

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
STUDIJSKI PROGRAM HEMIJSKA TEHNOLOGIJA



Kristina Burzanović

Ispitivanje antioksidativnog potencijala postdestilacione biomase timijana
(*Thymus vulgaris*)

MASTER RAD

Podgorica, 2023.

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
STUDIJSKI PROGRAM HEMIJSKA TEHNOLOGIJA



Ispitivanje antioksidativnog potencijala postdestilacione biomase timijana
(*Thymus vulgaris*)

MASTER RAD

Student:

Kristina Burzanović

Mentor:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica

Podgorica, 2023.

PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Kristina Burzanović

Datum i mjesto rođenja: 29.04.1998. godine; Podgorica

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Osnovne studije: Hemijska tehnologija, 2020. godine

Specijalističke studije: Hemijska tehnologija, 2021. godine

INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Ispitivanje antioksidativnog potencijala postdestilacione biomase timijana (*Thymus vulgaris*)

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

Datum prijave rada: 2023. godine

Datum prihvatanja teme: 2023. godine

Mentor: Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a, mentor

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, vanredni profesor MTF-a

Prof. dr Nada Blagojević, redovni profesor MTF-a

Komisija za odbranu rada:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a, mentor

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, vanredni profesor MTF-a

Prof. dr Nada Blagojević, redovni profesor MTF-a

Lektor: Autolektura

Datum odbrane:

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat: Kristina Burzanović

Na osnovu člana 22 Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisana

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom

„Ispitivanje antioksidativnog potencijala postdestilacione biomase timijana (*Thymus vulgaris*)“ rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

Podgorica, 2023.godine

Potpis studenta

Izvod

Aromatična biljna vrsta timijan (*Thymus vulgaris*) ima široku primjenu u svakodnevnom životu, narodnoj medicini, ali i u farmaceutskoj industriji. Antioksidativna svojstva ljekovitih i aromatičnih biljaka, samim tim i timijana, potiču najčešće od fenola, flavonoida i tanina. Preradom ljekovitog i aromatičnog bilja, tj. izolovanjem etarskih ulja, zaostaje otpad (biomasa) koja je potencijalno bogata biološki aktivnim jedinjenjima. Sa ekonomskog stanovišta, korišćenje ovog otpada je opravdano jer je jeftina sirovina za dobijanje drugih, vrijednih proizvoda čija je namjena raznolika. Jedan od razloga za ovaj način iskorišćenja otpada je i povećana potražnja za prirodnim antioksidantima, koji mogu da zamijene potencijalno štetne sintetske antioksidante. Upravo zbog toga, predmet istraživanja ovog master rada je određivanje flavonoida, fenola i tanina u otpadnom biljnom materijalu nakon hidrodestilacije lista timijana, primjenom različitih metoda ekstrakcije.

Za dobijanje ekstrakata postdestilacionog otpada timijana primijenjene su tri različite tehnike ekstrakcije: Soxhlet ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija i maceracija. Ispitano je koja metoda ekstrakcije daje najbogatiji ekstrakt u pogledu sadržaja flavonoida, fenola i tanina primjenom 70% i 96% etanola kao rastvarača.

Folin-Ciocalteu metodom određen je sadržaj ukupnih fenola u svim ekstraktima, za kvantitativno određivanje flavonoida iskorišćena je metoda po Kristu i Muleru, dok su tanini određeni metodom koja je opisana u Evropskoj farmakopeji Ph. Eur. 9.0 Količina fenola kreće se od 9,9 do 50,26 mg GAE/ 100 g suvog lista timijana, količina flavonoida od 0,72 do 57,6 mg QE/ 100 g suvog lista timijana, dok je sadržaj tanina bio u opsegu od 0,31 do 2,94%. Dobijeni rezultati ukazuju na značajnu prisutnost navedenih bioaktivnih supstanci u ekstraktima.

Antioksidanti su zaslužni za spriječavanje oksidacije drugih supstanci, a u biološkim sistemima neutrališu slobodne radikale, zbog čega su veoma značajni. U ovoj master tezi ispitana je antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih iz postdestilacionog otpada timijana spektrofotometrijski, primjenom DPPH metode i FRAP metode, a vršena je i korelaciona analiza sadržaja flavonoida, ukupnih fenola, tanina i antioksidativne aktivnosti postdestilacionog otpada timijana. U ispitivanim ekstraktima timijana utvrđen je jak stepen negativne korelacije između DPPH metode i tanina (-0,886).

Ključne riječi: timijan, postdestilacioni biootpad timijana, fenoli, flavonoidi, tanini, antioksidativna aktivnost, DPPH metoda, FRAP metoda

Abstract

The aromatic plant species thyme (*Thymus vulgaris*) is widely used in everyday life, traditional medicine, but also in the pharmaceutical industry. The antioxidant properties of medicinal and aromatic plants, including thyme, come mainly from phenols, flavonoids and tannins. By processing medicinal and aromatic herbs, i.e. by isolating essential oils, waste (biomass) is left behind, which is potentially rich in biologically active compounds. From an economic point of view, the use of this waste is justified because it is a cheap raw material for obtaining other, valuable products whose purpose is varied. One of the reasons for this way of using waste is the increased demand for natural antioxidants, which can replace potentially harmful synthetic antioxidants. Precisely because of this, the subject of research in this master's thesis is the determination of flavonoids, phenols and tannins in waste plant material after hydrodistillation of thyme leaves, using different extraction methods. Three different extraction techniques were used to obtain extracts of thyme post-distillation waste: Soxhlet extraction, ultrasonic extraction and maceration. It was investigated which extraction method gives the richest extract in terms of flavonoid, phenol and tannin content using 70% and 96% ethanol as a solvent.

The Folin-Ciocalteu method was used to determine the content of total phenols in all extracts, for the quantitative determination of flavonoids the Christ and Muller method was used, while tannins were determined using the method described in the European Pharmacopoeia Ph. Eur. 9.0 The amount of phenols ranges from 9.9 to 50.26 mg GAE/ 100 g of dry thyme leaf, the amount of flavonoids from 0.72 to 57.6 mg QE/ 100 g of dry thyme leaf, while the tannin content was in the range of 0,31 to 2.94%. The obtained results indicate a significant presence of the mentioned bioactive substances in the extracts.

Antioxidants are responsible for preventing the oxidation of other substances, and in biological systems they neutralize free radicals, which is why they are very important. In this master's thesis, the antioxidant activity of extracts obtained from thyme post-distillation waste was examined spectrophotometrically, using the DPPH method and the FRAP method, and a correlation analysis of the content of flavonoids, total phenols, tannins and antioxidant activity of thyme post-distillation waste was performed. In the tested thyme extracts, a strong degree of negative correlation was found between the DPPH method and tannins (-0.886).

Keywords: thyme, thyme post-distillation waste, phenols, flavonoids, tannins, antioxidant activity, DPPH method, FRAP method

Zahvalnica

Zahvalnost na prvom mjestu dugujem svojoj mentorki prof. dr Biljani Damjanović-Vratnica na izdvojenom vremenu, svakom stručnom savjetu, strpljenju i povjerenju koje mi je ukazala, kako tokom izrade ovog rada, tako i tokom studiranja.

Takođe se zahvaljujem ostalim članovima komisije, prof. dr Nadi Blagojević i prof. dr Vesni Vukašinović-Pešić na konstruktivnim i stručnim savjetima prilikom pisanja rada. Zahvalnost dugujem i dr Snežani Vukanović i laborantkinji Gordani Vuksanović na sugestijama i smjernicama pri izvođenju eksperimentalnog dijela ovog master rada.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na bezrezervnoj podršci, razumijevanju i ljubavi svih ovih godina.

Kristina Burzanović

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	3
2.1.	LJEKOVITO I AROMATIČNO BILJE	3
2.2.	SEKUNDARNI METABOLITI BILJKE, ETARSKO ULJE	3
2.3.	TIMIJAN (<i>THYMUS VULGARIS</i>)	4
2.3.1.	Morfološke karakteristike timijana	5
2.3.2.	Hemijski sastav timijana	6
2.3.3.	Upotreba timijana	11
2.3.4.	Upotreba etarskog ulja timijana	12
2.4.	MOGUĆNOST ISKORIŠĆENJA BIOMASE	12
2.4.1.	Postdestilaciona biomasa	13
2.4.2.	Aromatična voda	15
2.5.	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	16
2.6.	METODE EKSTRAKCIJE	20
2.6.1.	Hidrodestilacija	20
2.6.2.	Soxhlet ekstrakcija	21
2.6.3.	Ultrazvučna ekstrakcija	21
2.6.4.	Maceracija	23
2.7.	METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	23
2.7.1.	UV/VIS spektrofotomerija	23
2.7.2.	DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) test	24
2.7.3.	FRAP test	25
2.7.4.	Folin-Ciocalteu metoda	27
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	28
3.1.	MATERIJAL I METODE	28
3.1.1.	Materijal	28
3.1.2.	Metode	29
3.1.2.1.	Ekstrakcija bioaktivnih materijala	29

3.1.2.2.	Hemijska analiza postdestilacionog otpada timijana.....	35
3.1.2.3.	Određivanje antioksidativnih svojstava postdestilacionog otpada timijana	38
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	41
4.1.	CILJ RADA	41
4.2.	SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U POSTDESTILACIONOJ BIOMASI TIMIJANA	42
4.3.	SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U POSTDESTILACIONOJ BIOMASI TIMIJANA	44
4.4.	SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U POSTDESTILACIONOJ BIOMASI TIMIJANA	48
4.5.	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST POSTDESTILACIONE BIOMASE TIMIJANA	49
4.6.	KORELACIJA SADRŽAJA FLAVONOIDA, FENOLNIH JEDINJENJA, TANINA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM UZORCIMA TIMIJANA	52
5.	ZAKLJUČAK	54
6.	LITERATURA	56

1. UVOD

Sve je više ljudi alergično na kozmetička sredstva, a uzrok tome je industrijska proizvodnja preparata koji sadrže sintetske konzervanse (Tasić, 2017). Zamjena sintetskih antioksidanata polifenolnim jedinjenjima, kao prirodnim antioksidantima, posebno privlači pažnju istraživača. Polifenole karakteriše širok spektar bioloških aktivnosti, kao što su antioksidativna, antifungalna i antimikrobna aktivnost (Milutinović i sar., 2017). Takođe, polifenolna jedinjenja imaju zaštitnu ulogu u hrani i farmaceutskim proizvodima, tako što usporavaju promjene izazvane oksidacionim procesima i razvoj patoloških procesa uzrokovanih oksidativnim stresom (Gulcin, 2020). Oksidativni stres karakteriše povećana proizvodnja slobodnih radikala, pri čemu može doći do oksidativne degradacije proteina, nezasićenih masnih kiselina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina koje dovode do mnogih patofizioloških stanja kao što su ateroskleroza, kardiovaskularne bolesti, artritis, astma, Parkinsonova i Alchajmerova bolest, autoimuni poremećaji i rak. Formiranje slobodnih radikala se prirodno kontroliše jedinjenjima koji se nazivaju antioksidanti. Polifenoli kao što su flavonoidi i antocijanidini imaju svojstva helatiranja metala. Oni vezuju i stabilizuju redoks aktivne metale čime inhibiraju njihovo učešće u štetnim reakcijama (Kulišić i sar., 2005). Nusproizvodi voća i povrća predstavljaju potencijalni izvor ovih supstanci. Biološka svojstva ekstrakata, dobijenih iz biljnog materijala, potiču od jedinjenja kao što su fenolni sastojci, terpeni i flavonoidi (Dina i sar., 2022; Omre i sar., 2018).

Aromatične biljke su široko proučavane jer predstavljaju bogat izvor fenolnih jedinjenja, prirodnih antioksidanata i antimikrobnih supstanci koje se relativno lako mogu izolovati primjenom različitih rastvarača i metoda ekstrakcije (Kulišić i sar., 2015; Predescu i sar., 2020). Sa ekonomskog aspekta, njihov značaj ogleda se kroz upotrebu ovih vrsta kao ljekovitih, začinskih i ukrasnih biljaka (Čančarević i sar., 2013). Ekstrakcija predstavlja koncentrisanje i izdvajanje određenih biljnih sastojaka iz biljnog tkiva pomoću selektivnih rastvarača i njen cilj je da se dobiju terapijski željeni proizvodi u dovoljnoj količini i da se uklone nepoželjne supstance (Elgndi, 2012).

Timijan (*Thymus vulgaris* L.) je biljka koja pripada porodici usnatica (Lamiaceae) za koju je karakteristično da sadrži fenolna jedinjenja. Etarsko ulje se nalazi u žljezdanim trihomama i od njega potiče aroma. Količina etarskog ulja timijana u listovima je mala (0.8-2.6%), tako da većina biljnog materijala ostaje neiskorišćena nakon procesa hidrodestilacije (Gavarić i sar., 2015a). Odnedavno su nusproizvodi prehrambene industrije i poljoprivredni otpad počeli da se koriste kao sirovina za dobijanje bioaktivnih jedinjenja (Pavlić i sar., 2018; Nikolić i sar., 2019). Ovi nusproizvodi predstavljaju biljni materijal lošijeg kvaliteta i/ili neupotrijebljeni dio biljke koji nije komercijalno eksploatisan i on predstavlja moćan izvor bioaktivnih sastojaka. Sve veća potražnja za prirodnim antioksidantima jedan je od razloga iskorišćenja biljnog otpada koji je bogat polifenolima, što predstavlja veliki izazov za prehrambenu industriju (Kulišić i sar., 2015).

Osnovni ciljevi ove master teze su određivanje ukupnih fenola, flavonoida i tanina u ekstraktima dobijenim različitim metodama ekstrakcije u postdestilacionoj biomasi timijana (*Thymus vulgaris* L), kao i dokazivanje njenog antioksidativnog potencijala.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LJEKOVITO I AROMATIČNO BILJE

Tradicionalna medicina predstavlja najpristupačniji izvor liječenja u sistemu primarne zdravstvene zaštite. Biljke se upotrebljavaju u svrhu liječenja od davnina. Spisi ukazuju na terapijsku upotrebu biljaka čak i 5000 godina p. n. e. Kinezi su prvi koristili prirodne biljne preparate kao lijekove. Tradicionalna medicina je u odnosu na modernu medicinu sve popularnija iz historijskih i kulturoloških razloga. Važne prednosti koje se navode za terapijsku upotrebu ljekovitog bilja kod različitih oboljenja je njihova bezbjednost, efikasnost i laka dostupnost (Hosseinzadeh i sar., 2015; Khazim Al-Asmari et al, 2017). Prirodni proizvodi imaju minimalne neželjene efekte i kompatibilniji su sa ljudskom fiziologijom u odnosu na sintetske proizvode jer su i sami prirodnog porijekla. Danas se biljni proizvodi, koriste u mnogim industrijama i imaju visoku komercijalnu vrijednost. Interesovanje za prirodnim proizvodima i njihova primjena je sve veća (Perez, 2021). Ekstrakti dobijeni iz ljekovitih i aromatičnih biljaka su veoma interesantni za razvoj i pripremu lijekova alternativne medicine i aditiva u hrani (Hossain i sar., 2013). Zahvaljujući sadržaju etarskog ulja i polifenola, ove biljke služe kao pojačivači arome i ukusa, nalaze primjenu u parfimeriji i kozmetologiji i pokazuju antioksidativna, antimikrobna i antivirusna svojstva (Moisa i sar., 2018). Neke od ovih biljaka su korišćene u tradicionalnoj medicini od davnina i dostupne su na tržištu kao infuzi, tablete i/ili ekstrakti (Angelov i sar., 2015). Jedna od najvažnijih porodica ljekovitih biljaka bogata isparljivim uljima i biološki aktivnim jedinjenjima je porodica Lamiaceae koja ima preko 3000 vrsta (Moisa i sar., 2018).

Biološki aktivna jedinjenja koja se nalaze u biljkama nazivaju se fitohemikalije. Fitohemikalije se mogu naći u različitim djelovima biljke, npr. lišću, kori, sjemenu, cvijeću, korijenju, koji se koriste kao ljekovit izvor (Ingle i sar., 2016). One su potrebne biljkama jer predstavljaju odbrambeni mehanizam od patogena i raznih bolesti, a takođe su važne i za zdravlje ljudi jer pokazuju različite biološke aktivnosti. Većina ovih biohemikalija se unosi hranom kao što su voće i povrće, pa se savjetuje što veći unos ovih namirnica (Majekodunmi, 2015).

2.2. SEKUNDARNI METABOLITI BILJKE, ETARSKO ULJE

U tradicionalnoj medicini ljudi imaju velike koristi od biljaka i njihovih sekundarnih metabolita (Micucci i sar., 2020). Biljni metaboliti su jedinjenja koja sintetišu i luče biljke. Nalaze se u različitim biljnim vrstama, a međusobno se razlikuju po fizičkim, hemijskim i biološkim svojstvima. Mogu se podijeliti na primarne i sekundarne biljne metabolite. Primarni metaboliti su esencijalni za rast i razvoj biljke i omogućavaju osnovne funkcije u ćeliji. Tu se ubrajaju ugljeni hidrati, proteini i nukleinske kiseline. Uloga sekundarnih metabolita je u zaštiti biljke od oksidativnog stresa i ultraljubičastog zračenja. Sekundarnim metabolitima pripada većina

farmakološki aktivnih sastojaka biljaka i njih karakteriše velika strukturna raznovrsnost (Kvrgić, 2016; Dragović, 2020).

Glavnu grupu sekundarnih biljnih metabolita predstavljaju fenoli i polifenoli koji imaju najmanje jedan fenolni prsten u njihovom molekulu. Antioksidativno ponašanje fenolnih jedinjenja zavisi od broja hidroksi grupa, njihovog međusobnog položaja i mjesta vezivanja za aromatični prsten. Mnoge biljke proizvode biološki aktivne sekundarne metabolite kao dio svog odbrambenog mehanizma i oni djeluju kao insekticidi ili fungicidi (Trivellini i sar., 2015). Antioksidativna svojstva uglavnom se pripisuju polifenolima, najzastupljenijim sekundarnim metabolitima u voću, povrću, bilju i začinima (Vergara-Salinas i sar., 2012).

Većina biljaka koja pripada porodici Lamiaceae predstavlja bogat izvor sekundarnih metabolita sa dobro poznatim farmakološkim aktivnostima. Skorija istraživanja su pokazala potencijal za razvoj novih proizvoda u sektorima kao što su farmaceutska, kozmetička i prehrambena industrija. Posebno je poraslo interesovanje u prehrambenoj industriji u cilju zamjene sintetskih antioksidanata i aditiva prirodnim proizvodima (Celano i sar., 2017). Farmaceutska svojstva aromatičnih biljaka djelimično se pripisuju etarskim uljima. Etarska ulja su isparljiva, prirodna i složena jedinjenja koje odlikuje jak, aromatičan miris, a koje sintetišu aromatične biljke kao sekundarne metabolite (Pensel i sar., 2014). Karakteristike ovih ulja se razlikuju od masnih ulja koja imaju slab miris i nisu isparljiva (Mohammad Azmin i Nor, 2022). Prinos i hemijski sastav etarskog ulja zavisi od više faktora i njihove interakcije: genotip, okruženje, godišnje doba, vrijeme žetve i starost biljke (Zantar i sar., 2015).

2.3. TIMIJAN (*THYMUS VULGARIS*)

Porodica Lamiaceae je najznačajnija porodica aromatičnih biljnih vrsta u farmaciji zbog visokog sadržaja etarskog ulja sadržanog u biljkama (Askary i sar., 2018). Rod *Thymus*, član ove porodice, sadrži oko 400 vrsta višegodišnjih, aromatičnih, zimzelenih ili poluzimzelenih zeljastih biljaka sa mnogo vrsta, varijeteta i oblika (Boruga i sar., 2014). Jedan od brojnih predstavnika roda *Thymus* je timijan koji predstavlja najčešće korišćenu i proučavanu vrstu (Taghuoti i sar., 2020).

Postoji nekoliko pretpostavki o porijeklu imena *Thymus*. Neki autori smatraju da ime roda potiče od grčke riječi *thyo* što znači miris, dok drugi smatraju da potiče od grčke riječi *thymos* što predstavlja hrabrost i snagu i ukazuje na stimulirajuće djelovanje biljke (Kvrgić, 2016).

Naučni naziv: *Thymus vulgaris* L.

Carstvo: Plantae

Klasa: Magnoliopsida

Red: Lamiales

Porodica: Lamiaceae

Rod: *Thymus*

Vrsta: *Thymus vulgaris* (Kvrgić, 2016)

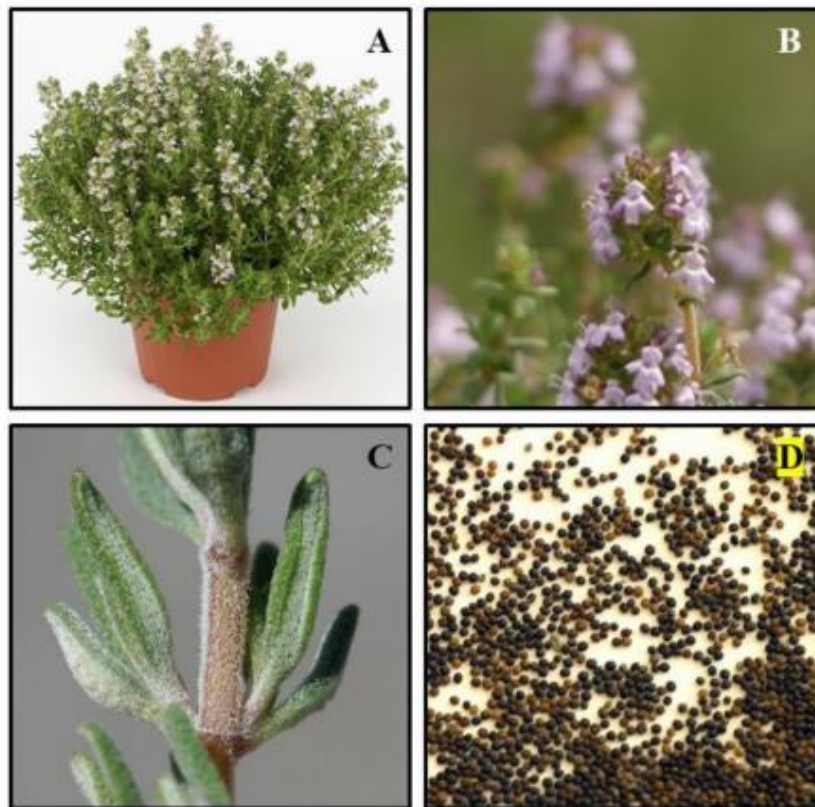
2.3.1. Morfološke karakteristike timijana

Timijan (*Thymus vulgaris*) je ljekovita, aromatična biljka koja pripada porodici Lamiaceae (Stevanović, 2021). To je višegodišnji polužbun visine do 50 cm (Čančarević i sar., 2013). Ima jak i razgranat korijenov sistem (Zrnić, 2007). Stabljike su uspravne i granaju se već od korijena. Donji dio stabljike je drvenast, dok je gornji dio zeljast i tamnocrvene boje (Šilješ i sar., 1992). Na vrhu stabljike se nalaze cvasti koje se sastoje iz blijedoružičastih cvjetova dugih 3-6 mm (Blažeković i sar., 2006). Cvasti su izdužene, a čašica je prekrivena kratkim dlakama (Aleksić, 2016). Na kratkoj peteljci su smješteni listovi (Radovanović i sar., 2020), sitni su i linearno raspoređeni (Pruteanu i sar., 2015). Dostižu dužinu od 4-10 mm. Naličje listova je obraslo gustim sivim dlačicama, a na njihovom vrhu se nalaze kvržice koje su bogate etarskim uljem. Sjeme je klijavo 2-3 godine (Šilješ i sar., 1992), okruglo je i veoma sitno (Mandal i DebMandal., 2016).

Na slikama 1 i 2 su dati morfološki prikazi biljke timijan.



Slika 1. Morfološke karakteristike timijana
(Kvrgić, 2016)



Slika 2. Timijan A) Biljka B) Cvijet C) List D) Sjeme
(Patil i sar., 2021)

Timijan u početku raste vrlo sporo i ne podnosi zasijenjene površine, dok su već naredne godine u rano proljeće biljke u punoj vegetaciji (Šilješ i sar., 1992). Prve godine berba se vrši jednom, početkom godine, a već sljedeće godine dva puta, u maju ili početkom juna i u septembru ili oktobru. Nakon žetve lišće timijana treba odmah skinuti sa grančica, što se vrši ručno ili sa posebnim „češljevima“. Potom se vrši sušenje, a osušeno lišće ne treba čuvati u istoj prostoriji sa drugim biljkama (Buha, 2006).

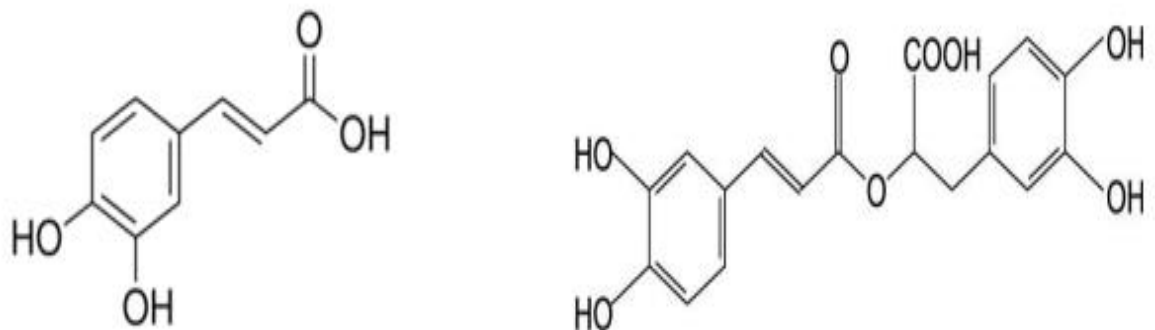
2.3.2. Hemijski sastav timijana

Hemijski sastav timijana je različit između različitih vrsta, pa čak i unutar iste vrste (Wiese i sar., 2018). Za *Thymus vulgaris* je karakteristično 6 različitih hemotipova: timol, karvakrol, geraniol, linalol, α -terpinol i tujanol-4. Timol i karvakrol predstavljaju fenolne hemotipove i za njih su karakteristična topla i suva staništa. Geraniol, linalol, α -terpinol i tujanol-4 predstavljaju nefenolne hemotipove i za njih je karakteristična hladnija i vlažnija klima (Kvrgić, 2016).

Fenolna jedinjenja predstavljaju proizvode sekundarnog metabolizma biljaka koji su veoma rasprostranjeni. Do sada je poznato oko 8000 fenolnih jedinjenja koja se veoma razlikuju po svojoj

strukturi. U svojoj strukturi ova jedinjenja sadrže aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa (Janković, 2017). Velika raznovrsnost strukture polifenolnih jedinjenja određuje njihovu raznovrsnu biološku aktivnost. Imaju pozitivan efekat na zdravlje ljudi zbog njihovih antioksidativnih, antibakterijskih, antigljivičnih i antiinflamatornih svojstava. U hrani, ova jedinjenja su odgovorna za boju, ukus, miris i stabilnost (Ostolski i sar., 2021). Posebno su osjetljivi na oksidaciju i povišenu temperaturu (Grigore i sar., 2019). Oni su zastupljeni u nadzemnim djelovima biljaka kao što su cvijeće, listovi, sjeme, plodovi biljke i korijenje (Koksal i sar., 2017).

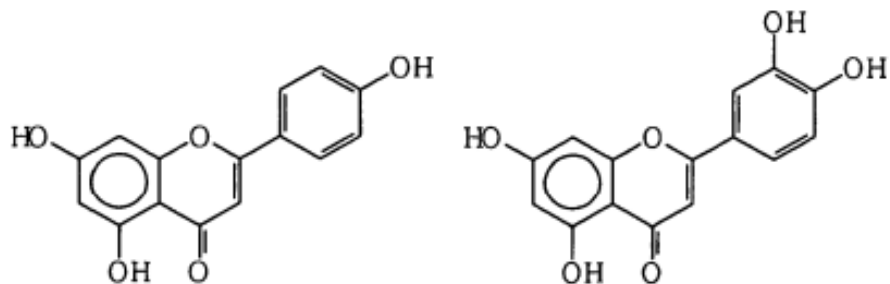
Fenolne kiseline predstavljaju podgrupu fenolnih jedinjenja sa antioksidativnim kapacitetom (Sytar i sar., 2022). One nastaju iz acetata i predstavljaju jedinjenja koja sadrže najmanje jednu karboksilnu i jednu hidroksilnu grupu. Dijele se na derivate benzojeve i derivate cimetine kiseline. U timijanu su najzastupljenije kafena i rozmarinska kiselina (slika 3). Kafena kiselina je najzastupljeniji derivat cimetine kiseline u biljnom svijetu, dok je rozmarinska estar kafene kiseline (Kvrgić, 2016).



Slika 3. Fenolne kiseline timijana (kafena kiselina i rozmarinska kiselina)
(Kvrgić, 2016)

Fenolna jedinjenja uključuju flavonoide, fenole i tanine (Azeez i sar., 2017).

- 1) **Flavonoidi** – Flavonoidi predstavljaju najveću grupu fenolnih jedinjenja (Azeez i sar., 2017). Zajednička osobina za sve flavonoide jeste njihova struktura od 15 atoma ugljenika i oni predstavljaju najrasprostranjenije sekundarne produkte metabolizma u svim biljkama. U timijanu je pronađeno 25 različitih flavonoida, od kojih su najznačajniji apigenin i luteolin (slika 4) (Kvrgić, 2016).



Slika 4. Flavonoidi timijana (apigenin i luteolin)
(Kvrgić, 2016)

Flavonoidi, kao važna grupa prirodnih antioksidanata, mogu smanjiti oksidativni stres kod kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Jovanović i sar., 2017). Imaju širok spektar bioloških funkcija i važnu ulogu u interakciji između biljaka i njihovog okruženja. Štite biljku od štetnog dejstva UV zračenja i imaju ključnu ulogu u procesu polne reprodukcije (Parađiković, 2014; Rahmah i sar., 2018). Nalaze se u povrću i voću i nosioci su antioksidativne aktivnosti (Nadia i Rachid, 2013). Postoji sve veći interes za ekstrakciju ovih metabolita iz biljnih izvora, kako bi se dobila sigurna, prirodna i jeftina alternativa sintetskim antioksidativnim komponentama od kojih neki imaju toksična i mutagena dejstva (Jovanović i sar., 2017).

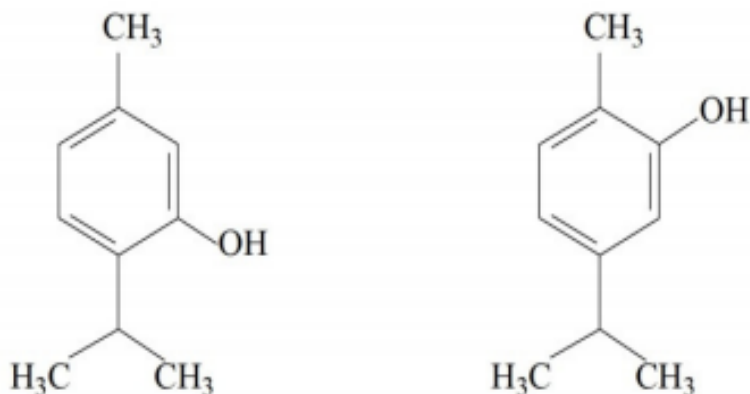
2) Monoterpenški fenoli – timol i karvakrol (Kvrgić, 2016)

Timol i njegov izomer karvakrol su supstance koje se nalaze u etarskom ulju timijana i njihov hemijski sastav zavisi od geografskog regiona i sezone skupljanja (Pavela i sar., 2018; Netopilova i sar., 2021). Uprava za hranu i lijekove ih smatra bezbjednim za upotrebu (Galovičova i sar., 2021).

Timol je u obliku bezbojnih kristala, u vodi se teško rastvara, dok se dobro rastvara u etanolu, etil etru i sirćetnoj kiselini. Izomer je karvakrola. Koristi se u medicini, kozmetici i prehrambenoj industriji kao antiseptik (Kvrgić, 2016). Obično se u kombinaciji sa glicerinom, alkoholom i drugim isparljivim materijama koristi za pravljenje vode za ispiranje usta (Salehi i sar., 2018).

Karvakrol je bezbojna tečnost koja je viskozna. U vodi se teško rastvara, dok je dobro rastvoran u etanolu, etil etru, bazama i acetonu (Kvrgić, 2016). Karvakrol je fenolni monoterpenoid koji se nalazi u etarskom ulju timijana. Njegova antimikrobna aktivnost je veća od aktivnosti kod drugih isparljivih jedinjenja prisutnih u etarskom ulju zbog prisustva slobodnih hidroksilnih grupa, hidrofobnosti i fenolnog dijela. Karvakrol je posebno efikasan protiv patogena koji se prenose hranom (Sharifi-Rad i sar., 2018).

Na slici 5 su prikazane strukturne formule timola i karvakrola.

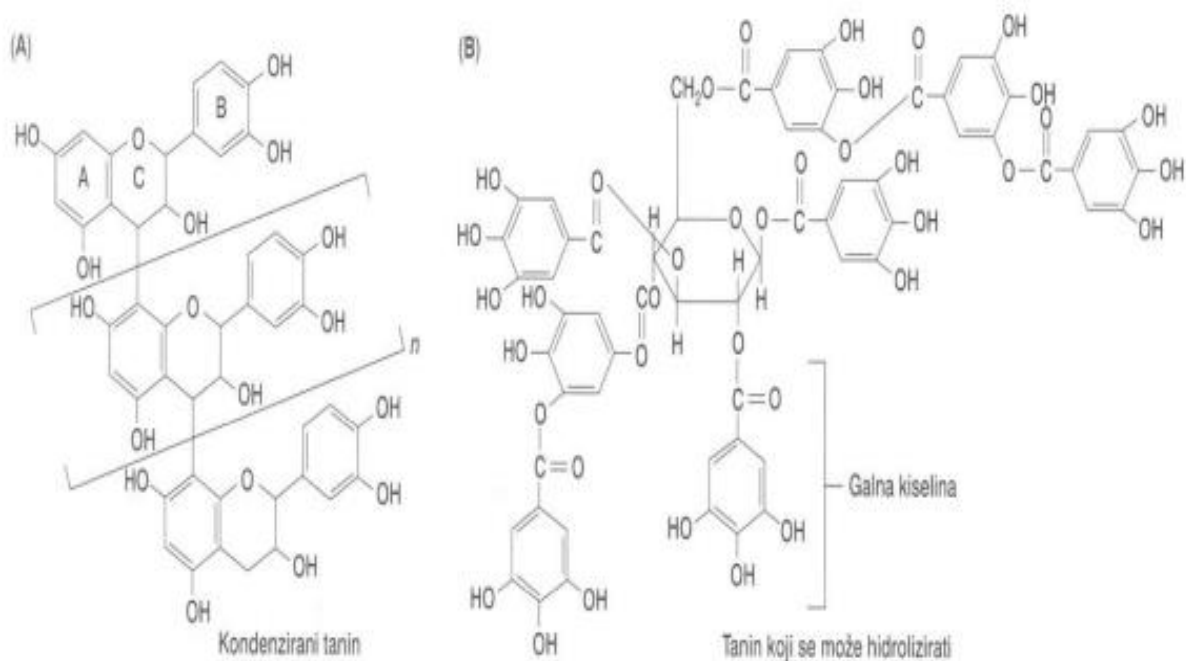


Slika 5. Strukturne formule timola i karvakrola
(Kvrgić, 2016)

U jednoj studiji je pokazano da je sadržaj timola u etarskom ulju timijana mnogo veći (do 60%) u poređenju sa sadržajem karvakrola (6%) (Zeković, 2000).

Posljednjih godina, kako bi se smanjila upotreba pesticida u kontroli bolesti, štetočina i korova u poljoprivredi, uloženi su veliki naponi da se identifikuju novi biopesticidi koji su efikasni kao sintetske hemikalije. Timol i karvakrol su primjeri bioaktivnih jedinjenja koja mogu da postanu sastavni dio poljoprivredne prakse kao biopesticidi. Ova jedinjenja su potencijalno korisna u kontrolisanju emisije mirisa i patogena u svinjskom otpadu i povezana sa značajnim fitotoksičnim dejstvom na mnoge korove i kultivisane vrste (Konstantinović i sar., 2022).

- 3) **Tanini** predstavljaju biljne fenolne polimere. Mogu se svrstati u dvije kategorije: kondenzovani i hidrolizujući tanini (slika 6). Kondenzovani tanini predstavljaju jedinjenja koja nastaju vezivanjem flavonoidnih jedinica, česta su komponenta drvenastih biljaka. U prisustvu jakih kiselina mogu se hidrolizovati do antocijanidina. Hidrolizujući tanini predstavljaju heterogene polimere koji sadrže galnu kiselinu i jednostavne šećere. Oni se mogu hidrolizovati razblaženim kiselinama (Rahmah i sar., 2018).



Slika 6. Struktura kondenzovanog tanina (A) i hidrolizujućeg tanina (B) (Galić, 2020)

Vrijeme ekstrakcije ima značajan uticaj na sadržaj tanina. Duže vrijeme ekstrakcije može smanjiti sadržaj tanina (Rahmah i sar., 2018). Kod ljudi, tanini izazivaju osjećaj zatezanja u ustima jer vezuju proteine pljuvačke. Čest je visok sadržaj tanina kod nezrelih plodova (Galić, 2020). Tanini pokazuju značajna farmakološka svojstva koja su korisna po zdravlje ljudi, od kojih su najznačajnija antioksidativna i antibakterijska svojstva (Jing i sar., 2022). Hrana bogata taninima ima nisku nutritivnu vrijednost. Fiziološki efekti tanina su raznovrsni. Mogu smanjiti krvni pritisak, utiču na brzinu zgrušavanja krvi ubrzavajući je, smanjuju nivo lipida u serumu i moduliraju imunološke odgovore (Chung i sar., 2010).

Timijan predstavlja i bogat izvor vitamina. Posebno je bogat vitaminima A i C. Vitamin A je antioksidant koji je od vitalnog značaja za održavanje zdrave sluzokože i kože, kao i dobar vid. Vitamin C pruža otpornost na zarazne bolesti i bori se protiv štetnih proinflammatoryh slobodnih radikala. Od vitamina B kompleksa najzastupljeniji je vitamin B₆ koji djeluje protiv stresa. Od ostalih vitamina, zastupljeni su vitamin K, vitamin E i folna kiselina. Timijan je takođe izvor minerala koji su važni za održavanje dobrog zdravlja. Njegovi listovi su odličan izvor kalijuma, magnezijuma, gvožđa, mangana, kalcijuma i selen (Dauqan i Abdullah, 2017).

2.3.3. Upotreba timijana

Svi dijelovi ove biljke su važni sa medicinskog aspekta i široko se koriste za liječenje raznoraznih bolesti zbog njihove ljekovite vrijednosti. Zahvaljujući fenolnim jedinjenjima koje sadrži, timijan jača imuni sistem (Gumus i sar., 2017). Osušeni, nadzemni dio timijana se koristi kao čaj kod upale grla i bronhitisa u alternativnoj medicini (Koksal i sar., 2017; Hossain i sar., 2022). Za smanjenje kašlja preporučuje se ekstrakt timijana zaslađen medom (Salehi i sar., 2019). Ekstrakt lista timijana nalazi primjenu i u tretmanu bolesti desni i zuba, inflamatornih procesa usne duplje, larinksa i traheje. Zbog antiseptičnog i osvježavajućeg efekta predstavlja sastavni dio pasta za zube (Čančarević i sar., 2013). Izbacuje gljivice iz želuca i crijeva i ima sposobnost da poveća apetit zbog prisustva timola koji ima sposobnost da ubije bakterije i parazite. Poboljšava protok krvi i ima okrepljujući efekat na cijeli organizam (Dauquan i sar., 2017). Posebno se preporučuje kod djece koja imaju problem sa parazitima, pogotovo glistama. Na živce djeluje umirujuće (Parađiković, 2015).

Osim u medicini, timijan i njegovi ekstrakti nalaze primjenu u industriji hrane i aroma, a široko se koristi kao kulinarski sastojak (Yalcin i sar., 2020). Rimljani su koristili timijan kao konzervans sira i alkoholnog pića što je bilo od velikog značaja u vrijeme kada nije bilo frižidera i drugih načina za prevenciju kvarenja namirnica. Grci su ga dodavali u vodu za kupanje smatrajući ga izvorom hrabrosti (Salehi i sar., 2019). Timijan služi kao konzervans za razne vrste prehrambenih proizvoda, posebno zbog svog antioksidativnog dejstva (Hosseinzadeh i sar., 2015). Biljka se od davnina koristila kao kulinarski sastojak za dodavanje ukusa siru i likerima i aromatizaciju mesa (Satyal i sar., 2016). Začini i njihovi ekstrakti imaju mnogo korisnih tehnoloških i bioloških svojstava, pa se njihova upotreba proširila na mnoge namirnice (Hossain i sar., 2010). Začini se od davnina koriste u pripremi hrane, ne samo za poboljšanje organoleptičkih svojstava, već i za njeno očuvanje. Danas, savremeni potrošači zahtijevaju hranu koja je minimalno obrađena i sadrži aditive prirodnog porijekla koji su za razliku od sintetskih bezbjedniji i ekološki prihvatljiviji. Kontaminacija hrane mogla bi se kontrolisati upotrebom prirodnih konzervanasa, kao što su začini i etarska ulja (Filipović i sar., 2016; Gavarić i sar., 2015b).

Rok upotrebe svježeg ili osušenog timijana je ograničen, a može biti produžen i do 4 nedelje ako se pravilno čuva. Treba izbjegavati i jednostavno siječenje biljke jer to izaziva isparavanje ulja i dovodi do hemijskih promjena ulja (Milanović, 2015). Takođe, postoje istraživanja koja ukazuju na to da treba da postoje ograničenja u upotrebi timijana u slučajevima kada pacijent ima visok krvni pritisak. Određeni hemotipovi koji sadrže visoke nivoe timola i karvakrola mogu biti toksični i treba ih izbjegavati u aromaterapiji (Mandal i DebMandal., 2016).

2.3.4. Upotreba etarskog ulja timijana

Zbog antimikrobnog, antifungalnog i antioksidativnog dejstva etarskog ulja timijana, ono se može koristiti kao prirodni konzervans za hranu (Jabraeili i sar., 2021). Međutim, njegova upotreba za očuvanje hrane je nepovoljna zbog karakterističnog, jakog mirisa i mogućeg uticaja na senzorne karakteristike hrane (Bouloumpasi i sar., 2021). Etarsko ulje ekstrahovano iz svježih listova može se koristiti i u farmaceutskim proizvodima i kozmetici u vidu aditiva (Shabnum i Wagay., 2011; Ferreira i sar., 2016; Fachini-Queiroz i sar., 2012). Koristi se i kod dermatoloških problema kao što su akne, masna koža, dermatitis i reumatski bolovi, a nalazi primjenu i u aromaterapiji (Patil i sar., 2021). Studija je pokazala da etarsko ulje timijana ima baktericidno dejstvo na bakteriju koja je uzročnik akni (*Propionibacterium acnes*) (Abdelhamed i sar., 2022). Lokalnom primjenom etarskog ulja timijana može doći do smanjenja reumatskih bolova, što se najviše pripisuje prisustvu timola koji posjeduje najveći antiinflamatorni potencijal (Li i sar., 2019). Etarsko ulje timijana nalazi primjenu u kozmetičkoj industriji gdje se koristi prilikom pripreme krema i losiona (Dudaš i sar., 2010). Djeluje umirujuće na nerve i povećava koncentraciju. Preventivno se koristi u sprječavanju gubitka kose i poboljšava otpornost organizma za oralne infekcije (Salehi i sar., 2018). I u narodnoj i u savremenoj medicini, etarsko ulje timijana se koristi inhalatorno za liječenje respiratornih oboljenja (Koksal i sar., 2017).

Karijes zuba, parodontalna oboljenja i streptokokni faringitis su najčešće oralne zarazne bolesti čovjeka. Ispitivanja su pokazala snažnu antimikrobnu aktivnost etarskog ulja timijana, pa se ono može koristiti u prevenciji ili za liječenje oralne infekcije (Fani i Kohanteb, 2017).

2.4. MOGUĆNOST ISKORIŠĆENJA BIOMASE

Po definiciji, biomasa predstavlja sav materijal koji je bio ili koji je dio živog svijeta. Mada, kada se razmatra upotreba biomase kao sirovine, misli se na organske materijale (Casau i sar., 2022) biljnog i životinjskog porijekla koji su podvrgnuti procesu sagorijevanja ili konverzije za generisanje energije. Trenutno najveći izvor biomase je drvo. Međutim, energija iz biomase se takođe može generisati i iz poljoprivrednih i životinjskih ostataka. Može se koristiti direktno ili indirektno. Direktna upotreba, koja se češće naziva tradicionalno korišćenje biomase, prvenstveno podrazumijeva proces sagorijevanja. Energija koja se generiše obično se koristi za kuvanje, grijanje prostora i raznorazne industrijske procese. Indirektna upotreba ili moderna upotreba tiče se naprednijih procesa konverzije biomase u sekundarnu energiju. Ovo uključuje gasifikaciju i proizvodnju električne energije (Sagisaka i sar., 2018).

Direktno sagorijevanje je najjednostavniji metod korišćenja energije iz biomase. U industrijskim postrojenjima za sagorijevanje biomase mogu se sagorijevati mnoge vrste goriva od biomase, uključujući drvo, poljoprivredne ostatke, tečnost za proizvodnju pulpe, komunalni čvrsti otpad i gorivo dobijeno od otpada.

U procesu gasifikacije se čvrsto gorivo izlaže visokim temperaturama i kiseoniku, kako bi se dobilo gasovito gorivo. Gas proizveden ovim procesom je mješavina gasova kao što su ugljen monoksid, ugljen dioksid, azot, vodonik i metan (Khan i sar., 2015).

Biomasa je obećavajući obnovljivi resurs koji se može primijeniti i za proizvodnju različitih vrsta biogoriva, uključujući bioetanol (Tsolcha i sar., 2021). Najveća pažnja je posvećena efektima upotrebe biomase na globalno zagrijavanje, dok neke druge kategorije uticaja na životnu sredinu, kao što su korišćenje zemljišta, formiranje čestica itd. su praktično zanemareni i/ili ih treba poboljšati i razmotriti sa većom pažnjom (Perić i sar., 2016). Statistički gledano, biomasa je jedan od tri najvažnija izvora goriva koji se koriste za proizvodnju toplotne i električne energije. Danas se koriste mnoge savremene tehnologije na globalnom nivou za efikasno pretvaranje biomase u toplotnu energiju, energiju pare, kao i u tečna i gasovita biogoriva. Zbog velikog potencijala drveta za komercijalnu upotrebu proizvodnje biogoriva, očekuje se kontinuirano povećanje drvnih resursa, posebno tzv. energetske plantaže (Kiełbasa i sar., 2021).

Agroindustrijski ostaci su najzastupljeniji i obnovljiv resurs na Zemlji koji je slabo valorizovan ili ostavljen da propada na Zemlji. Akumulacija velikih količina ove biomase svake godine rezultira ne samo pogoršanjem životne sredine već takođe i gubitkom potencijalno vrijednog materijala koji se može obraditi kako bi se dobio neki važan proizvod (Azeez i sar., 2017). Agroindustrijski procesi koji koriste ljekovito i aromatično bilje stvaraju različite vrste ostataka poput rezidualne biomase od destilacije aromatične biljke i neiskorišćenih djelova ljekovitog bilja. Ova preostala biomasa pogodna je za izolaciju fitohemikalija kao što su fenoli – antioksidanti koji se mogu koristiti u farmaceutskoj, kozmetičkoj i parfimerijskoj industriji. Ovo je značajno i sa ekonomskog stanovišta. Posljednjih decenija došlo je do ogromne potražnje za novim, prirodnim antioksidantima i postoji dovoljno prostora za istraživanje nusproizvoda agroindustrije kao izvora antioksidanata. Zbog niske cijene i ekološki prihvatljivog upravljanja, korišćenje ovih ostataka kao alternativnih izvora antioksidanata može biti najbolja opcija (Saha i Basak, 2019).

Zbog porasta potražnje potrošača živinskih proizvoda, poljoprivredna grana je suočena sa potrebom poboljšanja uslova stočarstva i smanjenja uticaja proizvodnog ciklusa na životnu sredinu (Amouei i sar., 2021). U većini zemalja u razvoju postoji problem sa stočnom hranom jer je ograničena njena dostupnost, što zahtijeva pronalaženje alternativnih izvora. Jedna od alternativa jeste i zaostala biomasa koja se može direktno koristiti kao stočna hrana. Biomasa koja se sastoji od agrootpada može se iskoristiti za proizvodnju biogasa koji je isplativ, ekološki prihvatljiv i održiv za zajednicu (Saha i Basak., 2019). Otpadni materijal takođe može da posluži pri pravljenju asfaltne baze, za poboljšanje određenih fizičkih i hemijskih karakteristika asfaltne mješavine (Milad i sar., 2020).

2.4.1. Postdestilaciona biomasa

Biljne sirovine i biljni preparati se tradicionalno primjenjuju za liječenje ili prevenciju mnogih bolesti još od davnina. Posljednjih decenija se smanjuje broj staništa sa samoniklim ljekovitim biljem, najviše zbog dejstva antropogenih faktora. To dovodi do iscrpljivanja izvora sirovine

fitoncida i ukazuje na neophodnost pronalaženja novih perspektivnih vrsta biljaka koje mogu da akumuliraju ciljana bioaktivna jedinjenja (Jasicka-Misiak i sar., 2021). Bioaktivna jedinjenja su nutritivni sastojci koji se u malim količinama nalaze u biljnim proizvodima. Najbrojnija bioaktivna jedinjenja su sekundarni metaboliti, polifenoli i flavonoidi koji su prisutni u višim biljkama (Azeez i sar., 2017). Prisustvo etarskog ulja je značajno za biljku, prvenstveno zato što obezbjeđuje energiju za biohemijske procese. Osim toga, privlači insekte radi oprašivanja i štiti biljku od infekcija gljivicama i bakterijama (Elgndi, 2012). Biljke iz porodice Lamiaceae se smatraju aromatičnim biljkama jer sadrže etarsko ulje koje se obično izoluje postupkom hidroddestilacije (Alimpić i sar., 2017). Racionalnom preradom sirovina aromatičnih biljaka može se dobiti mnogo otpada bogatog fenolnim jedinjenjima (Jasicka-Misiak i sar., 2021). Zbog brojnih neželjenih efekata sintetskih antioksidanata, sve je veće interesovanje za antioksidantima iz prirodnih izvora (Zeković i sar., 2017), što je podstaklo istraživače na ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz nedovoljno iskorišćenog agrootpada (Azeez i sar., 2017). Oporavak frakcija sa perspektivnim biološkim potencijalom je značajan i sa ekonomskog stanovišta (Jasicka-Misiak i sar., 2021). Zbog niske cijene biootpada i velike količine sadržanih vrijednih komponenti sve je veći broj istraživanja na ovu temu (Musto et al, 2022). Količina etarskog ulja destilovanog iz biljaka ili listova nije veća od 3%. Poslije izolovanja isparljivih jedinjenja iz biljaka koje sadrže etarsko ulje, u značajnoj količini zaostaje biljni otpad (slika 7) koji može biti bogat izvor polifenola i drugih neisparljivih farmakološki aktivnih supstanci. Optimizacija tehnika za efikasno korišćenje vrijednih prirodnih jedinjenja iz preostalih nusproizvoda je od velikog značaja jer izvori bogati polifenolima posjeduju visok antioksidativni potencijal (Jasicka-Misiak i sar., 2021).



Slika 7. Postdestilacioni otpad timijana (autor: Kristina Burzanović)

Potencijal korišćenja materijala je danas suštinska tema za promovisanje održivog korišćenja prirodnih resursa, otpadnih materijala i industrijskih nusproizvoda, u skladu sa principom održivog razvoja i procjene životnog ciklusa. Zbog ovoga, biološki potencijal različitih biljnih otpadnih

materijala je u fokusu brojnih istraživanja. Ove studije su važne, kako u ekonomskom, tako i u ekološkom smislu, kako bi se rasvijetlio način efikasnijeg eksploatacija postdestilacionog otpadnog materijala aromatičnog bilja i drugih biljnih otpadnih materija (Aćimović i sar., 2016). Ponovna upotreba postdestilacionog otpadnog materijala bi mogla doprinесе smanjenju ekološkog opterećenja vezanog za odlaganje zaostalog materijala iz proizvodnog područja (Klančnik i sar., 2017). Ostaci nakon hidrodestilacije etarskog ulja timijana mogu biti od interesa i za ishranu životinja (Chizzola i sar., 2008). Kako bi se otpad transformisao u hranljive sastojke potreban je redosljed operacija koji će uništiti strukturne barijere, ukloniti štetna jedinjenja, kao i potencijalno dodavanje hranljivih materija koje se mogu asimilirati (Capozzi, 2022).

Iako je otpad iz industrije etarskih ulja pokazao manju antioksidativnu aktivnost od originalne biljke, moguće je iskorišćenje određene količine antioksidanata iz ovog otpada. Nekoliko studija je potvrdilo korisnost ovih ekstrakata kao izvora prirodnih antioksidanata u razne namjene (Grigore i sar., 2019).

2.4.2. Aromatična voda

Aromatične vode, poznate i kao hidrolati i hidrosoli predstavljaju vodenu fazu dobijenu hidrodestilacijom različitih dijelova aromatičnih biljaka poslije odvajanja etarskog ulja. Sastav hidrolata varira u zavisnosti od porijekla biljnog materijala, primijenjene tehnike i instrumentalnih tehnika koje se koriste za analizu (Politi i sar., 2022).

Tokom hidrodestilacije voda isparava istovremeno sa etarskim uljem. Nakon kondenzovanja pare u kontaktu sa hladnim sudovima ili cijevima, tečne komponente se razdvajaju na 2 faze (slika 8):

1. uljnu fazu – unutar sabirne posude i
2. aromatičnu vodu – koja je zasićena isparljivim komponentama biljke koje se djelimično ili potpuno rastvaraju u vodi.



Slika 8. Aromatična voda i etarsko ulje timijana (autor: Kristina Burzanović)

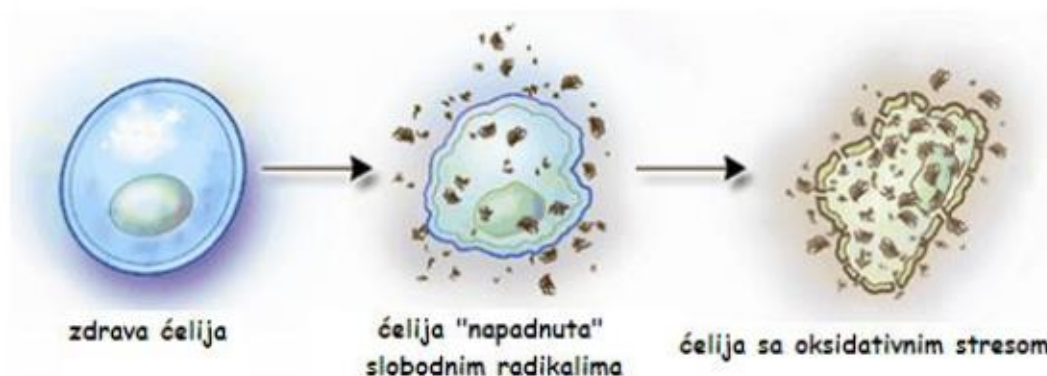
Etarsko ulje se obično koristi u farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji, dok se aromatična voda, u zavisnosti od njenih bioloških svojstava razblažuje vodom u odnosu 1:8 ili 1:12 i koristi u aromaterapiji (Hamedi i sar., 2017a). Za razliku od čistog etarskog ulja, koje je obično jakog, oštrg mirisa, aromatična voda je umjerena i uravnotežena i njene isparljive komponente su rastvorljive u vodi. Aromatična voda ima svoj individualni miris i sastav koji se znatno razlikuje od čistog etarskog ulja sa kojim je kodestilisana (Hamedi i sar., 2017b).

Proizvodnja hidrolata je jednostavna i jeftina i oni se danas široko koriste u farmaceutskoj, prehrambenoj, kozmetičkoj industriji i aromaterapiji (Konstantinović i sar., 2022). Ružina voda i voda narandže se tradicionalno koriste u medicini za njegu kože i u ishrani za pripremu kolača i pića u različitim djelovima svijeta, dok se timijan, bosiljak, nana, eukaliptus i lavanda koriste u parfimeriji (Andola i sar., 2014).

Hemijska svojstva hidrolata su nedovoljno ispitana. Neki literaturni podaci ukazuju na njihova antimikrobna i antifungalna svojstva (D'Amato i sar., 2018; Shafie i sar., 2022).

2.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Život je složen proces koji zahtijeva energiju da bi se održao. Jedan od ključnih elemenata neophodnih za postojanje života na Zemlji je kiseonik. Kada je antioksidativna zaštita prekinuta tokom patološkog stanja ili stresa, višak slobodnih radikala ispoljava štetne efekte i ima destruktivne implikacije na ćelije organizma (Aebisher i sar., 2021). Kada se poremeti ravnoteža između ćelijske antioksidativne odbrane i prekomjerne proizvodnje reaktivnih kiseonikovih jedinjenja dolazi do oštećenja različitih ćelijskih makromolekula i takvo stanje se karakteriše kao oksidativni stres (slika 9). Usko je povezan sa procesima starenja i brojnim poremećajima u organizmu (Petrović i sar., 2017). Oksidativni stres je uzročnik velikog broja oboljenja poput kardiovaskularnih bolesti, plućnih bolesti, autoimunih bolesti, bolesti jetre i pankreasa, očnih i kožnih bolesti i mnogih drugih (Vidanović, 2019). Takođe, ima značajnu ulogu u procesu napredovanja raka dojke (Coughlin, 2018). Posljednjih godina je prepoznato da oksidativni stres može objasniti mehanizam veze gojaznosti i povezanih komplikacija pošto oksidativni stres uzrokuje oštećenje tkiva kroz promjene u ćelijskoj strukturi (Malenica i Meseldžić, 2022). Esencijalni nezasićeni molekuli su posebno podložni oksidativnim procesima. Oksidacija nezasićenih masnih kiselina u biološkim membranama dovodi do smanjenja fluidnosti membrane i narušavanja funkcija i struktura membrana (Haraguchi i sar., 1996).

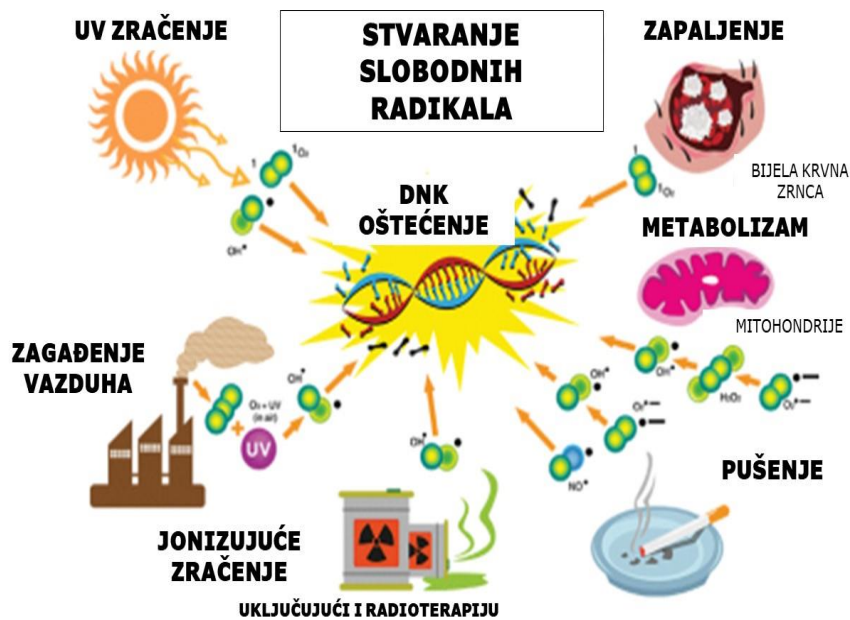


Slika 9. Ćelija prije i poslije izlaganja oksidativnom stresu
(Tasić, 2017)

Prooksidansi su jedinjenja koja mogu da prouzrokuju ili ubrzaju reakciju oksidacije i oni se dijele na slobodnoradikalske vrste i neradikalske vrste. Neradikalske vrste predstavljaju oksidaciona sredstva koja mogu lako preći u slobodne radikale koji imaju izraženo svojstvo reaktivnosti (Stanković, 2019).

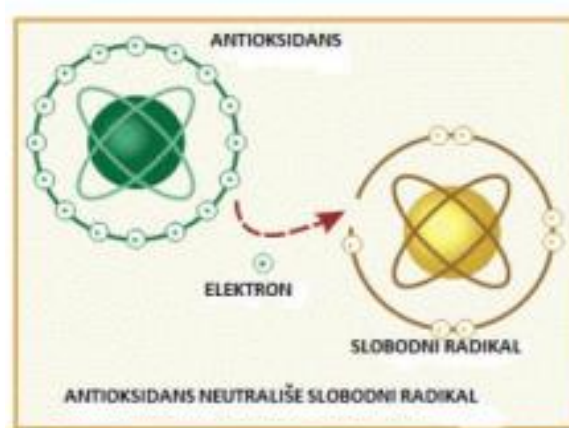
Slobodni radikali su prisutni u našem tijelu i nastaju normalnim fiziološkim procesima, uključujući aerobni metabolizam i inflamatorne odgovore čiji je cilj eliminacija patogenih mikroorganizama. Ove vrste napadaju lipide, proteine i DNK izazivajući oksidativnu modifikaciju (Banerjee i sar., 2019). Slobodni radikali su vrlo reaktivni molekuli koji u svojoj atomskoj ili molekularnoj orbitali sadrže jedan ili više nesparenih elektrona (Kojić, 2009). Oni reaguju sa antioksidativnim jedinjenjem i tako formiraju bezopasan molekul (Rahmah i sar., 2018).

U ljudskom tijelu, oko 5% udahnutog kiseonika se pretvara u reaktivne vrste kiseonika koje obuhvataju hidroksilni radikal, superoksid anjonski radikal, vodonik peroksid, singletni kiseonik, radikal azot oksida, hipohlorit radikal i razne lipidne perokside. Svi su sposobni da reaguju sa membranskim lipidima, nukleinskim kiselinama, proteinima i enzimima i drugim malim molekulima, što dovodi do oštećenja ćelija (Schwag i Das, 2013). Dejstvom slobodnih radikala može biti oštećen svaki tip molekula što negativno utiče na organizam. Mogu oštetiti sve ćelijske strukture, a najveći problem nastaje kada dođe do oštećenja DNK. Takođe, zbog ubrzanog propadanja ćelija ubrzavaju proces starenja organizma. Nastaju pod uticajem raznih faktora (slika 10), kao što su izloženost zagađenom vazduhu i UV zracima, pušenje, a takođe mogu biti i posljedica upale i raznih metaboličkih procesa. Njihovo stvaranje i neutralisanje u organizmu je konstantno, a do problema dolazi kada je veća brzina njihovog stvaranja od brzine neutralisanja. U cilju odbrane organizma od nabrojanih negativnih uticaja slobodnih radikala preporučuje se što veći unos antioksidanata (Vitković, 2017).



Slika 10. Nastajanje slobodnih radikala
(Vitković, 2017)

Supstance koje mogu da odlože ili spriječe nastanak slobodnih radikala su antioksidanti (slika 11). Povrće, voće i začinsko bilje su glavni izvori prirodnih antioksidanata (Koksal i sar., 2017; Vidanović, 2019). Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina i njihovih estara zavisi od broja hidroksilnih grupa u molekulu (Rice-Evans i sar., 1996). Antioksidanti su stabilni molekuli sposobni da smanje štetu uzrokovanu slobodnim radikalima. Slobodni radikali mogu da doniraju ili prime elektrone od drugih molekula što ih čini veoma reaktivnim, pa samim tim i opasnim jer mogu da oštete relevantne molekule ljudskog tijela kao što su DNK ili proteini (Perez, 2021).



Slika 11. Mehanizam stabilizacije slobodnog radikala antioksidantom
(Vitković, 2017)

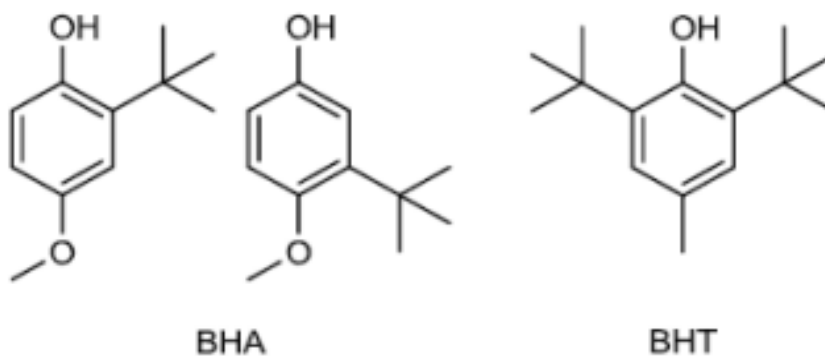
Primjena antioksidanata može značajno da kontroliše ozbiljnost hroničnih bolesti uklanjanjem slobodnih radikala, ali i uključivanjem u endokrinološki odgovor. Potencijal dijetetskih antioksidativnih komponenti u prevenciji hroničnih bolesti i za poboljšanje zdravstvenog kvaliteta privukao je ogromnu istraživačku pažnju u posljednjih nekoliko decenija (Boruga i sar., 2014). Veća konzumacija biljne hrane povezana je sa manjim rizikom od razvoja bolesti povezanih sa oksidativnim stresom (Niciforović i Abramović, 2013).

Na količinu antioksidanata unešenih u organizam prvenstveno utiču navike u ishrani, a zatim i pol, genetika i starost. Takođe, ti faktori imaju uticaj i na sposobnost neutralisanja štetnih efekata slobodnih radikala. Zbog brzog načina života i sve veće zagađenosti vazduha, uloga antioksidanata je od izuzetnog značaja za ljudsko zdravlje (Stanković, 2019).

2.5.1. Klasifikacija antioksidanata

Više je podjela antioksidanata, a neke od njih su prema porijeklu, mjestu nastajanja, mehanizmu djelovanja i prema rastvorljivosti (Babović, 2010; Vitković, 2017).

Postoje dvije osnovne kategorije antioksidanata na osnovu njihovog porijekla, a to su prirodni i sintetski. Značajno je poraslo interesovanje za pronalaženjem prirodnih antioksidanata i upotrebu u ishrani ili medicini kao zamjena za sintetske antioksidante, čija je upotreba ograničena zbog njihove kancerogenosti (Zheng i Wang, 2001). Istraživanje je pokazalo da BHT (butilovani hidroksitoluol) i BHA (butilovani hidroksianizol) djeluju toksično na ljude (Baydar i sar., 2007). U cilju uspješnog rastvaranja u mastima i uljima, oni su uvijek supstituisani alkil grupama (slika 12). U prženim i pečenim proizvodima se BHA i BHT često koriste zbog termičke stabilnosti. U određenim namirnicama (hrana za bebe i hrana za mlađu djecu) upotreba ovih antioksidanata je strogo zabranjena zbog mogućnosti pojave neželjenih efekata (Babović, 2010).



Slika 12. Sintetski antioksidanti (BHA i BHT)
(Vitković, 2017)

Prema mjestu nastajanja antioksidanti mogu biti endogeni i egzogeni (Vidanović, 2019). U organizmu nastaju endogeni antioksidanti, dok je egzogene potrebno unijeti putem hrane i ljekova (Vidanović, 2019; Koksar i sar., 2017).

Prema mehanizmu djelovanja, antioksidanti se dijele na:

- Primarne antioksidante – reagujući sa lipidnim radikalom mogu da odlože ili prekinu lančanu reakciju pri čemu se stvara stabilni produkt.
- Sekundarne ili preventivne antioksidante – njihova uloga je da uspore brzinu procesa oksidacije (Antolovich et al, 2001).

Takođe, antioksidanti se mogu podijeliti i prema rastvorljivosti na hidrosolubilne i liposolubilne. Hidrosolubilni su vitamin C, albumin, bilirubin, mokraćna kiselina i neki polifenoli, dok su liposolubilni vitamini E i A, karotenoidi i određeni polifenoli (Vitković, 2017).

2.6. METODE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija je tehnološki postupak pomoću kojeg se iz različitih dijelova biljnog materijala mogu izdvojiti bioaktivna jedinjenja uz prisustvo rastvarača, primjenom konvencionalnih i nekonvencionalnih metoda. Bioaktivna jedinjenja se mogu ekstrahovati iz materijala koji je svjež, suv, zamrznut, usitnjen ili bez usitnjavanja (Dragović, 2020). Koja će se metoda ekstrakcije upotrijebiti bitno zavisi od biljne vrste iz koje se vrši izolovanje. Prilikom procesa izolovanja treba voditi računa da se mirisne komponente što manje promjene, odnosno da se sačuva miris biljke iz koje je ulje dobijeno (Damjanović, 2000). Izbor odgovarajućeg rastvarača i metode ekstrakcije je ključ za uspješnu izolaciju bioaktivnih jedinjenja iz ljekovitog bilja. Rastvarači za ekstrakciju se biraju u skladu sa njihovim polaritetom, odnosno sposobnošću da izoluju specifične tipove jedinjenja različite strukture i fizičko-hemijskih svojstava. Cilj procesa ekstrakcije je da se dobije što veći prinos ekstrakta i da dobijeni ekstrakti imaju maksimalnu biološku aktivnost. Prinos ekstrakcije i biološka aktivnost dobijenog ekstrakta zavise od tehnike ekstrakcije i rastvarača za ekstrakciju. Pri izboru rastvarača treba uzeti u obzir nekoliko faktora, uglavnom selektivnost, rastvorljivost, cijenu i bezbjednost. Uopšteno, alkoholi, aceton i voda se koriste za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala, ali se selekcija zasniva na svojstvima jedinjenja od interesa, kao i od korišćenog biljnog materijala (Kaczorova i sar., 2021).

2.6.1. Hidrodestilacija

Hidrodestilacija je postupak koji se primjenjuje za izolovanje, prečišćavanje ili razdvajanje supstanci koje se ne miješaju sa vodom. Predstavlja jednostavnu i ekonomičnu metodu pomoću

koje je moguće preraditi velike količine biljnih sirovina, što je ogromna prednost ove metode (Bogdanović, 2016). Hidrodestilacija je metoda koja se primjenjuje za ekstrakciju isparljivog ulja iz biljnih djelova (Bader Ul Ain i sar., 2020). Najčešće se primjenjuje hidrodestilacija po Klevendžeru, koja je opisana po Ph. Jug. IV.

Osnovna ograničenja ove metode u pogledu uticaja na hemijski profil etarskih ulja su:

- termoosjetljiva jedinjenja bivaju podvrgnuta transformaciji ili degradaciji,
- trajni kontakt sa vodom povećava hidrolizu, pa se esterifikovana jedinjenja mogu razgraditi na jedinjenja koja ne postoje u ćelijama za skladištenje etarskih ulja,
- kada se koristi stakleni Klevendžer, etarsko ulje je izloženo svjetlosti, što može prouzrokovati foto-oksidaciju (Hzounda Fokou i sar., 2020).

Postoje tri načina izvođenja hidrodestilacije:

- klasična,
- vodeno-parna i
- parna hidrodestilacija (Bogdanović, 2016).

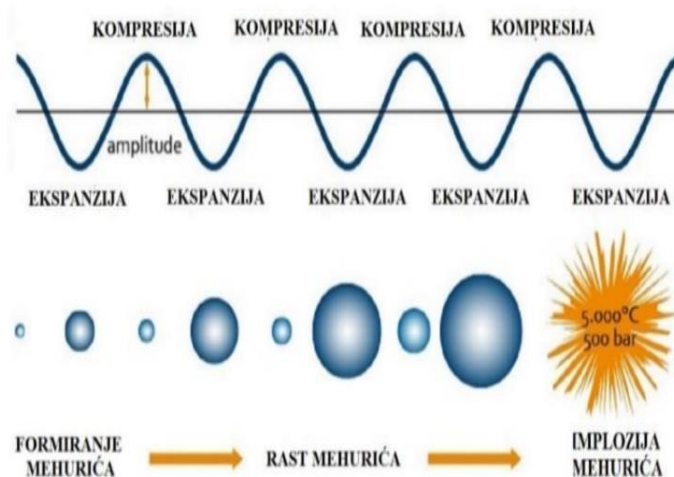
2.6.2. Ekstrakcija čvrsto-tečno organskim rastvaračima

Bioaktivna jedinjenja se generalno dobijaju iz prirodnih izvora ekstrakcijom uz primjenu **organskih rastvarača**. Biljna sirovina koja je prethodno obrađena izlaže se različitim rastvaračima koji selektivno ekstrahuju jedinjenja od interesa, kao i druge agense (arome i boje). Uzorci se obično centrifugiraju i filtriraju da bi se uklonio čvrsti ostatak, a ekstrakt se koristi kao aditiv. Neki od najčešće korišćenih rastvarača u procesu ekstrakcije su etanol, metanol, etar, hloroform i aceton, u različitim odnosima sa vodom. Ovi rastvarači se primjenjuju u cilju ekstrakcije različitih jedinjenja, kao što su fenoli, flavonoidi, tanini i mnogi drugi. Prednost primjene ove metode je jednostavnost rada i niska cijena obrade (Azeez i sar., 2017).

Najčešće se primjenjuje Soxhlet ekstrakcija. Prednost primjene metode su ekstrakcija velike količine uzorka, višestruka ekstrakcija uzorka čistim rastvaračem, kao i to što nakon ovog postupka nije potrebno izvršiti filtriranje (Drinić, 2020), dok su njeni nedostaci dugo vrijeme neophodno za ekstrakciju i velika količina utrošenog reaktanta (Luque de Castro i Priego-Capote, 2009). Primjena ove metode se ne preporučuje kod termolabilnih jedinjenja jer produženo zagrijavanje može dovesti do degradacije jedinjenja (Pandey i Tripathy, 2013).

2.6.3. Ultrazvučna ekstrakcija

Potencijalna industrijska primjena ultrazvuka prepoznata je u industriji fitofarmaceutske ekstrakcije za širok spektar biljnih ekstrakata. **Ultrazvučna ekstrakcija** se primjenjuje za izolaciju isparljivih jedinjenja iz prirodnih proizvoda na sobnoj temperaturi sa organskim rastvaračima. Poboljšanje efikasnosti ekstrakcije organskih jedinjenja ultrazvukom se pripisuje fenomenu kavitacije nastale u rastvaraču prolaskom na ultrazvučni talas (slika 13) (Reyes Jurado i sar., 2014). Tada dolazi do difuzije unutrašnjeg ćelijskog materijala bez ikakvog značajnog povećanja temperature, čime se izbjegava termička degradacija sadržanih vrijednih jedinjenja (Arshadi i sar., 2016). Ćelije koje sadrže etarsko ulje posjeduju veoma tanku membranu koja se lako može uništiti, a primjenom ultrazvuka olakšava se oslobađanje ekstrahovanih jedinjenja i poboljšava transport rastvarača u biljnu ćeliju. Zbog toga su efikasno uništenje ćelijskog zida i efikasan prenos mase dva glavna faktora koja dovode do poboljšanja ekstrakcije primjenom ultrazvuka. Mnogi faktori utiču na dejstvo ultrazvuka u cilju postizanja efikasne ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja. Neki od njih su sadržaj vlage i veličina čestica, odabir rastvarača, temperature, pritisak i frekvencija (Reyes Jurado i sar., 2014). Raspon ultrazvuka koji se koristi kod ultrazvučne ekstrakcije kreće se 20-2000 kHz (Savić, 2014). Ova metoda se smatra efikasnom jer proces ekstrakcije traje kraće u odnosu na druge metode ekstrakcije, manja je potrošnja rastvarača i dobija se finalni proizvod visoke čistoće koji nije skup i može da se primjenjuje i u laboratorijskim i u industrijskim uslovima (Perez, 2021). Primjena ultrazvuka je ekonomična metoda jer se njenom primjenom može povećati ekstrakcijski prinos određenih komponenti, kao što su polifenoli, antocijani i polisaharidi (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Nedostatak postupka je povremeni štetan efekat ultrazvučne energije na aktivne sastojke ljekovitog bilja stvaranjem slobodnih radikala i nepoželjnih promjena u lijeku (Gupta i sar., 2012).



Slika 13. Princip ultrazvučne kavitacije
(Drinić, 2020)

2.6.4. Maceracija

Za ovu metodu je potrebno da biljni materijal bude samljeven radi poboljšanja procesa ekstrakcije i zatim se dodaje rastvarač i takva mješavina treba da odstoji određeno vrijeme u zatvorenoj posudi, na sobnoj temperaturi, tako da biljni materijal bude natopljen rastvaračem. Nakon određenog vremena vrši se filtriranje (Perez, 2021). Prinos prvenstveno zavisi od stepena usitnjenosti biljnog materijala, a zatim i od primijenjenog rastvarača, vremena trajanja ekstrakcije, procesa miješanja i slično. Pozitivne strane ove metode su mali troškovi, lakoća izvođenja i ekstrakcija termolabilnih supstanci, dok su negativne strane nizak prinos ekstrakta, velika potrošnja rastvarača i dugo vrijeme izvođenja ekstrakcije (Drinić, 2020).

2.7. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Zbog sve većeg interesovanja za primjenu prirodnih antioksidanata, zahtjevi za pouzdanim metodama mjerenja antioksidativne aktivnosti su sve veći. Kako bi se pravilno odabrala metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti, važno je znati prednosti i mane, kao i mehanizam ovih testova. Pravilan odabir metode daje uvid u realan antioksidativni potencijal ispitivanog ekstrakta (Shadidi i Zhong, 2015).

Podjela metoda koje služe za ispitivanje antioksidativne aktivnosti može se izvršiti prema:

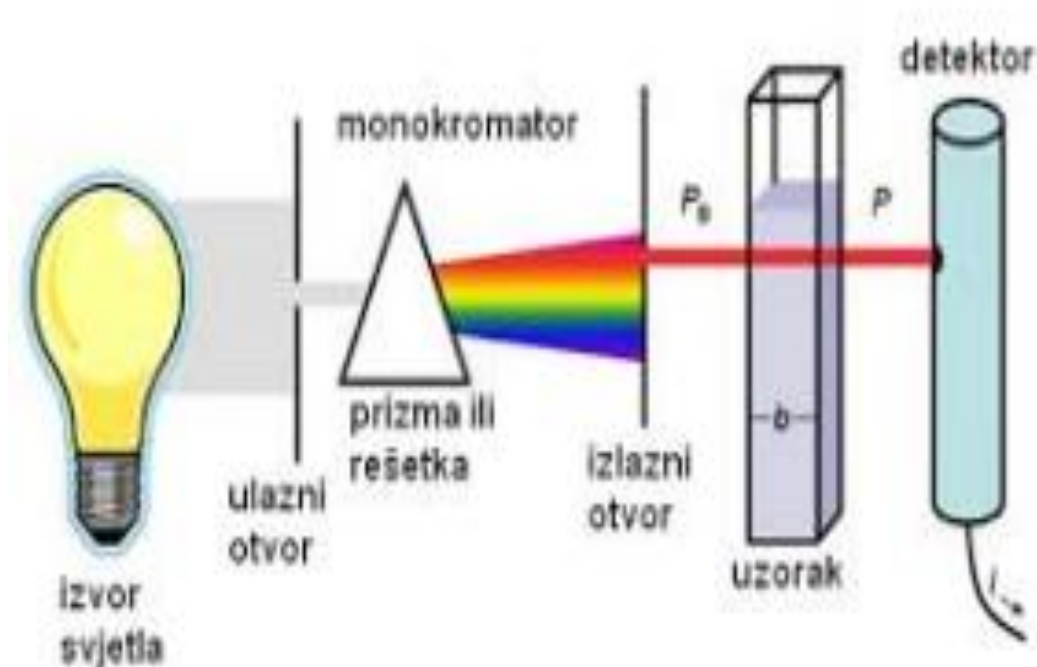
- načinu ispitivanja (*in vivo* i *in vitro*)
- metodi detekcije (spektrofotometrijski, ESR spektrometrijski i fluorometrijski)
- direktnosti određivanja (direktne i indirektne) (Bogdanović, 2016).

2.7.1. UV/VIS spektrofotometrija

Ultraljubičasta/Vidljiva spektrofotometrija predstavlja spektroskopsku metodu koja obuhvata proučavanje apsorpcije elektromagnetnog zračenja u oblasti između 200 i 800 nm. Na talasnim dužinama ispod 200 nm nalazi se vakuumska ultraljubičasta oblast, koja nije od značaja za određivanje strukture zbog apsorpcije kiseonika iz vazduha. Ova metoda se uglavnom koristi za identifikaciju djelova molekula koji apsorbuju u ovoj oblasti i to najčešće prirodnih konjugovanih jedinjenja kao što su antocijani, flavonoidi, fenoli, biljni pigmenti i drugi (Mitić, 2018).

Spektrofotometar je instrument koji se koristi u UV/VIS spektroskopiji pomoću kojeg se mjeri intenzitet svjetlosti koji prolazi kroz uzorak i prikazan je na slici 14. Dobijena vrijednost se upoređuje sa intenzitetom svjetlosti prije nego što ona prođe kroz uzorak. Odnos ove dvije vrijednosti se najčešće izražava u procentima (Mitić, 2018). Spektrofotometar se satoji od

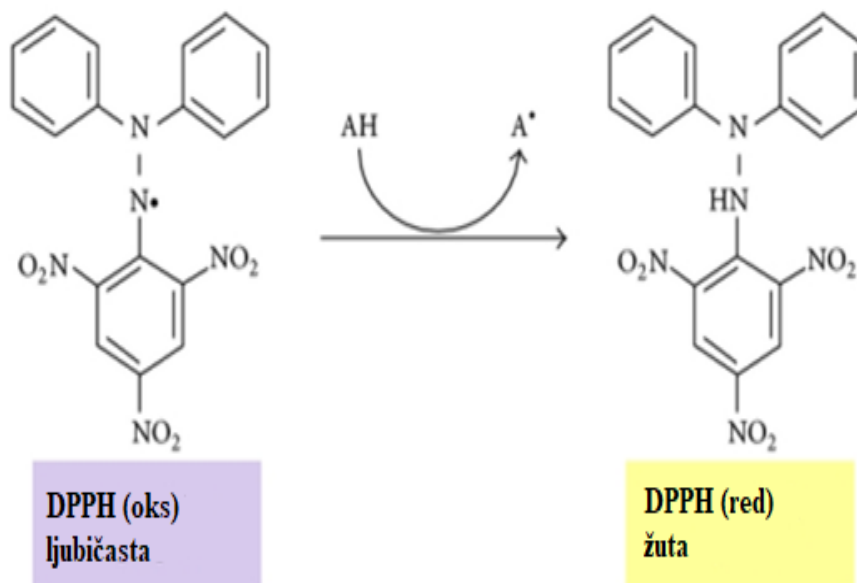
disperzionog elementa (prizme i difrakcione rešetke), izvora zračenja (volframove ili deuterijumske lampe), detektora koji transformiše svjetlosni u električni signal, uzorka za analizu koji se nalazi u kiveti i optičkih djelova (ogledala, prizme, sočiva) (Stanković, 2019). Svi djelovi UV/VIS spektrofotometra su dati na slici.



Slika 14. Djelovi UV/VIS spektrofotometra
(Stanković, 2019)

2.7.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) test

Antioksidativna svojstva ekstrakata mogu se odrediti metodom neutralizacije DPPH radikala. Antioksidant reaguje sa slobodnim DPPH radikalom (ljubičasto obojen rastvor) i prevodi ga u žuto obojen rastvor (slika 15). Prekida se lančana reakcija oksidacije i dobijeni krajnji proizvod je stabilan (Milutinović i sar., 2013). Reakcija je praćena promjenom boje i vrijednost apsorbancije se mjeri na 517 nm. Promjena boje je pokazatelj antioksidativne aktivnosti (Teixeira i sar., 2013).



Slika 15. Promjena boje DPPH radikala u prisustvu antioksidanta (Teixeira i sar., 2013)

Ovo je najčešće korišćena metoda za određivanje antioksidativnog dejstva mnogih ekstrakata (Stanković, 2019).

DPPH• radikal se slabo rastvara u nepolarnim rastvaračima, dok u različitim polarnim organskim rastvaračima pokazuje značajnu rastvorljivost. Ovaj test se obično vrši u rastvoru metanola ili etanola radi lakšeg rastvaranja fitokemikalija (Foti, 2015).

Prednost primjene DPPH testa su njegova lakoća izvođenja, niska cijena, mogućnost izvođenja na sobnoj temperaturi i mogućnost automatizacije (Kedare i Singh, 2011; Munteanu i Apetrei, 2021).

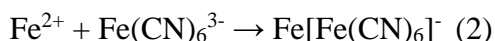
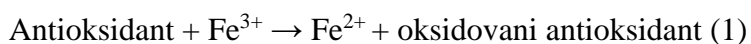
2.7.3. FRAP test

Antioksidativna svojstva ekstrakata mogu se odrediti i FRAP metodom koja mjeri kapacitet antioksidativne komponente da redukuje prisutnu antioksidativnu komponentu, pri čemu dolazi do transfera elektrona i promjene boje. Promjena boje mjeri se spektrofotometrijski, a stepen promjene boje je proporcionalan koncentraciji antioksidanta (Milutinović i sar., 2013). Test se zasniva na redukcionoj moći jedinjenja (Fernandes i sar., 2015). Uslovi reakcije (temperatura, pH, zapremine reagensa i uzorka, trajanje reakcije) su fiksirani, a mjerenje vrijednosti apsorbancije se vrši na 593 nm (Benzie i Devaki, 2018).

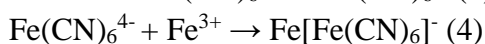
FRAP test se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa gvožđe-2,4,6-tripiridil-s-triazina pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks

FRAP test se sprovodi u kiselim uslovima (pH = 3,6) kako bi se održala rastvorljivost gvožđa. Reakcija na nižim vrijednostima pH smanjuje jonizacioni potencijal koji pokreće prenos elektrona i povećava redoks potencijal, izazivajući promjenu u dominantnom mehanizmu reakcije. Originalni FRAP test koristi tripiridiltriazin (TPTZ) kao ligand koji je vezan za jon gvožđa, dok su alternativni ligandi, kao što je ferozin (koji takođe vezuje jone gvožđa), korišćeni za procjenu redukcijske moći askorbinske kiseline (Munteanu i Apetrei, 2021).

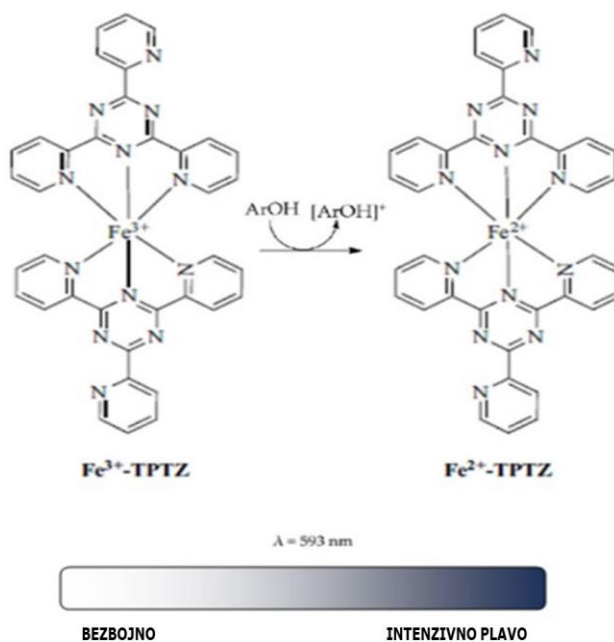
Formiranje intenzivne plave boje može se desiti na dva različita načina sa istim rezultatom. Antioksidanti mogu ili redukovati Fe^{3+} u rastvoru do Fe^{2+} , koji vezuje fericijanid da se dobije intenzivno plavo obojenje ili redukuje fericijanid u ferocijanid, koji vezuje slobodni Fe^{3+} u rastvoru i formira intenzivno plavo obojenje. Ova dva načina se mogu prikazati sljedećim reakcijama:



ili



Na slici 16 prikazana je pojednostavljena šema za ove dvije reakcije i promjenu boje zajedno sa mehanizmom reakcije (Munteanu i Apetrei, 2021).

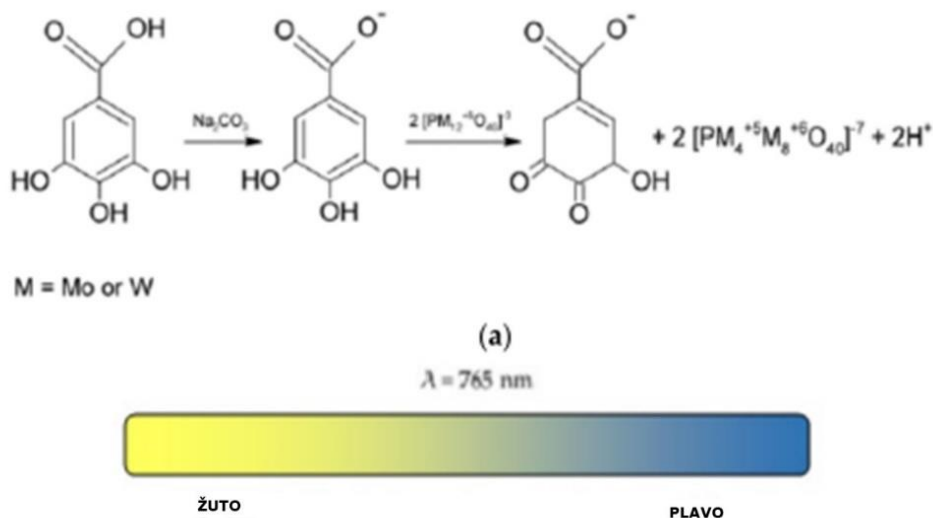


Slika 16. Mehanizam formiranja intenzivno plave boje FRAP metodom (Munteanu i Apetrei, 2021)

Nedostatak primjene ove metode predstavlja moguća pojava plavog sedimenta, pa je vrijeme dodavanja Fe^{3+} od suštinskog značaja (Munteanu i Apetrei, 2021).

2.7.4. Folin-Ciocalteu metoda

Najčešće korišćena metoda za procjenu ukupnih fenola je Folin-Ciocalteu metoda. Princip ove metode se sastoji u oksidaciji fenolnih jedinjenja iz analiziranog uzorka pomoću Folin-Ciocalteu reagensa koji se sastoji iz fosfovolframove kiseline i fosfomolibdinske kiseline. Reagens, koji je žuto obojen, se redukuje i prelazi u plavo obojen kompleks (slika 17). Intenzitet plave boje novonastalog kompleksa direktno je proporcionalan količini fenola koja se nalaze u rastvoru i detektuje se spektrofotometrijski na talasnoj dužini između 750 i 765 nm (Stanković, 2019). Reakcija se izvodi u alkalnoj sredini (Munteanu i Apetrei, 2021).



Slika 17. Mehanizam nastajanja plave boje Folin-Ciocalteu metodom (Munteanu i Apetrei, 2021)

Kao standard za kvantitativnu procjenu fenolnih jedinjenja u uzorku obično se koristi galna kiselina (Michiu i sar., 2022). Test je osjetljiv na promjenu temperature i pH vrijednosti, pa to predstavlja glavni nedostatak ove metode (Munteanu i Apetrei, 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL I METODE

3.1.1. Materijal

U ovom radu korišćena je postdestilaciona biomasa timijana, zaostala nakon procesa hidrodestilacije po Klevendžeru. Upotrijebljeni su listovi autohtone vrste gajene u Dinoši, na teritoriji opštine Tuzi (slika 18). Timijan je ručno ubran u martu 2022. godine i osušen na sobnoj temperaturi, bez direktne sunčeve svjetlosti i u odsustvu vlage. Timijan je zadržao svježinu i sačuvao boju i aromu. Materijal je čuvan u papirnim vrećama.



Slika 18. Timijan (Autor: Kristina Burzanović)

Nakon sušenja, biljni materijal je usitnjen mljevenjem. Usitnjavanje je veoma važna operacija jer tada dolazi do narušavanja strukture biljnog materijala i boljeg prenosa aktivnih materija iz biljne vrste. Prinos ekstrakcije u velikoj mjeri zavisi od veličine čestica biljnog materijala. Mljevenje predstavlja operaciju rasipanja komponenti prisutnih u smješi jednih kroz druge. Za mljevenje timijana upotrijebljen je blender marke Delimano. Usitnjena droga je zatim prosijavana par minuta kroz set sita Erweka (slika 19), srednjeg prečnika: 0,1 mm, 0,2 mm, 1 mm, 2 mm. Na taj način je određen srednji prečnik čestica.



Slika 19. Set sita Erweka (Autor: Kristina Burzanović)

Definisanje stepena usitnjenosti i ujednačenosti čestica droge vrši se preko veličine srednjeg prečnika (d), koji se računa iz izraza:

$$100/d = \sum mi/di$$

gdje je:

- m_i - maseni procenat i -te frakcije (%)
- d_i - srednji prečnik i -te frakcije (mm)
- d - srednji prečnik čestica (mm).

3.1.2. Metode

3.1.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih materijala

Reagensi

- Etanol 70%
- Etanol 96%

Najvažniji korak prilikom izolacije bioaktivnih komponenti je odabir pravilne metode ekstrakcije u cilju dobijanja maksimalnog prinosa željene komponente. Jedinstveni standardni postupak

ekstrakcije ne postoji pa ga je potrebno pravilno odabrati u skladu sa karakteristikama biljnog materijala.

Primijenjene su različite metode ekstrakcije. Prvo, vršena je hidrodestilacija po Klevendžeru kako bi se dobio posdestilacioni otpad koji je korišćen za eksperiment. Zatim su korišćene Soxhlet ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija i maceracija kako bi se ustanovilo koja metoda ekstrakcije je najefikasnija za izolovanje bioaktivnih materija iz postdestilacione biomase timijana, tj. kojom metodom se dobija ekstrakt sa najvišim sadržajem flavonoida, fenola i tanina, i kako bi se ustanovilo koji ekstrakt pokazuje najbolja antioksidativna svojstva.

Hidrodestilacija po Klevendžeru

Za postupak hidrodestilacije po Klevendžeru korišćeno je 100,49 g suvog lista timijana. Nakon mljevenja lista timijana, ukupan sadržaj biljne mase iznosio je 100,02 g. Za mljevenje se koristio aparat marke Delimano.

Nakon mljevenja određen je stepen usitnjenosti, pomoću seta sita Erweka (0,1 mm, 0,2 mm, 1 mm, 2 mm). Masa biljnog materijala prema setu sita je iznosila:

- I d = 2 mm masa uzorka iznosila je 8,89 g.
- II d = 1 mm masa uzorka iznosila je 33,56 g.
- III d = 0,2 mm masa uzorka iznosila je 55,26 g.
- IV d = 0,1 mm masa uzorka iznosila je 1,58 g.

Sve navedene granulacije su dobro izmiješane i sjedinjene u laboratorijskoj čaši (slika 20).



Slika 20. Usitnjeni i prosijani timijan (Autor: Kristina Burzanović)

Hidrodestilacija po Klevendžeru (slika 21) je metoda pomoću koje se može precizno odrediti sadržaj etarskog ulja u biljnim drogama uz primjenu male količine biljnog materijala. Usitnjena droga je usuta u destilacioni balon uz dodatak 600 ml destilovane vode. Na balon je postavljen kondenzator sa konstantnim proticanjem vode. Nakon toga, destilacioni balon je spušten u grejno tijelo i smješa je zagrijavana do ključanja. Proces je trajao 2 h, kako i propisuje Ph. Yug. IV.



Slika 21. Aparatura po Klevendžeru (Autor: Kristina Burzanović)

Hidrodestilacijom po Klevendžeru izolovano je etarsko ulje timijana u gornjem, graduisanom dijelu cijevi. Najveći dio destilata je dobijen u prvih pola sata, nakon čega je prinos bio veoma nizak. Na početku procesa je grejno tijelo uključeno na I, 5-10 minuta nakon izdvajanja prvih kapi destilata, grejno tijelo je pojačano na II, nakon čega je destilacija trajala oko 90 minuta. Ovim postupkom dobijeno je etarsko ulje žućkaste boje, karakterističnog, aromatičnog mirisa.

Za dalji eksperiment je korišćen postdestilacioni otpad koji se nalazi u balonu. Taj otpad je prvobitno bio odvojen od vode, a zatim sušen na temperaturi od 35 °C u roku trajanja od 2 h (slika 22). Timijan ne treba sušiti na temperaturi većoj od 40 °C kako bi se spriječilo isparavanje etarskog ulja i denaturacija bioaktivnih komponenata. Zaostala masa postdestilacionog otpada iznosila je 47,78 g.



Slika 22. Postdestilaciona biomasa timijana (Autor: Kristina Burzanović)

Soxhlet ekstrakcija

Za Soxhlet ekstrakciju korišćeno je 27,66 g osušenog postdestilacionog otpada timijana. Biljni materijal je stavljen u čauru, napravljenu od filter papira, koja se postavlja u ekstrakcionu komoru Soxhletovog ekstraktora. Soxhlet ekstraktor se postavlja na balon u koji je prethodno dodato 250 ml 70% etanola koji se koristio kao rastvarač. Balon se zagrijava uz pomoć vodenog kupatila do ključanja etanola. Njegove pare se penju uz destilacionu granu i ulaze u komoru za ekstrakciju. Zahvaljujući kondenzatoru, pare rastvarača se hlade i kapljice se vraćaju u ekstrakcionu komoru, gdje se odvija ekstrakcija. Čaura, koja se nalazi u ekstrakcionoj komori se natapa rastvaračem koji rastvara željene komponente. Onog momenta, kada se komora napuni rastvaračem, njen sadržaj se prelijeva preko sifona, pri čemu se rastvarač vraća u destilacioni balon. Postupak treba ponavljati sve do obezbojavanja rastvora, što je znak iscrpljenja biljne sirovine. Postupak ekstrakcije je trajao oko 3 h.

Vršena su 3 sifoniranja:

I sifoniranje je trajalo 1 h i 10 min;

II sifoniranje je trajalo 57 min;

III sifoniranje je trajalo 48 min.

Na slici 23 je prikazana aparatura po Soxhletu koja je korišćena u ovom radu.

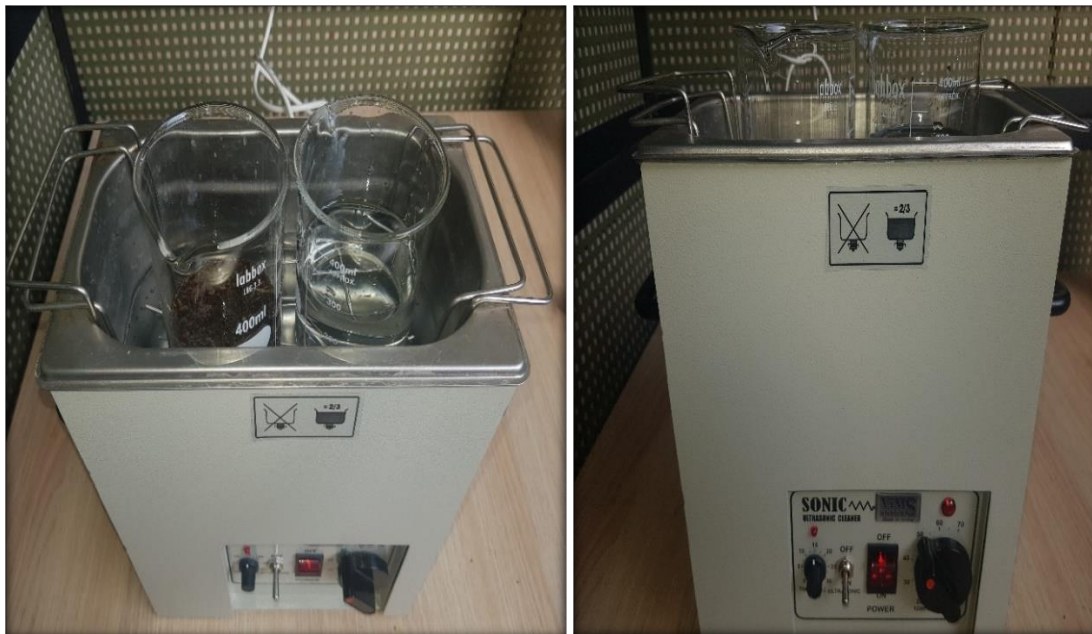


Slika 23. Soxhlet ekstrakcija (Autor: Kristina Burzanović)

Ultrazvučna ekstrakcija

Za postupak ultrazvučne ekstrakcije, 10 g osušenog postdestilacionog otpada timijana je ekstrahovano sa 100 ml 70% etanola kao rastvarača. Korišćen je ultrazvučni ekstraktor marke SONIC ultrasonic cleaner VIMS (slika 24). Temperatura, vrijeme ekstrakcije i snaga ultrazvuka su kontrolisani preko kontrolne table uređaja. Čaša je stavljena na rešetku uređaja u koji je prethodno usuta voda do $\frac{2}{3}$ njegove zapremine. Pored ove posude, nalazila se i posuda napunjena vodom, kako bi se uspostavio balans. Posude su uvijek postavljene na istom rastojanju u odnosu na emiter ultrazvuka. Nije primijenjivano dodatno miješanje tokom ovog procesa. Temperatura je podešena na 60 °C, a sam proces je trajao 15 minuta.

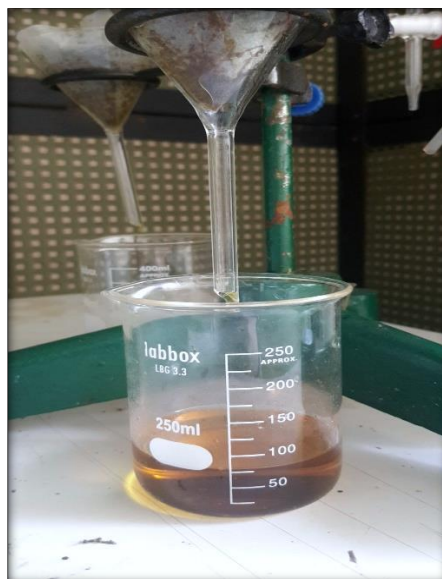
Nakon ekstrakcije, ekstrakt je profiltriran kroz filter papir. Filtriranjem se odvojio ekstrakt od nerastvorljivog dijela biljnog materijala.



Slika 24. Ultrazvučna ekstrakcija (Autor: Kristina Burzanović)

Maceracija

Za postupak maceracije, korišćeno je 10 g osušenog postdestilacionog otpada timijana, a kao rastvarač 100 ml 70% etanola. Da bi se biljna droga u potpunosti sjedinila sa rastvaračem, smješa je ostavljena da odstoji 1 h u dobro zatvorenoj posudi na sobnoj temperaturi. Nakon toga, smješa je filtrirana kroz filter papir kako bi se odvojio ekstrakt od nerastvorljivog biljnog materijala (slika 25).



Slika 25. Ekstrakt dobijen postupkom maceracije (Autor: Kristina Burzanović)

Postupak za sve tri pomenute ekstrakcione metode je ponovno rađen, a kao rastvarač se koristio 96% etanol. Dobijeni ekstrakti (slika 26), korišćenjem oba rastvarača, dalje su ispitivani različitim metodama za ispitivanje antioksidativne aktivnosti.



Slika 26. Ekstrakti dobijeni različitim metodama ekstrakcije uz primjenu 70% i 96% etanola
(Autor: Kristina Burzanović)

3.1.2.2. Hemijska analiza postdestilacionog otpada timijana

Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Reagensi

- aceton,
- urotropin,
- 25% hlorovodonična kiselina,
- aluminijum hlorid,
- etil acetat,
- sirćetna kiselina,
- destilovana voda

Postupak

Ukupna količina flavonoida određena je spektrofotometrijskom metodom prema Kristu i Muleru (Christ i Müller, 1960). Postupak: 0,3358 g ekstrakta ekstrahuje se sa 20 ml acetona, 1 ml urotropina i 2 ml 25% hlorovodonične kiseline u povratnom hladnjaku 30 minuta. Kada se rastvor ohladi vrši se filtriranje kroz pamuk. Ostaci biljnog materijala na pamuku se ponovo ekstrahuju sa 20 ml acetona do ključanja. Rastvor se ponovo propusti kroz pamuk, pa se ekstrakcija acetonom ponovi još jedanput. U normalnom sudu od 100 ml filtrati se sjedine i normalni sud se dopuni acetonom do oznake.

20 ml dobijenog rastvora se pomiješa sa 20 ml vode i 15 ml etil acetata, a zatim se vrši ponavljanje ekstrakcije sa 10 ml etil acetata, tri puta. Sjedinjene etil acetatne faze dvaput su isprane sa po 50 ml destilovane vode i propuštene kroz pamuk, a zatim razrijeđene sa etil acetatom do 50 ml.

Od tako dobijenog rastvora uzme se po 10 ml i prenese u 2 normalna suda od 25 ml. Jedan se sud napuni sirćetnom kiselinom do oznake i taj se rastvor koristi kao slijepa proba. U drugi sud se doda 1 ml aluminijum hlorida i do crte se dopuni rastvorom sirćetne kiseline. Apsorbanca dobijenog rastvora mjeri se na 425 nm nakon 45 minuta stajanja na tamnom mjestu (Christ i Müller, 1960). Za dobijanje kalibracione krive korišćen je kvercetin, a rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta kvercetina po 100 g biljne sirovine (mg QE/100 g).

Određivanje sadržaja ukupnih fenola

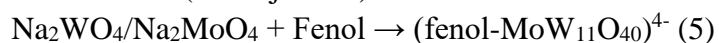
Reagensi

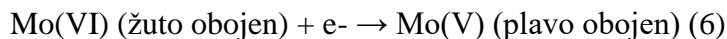
- Folin-Ciocalteu reagens (FC reagens),
- 7,5 % rastvor natrijum karbonata i
- destilovana voda

Postupak

Sadržaj ukupnih fenola je određen spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu sa određenim modifikacijama (Vitković, 2017). 1 ml ispitivanog ekstrakta je pomiješan sa 0,5 ml Folin Ciocalteu reagensa, nakon čega je u smješu dodato 2,5 ml 7,5% natrijum karbonata. Nakon 2 h stajanja na tamnom mjestu, apsorbanca ovako pripremljenih rastvora je očitana na talasnoj dužini od $\lambda=740$ nm. Slijepa proba napravljena je miješanjem 0,5 ml FC reagensa, 2,5 ml 7,5% natrijum karbonata i 1 ml destilovane vode. Za dobijanje kalibracione krive korišćena je serija standardnih rastvora galne kiseline u koncentraciji od 10 do 90 mg/l, a dobijeni rezultati izraženi su kao miligram ekvivalenta galne kiseline po gramu uzorka.

FC reagens je zapravo smješa kompleksa fosfomolibdenove i fosfovolframove kiseline i pri reakciji sa fenolnim jedinjenjima, ovaj reagens ih oksiduje, pri čemu se on redukuje u smješu volfram-oksida i molibden-oksida (reakcije 5 i 6).





Redukovani rastvor ima intenzivno plavu boju i mjeri se intenzitet boje u odnosu na slijepu probu koja ne sadrži uzorak (Gotal, 2020). Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanom ekstraktu izražen je kao ekvivalent mase u miligramima galne kiseline na 1 gram biljnog materijala (mgGAE/g) (Tasić, 2017).

Određivanje sadržaja ukupnih tanina

Reagensi

- Folin-Ciocalteu reagens (FC reagens),
- natrijum karbonat,
- pirogalol i
- destilovana voda

Postupak

Tanini su određeni metodom koja je opisana u Evropskoj farmakopeji Ph. Eur. 9.0. (Council of Europe, 2016). 0,7215 ekstrakta se sa 150 ml destilovane vode zagrijava do ključanja i ostavi da ključa još pola sata. Ohlađeni rastvor se profiltrira pri čemu se odbacuje prvih 50 ml filtrata. Od preostalog filtrata se uzme 5 ml (u normalni sud od 25 ml) i dopuni se destilovanom vodom do crte. Potom se u drugi normalni sud od 25 ml uzme 2 ml prethodno napravljenog rastvora i doda se 1 ml FC reagensa, 10 ml vode i dopuni se do crte sa natrijum karbonatom (koji se prethodno vrtio na mješalici pola sata). Na 760 nm je izmjerena apsorbancia, a za slijepu probu je korišćena destilovana voda (A1).

10 ml od prvobitnog filtrata se vrti na mješalici sa 0,1010 g kožnog praha u trajanju od 1 h. Nakon 1 h vrši se filtriranje. Dobijeni filtrat se potom tretira kao prethodni rastvor i nakon dodavanja svih potrebnih reagenasa, vrši se mjerenje apsorbance na 760 nm (A2). Kao slijepa proba se koristi destilovana voda.

U 100 ml vode se rastvori 50 mg pirogalola. Potom se ponovi postupak kao i za prethodna dva rastvora i mjerenje se vrši na 760 nm (A3). I u ovom slučaju se za slijepu probu koristila destilovana voda.

Njihov sadržaj je izračunat na osnovu razlike u apsorbanci ukupnih polifenola (A1) i polifenola koji se ne adsorbuju na kožni prah (A2). Apsorbance su izmjerene na talasnoj dužini od 760 nm. Sadržaj tanina se izražava kao procenat pirogalola.

Sadržaj tanina, izražen kao procenat pirogalola, izračunat je uz pomoć formule:

$$\frac{62,5 (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 - m_1}$$

gdje je:

m_1 - masa ispitivanih ekstrakata timijana u gramima,

m_2 - masa pirogalola u gramima.

3.1.2.3. Određivanje antioksidativnih svojstava postdestilacionog otpada timijana

Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala-DPPH test

Reagensi

- 70% etanol i
- 0,2 mM rastvor DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)
 - o 0,7656 g DPPH praha rastvori se u 50 ml etanola (slika 27)



Slika 27. DPPH rastvoren u etanolu (Autor: Kristina Burzanović)

Postupak

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti prirodnih antioksidanata najčešće se koristi DPPH metoda. DPPH predstavlja skraćenicu za 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Vitković, 2017). Prati se transformacija rastvora koji je ljubičasto obojen u redukovani žuto obojen rastvor i na taj način se uz pomoć DPPH radikala izračunava vrijednost antioksidativnog kapaciteta (Tasić, 2017). Napravljena je serija uzoraka od 10 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 100 μ l i 300 μ l i svaki uzorak je bio dopunjen etanolom tako da ukupni zbir uzorka i etanola iznosi 300 μ l. Zatim je u svaki uzorak dodato 2700 μ l DPPH. Ovako napravljeni rastvori predstavljaju prvu seriju uzoraka (slika 28).



Slika 28. Prva serija uzoraka (Autor: Kristina Burzanović)

Za drugu seriju uzoraka su uzete iste vrijednosti uzoraka i etanola s tim što se na kraju, umjesto DPPH radikala dodavao rastvarač (2700 μ l 70% etanol). Sadržaj svake epruvete je snažno promućkan i ostavljen da odstoji 30 minuta na tamnom mjestu, nakon čega je izmjerena apsorbanca.

Talasna dužina na kojoj je izmjerena apsorbanca iznosila je 517 nm. Na taj način je izmjeren intenzitet promjene boje. Za slijepu probu se koristio rastvarač, 70% etanol.

DPPH radikal je veoma stabilan, pa je ova metoda pouzdana i jednostavna za ispitivanje antioksidativne aktivnosti različitih biljnih ekstrakata i ona se odnosi na ukupni kapacitet uzorka, a ne na jednu određenu antioksidativnu komponentu (Babović, 2010).

Procenat inhibicije DPPH izračunat je prema sljedećoj formuli (Blois, 1958):

$$\% = 100 - \left[(A_S - A_B) \times \frac{100}{A_C} \right]$$

gdje je:

A_S - apsorbanca etanolnih ekstrakata prethodno tretiranih DPPH rastvorom,

A_B - apsorbanca etanolnih ekstrakata bez prethodnog tretiranja DPPH rastvorom,

A_C - apsorbanca etanolnog rastvora DPPH.

Određivanje sposobnosti redukcije feri jona-FRAP test

Reagensi

- 1) acetatni pufer (I rastvor)

- natrijum-acetat (bezvodni),
- sirćetna kiselina i
- sestilovana voda
- 2) TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin - II rastvor)
 - hlorovodonična kiselina i
 - destilovana voda
 - TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin)
- 3) gvožđe (III) hlorid rastvoren u vodi (III rastvor)

FRAP: 25 ml acetatnog pufera (I rastvor), 2,5 ml TPTZ (II rastvor), 2,5 ml gvožđe (III) hlorida (III rastvor)

Postupak

Ova se metoda zasniva na mjerenju stepena redukcije Fe^{3+} jona do Fe^{2+} u kiseloj sredini (Babović, 2010; Milutinović i sar., 2013). 0,5 g ekstrakta se rastvori u 10 ml 70 % etanola. Od dobijenog rastvora se uzme 100 μl i rastvori u 10 ml etanola i od tako razblaženog rastvora se ponovo uzme 100 μl i pomiješa sa 3 ml FRAP-a. Dobijeni rastvor treba da odstoji pola sata na temperaturi od 37 °C pri čemu treba da nastane plavo obojen rastvor. Talasna dužina na kojoj se mjeri apsorbancija iznosi 593 nm. Za slijepu probu se koristi smjesa etanola i FRAP-a.

Serijski standardni rastvori $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u FRAP reagensu u koncentracionom opsegu od 100 do 1000 mmol/l koristi se za konstrukciju kalibracione krive. Rezultati su izraženi kao milimolovi Fe^{2+} jona po gramu biljne sirovine (mmol Fe^{2+}/g).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. CILJ RADA

Cilj ovog master rada je određivanje ukupnih flavonoida, fenola i tanina u postdestilacionoj biomasi timijana (*Thymus vulgaris* L.) različitim metodama ekstrakcije, kao i upoređivanje efikasnosti različitih metoda u te svrhe. Takođe, cilj je bio i određivanje antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata uz primjenu 70% i 96% etanola kao rastvarača.

U tom cilju, urađeno je sljedeće:

- Listovi gajenog timijana su sakupljeni u martu 2022. godine u Dinoši, na teritoriji opštine Tuzi;
- Hidrodestilacijom po Klevendžeru je pored etarskog ulja lista timijana, dobijen i postdestilacioni otpad timijana, koji je korišćen za dalji eksperiment;
- Vršena je ekstrakcija postdestilacione biomase timijana: Soxhlet ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija i maceracija, a kao rastvarač je korišćen etanol u dvije različite koncentracije (70% i 96%);
- Antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata ispitivana je različitim metodama: DPPH metoda, FRAP metoda i Folin-Ciocalteu metoda;
- Sadržaj ukupnih flavonoida, fenola i tanina u postdestilacionoj biomasi timijana određen je metodom spektrofotometrije;
- Dobijeni rezultati su poređeni sa dostupnim literaturnim podacima.

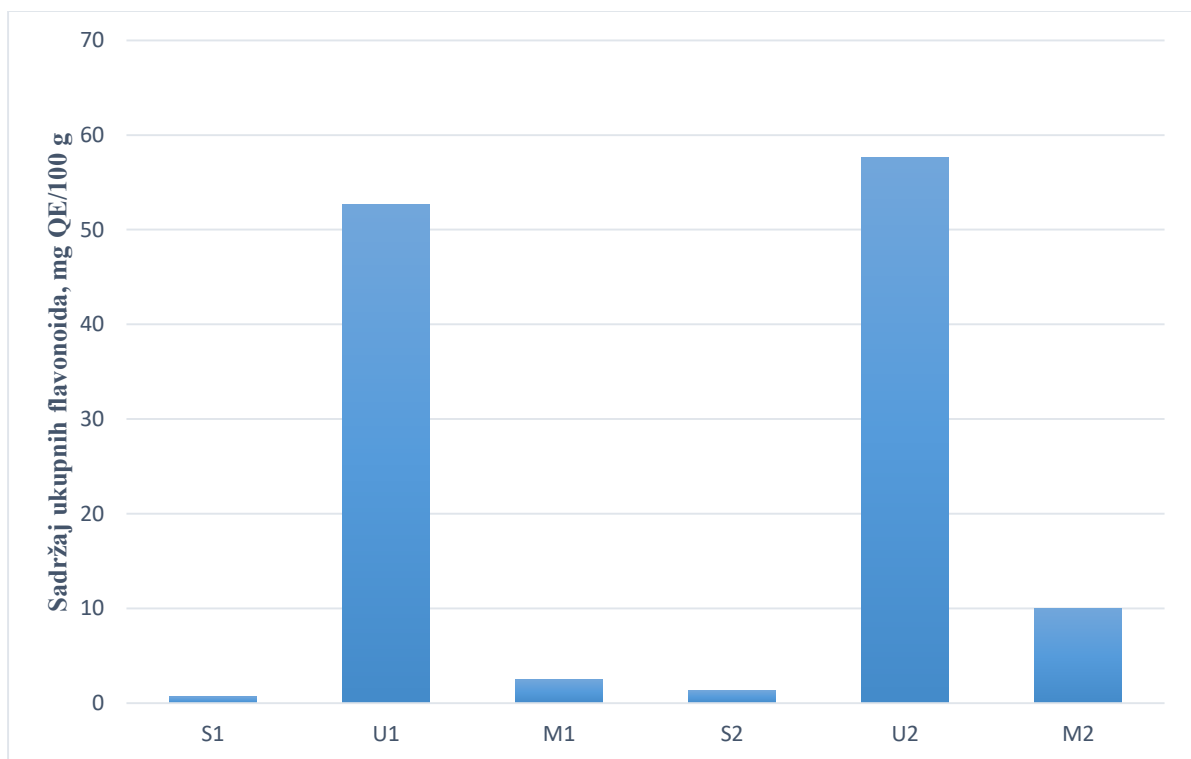
4.2. SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U POSTDESTILACIONOJ BIOMASI TIMIJANA

Flavonoidi predstavljaju važnu klasu niskomolekularnih jedinjenja, polifenolne strukture, široko rasprostranjenu u biljnom carstvu (Panche i sar., 2016). Ove ljekovite komponente imaju značajnu biološku aktivnost, a njihova efikasnost je dokazana u prevenciji nekih bolesti. Flavonoidi nalaze primjenu u prirodnim bojama, u kozmetici i proizvodima za njegu kože. Najizraženija primjena ovih polifenola je u medicinske svrhe (Ullah i sar., 2020).

Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja flavonoida je data na slici 29. Eksperimentalno je ispitano prisustvo flavonoida u postdestilacionom otpadu timijana različitih ekstrakata i rezultati su prikazani na slici 30. Sa S_1 , U_1 , M_1 označeni su ekstrakti dobijeni metodom Soxhlet ekstrakcije, ultrazvučne ekstrakcije i maceracije uz primjenu 70% etanola, respektivno; dok su sa S_2 , U_2 , M_2 , označeni ekstrakti dobijeni metodom Soxhlet ekstrakcije, ultrazvučne ekstrakcije i maceracije uz primjenu 96 % etanola, respektivno.



Slika 29. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida



Slika 30. Sadržaj flavonoida u ekstraktima postdestilacionog otpada timijana

Najveći sadržaj flavonoida imali su ekstrakti postdestilacione biomase timijana koji su dobijeni postupkom ultrazvučne ekstrakcije U_1 (52,7 mg QE/100g) i U_2 (57,6 mg QE/100g). Sadržaj flavonoida u ekstraktima koji su dobijeni postupkom maceracije M_2 bio je 10,02 mg QE/100g i M_1 2,49 mg QE/100g, dok je najniži sadržaj flavonoida u ekstraktima S_2 (1,40 mg QE/100g) i S_1 (0,72 mg QE/100g). Iz prethodno navedenog se zaključuje da se za izolovanje flavonoida iz postdestilacione biomase timijana kao rastvarač pokazao efikasniji 96 % etanol u odnosu na 70 % etanol, a da je ultrazvučna ekstrakcija najefikasnija od svih primijenjenih metoda, nezavisno od koncentracije rastvarača. Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka se posljednjih godina sve više koristi za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. Ova metoda zasniva se na narušavanju zidova biljnih ćelija i oslobađanju jedinjenja spriječavajući degradaciju termolabilnih prirodnih sekundarnih metabolita, što je veoma pogodno za izolaciju fenolnih jedinjenja. Slične vrijednosti sadržaja flavonoida je dobio Gavarić sa saradnicima (2015a) ispitivanjem ekstrakta lista timijana poslije hidrodestilacije uz primjenu 45% (52,89 mg QE/100g) i 75 % (50,09 mg QE/100g) etanola. Vrijednosti sadržaja flavonoida dobijene u tom istraživanju su vršene metodom maceracije i veće su od naših vrijednosti dobijenih istim postupkom. Ovaj rezultat može biti posljedica činjenice da je u datom istraživanju, biljna droga bila potopljena u rastvaraču 24 h, dok je u našem istraživanju biljna droga bila potopljena u rastvaraču 1 h, nakon čega je vršeno filtriranje ekstrakta. Istraživanjem sadržaja flavonoida u ekstraktu timijana (El-Guendouz i sar., 2019) gdje je izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz osušenog lista timijana vršeno Soxhlet ekstrakcijom, pomoću

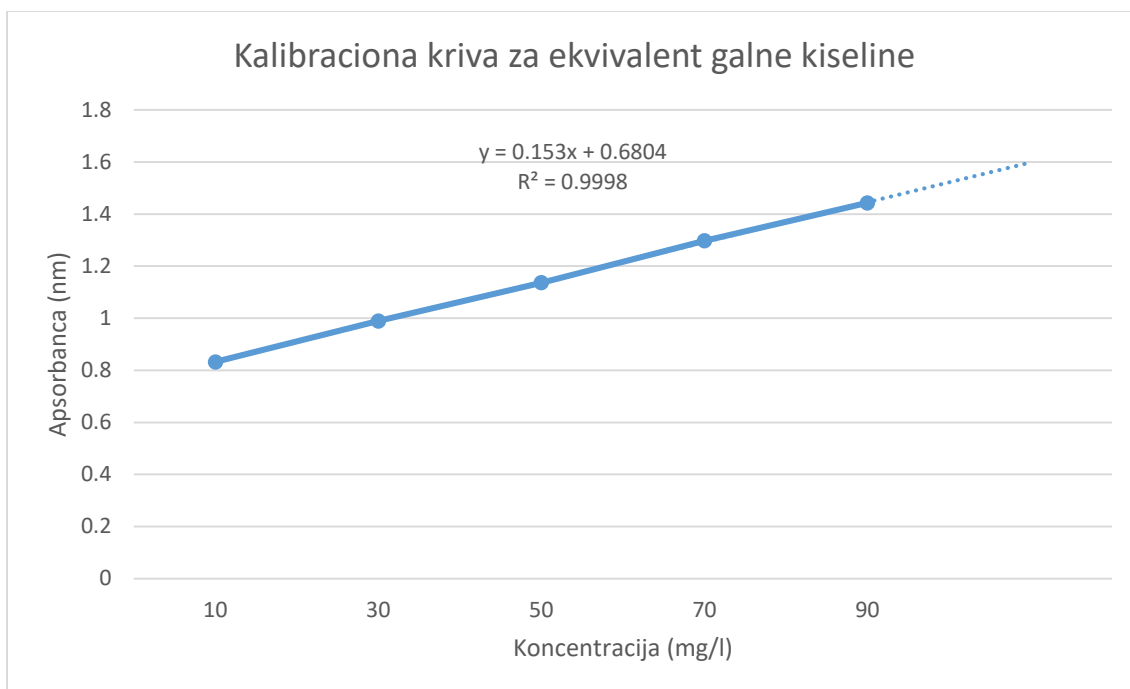
etanola, dobijeno je 0,13 mg QE/100g, što je manje u odnosu na rezultate u našem radu. Ispitivanje sadržaja flavonoida u postdestilacionoj biomasi timijana je vršeno uz metanol kao rastvarač, metodom maceracije (Luca i sar., 2023), a rezultati su se prikazivali kao ekvivalenti rutina po gramu uzorka, pa je sadržaj flavonoida iznosio 24,70 mg RE /g.

Sadržaj flavonoida u postdestilacionoj biomasi timijana je potrebno uporediti i sa drugim ekstraktima iz svježeg lista timijana, za koje je vršeno ispitivanje u više studija. Rezultati se razlikuju, pa tako u jednoj studiji (Koksal i sar., 2017) je ekstrakt timijana imao vrijednost od 36,6 mg QE/100g, u drugoj (Oalđe i sar., 2020) je ta vrijednost iznosila 19,57 mg QE/100g, dok je u trećoj (Zeghad i Merghem, 2013) 8,56 mg QE/100g. Za sve tri navedene studije se kao rastvarač koristio etanol, pa se razlika u rezultatima može objasniti razlikom u geografskom položaju ispitivanih uzoraka, biološkom porijeklu biljne vrste i njene starosti. U pomenutim istraživanjima od metoda su bile primijenjivane maceracija i ultrazvučna ekstrakcija. Sve navedene vrijednosti su manje u odnosu na vrijednosti dobijene u ovom radu postupkom ultrazvučne ekstrakcije, ali veće u odnosu na druge primijenjene metode. Pored etanola, za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz aromatičnih i ljekovitih biljnih vrsta se kao rastvarač najčešće koristio i metanol. Istraživanje lista timijana iz regiona Setif na istoku Alžira metodom maceracije (Amamra i sar., 2018) pokazalo je sadržaj flavonoida 21,92 mg QE/100g.

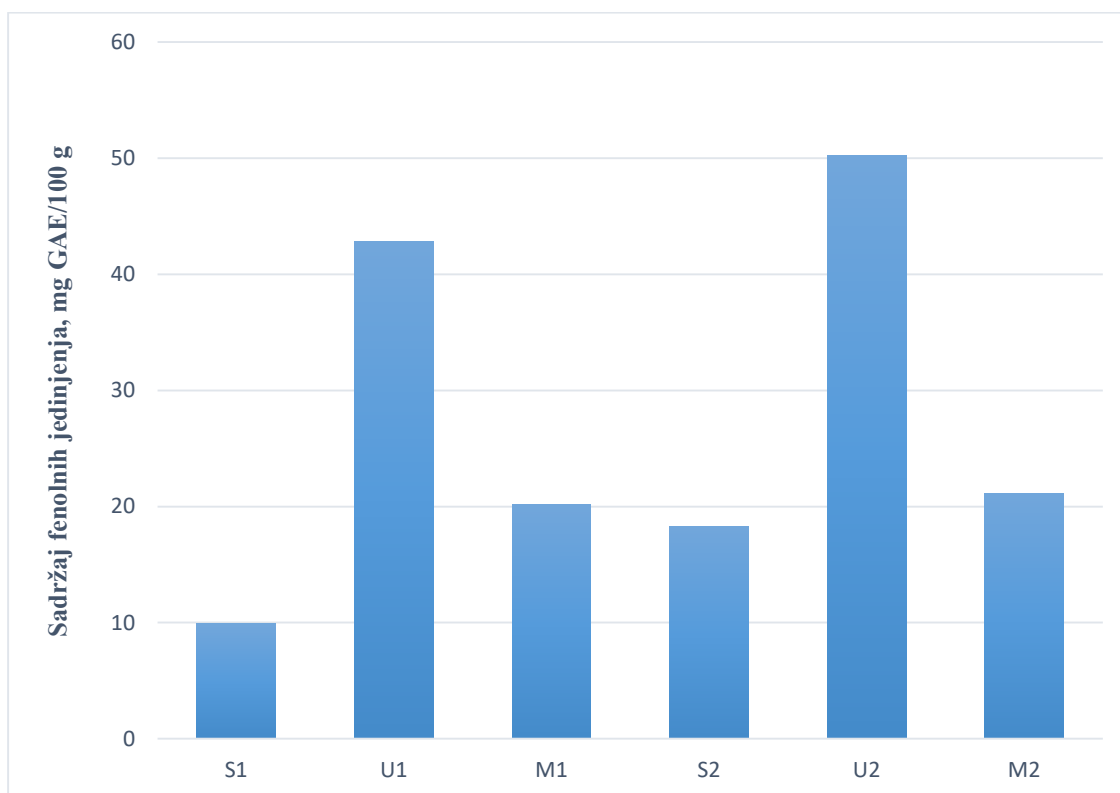
4.3. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U POSTDESTILACIONOJ BIOMASI TIMIJANA

Biljne vrste predstavljaju bitan izvor biološki aktivnih supstanci – antioksidanata. Antioksidativna aktivnost se uglavnom pripisuje fenolnim jedinjenjima (Baatour i sar., 2015). Unos polifenola može se postići konzumacijom hrane biljnog porijekla (Hussein i sar., 2017), prilikom čega se može smanjiti rizik od razvoja oboljenja izazvanih oksidativnim stresom. Fenolna jedinjenja mogu vršiti svoje antioksidativno djelovanje direktnom reakcijom sa slobodnim radikalima i na taj način proizvesti manje reaktivne radikalne vrste (Venkatesa i sar., 2019).

Na slici 31 prikazana je kalibraciona kriva koja je korišćena za određivanje sadržaja ukupnih fenola, dok je na slici 32 prikazan ukupan sadržaj fenola u ekstraktima posdestilacionog otpada timijana (S_1 , U_1 , M_1 , S_2 , U_2 , M_2).



Slika 31. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih fenola



Slika 32. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima postdestilacionog otpada timijana

Najveći sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima postdestilacionog otpada timijana imali su ekstrakti dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom: uzorak U₂ 50,26 mg GAE/100 g i uzorak U₁ 42,82 mg GAE/100 g, zatim postupkom maceracije (21,09 mg GAE/100 g u uzorku M₂ i 20,16 mg GAE/100 g u uzorku M₁), dok je najmanji sadržaj fenolnih jedinjenja pronađen u ekstraktima dobijenim Soxhlet ekstrakcijom (18,3 mg GAE/100 g za uzorak S₂ i 9,9 mg GAE/100 g za uzorak S₁). Ultrazvuk stvara mehanički pritisak na tkivu i dolazi do kavitacije u uzorku, odnosno do stvaranja i razgradnje mikroskopskih mjehurića, gdje ultrazvuk visoke frekvencije usljed djelovanja kavitacije na ćelijski zid materijala, omogućuje veće prodiranje rastvarača u materijal i povećava prenos mase. Svi ekstrakti, nezavisno od primijenjene metode ekstrakcije, dobijeni primjenom 96% etanola imali su veći sadržaj bioaktivnih jedinjenja u odnosu na 70% etanol. Da veća koncentracija rastvarača daje bolje rezultate u pogledu sadržaja bioaktivnih jedinjenja, pokazala je i studija (Gavarić i sar., 2015a) u kojoj je 75% etanol dao bolje rezultate u odnosu na 45%, a kao metoda je korišćena maceracija. Poređenjem rezultata ukupnih fenola dobijenih analizom ispitivanih uzoraka sa nekoliko objavljenih studija uočene su razlike. Naime, Gavarić i saradnici (2015a) su proučavajući postdestilacioni otpad timijana, u ekstraktu dobijenom postupkom maceracije i primjenom etanola kao rastvarača (45% i 75%), detektovali sadržaj ukupnih fenola 58,23 do 62,45 mg GAE/100 g. Dobijeni prinosi ukupnih fenola su veći u odnosu na rezultate u našem radu. U svim eksperimentima 75% etanol se pokazao kao bolji rastvarač za izolovanje fenolnih komponenti. Etanol su kao rastvarač koristili i El-Guendouz i saradnici (2019) i primjenom Soxhlet ekstrakcije dobili da je ekstrakt sa sadržajem ukupnih fenola u otpadu timijana iznosio 97,50 mg GAE/100 g, što predstavlja veću vrijednost u odnosu na naše rezultate. Luca i saradnici (2023) su u svom istraživanju koristili metanol kao rastvarač i dobili da je sadržaj ukupnih fenola u postdestilacionom otpadu timijana, postupkom ultrazvučne ekstrakcije 65,31 mg GAE/100 g, što je približno u poređenju sa rezultatima u našem radu. Prilikom ispitivanja sadržaja fenola u postdestilacionom otpadu, metanol se kao rastvarač koristio i kod srodnih biljaka *Thymus zygis* i *Thymbra capitata* pri čemu su zabilježene nešto veće vrijednosti u odnosu na vrijednosti kod *Thymus vulgaris*. Za *Thymus zygis* (Jordan i sar., 2009) sadržaj ukupnih fenola u biootpadu iznosio je od 122,2 do 108,5 mg GAE/100 g u zavisnosti od stepena navodnjavanja, dok je za *Thymbra capitata* (Proestos i sar., 2005) iznosio od 126,7 do 197,84 mg GAE/100 g. Dobijene vrijednosti potvrđuju da hidrodestilacioni otpad može biti potencijalni izvor fenolnih jedinjenja. Na osnovu dostupnih istraživanja postdestilacione biomase timijana, uočeno je da su se kao rastvarači najčešće koristili etanol i metanol u različitim koncentracijama. Oni su pokazali najbolje rezultate prilikom ekstrakcije fenolnih komponenti zbog njihovog polariteta i dobre rastvorljivosti fenolnih komponenata.

Sadržaj fenolnih komponenti u postdestilacionoj biomasi timijana upoređen je i sa ekstraktima svježeg lista timijana. Oalđe sa saradnicima (2020) je vršio ispitivanje 6 različitih ekstrakata iz porodice Lamiaceae, među kojima je bio i timijan, pri čemu su se kao rastvarači koristili metanol, etanol i voda. Najveći sadržaj fenolnih jedinjenja u svim ispitivanim uzorcima imali su etanolni ekstrakti. Vaičiulienne i saradnici (2022) su izvršili ekstrakciju lista timijana i etanolni ekstrakt

timijana je imao najveći sadržaj fenolnih jedinjenja 35,3 mg GAE/100 g. Za razliku od ovog istraživanja, u istraživanju koje je obavio Gedikoglu sa saradnicima (2019), metanol se pokazao kao bolji rastvarač fenolnih jedinjenja (15,3 mg GAE/100 g) u odnosu na etanol (13,57 mg GAE/100 g). Slične rezultate je pokazalo i istraživanje (Roby i sar., 2013) gdje je sadržaj fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima iznosio 8,10 mg GAE/100 g, dok je u etanolnim ekstraktima iznosio 7,30 mg GAE/100 g. U ovom istraživanju nepolarni rastvarači, heksan i dietil etar pokazali mnogo manju sposobnost ekstrakovanja fenolnih jedinjenja u poređenju sa polarnim rastvaračima. Amamra sa saradnicima (2018) je ispitujući sadržaj fenola u ekstraktu timijana koristio više rastvarača: vodu, butanol, hloroform, etil acetat, metanol i petrol etar, pri čemu su metanolni ekstrakti imali najveći sadržaj fenolnih jedinjenja. Prilikom ekstrakcije fenolnih jedinjenja kod biljaka srodnih biljnoj vrsti *Thymus vulgaris*, primijećene su sličnosti prilikom odabira pogodnih ekstrakcionih rastvarača, ali su vrijednosti izolovanih fenolnih jedinjenja bile veće. Naime, etanolni ekstrakti lista *Thymus algeriensis* i *Thymus quinquecostatus* imali su veći sadržaj fenolnih jedinjenja u odnosu na *Thymus vulgaris*. Etanolni ekstrakt lista *Thymus algeriensis* sadržao je 125 mg GAE/100 g fenolnih jedinjenja (Rezzoug i sar., 2019), dok je etanolni ekstrakt *Thymus quinquecostatus* sadržao 105 mg GAE/100 g (Kim i sar., 2012). Kod biljaka iz iste familije vršeno je poređenje efikasnosti rastvarača u cilju izolovanja fenolnih jedinjenja iz biljke *Thymus leptobotrys*, pa je tako u studiji (Oubihi i sar., 2020), gdje su se kao rastvarači koristili metanol i etanol, metanolni ekstrakti (243,08 mg GAE/100 g) imaju bolja svojstva u odnosu na etanolne ekstrakte (214,26 mg GAE/100 g).

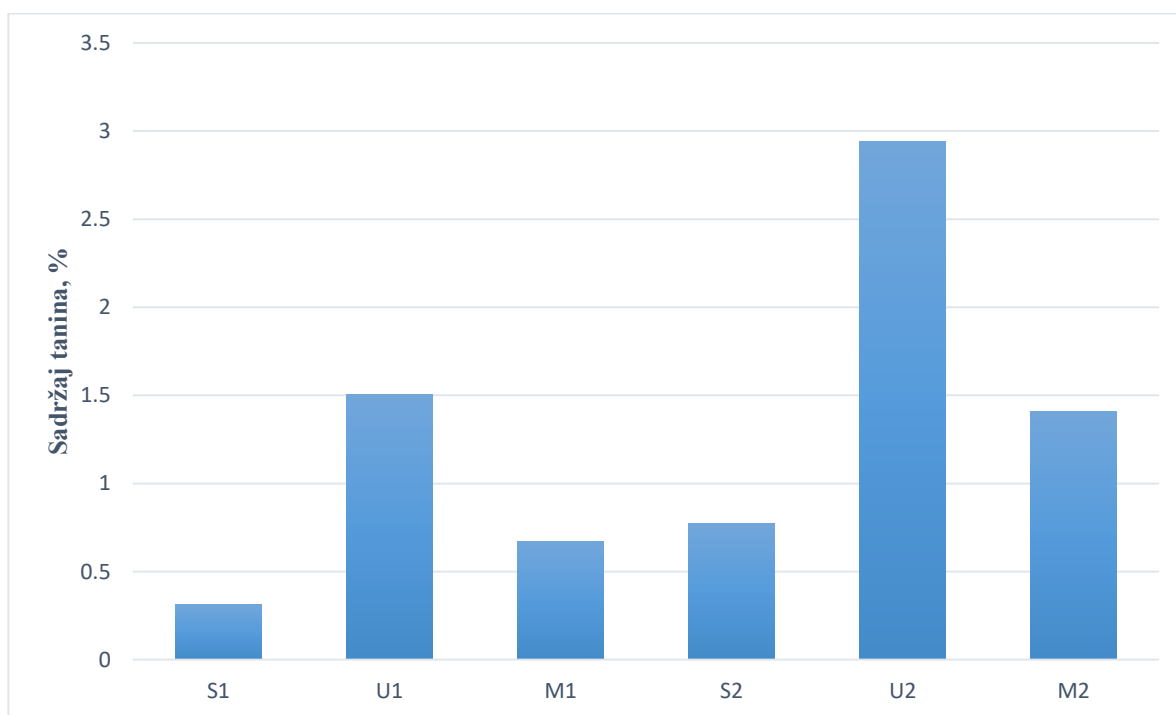
Na osnovu dosadašnjih istraživanja, za ispitivanje fenolnih jedinjenja u svježim listovima timijana primijenjivani su rastvarači: metanol, etanol, voda, aceton, dietil etar, hloroform, butanol. Od svih upotrijebljenih rastvarača, za ekstrakciju fenolnih jedinjenja najbolje rezultate su dali metanol i etanol zbog svog polariteta. U nekim studijama se metanol pokazao kao bolji rastvarač u odnosu na etanol, u pogledu ekstrakcije fenolnih jedinjenja, ali razlike u vrijednostima nisu velike, pa je za upotrebu u prehrambenoj industriji zbog svoje netoksičnosti etanol adekvatniji kao rastvarač. Naravno, osim odabira rastvarača, na prinos fenola utiču i razni drugi faktori zbog kojih su varijacije u rezultatima neminovne. Ukupan sadržaj fenola varira u zavisnosti od biljne vrste, tkiva, faze razvoja i faktora životne sredine, kao što su temperatura, voda, svjetlosni uslovi (Chaves, 2020).

Polaritet rastvarača za ekstrakciju utiče na efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja. Manje polarni rastvarači ekstrahuju manje količine fenolnih jedinjenja, a samim tim ovi ekstrakti posjeduju manji potencijal za uklanjanje slobodnih radikala. Pošto hidroksilne grupe fenolnih jedinjenja doprinose antioksidativnoj aktivnosti, generalno polarniji ekstrakti imaju veće antioksidativne aktivnosti (Kaczorova i sar., 2021).

4.4. SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U POSTDESTILACIONOJ BIOMASI TIMIJANA

Tanini predstavljaju široko rasprostranjene sekundarne metabolite u biljkama i igraju važnu ulogu u njihovim odbrambenim mehanizmima (Swanson, 2003). Djeluju kao odbrambeni agensi biljaka, štite drveće od gljivica, patogena, insekata i biljojeda (Das i sar., 2020). Takođe, tanini imaju benefite i po ljudsko zdravlje (Sharma i sar., 2019). Kategorisani su u dvije glavne grupe, kondenzovani tanini i hidrolizujuć tanini. Tanini koji se mogu hidrolizovati sadrže glukozu ili druge polihidroksilne alkohole esterifikovane galnom kiselinom ili heksahidroksidifenskom kiselinom, pa se u zavisnosti od esterifikacije dijele na galotanine i elagitanine. Kondenzovani tanini imaju širok opseg molekularnih težina od 500 do preko 20 000 i imaju sposobnost da reaguju sa aldehidima kako bi generisali polimerne materijale. (Das i sar., 2020).

Procentualni sadržaj tanina u ekstraktima postdestilacionog otpada timijana koji je dobijen u ovom istraživanju prikazan je na slici 33.



Slika 33. Sadržaj tanina u ekstraktima postdestilacionog otpada timijana

U ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom detektovan je najveći sadržaj tanina koji je iznosio 1,50% (70% etanol), dok je za 96% etanol dobijen rezultat od 2,94%. Potom, najveće vrijednosti u pogledu sadržaja tanina pokazali su ekstrakti M₂ (1,41%) i S₂ (0,77%), dok su

najmanje vrijednosti pokazali ekstrakti M₁ (0,66%) i S₁ (0,31%). Dobijeni rezultati ukazuju da veće vrijednosti tanina daju ekstrakti dobijeni 96% etanolom, u odnosu na ekstrakte dobijene 70% etanolom, nezavisno od primijenjene metode ekstrakcije.

Detaljnim pregledom literaturnih podataka nisu pronađeni radovi u kojima je vršeno ispitivanje sadržaja tanina u postdestilacionoj biomasi timijana.

Sadržaj tanina je ispitan u svježem listu timijana metodom ultrazvučne ekstrakcije uz primjenu 70 % etanola kao rastvarača (Kindl i sar., 2015) i dobijena vrijednost je iznosila 0.98 %, što predstavlja manju vrijednost u odnosu na rezultate našeg ispitivanja istom metodom ekstrakcije. Takođe, vršeno je ispitivanje za srodnu vrstu *Thymus leptobotrys* (Oubihi i sar., 2020) pri čemu je sadržaj tanina iznosio 2,06 mg/g CE.

Količina tanina sadržana u biljci zavisi od geografskog položaja, biološkog porijekla, vrste populacije i starosti. Odnos čvrste materije i rastvarača predstavlja važan faktor koji upravlja procesom ekstrakcije, kao i njihovo kontinuirano miješanje koje je lakše ukoliko je veći odnos rastvarača i čvrste materije. Na proces ekstrakcije utiče i veličina čestica, koja treba da je što manja, kako bi rastvarač mogao lakše da prodre u česticu i na taj način se skraćuje vrijeme ekstrakcije. Takođe, bitan faktor predstavlja i dužina trajanja ekstrakcije, tj. duže trajanje ekstrakcije daje veću količinu tanina (Das i sar., 2020).

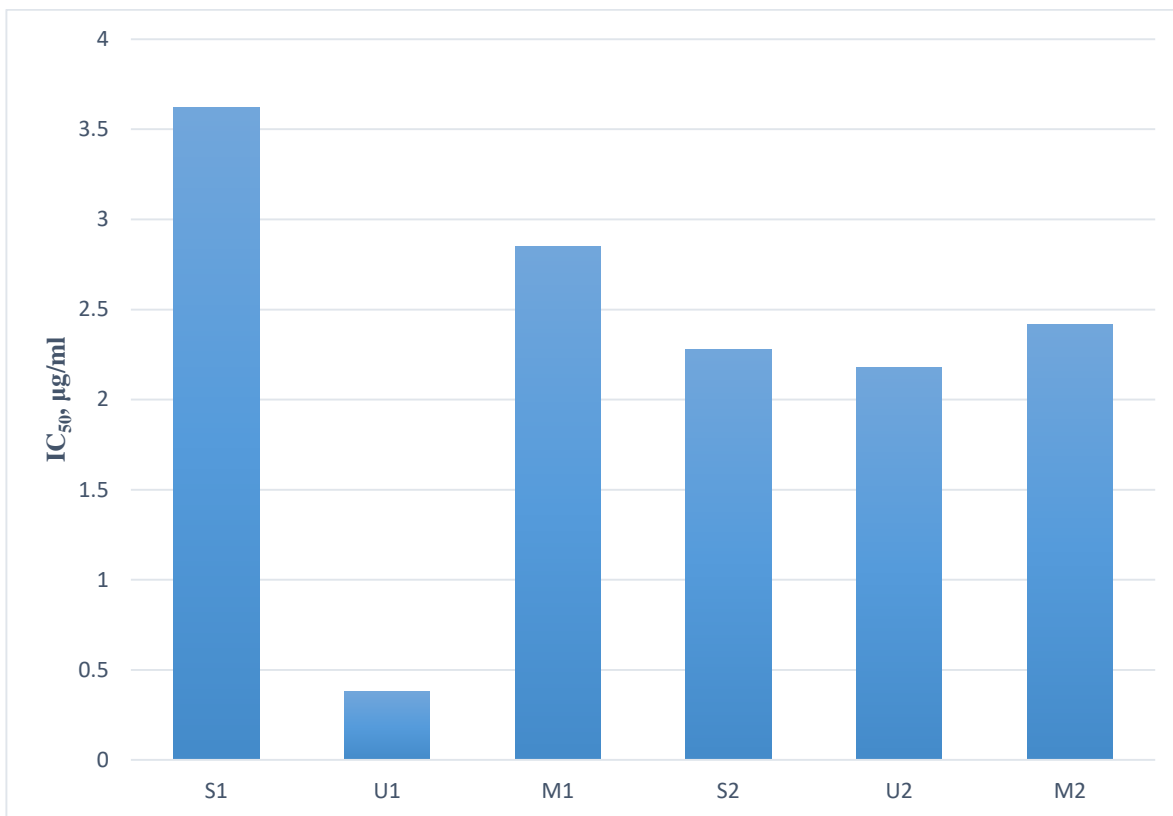
4.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST POSTDESTILACIONE BIOMASE TIMIJANA

Oksidativni stres je uzrokovan neravnotežom između reaktivnih vrsta kiseonika i antioksidativnih odbrambenih sistema i smatra se glavnim razlogom za pojavu mnogih oboljenja. Antioksidanti u cilju liječenja ćelijskih degeneracija počinju da se razmatraju jer inhibiraju ili odlažu oksidativni proces blokiranjem oksidativne lančane reakcije. Naše tijelo izloženo stresu ima više reaktivnih vrsta kiseonika od antioksidativnih vrsta, pri čemu dolazi do neravnoteže u ljudskom organizmu, a degradacija ćelije na kraju dovodi do djelimičnog ili potpunog funkcionalnog gubitka fizioloških sistema u tijelu (Shah i Modi, 2015).

Ekstrakti timijana testirani su različitim antioksidativnim testovima, što je od izuzetne važnosti jer antioksidanti mogu dati različite odgovore kada se tretiraju različitim testovima. Zbog toga se preporučuje kombinacija testova koji se zasnivaju na različitim mehanizmima djelovanja (Schlesier i sar., 2002). U ovom istraživanju, antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka timijana mjerena je DPPH i FRAP metodom. DPPH radikal je ljubičasto obojen, a kada dođe u kontakt sa antioksidantom prelazi u žuto obojen rastvor. Rezultati DPPH testa predstavljeni su onom količinom antioksidanta koja smanjuje koncentraciju radikala za 50% (efikasna koncentracija-IC₅₀). Što je manja IC₅₀ vrijednost, to je uzorak većeg antioksidativnog potencijala. Rezultati FRAP testa su izraženi kao milimolovi jona Fe²⁺ po gramu ispitivanog uzorka (mmol Fe²⁺/g) (Guediri i sar., 2021). Ova metoda mjeri kapacitet antioksidativne komponente da redukuje

prisutnu antioksidativnu komponentu, pri čemu dolazi do transfera elektrona, kao i do promjene boje, pri čemu je stepen promjene boje je proporcionalan koncentraciji antioksidanta (Milutinović i sar., 2013).

Na slici 34 prikazana je antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata timijana dobijena primjenom DPPH testa.



Slika 34. Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka timijana dobijena primjenom DPPH metode

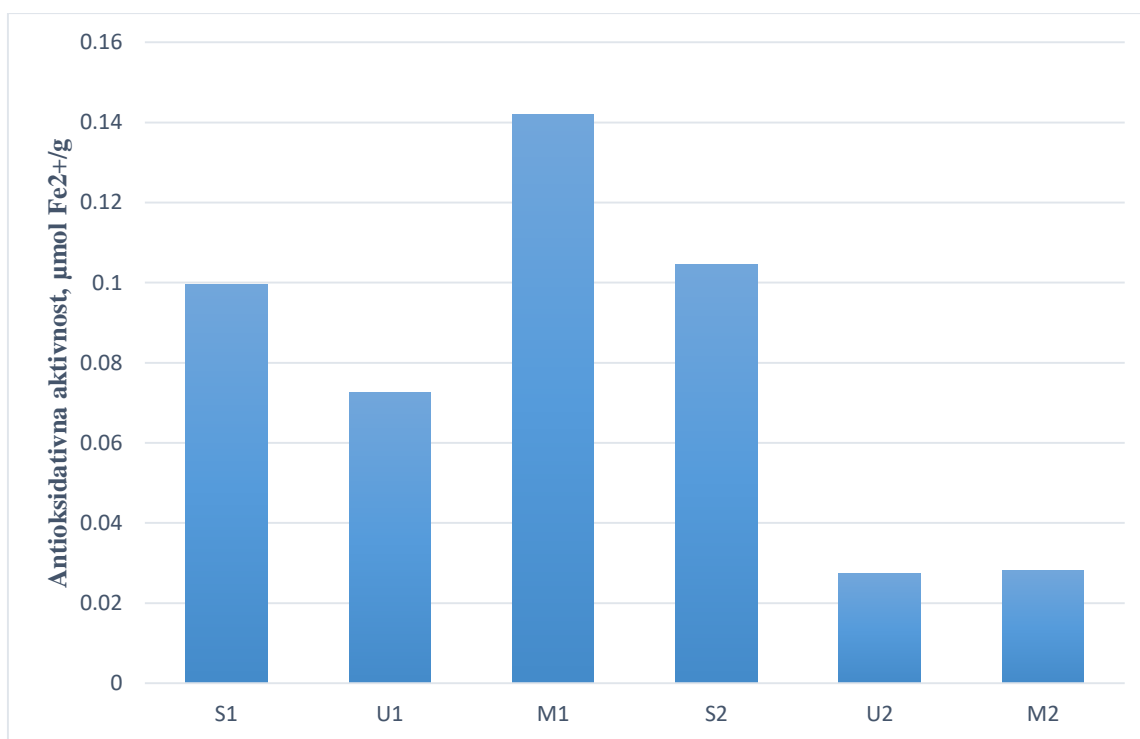
Dobijena IC₅₀ vrijednost u ekstraktima postdestilacione biomase timijana iznosila je redom (od najmanje ka najvećoj): U₁<U₂<S₂<M₂<M₁<S₁. Ekstrakti dobijeni metodom ultrazvučne ekstrakcije U₁ (0,38 µg/ml) i U₂ (2,18 µg/ml) pokazali su najbolji antioksidativni potencijal, jer manja IC₅₀ vrijednost pokazuje veći antioksidativni potencijal. Potom, ekstrakti S₂ (2,28 µg/ml) i M₂ (2,42 µg/ml), dok su najmanji antioksidativni potencijal pokazali ekstrakti M₁ (2,85 µg/ml) i S₁ (3,62 µg/ml). Gavarić i saradnici (2015) dobili su slične rezultate i ispitivani ekstrakti osušenog lista timijana su pokazali vrijednosti IC₅₀ u rasponu 1,74-2,63 µg/ml za biljnu drogu koja je izmljevena prije procesa ekstrakcije i 2,11-2,40 µg/ml za biljnu drogu u kojoj operacija mljevenja nije vršena. Manje vrijednosti antioksidativnog potencijala osušenog lista timijana detektovalo je

istraživanje koje je vršio El-Guendouz sa saradnicima (2019) pri čemu je dobijena vrijednost IC_{50} iznosila 0,093 $\mu\text{g/ml}$.

Antioksidativni potencijal DPPH metodom mjereno je i kod ekstrakata lista timijana koji nisu prethodno destilovani i neka istraživanja su pokazala veće IC_{50} vrijednosti u odnosu na prethodno pomenute vrijednosti. Naime, dobijena vrijednost u jednom istraživanju za ekstrakt *Thymus vulgaris* iznosila je 12,27 $\mu\text{g/ml}$ (Vladimir-Knežević i sar., 2014), dok je drugo istraživanje (Kindl i sar., 2015) dalo vrijednosti IC_{50} 14,41 $\mu\text{g/ml}$.

Podaci ukazuju na to da je ultrazvučna ekstrakcija bolja od klasičnih metoda ekstrakcije jer se dobijaju ekstrakti sa većim sadržajem flavonoida, fenola i tanina, shodno tome i bolje antioksidativne aktivnosti, za znatno kraće vrijeme u odnosu na maceraciju i Soxhlet ekstrakciju, što je veoma bitno i sa ekonomske strane.

Za određivanje antioksidativnog potencijala postdestilacione biomase timijana, u ovom radu korišćen je i FRAP test, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 35.



Slika 35. Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka timijana primjenom FRAP metode

Analizom antioksidativne sposobnosti osušenog lista timijana FRAP metodom dobijena vrijednost u ekstraktima postdestilacione biomase timijana iznosila je redom (od najmanje ka najvećoj): $U_2 < M_2 < U_1 < S_1 < S_2 < M_1$. Ekstrakti M_1 (0,142 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) i S_2 (0,1044 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) su dali najbolje rezultate u pogledu antioksidativnih svojstava. Potom, ekstrakti S_1 (0,0996 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) i U_1

(0,0726 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), dok su najmanji antioksidativni potencijal detektovani u ekstraktima M₂ (0,0281 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) i U₂ (0,0274 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$). Utvrđeno je da najveću antioksidativnu aktivnost pokazuju uzorci dobijeni maceracijom i Soxhlet ekstrakcijom, što se razlikuje od rezultata dobijenih DPPH metodom.

Detaljnim pregledom literaturnih podataka nisu pronađeni radovi u kojima je vršeno ispitivanje antioksidativne aktivnosti u postdestilacionoj biomasi timijana FRAP metodom.

Za srodnu biljnu vrstu *Thymbra capitata* vršeno je istraživanje antioksidativne aktivnosti postdestilacionog ekstrakta lista timijana FRAP metodom sa dva područja (Hcini i sar., 2022), pri čemu su dobijene vrijednosti 0,0422 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ i 0,0521 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Primijenjena je Soxhlet metoda ekstrakcije, a kao rastvarač se koristio metanol. Dobijene vrijednosti su manje u odnosu na vrijednosti našeg ispitivanja. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti svježeg lista timijana vršeno je FRAP metodom u istraživanju koje je obavio Gedikoglu sa saradnicima (2019). U istraživanju je koristio 80 % etanol kao rastvarač, a od metoda mikrotalasnu ekstrakciju, pri čemu su dobijene vrijednosti 3,18 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Dobijene vrijednosti ukazuju na činjenicu da veću antioksidativnu aktivnost pokazuju ekstrakti dobijeni iz svježeg lista timijana u odnosu na postdestilacioni ekstrakt timijana.

Poređenjem rezultata dobijenih primjenom DPPH i FRAP metode u ovom istraživanju uočene su izvjesne razlike. Naime, najveći antioksidativni kapacitet primjenom DPPH metode imao je ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom, dok su primjenom FRAP metode bolje rezultate pokazali ekstrakti dobijeni maceracijom i Soxhlet ekstrakcijom. Iz ovoga se može zaključiti da samo jedan test procjene antioksidativne aktivnosti nije dovoljan za dobijanje validnih rezultata.

4.6. KORELACIJA SADRŽAJA FLAVONOIDA, FENOLNIH JEDINJENJA, TANINA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM UZORCIMA TIMIJANA

Kako bi se procijenio uticaj flavonoida, ukupnih fenola i tanina na antioksidativnu aktivnost ispitivanih uzoraka timijana korišćen je Spirmanov koeficijent korelacije. U radu je analiziran stepen korelacije prethodno pomenutih polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima timijana i dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 1 i tabeli 2. Primjenom korelacione analize, neke studije su potvrdile da koncentracija polifenolnih ekstrakata ima značajnu ulogu na antioksidativnu aktivnost biljke (Hcini i sar., 2022). Takođe, pri procjeni antioksidativne aktivnosti važno je uzeti u obzir i prisustvo ostalih sekundarnih metabolita biljke jer njihova antioksidativna aktivnost nije rezultat aktivnosti samo jedne komponente, već je posljedica i njihovih međusobnih antagonističkih i sinergističkih djelovanja (Lianda, R.L.P., 2012).

Tabela 1. Stepen korelacije flavonoida, ukupnih fenola i tanina i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima timijana

	DPPH	FRAP
Flavonoidi	-0,771	-0,714
Ukupni fenoli	-0,771	-0,714
Tanini	-0,886	-0,771

Tabela 2. p vrijednosti za Spirmanov koeficijent korelacije

	DPPH	FRAP
Flavonoidi	0,1028	0,1361
Ukupni fenoli	0,1028	0,1361
Tanini	0,0333	0,1028

Vrijednosti Spirmanovog koeficijenta korelacije se kreću između -1 i +1, gdje vrijednost bliska -1 ukazuje na jaku negativnu rang-korelaciju, vrijednost bliska +1 ukazuje na jaku pozitivnu rang-korelaciju, a vrijednost bliska 0 ukazuje na nedostatak rang-korelacije (Schober i sar.,2018).

Vrijednost p predstavlja vjerovatnoću za koju se data korelacija dešava slučajno. Ako je p vrijednost manja od određenog praga značajnosti (najčešće 0,05), to znači da postoji dovoljno jak dokaz da postoji značajna korelacija između varijabli. U tom slučaju, može se odbaciti nulta hipoteza da nema korelacije. S druge strane, ako je p vrijednost veća od praga značajnosti, nulta hipoteza se ne može odbaciti i zaključuje se da nema dovoljno jakih dokaza da postoji značajna korelacija između varijabli. U našem slučaju samo je kod DPPH i tanina $p < 0.05$, pa u tom slučaju imamo jaku negativnu korelaciju (-0.886).

5. ZAKLJUČAK

Po prvi put ovaj rad daje sveobuhvatne podatke o antioksidativnim aktivnostima postdestilacione biomase biljne vrste *Thymus vulgaris* u Crnoj Gori. Izvedene su različite metode ekstrakcije biljnog otpada sa različitim koncentracijama rastvarača. Iz rezultata dobijenih ispitivanjem sadržaja ukupnih flavonoida, fenola i tanina, antioksidativne aktivnosti DPPH i FRAP metodama, uzoraka dobijenim različitim ekstrakcionim tehnikama primijenjenim na posdestilacionoj biomasi timijana, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Najveća količina ukupnih flavonoida detektovana je u uzorcima dobijenim postupkom ultrazvučne ekstrakcije- 57,6 mg QE/ g U₂ i 52,7 mg QE/ 100 g U₁. U ekstraktu dobijenom primjenom maceracije bilo je 10,02 mg QE/ 100 g za uzorak M₂ i 2,49 mg QE/ 100 g za uzorak M₁, a najmanja količina nađena je u ekstraktima dobijenim Soxhlet ekstrakcijom 1,40 mg QE/ 100 g za S₂ i 0,72 mg QE/ 100 g S₁.
- Najveća količina ukupnih fenola detektovana je takođe u uzorcima dobijenim postupkom ultrazvučne ekstrakcije- 50,26 mg GAE/ 100 g U₂ i 42,82 mg GAE/ 100 g U₁. U ekstraktu dobijenom primjenom maceracije bilo je 21,09 mg GAE/ 100 g za uzorak M₂ i 20,16 mg GAE/ 100 g za uzorak M₁. Najmanja količina ukupnih fenola ponovo je nađena je u ekstraktima dobijenim Soxhlet ekstrakcijom i iznosila je 18,3 mg GAE/ 100 g za S₂ i 9,9 mg GAE/ 100 g S₁.
- Najveća količina tanina detektovana je takođe u uzorku dobijenom postupkom ultrazvučne ekstrakcije i procenti sadržaj tanina je iznosio- 2,94% za U₂ i 1,50% za U₁. Potom, najveće vrijednosti u pogledu sadržaja tanina pokazali su ekstrakti M₂ (1,41%) i S₂ (0,77%), dok su najmanje vrijednosti pokazali ekstrakti M₁ (0,66%) i S₁ (0,31%).
- Na osnovu poređenja dobijenih rezultata tri ekstrakcione tehnike: Soxhlet ekstrakcije, ultrazvučne ekstrakcije i maceracije, može se zaključiti da ultrazvučna ekstrakcija dovodi do najvećeg prinosa bioaktivnih jedinjenja. Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka koristi energiju kavitacije u rastvaraču koja ubrzava rastvaranje i difuziju rastvorene supstance, kao i prenos toplote, što poboljšava efikasnost ekstrakcije. Zbog mehaničkog uticaja na ćelijske zidove, metoda ultrazvuka omogućava veće ekstrakcijske prinose u kraćem vremenskom roku, što utiče i na smanjenje utroška energije Manji prinos u pogledu sadržaja bioaktivnih jedinjenja daje maceracija i na kraju, kao najmanje pogodna metoda za izolovanja bioaktivnih komponenti iz postdestilacione biomase timijana- sa najnižim prinosom, pokazala se Soxhlet ekstrakcija.
- U svim slučajevima, nezavisno od primijenjene tehnike ekstrakcije, 96% etanol je favorizovao ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz postdestilacione biomase timijana u odnosu na 70% etanol. Pravilnim odabirom rastvarača može se uticati na povećanje prinosa željenih komponenti. Za ekstrakciju flavonoida, fenola i tanina bolje rezultate daje primjena organskih rastvarača, zbog sličnosti u polarnosti.

- Antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH i FRAP metodom se razlikuju. Naime, najveći antioksidativni potencijal primjenom DPPH metode imao je ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom, dok su primjenom FRAP metode bolje rezultate pokazali ekstrakti dobijeni maceracijom i Soxhlet ekstrakcijom. Iz tog razloga se preporučuje primjena različitih testova za određivanje antioksidativne sposobnosti ekstrakata, kako bi se dobili validni rezultati.
- Pronađena je jaka negativna korelacija između DPPH metode i tanina (-0,886).
- Rezultati pokazuju da posdestilacioni otpad timijana predstavlja izvor biološki aktivnih polifenolnih jedinjenja za kojima potražnja sve više raste. Takođe, ispitivani ekstrakti biootpada pokazuju antioksidativna svojstva i mogu se koristiti u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Postdestilacioni otpad timijana se pokazao kao efikasan potencijalni izvor polifenola, koji su prirodni antioksidanti i korisni po ljudsko zdravlje. Oni mogu da zamijene ili smanje korišćenje sintetičkih antioksidanata u hrani, kozmetici i farmaceutskim proizvodima.

6. LITERATURA

1. Abdelhamed F.M., Abdeltawab N.F., ElRakaiby M.T., Shamma R.N., Moneib N.A., Antibacterial and anti-inflammatory activities of *Thymus vulgaris* essential oil nanoemulsion on acne vulgaris. *Microorganisms*. 10, 1874, (2022).
2. Aćimović M., Mara D., Tešević V., Stanković J., Cvetković M., Urošević M., Filipović V., Analysis of total polyphenols postdistillation waste material of different coriander accessions grown in Serbia. VII International Scientific Agriculture Symposium, "Agrosym 2016". 13, 796-802, (2016).
3. Aebischer D., Cichonski J., Szpyrka E., Masjonis S., Chrzanowski G., Essential oils of seven *Lamiaceae* plants and their antioxidant capacity. *Molecules*. 26, 3793, (2021).
4. Aleksić V., Osetljivost multiplo rezistentnih sojeva *acinetobacter baumannii* na nekonvencionalne antimikrobne agense. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, (2016).
5. Alimpić A., Šavikin K., Pljevljakušić D., Matevski V., Marin P.D., Petrović I., Duletić-Laušević S., Polyphenolic content and biological activities of post-distillation waste of three sage species from the Republic of Macedonia. *Agro-knowledge Journal*. 18(1), 27-36, (2017).
6. Amamra S., Cartea M.E., Belhaddad O.E., Soengas P., Baghiani A., Kaabi I., Arrar L., Determination of total phenolics contents, antioxidant capacity of *Thymus vulgaris* extracts using electrochemical and spectrophotometric methods. *International Journal of Electrochemical Science*. 13, 7882 – 7893 (2018).
7. Amouei H., Ferronato G., Qotbi A.A.A., Bouyeh M., Dunne P.G., Prandini A., Seidavi A., Effect of essential oil of *Thyme* (*Thymus vulgaris* L.) or increasing levels of a commercial prebiotic (TechnoMOS®) on growth performance and carcass characteristics of male broilers. *Animals*. 11, 3330, (2021).
8. Andola H.C., Purohit V.K., Chauhan R.S., Arunachalam K., Standardize quality standards for aromatic hydrosols. *Medicinal Plants*. 6(3), 161-162, (2014).
9. Angelov I., Villanueva Bermejo D., Stateva R.P., Reglero G., Ibañez E., Fornari T., Extraction of thymol from different varieties of *thyme* plants using green solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95(14), 2901-2907, (2015).
10. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K., Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127, 183–198, (2002).
11. Arshadi M., Attard T.M., Lukasik R.M., Brncic M., Costa Lopes A.M., Finella M., Geladia P., Gerschenson L.N., Gogus F., Herrero M., Hunt A.J., Ibañez E., Kamm B., Mateos-Aparicio I., Matias A., Mavroudis N.E., Montoneri E., Morais A.R., Nilsson C.C., Papaioannou E.H., Richel A., Rupérez P., Škrbić B., Bodroža Solarov M., Švarc-Gajić J., Waldron K., Yuste F., Pre-treatment and extraction techniques for recovery of added value

- compounds from wastes throughout the agri-food chain. *Green Chemistry*. 18, 6160-6204 (2016).
12. Askary M., Behdani M.A., Parsa S., Mahmoodi S., Jamialahmadi M., Water stress and manure application affect the quantity and quality of essential oil of *Thymus daenensis* and *Thymus vulgaris*. *Industrial Crops and Products*. 111, 336–344, (2018).
 13. Azeez S., Narayana C.K., Oberoi H.S., Extraction and utilisation of bioactive compounds from agricultural waste. *Division of Post Harvest Technology & Agricultural Engineering*. 5, 127-158, (2017).
 14. Baatour O., Aouadi M., Dhieb C., Abbassi M.S., Sadfi N., Ben Nasri-Ayachi M., Screening for antifungal activity polyphenols content of *Origanum majorana* L. essential oil treated and non treated with salt. *International Journal of Advanced Researc*. 3(5), 570-574, (2015).
 15. Babović N.V., Antioksidativne osobine frakcija dobijenih iz odabranih biljaka familije *Lamiaceae* postupkom natkritične ekstrakcije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, (2010).
 16. Bader Ul Ain H., Saeed F., Barrow C.J., Dunshea F.R., Rasul Suleria H.A., Food Processing Waste: A Potential Source for Bioactive Compounds. *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts, Reference Series in Phytochemistry*. 36, 625-649, (2020).
 17. Banerjee P., Mukherjee S., Bera K., Ghosh K., Ali I., Khawas S., Ray B., Ray S., Polysaccharides from *Thymus vulgaris* leaf: Structural features, antioxidant activity and interaction with bovine serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 125, 580-587, (2019).
 18. Baydar G., N., Özkanb G., Yaşar S., Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*. 18(9), 1131–1136, (2007).
 19. Benzie F.F.I., Devaki M., The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications, First Edition*. 77-106, (2018).
 20. Blažeković, B., Stanić G., Vladimir-Knežević S., Morfološko-anatomska i fitokemijska obilježja biljnih vrsta *Thymus vulgaris* L. i *Thymus pulegioides* L. *Farmaceutski Glasnik*. 62(3), 121-130, (2006).
 21. Blois M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181(4617), 1199-1200, (1958).
 22. Bogdanović A.M., Dobijanje, karakterizacija i optimizacija hipolipemijskih ekstrakata matičnjaka (*Melissa Officinalis*) i grčkog semena (*Trigonella Foenum-Graecum*) natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, (2016).
 23. Borugă O., Jianu C., Mișcă C., Golet I., Gruia A.T., Horhat F.G., *Thymus vulgaris* essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*. 7(3), 56-60, (2014).

24. Bouloumpasi E., Hatzikamari M., Lazaridou A., Chatzopoulou P., Biliaderis C.G., Irakli M., Antibacterial and antioxidant properties of oregano and rosemary essential oil distillation by-products. *Biology and Life Sciences Forum*. 6(47), 1-6, (2021).
25. Buha, M., Aromatične i lekovite biljke u lečenju, u kuhinji, u kozmetici..-uzgoj, sakupljanje, čuvanje i upotreba. Film Publik Art. Niš, (2006).
26. Capozzi F., Food innovation in the frame of circular economy by designing ultra-processed foods optimized for sustainable nutrition. Mini-review. *Frontiers in Nutrition*. 9, 1-7, (2022).
27. Casau M., Dias M.F., Matias J.C.O., Nunes L.J.R., Residual biomass: A comprehensive review on the importance, uses and potential in a circular bioeconomy approach. *Resources*. 11(4), 35, (2022).
28. Celano R., Piccinelli A.L., Pagano I., Roscigno G., Campone L., Falco E.D., Russo M., Rastrelli L., Oil distillation wastewaters from aromatic herbs as new natural source of antioxidant compounds. *Food Research International*. 99(1), 298-307, (2017).
29. Chaves N., Santiago A., Alias J.C., Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: Analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. *Antioxidants*. 9(1):76, (2020).
30. Chizzola R., Michitsch H., Franz C., Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 6897–6904, (2008).
31. Christ B., Müller K.H., Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol Derivaten in Drogen. *Archiv de Pharmazie*. 293, 1033-1042, (1960).
32. Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.I, Huang Y.W., Lin Y., Tannins and Human Health: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6), 421-464, (1998).
33. Coughlin S.S., Oxidative stress, antioxidants, physical activity, and the prevention of breast cancer initiation and progression. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* . 4(2), 55–57, (2018).
34. Council of Europe, *European Pharmacopeia*, 9th ed. Council of Europe, Strasbourg, France (2016).
35. Čančarević A., Bugarski B., Šavikin K., Zdunić G., Biološka aktivnost vrsta *Thymus vulgaris* i *Thymus serpyllum* i njihovo korišćenje u etnomedicini. *Ljekovite sirovine*. 33, 3-17, (2013).
36. D'Amato S., Serio A., López C.C., Paparella A., Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*. 86, 126-137, (2017).
37. Damjanović B., Komparativna ispitivanja uslova ekstrakcije biološki aktivnih materija ploda kleke (*Juniperus communis* L) u standardnim, natkritičnim i subkritičnim uslovima. Magistarska teza. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, (2000).

38. Damjanović-Vratnica B., Đakov T., Šuković D., Damjanović J., Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill from Montenegro. *Czech Journal of Food Sciences*. 29(3), 277–284, (2011).
39. Das A.K., Islam N., Faruk O., Ashaduzzaman, Dungani R., Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*. 135, 58-70, (2020).
40. Dauqan E.M.A., Abdullah A., Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 5(02), 017-022, (2017).
41. Dina E., Vontzalidou A., Cheilari A., Bagatzounis P., Agapidou E., Giannenas I., Grigoriadou K., Aligiannis N., Sustainable use of Greek herbs by-products, as an alternative source of biologically active ingredients for innovative products. *Frontiers in Nutrition*. 9(867666), (2022).
42. Dragović S., Optimiranje procesa ekstrakcije i destilacije bioaktivnih spojeva iz lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.). Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, (2020).
43. Drinić Z., Ekstrakcija industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet - Farmaceutsko inženjerstvo, (2020).
44. Drmić H., Režek A., Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology*. 2(2), 22-33, (2010).
45. Dudaš S., Skitarelić D., Prgomet Ž., Bratović I., Mujić I., Ispitivanje prinosa i kakvoće francuskog i talijanskog timijana (*Thymus vulgaris* L.) u Istri. *Osječki list*. 11-20, (2010).
46. Elgndi A.M., Farmakološko delovanje ekstrakata odabranih aromatičnih/lekovitih biljaka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, (2017).
47. El-Guendouz S., Aazza S., Dandlen S.A., Majdoub N., Lyoussi B., Raposo S., M.D., Antunes, Gomes V., Miguel M.G., Antioxidant activity of thyme waste extract in O/W emulsions. *Antioxidants*. 8, 243, (2019).
48. Fachini-Queiroz F.C., Kummer R., Estevao-Silva C.F., Barros Carvalho M.D., Cunha J.M., Grespan R., Bersani-Amado C.A., Nakamura Cuman R.K., Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. (2012).
49. Fani M., Kohanteb J., In vitro antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oil against major oral pathogens . *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 24(22), 660-666, (2017).
50. Fernandes R.P.P., Trindade M.A., Tonin F.G., Lima C.G., Pugine S.M.P., Munekata P.E.S., Lorenzo J.M., Melo M.P., Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: Cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology*. 53(1), 451-60, (2015).
51. Ferreira L.E., Benincasa B.I., Fachin A.L., França S.C., Contini S.S.H.T., Chagas A.C.S., Belebani R.O., *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol:

- Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Parasitology*. 228, 70-76, (2016).
52. Filipović I., Zdolec N., Dobranić V., Effect of spices on *Vibrio parahaemolyticus* survival and growth. *Veterinary Archives*. 86 (1), 125-134, (2016).
 53. Foti M.C., Use and abuse of the DPPH• radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63, 8765-8776, (2015).
 54. Galić L., Fenolni spojevi u biljkama. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet Agrobiotehničkih znanosti, Osijek, (2020).
 55. Galovičová L., Borotová P., Valková V., Vukovic N.L., Vukic M., Štefániková J., Dúranová H., Kowalczewski P.Ł., Čmiková N., Kačániová M., *Thymus vulgaris* essential oil and its biological activity. *Plants*. 10(9), (2021).
 56. Gavarić N., Kladar N., Mišan A., Nikolić A., Samojlik I., Mimica-Dukić N., Božin B., Postdistillation waste material of thyme (*Thymus vulgaris* L., *Lamiaceae*) as a potential source of biologically active compounds. *Industrial Crops and Products*. 74, 457–464, (2015).
 57. Gavarić N., Kovač J., Kretschmer N., Kladar N., Smole Možina S., Bucar F, Bauer R., Božin B., Natural products as antibacterial agents - antibacterial potential and safety of post-distillation and waste material from *Thymus vulgaris* L., *Lamiaceae*. *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*. InTech. 6, 123-151, (2015).
 58. Gavarić A., Savremene metode ekstrakcije očajnice (*Marrubium vulgare* L.) i sušenje odabranih ekstrakata, hemijski sastav i biološke aktivnosti. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, (2020).
 59. Gedikoglu A., Sokmen M., Civit A., Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Science and Nutrition*. 7(5), 1–11, (2019).
 60. Gotal A.M., Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada primjenom pulsirajućeg električnog polja. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, (2020).
 61. Grigore A., Bubueanu C., Pirvu L., Nita S., Bazdoaca C., Dobre N., Polyphenol content dynamics in hydrodistillation water residues of *Lamiaceae* species. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 22(3), 1-7, (2019).
 62. Guediri I., Boubekri C., Smara O., Lanez T., Total phenolic contents and determination of Antioxidant activity by DPPH, FRAP, and cyclic voltammetry of the fruit of *Solanum nigrum* (black nightshade) growing in the south of Algeria. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 14(1), 47-55, (2021).
 63. Gulcin I., Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. 94, 651-715, (2020).
 64. Gumus R., Ercan N., Imik H., The effect of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) added to quail diets on performance, some blood parameters, and the antioxidative metabolism of the serum and liver tissues. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 19(2), 297-304, (2017).

65. Gupta A., Naraniwal M., Kothari V., Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS)*. 1(1), 8-26, (2012).
66. Hamed A., Afifi M., Etemadfard H., Investigating chemical composition and indications of hydrosol soft drinks (aromatic waters) used in persian folk medicine for women's hormonal and reproductive health conditions. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 22(4), 824-839, (2017).
67. Hamed A., Moheimani S.M., Sakhteman A., Etemadfard H., Moein M., An overview on indications and chemical composition of aromatic waters (hydrosols) as functional beverages in persian nutrition culture and folk medicine for hyperlipidemia and cardiovascular conditions. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 1-18, (2017).
68. Haraguchi H., Saito T., Ishikawa H., Date H., Kataoka S., Tamura Y., Mizutani K., Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Med*. 62(3), 217-12, (1996).
69. Hcini K., Bahi A., Zarroug M.B., Farhat M.B., Lozano-Pérez A.A., Cenis J.L., Quílez M., Stambouli-Essassi S., Jordán M.J., Polyphenolic profile of Tunisian thyme (*Thymbra capitata* L.) post-distilled residues: Evaluation of total phenolic content and phenolic compounds and their contribution to antioxidant activity. *Molecules*. 27, 8791, (2022).
70. Hossain M.B., Brunton N.P., Martin-Diana A.B., Barry-Ryana C., Application of response surface methodology to optimize pressurized liquid extraction of antioxidant compounds from sage (*Salvia officinalis* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Food Function Journal*. 1(3), 269–277, (2010).
71. Hossain M.A., AL-Raqmi K.A.S., AL-Mijizy Z.H., Weli A.M., Al-Riyami Q., Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(9), 705-710, (2013).
72. Hossain M.A., Alrashdi Y.B.A., Al-Touby S.S.J., A review on essential oil analyses and biological activities of the traditionally used medicinal plant *Thymus vulgaris* L. *International Journal of Secondary Metabolite*. 9(1), 103–111, (2022).
73. Hosseinzadeh S., Jafarikukhdan A., Hosseini A., Armand R., The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*. 6, 635-642, (2015).
74. Hussein I.A.S., Mona S.M.M., Polyphenols: Properties, occurrence, content in food and potential effects. *Frontiers of Environmental Science & Engineering (FESE)*. 6, 232-261, (2017).
75. Hzounda Fokou J.B., Jazet Dongmo P.M., Boyom F.F., Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. *Essential oils - oils of nature*. IntechOpen. (2020).

76. Ingle K.P., Deshmukh A.G., Padole D.A., Dudhare M.S., Moharil M.P., Khelurkar V.C., Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(1), 32-36, (2017).
77. Jabraeili S., Mirzaei H., Anarjan N., Javadi A., Behnajady M.A., Nanoliposomal thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil: Effects of formulation parameters. *Food Science and Technology International*. 28(3) 257-272, (2021).
78. Janković S., Kinetika ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala. Master rad, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet - Departman za hemiju, Niš, (2017).
79. Jasicka-Misiak I., Shanaida M., Hudz N., Wieczorek P.P., Phytochemical and pharmacological evaluation of the residue by-product developed from the *Ocimum americanum* (*Lamiaceae*) postdistillation waste. *Foods*. 10(12), 3063, (2021).
80. Jing W., Xiaolan C., Yu C., Feng Q., Haifeng Y., Pharmacological effects and mechanisms of tannic acid. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 154(113561), (2022).
81. Jordan M.J., Martinez R.M., Martinez C., Monino I., Sotomayor J.A., Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. *Industrial crops and products*. 29, 145–153, (2009).
82. Jovanović A.A., Đorđević V.B., Zdunić G.M., Pljevljakušić D.S., Šavikin K.P., Godevac D.M., Bugarski B.M., Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*. 179, 369-380, (2017).
83. Kaczorova D., Karalija E., Dahija S., Bešta-Gajević R., Parić A., Čavar Željковиć S., Influence of extraction solvent on the phenolic profile and bioactivity of two *Achillea* species. *Molecules*. 26(6), (2021).
84. Kedare S.B., Singh R.P., Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 48(4),412–422, (2011).
85. Khan S., Paliwal V., Pandey V.V., Kumar V., Biomass as Renewable Energy. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*. 2(1), 301-304, (2015).
86. Khazim Al-Asmari A., Athar M.T., Al-Faraidy A.A., Almuhaiza M.S., Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(2), 147-150, (2017).
87. Kielbasa P., Drózd T., Popardowski E., Influence of coniferous wood conditioning by pulsed electric field on its combustion heat characteristics. *Applied Sciences*. 11(3), 983, (2021).
88. Kim Y.S., Lee S.J., Hwang J.W., Kim E.K., Kim S.E., Kim E.H., Moon S.H., Jeon B.T., Park P.J., In vitro protective effects of *Thymus quinquecostatus* Celak extracts on t-BHP-induced cell damage through antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 4191–4198, (2012).

89. Kindl M., Blažeković B., Bucar F., Vladimir-Knežević S., Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-10. (2015).
90. Klančnik A., Špela Z., Toplak N., Kovač M., Bucar F., Jeršek B., Smole Možina S., Antiadhesion activity of juniper (*Juniperus communis* L.) preparations against *Campylobacter jejuni* evaluated with PCR- based methods. Phytotherapy Research. 32(3):542-550, (2017).
91. Kojić D., Otpornost na niske temperature i dehidraciju kukuruznog plamenca (*Ostrinia Nubilalis* Hb)- ćelijski i molekularni odgovori. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet - Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad, (2009).
92. Koksall E., Bursal E., Gülçin I., Korkmaz M., Çağlayan C., Gören A.C., Alwasel S.H., Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. International Journal of Food Properties. 20(3), 514-525, (2017).
93. Konstantinović B., Popov M., Samardžić N., Aćimović M., Šućur Elez J., Stojanović T., Crnković M., Rajković M., The effect of *Thymus vulgaris* L. hydrolate solutions on the seed germination, seedling length, and oxidative stress of some cultivated and weed species. Plants. 11, 1782, (2022).
94. Kulišić T., Dragović-Uzelac V., Miloš M., Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. Food Technology Biotechnology. 44(4), 485–492, (2006).
95. Kvirgić M., Farmakološki efekti sirupa i tinkture timijana. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Novi Sad (2016).
96. Li X., He T., Wang X., Shen M., Yan X., Fan S., Wang L., Wang X., Xu X., Sui H., She G., Traditional uses, chemical constituents and biological activities of plants from the Genus *thymus*. Review. Chemistry and Biodiversity. 16(9), (2019).
97. Lianda R.L.P., Sant´ Ana L.D.O., Echevarria A., Castro R.N., Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts, Journal of the Brazilian Chemical Society, 23, 618–627, (2012).
98. Luca S.V., Zengin G., Sinan K.I., Skalicka-Wozniak K., Trifan A., Post-distillation by-products of aromatic plants from *Lamiaceae* family as rich sources of antioxidants and enzyme inhibitors. Antioxidants. 12, 210, (2023).
99. Luque de Castro M.D., Priego-Capote F., Soxhlet extraction: Past and present panacea. Journal of Chromatography A. 1217(16), 2383–2389, (2010).
100. Majekodunmi S.O., Review of extraction of medicinal plants for pharmaceutical research. Journal of Medicine and Medical Sciences. 3(11), 521-527, (2015).
101. Malenica M., Meseldžić N., Oxidative stress and obesity. Archive of Pharmacy. 72, 166 – 183, (2022).

102. Mandal S., DebMandal M., Thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety: Named Essential Oils. 94, 825-834, (2016).
103. Michiu D., Socaciu M.I., Fogarasi M., Jimborean A.M., Ranga F., Muresan V., Semeniuc C.A., Implementation of an analytical method for spectrophotometric evaluation of total phenolic content in essential oils. *Molecules*. 27(4), 1345, (2022).
104. Micucci M., Protti M., Aldini R., Frosini M., Corazza I., Marzetti C., Beatrice Mattioli L., Tocci G., Chiarini A., Mercolini L., Budriesi R., *Thymus vulgaris* L. essential oil solid formulation: Chemical profile and spasmolytic and antimicrobial effects. *Biomolecules*. 10(6), 860, (2020).
105. Milad A., Suliman B.A.A., Yusoff N.I.M., A review of the utilisation of recycled waste material as an alternative modifier in asphalt mixtures. *Civil Engineering Journal*. 6, 42-60, (2020).
106. Milanović S.L., Impregnacija timola na čvrste nosače natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd (2015).
107. Milutinović M.D., Šiler-Marinković S.S., Antonović D.G., Mihajlovski K.R., Pavlović M.D., Dimitrijević-Branković S.I., Antioksidativna svojstva sušenih ekstrakata iz otpadne espresso kafe. *Chemical Industry*. 67(2), 261–267, (2013).
108. Mitić V.Z., Uperedna spektroskopska analiza jona prelaznih metala. Master rad, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš, (2018).
109. Mohammad Azmin S.N.H., Nor M.S.M., Image processing of ginger extract via microwave assisted hydrodistillation-Ginger and its health benefits. *Nova Science Publishers, Inc*. 37-54 (2022).
110. Moisa C., Copolovici L., Bungău S., Pop G., Imbrea I., Lupitu A., Nemeth S., Copolovici D., Wastes resulting from aromatic plants distillation - Bio-sources of antioxidants and phenolic compounds with biological active principles. *Farmacia*. 66(2), 289-295 (2018).
111. Munteanu I.G., Apetrei C., Analytical methods used in determining antioxidant activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(7), 3380, (2021).
112. Musto G., Laurenzi V., Annunziata G., Novellino E., Stornaiuolo M., Genotoxic assessment of nutraceuticals obtained from agricultural biowaste: Where do we “AMES”? *Antioxidants*. 11(6), 1197, (2022).
113. Nadia Z., Rachid M., Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. *Medicinal and Aromatic Plant Research Journal*. 1(1), 5-11, (2013).
114. Netopilova M., Houdkova M., Urbanova K., Rondevaldova J., Kokoska L., Validation of qualitative broth volatilization checkerboard method for testing of essential oils: Dual-column GC–FID/MS Analysis and in vitro combinatory antimicrobial effect of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* against *Staphylococcus aureus* in liquid and vapor phases. *Plants*. 10(2), 393, (2021).

115. Niciforović N., Abramović H., Sinapic acid and its derivatives: Natural sources and bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13(1), 34-51, (2014).
116. Nikolić B., Vasiljević B., Ćirić A., Mitić-Ćulafić D., Cvetković S., Džamić A., Knežević-Vukčević J., Bioactivity of *Juniperus communis* essential oil and post-distillation waste: Assessment of selective toxicity against food contaminants. *Archives of Biological Sciences*. 71(2), 235-244, (2019).
117. Oalđe M.M., Kolarević S.M., Zivković J.C., Vuković-Gačić B.S., Jovanović Marić J.M., Kračun Kolarević M.J., Đorđević J.Z., Alimpić Aradski A.Z., Marin P.D., Šavikin K.P., Duletić-Laušević S.N., The impact of different extracts of six *Lamiaceae* species on deleterious effects of oxidative stress assessed in acellular, prokaryotic and eukaryotic models *in vitro*. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 1592-1604, (2020).
118. Omre P.K., Singh S., Shikha, Waste utilization of fruits and vegetables-A review. *South Asian Journal of Food Technology and Environment.*, 4(1), 605-615, (2018).
119. Ostolski M., Adamczak M., Brzozowski B., Stolarski M.J., Screening of functional compounds in supercritical carbon dioxide extracts from perennial herbaceous crops. *Agriculture*. 11(6), 488, (2021).
120. Oubihi A., Hosni H., Nounah I., Ettouil A., Harhar H., Alaoui K., Ouhssine M., Guessous Z., Phenolic content, antioxidant activity, anti-inflammatory potential, and acute toxicity study of *Thymus leptobotrys* Murb. extracts. *Biochemistry Research International*. 1-7, (2020). 5(47), 1-16, (2016).
121. Panche A. N., Diwan A.D., Chandra S.R., Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 5(47), 1-15. (2016).
122. Pandey A., Tripathy S., Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2 (5), 115-119, (2014).
123. Parađiković N., Ljekovito i začinsko bilje-Nastavni materijal. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, Osijek, (2014).
124. Parađiković L., Utjecaj monokromatske svjetlosti na sadržaj funkcionlanih komponenti timijana (*Thymus vulgaris* L.). Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, Osijek, (2015).
125. Patil S.M., Ramu R., Shirahatti P.S., Shivamallu C., Amachawadi R.G., A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. *Heliyon*. 7(5), (2021).
126. Pavela R., Žabka M., Vrhotová N., Trískab J., Effect of foliar nutrition on the essential oil yield of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Industrial Crops and Products*. 112, 762-765, (2018).
127. Pavlić B., Bera O., Teslić N., Vidović S., Parpinello G., Zeković Z., Chemical profile and antioxidant activity of sage herbal dust extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Industrial Crops and Products*. 120, 305-312, (2018).

128. Pensel P.E., Maggiore M.A., Gende L.B., Eguaras M.J., Denegri M.G., Elissondo M.C., Efficacy of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on *Echinococcus granulosus*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 1-12. (2014).
129. Perez N.M., Distillation and extraction of herbs from Lamiaceae family. Faculty of Chemical Technology and Biotechnology-Budapest University of Technology and Economics. (2021).
130. Perić M., Komatina M., Bugarski B., Antonijević D., Best practices of biomass energy life cycle assessment and possible applications in Serbia. *Croatian Journal of Forest Engineering (CROJFE)*. 37(2), 375-390, (2016).
131. Petrović S., Ušjak Lj., Milenković M., Arsenijević J., Drobac M., Drndarević A., Niketić M., *Thymus dacicus* as a new source of antioxidant and antimicrobial metabolites. *Journal of Functional Foods*. 28, 114-121, (2017).
132. Politi M., Ferrante C., Menghini L., Angelini P., Flores G.A., Muscatello B. Braca A., De Leo M., Hydrosols from *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, and *Cupressus sempervirens*: Phytochemical analysis and bioactivity evaluation. *Plants*. 11, 349, (2022).
133. Predescu C., Papuc C., Stefan G., Petcu C., Phenolics content, antioxidant and antimicrobial activities of some extracts obtained from Romanian summer savory and lebanon wild thyme. *Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine*. 2, (2020).
134. Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas G.J.E., Komaitis M., RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1190–1195, (2005).
135. Pruteanu A., David L., Matache M., Ferdes M., Gageanu G., Muscalu A., Research on the processing of thyme (*Thymus vulgaris*) plants in order to obtain quality products, Proceedings of the Fifth International Conference “Research people and actual tasks on multidisciplinary sciences”, Lozenec, Bulgaria 24– 28, (2015).
136. Radovanović V., Dragutinović S., Priručnik za početnike o ljekobilju, doo Bohus, Pljevlja, Crna Gora, (2020).
137. Rahmah N.L., Diyah Dewanti B.S., Azizah F., Combination of kinetic maceration - digestion in the extraction of areca seeds (*Areca catechu* L.). *Advances in Food Science, Sustainable Agriculture and Agroindustrial Engineering*. 1(2), 27-33, (2018).
138. Reyes-Jurado F., Franco-Vega A., Ramirez-Corona N., Palou E., Lopez-Malo A., Essential oils: Antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Engineering Review*. 7(3), 275-297, (2014).
139. Rezzoug M., Bakchiche B., Gherib A., Roberta A, Guido F., Kilinçarslan O., Mammadov R., Bardaweel S.K., Chemical composition and bioactivity of essential oils and ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas. *Complementary and Alternative Medicine*. 19, 146, (2019).

140. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7), 933-956, (1996).
141. Roby M.H.H., Sarhana M.A., Selima K.A.H., Khalel K.I., Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*. 43, 827–831, (2013).
142. Working Group for Sustainable Biomass Utilisation Vision in East Asia (2008), ‘Economic Aspects of Biomass Utilisation’, in Sagisaka, M. (ed.), *Sustainable Biomass Utilisation Vision in East Asia*, ERIA Research Project Report 2007-6-3, Chiba: IDE-JETRO, pp.38-69.
143. Saha A., Basak B.B., Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*. 145(111979), (2019).
144. Salehi B., Mishra A.P., Shukla I., Sharifi-Rad M., Contreras M.D.M., Segura-Carretero A., Fathi H., Nasrabadi N.N., Kobarfard F., Sharifi-Rad J., Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. Review. *Phytotherapy Research*. 32(9), 1688-1706, (2018).
145. Salehi B., Abu-Darwish M.S., Tarawneh A.H., Cabral C., Gadetskaya A.V., Salgueiro L., Hosseinabadi T., Rajabi S., Chanda W., Sharifi-Rad M., Mulaudzi R.B., Ayatollahi S.A., Kobarfard F., Arserim-Uçar D.K., Sharifi-Rad J., Ata A., Baghalpour N., Contreras M.D.M., *Thymus spp.* plants - Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science and Technology*. 85, 287-306, (2019).
146. Satyal P., Murray B.L., McFeeters R.L., Setzer W.N., Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*. 5(70), (2016).
147. Savić Lj., Metode ekstrakcije biljnih materijala: Usporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. 34, 93-103, (2014).
148. Schleiser K., Harwat M., Bohm V., Bitsch R., Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*. 36 (2), 177–187, (2002).
149. Schober P., Boer C., Schwarte L.A., Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. Review. *Anesthesia & Analgesia*. 126(5), 1763-1768. (2018).
150. Sehwal S., Das M., Antioxidant Activity: An Overview. *Research & Reviews: Journal of Food Science & Technology*. 1-10, (2013).
151. Shabnum S., Wagay M.G., Essential Oil Composition of *Thymus Vulgaris* L. and their Uses. *Journal of Research and Development*. 11(1), (2011).
152. Shadidi F., Zhong Y., Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 18, 757-781, (2015).
153. Shafie M.H., Kamal M.L., Razak N.A.A., Hasan S., Uyup N.H., Abdul Rashid N.F., Zafarina Z., Antioxidant and antimicrobial activity of plant hydrosol and its potential application in cosmeceutical products. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 17(4), (2022).

154. Shah P., Modi H.A., Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*. 3(6), 636-641, (2015).
155. Sharifi-Rad M., Varoni E.M., Iriti M., Martorell M., Setzer W.N., Contreras M.D.M., Salehi B., Soltani-Nejad A., Rajabi S., Tajbakhsh M., Sharifi-Rad J., Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*. 32(9), 1675-1687, (2018).
156. Sharma K., Kumar V., Kaur J., Tanwar B., Goyal A., Sharma R., Gat Y., Kumar A., Health effects, sources, utilization and safety of tannins: a critical review, *Toxins*. 40(3), 1-13, (2019).
157. Stanković J., Određivanje antioksidativnih karakteristika odabranih vrsta lubenica i dinja. Master rad, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet-Departman za hemiju, Niš, (2019).
158. Stevanović M., Antimikrobna i antivirulentna aktivnost etarskih ulja origana, vreska, smilja, rtanjskog čaja i timijana na sojeve bakterija *Staphylococcus aureus* i gljive roda *Candida*. Master rad, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Niš, (2021).
159. Swanson B.G., Tannins and polyphenols. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 5729-5733, (2003).
160. Sytar O., Zivcak M., Konate K., Brestic M., Phenolic acid patterns in different plant species of families *Asteraceae* and *Lamiaceae*: Possible phylogenetic relationships and potential molecular markers. *Hindawi Journal of Chemistry*. 4, (2022).
161. Šilješ I., Grozdanić Đ., Grgesina I., Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja. Zagreb. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, (1992).
162. Taghouti M., Martins-Gomes C., Félix L.M., Schäfer J., Santos J.A., Bunzel M., Nunes F.M., Silva A.M., Polyphenol composition and biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: Comparison with endemic Iberian *Thymus* species. *Food Chemistry*. 331(127362), (2020).
163. Tasić M., Ispitivanje fenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakata biljne vrste *Forsythia europaea*. Master rad, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet - Departman za hemiju, Niš, (2017).
164. Teixeira J., Gaspar A., Garrido E.M., Garrido J., Borges F., Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*. (2013).
165. Trivellini A., Lucchesini M., Maggini R., Mosadegha H., Sulca Villamarin T.S., Vernieri P., Mensuali-Sodi A., Pardossi A., *Lamiaceae* phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of "positive-stress". *Industrial Crops and Products*. 83, 241-254, (2015).
166. Tsolcha O.N., Patrino V., Economou C.N., Dourou M., Aggelis G., Tekerlekopoulou A.G., Utilization of biomass derived from Cyanobacteria-based agro-

- industrial wastewater treatment and raisin residue extract for bioethanol production. *Water*. 13, 486, (2021).
167. Ullah A., Munir S, Badshah S.L., Khan N., Ghani L., Poulson B.G., Emwas A.H., Jaremko M., Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*. 25(22), (2020).
168. Vergara-Salinas J., Perez-Jimenez J., Torres J.L., Agosin E., Perez-Correa J.R., Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(44), 10920–10929, (2012).
169. Vaičiuliene G., Bakutis B., Jovaišiene J., Falkauskas R., Gerulis G., Bartkiene E., Klupšaitė D., Klementavičiute J., Baliukoniene V., Effects of ethanol extracts of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* on the mycotoxin concentrations and the hygienic quality of maize (*Zea mays* L.) silage. *Toxins*. 14, 298. (2022).
170. Venkatesan T., Choi Y.W., Kim Y.K., Impact of different extraction solvents on phenolic content and antioxidant potential of *Pinus densiflora* bark extract. *BioMed Research International*. (2019).
171. Vidanović M., Antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata rizoma vrste *Bolboschoenus laticarpus*. Master rad, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet - Departman za biologiju i ekologiju, Niš, (2019).
172. Vitković A., Odredjivanje antioksidativnih karakteristika odabranih gljiva roda *Lactarius*. Master rad, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet - Departman za biologiju i ekologiju, Niš, (2017).
173. Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Kindl M., Vladić J., Lower-Nedza A.D., Brantner A.H., Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the *Lamiaceae* family. *Molecules*. 19, 767-782, (2014).
174. Wiese N., Fischer J., Heidler J., Lewkowski O., Degenhard J., Erler S., The terpenes of leaves, pollen, and nectar of thyme (*Thymus vulgaris*) inhibit growth of bee disease associated microbes. 8(1), (2018).
175. Yalçın S., Eser H., Onbaşilar I., Yalçın S., Effects of dried thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves on performance, some egg quality traits and immunity in laying hens. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 67(3), 303-311, (2020).
176. Zantar S., Garrouj D.E., Pagán R., Chabi M., Laglaoui A., Bakkali M., Zerrouk M.H., Effect of harvest time on yield, chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils. *European Journal of Medicinal Plants*. 8(2), 69-77, (2015).
177. Zeghad N., Merghem R., Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. *Romanian Journal of Biology - Plant Biology*. 58(1), 27–36, (2013).
178. Zeković Z., Pintać D., Majkić T., Vidović S., Mimica-Dukić N., Teslić N., Versari A., Pavlić B., Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery-

- Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*. 99, 49-59, (2017).
179. Zeković Z., Analysis of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts. *Apteff*. 31, 617-622, (2000).
180. Zheng W., Wang S.Y., Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(11), 5165–5170, (2001).
181. Zrnić M., Proizvodnja ljekovitog bilja, sjemena i sadnog materijala za proizvodnju ljekovitog bilja, u cilju podsticanja organske poljoprivredne proizvodnje. NGO „Krajina-Poslovni inkubator“, Banja Luka, (2007).