi da vrije točno 15 minuta, nakon čega se odvoji od zračnog hladila te se pomoću pipete doda 5 mL etanola. Kada je tikvica potpuno ohlađena, slijedi kromatografija u stupcu.

Priprema kolone za kromatografiju u stupcu

Kolona za kromatografiju u stupcu dugačka 25 cm, unutarnjeg promjera 1,5 cm sa sinterom na dnu pričvrsti se za metalni stalak. Vata se postavi na dno kolone i doda se malo etanola kako bi vata prionula uz sinter te se potom pomoću staklenog štapića istisne zrak kako ne bi zaostao u vati. Odvažuje se 10 g aluminijevog oksida koji se uz 20 mL etanola prenese u kolonu za kromatografiju. Potrebno je što pažljivije provesti ovaj korak kako ne bi nastale pukotine u stupcu aluminijevog oksida. Višak etanola propusti se iz kolone na način da razina etanola bude 0,5 cm iznad razine vrha stupca aluminijevog oksida.

Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom u stupcu

Ohlađen uzorak se pomoću pipete iz tikvice prebaci na pripremljenu kolonu. Eluiranje traje sve dok otopina ne dosegne vrh sloja aluminijevog oksida. Eluat se skuplja u tikvicu s okruglim dnom od 100 mL. U kolonu za kromatografiju pipetom se doda 5 mL etanola te se nastavi proces eluiranja. Tikvica u kojoj se nalazio uzorak, ispere se s 10 mL dietiletera te se prenese na kolonu. Nakon što dietileter dosegne vrh sloja aluminijevog oksida, na kolonu se

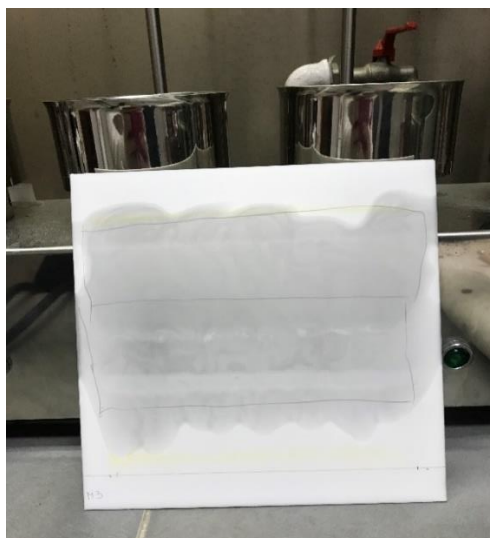
doda još 20 mL dietiletera (u dva navrata po 10 mL svaki) kojim se završava postupak eluiranja. Na rotavaporu se dobiveni eluat pri 40 °C otpari do suhog, kako je prikazano na slici 8.



Slika 8. Uparavanje na rotavaporu (vlastita fotografija)

Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom

U 2 mL dietiletera otopi se uzorak neosapunjive frakcije te se pomoću mikropipete nanese na gotovu ploču sa silikagelom (Silikagel F254, veličine 20 x 20 cm, debljine 0,25 mm) u ravnoj liniji 2 cm od donjeg ruba ploče. Na istoj se visini ispred ove linije nanese 2 - 3 μ L referentne otopine α -kolestanola s ciljem identifikacije fitosterola nakon što se razvije kromatogram. Potom se ploča postavi u kadu za razvijanje koja sadrži 100 mL otopine heksan : dietileter (1:1, v/v) te se poklopi poklopcem. Kromatogram se razvija pri sobnoj temperaturi, do trenutka kad linija otapala dosegne visinu od 1 cm ispod gornjeg ruba ploče. Nakon toga ploča se suši u digestoru te kada se osuši, ravnomjerno se popraska metanolom, a traka fitosterola prepoznaje se po referentnoj mrlji. Olovkom se iscrtaju rubovi mrlje, a metalnom špatulom sastruže se silikagel (slika 9) unutar označenih rubova te se prebaci u lijevak s filter papirom. Doda se 0,5 mL 96 %-tne otopine etanola te se ispiru tri puta s 5 mL dietiletera. U tikvici s okruglim dnom od 50 mL skuplja se sterolna frakcija. Kada se skupi sterolna frakcija, otparava se na rotavaporu pri temperaturi od 40 °C do volumena od 1 mL. Koncentrat se potom prenese u epruvetu te se pod strujom dušika osuši dok ne postane suh. Tikvica u kojoj je prethodno skupljana sterolna frakcija ispiru se s 0,5 mL dietiletera, a sadržaj se prebaci u epruvetu i suši pod strujom dušika. Dobiveni suhi ostatak predstavlja sterolnu frakciju.



Slika 9. Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom – ploča s trakom fitosterola (vlastita fotografija)

Priprema trimetilsililestera:

U epruvetu sa sterolnom frakcijom se na svaki miligram frakcije doda 50 μL reagensa za sililiranje koji jest mješavine piridina, heksametildisilazana i trimetilklorsilana u omjeru 5:2:1 (V:V:V). Potom se epruveta poklopi te protrese na vorteksu do potpunog otapanja fitosterola te stavi zagrijavati u sušionik pri temperaturi od 105 $^{\circ}\text{C}$ tijekom 15 minuta. Nakon sušenja, epruveta se ohladi u eksikatoru te centrifugira 10 min pri 3000 okretaja po minuti. Zatim se bistri supernatant odvoji od taloga te prenese u vijale od 2 mL unutar kojih se nalazi insert od 100 μL .

Analiza sastava fitosterola plinskom kromatografijom:

Na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) analizira se pripremljeni uzorak. Kromatograf sadrži sustav za injektiranje s 8 mjesta i plameno-ionizacijski detektor (FID) spojen na računalo s instaliranim ChemStation softverom (Agilent, Santa Clara, SAD). Po završetku preliminarnih ispitivanja prema kojima su odabrani optimalni uvjeti (protok plina, temperatura kolone, detektora i injektora te količina injektiranog uzorka), zadani su slijedeći uvjeti analize navedeni u tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti rada plinskog kromatografa za određivanje udjela fitosterola

KOLONA	DB-17 kapilarna kolona (Agilent, Santa Clara, SAD); 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm debljina filma
STACIONARNA FAZA (SF)	(50 %-fenil)-metilpolisiloksan
TEMPERATURNI PROGRAM KOLONE	180 °C do 270 °C uz 6 °C min ⁻¹ ; 270 °C 30 min
PLIN NOSITELJ	Helij
PROTOK PLINA NOSITELJA	1,5 mL min ⁻¹
TEMPERATURA INJEKTORA	290 °C
SPLIT	13,3 : 1
TEMPERATURA DETEKTORA	250 °C
KOLIČINA INJEKTIRANOG UZORKA	1,0 µL
TRAJANJE ANALIZE	45 min

Identifikacija i kvantifikacija pikova:

Na temelju dobivenih retencijskih vremena (RT) te usporedbom s retencijskim vremenima trimetilsililestera standardnih mješavina fitosterola analiziranih pod jednakim uvjetima raspoznaju se pojedinačni pikovi fitosterola. Za identifikaciju drugih pikova fitosterola, plinski kromatograf spojen je s masenim detektorom 5973 (Agilent). Prijenosna linija održavana je na 280 °C, MS izvor na 230 °C i temperatura kvadrupola na 150 °C, dok je raspon skeniranja masenog spektra postavljen na 30-550 (m/z). Fitosteroli su identificirani putem biblioteke podataka NIST17 i relativnog vremena zadržavanja iz literature Yang i sur. (2001).

Udio pojedinačnog fitosterola izražava se u mg kg⁻¹ te se izračuna prema jednadžbi [2]:

$$\text{Udio fitosterola (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{A_s \times 1000}{A_\alpha \times m} \quad [2]$$

gdje je:

A_s = površina pika identificiranog sterola

A_a = površina pika internog standarda (α -kolestanola)

m = masa uzorka $scCO_2$ ekstrakta plodova mirte

Udio ukupnih fitosterola potom se računa i izražava se kao suma udjela pojedinačnih fitosterola. Iz rezultata za udio ukupnih fitosterola i iskorištenja ekstrakcije izračunat je i prinos fitosterola izražen u $mg\ kg^{-1}$ plodova mirte.

3.2.4. Određivanje udjela hlapljivih spojeva

Za pripremu uzorka za analizu plinskom kromatografijom (GC) doda se $10\ \mu L\ scCO_2$ ekstrakta mirte, $100\ \mu L$ internog standarda (nerol, $c = 10,6500\ mg\ mL^{-1}$) i $890\ \mu L$ *n*-heksana (HPLC čistoća, 95 %) u staklenu vijalu prema Repajić i sur. (2021). Tako pripremljeni uzorak ulja analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) korištenjem Agilent Technologies 5973 inertnog maseno-selektivnog detektora prema uvjetima prikazanim u tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti rada plinskog kromatografa za određivanje udjela hlapljivih spojeva

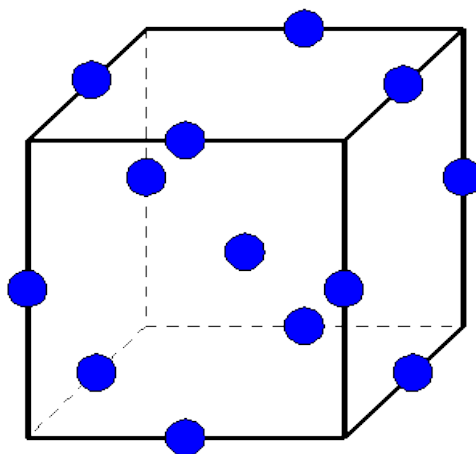
KOLONA	HP-5MS kapilarna kolona (Agilent, Santa Clara, SAD); 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm debljina filma
STACIONARNA FAZA (SF)	5 % fenilmetilsiloksan
TEMPERATURNI PROGRAM KOLONE	60 °C 60 do 145 °C uz 3 °C min^{-1} ; 145 do 250 °C uz 30 °C min^{-1} ; 250 °C 3 min
PLIN NOSITELJ	Helij
PROTOK PLINA NOSITELJA	1,0 $mL\ min^{-1}$
TEMPERATURA INJEKTORA	250 °C
SPLIT	100 : 1
KOLIČINA INJEKTIRANOG UZORKA	1,0 μL
TRAJANJE ANALIZE	34,83 min

Prijenosna linija održavana je na 280 °C, MS izvor na 230 °C i temperatura kvadrupola na 150 °C, dok je raspon skeniranja masenog spektra postavljen na 30-550 (m/z). Hlapljivi spojevi identificirani su usporedbom retencijskog vremena i masenih spektara (m/z) ispitivanih spojeva s retencijskim vremenima i masenim spektrima komercijalnih standarda te usporedbom dobivenih masenih spektara s onima u bazama podataka NIST17, pomoću MSD ChemStation softvera za analizu podataka.

Kvantitativne vrijednosti za svaki hlapljivi spoj izračunate su iz kalibracijskih jednadžbi standardnih spojeva uz korekciju s internim standardom. Udio ukupnih hlapljivih spojeva izračunat je kao suma udjela pojedinačnih fitosterola te je pomoću njega izračunat i prinos hlapljivih spojeva izražen u mg kg⁻¹ plodova mirte.

3.2.5. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka upotrijebljen je programski sustav Design-Expert 10.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, SAD) uz upotrebu Box-Behnkenovog dizajna. Box-Behnkenov dizajn neovisni je kvadratni dizajn koji uključuje tri varijable i tri faktorijalne razine. U ovom dizajnu kombinacije faktora raspodijeljene su u središtu te na srednjim rubovima procesnog prostora, kako je prikazano na slici 10.



Slika 10. Box-Behnkenov dizajn s tri faktora (Ait-Amir i sur., 2020)

Svaki ispitivani faktor ispitan je na tri razine (-1, 0, 1), a centralna točka ispitana je u 5 ponavljanja što ukupno iznosi 17 pokusa. Nivoi za nezavisne varijable odabrani su na temelju literaturnih podataka i preliminarnih pokusa (podaci nisu prikazani), a uključuju temperaturu (40, 50 i 60 °C), tlak (200, 300 i 400 bar) te protok (20, 30 i 40 g min⁻¹), kako je prikazano u tablici 4. Svi analitički podaci prikupljeni su u dva paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standarda devijacija.

Tablica 4. Eksperimentalni dizajn pokusa ekstrakcije lipofilnog ekstrakta plodova mirte primjenom scCO₂

Nezavisna varijabla (faktor)	Simbol	Nivoi nezavisne varijable		
		Nizak (-1)	Srednji (0)	Visok (1)
Temperatura (°C)	X ₁	40	50	60
Tlak (bar)	X ₂	200	300	400
Protok CO ₂ (g min ⁻¹)	X ₃	20	30	40

U svrhu optimiranja uvjeta scCO₂ ekstrakcije upotrijebljena je metodologija odzivnih površina – RSM (eng. *Response Surface Methodology*). Regresijski modeli za promatrane zavisne varijable izračunati su sukladno jednadžbi [3]:

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

gdje je:

Y - predviđeni rezultat odnosno vrijednost zavisne varijable

β_0 - fiksni koeficijent

β_i , β_{ii} i β_{ij} linearni, kvadratni i koeficijent interakcije

X_i...X_j - vrijednost nezavisne, kontrolirane varijable

Kao zavisne varijable promatrani su iskorištenje (%), udio PUFA (%) te prinos fitosterola (mg kg⁻¹) i prinos hlapljivih spojeva (mg kg⁻¹). Rezultati modeliranja prikazani su i konturnim dijagramima koji prikazuju utjecaj dva faktora, dok je treći faktor postavljen na vrijednost centralne točke. Prikladnost modela ispitana je i provjerena pomoću nekoliko uobičajenih statističkih parametara tj. određivanjem koeficijenta determinacije (R²) i nedostatka modela (eng. *lack of fit*) provođenjem F-testa.

Za utvrđivanje značajnosti modela i utjecaja pojedinih faktora (temperatura, protok i tlak) provedena je analiza varijance (ANOVA). Za primjenjene testove postavljena je razina pouzdanosti od 95%. Navedene zavisne varijable uključene su i u optimizaciju uvjeta scCO₂ ekstrakcije koja je provedena metodom poželjnosti na način da su optimalni uvjeti određeni zasebno za svaku varijablu.

4. REZULTATI

U ovom istraživanju načinjeno je određivanje utjecaja te optimizacija uvjeta ekstrakcije scCO₂ za izolaciju lipofilnog ekstrakta iz plodova mirte. Tijekom istraživanja kao nezavisne varijable (faktori) promatrali su se najznačajniji uvjeti scCO₂ ekstrakcije: (i) temperatura (40, 50 i 60 °C), (ii) tlak (200, 300 i 400 bar) i (iii) protok (20, 30 i 40 g min⁻¹). Njihovi rasponi određeni su preliminarnim istraživanjem, a prema Box-Benken dizajnu provedeno je ukupno 17 eksperimenata. Iskorištenje ekstrakcije određeno je za svaki eksperiment, a u dobivenim su ekstraktima pomoću plinske kromatografije ispitani sastav masnih kiselina te udio i sastav fitosterola i hlapljivih spojeva. Zbog velikog broja kemijskih spojeva određenih plinskom kromatografijom, rezultati sastava pojedinih skupina spojeva korišteni su za evaluaciju bioaktivnog potencijala scCO₂ ekstrakata plodova mirte, dok su za utvrđivanje utjecaja uvjeta ekstrakcije kao zavisne varijable odabrani: (i) iskorištenje ekstrakcije, (ii) udio ukupnih PUFA, (iii) prinos sterola i (iv) prinos hlapljivih spojeva. Na osnovu dobivenih rezultata za navedene varijable izrađeni su matematički modeli te je provedena njihova evaluacija kako bi se odabrali oni koji najbolje aproksimiraju eksperimentalne vrijednosti. Za utvrđivanje značajnosti utjecaja pojedinih nezavisnih varijabli i njihovih interakcija primijenjena je ANOVA. U nastavku statističke obrade načinjeno je optimiranje uvjeta scCO₂ ekstrakcije u svrhu postizanja maksimalnog iskorištenja lipofilnog ekstrakta te udjela PUFA, fitosterola i hlapljivih spojeva kao najvažnijih bioaktivnih molekula u ekstraktima plodova mirte.

4.1. ISKORIŠTENJE LIPOFILNOG EKSTRAKTA

U tablici 5 prikazano je iskorištenje lipofilnog ekstrakta (%) dobiveno u eksperimentima scCO₂ ekstrakcije plodova mirte provedenim prema Box-Behnkenovom eksperimentalnom dizajnu uz variranje vrijednosti temperature, tlaka i protoka ekstrakcije.

Tablica 5. Iskorištenje lipofilnog ekstrakta (%) u eksperimentima scCO₂ ekstrakcije plodova mirte

Eksperiment	X₁: Temperatura (°C)	X₂: Tlak (bar)	X₃: Protok (g min⁻¹)	Iskorištenje ekstrakcije (%)
1	50	300	30	5,26
2	60	300	20	5,33
3	60	200	30	5,49
4	60	300	40	5,92
5	50	300	30	5,18
6	50	200	20	5,10
7	60	400	30	5,59
8	50	300	30	5,03
9	50	400	20	5,37
10	40	400	30	4,95
11	50	300	30	5,27
12	50	400	40	5,05
13	40	200	30	4,75
14	50	300	30	5,19
15	50	200	40	5,20
16	40	300	20	4,77
17	40	300	40	5,01
Prosjek				5,20

4.2. SASTAV MASNIH KISELINA

U tablicama 6 i 7 prikazan je sastav zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u scCO₂ ekstraktima plodova mirte. Sastav masnih kiselina određen je plinskom kromatografijom (GC) prije koje su masne kiseline prevedene u svoje metilne estere.

Tablica 6. Sastav (%) zasićenih masnih kiselina (SFA) u scCO₂ ekstraktima plodova mirte

Eksperiment*	C11:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C22:0	C23:0	C24:0	Σ SFA
1	0,43±0,00	0,02±0,01	8,41±0,02	0,26±0,01	3,25±0,01	0,43±0,00	0,32±0,03	0,31±0,06	0,08±0,00	13,88±0,14
2	1,72±0,00	0,13±0,10	9,14±0,12	0,21±0,01	0,02±0,00	0,48±0,00	0,54±0,07	1,99±0,07	0,20±0,00	15,07±0,40
3	1,27±0,00	0,16±0,13	8,64±0,04	0,18±0,07	3,30±0,01	0,50±0,00	0,45±0,01	2,45±0,19	0,22±0,01	17,74±0,49
4	0,89±0,00	0,11±0,05	8,54±0,02	0,19±0,03	3,25±0,00	0,47±0,02	0,28±0,03	1,31±0,06	0,15±0,01	15,63±0,22
5	0,2±0,00	0,08±0,00	8,36±0,01	0,12±0,01	3,24±0,00	0,43±0,00	0,08±0,00	0,34±0,03	0,06±0,01	13,17±0,06
6	0,78±0,01	0,13±0,09	8,61±0,01	0,28±0,03	3,26±0,07	0,43±0,06	0,19±0,00	0,64±0,01	0,33±0,05	14,92±0,35
7	0,76±0,01	0,28±0,01	8,69±0,11	0,40±0,05	3,39±0,14	0,52±0,06	0,22±0,01	1,20±0,01	0,37±0,03	16,19±0,44
8	0,26±0,00	0,05±0,02	8,40±0,02	0,12±0,01	3,22±0,02	0,41±0,01	0,10±0,00	0,33±0,02	0,17±0,02	13,33±0,11
9	1,35±0,04	0,29±0,06	8,85±0,09	0,32±0,02	3,25±0,21	0,50±0,07	nd	1,18±0,02	0,28±0,02	16,50±0,56
10	0,23±0,00	0,05±0,00	8,40±0,02	0,10±0,01	3,18±0,01	0,40±0,00	0,01±0,01	0,28±0,05	0,05±0,03	12,88±0,14
11	0,24±0,00	0,06±0,01	8,32±0,04	0,14±0,06	3,30±0,11	0,43±0,02	nd	0,33±0,01	0,02±0,00	13,05±0,26
12	0,21±0,00	0,06±0,02	8,22±0,02	0,11±0,01	3,27±0,02	0,43±0,00	nd	0,32±0,00	0,04±0,03	12,82±0,11
13	0,21±0,00	0,06±0,01	8,29±0,05	0,14±0,00	3,32±0,01	0,43±0,00	nd	0,37±0,02	0,03±0,02	13,02±0,12
14	0,82±0,00	0,12±0,01	8,55±0,04	0,12±0,01	3,21±0,00	0,45±0,01	0,04±0,03	1,05±0,03	0,06±0,03	14,76±0,17
15	0,21±0,00	0,02±0,03	8,67±0,05	0,08±0,00	3,40±0,09	0,45±0,06	0,02±0,02	0,89±2,29	0,03±0,03	13,97±2,62
16	0,3±0,00	0,01±0,00	8,50±0,04	0,21±0,02	3,32±0,02	0,42±0,02	0,01±0,00	0,25±0,01	0,02±0,00	13,23±0,15
17	0,31±0,00	Nd	8,27±0,05	0,12±0,02	3,28±0,00	0,42±0,00	nd	0,39±0,13	0,02±0,01	13,01±0,23
Prosjek	0,6±0,48	0,10±0,08	8,52±0,23	0,18±0,09	3,09±0,79	0,45±0,03	0,13±0,17	0,8±0,65	0,13±0,12	14,3±1,5

* Eksperimentalni uvjeti prikazani su u tablici 5

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=2).

nd – nije detektirano

Tablica 7. Sastav (%) nezasićenih masnih kiselina (MUFA i PUFA) u scCO₂ ekstraktima plodova mirte

Eksperiment*	C18:1c	C20:1	C18:2t	C18:2c	C18:3n3	C20:5n3	Σ MUFA	Σ PUFA
1	7,40±0,02	0,16±0,01	0,31±0,00	77,46±0,37	0,40±0,00	0,12±0,05	7,72±0,08	78,40±0,48
2	7,04±0,01	0,14±0,00	0,34±0,00	76,03±0,22	0,55±0,01	0,19±0,10	7,49±0,12	77,44±0,41
3	6,93±0,05	0,14±0,01	0,35±0,03	73,77±0,32	0,53±0,01	0,11±0,00	7,35±0,10	74,91±0,41
4	7,11±0,01	0,16±0,01	0,35±0,00	75,55±0,22	0,49±0,01	0,09±0,00	7,64±0,12	76,74±0,27
5	7,55±0,00	0,15±0,00	0,26±0,00	78,22±0,02	0,37±0,00	0,07±0,00	7,85±0,02	78,98±0,04
6	7,13±0,00	0,17±0,04	0,51±0,09	76,05±0,72	0,48±0,06	0,08±0,00	7,75±0,20	77,33±0,90
7	7,10±0,04	0,20±0,04	0,52±0,03	74,35±1,04	0,55±0,09	0,11±0,01	7,97±0,29	75,84±1,20
8	7,52±0,01	0,16±0,00	0,25±0,01	78,06±0,01	0,37±0,00	0,12±0,03	7,80±0,02	78,87±0,06
9	6,97±0,04	0,20±0,05	0,54±0,03	73,89±1,63	0,57±0,03	0,45±0,10	7,78±0,27	75,72±1,85
10	7,48±0,01	0,15±0,00	0,24±0,00	78,44±0,00	0,36±0,00	0,21±0,00	7,83±0,06	79,30±0,01
11	7,54±0,06	0,17±0,02	0,28±0,05	78,06±0,51	0,39±0,04	0,20±0,05	7,90±0,19	79,05±0,70
12	7,52±0,04	0,16±0,01	0,25±0,00	78,35±0,35	0,36±0,00	0,14±0,01	8,02±0,11	79,16±0,38
13	7,54±0,01	0,16±0,00	0,25±0,00	78,15±0,07	0,36±0,00	0,16±0,03	7,99±0,07	79,00±0,14
14	7,10±0,00	0,15±0,02	0,35±0,01	76,36±0,07	0,44±0,00	0,36±0,07	7,53±0,13	77,71±0,18
15	6,98±0,00	0,14±0,02	0,30±0,06	77,48±0,56	0,42±0,01	0,07±0,03	7,58±0,69	78,45±0,72
16	7,58±0,02	0,03±0,01	0,35±0,03	77,74±0,23	0,42±0,02	0,16±0,00	7,99±0,10	78,77±0,35
17	7,51±0,04	0,01±0,00	0,25±0,00	78,17±0,47	0,36±0,00	0,21±0,09	7,86±0,08	79,13±0,61
Prosjek	7,29±0,25	0,15±0,05	0,34±0,10	76,83±1,63	0,44±0,08	0,17±0,10	7,77±0,19	77,93±1,39

* Eksperimentalni uvjeti prikazani su u tablici 5

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=2).

nd – nije detektirano

4.3. UDIO I SASTAV FITOSTEROLA

Plinskom kromatografijom u uzorcima scCO₂ ekstraktata plodova mirte analizirani su fitosteroli u plodovima mirte. U tablici 8 prikazan je sastav i udio ukupnih fitosterola (mg kg⁻¹ ekstrakta) te prinos fitosterola (mg kg⁻¹ ploda) u scCO₂ ekstraktima plodova mirte.

Tablica 8. Sastav i udio ukupnih fitosterola (mg kg⁻¹ ekstrakta) te njihov prinos (mg kg⁻¹ ploda) u scCO₂ ekstraktima plodova mirte

Eksperiment*	Kampesterol	24-Metilen-kolesterol	Stigma-sterol	β-sitosterol	Δ5-avenasterol	Δ7-sitosterol	Citrostadienol	Ukupni fitosteroli	Prinos fitosterola
1	222,14±2,17	74,31±2,66	74,31±2,66	13266,14±98,38	617,72±7,19	192,64±34,46	30,66±35,41	14675,05±191,69	771,91±10,08
2	203,28±0,61	10,25±2,09	67,60±2,31	11849,17±61,69	541,24±5,48	132,96±32,91	18,71±2,04	12983,56±113,82	692,02±6,07
3	197,29±0,41	23,88±2,10	71,03±0,10	10650,54±3,33	525,36±0,99	163,02±1,31	148,73±0,34	12019,27±10,78	659,86±0,59
4	188,03±0,31	25,08±0,69	75,25±0,65	10921,61±8,47	535,46±0,10	153,42±1,17	29,67±0,58	12101,86±15,32	716,43±0,91
5	222,96±0,84	21,82±0,72	88,93±0,61	12967,96±3,93	615,52±2,64	192,49±2,87	nd	14317,49±11,99	741,65±0,62
6	175,23±0,57	24,95±1,28	76,20±0,24	9110,43±16,27	426,16±0,42	136,23±9,38	36,49±0,39	10126,55±30,57	516,45±1,56
7	217,17±1,78	190,22±7,47	72,08±3,73	12259,27±17,78	558,89±0,71	160,30±1,49	81,67±1,80	13735,05±46,41	767,79±2,59
8	232,31±0,53	20,22±0,51	80,55±0,36	13500,66±12,32	643,84±2,32	179,94±30,56	52,38±1,94	14922,26±49,94	750,59±2,51
9	327,98±0,12	22,49±0,16	71,68±0,21	12141,92±1,12	546,78±0,01	153,28±31,51	51,64±0,24	13493,28±33,98	724,59±1,82
10	232,54±0,11	23,89±0,40	79,93±0,74	13051,39±20,75	663,83±2,43	222,31±5,59	129,53±7,10	14657,08±43,66	725,53±2,16
11	475,54±3,83	33,83±0,06	80,54±7,93	13228,7±69,26	531,65±6,31	114,82±4,48	76,77±6,07	14720,79±243,76	775,79±12,85
12	205,36±5,50	205,36±5,50	72,04±7,60	11958,25±50,84	575,72±0,29	144,8±40,33	152,82±5,24	13630,92±195,37	688,36±9,87
13	230,88±6,22	121,35±4,68	88,32±3,82	13593,08±0,27	672,21±0,86	206,94±2,35	146,46±2,23	15428,21±290,42	732,84±13,80
14	228,73±1,07	228,73±1,07	73,65±0,77	12240,68±6,47	556,85±0,04	151,84±21,14	86,93±0,26	13758,76±30,84	714,08±1,60
15	236,16±0,72	19,39±1,26	75,38±0,28	13231,48±0,49	654,57±3,5	155,01±5,18	154,31±0,06	14784,43±14,05	768,79±0,73
16	235,78±1,93	235,78±1,93	77,13±1,03	14384,99±3,53	689,21±3,89	169,05±51,02	158,36±0,57	16186,07±65,37	772,08±3,12
17	219,95±0,92	219,95±0,92	68,06±0,63	13554,49±20,71	675,07±0,24	200,56±1,36	174,59±0,07	15385,91±25,95	770,83±1,30
Prosjeck	238,31±69,07	88,32±89,33	76,04±6,09	12465,34±1308,35	590±71,46	166,45±28,92	89,98±58,34	13936,86±1494,36	722,92±63,31

* Eksperimentalni uvjeti prikazani su u tablici 5

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija (n=2).

nd – nije detektirano

4.4. UDIO I SASTAV HLAPLJIVIH SPOJEVA

U tablicama 9a i 9b prikazan je sastav i udio hlapljivih spojeva (mg kg⁻¹ ekstrakta) te prinos hlapljivih spojeva (mg kg⁻¹ ploda) u scCO₂ ekstraktima plodova mirte analiziranih plinskom kromatografijom u uzorcima scCO₂ ekstraktata plodova mirte.

Tablica 9a. Sastav i udio hlapljivih spojeva (mg kg⁻¹ ekstrakta) te njihov prinos (mg kg⁻¹ ploda) u scCO₂ ekstraktima plodova mirte (1. dio)

Eksperiment*	α -pinen	β -pinen	Mircen	α -felandren	3-Karen	Limonen	1,8-Cineol	Linalol
1	1868,35±42,78	6,57±0,29	nd	32,68±0,48	36,26±2,04	293,95±0,97	2975,27±9,23	829,83±9,58
2	859,36±17,91	nd	nd	16,23±0,42	17,80±0,98	189,76±2,58	1921,41±91,86	113,14±6,01
3	932,42±43,46	nd	nd	4,70±0,65	17,22±0,72	156,06±7,31	1528,18±52,42	78,40±3,88
4	1173,96±11,08	nd	nd	13,86±0,44	20,83±3,20	177,46±2,82	1804,81±21,57	85,22±1,52
5	1539,51±12,48	nd	6,03±0,53	42,29±1,00	22,49±1,12	231,69±2,19	2170,90±26,78	644,31±12,83
6	1183,71±20,16	3,41±0,83	3,55±0,03	60,57±2,55	57,41±2,00	252,28±6,55	2430,18±39,59	1326,37±42,75
7	337,72±20,68	nd	nd	22,83±2,22	8,28±0,37	105,36±7,88	1058,39±2,76	nd
8	1789,61±30,62	nd	nd	55,06±1,93	72,93±2,76	274,17±7,87	2643,03±23,18	1521,77±23,76
9	1472,42±70,04	nd	nd	70,26±1,56	52,23±3,21	283,81±6,04	2604,47±68,17	987,67±45,47
10	959,88±35,32	nd	nd	35,90±3,78	31,28±1,42	198,14±8,18	1952,26±3,40	435,73±20,13
11	624,43±17,35	nd	nd	75,09±2,79	53,89±1,09	287,69±6,86	1845,88±6,16	1272,98±46,65
12	1493,91±15,54	4,79±0,78	nd	24,96±2,51	82,43±2,88	295,22±10,79	2510,49±49,29	950,90±40,25
13	1305,03±38,77	nd	nd	25,18±1,91	26,06±1,16	237,83±9,00	2067,17±311,71	233,78±8,32
14	1122,26±25,57	7,28±0,29	nd	25,25±1,12	24,82±1,09	212,48±7,72	2138,05±143,51	536,75±10,52
15	1645,22±37,43	5,96±0,43	nd	5,19±0,33	60,50±7,33	254,07±9,15	2119,99±4,65	85,85±12,41
16	1718,73±61,88	9,80±0,52	4,88±0,91	50,25±5,57	69,18±4,48	311,15±2,73	2809,00±22,59	1509,30±69,20
17	1730,09±10,37	5,35±0,57	nd	31,87±2,88	62,22±5,61	289,33±9,45	2529,20±17,07	596,52±26,16
Prosjeck	1279,80±436,49	2,54±3,37	0,85±1,94	34,83±21,29	42,11±22,95	238,26±57,72	2182,86±486,60	659,32±529,68

* Eksperimentalni uvjeti prikazani su u tablici 5

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija (n=2).

nd – nije detektirano

Tablica 9b. Sastav i udio ukupnih hlapljivih spojeva (mg kg⁻¹ ekstrakta) te njihov prinos (mg kg⁻¹ ploda) u scCO₂ ekstraktima plodova mirte (2. dio)

Eksperiment*	α-terpineol	Mirtenol	Karvon	Geraniol	Mirtenil acetat	Ukupni hlapljivi spojevi	Prinos hlapljivih spojeva
1	87,59±4,14	28,38±1,86	62,23±2,25	41,37±3,22	5521,68±30,79	11784,15±390,48	619,85±20,54
2	69,90±1,12	5,38±0,61	96,08±4,19	52,07±1,57	3952,54±40,89	7293,67±256,80	388,75±13,69
3	41,74±1,31	nd	42,77±1,22	44,27±1,31	2475,76±39,54	5321,53±65,23	292,15±13,58
4	55,31±2,40	nd	43,03±2,07	57,66±3,18	3035,25±44,16	6467,40±145,98	382,87±18,64
5	83,71±2,88	13,27±0,36	94,43±4,33	79,87±2,25	4505,63±92,03	9434,13±166,51	488,69±18,63
6	161,92±1,66	46,69±2,65	78,34±2,33	50,24±2,94	5310,63±19,67	10965,30±370,27	559,23±19,90
7	76,95±1,29	12,99±0,82	72,70±3,96	91,29±1,61	3088,99±36,80	4875,48±191,75	272,54±12,20
8	146,43±4,49	64,55±1,31	74,25±3,9	63,93±1,07	4857,41±81,16	11563,13±443,10	581,63±22,29
9	104,79±4,06	45,32±1,30	93,82±4,73	112,74±1,28	5049,07±27,86	10876,59±290,02	584,07±15,57
10	128,61±2,52	22,57±3,92	87,04±3,61	65,59±2,71	4180,84±99,66	8097,86±447,78	400,84±22,17
11	152,04±4,15	8,79±0,33	54,76±2,14	69,91±2,42	5165,15±60,38	9610,62±149,75	506,48±20,62
12	120,30±4,86	28,69±6,31	86,89±2,00	99,82±2,46	4170,33±62,20	9868,72±369,19	498,37±18,64
13	86,35±3,52	9,77±3,81	63,05±3,08	85,49±3,60	3651,03±58,41	7790,73±194,67	370,06±13,00
14	129,75±6,35	19,83±3,70	58,68±3,36	97,05±4,61	4753,96±24,26	9126,16±137,89	473,65±23,16
15	84,73±3,60	14,65±6,71	101,42±4,24	75,38±4,18	3382,71±60,34	7835,67±89,66	407,45±15,66
16	172,78±9,03	48,51±4,29	89,27±3,30	129,25±4,43	5396,25±38,59	12318,36±619,03	587,59±29,53
17	78,01±3,17	17,29±7,09	101,38±3,21	114,52±3,10	4548,62±25,65	10104,42±583,98	506,23±29,26
Prosjeck	104,76±38,65	22,75±18,62	76,48±19,50	78,26±26,22	4296,81±917,00	9019,64±2218,70	465,91±101,96

* Eksperimentalni uvjeti prikazani su u tablici 5

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija (n=2).

nd – nije detektirano

4.5. UTJECAJ UVJETA $scCO_2$ EKSTRAKCIJE

U tablici 10 prikazani su rezultati ANOVA analize utjecaja ekstrakcijskih uvjeta na iskorištenje, sumu PUFA te prinose fitosterola i hlapljivih spojeva primjenom RSM metode.

Tablica 10. Rezultati statističke analize utjecaja ekstrakcijskih uvjeta na iskorištenje, sumu PUFA te prinose fitosterola i hlapljivih spojeva

Izvor varijacije	Iskorištenje (%)		Σ PUFA (% od ukupnih)		Prinos fitosterola (mg kg ⁻¹ ploda)		Prinos hlapljivih spojeva (mg kg ⁻¹ ploda)	
	F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost
Model	17,22	< 0,001*	6,16	0,008*	5,03	0,024*	5,48	0,018*
Linearni								
X₁	48,40	< 0,001*	16,19	0,001*	2,78	0,124	11,12	0,013*
X₂	1,05	0,324	0,01	0,908	5,31	0,063	0,64	0,449
X₃	2,22	0,160	2,27	0,156	5,83	0,047*	4,20	0,080
Kvadratni								
X₁²	-	-	-	-	0,99	0,333	20,32	0,003*
X₂²	-	-	-	-	7,35	0,036*	7,98	0,026*
X₃²	-	-	-	-	3,08	0,105	4,11	0,082
Interakcija								
X₁X₂	-	-	-	-	2,71	0,121	0,20	0,666
X₁X₃	-	-	-	-	0,13	0,735	0,45	0,522
X₂X₃	-	-	-	-	16,96	0,005*	0,35	0,574
Nedostatak modela	2,84	0,164	4,06	0,095	3,25	0,164	0,49	0,710
R²	0,799		0,587		0,866		0,876	

X₁: temperatura, X₂: tlak, X₃: protok

* utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

5. RASPRAVA

5.1. ISKORIŠTENJE LIPOFILNOG EKSTRAKTA

U tablici 5 prikazano je iskorištenje lipofilnih ekstrakta (%) dobivenih u eksperimentima scCO₂ ekstrakcije plodova mirte prema eksperimentalnim varijablama, odnosno temperaturi, tlaku i protoku ekstrakcije.

Eksperimentalno dobiveni rezultati ukazuju kako se iskorištenje scCO₂ ekstrakta kreće u rasponu od 4,75 do 5,92 %, pri čemu je prosječna vrijednost iskorištenja 5,20 %. Najniže iskorištenje ekstrakcije zabilježeno je pri eksperimentalnim uvjetima temperature od 40 °C, tlaka od 200 bara te protoka 30 g min⁻¹, a najviše pri eksperimentalnim uvjetima temperature od 60 °C, tlaka od 300 bara te protoka 40 g min⁻¹. Falconieri i sur. (2010) navode kako viši tlak ekstrakcije omogućuje smanjenje vremena obrade i daje veće iskorištenje, stoga je očekivano da su iskorištenja lipofilnog ekstrakta dobivena ovim istraživanjem pri 300 bara veća u odnosu na ona dobivena pri 200 bara.

5.2. SASTAV MASNIH KISELINA

U tablicama 6 i 7 prikazan je sastav masnih kiselina u scCO₂ ekstraktima plodova mirte. Sastav masnih kiselina određen je plinskom kromatografijom (GC) prije koje su masne kiseline prevedene u svoje metilne estere te je identificirano ukupno 36 masnih kiselina odnosno 17 SFA, 9 MUFA i 10 PUFA. Radi jednostavnijeg prikaza iz tablica su isključene masne kiseline prisutne u prosječnim udjelima < 0,1 % [maslačna (C4:0), kapronska (C6:0), kaprilna (C8:0), kaprinska (C10:0), laurinska (C12:0), tridekanska (C13:0), miristinska (C14:0), heneikozanska (C21:0), miristoleinska (C14:1), pentadekanska (C15:1), palmitoleinska (C16:1), heptadekanska (C17:1), trans-oleinska (C18:1t), eručna (C22:1), nervonska (C24:1), n-6 linolenska (C18:3n6), eikozadienska (C20:2), n-3 eikozatrienska (C20:3n3), n-6 eikozatrienska, dokozadienska (C22:2) te dokozahexaenska (C22:6) masna kiselina)].

Dominantna masna kiselina u analiziranim scCO₂ ekstraktima plodova mirte bila je esencijalna *cis*-linolna (C18:2c) masna kiselina s udjelom od 76,83±1,63 %, a slijede palmitinska masna kiselina (C16:0) s udjelom 8,52±0,23 %, oleinska masna kiselina (C18:1) dominantna s udjelom od 7,29±0,25 %, stearinska masna kiselina (C18:0) čiji je udio 3,09±0,79 %, behenijska (C22:0), dokotriozenska (C23:0) te lignocerinska (C24:0) masna kiselina. Prosječni ukupni udio SFA prisutnih u ekstraktima plodova mirte iznosio je 14,3±1,5 %, a osim navedenih palmitinske i stearinske u udjelima do 1 % detektirane su undekanska (C11:0),

pentadekanska (C15:0), margarinska (C17:0), arahidska (C20:0), behenijska (C22:0), dokotriozenska (C23:0) te lignocerinska (C24:0) masna kiselina.

Nadalje, rezultati ovog istraživanja pokazuju kako je ukupni udio MUFA u scCO₂ ekstraktima plodova mirte $7,77 \pm 0,19$ % među kojima se osim oleinske u nešto većem udjelu ističe samo eikozanoidna (C20:1) masna kiselina. Zahvaljujući visokom udjelu linolne masne kiseline, PUFA su najzastupljenija skupina masnih kiselina prisutna u plodovima mirte s udjelom od $77,93 \pm 1,39$ %, a pored nje zastupljene su i α -linolenska (C18:3) i n-3 eikozapentaenska (C20:5n3) masna kiselina, međutim u udjelima manjim od 0,50 %. U svim uzorcima je, pored navedenih, detektirana i manja količina *trans*-linolne (C18:2t) masne kiseline.

Prema rezultatima dobivenim ovim istraživanjem, plodovi mirte izvor su esencijalnih masnih kiselina poput n-3 linolenske, eikozapentaenske i dokozaheksaenske te n-6 linolne masne kiseline koje imaju brojna bioaktivna djelovanja. Ljudsko tijelo nije sposobno sintetizirati n-6 linolnu masnu kiselinu, a ona je vrlo važna za ljudski organizam jer stabilizira strukture staničnih membrana i kože. Nadalje, n-3 masne kiseline važne su za normalan rast i funkciju ljudskog mozga i mrežnice, a prehrana bogata n-3 masnim kiselinama povezana je s održavanjem zdravlja srca i krvnih žila te prevencijom ateroskleroze. Kardioprotektivni učinci EPA i DHA očituju se u sprječavanju aritmija, snižavanju razine triacilglicerola u krvnoj plazmi, smanjenju isporuke arterijskog kolesterola te u regulaciji funkcije vaskularnih endotelnih stanica i poboljšavanju vaskularne relaksacije (De Carvalho i Caramujo, 2018).

U istraživanju provedenom na lipofilnim ekstraktima izoliranim iz plodova tamnih i bijelih plodova mirte uz smjesu otapala metanol/kloroform, Şan i sur. (2015) detektirali su linolnu masnu kiselinu kao dominantnu u udjelu od 69,47 - 71,71 %. Nadalje, u svom istraživanju Özcan i sur. (2020) navode kako je udio linolne masne kiseline u metanolnim ekstraktima tamnih plodova mirte 69,71 %, dok su Wannes i sur. (2010) u ekstraktu dobivenom smjesom metanol/kloroform/heksan utvrdili udio linolne od $71,3 \pm 1,0$ %, što je gotovo jednako rezultatima ovog istraživanja.

Nadalje, prema istraživanju Şan i sur. (2015), glavne zasićene masne kiseline u plodovima mirte su palmitinska i stearinska masna kiselina, pri čemu je udio palmitinske masne kiseline 10,18 - 13,40 %, a udio stearinske masne kiseline je 2,93 - 4,34 %. U istom istraživanju detektiran je udio oleinske od 10,14 - 13,48 %, a nešto niži raspon utvrdili su Özcan i sur. (2020) koji navode kako je oleinska masna kiselina prisutna u udjelu od 7,47 - 9,21 %, što je

gotovo identično rezultatima ovog istraživanja. Iako su u navedenim istraživanjima upotrijebljene konvencionalne ekstrakcijske tehnike i različita otapala u usporedbi sa scCO₂ upotrijebljenim u ovom radu, može se zaključiti da sama tehnika ekstrakcije ne dovodi do većih promjena u sastavu masnih kiselina ekstrakta.

S druge strane, značajna odstupanja masnih kiselina od sastava utvrđenog ovim radom zabilježili su Serce i sur. (2010) koji navode kako su plodovi mirte bogat izvor esencijalnih masnih kiselina, osobito linolne masne kiseline koja je utvrđena u udjelu od 4,78 %, dok je udio oleinske bio 67,07 %. U istraživanju Cakir (2004) navodi kako je oleinska masna kiselina glavna masna kiselina zastupljena u ekstraktima plodova mirte s udjelom od 64,1 - 72,1%, što je gotovo deset puta više nego u ovom istraživanju. Ovako velika razlika u udjelu oleinske i linolne masne kiseline vjerojatno je posljedica različitih genotipova i geografskog porijekla u ovom istraživanju te u istraživanjima Cakira (2004) te Serce i sur. (2010) u kojima je upotrijebljena mirta uzgojena na području Turske.

5.3. UDIO I SASTAV FITOSTEROLA

Fitosteroli su prirodni sastojci biljnih staničnih membrana te posjeduju višestruko blagotvorno djelovanje na ljudsko zdravlje pri čemu se kao najznačajnije navodi utjecaj na smanjenje razine kolesterola u krvi, čime se osigurava zaštita od kardiovaskularnih bolesti (Chanioti i sur., 2021). Zbog funkcionalne uloge fitosterola, osobito β -sitosterola, uvjeti uporabe njihovih zdravstvenih tvrdnji navedeni su u Uredbi Komisije (EU) br. 686/2014. Bez obzira na veliku važnost ovih spojeva, pregledom znanstvene literature, uočeno je kako ovo istraživanje predstavlja prvu objavu podataka o sastavu i udjelu fitosterola u plodovima mirte, a tako i sastavu i udjelu fitosterola u scCO₂ ekstraktima plodova mirte, stoga ovaj rad predstavlja vrlo vrijedan znanstveni doprinos.

Plinskom kromatografijom u uzorcima scCO₂ ekstrakata plodova mirte identificirano je ukupno devet spojeva iz skupine fitosterola. U tablici 8 prikazani su sastav i udio ukupnih fitosterola (mg kg⁻¹ ekstrakta) u scCO₂ ekstraktima plodova mirte. Identificirani su sljedeći fitosteroli: kampesterol, 24-metilenkolesterol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ 5-avenasterol, Δ 7-sitosterol, te citrostadienol. Prosječan udio ukupnih fitosterola iznosi 13936,86±1494,36 mg kg⁻¹ ekstrakta, a najzastupljeniji su β -sitosterol u udjelu 12465,34±1308,35 mg kg⁻¹, Δ 5-avenasterol u udjelu 590±71,46 mg kg⁻¹, Δ 7-sitosterol u udjelu 166,45±28,92 mg kg⁻¹ te kampesterol u udjelu 238,31±69,07 mg kg⁻¹. Najmanje zastupljen fitosterol je stigmasterol u udjelu od 76,04±6,09 mg kg⁻¹. U svojem istraživanju, Shen i sur. (2021) uspoređivali su udjele

pojedinačnih i ukupnih fitosterola u komercijalno najzastupljenijim biljnim uljima poput palminog, sojinog, ulja kukuruznih klica, repičinog, maslinovog i sl. Najviše udjele ukupnih fitosterola zabilježili su u ulju kukuruznih klica te repičinom ulju u rasponu 6128,7 – 9525,5 mg kg⁻¹ odnosno 5917,0 - 6859,9 mg kg⁻¹. Nadalje, Czaplicki i sur. (2011) odredili su udjele ukupnih fitosterola u različitim nekonvencionalnim biljnim uljima pri čemu je najviši udio iznosio 8570 mg kg⁻¹, a detektiran je u ulju noćurka dok je u istraživanju Vecka i sur. (2019) među lipidnim ekstraktima izoliranim iz 19 različitih vrsti sjemenki i koštica najviši udio fitosterola imao onaj sezama (6590 mg kg⁻¹). Usporedbom s podacima dobivenim ovim istraživanjem vidljivo je da scCO₂ ekstrakti ploda mirte u prosjeku sadrže i dvostruko više fitosterola od udjela zabilježenih u navedenim uljima. U većini ulja i lipidnih ekstrakata analiziranih u navedenim istraživanjima (Shen i sur., 2021; Czaplicki i sur., 2011; Vecka i sur. 2019) β-sitosterol je bio dominantan, a slijedili su kampesterol i stigmasterol. Sukladno tome, prema Moghadasian (2000) sitosterol i kampesterol čine oko 95% fitosterola zastupljenih u prehrani (otprilike 65% odnosno 30%), dok preostalih 5% čine ostali biljni steroli, uglavnom stigmasterol.

Nadalje, budući da ne postoje literaturni podaci o fitosterolima u plodovima mirte, rezultati ovog istraživanja dodatno su uspoređeni s istraživanjima provedenim na plodovima pasjeg trna zbog morfološke i kemijske sličnosti ovih dvaju plodova.

Dabrowski i sur. (2022) GC-MS spektrometrijom određivali su fitosterole u pet različitih sorti pasjeg trna te navode kako udio fitosterola varira u rasponu od 9304 mg kg⁻¹ do 16129 mg kg⁻¹, s prosječnom vrijednošću za ispitivane sorte od 11791 mg kg⁻¹ i koeficijentom varijacije od 26 % između sorti. Ovako visoke vrijednosti ukupnih fitosterola usporedive su s udjelima u lipidnim ekstraktima plodova mirte dobivenim ovim istraživanjem. Od pojedinačnih fitosterola dominantna su dva sterola koja čine 87 % ukupnih fitosterola prisutnih u plodovima pasjeg trna, a to su β-sitosterol s udjelom u rasponu od 4042 mg kg⁻¹ do 6472 mg kg⁻¹ i 24-metilcikloartanol s udjelom u rasponu od 2765 mg kg⁻¹ do 8059 mg kg⁻¹. Kao što je navedeno, β-sitosterol je bio dominantan fitosterol i u ovom istraživanju, međutim bio je prisutan u udjelu od otprilike 80 % ukupnih fitosterola, za razliku udjela od oko 50 % koliko je zabilježeno u istraživanju Dabrowskog i sur. (2022) za ulje pasjeg trna. U mnogim *in vitro* i *in vivo* studijama dokazano je da β-sitosterol posjeduje različita biološka djelovanja kao što su anksiolitičko i sedativno djelovanje, analgetsko, imunomodulatorno, antimikrobno, antikancerogeno, protuupalno, hepatoprotektivno, antioksidacijsko i antidijabetičko djelovanje (Babu i Jayaraman, 2020) što potvrđuje visok bioaktivnih potencijal lipidnih ekstrakata

plodova mirte. Nadalje, u uljima plodova pasjeg trna identificirani su kampesterol u udjelu nižem od 1% ukupne frakcije te cikloartenol s udjelom oko 4 – 8 % ukupne frakcije. U ovom istraživanju kampesterol je zastupljen u udjelu oko 1,5 %, dok cikloartenol nije detektiran. S druge strane, detektirani Δ^7 -sitosterol predstavlja specifičnost plodova mirte i za sad je detektiran samo u određenom broju biljnih vrsta poput kikirikija (Mingrou i sur., 2022), kravačca (Al-Snafi, 2020) i pira (Giambanelli i sur., 2020).

Radi pouzdanije procjene učinkovitosti pojedinih uvjeta scCO₂ ekstrakcije rezultati za udio ukupnih fitosterola u ekstraktima preračunati su korištenjem podataka za iskorištenje lipofilnog ekstrakta iz tablice 4 te su u tablici 8 prikazani rezultati prinosa fitosterola ekstrahiranih scCO₂ iz plodova mirte (mg kg⁻¹ ploda). Prosječan prinos fitosterola tako iznosi 722,92±63,31 mg kg⁻¹ ploda. Ovaj podatak, uz usporedbu s rezultatima za druge biljne vrste, također potvrđuje da plodovi mirte predstavljaju bogat izvor fitosterola. Balbino i sur. (2021) analizirali su udio fitosterola u ekstraktima komorača, anisa, kima i korijandra te navode kako je udio fitosterola u rasponu od 390,3 do 542,6 mg kg⁻¹ sjemenki. U drugom istraživanju također je zabilježen udio fitosterola u plodovima pasjeg trna u rasponu 344 – 515 mg kg⁻¹ plodova (Yang i sur., 2001).

5.4. UDIO I SASTAV HLAPLJIVIH SPOJEVA

U tablicama 9a i 9b prikazan je sastav i udio hlapljivih spojeva (mg kg⁻¹ ekstrakta) u scCO₂ ekstraktima plodova mirte. Hlapljivi spojevi identificirani u ekstraktima plodova mirte su: α -pinen, β -pinen, mircen, α -felandren, 3-karen, limonen, 1,8-cineol, linalol, α -terpineol, mirtenol, karvon, geraniol te mirtenil acetat. Ovi rezultati slični su istraživanju Giampieri i sur. (2020) koji kao najvažnije hlapljive spojeve mirte navode 1,8-cineol, α -pinen, limonen, geranil acetat, linalol, estragol, α -terpinil acetat, mirtenil acetat, bergamoten te E-kariofilen.

Udio ukupnih hlapljivih spojeva u scCO₂ ekstraktima plodova mirte dobivenih u ovom istraživanju iznosi 9019,64±2218,70 mg kg⁻¹, pri čemu su najzastupljeniji mirtenil acetat u udjelu od 4296,81±917,00 mg kg⁻¹, 1,8-cineol u udjelu od 2182,86±486,60 mg kg⁻¹ te α -pinen u udjelu od 1279,80±436,49 mg kg⁻¹. Najmanje zastupljeni su, za mirtu specifičan, mirtenol s udjelom 22,75±18,62 mg kg⁻¹, mircen s udjelom 0,85±1,94 mg kg⁻¹ te β -pinen s udjelom 2,54±3,37 mg kg⁻¹ ekstrakta. Jerković i sur. (2002) istražili su hlapljive spojeve prisutne u eteričnom ulju mirte prikupljene na Visu te navode kako su identificirani mirtenil acetat u udjelu od 12,2 - 33,2 %, 1,8-cineol i limonen u udjelu od 10,9 – 21,1 %, α -pinen u udjelu od 4,0 – 15,3 % te linalol u udjelu od 4,7 – 7,7 %. Identificirani spojevi identični su spojevima

prisutnim u ekstraktima mirte dobivenim ovim istraživanjem. Udio α -pinena gotovo je identičan u oba istraživanja, dok je udio mirtenil acetata 47,64 % u ovom istraživanju viši nego u istraživanju Jerković i sur. (2002). Nadalje, Aleksić i sur. (2014) istraživali su sastav eteričnih ulja *M. communis* L. porijeklom iz Crne Gore te navode kako su dominantni spojevi linalol (18 – 26,5 %), mirtenil acetat (16,5 – 18,5 %) i 1,8-cineol (13 – 16,8 %). Bradesi i sur. (1997) predložili su klasifikaciju biljke *M. communis* L. u dva kemotipa: CT1 s visokim udjelom 1,8-cineola i α -pinena te CT2 s visokim udjelom mirtenil acetata i niskim udjelom α -pinena. U skladu s tim, plodovi mirte upotrijebljeni u ovom istraživanju mogu se svrstati u kemotip CT2 kao i plodovi mirte upotrijebljeni u istraživanjima Aleksić i sur. (2014) te Jerković i sur. (2002).

Ghasemi i sur. (2011) provodili su istraživanje o ekstrakciji eteričnih ulja iz lišća mirte prikupljenih na području Irana te su usporedili SFE i hidrodestilaciju. Sastav i broj hlapljivih komponenti dobivenih primjenom SFE razlikuje se od onih dobivenih hidrodestilacijom. Broj hlapljivih komponenti ekstrahiranih SFE (17 komponenti) manji je od onih dobivenih metodom hidrodestilacije (31 komponenta). Glavne hlapljive komponente dobivene hidrodestilacijom su α -pinen (31,8 %), 1,8-cineol (24,6 %), limonen (14,8 %), linalol (8,3 %), α -terpinolen (4,8 %), linalil acetat (3,4 %) i α -terpineol (2,1 %). U uljima dobivenim primjenom SFE, α -pinen je glavna komponenta, a slijede je 1,8-cineol i limonen te ove komponente čine više od 85 % ekstrakta. Ovi rezultati pokazuju kako je, primjenom odgovarajućih uvjeta, superkrična ekstrakcija selektivnija od konvencionalnih metoda hidrodestilacije. Osim navedenoga, vrijeme SFE ekstrakcije (30 min) kraće je u odnosu na vrijeme hidrodestilacije (3-5 h) te je smanjena energetska potrošnja. Sastav hlapljivih komponenti dobivenih u ovom istraživanju razlikuje se od istraživanja Ghasemi i sur. (2011). Glavne komponente identificirane u ovom istraživanju su mirtenil acetat koji je najzastupljeniji (47,64 %), 1,8-cineol te α -pinen, dok su glavne komponente u uljima dobivenim u istraživanju Ghasemi i sur. (2011) α -pinen, 1,8-cineol te limonen, što upućuje na činjenicu da je u njihovom istraživanju upotrijebljena mirta kemotipa CT1.

Budući da su mirtenil acetat te 1,8-cineol najzastupljeniji hlapljivi spojevi prisutni u superkričnim ekstraktima plodova mirte dobivenim ovim istraživanjem, treba istaknuti njihovu važnost. Aleksić i sur. (2014) navode kako male razlike u sastavima hlapljivih komponenti eteričnih ulja mirte značajno utječu na njihovo bioaktivno djelovanje. Eterična ulja mirte posjeduju antibakterijsko djelovanje te značajan bakteriostatski i baktericidni učinak protiv multirezistentne bakterije *Acinetobacter baumannii*. Nadalje, Sonboli i sur. (2006) navode kako neke komponente eteričnih ulja pokazuju veću antimikrobnu aktivnost protiv

gram negativnih bakterija, kao što su 1,8-cineol ($1,87 \text{ mg ml}^{-1}$) i linalool ($0,4 \text{ mg ml}^{-1}$), nego α -pinen (15 mg ml^{-1}). Burt i sur. (2005) navode kako je specifičan sastav ulja zajedno sa sinergističkom interakcijom između sastojaka vjerojatno najodgovorniji za drugačije antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja mirte. Rezultati vezani uz hlapljive spojeve mirte čine ih obećavajućim alternativnim antimikrobnim agensima. Također, pokazuju potencijal njihove upotrebe u formulaciji nekih komercijalnih higijenskih kemijskih proizvoda, kao što su sanitarna sredstva, u svrhu smanjenja prijenosa bakterija, posebno multirezistentnih mikroorganizama koji uzrokuju bolničke infekcije. Međutim, potrebni su dodatni *in vitro* i *in vivo* eksperimenti s eteričnim uljem mirte prije odobrenja njegove primjene kao novog komercijalnog i terapijskog sredstva (Aleksić i sur., 2014).

U tablici 9b prikazano je i iskorištenje scCO_2 ekstrakcije hlapljivih spojeva (mg kg^{-1} ploda) izračunato na temelju podataka za udio ukupnih hlapljivih spojeva u ekstraktima i iskorištenja ekstrakcije iz tablice 4. Prosječno iskorištenje ekstrakcije hlapljivih spojeva iznosi $465,91 \pm 101,96 \text{ mg kg}^{-1}$ ($0,05 \%$) ploda što je usporedivo s rezultatima Usai i sur. (2018). U njihovom istraživanju zabilježena su iskorištenja destilacije eteričnih ulja iz plodova mirte različitih kultivara u rasponu $100 - 550 \text{ mg kg}^{-1}$. Ove vrijednosti značajno su niže u usporedbi s iskorištenjima destilacije eteričnog ulja iz lista mirte koje prema Pereira i sur. (2009) iznose $0,33 - 0,74 \%$. Dobiveni rezultati su međutim u skladu s očekivanjima obzirom da Boelens i Jimenez (1992) ističu kako zrenjem plodova mirte dolazi do smanjenja udjela hlapljivih spojeva što dovodi do nižeg udjela hlapljivih spojeva u zrelih plodovima mirte u odnosu na list.

5.5. UTJECAJ UVJETA scCO_2 EKSTRAKCIJE NA ISKORIŠTENJE

Za ispitivanje utjecaja pojedinih uvjeta scCO_2 ekstrakcije i njihovih interakcija u nastavku istraživanja na Box-Behnkenovom dizajnu pokusa primijenjena je RSM metoda. Obzirom da mnogi čimbenici poput temperature, tlaka, vremena ekstrakcije, protoka otapala, veličine čestica, udjela vode, korištenja ko-otapala i sl. utječu na prinose ciljnih komponenti, modeliranje procesnih parametara ključno je za razvoj učinkovite metode ekstrakcije scCO_2 za dobivanje ekstrakata biljnih materijala bogatih bioaktivnim molekulama. RSM predstavlja prikladnu platformu za optimiranje ekstrakcije i kreiranje procesa učinkovitog i s ekonomskog i s proizvodnog stajališta (Dai i sur, 2019).

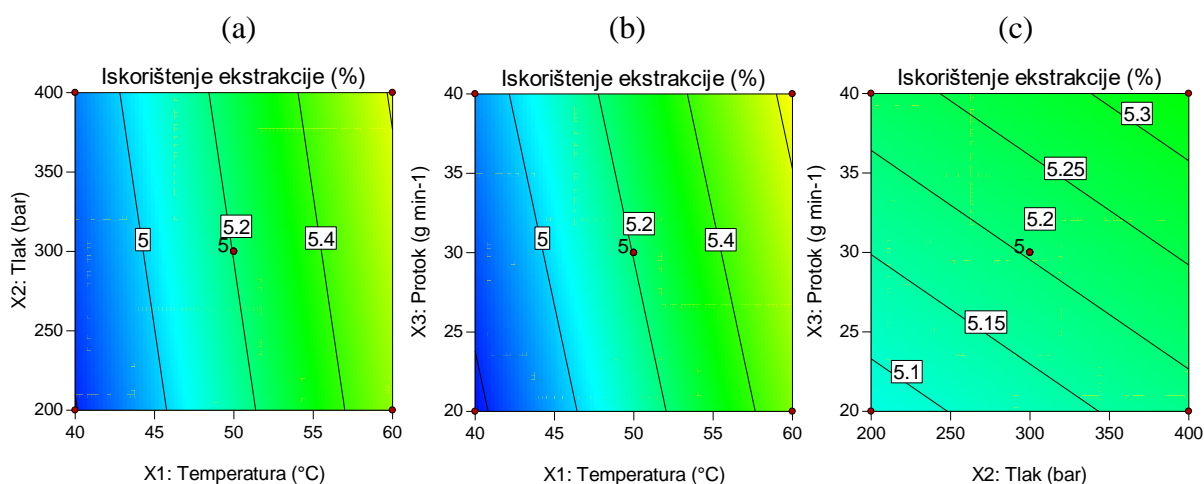
Usljed velikog broja određivanih parametara, kao nezavisne varijable u procjeni utjecaja ekstrakcije odabrani su najrelevantniji pokazatelji bioaktivnog potencijala dobivenih

ekstrakata. Uz samo iskorištenje lipofilnog ekstrakta (tablica 5), u ovaj dio istraživanja uključene su ukupne PUFA (tablica 7), te prinosi scCO₂ ekstrakcije fitosterola (tablica 8) i hlapljivih spojeva (tablica 9b). Za svaku od odabranih zavisnih varijabli uspoređena su tri modela: (i) linearni, (ii) dva faktora s interakcijama i (iii) kvadratni te su usporedbom statističkih parametara prikazanih u tablici 10 (p-vrijednost modela, nedostatak modela i R²) odabrani modeli koji najbolje opisuju vezu nezavisnih i zavisnih varijabli.

U slučaju iskorištenja ekstrakcije, odabran je linearni model ($p < 0,001$) uz koeficijent determinacije $R^2 = 0,799$ dok nedostatak modela nije bio značajan ($p = 0,164$). Regresijski koeficijenti modela prikazanog u izrazu [4] pokazuju značajan utjecaj temperature ekstrakcije ($p < 0,05$) dok utjecaj druga dva faktora nije bio značajan:

$$\text{Iskorištenje (\%)} = 3,036 + 0,036 \times \text{Temperatura} + 5,250 \times 10^{-4} \times \text{Tlak} + 7,624 \times 10^{-3} \times \text{Protok} \quad [4]$$

Iz prikazane jednadžbe vidljivo je kako iskorištenje ekstrakcije, odnosno količina dobivenog ekstrakta raste isključivo s porastom temperature. Isto je vidljivo i iz slike 11 koja prikazuje konturne dijagrame utjecaja kombinacije nezavisnih faktora ekstrakcije na iskorištenje lipofilnog ekstrakta. Dijagrami su dobiveni uz variranje dva faktora u eksperimentalnom rasponu dok je treća varijabla postavljena na vrijednost centralne točke.



Slika 11. Konturni dijagrami iskorištenja ekstrakcije (%) pod utjecajem temperature (°C) i tlaka ekstrakcije (bar) (a), temperature (°C) i protoka (g min⁻¹) (b) te tlaka ekstrakcije (bar) i protoka (g min⁻¹) (c)

Temperatura je jedan od najvažnijih faktora u ekstrakciji lipofilnih spojeva scCO₂ ekstrakcijom, budući da promjene u temperaturi utječu na njihovu topljivost, ali povišena temperatura može uzrokovati i oksidaciju. Tipični temperaturni rasponi koji se koriste za

mnoge ekstrakcije sjemenskog ulja kreću se u rasponu od 40 °C do 80 °C (Ahangari i sur., 2021). Na primjer, u istraživanju Gustinelli i sur. (2018), povećanje temperature s 50 °C na 60 °C, povećalo je iskorištenje ulja iz sjemena borovnice s 7,6 % do 12,2 %. S druge strane, direktan utjecaj temperature na učinkovitost scCO₂ ekstrakcije nije uvijek jasno vidljiv, budući da temperatura, ovisno o tipu materijala, ciljnim komponentama i tlaku može imati dvostruki učinak. Naime, porastom tlaka u sustavu pri konstantnoj temperaturi, raste gustoća superkritičnog CO₂. Gustoća igra važnu ulogu u procesu ekstrakcije, budući da pokreće topljivost tekućine i omogućuje joj prodiranje unutar biljnog materijala kako bi se ekstrahiralo ulje. Gustoća tekućine vrlo je osjetljiva na temperaturu jer će, posebno u području kritičnog tlaka, povećanje temperature pri konstantnom tlaku dovesti do smanjenja gustoće tekućine te smanjenja snage otapala. Međutim, povećanje temperature također će ubrzati prijenos mase i time povećati iskorištenje. Navedena pojava događa se uslijed povećanja tlaka para spojeva koji se izloženih ekstrakciji (Hamid i sur., 2018).

Utjecaj temperature scCO₂ na povećanje iskorištenja ekstrakta biljke *Lecythis pisonis* sličan onom zabilježenom u ovom istraživanju zabilježili su Teixeira i sur. (2018). Pri tome navode kako povećanje temperature dodatno djeluje na smanjenje viskoznosti CO₂ kao otapala, povećanje tlaka pare ekstrahiranih komponenti te povećanje difuzivnosti, čime se smanjuje otpor prijenosu mase i olakšava ekstrakcija ulja. Također, napominju da pojedine masne kiseline pokazuju povećanje topljivosti s povećanjem temperature.

Rocha-Uribe i sur. (2011) istraživali su utjecaj uvjeta ekstrakcije na iskorištenje ulja iz chia sjemenki te su također primijetili da porast temperature pri konstantnom tlaku dovodi do povećanja iskorištenja. Međutim, za razliku od rezultata dobivenih ovim istraživanjem u njihovom radu je do povećanja iskorištenja također došlo porastom tlaka scCO₂. Autori su zaključili kako zamijećeno veće iskorištenje uzrokuju istovremeno povećanje gustoće CO₂ i povećanje topivosti ulja, međutim u njihovom istraživanju najniža vrijednost tlaka bila je 136 bara te je moguće da su navedene promjene bile značajnije zbog nižih tlakova i većeg raspona testiranja.

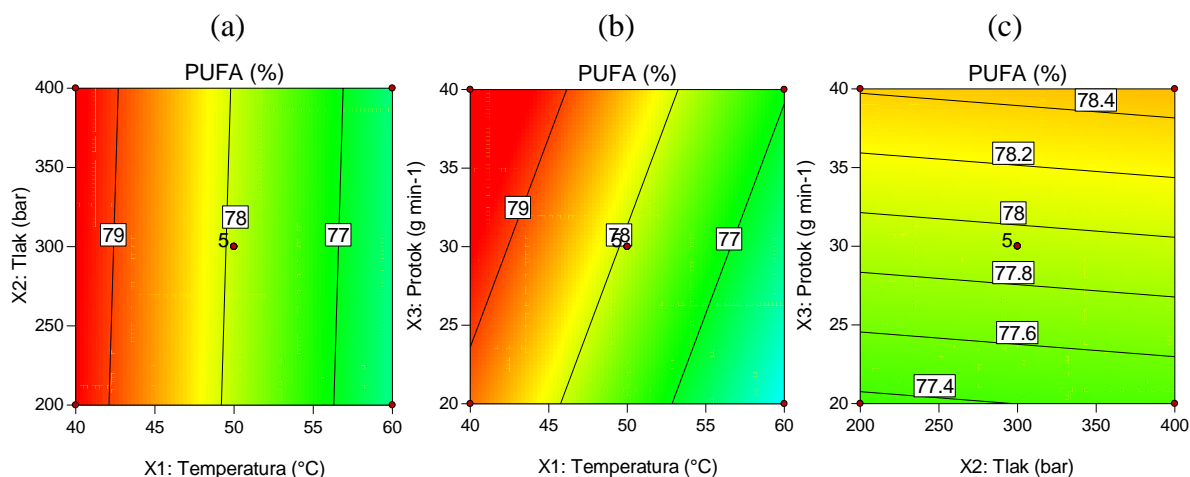
5.6. UTJECAJ UVJETA scCO₂ EKSTRAKCIJE NA UDIO VIŠESTRUKO NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA (PUFA)

Obzirom na različitu stabilnost masnih kiselina prema oksidaciji te također različitu topivost u CO₂ tj. ekstraktibilnost, primijenjeni uvjeti scCO₂ ekstrakcije mogu imati dvojako djelovanje (Natolino i Da Porto, 2019).

Za prikaz utjecaja uvjeta scCO₂ ekstrakcije na udio ukupnih PUFA u ovom istraživanju, kao najprikladniji, odabran je linearni model prikazan u izrazu [5]:

$$PUFA (\%) = 83,264 - 0,141 \times Temperatura + 4,141 \times 10^{-4} \times Tlak + 0,053 \times Protok \quad [5]$$

Značajnost modela iznosila je $p = 0,008$ uz valjanost modela $R^2 = 0,587$, dok nedostatak modela nije bio značajan ($p = 0,095$), a konturni dijagrami modela u kombinaciji dva faktora s trećim faktorom postavljenim na centralnu vrijednost prikazani su na slici 12.



Slika 12. Konturni dijagrami utjecaja temperature (°C) i tlaka ekstrakcije (bar) (a), temperature (°C) i protoka (g min⁻¹) (b) te tlaka ekstrakcije (bar) i protoka (g min⁻¹) (c) na udio ukupnih PUFA (%)

Iz slike 12 i statističkih podataka iz tablice 10 te samog modela vidljivo je kako je temperatura jedini značajan faktor pri čemu s porastom temperature pada udio PUFA. Kao što je navedeno, razlog tome može biti oksidacija uvjetovana povišenom temperaturom. Kostik i sur. (2013) navode kako su ulja koja su bogatija nezasićenim masnim kiselinama sklonija oksidaciji i razgradnji, a Diop i sur. (2014) navode kako PUFA imaju manju stabilnost na višim temperaturama uslijed reakcije s kisikom prilikom koje nastaju peroksidi.

Iako se povećanjem temperature povećava iskorištenje reakcije, kod termolabilnih spojeva poput PUFA, visoka temperatura utječe na degradaciju. Stoga, kada temperatura postane previsoka, efekt degradacije prevlada pozitivan utjecaj temperature na iskorištenje ekstrakcije. Smanjenje udjela linolne i linolenske masne kiseline u uljima dobivenim scCO₂ ekstrakcijom sjemenki soje zabilježili su i Jokić i sur. (2013). U njihovom istraživanju se udio linolne masne kiseline smanjio s 55,8 % na 55,1 %, a linolenske sa 6,3 % na 6,1 % uz porast temperature procesa s 40 na 60 °C. Također, navode kako je temperatura imala značajniji utjecaj na sastav masnih kiselina od tlaka. U istraživanju Teslić i sur. (2021) međutim navode

kako se prema rezultatima ANOVA-e, može uočiti da su tlak i protok CO₂ pokazali najveći utjecaj na udio PUFA, dok je utjecaj temperature bio prilično slab.

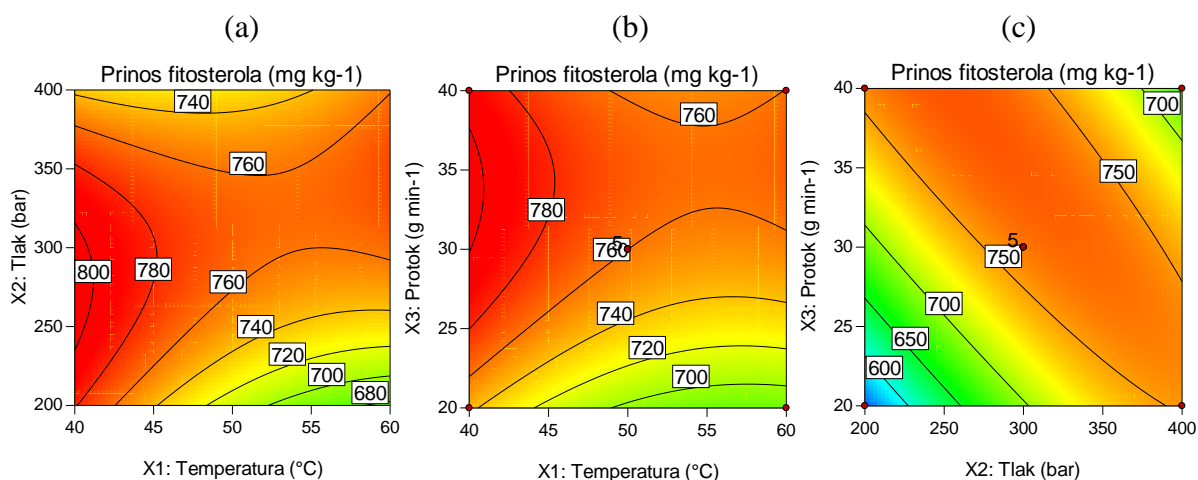
De Zordi i sur. (2017) pratili su kemijski sastav ulja lješnjaka dobivenih scCO₂ ekstrakcijom te su također primijetili značajne promjene udjela masnih kiselina, pri čemu su više temperature i duže vrijeme ekstrakcije povećale udio SFA odnosno smanjile udio PUFA. Ova pojavu objasnili su niskom topljivosti SFA u scCO₂ koja dovodi do nižeg prijenosa mase navedenih spojeva u ekstrahirani materijal. Zaključuju kako blaži uvjeti ekstrakcije rezultiraju manjim iskorištenjem ekstrakta, ali višim udjelom nutritivno vrijednih spojeva.

Kao što je navedeno, utjecaj tlaka na udio masnih kiselina u ovom istraživanju nije zabilježen. Prema opsežnom istraživanju Maheswari i sur. (1992) provedenom na laurinskoj, miristinskoj, palmitinskoj, stearinskoj, oleinskoj i linolnoj masnoj kiselini, njihova topljivost, uz temperaturu, ovisi i o primijenjenom tlaku CO₂. Pri temperaturi od 40 °C topljivost linolne masne kiseline u CO₂ porastom tlaka s 138 na 207 bara povećava se s 45 na 220 g g⁻¹ CO₂ dok se pri 60 °C ovaj porast kreće od 11 do 180 g g⁻¹ CO₂. Daljnjim povećanjem tlaka do 276 bara porast topljivosti je manji, odnosno nije značajan. Stoga je vjerojatno da utjecaj tlaka u ovom istraživanju nije bio značajan jer je najniži testirani tlak bio 200 bara.

5.7. UTJECAJ UVJETA scCO₂ EKSTRAKCIJE NA PRINOS FITOSTEROLA

Na slici 13 konturnim dijagramima prikazani su utjecaji interakcija ispitivanih faktora temperature, tlaka i protoka na prinos fitosterola u mg kg⁻¹. Statističkom obradom dobivenih rezultata uočeno je kako kvadratni model ($p = 0,024$; $R^2 = 0,864$ i nedostatak modela $p = 0,164$) prikazan u izrazu [6] najbolje opisuje utjecaj faktora primijenjenih u ovom istraživanju:

$$\begin{aligned} \text{Prinos fitosterola (mg kg}^{-1} \text{ ploda)} = & 296,411 - 29,628 \times \text{Temperatura} + 3,787 \times \text{Tlak} + 39,402 \\ & \times \text{Protok} + 0,029 \times \text{Temperatura} \times \text{Tlak} + 0,064 \times \text{Temperatura} \times \text{Protok} - 0,072 \times \text{Tlak} \times \text{Protok} \\ & + 0,170 \times \text{Temperatura}^2 - 0,005 \times \text{Tlak}^2 - 0,300 \times \text{Protok}^2 \end{aligned} \quad [6]$$



Slika 13. Konturni dijagrami utjecaja temperature (°C) i tlaka ekstrakcije (bar) (a), temperature (°C) i protoka (g min⁻¹) (b) te tlaka ekstrakcije (bar) i protoka (g min⁻¹) (c) na prinos fitosterola (mg kg⁻¹)

Iz samog modela kao i konturnih dijagrama na slici 13 te iz tablice 10 vidljivo je kako povećanjem tlaka i protoka dolazi do povećane ekstrakcije fitosterola bez obzira na primijenjenu temperaturu, pri čemu je protok značajan kao linearan, a tlak kao kvadratni faktor. Utjecaj temperature nije značajan dok je od ostalih faktora kvadratnog modela značajna interakcija tlaka i protoka. Naime, može se uočiti kako pri nižem protoku povećanjem tlaka raste udio fitosterola, dok se pri višem protoku povećanjem tlaka smanjuje. Slično tome, pri nižem tlaku povećanjem protoka raste udio fitosterola, dok pri višem tlaku i nižem protoku pada.

Brzina protoka otapala mora biti dovoljno visoka da osigura dobro iskorištenje ekstrakcije u kratkom vremenu, ali također treba omogućiti vrijeme dovoljno za kontakt između otapala i otopljenih tvari (Mendiola i sur., 2013). Povećanje protoka uzrokuje i povećanje intermolekularnih interakcija između CO₂ i ciljnih molekula, u ovom slučaju fitosterola i na taj način se povećava njihova topljivost što predstavlja pozitivan utjecaj. Međutim, povećanje protoka također će uzrokovati kraće vrijeme kontakta, odnosno vrijeme u kojem se otapalo zadržava u kontaktu s materijalom, čime je smanjen prijenos mase što predstavlja negativan utjecaj (Lu i sur., 2007). Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je stoga kako pri nižim tlakovim prevladava pozitivan utjecaj povećanja protoka, a pri višim negativan. Smanjenje iskorištenja β-karotena iz ploda šipka uzrokovano protocima većim od 3 mL min⁻¹ primijetili su i Machmudah i sur. (2008), a slično na primjeru ekstrakcije likopena iz rajčice opisuju i Zuknik i sur. (2012).

S druge strane, kako je ranije objašnjeno, povećanjem tlaka povećava se gustoća CO₂ što dovodi do povećanja topljivosti ciljnih komponenti. Povećanje tlaka također uzrokuje i povećanje u odbojnim silama između visoko komprimiranog otapala i otopljene tvari (Wang i sur., 2012). Naime, odbojne interakcije otapala i otopljene tvari nastaju zbog prevladavanja odbojnih sila među njima. Kao posljedica, prosječna gustoća otapala koje se nalazi u kontaktu s otopljenom tvari je smanjena je u odnosu na gustoću u cijelom sustavu. U interakciji s protokom, sukladno dobivenim rezultatima, pozitivan efekt povećanja tlaka na povećanje gustoće otapala prevladava pri nižim protocima, dok pri višim protocima porastom tlaka rastu odbojne interakcije.

Ekinci i Gürü (2014) u svom istraživanju provedenom na košticama breskve navode kako se povećanjem tlaka ekstrahira više ulja i β -sitosterola, što se objašnjava povećanjem gustoće CO₂, a time i snage otapala. Uočeno je kako udio ulja i β -sitosterola raste pri povećanju tlaka sa 180 na 200 bara, no daljnjim povećanjem tlaka nema značajnog povećanja udjela ulja i β -sitosterola. Nadalje, kako bi se istražio utjecaj brzine protoka superkritičnog CO₂ na količine ulja i β -sitosterola, autori su proučavali različite vrijednosti protoka CO₂ te je uočeno kako porastom brzine protoka do 6, odnosno 7 mL min⁻¹, raste udio ekstrahiranih β -sitosterola i ulja. Zbog kratkotrajne interakcije između superkritičnog CO₂ i koštica, daljnje povećanje brzine protoka rezultiralo je većom linearnom brzinom i manjim iskorištenjem ekstrakcije.

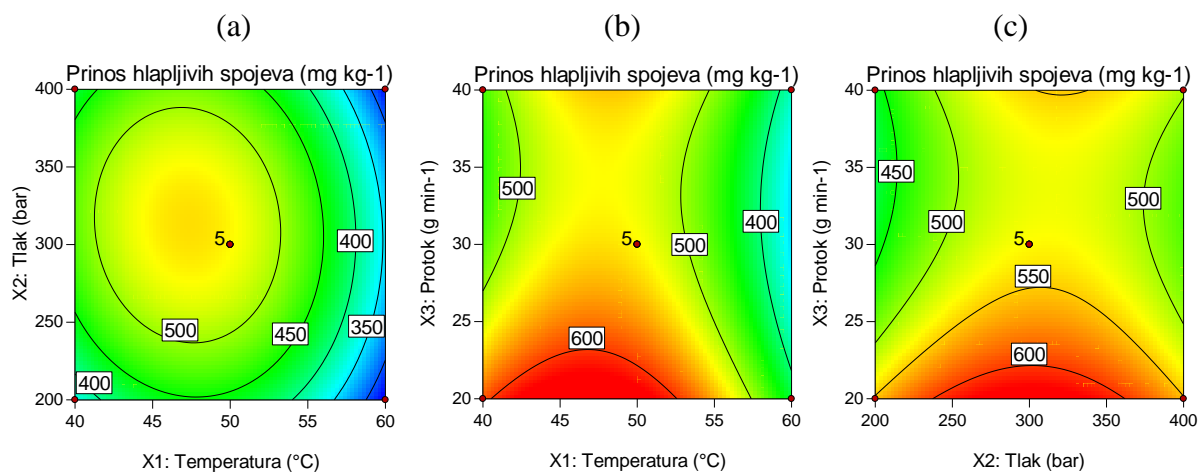
Xu i sur. (2011) koji su proveli istraživanje utjecaja superkritične ekstrakcije na peludu lotosa navode kako viša temperatura pri niskom tlaku dovodi do nižeg prinosa fitosterola što objašnjavaju izraženijim učinkom porasta temperature na pad gustoće CO₂ nego na tlak pare otopljene tvari. Do sličnih zaključaka došli su i Dąbrowski i sur. (2019) koji su istraživali udio fitosterola u scCO₂ ekstraktima lana. U našem istraživanju, međutim, utjecaj temperature na prinos fitosterola iz plodova mirte nije bio značajan što ide u prilog činjenici da utjecaji uvjeta scCO₂ snažno ovise o interakciji s matriksom odnosno razlikuju se ovisno o svojstvima materijala koji se ekstrahira (Uddin i sur., 2015). Dodatno, navedeni radovi izražavaju udio fitosterola u dobivenom lipofilnom ekstraktu, odnosno ulju, pa je moguće da je povećani prinos ekstrakcije triacilglicerola pri određenoj povišenoj temperaturi smanjio koncentraciju fitosterola.

5.8. UTJECAJ UVJETA $scCO_2$ EKSTRAKCIJE NA PRINOS HLAPLJIVIH SPOJEVA

Na slici 14 prikazani su konturni dijagrami dobiveni modeliranjem utjecaja ispitivanih faktora (tlaka, temperature i protoka) na prinos hlapljivih spojeva u $mg\ kg^{-1}$ ekstrahiranih plodova mirte. Statističkom obradom dobivenih rezultata načinjenom pomoću Design Experta uočeno je kako utjecaj uvjeta primijenjenih u ovom eksperimentu najbolje opisuje kvadratni model ($p = 0,018$; $R^2 = 0,876$ i nedostatak modela $p = 0,710$) prikazan u izrazu [7]:

$$\text{Prinos hlapljivih spojeva (mg kg}^{-1}\text{ ploda)} = -2090.814 + 114.555 \times \text{Temperatura} + 4.920 \times \text{Tlak} - 51.654 \times \text{Protok} - 0.013 \times \text{Temperatura} \times \text{Tlak} + 0.189 \times \text{Temperatura} \times \text{Protok} + 0.017 \times \text{Tlak} \times \text{Protok} - 1.230 \times \text{Temperatura}^2 - 0.008 \times \text{Tlak}^2 + 0.553 \times \text{Protok}^2 \quad [7]$$

Iz rezultata ANOVA-e prikazanih u tablici 10 uočeno je kako temperatura kao linearan i kvadratni faktor te tlak kao kvadratni faktor značajno utječu na prinos hlapljivih spojeva. Iz navedenih rezultata može se uočiti kako se najviši prinos hlapljivih spojeva postiže pri srednjim vrijednostima tlaka i temperature. Pri višim vrijednostima temperature prinos se smanjuje, što je očekivano, budući da dolazi pri povišenoj temperaturi može doći do degradacije termolabilnih komponenti.



Slika 14. Konturni dijagrami utjecaja temperature (°C) i tlaka ekstrakcije (bar) (a), temperature (°C) i protoka ($g\ min^{-1}$) (b) te tlaka ekstrakcije (bar) i protoka ($g\ min^{-1}$) (c) na prinos hlapljivih spojeva ($mg\ kg^{-1}$)

Na slici 14 prikazan je utjecaj protoka ($g\ min^{-1}$) i temperature (°C) na prinos hlapljivih spojeva te se može potvrditi kako interakcija ovih faktora nema značajan utjecaj na udio hlapljivih spojeva. Najviše ukupnih hlapljivih spojeva postiže se porastom temperature do određenih vrijednosti (oko 47 °C), dok se daljnjim povećanjem temperature smanjuje prinos

hlapljivih spojeva neovisno o primijenjenom protoku. Slično ponašanje zabilježeno je i za utjecaj tlaka za koji su maksimalne vrijednosti prinosa hlapljivih spojeva postignute pri tlakovima od oko 300 bara, odnosno u blizini centralne točke.

Slični rezultati koji opisuju značajan utjecaj tlaka i temperature na hlapljive spojeve zabilježeni su i u istraživanjima drugih autora. Na primjer, Zhao i Zhang (2013) pokazali su kako porast temperature s 40 °C na 60 °C dovodi do značajnog porasta prinosa ekstrakcije listova biljke *Moringa oleifera*, dok daljnje povećanje temperature na 80 °C ne uzrokuje značajni porast. Obzirom da porast temperature s jedne strane dovodi do smanjenja gustoće otapala, a s druge povećava tlak para i topljivost hlapljivih spojeva, prinos hlapljivih spojeva ovisiti će o kompleksnoj ravnoteži gustoće scCO₂ i hlapljivosti spojeva u uvjetima ekstrakcije. Također, hlapljivi spojevi često su termolabilni i moguća je njihova razgradnja pri povišenoj temperaturi.

Jedna od prednosti upotrebe scSCO₂ za ekstrakciju hlapljivih spojeva je mogućnost ostvarivanja visokih prinosa u nižem rasponu tlaka (90 - 120 bara) Marongiu i sur. (2003), ali viši tlakovi se često primjenjuju kako bi se iskoristio i dodatan utjecaj kompresije biljnog materijala koja dovodi do poboljšanja prijenosa mase i otpuštanja hlapljivih spojeva iz matriksa. Grosso i sur. (2008) u svom istraživanju također su zaključili kako tlak i temperatura utječu na iskorištenje i sastav hlapljivih komponenti, budući da mala varijacija ovih faktora dovodi do promjene gustoće superkritičnog otapala. Međutim, povećanjem tlaka pri istoj temperaturi, otapaju se i nehlapljive komponente koje kontaminiraju hlapljivo ulje. Povećanje temperature pri istom tlaku dovodi do smanjenja gustoće CO₂, što rezultira manjim iskorištenjem i početnim sastavom ulja bogatijim monoterpenskim ugljikovodicima. Stoga Yousefi i sur. (2019) preporučuju umjerene tlakove i temperature koji minimiziraju koekstrakciju drugih spojeva, povećavaju selektivnost ekstrakcije te tako optimiraju sastav hlapljivog ulja. Iz istog razloga, potpuniju usporedbu rezultata dobivenih ovim istraživanjem i rezultata drugih autora otežava činjenica da je u većini drugih istraživanja kao prinos hlapljivih spojeva razmatran ukupni prinos ekstrakcije jer pojedinačni hlapljivi spojevi nisu određivani.

Rezultate u kojima je pokazan vrlo sličan utjecaj tlaka i temperature na ekstrakciju hlapljivih spojeva iz komorača bazirano na udjelu *trans*-anetola određenog GC metodom dobili su Maitusong i sur. (2021). Temeljem središnjeg kompozitnog dizajna primijenjenog u njihovom istraživanju uočili su da je svaki od tri čimbenika (tlak, dinamičko vrijeme ekstrakcije i volumen modifikatora) imao značajan učinak na prinos ekstrakcije, pri čemu je

utjecaj tlaka bio najveći budući da se, kao što je spomenuto, povećanjem tlaka povećava topljivost ekstrahiranih spojeva. Nadalje, također navode da se topljivost ulja kontrolira ravnotežom između gustoće otapala i tlaka pare otopljene tvari budući da povećanje ekstrakcijskog tlaka dovodi do veće gustoće tekućine, što povećava topljivost analita.

5.9. REZULTATI OPTIMIRANJA UVJETA scCO₂ EKSTRAKCIJE

Kao praktični nedostatak superkritične ekstrakcije ističe se veliki broj faktora koji mogu utjecati na rezultate i trebaju biti ispitani prije pokretanja proizvodnje. Za racionalizaciju broja pokusa stoga se često koristi eksperimentalni dizajn uz upotrebu metodologije odzivnih površina (RSM). Box-Behnkenov dizajn pokusa koji je upotrijebljen u ovom istraživanju predstavlja jedan od najčešćih alata u optimiranju uvjeta scCO₂ ekstrakcije (Sharif i sur., 2014).

Gledajući iz perspektive troškova proizvodnje, za ekstrakciju ciljnih komponenti trebalo bi koristiti najniži mogući utrošak CO₂ te bi u optimizaciju bilo moguće uključiti minimizaciju tlaka i protoka ekstrakcije. S druge strane, zahvaljujući izuzetnoj tržišnoj vrijednosti bioaktivnih molekula koje je moguće ovom tehnikom ekstrahirati iz biljnih materijala, njihova značajno veća iskorištenja mogu povećati dobit od prodaje proizvoda i kompenzirati ili nadmašiti povećanje troškova proizvodnje izazvanih višim vrijednostima procesnih parametara. Stoga u ovom istraživanju utrošak CO₂, odnosno tlak i protok nisu uzeti u razmatranje prilikom optimiranja nego je za sve zavisne varijable zadano da budu u rasponu obuhvaćenom istraživanjem. Nadalje, uzevši u obzir jaku nelinearnost scCO₂ sustava i zamijećene razlike u utjecaju temperature, tlaka i protoka na pojedine ciljne komponente, optimiranje uvjeta ekstrakcije provedeno je zasebno za iskorištenje lipofilnog ekstrakta, udio PUFA te prinose sterola i hlapljivih spojeva plodova mirte. Na ovaj način moguće je preporučiti procesne parametre potrebne za dobivanje ekstrakata specifičnih sastava bioaktivnih komponenti i za određene namjene.

U tablici 11 prikazani su optimalni uvjeti za postizanje maksimalnih vrijednosti navedenih zavisnih varijabli. Za postizanje optimalnog iskorištenja ekstrakcije od 5,69 % potrebno je stoga primijeniti uvjete ekstrakcije na najvišem nivou testiranog raspona, odnosno temperaturu 60,0 °C, tlak 400,0 bara i protok 40 g min⁻¹. Mendiola i sur. (2013) navode kako se optimalni uvjeti superkritične ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz havajske spiruline (*Arthrospira platensis*) postižu pri maksimalno ispitivanom tlaku i temperaturi, odnosno 83,1 °C i 362 bara, pri čemu se postiže maksimalno iskorištenje ekstrakcije od 0,53 %. U

istraživanju Mendiola i sur. (2013) postignuto je maksimalno iskorištenje pri maksimalnim ispitivanim uvjetima tlaka i temperature, kao što je postignuto i u ovom istraživanju. Zermane i sur. (2014) navode kako se maksimalno iskorištenje superkritične ekstrakcije lišća mirte od 4,89 % postiže pri uvjetima temperature od 39,9 °C te tlaka od 300 bar, što je niže od uvjeta ove ekstrakcije. Međutim, dijelovi biljnog materijala upotrijebljeni za ekstrakciju nisu jednaki, stoga ne čudi razlika u optimalnim ekstrakcijskim uvjetima.

Tablica 11. Optimalni uvjeti scCO₂ ekstrakcije

Faktor	Iskorištenje (%)	Σ PUFA (% od ukupnih)	Prinos fitosterola (mg kg⁻¹ ploda)	Prinos hlapljivih spojeva (mg kg⁻¹ ploda)
Optimalna vrijednost	5,69	79,34	793,48	629,85
Temperatura (°C)	60,0	40,2	40,5	49,5
Tlak (bar)	400,0	235,7	225,0	298,0
Protok (g min ⁻¹)	40,0	31,1	32,5	20,3

Nadalje, za maksimalan udio sume PUFA od 79,34 % potrebni su znatno blaži ekstrakcijski uvjeti koji uključuju temperaturu 40,2 °C, tlak 235,7 bara i protok 31,1 g min⁻¹. Teslić i sur. (2020) u svojem istraživanju proveli su superkritičnu ekstrakciju ulja iz pšeničnih klica pri uvjetima tlaka od 250, 300 i 350 bar, temperature od 40, 50 i 60 °C te protoka od 0,2; 0,3 i 0,4 kg h⁻¹. Za maksimalni udio PUFA od 7,25 % u njihovom istraživanju upotrijebljeni su ekstrakcijski uvjeti tlaka od 350 bara, temperature od 50 °C te protoka od 0,4 kg h⁻¹ (66,67 g min⁻¹). Može se uočiti kako su za postizanje maksimalnog udjela PUFA upotrijebljene maksimalne vrijednosti tlaka i protoka te niža temperatura, što se prilično razlikuje od rezultata ovog istraživanja u kojem su upotrijebljeni znatno blaži uvjeti za maksimalan udio PUFA.

Vrlo slični ekstrakcijski uvjeti utvrđeni ovim istraživanjem za ekstrakciju PUFA, optimalni su i za ekstrakciju fitosterola te iznose 40,5 °C, 225,0 bara i protok 32,5 g min⁻¹. Primjenom navedenih uvjeta moguće je postići prinos sterola od 793,48 mg kg⁻¹ ploda mirte. Andras i sur. (2005) istražili su primjenu SFE na ekstrakciju β-sitosterola iz sjemenki hibiskusa. Istraživanje je provedeno pri tlakovima od 15 – 45 MPa (150 – 450 bar) i temperaturama od 40 – 60 °C. Iako je maksimalno povećanje tlaka i temperature rezultiralo većim prinosima ekstrahiranog biljnog ulja i njegovih komponenti, za ekstrakciju β-sitosterola je preporučena

optimalna temperatura od 50 °C. U istraživanju Sajfrtova i sur. (2010) provedena je SFE pri tlaku od 15 – 60 MPa (150 – 600 bar) i temperaturama od 40 – 80 °C na sjemenkama pasjeg trna. Maksimalna koncentracija β -sitosterola u ekstraktu postignuta je pri tlaku od 150 bara i temperaturi od 40 °C. Rezultati Sajfrtove i sur. (2010) također su slični su rezultatima ovog istraživanja te se može uočiti kako primjenom blažih uvjeta SFE postiže se viši prinos fitosterola.

S druge strane optimalni uvjeti scCO₂ za hlapljive spojeve iznosili su 49,5 °C, 298,0 bar i 20,3 g min⁻¹, odnosno za maksimalan prinos hlapljivih spojeva utvrđen u ovom radu, a koji iznosi 629,85 mg kg⁻¹ potrebni su nešto viši tlak i temperatura te niži protok nego za optimalnu ekstrakciju fitosterola.

U istraživanju Pereira i sur. (2016) kao uvjete za ekstrakciju eteričnog ulja iz plodova mirte primjenili su temperatura od 45 °C, tlak od 230 bar te protok scCO₂ od 5 g min⁻¹. Ove vrijednosti su međutim dobivene prethodnim istraživanjem iste grupe autora koje je uključilo optimizaciju scCO₂ lista mirte (Pereira i sur., 2013). Stoga, iako su optimalne vrijednosti za temperaturu slične u oba istraživanja, dobiveni rezultati potvrđuju potrebu za optimiranjem ekstrakcijskih uvjeta u skladu s biljnim materijalom koji se podvrgava ekstrakciji.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Superkrična CO₂ ekstrakcije učinkovita je tehnika za ekstrakciju lipofilnih spojeva iz plodova mirte pri čemu je primjenom različitih uvjeta temperature, tlaka i protoka scCO₂ dobiveno iskorištenje u rasponu od 4,75 % do 5,92 % s prosječnom vrijednosti 5,20 %.
2. U scCO₂ ekstraktima identificirano je ukupno 36 masnih kiselina od kojih je dominantna bila esencijalna *cis*-linolna kiselina s prosječnim udjelom od 76,83 %, a slijedile su palmitinska (8,52 %) i oleinska kiselina (7,29 %). Od skupina masnih kiselina najzastupljenije su bile PUFA s prosječnim udjelom 77,93 %.
3. U uzorcima scCO₂ ekstrakata plodova mirte identificirano je ukupno 7 fitosterola, a to su: kampesterol, 24-metilenkolesterol, stigmasterol, β-sitosterol, Δ5-avenasterol, Δ7-sitosterol te citrostadienol. Prosječan udio ukupnih fitosterola iznosi 14097,92 mg kg⁻¹ ekstrakta, a najzastupljeniji je β-sitosterol u udjelu 12465,34 mg kg⁻¹ čime je dokazano da plodovi mirte predstavljaju bogat izvor ovih spojeva.
4. U dobivenim ekstraktima također je identificirano 13 hlapljivih spojeva, čiji je prosječni ukupni udio 9019,64 mg kg⁻¹, pri čemu je najzastupljeniji mirtenil acetat u udjelu od 4296,81 mg kg⁻¹. Plodovi mirte uključeni u istraživanje pripadaju kemotipu CT2 s visokim udjelom mirtenil acetata i niskim udjelom α-pinena.
5. Primijenjena RSM metoda i Box-Behnkenov dizajn pokusa predstavljaju prikladnu platformu za modeliranje ekstrakcije scCO₂ lipofilnih spojeva plodova mirte. Iskorištenje ekstrakcije, odnosno količina dobivenog ekstrakta raste isključivo s porastom temperature. S druge strane, porastom temperature pada udio PUFA, dok je ekstrakcija fitosterola pod značajnim utjecajem interakcije tlaka i protoka, a najviši udio ukupnih hlapljivih spojeva postiže se pri srednjim vrijednostima tlaka i temperature.
6. Rezultati optimiranja uvjeta scCO₂ ekstrakcije ukazuju da je za postizanje optimalnog iskorištenja ekstrakcije od 5,69 % potrebno primijeniti najviše uvjete ekstrakcije temperaturu od 60,0 °C, tlak od 400,0 bara i protok od 40 g min⁻¹. Nadalje, najveći udio sume PUFA od 79,34 % postiže se pri temperaturi od 40,2 °C, tlaku od 235,7 bara i protoku od 31,1 g min⁻¹. Za optimalnu ekstrakciju fitosterola (793,48 mg kg⁻¹) potrebno je primijeniti uvjete temperature od 40,5 °C, tlaka od 225,0 bara i protoka od 32,5 g min⁻¹, a za optimalnu ekstrakciju hlapljivih spojeva (629,85 mg kg⁻¹) primjenjuje se temperatura od 49,5 °C, tlak od 298,0 bar i protok od 20,3 g min⁻¹. Primjenom navedenih uvjeta moguće je dobiti scCO₂ ekstrakte plodova mirte specifičnih sastava i za određene namjene.

7. POPIS LITERATURE

Ahangari H, King JW, Ehsani A, Yousefi M (2021) Supercritical fluid extraction of seed oils—A short review of current trends. *Trends Food Sci Technol* **111**, 249-260.

Ahmad T, Masoodi FA, Rather SA, Wani SM, Gull A (2019) Supercritical fluid extraction: A review. *J Biol Chem Chron* **5**, 114-122.

Ait-Amir B, Pougnet P, El Hami A (2020) Meta-model development. U: A. El Hami, P. Pougnet (ured.) *Embedded mechatronic systems 2*, ISTE Press Ltd, London, str. 157-187.

Aleksić V, Knežević P (2014) Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L., *Microbiol Res* **169**, 240-254. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.003>.

Aleksić V, Mimica-Dukić N, Simin N, Stanković Nedeljković N, Knežević P (2014) Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. *Phytomedicine* **21**, 1666-7113. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.08.013>.

Al-Snafi AE (2020) Constituents and pharmacology of *Onopordum acanthium*. *IOSR J Pharm* **10**, 7-14.

Andras CD, Simandi B, Orsi F, Lambrou C, Missopolinou-Tatala D, Panayiotou C, Domokos J, Doleschall F (2005) Supercritical carbon dioxide extraction of okra (*Hibiscus esculentus* L.) seeds. *J Sci Food Agric* **8**, 1415–1419.

Babu S, Jayaraman S (2020) An update on β -sitosterol: A potential herbal nutraceutical for diabetic management. *Biomed Pharmacother* **131**, 110702. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110702>.

Bai G, Ma C, Chen X (2021) Phytosterols in edible oil: Distribution, analysis and variation during processing. *Grain Oil Sci Technol* **4**, 33-44.

Balbino S, Repajić M, Obranović M, Medved AM, Tonković P, Dragović-Uzelac V (2021) Characterization of lipid fraction of Apiaceae family seed spices: Impact of species and extraction method. *J Appl Res Med Aromat Plants* **25**. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100326>.

Boelens MH, Jimenez R (1992) The chemical composition of Spanish myrtle oils. Part II. *J Essent Oil Res* **4**, 349-353. <https://doi.org/10.1080/10412905.1992.9698084>.

- Bowles EJ (2003) The chemistry of aromatherapeutic oils, 3 izd., Routledge, London.
- Bradesi P, Tomi F, Casanova J, Costa J, Bernardini AF (1997) Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica (France). *J Essent Oil Res* **9**, 283-288.
- Brunner G (2005) Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J Food Eng* **67**, 21–33.
- Burt SA, Vlieland R, Haagsman HP, Veldhuizen EJA (2005) Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *J Food Protect* **68**, 919-926.
- Cakir A (2004) Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. *Biochem Syst Ecol* **32**, 809-816. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.11.010>.
- Chanioti S, Katsouli M, Tzia C (2021) β -Sitosterol as a functional bioactive. U: Mushtaq M i Anwar F (ured.) A Centum of Valuable Plant Bioactives, Academic Press, str. 193-212.
- Correddu F, Maldini M, Addis R, Petretto GL, Palomba M, Battacone G, Pulina G, Nudda A, Pintore G (2019) *Myrtus communis* Liquor Byproduct as a Source of Bioactive Compounds. *Foods* **30**, 237. <https://doi.org/10.3390/foods8070237>.
- Czaplicki S, Ogrodowska D, Derewiaka D, Tańska M, Zadernowski R (2011) Bioactive compounds in unsaponifiable fraction of oils from unconventional sources. *Eur J Lipid Sci Technol* **113**, 1456–1464. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000410>.
- Dąbrowski G, Czaplicki S, Konopka I (2019) Fractionation of sterols, tocopherols and squalene in flaxseed oils under the impact of variable conditions of supercritical CO₂ extraction. *J Food Compos Anal* **83**, 103261.
- Dąbrowski G, Czaplicki S, Szustak M, Cichonska E, Gendaszewska-Darmach E, Konopka I (2022) Composition of flesh lipids and oleosome yield optimization of selected seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars grown in Poland. *Food Chem* **369** <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130921>.
- Dai Q, Yang Y, Chen K, Cheng Z, Ni Y, Li J (2019) Optimization of supercritical CO₂ operative parameters to simultaneously increase the extraction yield of oil and pentacyclic triterpenes from artichoke leaves and stalks by response surface methodology and ridge analysis. *Eur J Lipid Sci Technol* **121**, 1800120. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800120>.

- De Carvalho CC, Caramujo MJ (2018) The various roles of fatty acids. *Molecules* **23**, 2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>.
- De Zordi N, Cortesi A, Kikic I, Moneghini M, Baldan V, Sut S, Solinas D, Dall'Acqua S (2017) The Supercritical carbon dioxide extraction of ω -3, ω -6 lipids and β -sitosterol from Italian walnuts: A central composite design approach. *J Supercrit Fluids*. 10.1016/j.supflu.2017.02.020.
- Diop A, Sarr SO, Ndao S, Cissé M, Baldé M, Ndiaye B, Diop YM (2014) Effect of deep-fat frying on chemical properties of edible Vegetable oils used by senegalese households. *Afr J Food Agric Nutr Dev* **14**, 9418-9438. <https://doi.org/10.18697/ajfand.66.13315>.
- Ekinci M, Gürü M (2014) Extraction of oil and β -sitosterol from peach (*Prunus persica*) seeds using supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids* **92**, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.004>.
- Falconieri D, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E & Marzouki H (2010) Supercritical extraction of essential oils from natural matrices. *Acta Horti* **4**, 229-240. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.853.27>.
- Fey N (2020) Olives- *Olea europea* – Picture it Chemistry. <https://chempics.wordpress.com/2020/04/>. Pristupljeno 3. veljače 2022.
- Ghasemi E, Raofie F, Najafi NM (2011) Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem* **126**, 1449-1453.
- Giambanelli E, Ferioli F, D'Antuono LF (2020) The fate of bioactive compounds during traditional preparation of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) bulgur. *J Cereal Sci* **91**, 102890. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102890>.
- Giampieri F, Cianciosi D, Forbes-Hernández TY (2020) Myrtle (*Myrtus communis* L.) berries, seeds, leaves, and essential oils: New undiscovered sources of natural compounds with promising health benefits. *Food Front* **1**, 276-295. <https://doi.org/10.1002/fft2.37>.
- Grosso C, Coelho JP, Pessoa FLP, Fareleira JMNA, Barroso JG, Urieta JS, Palavra AF, Sovova H (2010) Mathematical modelling of supercritical CO₂ extraction of volatile oils from aromatic plants. *Chem Eng Sci* **65**, 3579-3590.

Grosso C, Ferraro V, Figueiredo AC, Barroso JG, Coelho JA, Palavra AM (2008) Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chem* **111**, 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.031>.

Gustinelli G, Eliasson L, Svelander C, Alminger M, Ahrné L (2018) Supercritical CO₂ extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) seed oil: Fatty acid composition and antioxidant activity. *J Supercrit Fluids* **135**, 91-97.

Hamid IA, Ismail N, Rahman N (2018) Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Selected Herbal Leaves: An Overview. *Mater Sci Eng* **358**, 12-37. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/358/1/012037>.

Hennia A, Nemmiche S, Dandlen S, Miguel MG (2019) *Myrtus communis* essential oils: Insecticidal, antioxidant and antimicrobial activities: A review. *J Essent Oil Res* **31**, 487-545.

HRN EN ISO 12228:2014-1 Životinjske i biljne masti i ulja — Određivanje količine pojedinačnih i ukupnih sterola-Metoda plinske kromatografije.

Hussain AY, Hussein HJ, Al-Rubaye AF (2021) Antifungal Efficacy of the crude Flavonoid, Terpenoid, and Alkaloid Extracted from *Myrtus communis* L. against *Aspergillus* species isolated from Stored Medicinal plants seeds in the Iraqi Markets. *J Biotechnol Research Center* **15**, 73-80.

ISO 12966-2:2017 Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters.

ISO 12966-4:2015 Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters.

Jerković I, Radonić A, Borčić I (2002) Comparative study of leaf, fruit and flower essential oils of Croatian *Myrtus communis* (L.) during a one-year vegetative cycle. *J Essen Oil Res* **14**, 266-270.

Jiang L, Zhao X, Xu J, Li C, Yu Y, Wang W, Zhu L (2019) The protective effect of dietary phytosterols on cancer risk: a systematic meta-analysis. *J Oncol*. <https://doi.org/10.1155/2019/7479518>.

Jokić S, Sudar R, Svilović S, Vidović S, Bilić M, Velić D, Jurković V (2013) Fatty acid composition of oil obtained from soybeans by extraction with supercritical carbon dioxide. *Czech J Food Sci* **31**, 116-125.

- Kaya DA, Ghica MV, Dănilă E, Öztürk Ş, Türkmen M, Albu Kaya MG, Dinu-Pîrvu CE (2020) Selection of optimal operating conditions for extraction of *Myrtus Communis* L. essential oil by the steam distillation method. *Molecules* **25**, 2399.
- Kostik V, Memeti S, Bauer B (2013) Fatty acid composition of edible oils and fats. *J Hyg Eng Des* **4**, 112-116.
- Laboureur L, Ollero M, Touboul D (2015) Lipidomics by Supercritical Fluid Chromatography. *Int J Mol Sci* **16**, 13868-13884. <https://doi.org/10.3390/ijms160613868>.
- Lu T, Gaspar F, Marriott R, Mellor S, Watkinson C, Al-Duri B, Santos R (2007) Extraction of borage seed oil by compressed CO₂: effect of extraction parameters and modelling. *J Supercrit Fluids* **41**, 68-73.
- Machmudah S, Kawahito Y, Sasaki M, Goto M (2008) Process optimization and extraction rate analysis of carotenoids extraction from rosehip fruit using supercritical CO₂. *J Supercrit Fluids* **44**, 308-314.
- Maheshwari P, Nikolov ZL, White TM, Hartel R (1992) Solubility of fatty acids in supercritical carbon dioxide. *J Am Oil Chem Soc* **69**, 1069-1076.
- Maitusong J, Aimila A, Zhang J, Mahinur B, Maiwulanjiang M, Aisa HA (2021) Process optimization for the supercritical carbon dioxide extraction of *Foeniculum vulgare* Mill. seeds aromatic extract with respect to yield and *trans*-anethole contents using Box-Behnken design. *Flavour Fragr J* **36**, 280– 291. <https://doi.org/10.1002/ffj.3643>.
- Marongiu B, Piras A, Pani F, Porcedda S, Ballero M (2003) Extraction, separation and isolation of essential oils from natural matrices by supercritical CO₂. *Flavour Fragrance J* **18**, 505-509.
- Martin J (2008) *Myrtus communis* berries close up - Wikimedia Commons, the free media repository. <https://www.plantea.com.hr/mirta/>. Pristupljeno 3. veljače 2022.
- Medjeldi S, Benrachou N, Bouchelaghem S, Jallouli S, Farès N, Elkahoui S (2022) Essential Oils and Alcohol Extracts of Northwest Tunisia *M. communis* and *M. spicata*: Phytocompounds, Antioxidant and Antibacterial Activities. *Curr Bioact Compd* **18**, 44-52.
- Mendiola JA, Herrero M, Castro-Puyana M, Ibanez E (2013) Supercritical Fluid Extraction. U: Prado JM i Rostagno MA (ured.) Natural Product Extraction: Principles And Applications, 21. izd., Royal Soc Chemistry, Cambridge, str. 196-230.

Mingrou L, Guo S, Ho CT, Bai N (2022) Review on chemical compositions and biological activities of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *J Food Biochem*, e14119. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14119>.

Moghadasian MH (2000) Pharmacological properties of plant sterols in vivo and in vitro observations. *Life Sci* **67**, 605-615. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00665-2](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00665-2).

Natolino A, Da Porto C (2019) Supercritical carbon dioxide extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil: Kinetic modelling and solubility evaluation. *J Supercrit Fluids* **151**, 30-39.

Nattagh-Eshtivani E, Barghchi H, Pahlavani N, Barati M, Amiri Y, Fadel A, Ghavami A (2022) Biological and pharmacological effects and nutritional impact of phytosterols: A comprehensive review. *Phytother Res* **36**, 299-322.

Nogueira MS, Scolaro B, Milne GL, Castro IA (2019) Oxidation products from omega-3 and omega-6 fatty acids during a simulated shelf life of edible oils. *LWT* **101**, 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.044>.

Özcan MM, Al Juhaimi F, Ahmed IAM, Babiker EE, Ghafoor K (2020) Antioxidant activity, fatty acid composition, phenolic compounds and mineral contents of stem, leaves and fruits of two morphs of wild myrtle plants. *J Food Meas Charact* **14**, 1376-1382. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00387-3>.

Pavlović N, Valek Lendić K, Miškulin M, Moslavac T, Jokić S (2016) Supercritical CO₂ extraction of Sea Buckthorn. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* **5**, 55-61.

Pereira PC, Cebola MJ, Bernardo-Gil MG (2009) Evolution of the yields and composition of essential oil from Portuguese myrtle (*Myrtus communis* L.) through the vegetative cycle. *Molecules* **14**, 3094-3105. <https://doi.org/10.3390/molecules14083094>.

Pereira PC, Bernardo-Gil MG, Cebola MJ, Mauricio E, Romano A (2013) Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves. Response surface optimization. *J Supercrit Fluids* **83**, 57-64.

Pereira PC, Cebola MJ, Oliveira MC, Bernardo-Gil MG (2016) Supercritical Fluid Extraction vs Conventional Extraction of Myrtle Leaves and Berries: Comparison of Antioxidant Activity and Identification of Bioactive Compounds. *J Supercrit Fluids* **113**, 1-47. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.09.006>.

- Pereira PC, Mauricio EM, Duarte MP, Lima K, Fernandes AS, Bernardo-Gil G, Cebola MJ (2022) Potential of supercritical fluid myrtle extracts as an active ingredient and co-preservative for cosmetic and topical pharmaceutical applications. *Sustainable Chem Pharm* **28**, 100739.
- Plat J, Nichols JA, Mensink RP (2005) Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J lipid res* **46**, 2468-2476.
- Pollier J, Vancaester E, Kuzhiumparambil U, Vickers CE, Vandepoele K, Goossens A, Fabris M (2019) A widespread alternative squalene epoxidase participates in eukaryote steroid biosynthesis. *Nat Microbiol* **4**, 226–233. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0305-5>.
- Repajić M, Cegledi E, Palčić I, Marčac N, Dragović-Uzelac V (2021) Essential oils in wild Istrian fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): Variability in the content and composition. Book of Abstracts of the 13th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH; Babić J, Šubarić D, Jašić M; Osijek i Tuzla, 134-134.
- Rocha-Uribe J, Perez J, Kaul H, Rubio G, Alcocer C (2011) Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO₂. *J Supercrit Fluids* **56**, 174-178. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.12.007>.
- Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, Karim AA, Abbas KA, Norulaini NAN, Omar AKM (2009) Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review, *J Food Eng* **95**, 240-253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026>.
- Saini RK, Keum YS (2018) Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review. *Life sci* **203**, 255-267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.049>.
- Sajfirtova M, Ličkova I, Wimmerova M, Sovova H, Wimmer Z (2010) β-Sitosterol: Supercritical Carbon Dioxide Extraction from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Seeds. *Int J Mol Sci* **11**, 1842-1850. <https://doi.org/10.3390/ijms11041842>.
- Şan B, Nurhan Yildirim A, Polat M, Yildirim F (2015) Chemical Compositions of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes Having Bluish-Black and Yellowish-White Fruits. *Erwerbs-Obstbau* **57**, 203-210. <https://doi.org/10.1007/s10341-015-0254-6>.
- Serce S, Ercisli S, Sengul M, Gunduz K, Orhan E (2010) Antioxidant activities and fatty acid composition of wild grown myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits. *Pharmacogn Mag* **6**, 9-12. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.59960>.

- Sharif KM, Rahman MM, Azmir J, Mohamed A, Jahurul MHA, Sahena F, Zaidul ISM (2014) Experimental design of supercritical fluid extraction - A review. *J Food Eng* **124**, 105-116.
- Shen W, Wang Y, Shao W, Wang Q, Jiang Z, Hu H (2021) Dietary plant sterols prevented cholesterol gallstone formation in mice. *Food Funct* **12**, 11829-11837. <https://doi.org/10.1039/d1fo02695j>.
- Sonboli A, Babakhani B, Mehrabian AR (2006) Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *J Biosci* **61**, 160-164.
- Tang Y, Zhou J, Hooi SC, Jiang YM, Lu GD (2018) Fatty acid activation in carcinogenesis and cancer development: Essential roles of long-chain acyl-CoA synthetases. *Oncol Lett* **16**, 1390-1396. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8843>.
- Teixeira GL, Ghazani SM, Corazza ML, Marangoni AG, Ribani RH (2018) Assessment of subcritical propane, supercritical CO₂ and Soxhlet extraction of oil from sapucaia (*Lecythis pisonis*) nuts. *J Supercrit Fluids* **133**, 122-132.
- Teslić N, Bojanić N, Čolović D, Fišteš A, Rakić D, Solarov MB, Pavlić B (2021) Conventional versus novel extraction techniques for wheat germ oil recovery: multi-response optimization of supercritical fluid extraction. *Sep Sci Technol* **56**, 1546-1561.
- Tyśkiewicz K, Konkol M, Rój E (2018) The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. *Molecules* **23**, 2625.
- Uddin MS, Sarker MZI, Ferdosh S, Akanda MJH, Easmin MS, Bt Shamsudin SH, Yunus KB (2015) Phytosterols and their extraction from various plant matrices using supercritical carbon dioxide: a review. *J Sci Food Agric* **95**, 1385-1394.
- Uredba Komisije (EU) br. 686 (2014) Uredba Komisije (EU) br. 686/2014 od 20. lipnja 2014. o izmjeni uredaba (EZ) br. 983/2009 i (EU) br. 384/2010 u pogledu uvjeta za uporabu određenih zdravstvenih tvrdnji koje se odnose na učinak biljnih sterola i biljnih stanola na snižavanje LDL-kolesterola u krvi. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/ALL/?uri=CELEX:32014R0686>. Pristupljeno 6. lipnja 2022.
- Usai M, Marchetti M, Culeddu N, Mulas M (2018) Chemical Composition of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries Essential Oils as Observed in a Collection of Genotypes. *Molecules* **23**, <https://doi.org/10.3390/molecules23102502>.

- Vecka M, Staňkova B, Kutová S, Tomášová, Tvrzická E, Žák A (2019) Comprehensive sterol and fatty acid analysis in nineteen nuts, seeds, and kernel. *SN Appl Sci* **1**, 1531. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1576-z>.
- Wang H, Liu Y, Wei S, Yan Z (2012) Application of response surface methodology to optimise supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from *Cyperus rotundus* Linn. *Food Chem* **132**, 582–587.
- Wannes WA, Mhamdi B, Marzouk B (2009) Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. *Food Chem* **112**, 621–626. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.018>. F
- Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Marzouk B (2010) Glycerolipid and fatty acid distribution in pericarp, seed and whole fruit oils of *Myrtus communis* var. *italica*. *Ind Crop Prod* **31**, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.006>.
- Xu X, Dong J, Mu X, Sun L (2011) Supercritical CO₂ extraction of oil, carotenoids, squalene and sterols from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) bee pollen. *Food Bioprod Process* **89**, 47–52. <https://sci-hub.se/10.1016/j.fbp.2010.03.003>.
- Yang B, Kallio H (2002) Composition and physiological effects of Sea Buckthorn (*Hippophae*) lipids, *Trends Food Sci Technol* **13**, 160–167. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00136-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00136-X).
- Yang B, Karlsson RM, Oksman PH, Kallio HP (2001) Phytosterols in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries: Identification and Effects of Different Origins and Harvesting Times. *J Agric Food Chem* **49**, 5620–5629. <https://doi.org/10.1021/jf010813m>.
- Yousefi M, Rahimi-Nasrabadi M, Pourmortazavi SM, Wysokowski M, Jesionowski T, Ehrlich H, Mirsadeghi S (2019) Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC Trends Anal Chem* **118**, 182–193.
- Zermane A, Larkeche O, Meniai AH, Crampon C, Badens E (2014) Optimization of essential oil supercritical extraction from Algerian *Myrtus communis* L. leaves using response surface methodology. *J Supercritl Fluids* **85**, 89–94. <https://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.002>.
- Zhao S, Zhang D (2013) Supercritical fluid extraction and characterisation of *Moringa oleifera* leaves oil. *Sep Purif Technol* **118**, 497–502.
- Zuknik MH, Norulaini NN, Omar AM (2012) Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene: A review. *J Food Eng* **112**, 253–262.

8. SAŽETAK

Iva Škarica

Primjena metode odzivnih površina u optimiranju uvjeta superkritične CO₂ ekstrakcije plodova mirte (*Myrtus communis* L.)

U ovom istraživanju, za određivanje utjecaja te optimizaciju uvjeta ekstrakcije scCO₂ za izolaciju lipofilnog ekstrakta iz plodova mirte, primijenjena je metoda odzivnih površina uz Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn. Promatrani faktori uključili su temperaturu (40 – 60 °C), tlak (200 – 400 bar) i protok (20 – 40 g min⁻¹), a u dobivenim ekstraktima plinskom kromatografijom su određeni sastav masnih kiselina, fitosterola i hlapljivih spojeva. Dominantna masna kiselina u ekstraktima bila je esencijalna *cis*-linolna (C18:2c) s udjelom od 76,83 %. Nadalje, po prvi puta objavljeni rezultati o udjelu i sastavu fitosterola u plodovima mirte pokazuju visoki ukupni udio fitosterola od 14097,92 mg kg⁻¹ ekstrakta, dok je najzastupljeniji bio β-sitosterol. Od hlapljivih spojeva najzastupljeniji je bio mirtenil acetat u udjelu od 4296,8 mg kg⁻¹. Regresijski modeli izrađeni na temelju dobivenih rezultata za iskorištenje ekstrakcije, udio ukupnih PUFA, prinos fitosterola i prinos hlapljivih spojeva pokazali su dobru preciznost. Optimalno iskorištenje ekstrakcije od 5,69 % dobiveno je na najvišem nivou testiranog raspona, odnosno pri temperaturi 60,0 °C, tlaku 400,0 bara i protoku 40 g min⁻¹. Međutim, najviši prinos hlapljivih spojeva (629,85 mg kg⁻¹) dobiven je pri znatno blažim uvjetima (49,5 °C, 298,0 bar i 20,3 g min⁻¹) dok je za optimalan prinos ekstrakcije fitosterola bilo potrebno primijeniti uvjete temperature od 40,5 °C, tlaka od 225,0 bara i protoka od 32,5 g min⁻¹. Rezultati pokazuju potencijal plodova mirte kao izvora bioaktivnih lipofilnih spojeva te učinkovitost superkritičnog CO₂ u njihovoj ekstrakciji.

Ključne riječi: Mirta, ekstrakcija superkritičnim CO₂, masne kiseline, fitosteroli, hlapljivi spojevi

9. SUMMARY

Iva Škarica

Application of response surface methodology for the optimization of the supercritical CO₂ extraction of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit

In this study, the response surface methodology with the Box-Behnken experimental design was applied to determine the effect and optimize the scCO₂ extraction conditions to isolate lipophilic extract from myrtle fruit. Temperature (40 - 60 °C), pressure (200 - 400 bar), flow (20 - 40 g min⁻¹) and the composition of fatty acids, phytosterols, and volatile compounds were determined in the extracts using Gas Chromatography. The dominant fatty acid in the extracts was essential *cis*-linolenic (c18:2c) with a proportion of 76,83 %. Furthermore, for the first time published results on the content and composition of phytosterols in myrtle fruits show a high total phytosterol content of 14097,92 mg kg⁻¹ extract, while the most common was β -sitosterol. Myrtenyl acetate was the most common volatile compound, in the proportion of 4296,8 mg kg⁻¹. Regression models developed based on the obtained results for extraction yield, the proportion of total PUFA, and also yield of sterols and volatile compounds showed good accuracy. The optimal extraction yield of 5,69 % was obtained at the highest level of the tested range, i.e. at a temperature of 60,0 °C, a pressure of 400,0 bar, and a flow rate of 40 g min⁻¹. However, the highest yield of volatile compounds (629,85 mg kg⁻¹) was obtained under significantly milder conditions (49,5 °C, 298,0 bar, and 20,3 g min⁻¹). In contrast, the optimal yield of phytosterol extraction required applying conditions of a temperature of 40,5 °C, a pressure of 225,0 bar, and a flow of 32,5 g min⁻¹. The results show the potential of myrtle fruits as a source of bioactive lipophilic compounds and the efficiency of supercritical CO₂ in their extraction.

Key words: Myrtle, Supercritical Fluid Extraction, Fatty Acids, Phytosterols, Volatile Compounds