

INOVATIVNE TEHNOLOGIJE U EKSTRAKCIJI BIOLOŠKI VAŽNIH MOLEKULA

Aleksandra Cvetanović¹, Marija Radojković¹, Saša Đurović¹, Pavle Mašković², Zoran Zeković¹

Izvod: Veliki biološki potencijal biljnih proizvoda glavni je razlog njihove široke upotrebe u proizvodnji dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane, koja pored zadovoljavajućih nutritivnih svojstava, ispoljava i određene farmakološke i fiziološke efekte. Poslednjih godina došlo je do značajnog napretka u procesima izolovanja farmakološki aktivnih jedinjenja, pre svega zahvaljujući novim naučnim saznanjima vezanim za mehanizme izdvajanja jedinjenja iz složenih matriksa. Danas ekstrakcioni procesi zauzimaju značajno mesto u nauci, a posebni fokus svetske nauke usmeren je ka „zelenim“ tehnologijama. Razvoj takvih tehnologija implicira upotrebu „zelenih“ rastvarača, među kojima su posebno značajni sub- ili superkritičnih fluida kao i jonske tečnosti.

Ključne reči: ekstrakcija, lekovito bilje, savremene ekstrakcione tehnike, subkritična voda, superkritični ugljendioksid

Uvod

Vekovima unazad upotreba lekovitog bilja u narodnoj medicini i ishrani je široko rasprostranjena. Lečenje biljem je jedna od najstarijih ljudskih veština, koja je svojom vekovnom primenom utrla put savremenoj medicini. Različite biljne vrste iz bogate riznice narodne medicine usle su u školsku medicinu. Veliki broj aktivnih sastojaka lekovitog bilja izolovan je u čistom stanju, određena im je hemijska struktura, a zatim su i sintetizovani. Međutim, bez obzira na izuzetne uspehe organske sinteze, izvestan broj farmakološki aktivnih supstanci nije ni do danas sintetizovan ili je njihova sinteza samo od akademskog značaja. Nesumnjivo i naučno je dokazano da je za veliki broj aktivnih principa biljaka nophodno njihovo ekstrahovanje i izolovanje iz prirodnih izvora.

Iako se proces ekstrakcije vekovima unazad koristi za dobijanje biološki značajnih proizvoda, on još uvek predstavlja svojevrsni izazov, pre svega zbog složenosti sastava uzoraka iz kojih se komponente ekstrahuju. Uspešnost procesa ekstrakcije u mnogome zavisi od osobina samog biljnog materijala, odnosno od karakteristika biljnog tkiva. Danas se na industrijskom nivou primenjuju različiti procesi za dobijanje biljnih ekstrakata sa odeđenim biopotencijalom. Jedan od bitnih uslova koje biljni ekstrakti treba da zadovolje jeste biološka aktivnost pri malim koncentracijama. Za ostvarenje ovog uslova na raspolaganju je veliki broj konvencionalnih, kao i savremenih ekstrakcionih tehnika.

Biljni ekstrakti predstavljaju uzorke složenog hemijskog sastava, a sam željeni analit koji se iz uzorka izoluje je obično veoma čvrstim vezama vezan za matriks

¹Tehnološki fakultet, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija (a.c.istrazivac@gmail.com);

²Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija

uzoraka, tako da poznavanje tipa uspostavljenih veza predstavlja preduslov za uspešnost procesa ekstrakcije. Efekti matriksa spadaju u najmanje razjašnjene fenomene u procesima ekstrakcija. Ovi efekti su često nepredvidivi, i oni u značajnoj meri utiču na efikasnost procesa. Čak i ako su supstance dobro rastvorne u primenjenom rastvaraču efikasnost ekstrakcije može biti nezadovoljavajuća ukoliko su analiti zarobljeni u matriksu različitim mehanizmima. Ovi fenomeni objašnjavaju različitu efikasnost procesa ekstrakcije istog analit/rastvarač sistema u različitim uzorcima. Pojedine ekstrakcione tehnike nisu u stanju da prevaziđu izuzetno izražene efekte matriksa, što ujedno predstavlja i njihov najznačajniji nedostatak (Švarc-Gajić, 2012).

Tradicionalne tehnike ekstrakcije uključuju najrazličitije šaržne ili polušaržne postupci, kao što su: maceracija, remaceracija, digestija i perkolacija, koje propisuje farmakopeja, ili postupke kontinualne ekstrakcije, najčešće protivstrujne višestupne ili diferencijalne ekstrakcije. Najčešće primenjeni rastvarači u procesu ekstrahovanja tradicionalnim postupcima jesu organski rastvarači, koji imaju niz nedostataka, a koji se pre svega odnose na njihov negativni uticaj na zdravlje i životnu sredinu. Počevši od poslednje decenije 20. veka pa sve do danas, sve su izraženiji naponi da se razviju tehnologije obzirne prema životnoj sredini tako da se najveći deo savremenih istraživanja fokusira na razvoj i primenu „čistih“ tehnologija. Posebna pažnja se posvećuje razvoju hemijskih procesa kod kojih se koriste rastvarači koji ne zagađuju životnu sredinu. U tu svrhu, sve veću popularnost dobija upotreba sub- ili superkritičnih fluida.

Savremene ekstrakcione tehnike

Konvencionalna ekstrakcija lekovitog bilja se najčešće izvodi koristeći čitav niz lako isparljivih organskih rastvarača, poput etil-etra, metilen-hlorida, hloroforma, benzola i sl. (Damjanović, 2005). Navedeni organski rastvarači nisu dovoljno selektivni jer rastvaraju i teško isparljive komponente velikih molekulskih masa kao što su smole, masne komponente, pigmenti i druge prateće komponente. Iz ekstrakta se korišćeni rastvarači uklanjaju uparavanjem pod sniženim pritiskom, ali u krajnjem proizvodu oni ipak zaostaju u tragovima. Ustanovljeno je da prisustvo organskih rastvarača u tragovima u većini slučajeva štetno deluje na ljudski organizam, kao i na senzorna svojstva proizvoda (Vidović, 2011). Pored toga, tradicionalne tehnike ekstrakcije podrazumevaju dugo vreme izvođenja procesa, velike količine uzoraka i organskih rastvarača, što ove procese čini neekonomičnim i nepogodnim sa aspekta održivog razvoja.

Poslednjih decenija veliki napredak je ostvaren u polju izolacije biološki aktivnih molekula, te se primenom savremenih ekstrakcionih tehnika omogućava selektivno izdvajanje analita iz kompleksnih matriksa. Savremene ekstrakcione tehnike uključuju upotrebu rastvarača izmenjenih fizičko-hemijskih osobina, ili medijuma drugačijih od klasičnih rastvarača.

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija ili ultrazvučna ekstrakcija je najčešće korišćena savremena ekstrakciona tehnika. Njenom primenom moguće je ostvariti veću reproduktivnost u kraćem vremenskom periodu u odnosu na tradicionalne tehnike ekstrakcija. Fenomen koji dominira u procesu ekstrakcije ultrazvukom jeste kavitacija

koja nastaje prostiranjem ultrazvuka kroz neki medijum. Tom prilikom dolazi do formiranja mikromehurića vazduha usled naizmeničnog udaljavanja i približavanja molekula. Brza kompresija mehurića ispunjenih vazduhom oslobađa ogromnu količinu energije, koja se karakteriše dramatičnim porastom temperature i pritiska (Švarc-Gajić, 2012). Prednost korišćenja ultrazvuka leži i u činjenici da se ultrazvučni talasi prostiru kroz bilo koji medijum, te je izbor rastvarača koji se mogu uzeti u obzir kod ovog tipa ekstrakcije dosta širok. Treba imati u vidu da usled delovanja ultrazvuka dolazi do drastičnih promena u samom medijumu, te su moguće disocijacije molekula i nastanak slobodnih radikala na račun razgradnje željenog analita. Dalje, često se tokom procesa ultrazvučnog delovanja generišu visoke temperature koje mogu izazvati prelazak pojedinih molekula u više energetske stanje, odnosno njihovu ekscitaciju i degradaciju. Stoga, proces je neophodno voditi pod jasno optimizovanim uslovima za svaki uzorak, a naročito ukoliko je cilj ekstrakcije izolovanje analita prisutnih u niskim koncentracijama u matriksu.

Mikrotalasno potpomognuta ekstrakcija (MAE) ili, jednostavnije, mikrotalasna ekstrakcija je nova ekstrakciona tehnika koja kombinuje tradicionalnu ekstrakciju rastvaračem i mikrotalase. Mikrotalasna energija se efikasno prenosi do materije putem molekulskih interakcija sa elektromagnetnim poljem, pri čemu se ostvaruje brzi transfer energije do rastvarača i materijala (Criado i sar., 2004). Direktna interakcija mikrotalasa sa molekulima rastvarača izaziva brzo zagrevanje (Lay-Keow i Michel, 2003). Između ostalog, ona se izuzetno uspešno može primenjivati za izolaciju polifenolnih jedinjenja, te se danas ona smatra potencijalnom alternativom tradicionalnoj čvrsto-tečnoj ekstrakciji za ekstrakciju metabolita iz biljaka.

Od velikog broja savremenih ekstrakcionih tehnika, posebno mesto zauzimaju tehnike kod kojih se ekstrakcija izvodi uz pomoć fluida pod povišenim pritiskom. Fluidi pod pritiskom ili po drugim definicijama fluidi visoke difuzivnosti jesu zapravo fluidi koji se nalaze u stanju povišene temperature i pritiska, odnosno stanja u kome oni postaju fluidi visoke difuzivne moći. Ekstrakcija fluidima pod pritiskom zapravo je zasnovana na činjenici da se brzina prenosa mase može menjati promenama vrednosti pritiska i temperature. Povećanjem temperature dolazi do povećanja rastvorljivosti analita, slabljenja veze između analita i matriksa iz kojeg se izdvaja, a samim tim i do olakšane difuziju analita. Povećanje temperature uslovljava smanjenje viskoziteta fluida, što omogućava njegovo bolje prodiranje u pore matriksa. Ujedno dovodi do smanjenja površinskog napona rastvarača, te omogućava bolje „vlaženje“ materijala. Ovakvi fluidi poseduju karakteristične fizičko-hemijske osobine u odnosu na fluide pod ambijentalnim uslovima. Malim promenama u gustini fluida može se uspešno regulisati prinos i sastav dobijenog ekstrakta, tako da ovaj način ekstrakcije pruža neuobičajeno široke mogućnosti za selektivnu ekstrakciju, frakcionisanje i prečišćavanje prirodnih proizvoda. Zbog ovakvih svojih prednosti, ekstrakcija fluidima pod povišenim pritiskom predstavlja dobru alternativu klasičnim postupcima ekstrakcije, i posebno je interesantana za prehrambenu i farmaceutsku industriju.

Razvoj analitičkih tehnika i njihova usavršena osetljivost su dovele do razvoja tzv. ekstrakcionih tehnika bez rastvarača, bitnih sa zdravstvenih aspekata i aspekata očuvanja životne sredine. Ove tehnike koriste zapreminu rastvarača od svega nekoliko mikrolitara, te se njima mogu ekstrahovati samo ograničene količine supstanci. Tehnike

ekstrakcije superkritičnim fluidima se mogu smatrati tehnikama bez rastvarača, s obzirom da primenjeni ekstragens ne poseduje većinu karakteristika uobičajenih rastvarača.

Ekstrakcija fluidima u superkritičnom stanju

Ekstrakcija fluidima u superkritičnom stanju, superkritična ekstrakcija ili po navodima nekih autora nadkritična ekstrakcija, je operacija prenosa mase zasnovana na činjenici da pojedini gasovi postaju izuzetno moćni rastvarači (ekstragensi) kada se nađu u blizini svoje kritične tačke, odnosno u svojoj nadkritičnoj oblasti (Nikolovski, 2009). Fizičko-hemijske karakteristike fluida u superkritičnom stanju se nalaze između osobina gasova i tečnosti što ih čini jako atraktivnim u polju ekstrakcije. Oni se ponašaju kao izuzetno pokretne tečnosti, kombinujući dobre solvatacione osobine tečnosti i brzi transfer mase koji se odigrava u gasovima. Vrednost viskoziteta ovakvih fluida su jedan red veličine niže od vrednosti viskoziteta tečnih rastvarača, a vrednosti koeficijenata difuzije su jedan red veličine viši od onih za tečne rastvarače. Nizak viskozitet i površinski napon blizak gasovima dozvoljava superkritičnim fluidima bolju penetraciju u pore čvrstog uzorka. Kao posledica brzina ekstrakcije biva znatno povećana u poređenju sa konvencionalnim postupcima, omogućavajući da proces bude završen u veoma kratkom periodu.

Ugljenik (IV)-oksid danas predstavlja najčešće korišćeni superkritični fluid. Razlog ovome leži u činjenici da je ovaj gas netoksičan, nezapaljiv, fiziološki inaktivan, hemijski inertan, tako da nema opasnosti od toksičnih primesa koje zaostaju u ekstraktu. Pored ovoga, pomenuti rastvarač ispoljava dobre solvatacione osobine prema nepolarnim i umereno polarnim jedinjenjima, te u potpunosti zamenjuje toksične organske rastvarače i dostupan je po povoljnoj ceni. Sa druge strane, niska vrednost kritične temperature (31,1°C) omogućava ekstrakciju na relativno niskim temperaturama, što je od velikog značaja za ekstrakciju termički nestabilnih supstanci (Ozer i sar., 1996).

Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju

Pregrejana ili subkritična voda je zapravo voda zagrejana do temperature iznad svoje temperature ključanja (100°C), a ispod kritične temperature (374°C), i pod pritiskom čija je vrednost dovoljno visoka da je zadrži u tečnom stanju. Pod ovakvim uslovima, svojstva vode kao rastvarača se menjaju u širokom opsegu (Cvetanović, 2016). Zapravo, njene osobine se menjaju od graničnih uslova kada ona rastvara polarne supstance na ambijentalnim uslovima temperature i pritiska do mogućnosti rastvaranja parafina, aromatičnih i drugih nepolarnih jedinjenja u stanju bliskom kritičnom. Posebnu pažnju privlači činjenica da subkritična voda u značajnoj meri rastvara jedinjenja koja su umereno rastvorna ili čak i vrlo slabo rastvorna u vodi sobne temperature, dok se u isto vreme rastvorljivost jedinjenja koja su dobro rastvorna u vodi na sobnoj temperaturi (polarna i umereno polarna jedinjenja) ne menja bitnije dovođenjem vode u subkritično stanje. Ujedno, zbog svoje niske cene, potpune

netoksičnosti i visoke reaktivnosti mogućnost upotrebe vode pod određenim eksperimentalnim uslovima izaziva veliko interesovanje (Cvetanović, 2016).

Temperatura do koje se voda zagreva zavisi isključivo od analita koji se ekstrahuju, a sa promenom primjenog pritiska njena polarnost se menja. Pri zagrevanju vode dolazi do značajnog pada njene polarnosti pri čemu nastaje rastvarač selektivan prema umereno-polarnim jedinjenjima, a takođe dolazi i do pada njenog viskoziteta, gustine i površinskog napona što takođe doprinosi porastu efikasnosti. U kritičnoj tački gustina je čak trostruko niža od one na sobnoj temperaturi i iznosi 0,32 g/ml (Švarc-Gajić, 2012). Dielektrična konstanta je jedan od najznačajnijih parametara polarnosti rastvarača, koja se jednostavnim zagrevanjem vode od sobne temperature (25°S) do 250°S menja od 80 do 27. Tako se voda zagrejana na 300°S ponaša kao umereno polaran rastvarač, kao što su metanol ili acetonitril. Zagrevajući vodu do 250°S rastvorljivost umereno polarnih jedinjenja se povećava 4-5 redova veličine (Švarc-Gajić, 2012). Međutim, voda se kao ekstragens još uvek ne eksploatiše u dovoljnoj meri prvenstveno zbog nedostataka literaturnih podataka o fizičko-hemijskim osobinama sub- i superkritične vode, zbog nedovoljnog broja opisanih aplikacija, kao i zbog rigoroznih uslova za njen prelaz u subkritično stanje (Švarc-Gajić, 2012).

Zaključak

Prvi korak u procesu izolacije bioaktivnih molekula je njihova ekstrakcija iz prirodnih izvora. Proces izolacije željenog analita je često otežan usled pristupstva ogromnog broja interferirajućih komponenata, ili zbog prisustva željenog analita u izuzeno niskim koncentracijama. Poslednjih godina ostvaren je veliki napredak na polju ekstrakcije biološki važnih molekula, te je danas na raspolaganju veliki broj savremenih tehnika ekstrakcije. Za razliku od tradicionalnih, savremene ekstrakcione tehnike podrazumevaju upotrebu rastvarača izmenjenih fizičko-hemijskih karakteristika poput sub- ili superkritičnih fluida, imobilisanih rastvarača, rastvarača pod pritiskom i sl. Ovi fluidi zamenjuju toksične organske rastvarače netoksičnim fluidima uz istovremeno postizanje znatno bolje selektivnosti.

Literatura

- Cvetanović A. (2016). Optimizacija savremenih ekstrakcionih postupaka za izolaciju apigenina iz cveta kamilice (*Chamomilla recutita* L.) i karakterizacija biološke aktivnosti dobijenih ekstrakata. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet. Novi Sad.
- Criado, M.R., Torre, S.P., Pereiro, I.R., Torrijos, R.C. (2004). Optimization of a microwave-assisted derivatization–extraction procedure for the determination of chlorophenols in ash samples. *Journal of Chromatography A* 1024, 155–163.
- Damjanović, B. (2005). Ispitivanje ekstrakcije ploda morača (*Foeniculum vulgare* Mill.) natkritičnim ugljen-dioksidom. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet. Novi Sad.
- Lay-Keow, N., Michel, H. (2003). Effects of moisture content in cigartobacco on nicotine extraction similarity between Soxhlet and focusedopen-vessel microwave-assisted techniques. *Journal of Chromatography A*, 1011, 213–219.
- Nikolovski B. (2009). Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz bobica kleke (*Juniperus*

- communis* L.) i semenki tikve (*Cucurbita pepo* L.) natkriticnim ugljendioksidom. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet. Novi Sad.
- Ozer. E.O., Platin, S., Akman, U., Hortasçu, O. (1996). Supercritical carbon dioxide extraction of spearmint oil from mint-plant leaves. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 74, 920-928.
- Švarc-Gajić, J. (2012). Sampling and sample preparation in analytical chemistry. Nova Science Publishers. New York, USA.
- Vidović, S. (2011). Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet. Novi Sad.
- Gandev S., Dzhuvinov V. (2006). Performance of hypocotyls grafting of walnut under uncontrolled temperature conditions. *Acta Horticulturae* 705, 351-353.
- Sabo M., Bede M., Hardi Ž.U. (2002). Variability of grain yield components of some new winter wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.). *Rostlinná Výroba*, 48 (5), 230-235.
- Weikai Y., Hunt L.A. (2001). Interpretation of genotype x environment interaction for winter wheat yield in Ontario. *Crop Science*, 41, 19-25.

INNOVATIVE TECHNOLOGIES IN THE EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES

Aleksandra Cvetanović¹, Marija Radojković¹, Saša Đurović¹, Pavle Mašković², Zoran Zeković¹

Abstract

Huge biological potential of plant products is one of the main reasons of their common utilization in the productions of dietary supplements as well as functional food which, beside of its nutrition properties, express pharmacological and physiological effects. New scientific knowledge regarding the isolation of pharmacologically active compounds from complex matrices led to significant progress in this field. Today, the process of extraction has significant scientific role, while “green” technologies possess special place in the today’s science. Developing of such technologies implies the use of “green” solvents, among which are especially significant sub- or supercritical fluids and ionic liquids.

Key words: extraction, medicinal plant, advanced extraction technologies, subcritical water, supercritical carbon dioxide.

¹Tehnološki fakultet, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija (a.c.istrazivac@gmail.com);

²Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija