



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**KARAKTERIZACIJA POLIFENOLA KOMINE GROŽĐA
DOBIJENIH EKSTRAKCIJOM VODENIM
RASTVORIMA NEJONSKIH SURFAKTANATA I
PRIMENA EKSTRAKATA U IZRADI EMULZIJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:
Prof. dr Milica Atanacković Krstonošić
Prof. dr Veljko Krstonošić

Kandidat:
Darija Sazdanić

Novi Sad, 2023. godine

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Дарија Сазданић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	др Милица Атанацковић Крстоношић, ванредни професор, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду др Вељко Крстоношић, редовни професор, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду
Наслов рада:	Карактеризација полифенола комине грожђа добијених екстракцијом воденим растворима нејонских сурфактаната и примена екстраката у изради емулзија
Језик публикације (писмо):	српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 149 Поглавља 7 Референци 262 Табела 21 Слика 41 Графикона 0 Прилога 0
Научна област:	Медицинске науке (Фармацеутске науке)
Ужа научна област (научна дисциплина):	Фармацеутска аналитика / Фармацеутска технологија са индустријском фармацијом и козметологијом
Кључне речи / предметна одредница:	грожђе; биљни екстракти; полифеноли; површински активне материје; емулзије Не-Меш: комина грожђа
Резиме на језику рада:	Током производње вина стварају се велике количине нуспроизвода, од којих комина чини приближно 20-30% укупне масе обрађеног грожђа. Комина истовремено представља и еколошки проблем и сировину богату биолошки активним једињењима, од којих посебну пажњу привлаче полифенолна једињења захваљујући доказаном антиинфламаторном, антиоксидативном, антиканцерогеном и кардиопротективном дејству. Искоришћавање нуспроизвода који настају током производње вина у сврху ефикасне екстракције полифенола представља предмет интересовања науке и индустрије. Савремен приступ екстракцији полифенола довео је до развоја ефикасних и истовремено еколошки прихватљивих метода, будући да су првобитне, класичне, методе подразумевале употребу великих количина органских растварача. Методе екстракције полифенола које укључују употребу водених раствора површински активних материја у складу су са принципима „зелене” хемије и представљају нови приступ класичној чврсто-течној екстракцији. Имајући у виду све претходно изнешено, циљеви рада су били следећи: испитивање могућности примене различитих типова нејонских сурфактаната и бинарних смеша сурфактаната у екстракцији полифенолних једињења из комине црног грожђа, упоређивање

	<p>ефикасности екстракције са ефикасношћу конвенционалних растварача, испитивање утицаја различитих фактора (концентрација сурфактанта, киселост раствора и однос запремине растварача и масе комине) на ефикасност екстракције, карактеризација екстраката, израда модела емулзија са инкорпорираним екстрактима комине грожђа уз стабилизацију сурфактантима употребљеним у екстракцији, као и испитивање њихове физичке стабилности и реолошких карактеристика.</p> <p>Ефикасност екстракције применом водених раствора једнаест нејонских сурфактаната из група полуксамера, <i>Tween</i>, <i>Brij</i> и <i>Triton</i> сурфактаната, у концентрацијама од 0,5, 1, 2 и 3% (m/V), при рН вредностима 3, 4 и 5 и односима запремине растварача и масе комине 100:1, 20:1 и 10:1 је испитана. Као конвенционални растварачи испитани су дестилована вода, етанол и смеша вода:етанол (1:1). Такође, испитана је ефикасност екстракције бинарних смеша сурфактаната <i>Brij S20</i> и полуксамера 407, уз варирање масених удела појединачних сурфактаната у смешама (1:9, 1:1, 9:1). Ефикасност екстракције је испитана <i>in vitro</i> одређивањем садржаја укупних фенола, одређивањем садржаја појединачних фенола, одређивањем антиоксидативног капацитета и праћењем промена у величини мицела. Сурфактанти који су идентификовани као најефикаснији за екстракцију полифенола (полуксамер 407, <i>Brij S20</i> и <i>Tween 60</i>), као и њихове смеше уз варирање масених удела појединачних сурфактаната (1:9, 1:1, 9:1), употребљени су потом за израду модела емулзија типа уље у води. Израђене су контролне емулзије са водом као континуалном фазом, као и емулзије са екстрактом комине као континуалном фазом. Испитане су следеће карактеристике емулзија: величина капи унутрашње фазе, реолошке карактеристике и криминг индекс.</p> <p>Ефикасност екстракције полифенола зависила је од врсте и концентрације примењених сурфактаната, као и од услова екстракције. Међу испитиваним површински активним материјама, <i>Brij S20</i> и полуксамер 407 су показали највећи потенцијал за екстракцију полифенола. Ефикасност ових сурфактаната била је виша од воде и етанола појединачно, а упоредива са смешом вода:етанол (1:1). Раствори бинарних смеша <i>Brij-a S20</i> и полуксамера 407 масених односа 1:1 и 9:1 испољили су већу ефикасност екстракције у поређењу са растворима појединачних сурфактаната. Полифенолни профил екстраката зависио је од типа примењеног сурфактанта. Такође, претпостављени су механизми солубилизације ових једињења у мицелама. Све израђене емулзије показале су псеудопластично протицање и адекватну физичку стабилност, без појаве коалесценције. Запажено је да су реолошке карактеристике и криминг нестабилност одређени уделом полимерног сурфактанта. Инкорпорирање екстраката није довело до нарушавања физичке стабилности и промена у реолошким карактеристикама емулзија.</p> <p>Ово истраживање је показало да анализирани сурфактанти, као и бинарне смеше сурфактаната, показују потенцијал за примену у оквиру ефикасне, једноставне и еколошке прихватљиве методе за екстракцију полифенола из нуспроизвода винске индустрије. Такође, утврђено је да емулзије представљају погодне носаче полифенола као активних супстанци, те да су овако добијени екстракти погодни за даљи развој производа у фармацеутској, козметичкој или прехранбеној индустрији.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	27.03.2023.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	

Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: Члан: Члан: Члан:
Напомена:	

KEY WORD DOCUMENTATION

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Darija Sazdanić
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Milica Atanacković Krstonošić, PhD, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad Veljko Krstonošić, PhD, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad
Thesis title:	Characterization of grape pomace polyphenols obtained by extraction with aqueous solutions of non-ionic surfactants and application of the extracts in the preparation of emulsions
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages 149 Chapters 7 References 262 Tables 21 Illustrations 41 Graphs 0 Appendices 0
Scientific field:	Medical sciences (Pharmaceutical sciences)
Scientific subfield (scientific discipline):	Pharmaceutical Analytics / Pharmaceutical Technology with Industrial Pharmacy and Cosmetology
Subject, Key words:	Vitis; Plant Extracts; Polyphenols; Surface-Active Agents; Emulsions Non-MeSH: Grape Pomace
Abstract in English language:	<p>The winemaking process generates large amounts of by-products, whereas grape pomace residue might account for approximately 20-30% of the mass of total processed grapes. Grape pomace is considered both an environmental issue and a rich source of biologically active compounds, such as polyphenolic compounds, which attract special attention thanks to the demonstrated anti-inflammatory, antioxidant, anti-cancer and cardioprotective effects. There is a growing scientific and industrial interest in the valorization of winemaking waste and the effective recovery of polyphenols. The modern approach to the extraction of polyphenols has led to the development of efficient and more environmentally-friendly methods. The methodology suggesting the use of aqueous solutions of surfactants represents a novel approach to the conventional solid-liquid extraction of polyphenols.</p> <p>The aims of this research were: investigation of the potential of different types of nonionic surfactants and binary surfactant mixtures for the extraction of polyphenol compounds from red grape pomace, comparison of the extraction efficiency with the efficiency of conventional solvent, examination of the influence of various factors (surfactant concentration, pH value, and solvent-to-material ratio) on extraction rate, characterization of the extracts, preparation of emulsion models with incorporated extracts of grape pomace, which were</p>

	<p>stabilized by surfactants used in the extraction, as well as the examination of their physical stability and rheological characteristics.</p> <p>The extraction efficiency of aqueous solutions of eleven non-ionic surfactants belonging to poloxamer, Tween, Brij and Triton surfactant types, in concentrations of 0.5, 1, 2 and 3% (m/V), at pH values of 3, 4 and 5 and solvent-to-material ratios of 100:1, 20:1 and 10:1 was investigated. Water, ethanol and a water:ethanol (1:1) mixture were used as conventional solvents. Also, the binary mixtures of Brij S20 and poloxamer 407 with varying mass fractions of individual surfactants in the mixtures (1:9, 1:1, 9:1) were investigated. The extraction efficiency was tested <i>in vitro</i> by determining the total phenolic content, the content of individual phenols, the antioxidant capacity and monitoring changes in the micelle size. The surfactants that were identified as the most effective for the extraction of polyphenols (poloxamer 407, Brij S20 and Tween 60), as well as their mixtures with varying mass proportions of individual surfactants (1:9, 1:1, 9:1), were used to prepare the oil-in-water emulsions. Control emulsions with water as the continuous phase, as well as emulsions with pomace extract as the continuous phase, were prepared. The dispersion and rheological characteristics as well as creaming index of the emulsions were examined.</p> <p>The efficiency of polyphenol extraction depended on the type and concentration of applied surfactants, as well as on the extraction conditions. Among the tested surfactants, Brij S20 and poloxamer 407 showed the highest potential for polyphenol extraction. The effectiveness of these surfactants was higher than water and ethanol individually, and comparable to the water:ethanol (1:1) mixture. Surfactant mixtures with mass ratios of Brij S20 and poloxamer of 1:1 and 9:1 exhibited higher extraction efficiency compared to individual surfactants. The polyphenolic profile of the extracts was determined by the type of surfactant used. Based on the obtained results of extraction efficiency, chemical structures of surfactants and polyphenolic compounds of pomace, it was assumed the solubilization mechanism of these compounds in micelles. All prepared emulsions showed pseudoplastic behavior and sufficient physical stability without coalescence. Also, it has been noticed that the rheological characteristics and creaming index are determined by the share of polymeric surfactant. Incorporation of extracts did not lead to impairment of physical stability and changes in the rheological characteristics of emulsions.</p> <p>This research showed that the analyzed surfactants and surfactant mixtures exhibit the potential for the application within an effective, simple and environmentally-friendly method for the extraction of polyphenols from winery by-products. Also, it was concluded that emulsions represent suitable carriers of polyphenols as active substances, and that the surfactant-rich grape pomace extracts are suitable for further incorporation in such products in the pharmaceutical, cosmetic or food industry.</p>
Accepted on Scientific Board on:	27.03.2023.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Member: Member: Member:
Note:	

Zahvalnica

Neizmernu zahvalnost na poverenju, nesebičnoj pomoći, savetima, velikom strpljenju i podršci tokom celokupnog procesa izrade ove doktorske disertacije dugujem svojim mentorima, prof. dr Milici Atanacković Krstonošić i prof. dr Veljku Krstonošiću.

Veliku zahvalnost na pomoći u izradi disertacije, kao i na korisnim savetima i podršci, dugujem prof. dr Branislavi Srđenović Čonić, doc. dr Dejanu Ćirinu i doc. dr Nebojši Kladaru sa Katedre za farmaciju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, prof. dr Ivani Nikolić i asist. dr Nikoli Maraviću sa Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, kao i dr Miroslavu Hadnađevu, naučnom savetniku sa Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. Veliko hvala na podršci i razumevanju prof. dr Jeleni Cvejić i prof. dr Miri Mikulić, kao i svim članovima Katedre za farmaciju. Takođe, posebnu zahvalnost na nesebičnoj pomoći dugujem Katarini Kocki.

Beskrajno se zahvaljujem svojoj porodici na podršci, ljubavi i razumevanju!

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Opšti deo	3
2.1.	Proizvodnja grožđa i vina	3
2.2.	Nusproizvodi vinske industrije	4
2.2.1	Fizičko-hemijske karakteristike i nutritivni sastav komine grožđa	6
2.3.	Ekološki uticaj komine grožđa.....	7
2.4.	Upotreba komine grožđa.....	8
2.5.	Fenolna jedinjenja komine grožđa	9
2.5.1	Fenolne kiseline	11
2.5.2	Flavonoidi	12
2.5.2.1	Flavoni, flavonoli i flavanoni	13
2.5.2.2	Flavanoli	14
2.5.2.3	Antocijanidini	15
2.5.3	Stilbeni	15
2.6.	Biološki efekti fenolnih jedinjenja komine grožđa	16
2.6.1	Mehanizmi antiinflamatornog i antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja ...	17
2.6.2	Kardioprotektivno delovanje fenolnih jedinjenja grožđa	19
2.6.3	Antikancerogeno delovanje fenolnih jedinjenja grožđa	19
2.7.	Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz komine grožđa	20
2.7.1	Konvencionalne tehnike ekstrakcije polifenola	21
2.7.1.1	Prednosti konvencionalnih tehnika ekstrakcije	23
2.7.1.2	Nedostaci konvencionalnih tehnika ekstrakcije	24
2.7.2	Savremene tehnike ekstrakcije polifenola	24
2.7.3	Ekstrakcija polifenola primenom rastvora surfaktanata	25
2.7.3.1	Karakteristike surfaktanata	26
2.7.3.1.1	Podela surfaktanata	27
2.7.3.1.2	Binarne smeše surfaktanata.....	30
2.7.3.1.3	Solubilizacija.....	30
2.7.3.2	Ekstrakcija polifenola primenom rastvora nejonskih surfaktanata.....	31
2.8.	Emulzije	36
2.8.1	Podela emulzija.....	36

2.8.2	Stabilnost emulzija.....	39
2.8.3	Reološke osobine emulzija	40
2.8.4	Emulzije kao nosači aktivnih supstanci	41
3.	Ciljevi i hipoteze	43
4.	Materijal i metode	44
4.1.	Uzorak komine grožđa.....	44
4.2.	Priprema vodenih rastvora pojedinačnih nejonskih surfaktanata	44
4.3.	Priprema vodenih rastvora smeša nejonskih surfaktanata	45
4.4.	Poredbeni ekstrakcioni medijumi	45
4.5.	Ispitivanja površinske aktivnosti pojedinačnih surfaktanata i smeša surfaktanata.....	45
4.5.1	Priprema rastvora.....	45
4.5.2	Određivanje kritičnih micelarnih koncentracija i ispitivanje agregacionih svojstava pojedinačnih surfaktanata i smeša surfaktanata.....	46
4.6.	Postupak ekstrakcije.....	46
4.6.1	Postupak ekstrakcije - variranje zapremine rastvarača i mase komine.....	46
4.6.2	Postupak ekstrakcije – sukcesivna ekstrakcija.....	47
4.7.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	47
4.8.	Određivanje sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja.....	47
4.9.	Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH slobodnih radikala	48
4.10.	Ispitivanje sposobnosti inhibicije ksantin oksidaze	49
4.11.	Određivanje veličine micela	49
4.12.	Postupak izrade emulzija	49
4.13.	Određivanje veličine kapi disperzne faze emulzija	50
4.13.1	Mikroskopska analiza emulzija.....	51
4.14.	Ispitivanje reoloških karakteristika emulzija	51
4.15.	Određivanje kriming indeksa emulzija	52
4.16.	Statistička obrada podataka.....	52
5.	Rezultati i diskusija.....	53
5.1.	Određivanje kritičnih micelarnih koncentracija i ispitivanje agregacionih svojstava pojedinačnih surfaktanata i smeša surfaktanata	53
5.2.	Ispitivanje efikasnosti konvencionalnih rastvarača u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz komine crnog grožđa.....	58
5.2.1	Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa dobijenim primenom odabranih konvencionalnih rastvarača.....	58
5.2.1.1	Uticaj tipa primenjenog konvencionalnog rastvarača na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa.....	58

5.2.1.2	Uticaoj odnosa zapremine rastvarača i mase komine na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa.....	59
5.2.1.3	Uticaoj sukcesivne ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa.....	61
5.2.2	Sadržaj pojedinačnih fenolnih komponenti u ekstraktima dobijenim primenom konvencionalnih rastvarača.....	62
5.2.3	Antioksidativni kapacitet ekstrakata – sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala.....	64
5.2.4	Sposobnost ekstrakata za inhibiciju ksantin oksidaze	65
5.3.	Ispitivanje efikasnosti vodenih rastvora pojedinačnih nejonskih surfaktanata u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz komine crnog grožđa.....	66
5.3.1	Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa dobijenim primenom vodenih rastvora pojedinačnih nejonskih surfaktanata	66
5.3.1.1	Uticaoj tipa nejonskog surfaktanta na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa.....	66
5.3.1.1.1	Predloženi mehanizmi solubilizacije polifenola unutar micela ispitanih tipova nejonskih surfaktanata	70
5.3.1.2	Uticaoj koncentracije surfaktanta na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa.....	73
5.3.1.3	Uticaoj pH vrednosti rastvora na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa.....	74
5.3.1.4	Uticaoj odnosa zapremine rastvarača i mase komine na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa.....	75
5.3.1.5	Uticaoj primene sukcesivne ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa.....	77
5.3.2	Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora pojedinačnih nejonskih surfaktanata.....	79
5.3.3	Antioksidativni kapacitet ekstrakata – sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala.....	82
5.3.4	Sposobnost ekstrakata za inhibiciju ksantin oksidaze	83
5.3.5	Uticaoj ekstrakcije polifenola iz komine grožđa na veličinu micela u rastvorima pojedinačnih surfaktanata	84
5.4.	Ispitivanje efikasnosti vodenih rastvora smeša nejonskih surfaktanata u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz komine crnog grožđa	89
5.4.1	Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa dobijenim primenom vodenih rastvora smeša nejonskih surfaktanata.....	89
5.4.1.1	Uticaoj pH vrednosti rastvora na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa.....	90

5.4.1.2	Uticaj masenog udela pojedinačnih surfaktanata u binarnim smešama na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa.....	90
5.4.2	Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora smeša nejonskih surfaktanata.....	91
5.4.3	Antioksidativni kapacitet ekstrakata – sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala.....	96
5.4.4	Sposobnost ekstrakata za inhibiciju ksantin oksidaze	97
5.4.5	Uticaj ekstrakcije polifenola iz komine grožđa na veličinu micela u rastvorima smeša surfaktanata	98
5.5.	Određivanje karakteristika emulzija	103
5.5.1	Veličina kapi unutrašnje faze emulzija	103
5.5.2	Reološke osobine emulzija	112
5.5.1	Određivanje kringing indeksa emulzija	117
6.	Zaključak.....	125
7.	Literatura.....	127

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera* L., Vitaceae) predstavlja jednu od najznačajnijih gajenih biljnih vrsta. Najveći deo proizvodnje grožđa se dalje usmerava ka proizvodnji vina, koja generiše veliku količinu nusproizvoda i otpada. Komina predstavlja čvrsti nusproizvod, koji se istovremeno smatra i nedovoljno iskorištenom sirovinom i potencijalnim ekološkim problemom. Zbog negativnog uticaja na životnu sredinu usled nepropisnog odlaganja velikih količina ostataka grožđa, evropska regulativa predviđa usmeravanje nusproizvoda u destilerije radi daljeg iskorišćenja, uz postojanje stroge kaznene politike. Sa druge strane, sve veća pažnja se posvećuje valorizaciji nusproizvoda vinske industrije u cilju dobijanja biološki aktivnih jedinjenja, koja se dalje mogu upotrebiti u proizvodnji dijetetskih proizvoda, funkcionalne hrane, kao i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Naime, nakon proizvodnje crvenog vina, u otpadu i nusproizvodima vinske industrije se zadržava velika količina polifenola grožđa (fenolnih kiselina, flavonoida, stilbena itd.), čiji se biološki potencijal detaljno proučava. Najznačajnija delovanja polifenola grožđa obuhvataju antioksidativno, antiinflamatorno, kardioprotektivno i antikancerogeno.

Klasične tehnike ekstrakcije polifenolnih jedinjenja se generalno zasnivaju na čvrsto-tečnoj ekstrakciji uz primenu organskih rastvarača ili njihovih smeša sa vodom. Pored toga, kako bi se uklonili nedostaci klasičnih tehnika (upotreba toksičnih rastvarača, dužina trajanja ekstrakcionih procesa, potreba za dodatnim prečišćavanjem ekstrakata i dr.) i povećao prinos ekstrakcije, razvijene su savremene tehnike, kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvučnim talasima ili mikrotalasnim zračenjem, ekstrakcija superkritičnim fluidima i sl. Ipak, i dalje postoji potreba za razvojem novih inovativnih tehnika, koje su efikasne, a istovremeno u potpunosti ispunjavaju zahteve „zelene” hemije.

Jedna od metoda, koja se zasniva na principima „zelene” hemije, odnosno ne podrazumeva upotrebu štetnih organskih rastvarača i ne zahteva veliki utrošak energije u odnosu na ostale tehnike, predstavlja ekstrakcija primenom vodenih rastvora surfaktanata. Ovom metodom se omogućava izolovanje širokog spektra jedinjenja iz različitih sirovina, uz upotrebu vode kao medijuma, što metodu čini ekološki prihvatljivom. Takođe, primenjeni surfaktanti se zadržavaju u finalnom ekstraktu, u kojem imaju sposobnost da povećaju stabilnost i pospeše penetraciju ukoliko se ekstrakt primenjuje topikalno. Naime, surfaktanti, zahvaljujući svojoj karakterističnoj

hemijskoj strukturi, u vodenim rastvorim iznad kritične micelarne koncentracije formiraju agregate – micelle, u kojima su polarne glave molekula orijentisane ka površini, a nepolarni repovi ka jezgru. Zahvaljujući ovakvoj specifičnoj građi molekula surfaktanata i njihovoj orijentaciji u micelama, omogućeno je formiranje fizičkih i hemijskih interakcija i sa hidrofilnim i sa lipofilnim supstancama. Ovo ukazuje na potencijal micelarnih rastvora za solubilizaciju polifenolnih jedinjenja različitih struktura i polarnosti, odnosno za njihovu efikasnu ekstrakciju iz komine grožđa. Nejonski surfaktanti se smatraju generalno bezbednim za zdravlje ljudi, što ih čini pogodnim za upotrebu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Takođe, pokazano je da rastvori nejonskih surfaktanata mogu biti efikasniji u ekstrakciji fenolnih jedinjenja iz različitog biljnog materijala, u poređenju sa vodom ili organskim rastvaračima.

Emulzije su prepoznate kao pogodni nosači polifenolnih jedinjenja kao aktivnih sastojaka za topikalnu primenu, zahvaljujući efikasnoj inkorporaciji, zadržavanju hemijske stabilnosti i antioksidativne aktivnosti polifenola, mogućnosti njihovog kontrolisanog otpuštanja iz formulacije, uz istovremeno očuvanje neophodne stabilnosti emulzija. Takođe, formulacije čiju osnovu čine emulzije pogodnije su za primenu na koži budući da su po svom sastavu najbližije sastavu i uslovima površinskog sloja kože i prema tome, pokazuju najveću kompatibilnost. Iskorišćavanjem ekstrakata komine grožđa dobijenih primenom vodenih rastvora surfaktanata za izradu emulzija tipa ulje u vodi, prisustvo surfaktanata u ekstraktima omogućava dispergovanje uljane faze u vodenu, dok polifenoli predstavljaju aktivne komponente.

2. Opšti deo

2.1. Proizvodnja grožđa i vina

Vinova loza (*Vitis vinifera* L., Vitaceae) predstavlja jednu od najznačajnijih gajenih biljnih vrsta, koja se u velikom obimu uzgaja širom sveta i pripada glavnim svetskim agroekonomskim aktivnostima. U 2021. godini je ukupna površina zemljišta zasađena vinogradima iznosila 6,73 miliona hektara i proizvedeno je više od 73 miliona tona grožđa širom sveta [1]. U Evropi je iste godine proizvedeno skoro 27 miliona tona grožđa, odnosno evropske zemlje su imale udeo od 36,6% u ukupnoj svetskoj proizvodnji (**Tabela 1**), a pet najvećih svetskih proizvođača grožđa su bile Kina, Italija, Španija, Sjedinjene Američke Države i Francuska [1].

Tabela 1. Statistički podaci o proizvodnji grožđa i vina za 2021. i 2022. godinu

	Svet	Evropa	Srbija
Površina zemljišta zasađena vinogradima (ha)			
2021. godina	6,73 miliona [1]	> 3,4 miliona [1]	20113 [1]
Proizvodnja grožđa (t)			
2021. godina	> 73 miliona [1]	skoro 27 miliona [1]	155 718 [1]
Proizvodnja vina (hl)			
2021. godina	262 miliona [2]	154 miliona [3]	/
2022. godina	258 miliona [4]	161,1 miliona [4]	/

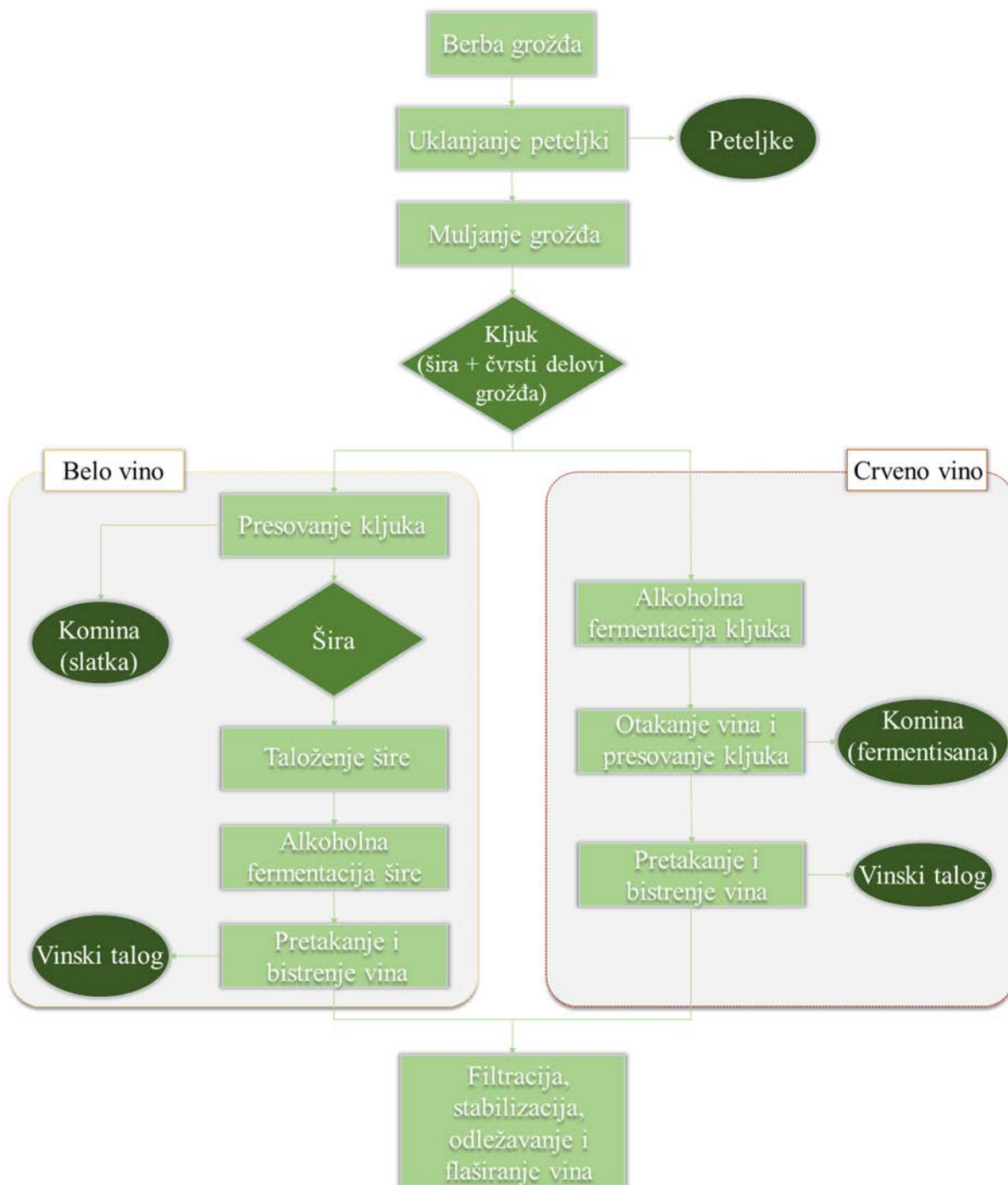
Grožđe se može koristiti sveže ili osušeno u ishrani ili se može koristiti kao sirovina za proizvodnju vina, džema, soka, sirćeta ili jestivog ulja semenki [5]. Prema podacima *International Organisation of Vine and Wine* od ukupne svetske proizvodnje grožđa, 57% predstavlja proizvodnja grožđa za potrebe vinarstva i vinske industrije, dok je ostatak namenjen za ishranu, kao sveže ili sušeno voće [6]. Prema izveštaju za 2022. godinu, proizvedeno je 258 miliona hektolitara vina na svetskom nivou, a takođe je procenjeno da je proizvodnja vina u periodu od 2019. do 2022. godine bila konstantna i godišnje iznosila oko 260 miliona hektolitara [3, 4]. Osim toga, procenjeno je da je proizvodnja vina u Evropskoj uniji 2022. godine iznosila 161,1 milion hektolitara [4] (**Tabela 1**). Najveći proizvođači vina na svetskom nivou su Italija i Francuska, koje zajedno imaju udeo u svetskoj proizvodnji od 36% i u evropskoj proizvodnji od 60% [3]. Povoljan geografski položaj i klimatski uslovi Republike Srbije, kao i drugi faktori, kao što su nagib terena

i sastav zemljišta, daju brojne mogućnosti za gajenje vinove loze i proizvodnju vina na ovoj teritoriji [7, 8]. U 2021. godini je u Republici Srbiji površina zemljišta zasađena vinogradima iznosila 20113 hektara, a proizvedeno je ukupno 155 718 tona grožđa (**Tabela 1**) [1]. Takođe, broj vinarija na ovom području konstantno raste i 2021. godine je zabeleženo ukupno 430 registrovanih proizvođača vina [7, 9].

2.2. Nusproizvodi vinske industrije

Tokom procesa proizvodnje vina stvara se značajna količina nusproizvoda. Otpad vinske industrije obuhvata organski otpad, odnosno lišće, peteljke i kominu kao čvrste nusproizvode, vinski talog koji nastaje nakon pretakanja i bistrenja vina, otpadnu vodu, gasove kao što je ugljen-dioksid, isparljiva organska jedinjenja, kao i neorganski otpad (dijatomejska zemlja, bentonit itd.) [10-12].

Proces proizvodnje vina započinje berbom grožđa, dok se u zavisnosti od željenih senzornih karakteristika krajnjeg proizvoda, procesi proizvodnje vina mogu u određenoj meri razlikovati (**Slika 1**) [5]. U procesu muljanja grožđa nastaje kljuk, koji se sastoji od soka koji je nastao muljanjem (šira), kao i od čvrstih delova grožđa (egzokarp, semenke i peteljke) [13, 14]. Karakteristika procesa proizvodnje crvenih vina je fermentacija kljuka, tj. šire zajedno sa čvrstim delovima grožđa. Prisustvo egzokarpa u kljuku tokom fermentacije omogućava dobijanje vina crvene boje, koja potiče od antocijana [5, 14, 15]. Takođe, budući da je u procesu proizvodnje crvenih vina šira tokom nekoliko dana u kontaktu sa semenkama i egzokarpom grožđa, koji imaju visok sadržaj polifenola grožđa, to u velikoj meri povećava sadržaj polifenola u vinu [16]. Međutim, i nakon završene fermentacije, ostaci grožđa unutar komine i dalje imaju visok sadržaj polifenola, koji se u najvećoj meri zadržavaju u egzokarpu [14, 16, 17]. Mehaničko presovanje kljuka se sprovodi tek nakon fermentacije i tom prilikom nastaje komina crnog grožđa. Sa druge strane, tokom proizvodnje belih vina čvrsti ostaci grožđa nisu uključeni u proces fermentacije. Naime, nakon muljanja grožđa, kljuk se podvrgava mehaničkom presovanju radi dobijanja šire, koja se dalje podvrgava procesu fermentacije, a kao čvrsti nusproizvod se odvaja komina [5].



Slika 1. Generisanje nusproizvoda tokom procesa proizvodnje vina

Komina predstavlja biorazgradivi čvrsti nusproizvod koji nastaje tokom proizvodnje vina. Procenjuje se da se od 1 kg grožđa može dobiti 0,75 l crvenog vina [5], a da nakon proizvodnje 6 l vina zaostaje 1 kg komine grožđa [18], što bi na svetskom nivou predstavljalo generisanje oko

4,3 miliona tona komine godišnje. Količina komine koja se stvara po jedinici mase iskorišćenog grožđa zavisi procesa presovanja, fermentacije, *terroir*-a (francuski izraz za sveobuhvatni uticaj okruženja: klime, tipa zemljišta, izloženosti sunčevoj svetlosti itd.) i sorte grožđa [5, 17, 18]. Komina grožđa čini do 20-30% ukupne mase obrađenog grožđa [5, 11, 19], gde najveći udeo predstavlja egzokarp, koji čini 65-75% ukupne mase čvrstog ostatka, zatim semenke (15-52%), dok ostatak čine zaostala pulpa i peteljke [10, 12]. Razlike u podacima koji se odnose na proporciju komine i ukupne količine grožđa iskorišćene u procesu proizvodnje vina nastaju kao posledica različitog tumačenja polazne mase grožđa za proizvodnju vina, tj. koja vrsta materijala se smatra polaznom masom grožđa i da li se peteljke smatraju sastavnim delom komine [12]. Naime, u nekim slučajevima se peteljke grožđa uklanjaju pre početka procesa proizvodnje vina zbog visokog sadržaja tanina, dok se u pojedinim slučajevima zadržavaju, u zavisnosti od željenog hemijskog sastava i senzornih karakteristika vina [15].

2.2.1 Fizičko-hemijske karakteristike i nutritivni sastav komine grožđa

Grožđe predstavlja bogat izvor brojnih klasa jedinjenja, kao što su ugljeni hidrati, organske kiseline, vitamini, minerali, a kao jedna od značajnijih klasa izdvajaju se polifenoli [20]. Kao što je naglašeno, kominu grožđa najvećim delom čini egzokarp, dok pulpa, peteljke i semenke grožđa čine njen preostali deo [10, 12, 18]. Komina grožđa se sastoji od 50% do 74% vlage [21, 22], u zavisnosti od sorte i stepena zrelosti grožđa (**Tabela 2**). Vlaga čini između 50 i 64% komine dobijene proizvodnjom crvenih vina [22, 23]. U komini dobijenoj tokom proizvodnje crvenih vina (komina crnog grožđa) lignin, celuloza, hemiceluloza i drugi sastavni molekuli ćelijskih zidova biljaka predstavljaju najzastupljenija jedinjenja, dok je njihov udeo u komini dobijenoj tokom proizvodnje belih vina (komina belog grožđa) značajno smanjen budući da u ovoj vrsti komine dominantne materije čine rastvorljivi šećeri [24]. Dakle, komina grožđa, u zavisnosti od primenjene tehnike proizvodnje vina, može imati sadržaj rezidualnih šećera (glukoze i fruktoze) u rasponu od 1% u slučaju crvenih vina do 38% u slučaju belih vina, mereno na osnovu mase suve materije (**Tabela 2**) [25, 26]. U poređenju sa svežim grožđem, vlakna su u nusproizvodima vinske industrije, odnosno u peteljčkama i komini grožđa prisutna u značajno većem udelu [22]. Lignin predstavlja najzastupljeniji polimer ćelijskih zidova u komini crnog grožđa, sa masenim udelom od 30,8 do 44,5% suve materije [23]. Najzastupljenije komponente iz grupe polisaharida ćelijskih zidova su pektinske materije, sa molskim udelom od 37 do 54%, dok celuloza predstavlja drugu

najzastupljeniju komponentu polisaharida ćelijskih zidova, sa molskim udelom od 27 do 37% [22]. Prema Jin i sar. (2019), razlike u sadržaju proteina komine crnog i belog grožđa (**Tabela 2**) predstavljaju posledicu različitih procesa proizvodnje belog i crvenog vina. Budući da se komina tokom proizvodnje crvenog vina dobija presovanjem kljuka nakon dodatka kvasca i alkoholne fermentacije, to utiče na viši sadržaj proteina [23]. Komina grožđa je takođe bogata i lipidima budući da semenke grožđa, koje sadrže značajnu količinu lipida (sa masenim udelom između 10% i 20%) čine drugu po redu najzastupljeniju komponentu komine grožđa posle egzokarpa (**Tabela 2**) [24]. Lipide semenki grožđa u velikoj meri čine nezasićene masne kiseline, na prvom mestu linoleinska i oleinska kiselina [23, 24]. Ukupni maseni udeo mineralnih materija u osušenoj komini crnog grožđa iznosi između 4,66 i 5,62% [27]. Mineralni sadržaj komine grožđa se karakteriše velikim stepenom varijabilnosti između uzoraka zahvaljujući uticaju klimatskih uslova, načina gajenja vinove loze i specifičnostima postupka proizvodnje vina [28]. Komina grožđa je blago kisela, sa pH vrednošću ispod 4 (3,2-3,78 za kominu crnog grožđa) [14, 21, 27].

Tabela 2. Sastav komine crnog i belog grožđa

	Komina crnog grožđa	Komina belog grožđa
Vlaga	50-58% [23]	52-69,5% [23]
	50-64% [22]	63-72% [22]
Glukoza	2,09-6,05 g/kg SM ¹ [23]	6,86-53,33 g/kg SM [23]
Fruktoza	3,79-10,9 g/kg SM [23]	7,42-32,8 g/kg SM [23]
Lignin	30,8-44,5% SM [23]	25,2-37,6% SM [23]
Proteini	3,1-3,8% SK ² [22]	2,7-3,4% SK [22]
	11-13% SM [23]	6-11% SM [23]
Lipidi	7,8-8,95 g/100 g SM [27]	4,62-10,9% SM [23]
	7,19-12,5% SM [23]	
Minerali	4,66-5,62% SM [27]	

¹SM – suva materija

²SK – sveža komina

2.3. Ekološki uticaj komine grožđa

Velike količine nusproizvoda koje zaostaju nakon proizvodnje vina u okviru kratkog vremenskog perioda nakon berbe grožđa predstavljaju značajan problem u očuvanju životne sredine i važno ekonomsko pitanje. Zahvaljujući određenim karakteristikama komine, kao što su niska pH

vrednost i visok stepen otpornosti na biološku degradaciju, kao i fitotoksičnost zbog visokog sadržaja polifenolnih jedinjenja [29-31] neadekvatno odlaganje velikih količina ovog otpada na poljoprivrednom zemljištu predstavlja ekološki problem [5]. Efekti nepropisnog odlaganja komine mogu biti zagađenje zemljišta, površinskih i podzemnih voda, privlačenje insekata i štetočina, uticaj na proces klijanja useva itd. [11, 15, 16]. Evropska regulativa predviđa usmeravanje nusproizvoda vinske industrije u destilerije, uz striktnu kaznenu politiku za nepropisno odlaganje [30, 32]. Uprkos naporima, koji su prethodnih godina uloženi u unapređenje sistema za upravljanje otpadom, štetan uticaj celokupnog procesa proizvodnje vina na životnu sredinu je i dalje uočljiv.

2.4. Upotreba komine grožđa

U poslednjih dvadeset godina uočava se povećanje zabrinutosti za ekonomske i ekološke probleme koji mogu proisteći iz stvaranja velikih količina otpada u industriji hrane. U cilju smanjenja navedenih problema, savremeno tretiranje otpada je usmereno na njegovu obradu kako bi se smanjili negativni uticaji netretiranog otpada na životnu sredinu uz istovremeno omogućavanje dobijanja različitih proizvoda sa dodatnom vrednošću [14]. Prema tome, delovi otpada industrije hrane koji se mogu tretirati i iskoristiti smatraju se „nusproizvodima” [33]. Pojam „valorizacija” odnosi se na obradu nusproizvoda sa ciljem dobijanja proizvoda sa dodatnom vrednošću [34]. Kao i svi ostali nusproizvodi nastali tokom obrade hrane, nusproizvodi vinske industrije smatraju se ekonomski isplativim i izuzetno bogatim izvorom komponenti koje se mogu izolovati i dalje koristiti kao prirodni aditivi, sastojci funkcionalne hrane itd. [18].

Glavni nusproizvod vinske industrije predstavlja komina grožđa, koja se najčešće koristi u proizvodnji biođubriva [35, 36], kao stočna hrana [37, 38], za dobijanje jestivog i tehničkog ulja iz semenki, vinske kiseline, boja itd. [10, 14]. Odvajanjem semenki iz komine grožđa i ekstrakcijom može se dobiti ulje, koje se upotrebljava u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, hemijskoj i drugim industrijama. Proizvodnja boja se zasniva na iskorišćenju antocijana komine grožđa, a takve prirodne boje se dalje mogu primenjivati za bojenje hrane, bezalkoholnih i alkoholnih napitaka, kao i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, gde zamenjuju primenu sintetskih boja. Takođe, destilacijom komine grožđa mogu se dobiti alkoholni napici [14]. Zahvaljujući visokom sadržaju ugljenih hidrata, komina grožđa predstavlja sirovinu koja se može

iskoristiti za dobijanje biogoriva [10, 36]. Komina se može koristiti i kao supstrat za dobijanje biopolimera [39], kao i enzima i organskih kiselina [40].

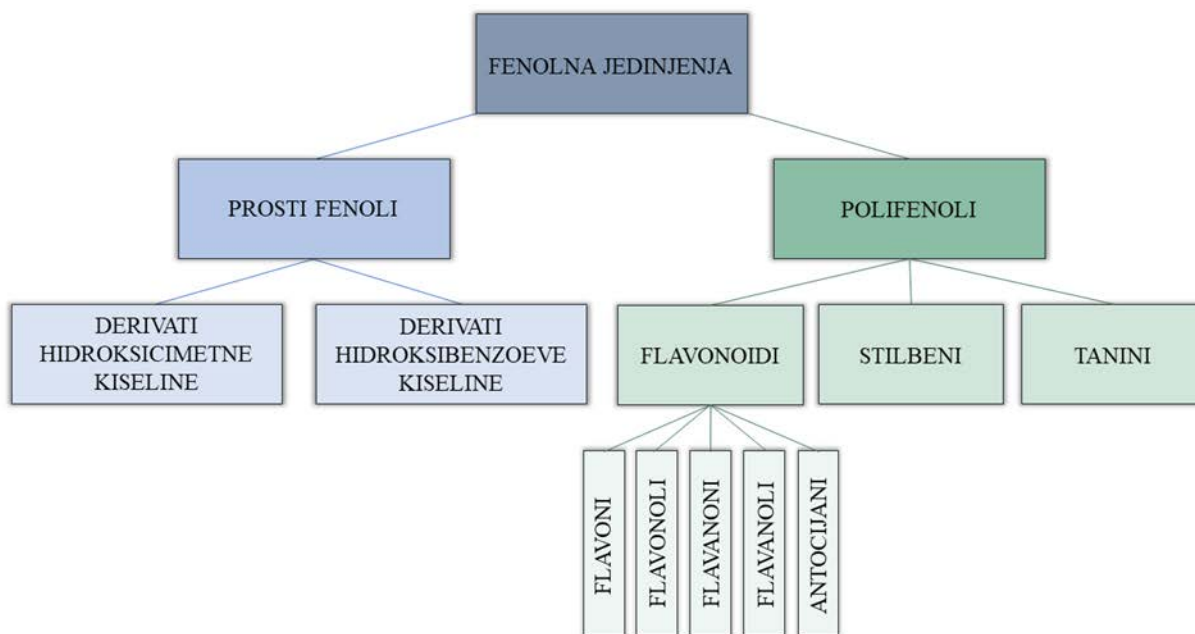
Prethodnih godina su različiti nusproizvodi biljnog porekla nastali tokom poljoprivredne proizvodnje i u industriji hrane i pića privukli značajnu pažnju kao izvori biološki aktivnih fenolnih jedinjenja koja mogu imati primenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji [41]. Podaci ukazuju da tokom proizvodnje crvenog vina u komini može zaostati i do 85% polifenola grožđa, dok se u najvećem broju slučajeva tokom procesa proizvodnje vina ekstrahuje između 30 i 40% polifenola [42]. Sadržaj polifenola koji zaostaje u otpadu i nusproizvodima vinske industrije zavisi u velikoj meri od sorte grožđa, lokacije vinograda i karakteristika grožđa, kao i od tehnoloških parametara procesa proizvodnje vina [42].

2.5. Fenolna jedinjenja komine grožđa

Sekundarni metaboliti biljaka se sintetišu kao odgovor na stresne uslove (npr. povreda tkiva, infekcije ili dejstvo UV zraka) i imaju ulogu u zaštiti biljaka [43-45]. Ovakva jedinjenja mogu biti biološki aktivna zahvaljujući mogućnosti ispoljavanja farmakološkog ili toksikološkog delovanja na ljudima ili životinjama [46]. Najzastupljenija biološki aktivna jedinjenja nusproizvoda vinske industrije su fenolna jedinjenja. Fenolna jedinjenja predstavljaju jednu od najvećih grupa sekundarnih metabolita biljaka, koju čini više od 8000 hemijskih jedinjenja [47] i nastaju jednim od dva biosintetska puta, putem šikimske (fenilpropanoidnim) ili sirćetne kiseline [48, 49]. Hemijska struktura fenolnih jedinjenja može biti vrlo jednostavna, kao u slučaju fenolnih kiselina, ili kompleksna polimerna struktura, kao kod tanina [12]. Fenolne komponente se u biljkama uglavnom nalaze u vidu estara, metil estara ili glikozida, a mnogo ređe se nalaze u slobodnoj formi [50]. Polifenolna jedinjenja komine se karakterišu značajnom antioksidativnom aktivnošću, zahvaljujući kojoj mogu imati primenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji [18]. Pored bioloških uloga fenolnih jedinjenja, njihovo prisustvo u grožđu, vinu i nusproizvodima ima veliki uticaj na senzorna svojstva, kao što su boja, aroma, ukus, gorčina i oporost [12].

Generalno, fenolna jedinjenja se na osnovu hemijske strukture mogu podeliti na proste fenole (fenolne kiseline), koji u svojoj hemijskoj strukturi sadrže jedan aromatični prsten supstituisan jednom hidroksilnom grupom ili je za prsten vezano više hidroksilnih grupa, kao i polifenolna jedinjenja, koja u svojoj strukturi sadrže više od jednog aromatičnog prstena, za koje je vezan

određeni broj hidroksilnih funkcionalnih grupa. Takođe, postoji podela fenolnih jedinjenja na flavonoidna i neflavonoidna, od kojih se prva grupa karakteriše prisustvom strukture C₆-C₃-C₆ u svojoj građi [5, 51]. Na **Slici 2** shematski je prikazana podela fenolnih jedinjenja grožđa na osnovu hemijske strukture. Od polifenolnih jedinjenja, u grožđu i nusproizvodima vinske industrije prisutne su sledeće klase fenolnih jedinjenja: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, tanini i lignin.



Slika 2. Klasifikacija fenolnih jedinjenja grožđa

Fenolna jedinjenja, flavonoidna i neflavonoidna, sadržana su u svim morfološkim delovima plodova vinove loze. U semenkama grožđa su najzastupljeniji flavanoli, monomeri (+)-katehin, (-)-epikatehin, kao i dimeri i trimeri (procijanidini), a pored njih prisutni su flavonoli, hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline [17, 52-54]. Egzokarp grožđa je takođe vrlo bogat polifenolima, na prvom mestu antocijanima (brojnim derivatima antocijanidina malvidina, delfinidina, petunidina, peonidina i cijanidina, od kojih su najzastupljeniji glikozidi i acetil glikozidi), od kojih su u egzokarpu crnog grožđa dominantni 3-*o*-glikozidi malvidina, potom flavonolima, flavan-3-olima, hidroksibenzojevim kiselinama i stilbenima (resveratrol) [17, 41, 52]. Pulpa ima značajno niži sadržaj polifenola u poređenju sa semenkama i egzokarpom. U pulpi grožđa su najzastupljenije hidroksibenzojeve kiseline, a zabeležen je i veoma nizak sadržaj flavan-3-ola i flavonola [52]. U peteljčkama grožđa je najzastupljenija polifenolna komponenta katehin, a

drugo najzastupljenije jedinjenje *p*-kumarinska kiselina [54]. Sadržaj flavonoidnih i neflavonoidnih polifenolnih jedinjenja je u komini po pravilu niži nego u grožđu zahvaljujući ekstrahovanju određene količine jedinjenja u vino tokom procesa maceracije i alkoholne fermentacije. Takođe, zabeleženo je da se i kvalitativni fenolni profil komine može razlikovati od profila svežeg grožđa budući da se pojedina fenolna jedinjenja nalaze samo u proizvodima i nusproizvodima vinske industrije jer nastaju hemijskim reakcijama koje se odigravaju tokom fermentacije [17]. Često je sadržaj aglikona flavonola viši u komini grožđa, dok se u svežim plodovima dominantno nalaze flavonoli u obliku glikozida [17].

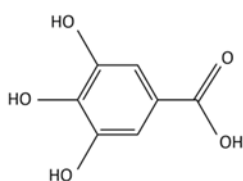
Prema literaturnim podacima, tip ekstrakcionog medijuma utiče na sadržaj polifenolnih komponenti u ekstraktima komine grožđa. U vodeno-metanolnim (80% metanol) i metanolnim ekstraktima komine, zatim u ekstraktima egzokarpa i semenki crnog grožđa identifikovano je ukupno 28 fenolnih komponenti, od toga 11 flavan-3-ola (derivati katehina i epikatehina), 6 flavonola (derivati kvercetina, laricitrina i siringetina), dva derivata hidroksibenzoeve kiseline, dva derivata hidroksicimetne kiseline i 7 antocijana (derivati malvidina, delphinidina, petunidina i peonidina) [41]. U vodeno-etanolnim (50% etanol) ekstraktima peteljki, semenki i egzokarpa dve različite porugalske sorte crnog grožđa utvrđeno je prisustvo 24 polifenolne komponente [54]. Takođe, sadržaj fenolnih jedinjenja određen je u vodenom i etanolnom ekstraktu komine crnog grožđa sorte *Barbera*. U etanolnim ekstraktima komine crnog grožđa dominantno su prisutni antocijani, dok su u vodenim ekstraktima u najvećoj meri bile zastupljene fenolne kiseline [55]. Sa druge strane, u vodenom ekstraktu komine crnog grožđa italijanske sorte *Montepulciano* najzastupljenije fenolno jedinjenje bio je kvercetin, a potom epikatehin, galna i kaftarna kiselina, dok je sadržaj ostalih fenolnih komponenti bio značajno niži [56].

2.5.1 Fenolne kiseline

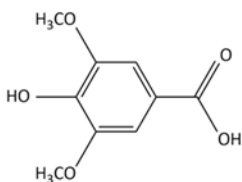
Fenolne kiseline predstavljaju neflavonoidna jedinjenja sa jednim benzenovim prstenom, koja u svojoj strukturi sadrže jednu karboksilnu grupu [50]. One se u biljkama mogu nalaziti u slobodnoj formi ili u konjugovanom obliku, vezane najčešće za neku šećernu komponentu, ili u formi estara hine, šikimske ili tartarne kiseline [12]. Grupa fenolnih kiselina obuhvata dve podgrupe, derivate hidroksibenzoeve kiseline i derivate hidroksicimetne kiseline. Svi derivati hidroksibenzoeve kiseline imaju zajedničku C₆-C₁ strukturu, dok je zajednička struktura hidroksicimetne kiseline i

njenih derivata C₆-C₃ (**Slika 3**) [57]. Predstavnicu fenolnih kiselina se međusobno razlikuju po broju i položaju hidroksilnih i metoksi grupa na benzenovom prstenu [50]. U ekstraktima komine grožđa su identifikovani i derivati hidroksibenzojeve kiseline (vanilinska kiselina, protokatehinska kiselina, galna kiselina, siringinska kiselina i dr.), kao i derivati hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska kiselina, hlorogenska kiselina, neohlorogenska kiselina, ferulna kiselina i dr.) [41, 54]. Galna kiselina je najzastupljeniji predstavnik ove grupe jedinjenja u vodenim i etanolnim ekstraktima komine crnog grožđa [55, 56].

Derivati hidroksibenzojeve kiseline

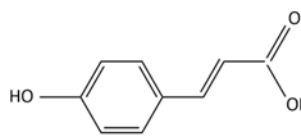


galna kiselina

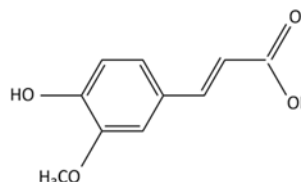


siringinska kiselina

Derivati hidroksicimetne kiseline



***p*-kumarinska kiselina**

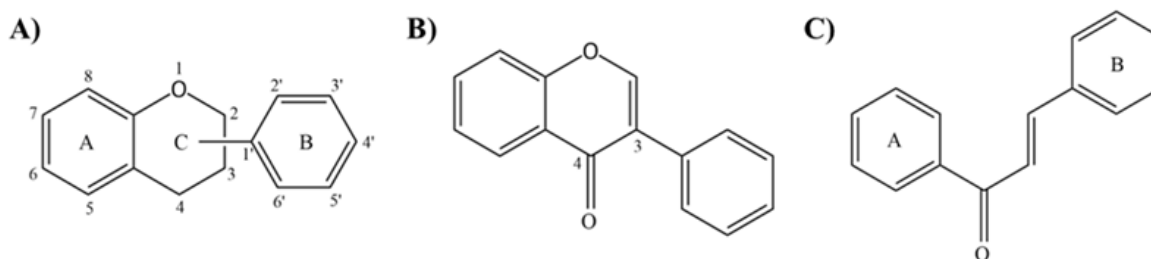


ferulna kiselina

Slika 3. Hemijske strukture predstavnika derivata hidroksibenzojeve kiseline (C₆-C₁) i derivata hidroksicimetne kiseline (C₆-C₃)

2.5.2 Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću i najviše proučavanu grupu polifenola biljaka. Zajedničku hemijsku strukturu svih flavonoida predstavlja flavan (2-fenil-benzo- γ -piran), koja se može predstaviti kao C₆-C₃-C₆ (**Slika 4A**). U strukturi flavonoida dve C₆ jedinice predstavljaju benzenove prstenove (prsten A i prsten B), koji su povezani heterocikličnim prstenom koji sadrži kiseonik - piranom (prsten C) [57]. Na osnovu razlika u stepenu oksidacije, odnosno u zavisnosti od tipa heterocikličnog prstena C, flavonoidi se mogu podeliti na 7 klasa: flavonoli, flavoni, izoflavoni, antocijanidini, flavanoni, flavanoli i halkoni [45, 58].

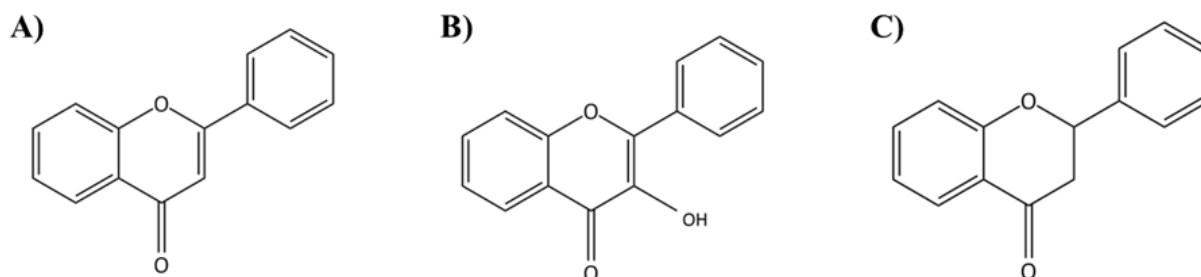


Slika 4. Opšte strukture: A) flavonoida, B) izoflavona i C) halkona

U hemijskoj strukturi većine klasa flavonoida prsten B je vezan za prsten C na poziciji C-2, dok je u slučaju izoflavona prsten B povezan sa C-3 atomom prstena C (**Slika 4B**). Iako ne poseduju heterociklični prsten C u svojoj strukturi, halkoni se takođe smatraju flavonoidima (**Slika 4C**) [57]. Osnovnu strukturu flavonoida čine aglikoni, ali se ova jedinjenja u biljkama najčešće nalaze u vidu glikozida [57].

2.5.2.1 Flavoni, flavonoli i flavanoni

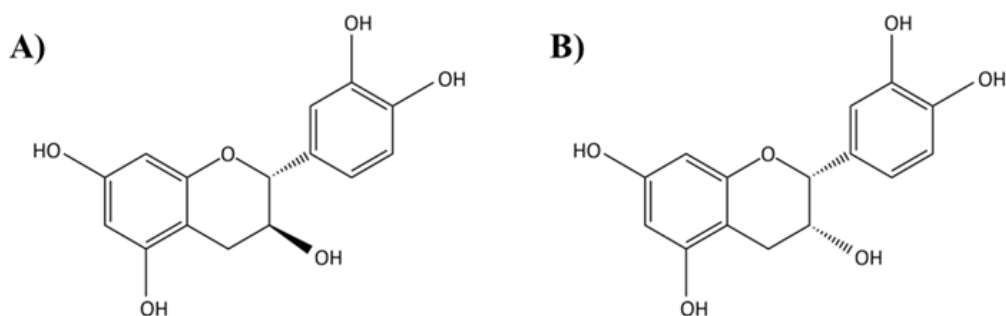
Klasu flavona čine flavonoidna jedinjenja koja poseduju keto grupu na poziciji C-4 prstena C (**Slika 5A**), od kojih su u prirodi najzastupljeniji apigenin i luteolin, koji se u niskim koncentracijama mogu naći i u grožđu i komini grožđa [41, 45, 52, 57]. Klasa flavonola je široko rasprostranjena u biljkama i obuhvata 3-hidroksiderivate flavona, tj. ova jedinjenja se karakterišu postojanjem keto grupe na poziciji C-4 i hidroksilne grupe na poziciji C-3 heterocikličnog prstena (**Slika 5B**). U grožđu i komini grožđa su identifikovani flavonoli kempferol, kvercetin, rutin, miricetin, laricitrin, siringetin, sa kvercetinom i rutinom kao najzastupljenijim predstavnicima [17, 41, 52, 54, 56, 57]. Flavanoni su u grožđu i nusproizvodima vinske industrije prisutni u značajno nižim koncentracijama u poređenju sa ostalim flavonoidima, a zabeleženo je prisustvo naringenina i hesperetina [52]. Klasu flavanona karakteriše odsustvo dvostruke veze između C-2 i C-3 (**Slika 5C**).



Slika 5. Opšte strukture: A) flavona, B) flavonola, A) flavanona

2.5.2.2 Flavanoli

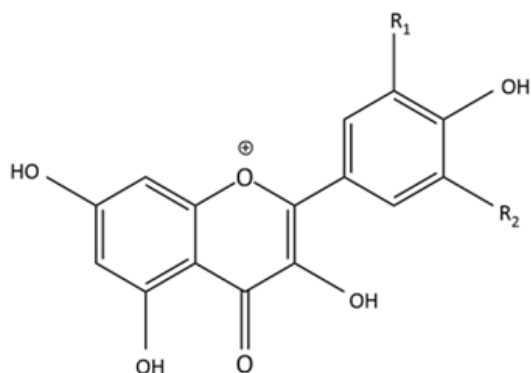
Flavanoli se u literaturi mogu pronaći i pod nazivima flavan-3-oli ili katehini. Ova klasa flavonoida uključuje monomerne, oligomerne i polimerne forme (od kojih su posljednje dve grupe poznate kao procijanidini ili kondenzovani tanini). Hemijska struktura flavanola se razlikuje od većine klasa flavonoida budući da na prstenu C između C-2 i C-3 postoji jednostruka veza umesto dvostruke, a da za C-4 atom nije vezana karbonilna grupa. Zahvaljujući prethodno navedenim strukturnim karakteristikama i postojanju hidroksilne grupe na poziciji C-3, flavanoli imaju dva hiralna centra (na pozicijama C-2 i C-3) i posledično četiri moguća stereoizomera. Katehin i epikatehin predstavljaju *trans* i *cis* izomere, a svaka od dve konfiguracije ima po dva stereoizomera [57]. U biljkama koje se koriste u prehrambene svrhe, kao i u grožđu, najzastupljeniji su (+)-katehin i (-)-epikatehin (**Slika 6**) [17, 52, 57]. Kao što je naglašeno, flavan-3-oli čine najzastupljenija fenolna jedinjenja semenki i komine grožđa [41].



Slika 6. Hemijske strukture: A) (+)-katehina i B) (-)-epikatehina

2.5.2.3 Antocijanidini

Antocijanidini predstavljaju jednu od najviše proučavanih klasa flavonoida. Ova jedinjenja daju boju crnom grožđu budući da se nalaze u egzokarpu plodova [52]. Antocijanidini predstavljaju derivate 2-fenilbenzopirilijum ili flavilijum soli, koji se međusobno razlikuju po stepenu supstitucije prstena B hidroksilnim i metoksi grupama (**Slika 7**) [59]. Karakteristika antocijanidina je da podležu reverzibilnim strukturnim promenama u zavisnosti od pH vrednosti sredine, što posledično uslovljava i promenu boje pigmenta [60]. Antocijanidini predstavljaju aglikone, dok su u biljkama dominantno prisutni u formi glikozida - antocijana. Supstitucija antocijanidina šećernim komponentama se odvija ili samo na poziciji C-3 u slučaju 3-*o*-monoglikozida ili na pozicijama C-3 i C-5 u slučaju 3,5-*o*-diglikozida [59]. Antocijani se nalaze samo u egzokarpu grožđa i odgovorni su za crvenu boju plodova kod crnih sorti [17]. U ekstraktima egzokarpa crnog grožđa zabeleženo je prisustvo 20 derivata malvidina, delfinidina, petunidina, cijanidina i peonidina, gde su dominantne derivate činili 3-*o*-monoglikozidi. Iako za plodove vinove loze nije karakteristično prisustvo 3,5-*o*-diglikozida antocijanidina, ovi derivati se u egzokarpu grožđa mogu naći u tragovima [52]. Malvidin-3-*o*-glukozid je najzastupljenije polifenolno jedinjenje egzokarpa crnog grožđa [54].



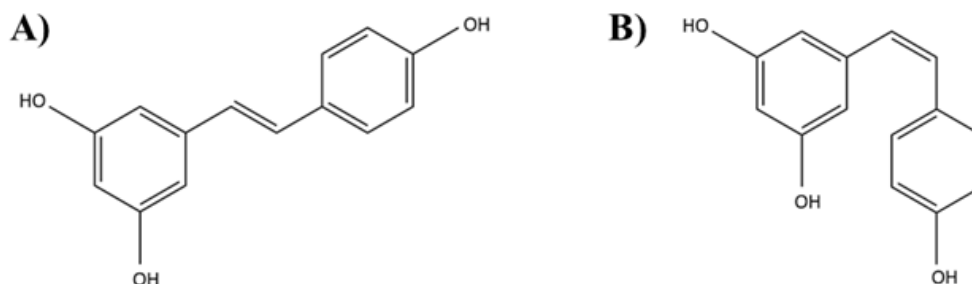
Antocijanidin	R ₁	R ₂
Cijanidin	-OH	-H
Delfinidin	-OH	-OH
Malvidin	-OCH ₃	-OCH ₃
Peonidin	-OCH ₃	-H
Petunidin	-OH	-OCH ₃

Slika 7. Hemijske strukture antocijanidina

2.5.3 Stilbeni

Stilbeni predstavljaju klasu neflavonoidnih polifenola, čija se hemijska struktura sastoji od dva aromatična prstena povezana etilenskim mostom. Stilbeni pripadaju grupi fitoaleksina, koji se u grožđu sintetisu kao odgovor na infekciju ili povredu tkiva [61]. Najznačajniji predstavnik ove

klase fenolnih jedinjenja je resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), koji postoji u obliku *cis* i *trans* izomera (**Slika 8**) [62]. Prirodno se resveratrol u grožđu nalazi u obliku *trans* izomera [63]. Ovi sekundarni metaboliti se u biljkama akumuliraju u slobodnoj formi i u formi glikozida (*cis*- i *trans*-piceid) [63]. Nalaze se samo u egzokarpu grožđa, kao i u vinu i komini grožđa, u nešto nižim koncentracijama u poređenju sa ostalim fenolnim jedinjenjima [17]. Za razliku od etanolnog ekstrakta komine crnog grožđa, resveratrol se u vodenim ekstraktima ne detektuje [55].



Slika 8. Hemijske strukture: A) *trans*-resveratrola i B) *cis*-resveratrola

2.6. Biološki efekti fenolnih jedinjenja komine grožđa

Na osnovu rezultata globalnog projekta Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) francuski istraživači su 1992. godine zapazili da je stepen smrtnosti od koronarnih bolesti u Francuskoj mnogo niži nego u drugim razvijenim zemljama, kao što su Sjedinjene Američke Države i Ujedinjeno Kraljevstvo. Istovremeno su u sve tri navedene države stepen unosa zasićenih masti i koncentracija holesterola u serumu bili na sličnom nivou, a ni drugi faktori rizika za razvoj koronarnih bolesti (npr. indeks telesne mase, arterijski krvni pritisak, upotreba cigareta) nisu se razlikovali. Ova pojava je nazvana „Francuski paradoks”, a objašnjena je drugačijim navikama u ishrani stanovništva Francuske i drugih razvijenih zemalja. Naime, ishrana stanovnika Francuske se zasniva na unosu velikih količina povrća, voća, sira, maslinovog ulja i umerenoj konzumaciji vina, što čini osnovu tzv. mediteranskog tipa ishrane [64]. Brojni antioksidansi (na prvom mestu fenolna jedinjenja) prisutni u vinu su povezani sa prethodno uočenim rezultatima istraživanja [65].

Biološki potencijal fenolnih jedinjenja grožđa, vina i nusproizvoda vinske industrije je u prethodnim decenijama detaljno proučavan, a najznačajnija delovanja uključuju antioksidativno,

antiinflamatorno, kardioprotektivno i antikancerogeno [66, 67]. Poznato je da su dugotrajni upalni procesi i oksidativni stres u ljudskom organizmu povezani sa pojavom brojnih hroničnih stanja, uključujući dijabetes melitus tip II, metabolički sindrom, kardiovaskularne bolesti, karcinome, reumatoidni artritis, zapaljenske bolesti creva, astmu, opstruktivne bolesti pluća, kao i neurodegenerativne bolesti [68]. Rezultati brojnih *in vitro*, *in vivo*, epidemioloških i kliničkih studija ukazuju da fenolna jedinjenja biljnog porekla ispoljavaju antiinflamatornu i antioksidativnu aktivnost, što predstavlja jedan od mehanizama delovanja na hronične bolesti [69-77]. Pored toga, ova jedinjenja deluju inhibitorno na brojne enzime, te je primećeno da inhibiraju aktivnosti enzima kolagenaze i elastaze i ispoljavaju citoprotektivni efekat ukoliko se primene topikalno, što doprinosi preventivnom delovanju na oštećenja kože koja mogu nastati usled oksidativnog stresa [78, 79]. U nastavku, izdvojeni su mehanizmi nekih od najvažnijih delovanja fenolnih jedinjenja.

2.6.1 Mehanizmi antiinflamatornog i antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja

Regulaciju upalnih procesa u organizmu fenolna jedinjenja vrše preko različitih mehanizama. Citokini predstavljaju glavne medijatore koji učestvuju u lokalnoj intercelularnoj komunikaciji i posreduju u imuskom i zapaljenskom odgovoru tkiva na brojne stimulse. Smatra se da postojanje odnosno narušavanje ravnoteže između proinflamatornih i antiinflamatornih citokina određuje tok bolesti uzrokovanih inflamacijom [80]. Zabeleženo je da pojedina flavonoidna jedinjenja imaju sposobnost da utiču na smanjenje ekspresije proinflamatornih citokina kao što su TNF- α (eng. *tumor necrosis factor α*), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, MCP-1 (eng. *monocyte chemoattractant protein-1*) u monocitima i makrofagima [70, 74, 81-84], a takođe je i ekstrakt komine grožđa smanjio ekspresiju TNF- α , TLR-4 (eng. *Toll like receptor-4*), IL-1 β i Iba-1 (eng. *ionized calcium binding adaptor molecule-1*) u N13 ćelijskoj kulturi mikroglija, nakon izlaganja lipopolisaharidu (eng. *lipopolysaccharide*, LPS) [85]. Jedan od najznačajnijih mehanizama sprečavanja zapaljenskog odgovora predstavlja inhibicija enzima koji učestvuju u sintezi eikosanoida: fosfolipaze A₂, ciklooksigenaze (COX) i lipooksigenaze (LOX) [80]. Fenolna jedinjenja biljaka, uključujući fenolna jedinjenja grožđa, ispoljavaju sposobnost regulacije aktivnosti enzima ciklooksigenaze-2 (COX-2), kao i ekspresije ovog enzima u ćelijama različitih tkiva [70, 72, 74, 86]. Smanjenje inflamatornog odgovora tkiva kroz supresiju gena i inhibiciju ekspresije COX-2, ali i TNF- α , IL-6 i IL-1 β može da se dešava preko inhibicije aktivacije MAPK

(eng. *mitogen activated protein kinase*) i NF- κ B (eng. *nuclear factor kappa B*) signalnih puteva [70, 87]. U stanju akutne inflamacije oslobađaju se medijatori kao što su citokini, prostaglandini i reaktivne kiseonične vrste (eng. *reactive oxigen species*, ROS). Fiziološka produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao što su vodonik-peroksid (H_2O_2), hidroksil radikal (OH^\bullet), superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), singlet kiseonik (1O_2), kao i reaktivnih azotnih vrsta (eng. *reactive nitrogen species*, RNS), imaju zaštitnu ulogu, dok sa druge strane dugotrajni imuni odgovor i sinteza reaktivnih kiseoničnih vrsta može dovesti do gubitka balansa između stvaranja i uklanjanja reaktivnih kiseoničnih vrsta, tj. do oksidativnog stresa i posledično do ireverzibilnog oštećenja tkiva [88]. Fenolna jedinjenja biljaka imaju sposobnost da podržavaju prirodni odbrambeni mehanizam pojačavajući aktivnost enzima katalaze (eng. *catalase*, CAT), superoksid dismutaze (eng. *superoxide dismutase*, SOD), glutation peroksidaze (eng. *gluthatione peroxidase*, GPx) i glutation reduktaze (eng. *gluthatione reductase*, GR) [89, 90]. Budući da je ekspresija navedenih antioksidativnih enzima pod kontrolom transkripcionog faktora Nrf2 (eng. *nuclear factor erythroid-related factor 2*) i da fenolna jedinjenja imaju sposobnost da indukuju aktivaciju ovog faktora, ova jedinjenja na taj način aktiviraju endogeni antioksidativni odbrambeni sistem [90-93]. Polifenolna jedinjenja imaju sposobnost direktne neutralizacije slobodnih radikala i stvaranjem helatnih kompleksa sa prooksidativnim jonima metala [94]. Neutralizacija slobodnih radikala se dešava prelaskom elektrona i/ili atoma vodonika sa molekula fenolnog jedinjenja [90]. Polifenolna jedinjenja zahvaljujući posedovanju hidroksilnih grupa u svojoj strukturi imaju sposobnost heliranja metalnih jona (npr. joni Cu ili Fe), koji katalizuju reakcije stvaranja slobodnih radikala. Kao posledica stvaranja helatnih kompleksa smanjuje se stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (npr. $O_2^{\bullet-}$) [94]. Jedan od ćelijskih medijatora koji posreduje i u fiziološkim i u patološkim procesima predstavlja azot-monoksid (NO), koji se sintetise iz L-arginina. Ulogu katalizatora u reakciji stvaranja NO ima porodica enzima azot-monoksid-sintaze (eng. *nitric oxide synthase*, NOS), koju čine endotelna (eng. *endothelial NOS*, eNOS), neuronalna (eng. *neuronal NOS*, nNOS) i inducibilna (eng. *inducible NOS*, iNOS) izoforma. Ekspresija iNOS izoforme enzima može biti stimulisana u prisustvu inflamatornih stimulusa, a iNOS svojim delovanjem dovodi do produkcije velike količine NO [80]. Polifenolna jedinjenja imaju sposobnost inhibicije enzima inducibilne azot-monoksid-sintaze i smanjenja sinteze NO. Ekstrakt semenki groža smanjuje ekspresiju iNOS u ćelijskoj liniji RAW 264.7 makrofaga, a malvidin-3-*o*-glukozid, najzastupljeniji predstavnik antocijana u egzokarpu grožđa, inhibiše nastanak NO pod dejstvom iNOS u ćelijskoj kulturi

humanih makrofaga (eng. *monocyte-derived macrophages*, MDM) [84, 95]. Isti efekat uočen je i kada je ekstrakt komine grožđa primenjen na ćelijsku liniju mikroglia nakon izlaganja LPS-u [85]. Polifenolna jedinjenja inhibiraju oslobađanje NO ili supresijom ekspresije iNOS enzima ili smanjenjem njihove aktivnosti [80].

2.6.2 Kardioprotektivno delovanje fenolnih jedinjenja grožđa

Antioksidativno delovanje fenolnih jedinjenja, kao i njihova mogućnost da utiču na aktivnost brojnih enzima i da učestvuju u ćelijskim signalnim putevima predstavljaju osnovu brojnih korisnih efekata fenolnih jedinjenja na zdravlje ljudi [96, 97]. Epidemiološkim studijama je pokazana povezanost između ishrane bogate polifenolima i smanjenja rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, kao i metaboličkih poremećaja [97]. Potvrđena dejstva polifenola, kao što su vazodilatatorno, antitrombotično, antiinflamatorno, antiapoptotsko, antihipertenzivno hipolipidemijsko i antiaterogeno, doprinose smanjenju rizika od nastanka kardiovaskularnih bolesti [96, 98, 99]. Kod pacova sa razvijenom hipertenzijom je nakon tretmana liofiliziranim praškom dobijenim mlevenjem celih plodova grožđa uočeno značajno smanjenje krvnog pritiska, unapređena vaskularna funkcija i smanjenje hipertrofije leve komore [100]. Takođe, pojedinačna fenolna jedinjenja, kao što je resveratrol pokazala su vazodilatatorno dejstvo *in vivo* kod pacova sa razvijenom hipertenzijom, koje je povezano sa antioksidativnom sposobnošću i uticajem na signalne puteve [101]. Pokazano je da polifenolima bogat ekstrakt crnog grožđa dovodi do popravljavanja endotelne funkcije kod pacijenata sa razvijenom koronarnom bolešću [102]. Kliničkim studijama je potvrđeno antihipertenzivno i vazodilatatorno delovanje praha grožđa bogatog polifenolima kod pacijenata koji boluju od metaboličkog sindroma i hipertenzije [103, 104]. Takođe, pokazano je da ekstrakti semenki grožđa ispoljavaju antihipertenzivno dejstvo [105, 106]. Dodatno, utvrđeno je da ekstrakt grožđa bogat polifenolima, kao i prah grožđa kod zdravih ispitanika i u populaciji žena u pre- i postmenopauzi ispoljavaju hipolipidemijski efekat [77, 107].

2.6.3 Antikancerogeno delovanje fenolnih jedinjenja grožđa

Pokazano je da mnoga biološki aktivna jedinjenja biljaka ometaju razvoj karcinoma delujući preko različitih mehanizama – inhibicijom ključnih enzima i signalnih puteva, aktivacijom sistema reparacije oštećenja dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i regulatora apoptoze, indukovanjem endogenog antioksidativnog sistema [108]. Polifenolima bogati ekstrakti grožđa kao i pojedinačna

fenolna jedinjenja (flavonoidi, stilbeni itd.) ispoljili su antikancerogeno delovanje u brojnim ispitivanjima. *In vitro* i *in vivo* istraživanjima pokazano je hemopreventivno delovanje ekstrakata semenki grožđa, kao i resveratrola pri izlaganju ćelijskih linija i životinjskih modela UVB zračenju [109-112]. Pored toga, *in vivo* je pokazano i hemopreventivno delovanje peroralno primenjenog praha grožđa [113]. Antikancerogeno delovanje ekstrakata semenki grožđa, kao i kvercetina i resveratrola je pokazano *in vitro* i *in vivo* na životinjskim modelima karcinoma kože pri topikalnoj primeni [114-116]. Fenolna jedinjenja grožđa (npr. procijanidini, fenolne kiseline, polifenoli egzokarpa, resveratrol) ispoljila su *in vitro* i *in vivo* antikancerogeno delovanje i na druge tipove karcinoma, kao što je karcinom kolona [117], karcinom pankreasa [118] i karcinom dojke [119].

2.7. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz komine grožđa

Među brojnim tehnikama koje su do sada primenjivane za izolovanje jedinjenja od interesa iz različitih nusproizvoda industrije hrane (npr. ekstrakcija polifenola iz nusproizvoda vinske industrije) može se uočiti pet karakterističnih faza, od kojih su neke u pojedinim slučajevima izostavljene ili se preklapaju [120]:

- makroskopska priprema sirovine (mehaničko presovanje, sušenje zamrzavanjem, centrifugiranje, mikrofiltracija, mlevenje itd.),
- makro- i mikromolekularna separacija (alkoholna precipitacija, ultrafiltracija itd.),
- ekstrakcija (organskim rastvaračima, ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima ili ultrazvukom, superkritična ekstrakcija, itd.),
- izolovanje i prečišćavanje (adsorpcija, hromatografski postupci, nanofiltracija, raspodela između dve faze itd.),
- formiranje finalnog proizvoda (sušenje raspršivanjem, sušenje zamrzavanjem, izrada emulzija itd.).

Ekstrakcija predstavlja najznačajniji korak u postupku izolovanja jedinjenja od interesa i u zavisnosti od fizičko-hemijskih karakteristika jedinjenja u upotrebi su različite tehnike [16, 120]. Ekstrakciji prethode postupci pripreme uzorka koji imaju za cilj smanjenje čestica uzorka i posledično povećanje aktivne površine, što utiče na kinetiku ekstrakcionog postupka i prinos ekstrakcije [121, 122]. Na polifenolni sastav ekstrakata komine grožđa i efikasnost ekstrakcije ovih jedinjenja, pored prirode polifenolnih jedinjenja komine utiče i njihova distribucija unutar sirovine

[16]. Naime, komina grožđa sadrži značajnu količinu polifenolnih jedinjenja, koji su najvećim delom sadržani u egzokarpu [16] i čine ih polifenolna jedinjenja ćelijskih zidova (polifenolna jedinjenja vezana hidrofobnim i vodoničnim vezama za polisaharide) i polifenolna jedinjenja sadržana u citoplazmi ćelija, u vakuolama, unutar jezgra ili u njegovoj blizini [123]. Tehnike za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz komine grožđa najčešće se zasnivaju na čvrsto-tečnoj ekstrakciji uz primenu konvencionalnih organskih rastvarača kao što metanol, etanol, aceton, dietiletar i etil-acetat, koji se često mešaju sa vodom u različitim odnosima u cilju unapređenja efikasnosti ekstrakcionog postupka [26, 124-126]. Konvencionalnim tehnikama čvrsto-tečne ekstrakcije postiže se izolovanje polifenolnih jedinjenja sadržanih u citoplazmi ćelija ili onih jedinjenja koja su slabijim vezama vezana za komponente ćelijskih zidova [16, 123, 127]. Ovakve tehnike imaju i neke nedostatke, kao što su upotreba organskih rastvarača, neophodnost dodatnog prečišćavanja ekstrakata i otparavanja rastvarača, kao i dugo trajanje ekstrakcionog postupka [11, 12, 125]. Kako bi se povećala efikasnost ekstrakcije, odnosno postiglo izolovanje polifenolnih jedinjenja vezanih jačim interakcijama za strukture ćelijskih zidova [16] i kako bi se eliminisali nedostaci konvencionalnih tehnika, optimizacija postojećih i primena novih tehnika postali su predmet velikog interesovanja. Savremene tehnike ekstrakcije polifenolnih jedinjenja (npr. ekstrakcija ultrazvučnim talasima ili mikrotalasnim zračenjem, ekstrakcija superkritičnim fluidima itd.) relativno su jednostavne za izvođenje, kraće traju i podrazumevaju upotrebu manjih zapremina organskih rastvarača [11, 12, 33, 34].

2.7.1 Konvencionalne tehnike ekstrakcije polifenola

Konvencionalna tehnika ekstrakcije polifenola iz komine grožđa, koja je u velikoj meri zastupljena u postupku valorizacije nusproizvoda vinske industrije, je klasična čvrsto-tečna ekstrakcija (eng. *solid-liquid extraction*, SLE) [34, 121]. U cilju nalaženja ekološki i ekonomski prihvatljivih tehnika ekstrakcije polifenola, kojima bi se postizao što veći prinos ekstrakcije polifenola iz nusproizvoda vinske industrije, izvršena je optimizacija postojećih tehnika. Iz tog razloga je do sada detaljno istražen uticaj različitih faktora, kao što su tip rastvarača, pH vrednost, odnos zapremina rastvarača i mase uzorka, temperatura i dužina trajanja ekstrakcionog postupka na efikasnost klasične čvrsto-tečne ekstrakcije [12, 66, 121, 124, 128].

Klasična čvrsto-tečna ekstrakcija može da se izvodi ili na sobnoj ili na povišenoj temperaturi, a sastoji se u potapanju usitnjenog materijala uzorka (npr. komine grožđa) u pogodan rastvarač [121, 129]. Čvrsto-tečna ekstrakcija se zasniva na mogućnosti odgovarajućeg rastvarača da ekstrahuje polifenolna jedinjenja iz matriksa [10]. Do sada je ispitana mogućnost primene različitih organskih rastvarača (etanol, metanol, aceton, etil acetat itd.) kao i njihovih smeša sa vodom u različitim razmerama [45, 126, 128, 130, 131]. Pojedini organski rastvarači se smatraju pogodnijim za ekstrakciju ukoliko se ekstrakti dalje koriste u proizvodnji hrane ili dijetetskih suplemenata, kao što je slučaj sa etanolom, koji prema Američkoj agenciji za hranu i lekove (*U.S. Food and Drug Administration*, FDA) ima status bezbednog rastvarača (eng. *generally recognized as safe*, GRAS) [132]. Takođe, ispitan je uticaj podešavanja pH vrednosti rastvarača dodatkom odgovarajuće zapremine hlorovodonične kiseline [128]. Ekstrakcioni postupak se izvodi pri atmosferskom pritisku u otvorenim sistemima ili u zatvorenim sistemima pri kontrolisanim uslovima (npr. ekstrakcija po Soksletu) [121]. Najčešći vidovi izvođenja klasične čvrsto-tečne ekstrakcije polifenola iz različitih matriksa su jednostavna ekstrakcija (maceracija, infuz i dr.), uz potencijalnu primenu mehaničkog mešanja, kao i višestruka kontinualna ekstrakcija primenom aparature po Soksletu [10, 45, 121, 129]. Nakon odgovarajućeg vremenskog perioda, ekstrakt se odvaja od nerastvornih materija uzorka dekantovanjem, centrifugiranjem i/ili filtriranjem [121, 129].

Generalno se čvrsto-tečna ekstrakcija zasniva na transferu mase, odnosno na migraciji analita iz uzorka u rastvarač, sa kojim je uzorak u direktnom kontaktu [128]. Migracija analita iz uzorka u ekstrakciono sredstvo, odnosno rastvarač, može biti pospešena promenama koncentracionog gradijenta u ekstrakcionom sistemu i koeficijentata difuzije, što se može postići modifikovanjem metode ekstrakcije, odabirom rastvarača, promenom odnosa zapremine rastvarača i mase uzorka, promenom temperature, kao i dužinom trajanja ekstrakcionog postupka [128]. Pretpostavlja se da navedeni faktori u najvećoj meri menjaju efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja koja su slabijim vezama vezana za polisaharide ćelijskih zidova i onih sadržanih u citoplazmi ćelija grožđa [123]. Sa druge strane, jedan deo polifenolnih jedinjenja zaostaje u matriksu, vezan za proteine i polisaharide ćelijskih zidova i nakon procesa ekstrakcije [5]. Tip primenjenog rastvarača za ekstrakciju predstavlja jedan od najznačajnijih faktora koji utiču na efikasnost ekstrakcionog postupka [128]. Naime, efikasnost ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz različitih uzoraka biljnog porekla određena je sposobnošću rastvarača da vrše solvataciju pojedinačnih fenolnih jedinjenja, kao i relativnom rastvorljivošću fenolnih jedinjenja [121]. Sposobnost građenja vodoničnih veza

između molekula polifenola i rastvarača predstavlja ključni uslov za postizanje oslobađanja polifenola iz matriksa [121]. Pored toga, većim stepenom difuzije rastvarača u matriks omogućava se lakše raskidanje vodoničnih veza između polifenola i struktura biljnog materijala i veći stepen solvatacije polifenola molekulima rastvarača [45]. Iako hidrofilno-lipofilni karakter pojedinačnog polifenolnog jedinjenja zavisi od broja fenolnih grupa i stepena konjugacije unutar molekula, fenolna jedinjenja se smatraju generalno polarnim (odnosno ispoljavaju više hidrofilni nego lipofilni karakter), te se primenom polarnijih protičnih rastvarača obezbeđuje visoka efikasnost ekstrakcije [128]. Prema tome, alifatični alkoholi (npr. metanol i etanol) i polarni organski rastvarači (npr. aceton i etil acetat) predstavljaju rastvarače izbora za ekstrakciju polifenola iz materijala biljnog porekla [57, 121]. Takođe, prema literaturnim podacima, primenom smeša organskih rastvarača i vode postižu se viši prinosi ekstrakcije polifenola iz komine grožđa u poređenju sa čistim organskim rastvaračima. Ovaj efekat se pripisuje povećanju permeabilnosti ćelijskih zidova u prisustvu vode, kao i slabljenju vodoničnih veza između polifenolnih jedinjenja i ćelijskih struktura u prisustvu molekula vode i posledično većoj rastvorljivosti polifenola u ovakvim smešama [16, 126, 128].

Na efikasnost ekstrakcije polifenola konvencionalnim tehnikama utiču i temperatura, kiselost ekstrakcionog medijuma, kao i vreme trajanja ekstrakcionog procesa [121]. Na povišenim temperaturama se povećava rastvorljivost polifenola i postiže veći stepen difuzije i transfer mase analita zahvaljujući smanjenju viskoziteta i površinskog napona rastvarača [123, 133]. Ekstrakcija polifenola se najčešće izvodi pri nižim pH vrednostima budući da se u takvoj sredini slabo kisela polifenolna jedinjenja nalaze u molekulskom obliku i u većoj meri se ekstrahuju iz uzorka. Pored toga, produženo vreme trajanja ekstrakcionog postupka i veća masa uzorka u odnosu na zapreminu rastvarača utiču na postizanje većih prinosa ekstrakcije [123].

2.7.1.1 Prednosti konvencionalnih tehnika ekstrakcije

Klasične ekstrakcione tehnike najčešće podrazumevaju jednostavno izvođenje, blage uslove kao što je atmosferski pritisak i mogućnost izvođenja na sobnoj ili umereno povišenoj temperaturi [121]. Mogućnost primene niza različitih rastvarača, kao i mogućnost izvođenja na svežim čvrstim, polučvrstim, zamrznutim ili osušenim uzorcima obezbeđuje veliku primenljivost ovakvih tehnika [121]. Pored toga, prihvatljiva efikasnost ekstrakcije i ekonomska isplativost ovakvih postupaka doprinose visokoj zastupljenosti klasičnih čvrsto-tečnih tehnika ekstrakcije u postupcima

izdvajanja polifenola iz različitog biljnog materijala [121]. Prednosti jednostavnog postupka višestruke kontinualne ekstrakcije primenom aparature po Soksletu su postizanje visokih prinosa u relativno kratkom vremenskom periodu, kao i upotreba manjih zapremina rastvarača nego u slučaju drugih klasičnih tehnika [121].

2.7.1.2 Nedostaci konvencionalnih tehnika ekstrakcije

Najznačajnije nedostatke klasičnih čvrsto-tečnih tehnika ekstrakcije predstavljaju česta upotreba relativno velikih zapremina rastvarača visokog stepena čistoće, upotreba organskih rastvarača sa štetnim uticajem na zdravlje ljudi i životnu sredinu i zahtevi za otparavanjem rastvarača i koncentrovanjem ekstrakata, što komplikuje i produžava trajanje celokupnog procesa i povećava utrošak energije [12, 29, 121, 125]. Veliki broj metoda ekstrakcije polifenola iz komine grožđa uključuje upotrebu efikasnih organskih rastvarača, kao što je metanol, koji nisu prepoznati kao bezbedni od strane Američke agencije za hranu i lekove, odnosno rastvaračima koji nisu pogodni za upotrebu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji [121]. Iako se u postupku ekstrakcije po Soksletu upotrebljavaju manje zapremine rastvarača nego u drugim klasičnim tehnikama ekstrakcije, upotreba rastvarača je veća nego u savremenim tehnikama [121]. Takođe, primena povišenih temperatura, bliskih tačkama ključanja rastvarača, u ekstrakciji po Soksletu može dovesti do oksidacije polifenola i smanjiti koncentraciju polifenola u finalnim ekstraktima [121, 123, 133].

2.7.2 Savremene tehnike ekstrakcije polifenola

U cilju prevazilaženja nedostataka klasičnih tehnika ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala, razvijene su nove, tzv. nekonvencionalne, odnosno savremene tehnike. Savremene tehnike ekstrakcije obuhvataju ultrazvučnu ekstrakciju (klasična ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, eng. *ultrasound-assisted extraction*, UAE), mikrotalasnu ekstrakciju (ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima, eng. *microwave-assisted extraction*, MAE), superkritičnu ekstrakciju (ekstrakcija fluidima u superkritičnom stanju, eng. *supercritical fluid extraction*, SFE), ekstrakciju tečnim rastvaračima pod pritiskom (eng. *pressurized liquid extraction*, PLE), ekstrakciju vodom u subkritičnom stanju (eng. *subcritical water extraction*, SWE), ekstrakciju potpomognutu enzimima (eng. *enzyme-assisted extraction*, EAE), ekstrakciju potpomognutu pulsним električnim poljem (eng. *pulsed electric field*, PEF), ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem

(eng. *high voltage electrical discharges*, HVED) i kombinovane tehnike. Savremene tehnike ekstrakcije se zasnivaju na principima „zelene” hemije, odnosno podrazumevaju značajno manju potrošnju štetnih organskih rastvarača u poređenju sa klasičnim tehnikama, te se smatraju prihvatljivim za životnu sredinu [12, 29, 125, 134]. Pored toga, primenom savremenih tehnika smanjuje se vreme ekstrakcionog postupka [5]. Uzimajući u obzir navedene prednosti savremenih tehnika ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz biljnog materijala, njihova primena doprinosi povećanju održivosti procesa valorizacije nusproizvoda vinske industrije [5].

UAE i MAE su tehnike koje se veoma često koriste za izolovanje polifenola iz komine grožđa. Ultrazvučna ekstrakcija predstavlja vid klasične čvrsto-tečne ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, kojom se postiže brža ekstrakcija biološki aktivnih jedinjenja iz različitog materijala [135]. Pored toga, ova tehnika ekstrakcije zahteva upotrebu manje zapremine rastvarača, a moguća je i primena vodenih rastvarača kao ekstrakcionih medijuma [135]. Prilikom propuštanja mikrotalasa kroz sistem uzorka i rastvarača dolazi do njihovog mešanja i zagrevanja. Prilikom zagrevanja biljnog materijala može doći do dehidracije strukturnih polisaharida i do razaranja ćelijskih zidova, čime se obezbeđuje brži transfer mase analita u rastvarač, skraćuje se trajanje ekstrakcionog postupka i smanjuje utrošak rastvarača [121, 134].

Međutim, većina savremenih ekstrakcionih tehnika zahteva primenu određenog vida energije, tako da ne predstavljaju uvek isplative metode za izolovanje polifenola kada se primene na veliku količinu otpadnog materijala. S tim u vezi, novi pristupi ekstrakciji bi trebalo da se takođe zasnivaju na principima „zelene” hemije, odnosno da podrazumevaju smanjenje upotrebe štetnih rastvarača, kao i smanjenje utroška energije.

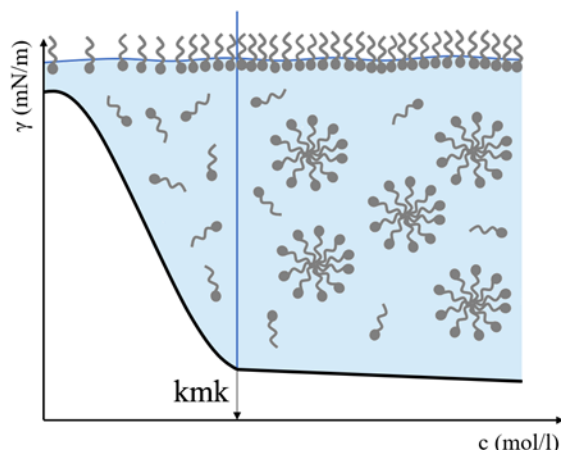
2.7.3 Ekstrakcija polifenola primenom rastvora surfaktanata

Primena površinski aktivnih materija (PAM), odnosno surfaktanata (eng. *surface-active agents*, *surfactant*), u ekstrakciji polifenola iz matriksa predstavlja novi, efikasan pristup čvrsto-tečnoj ekstrakciji [136]. Primena vodenih rastvora surfaktanata kao medijuma za ekstrakciju predstavlja netoksičnu, relativno jeftinu, jednostavnu i ekološki prihvatljivu metodu koja omogućava izolovanje širokog spektra jedinjenja [137]. Metode ekstrakcije zasnovane na primeni surfaktanata ne zahtevaju naknadno prečišćavanje ekstrakata, uparavanje rastvarača i primenu energije tokom izvođenja ekstrakcije. Vodeni rastvori surfaktanata se smatraju „zelenim” ekstrakcionim

medijumima budući da je voda prisutna u najvećem udelu [137, 138]. Pored toga, primenjeni surfaktanti se zadržavaju u finalnom ekstraktu, u kojem imaju sposobnost da povećaju stabilnost [139], pospeše penetraciju [140] i efikasnost delovanja fenolnih jedinjenja [55] ukoliko se ekstrakt primenjuje topikalno.

2.7.3.1 Karakteristike surfaktanata

Površinski aktivne materije poseduju karakterističnu amfifilnu građu molekula. U molekulima surfaktanata se razlikuju dva dela: liofilni i liofobni deo. Liofilni deo molekula ostvaruje privlačne interakcije sa molekulima rastvarača, dok liofobni deo molekula ne pokazuje afinitet prema molekulima rastvarača. Karakteristični način predstavljanja građe molekula surfaktanata podrazumeva označavanje hidrofilnog dela molekula, odnosno polarne glave, krugom, dok se crtom ili talasastom linijom označava nepolarni (hidrofobni) rep [141, 142]. Zahvaljujući karakterističnoj građi molekula surfaktanata, ova jedinjenja pokazuju specifično ponašanje kada se nalaze u određenom medijumu. Naime, kada se molekuli surfaktanata nađu u nekom polarnom medijumu, kao što je voda, polarni deo molekula je hidratisan zahvaljujući građenju vodoničnih veza sa molekulima rastvarača. Sa druge strane, između nepolarnog dela molekula surfaktanata i molekula vode ne javljaju se privlačne interakcije, a postojanje hidrofobnih grupa doprinosi raskidanju vodoničnih veza između molekula vode, čime se povećava slobodna energija sistema [141]. Usled toga, kao i usled jakih kohezivnih sila, molekuli vode teže da izbace hidrofobne delove molekula surfaktanta iz sistema, što se naziva hidrofobni efekat [143]. Rezultat ove pojave je nakupljanje molekula surfaktanata na graničnim površinama voda/vazduh ili voda/nepolarna tečnost u vidu monosloja, u kojem se polarne glave nalaze u vodi, a nepolarni repovi u drugoj fazi. Nakon dostizanja određene koncentracije surfaktanata, dolazi do zasićenja granične površine molekulima i potom se pri povećanju koncentracije svi molekuli surfaktanata nalaze u unutrašnjosti vodene faze gradeći odgovarajuće agregate, prvo dimere i trimere, a zatim micelle, što predstavlja drugu posledicu hidrofobnog efekta. Micelle predstavljaju termodinamički stabilne agregate molekula karakteristične strukture, u kojima su polarne glave orijentisane ka površini, odnosno ka polarnim molekulima vode, a nepolarni repovi su okrenuti ka unutrašnjosti tj. jezgru micela. Minimalna koncentracija surfaktanata na kojoj se može smatrati da su micelle formirane se naziva kritična micelarna koncentracija (kmc) (**Slika 9**) [141, 142].



Slika 9. Formiranje micela surfaktanata u vodenim rastvorima i promena površinskog napona rastvora (γ) u zavisnosti od koncentracije surfaktanta (c)

2.7.3.1.1 Podela surfaktanata

Nepolarne delove molekula najčešće čine dugački ugljovodonični lanci, koji mogu biti linearne ili razgranate strukture, zasićeni ili nezasićeni, halogenovani ili oksigenovani, zatim grupe alkil-benzena, siloksanski lanci, derivati polioksipropilen glikola, derivati lignina, i dr. Prema hemijskoj strukturi polarne glave molekula surfaktanata, oni se mogu klasifikovati u tri grupe [141]:

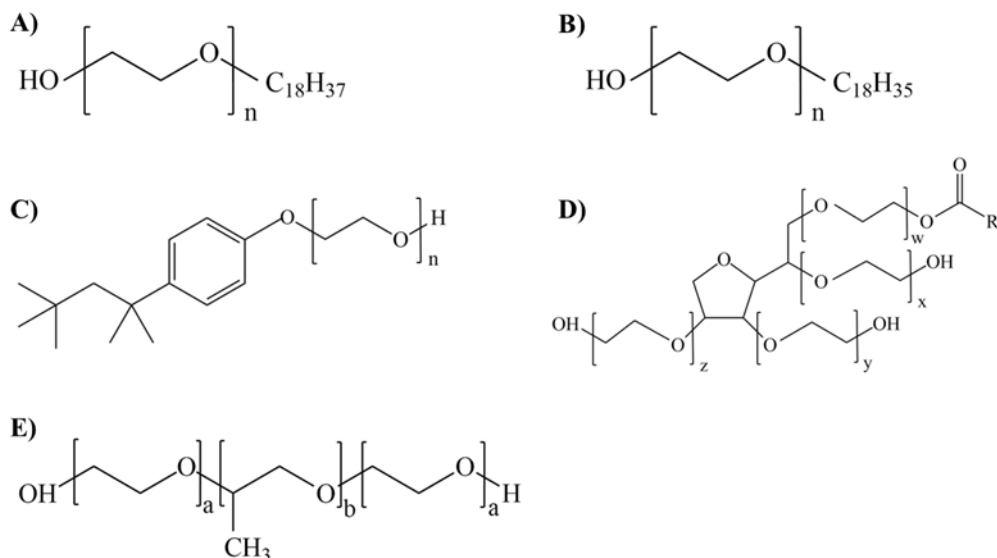
- 1) Jonski surfaktanti
 - a. Katjonski
 - b. Anjonski
- 2) Amfoterni surfaktanti
- 3) Nejonski surfaktanti

Jonske površinski aktivne materije obuhvataju dve podgrupe: katjonske i anjonske surfaktante. Katjonski surfaktanti u vodenoj sredini disociraju dajući pozitivno naelektrisan amfifilni jon. Ova podgrupa surfaktanata ima ograničenu primenu u komercijalne svrhe zbog mogućnosti ispoljavanja neželjenih dejstava (iritacija kože i dr.). Najznačajnije predstavnike katjonskih surfaktanata čine primarni, sekundarni i tercijarni alkilil-amini i njihove soli (RNH_x^+X^-), kvaternerne amonijumove soli (npr. N-alkiltrimetilamonijum hloridi, $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$), polioksietilovani dugolančani amini ($\text{RN}(\text{CH}_3)[(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x\text{H}]_2^+\text{Cl}^-$), amino-oksidi ($\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{O}^-$) itd. [141, 144, 145]. Anjonski surfaktanti, sa druge strane u vodi nakon disocijacije daju negativno

naelektrisan amfifilni jon. Grupa anjonskih surfaktanata ima široku primenu u izradi disperznih sistema, kao deterdženti itd. [146]. Najznačajniji predstavnici anjonskih surfaktanata su soli karboksilne (npr. sapuni, odnosno natrijumove i kalijumove soli linearnih masnih kiselina, $\text{RCOO}^- \text{M}^+$) i sulfonske kiseline (npr. linearni alkilbenzensulfonati, $\text{RC}_6\text{H}_4\text{SO}_3^- \text{M}^+$), zatim estri fosforne ili sulfonske kiseline [141].

Amfoterni surfaktanti nose i pozitivno i negativno naelektrisanje, te u zavisnosti od pH vrednosti sredine, mogu da se ponašaju kao anjonski, katjonski ili nenaelektrisani surfaktanti (na izoelektričnoj tački). Najznačajniji predstavnici amfoternih surfaktanata su alkil-amino (npr. β -N-alkilaminopropionska kiselina, $\text{RN}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$) i alkil-imino karboksilne kiseline, imidazolin karboksilati, alkil- i sulfo-betaini, i dr.

Nejonski surfaktanti u vodenoj sredini ne disosuju, te nisu naelektrisani. Ova grupa surfaktanata zbog svoje hemijske strukture poseduje brojne pogodne osobine (mogućnost primene pri ekstremnim pH vrednostima, slaba mogućnost iritacije itd.) i imaju široku primenu [141]. Nejonski surfaktanti kao polarnu glavu imaju ili polietarsku ili polihidroksilnu grupu, a većina predstavnika poseduje polietarsku grupu sastavljenu iz određenog broja oksietilenskih jedinica [142]. Predstavnici ove grupe surfaktanata su alkoksilovani alkoholi, alkil-poliglikozidi, alkanolamidi, estri viših masnih kiselina i polihidroksilovanih alkohola, polioksietilovani estri viših masnih kiselina i polihidroksilovanih alkohola i dr. [141]. Na **Slici 10** date su hemijske strukture predstavnika pojedinih grupa nejonskih surfaktanata.



Slika 10. Opšta hemijska struktura nejonskih surfaktanata: A) polioksietilen stearyl etar, B) polioksietilen oleil etar, C) polioksietilen oktil fenol etar, D) polioksietilen sorbitan estar masne kiseline, E) triblok kopolimer; u strukturama A), B) i C) oznaka n predstavlja broj oksietilenskih jedinica; u strukturi D) oznake x, y, z i w predstavljaju brojeve oksietilenskih jedinica; u strukturi E) oznaka a predstavlja broj oksietilenskih jedinica, a oznaka b broj oksipropilenskih jedinica

Polioksietilen alkil etri (**Slika 10A i 10B**) predstavljaju grupu surfaktanata dostupnih pod komercijalnim imenom Brij®. Zahvaljujući dobrim solubilizacionim sposobnostima i niskoj toksičnosti, ovi surfaktanti se primenjuju u izradi različitih farmaceutskih formulacija [147-150]. Hemijska struktura Triton surfaktanata se od ostalih klasičnih nejonskih surfaktanata razlikuje po tome što hidrofobni deo molekula umesto alifatičnog lanca čini alkil-aril grupa (**Slika 10C**). Polisorbati, odnosno polioksietilen sorbitan estri masnih kiselina, poznati su i kao Tween surfaktanti budući da su dostupni pod takvim komercijalnim nazivom (Tween®). Pripadaju grupi klasičnih nejonskih surfaktanata koji sadrže 1-3 masne kiseline vezane za polietoksilovanu sorbitansku osnovu (**Slika 10D**) [151, 152]. Zahvaljujući biokompatibilnosti, ova grupa surfaktanata se koristi u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, bilo kao deterdženti, sredstva za solubilizaciju ili emulgatori [153-157]. Poloksameri čine grupu nejonskih triblok kopolimernih surfaktanata, koji se sastoje od jednog hidrofobnog lanca polioksipropilena (PPO) za koji su sa obe strane vezana dva hidrofilna lanca polioksietilena (PEO). Sinteza poloksamera se vrši kontrolisanim reakcijama polimerizacije, odnosno postepenim dodavanjem

monomera propilen oksida (PO) i etilen oksida (EO) u prisustvu alkalnog katalizatora, i na taj način se formira $EO_a-PO_b-EO_a$ struktura (**Slika 10E**) [158-160]. Poloksameri su dostupni pod različitim komercijalnim nazivima, kao što su Synperonic®, Pluronic® i Kolliphor®, sa različitim brojem EO i PO jedinica u molekulima i u različitim agregatnim stanjima (kao tečnosti, paste ili čvrste supstance nalik voskovima). Imaju brojne primene u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji i smatraju se generalno bezbednim za primenu, a mogu se koristiti u izradi preparata za peroralnu, parenteralnu ili topikalnu primenu [161-164]. Pored mogućnosti građenja micela i solubilizacije, zahvaljujući amfifilnom karakteru i sposobnosti adsorbovanja na granici faza, poloksameri se primenjuju i kao emulgatori, a imaju i primenu kao lubrikansi u tabletama, sredstva za geliranje, stabilizatori suspenzija itd. [158, 160, 161, 164, 165].

2.7.3.1.2 Binarne smeše surfaktanata

Umesto pojedinačnih, u praktičnoj primeni se često upotrebljavaju rastvori smeša surfaktanata zbog unapređenih svojstava smeša [141]. Mešovite micelle imaju drugačija svojstva zbog međudejstava različitih surfaktanata. Međudejstva mogu biti takve prirode da cmc smeše surfaktanta ima nižu vrednost od cmc pojedinačnih surfaktanata, što se naziva sinergizmom [141]. Sa druge strane, u slučaju da su vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija pojedinačnih surfaktanata niže od kritične micelarne koncentracije smeše surfaktanata, prisutna je pojava antagonizma u sistemu [141]. Sinergizam proističe iz privlačnih sila između različitih surfaktanata u mešovitim micelama ili iz smanjenja intenziteta odbojnih sila u mešovitim micelama u poređenju sa micelama pojedinačnih surfaktanata, što termodinamički stabilizuje binarne sisteme [141, 166]. U tom slučaju, manja količina surfaktanta je potrebna da bi se postigla željena svojstva sistema, kao na primer solubilizacija hidrofobnih jedinjenja u farmaceutskim formulacijama i kozmetičkim proizvodima [167].

2.7.3.1.3 Solubilizacija

Specifična građa molekula surfaktanata i njihova orijentacija u micelama omogućavaju formiranje reverzibilnih interakcija micela sa supstancama u čvrstom, tečnom i gasovitom stanju, koje se tom prilikom nagomilavaju u micelama. Ova pojava se naziva solubilizacija i dešava se samo pri koncentracijama surfaktanta višim od kritične micelarne koncentracije, dok se sa povećanjem koncentracije surfaktanata formira veći broj micela i moguća je solubilizacija veće količine solubilizata. Moguća je solubilizacija i hidrofilnih i hidrofobnih supstanci, a sa praktične strane je

najznačajnije rastvaranje supstanci koje su u konvencionalnim rastvaračima teško rastvorljive [141]. Solubilizacija u vodenim rastvorima surfaktanata je od posebnog značaja jer omogućava rastvaranje u vodi nerastvorljivih supstanci, uz istovremenu mogućnost zamene organskih rastvarača micelarnim rastvorima [141]. Takođe, zahvaljujući mogućnosti solubilizovanja fenolnih jedinjenja različitih struktura i polarnosti, micelarni rastvori surfaktanata u vodi poseduju potencijal za efikasnu ekstrakciju ovih jedinjenja iz biljnog materijala.

2.7.3.2 Ekstrakcija polifenola primenom rastvora nejonskih surfaktanata

Nejonski surfaktanti ne poseduju naelektrisane funkcionalne grupe, stabilni su i smatraju se relativno netoksičnim i bezbednim za zdravlje ljudi [168]. Pokazano je da micelarni rastvori određenih nejonskih surfaktanata efikasnije ekstrahuju fenolna jedinjenja iz različitog biljnog materijala u poređenju sa vodom i organskim rastvaračima [168-170], kao i u poređenju sa jonskim i drugim tipovima nejonskih surfaktanata [169, 171].

Do sada su različiti pojedinačni nejonski surfaktanti ispitani za primenu u jednostavnim, klasičnim metodama čvrsto-tečne ekstrakcije, sa najvećim brojem studija fokusiranim na ispitivanje Tween surfaktanata (**Tabela 3**). Primenom 20 mM vodenog rastvora Tween 20 surfaktanta u ekstrakciji polifenola iz egzokarpa crnog grožđa sorte *Barbera*, gde je odnos zapremine rastvarača i mase komine iznosio 8:1, dobijeni su ekstrakti sa sadržajem ukupnih fenola 4,3 mg GAE/g suve materije [170]. U procesu ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz komine jabuke primenom vodenih rastvora Tween-a 80 (koncentracija 1,14%, odnos zapremine rastvarača i mase komine 104:1, trajanje ekstrakcionog postupka 65 minuta) dobijeni su ekstrakti u kojima je sadržaj ukupnih fenola iznosio do 10,23 mg GAE/g suve materije, u zavisnosti od sorte jabuke [171]. Sa druge strane, brojnije su studije u okviru kojih je ispitana primena rastvora surfaktanata kao medijuma u ultrazvukom potpomognutoj ekstrakciji. Prema literaturnim podacima, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija rastvorima surfaktanata do sada je primenjena na različitim sirovinama, kao što su začinske biljke, različito voće i voćni sokovi, pri čemu su se Brij surfaktanti pokazali kao nedvosmisleno najefikasniji [136, 168, 169, 172-174]. Takođe, metoda stvaranja specifičnih vezikula gasa uz primenu surfaktanata (eng. *colloidal gas aphrons method*) je primenjena u ekstrakciji polifenola iz etanolnog i vodenog ekstrakta komine grožđa (sorte *Barbera*) [55]. Osim toga, ekstrakcija polifenola micelarnim rastvorima iznad tačke zamućenja (eng. *cloud point extraction*) uz primenu Triton surfaktanata je ranije ispitana na različitim sirovinama [175-177]. Poređenje literaturnih

podataka koji se odnose na efikasnost ekstrakcije polifenola uz primenu rastvora surfaktanata je često otežano zahvaljujući razlikama u ekstrakcionim procedurama, primenjenim uslovima ekstrakcije (npr. odnos zapremine rastvarača i mase komine), kao i metodama kvantifikacije polifenola i načinima izražavanja dobijenih rezultata. Takođe, razlike u karakteristikama i polifenolnim profilima različitih biljnih sirovina (jabuke, komina jabuke, začinske biljke, egzokarp nara itd.) doprinose razlikama u polifenolnom sastavu ekstrakata.

Tabela 3. Poređenje tehnika ekstrakcije polifenola primenom rastvora surfaktanata

Tip surfaktanta	Uzorak	Tehnika ekstrakcije	Parametri korišćeni za procenu efikasnosti ekstrakcije	Nejefikasniji tip surfaktanta	Efikasnost ekstrakcije najefikasnijeg tipa surfaktanta	Referenca
Tween 80; Tween 20; Triton X-100; Span 20	Komina ploda jabuke dobijena tokom proizvodnje soka (različite sorte)	SLE rastvorima surfaktanata	TPC (Folin-Ciocalteu metoda); Antioksidativni kapacitet (DPPH, ABTS i FRAP testovi)	Tween 80	TPC: 6,85-10,23 mg GAE/g SM; DPPH: 4,36-6,48 mg TE/g SM; ABTS: 8,26-15,23 mg TE/g SM; FRAP 2,42-4,52 mg TE/g SM	[171]
Triton X-100; Span 80; Tween 80; PEG 1500; PEG 6000; Gelucire 50/13; Gelucire 14/44	Osušeni pupoljci karanfilića (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	SLE rastvorima surfaktanata	TPC (Folin-Denis metoda); Antioksidativni kapacitet (ABTS test); HPLC (koncentracija eugenola)	Tween 80, Gelucire 44/14, Gelucire 50/13 i Triton X-100 (ekstrakcija eugenola)	-	[178]
Tween 20	Egzokarp grožđa iz komine (sorta <i>Barbera</i>)	SLE rastvorima surfaktanata	TPI ₂₈₀ ; TPC (Folin-Ciocalteu metoda); TAC; Antioksidativni kapacitet (ABTS test)	-	TPI ₂₈₀ : 20 mM Tween 20 + 60% etanol: 12,7±0,1 mg GAE/g SM, 20 mM Tween 20 + 0% etanol: 4,3±0,5 mg GAE/g SM; TPC: 20 mM Tween 20 + 60% etanol: 20,5±0,2 mg GAE/g SM, 20 mM Tween 20 + 0% etanol: 4,1±0,3 mg GAE/g SM, TAC: 20 mM Tween 20 + 60% etanol: 7,0±0,0 mg WAE/g SM; 20 mM Tween 20 + 0% etanol: 2,6±0,1 mg WAE/g SM	[170]
Triton X-100; Brij 35; SDS; CPB	Različito začinsko bilje	SLE rastvorima surfaktanata potpomognuta ultrazvukom	Prinos ekstrakcije fenolnih antioksidanasa (kulometrijska titracija sa heksacijanofatom (III))	Brij 35	Q/C: 9,65±0,09	[174]
CTAB; SDS; Triton X-100; PEG 2000; Brij 35	Plod jabuke (različite sorte)	SLE rastvorima surfaktanata potpomognuta ultrazvukom	HPLC; Antioksidativni kapacitet	Brij 35	-	[136]
Tween 80; Triton-114; Deterdžent NP-10; Emulgator OP-10	Herba <i>Ampelopsis grossedentata</i>	SLE rastvorima surfaktanata potpomognuta ultrazvukom	TPC (Folin-Ciocalteu metoda); Antioksidativni kapacitet (FRAP test)	Tween 80	TPC: 360,4 mg GAE/g SM; FRAP: 478,2 μmol Fe ²⁺ /g SM	[169]

Tip surfaktanta	Uzorak	Tehnika ekstrakcije	Parametri korišćeni za procenu efikasnosti ekstrakcije	Nejefikasniji tip surfaktanta	Efikasnost ekstrakcije najefikasnijeg tipa surfaktanta	Referenca
Oleth-5; Oleth-10; Oleth-20; Steareth-20; Ceteareth-20; Ceteareth-12; C12-C15 Pareth-12; C12-C13 Pareth-12	Herba <i>Bidens tripartite</i> L.	SLE rastvorima surfaktanata potpomognuta ultrazvukom	TPC (Folin-Ciocalteu method); TFC; HPLC (koncentracija hlorogenske kiseline i luteolin-7- <i>O</i> -glukozida)	Oleth-10 and Oleth-5 (TPC); Oleth-5 (TFC); Ceteareth-12 (koncentracija hlorogenske kiseline i luteolin-7- <i>O</i> -glukozida)	TPC: Oleth-5: 424,9±1,1 mg RE/l, Oleth-10: 469,3±10,0 mg RE/l; TFC: Oleth-5: 83,2±2,1 mg LE/l; Hlorogenska kiselina (HPLC): Ceteareth-12: 66,4 mg/l; Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid (HPLC): Ceteareth-12: 28,5 mg/l	[173]
Brij-35; Brij-58; Triton X-100; Span-40; SDS	Sokovi plodova: jabuke (sorta <i>Red delicious</i>); <i>Mcintosh</i> jabuke; slatkog limuna; manga	SLE rastvorima surfaktanata potpomognuta ultrazvukom	TPC (Folin-Ciocalteu metoda); Antioksidativni kapacitet (DPPH test)	Brij-58	TPC: 35,4±0,8 – 37,0±0,1 mg GAE/100 ml; DPPH: 90,4±0 – 93,4±0,4% AA	[168]
Rocanol B2	Komina ploda jabuke (sorta <i>Champion</i>) – konvencionalni i ekološki usevi	SLE rastvorima surfaktanata potpomognuta ultrazvukom	TPC (Folin-Ciocalteu metoda), UPLC-MS (koncentracija polifenola)	-	TPC: konvencionalni: 245,83 mg/l, ekološki: 349,65 mg/l; Ukupna koncentracija polifenola (UPLC-MS): konvencionalni: 112,58±8,96 mg/l, ekološki: 148,37±13,23 mg/l	[172]
Tween 20	Komina grožđa (sorta <i>Barbera</i>)	1) Etanol 60% SLE; 2) Etanol 60% SLE + CGA razdvajanje (Tween 20, 10 mmol/l); 3) SLE toplom vodom; 4) SLE toplom vodom + CGA razdvajanje (Tween 20, 10 mmol/l)	TPI ₂₈₀ ; TPC (Folin-Ciocalteu metoda); TAC; HPLC (koncentracija polifenola); LC-MS	-	Ukupna koncentracija polifenola (HPLC): 1) EE: 478,9±71,0 mg/l; 2) CGP-EE 147,0±14,8 mg/l, LP-EE 80,44±9,33 mg/l; 3) HWE 355,2±11,4 mg/l; 4) CGP-HWE 75,0±8,0 mg/l, LP-HWE 51,7±9,6 mg/l	[55]

Tip surfaktanta	Uzorak	Tehnika ekstrakcije	Parametri korišćeni za procenu efikasnosti ekstrakcije	Nejefikasniji tip surfaktanta	Efikasnost ekstrakcije najefikasnijeg tipa surfaktanta	Referenca
C9-11 Pareth-5; PPG-6 Steareth-7; PPG-4 Laureth-5	Herba <i>Bidens tripartite</i> L.	1) SLE rastvorima surfaktanata potpomognuta ultrazvukom; 2) SLE rastvorima surfaktanata potpomognuta ultrazvukom + „cloud point” koncentrovanje; 3) SLE rastvorima surfaktanata potpomognuta ultrazvukom + koncentrovanje isoljavanjem sa NaCl	TPC (Folin-Ciocalteu metoda); TFC; Antioksidativni kapacitet (DPPH test); UPLC-DAD-MS (koncentracija polifenola);	C9-11 Pareth-5 (TPC and TFC); PPG-6 Steareth-7 (DPPH); C9-11 Pareth-5 (koncentracija polifenola)	TPC (C9-11 Pareth-5): 1) 400 mg RE/l, 2) 4870 mg RE/l, 3) 4720 mg RE/l; TFC (C9-11 Pareth-5): 1) 520 mg LE/l, 2) 1960 mg LE/l, 3) 1550 mg LE/l; DPPH (PPG-6 Steareth-7): 1) 85,9% AA, 2) 85,6% AA, 3) 75,4% AA; Ukupna koncentracija polifenola (UPLC-DAD-MS) (C9-11 Pareth-5): 1) 59,2 mg/l, 2) 1691,9 mg/l, 3) 559,4 mg/l	[175]
Triton X-114; Triton X-100; Tergitol NP-12	Perikarp ploda nara (sorta <i>Bhagwa</i>)	CPE	TPC (Folin-Ciocalteu metoda); TFC	Triton X-114	TPC: 98,09±1,19% prinos, 205,2 mg GAE/g SM pri optimalnim uslovima; TFC: 96,96±1,13% prinos; 60,05 mg QE/g SM pri optimalnim uslovima	[176]
Triton X-100; Triton X-114; Tween 20; Tween 80	Perikarp ploda nara	CPE	TPC (Folin-Ciocalteu metoda); TFC Antioksidativni kapacitet (DPPH test)	Triton X-100	TPC: 72,98±0,01 mg GAE/g SM; TFC: 7,05±0,003 mg QE/g SM; DPPH: 79,25±0,04% AA	[177]

SLE – čvrsto-tečna ekstrakcija (eng. *solid-liquid extraction*), TPC – sadržaj ukupnih fenola (eng. *total phenolic content*), DPPH - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, ABTS - 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina, FRAP - antioksidativna sposobnost redukcije Fe (III) jona (eng. *ferric-reducing antioxidant power*), GAE – ekvivalenti galne kiseline (eng. *gallic acid equivalents*), SM – suva materija, TE – Trolox ekvivalenti, PEG – polietilen glikol, HPLC – visokoefikasna tečna hromatografija (eng. *high performance liquid chromatography*), TPI₂₈₀ – indeks ukupnih fenola (eng. *total phenolic index*) izmeren na 280 nm, TAC – sadržaj ukupnih antocijana (eng. *total anthocyanins content*), WAE – ekvivalenti antocijana vina (eng. *wine anthocyanins equivalents*), SDS – natrijum lauril sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*), CPB - cetilpiridinijum bromid, Q/C – količina elektriciteta utrošena za kulometrijsku titraciju, CTAB - cetiltrimetilamonijum bromid, TFC – sadržaj ukupnih flavonoida (eng. *total flavonoids content*), RE – ekvivalenti rutina, LE – ekvivalenti luteolina, % AA – antioksidativna aktivnost izražena kao % inhibicije DPPH slobodnih radikala, UPLC-MS – tečna ekstrakcija ultravisokih performansi kuplovana sa masenim spektrometrom (eng. *ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry*), CGA – razdvajanje tehnikom ‘*colloidal gas aphasors*’, LC-MS - tečna hromatografija kuplovana sa masenim spektrometrom (eng. *liquid chromatography-mass spectrometry*), EE - etanolni ekstrakt; HWE – ekstrakt dobijen toplom vodom, CGP - CGA faza, LP – tečna faza (eng. *liquid phase*), UPLC-DAD-MS – tečna ekstrakcija ultravisokih performansi kuplovana sa DAD detektorom i masenim spektrometrom (eng. *ultra-performance liquid chromatography coupled to diode array detection and mass spectrometry*), CPE – ‘*cloud point*’ ekstrakcija, QE – ekvivalenti kvercetina (eng. *quercetin equivalents*)

2.8. Emulzije

Emulzije pripadaju klasi disperznih sistema koji sadrže najmanje dve tečnosti koje se međusobno ne mešaju. Obaveznu komponentu emulzija čine i emulgatori (najčešće su to surfaktanti, a mogu biti i makromolekuli ili fino usitnjene čvrste komponente), čija je uloga da obezbede dispergovanje i stabilnost sistema [179]. Ovakvi disperzni sistemi imaju dakle dve tečne faze [180]:

- kontinualnu, spoljašnju fazu, odnosno disperzno sredstvo,
- diskontinualnu, unutrašnju, odnosno disperznu fazu.

Kapi unutrašnje faze su raspoređene u spoljašnjoj fazi emulzije [180]. Emulgator ne čini posebnu fazu emulzije, on se u procesu izrade emulzija adsorbuje na graničnoj površini dve faze, smanjuje površinski napon, omogućava usitnjavanje kapi i povećava stabilnost sistema [180, 181]. Pored toga, emulgator adsorbovanjem na graničnoj površini formira zaštitni sloj na dispergovanim kapljicama, koji je važan u procesu stabilizacije emulzija [180]. Jedan od osnovnih kriterijuma za odabir emulgatora koji će se koristiti u izradi emulzije je njegova rastvorljivost u vodenoj ili uljanoj fazi. Rastvorljivost emulgatora u vodenoj ili uljanoj fazi određena je njegovom hemijskom strukturom, tj. odnosom polarnog i nepolarnog dela molekula površinski aktivne materije (hidrofilno-lipofilni balans, HLB). Emulgatori koji imaju HLB vrednost između 3 i 6 koriste se za izradu emulzija tipa voda u ulju, dok se emulgatori sa HLB vrednostima između 8 i 18 koriste za izradu emulzija tipa ulje u vodi [179].

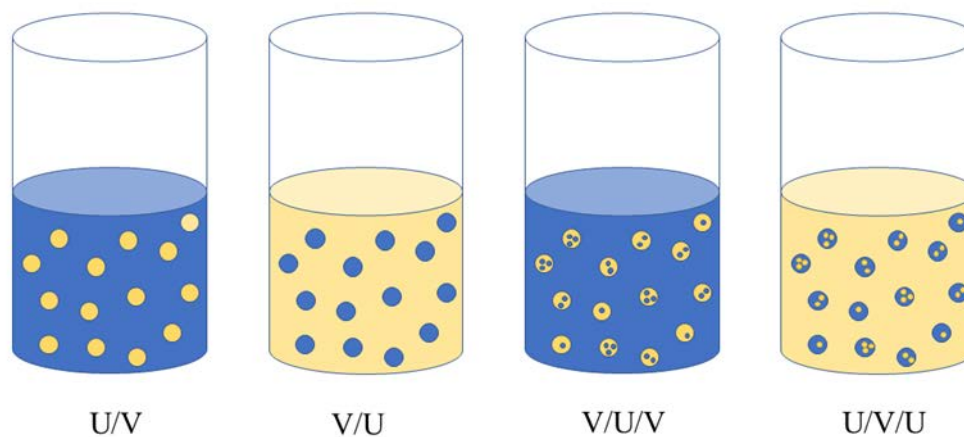
2.8.1 Podela emulzija

Emulzije se mogu podeliti na osnovu polarnosti faza, veličine dispergovanih kapi, koncentracije disperzne faze i namene (**Tabela 4**). Po pravilu u dvofaznim emulzijama jednu fazu čini voda, odnosno vodena faza u kojoj su rastvorene polarne supstance, a druga faza je ulje, odnosno uljana faza u kojoj su rastvorene nepolarne supstance. Podela emulzija na osnovu rasporeda tj. polarnosti faza zasniva se na osobinama tečnosti. Budući da obe faze mogu biti i disperzna faza i disperzno sredstvo, dvofazne emulzije se dele na emulzije tipa ulje u vodi (U/V emulzije) i emulzije tipa voda u ulju (V/U emulzije) (**Slika 11**) [180].

Tabela 4. Podela emulzija na osnovu polarnosti faza, veličine dispergovanih kapi, koncentracije disperzne faze i namene

Polarnost faza	Veličina dispergovanih kapi	Koncentracija disperzne faze	Namena
Dvofazne emulzije U/V V/U	Makroemulzije Nanoemulzije Mikroemulzije	Razblažene Koncentrovane Visokokoncentrovane	Prehrambena Farmaceutska Kozmetička Agrohemija Boje
Višefazne emulzije U/V/U V/U/V			

U slučaju U/V emulzija, disperzna faza je uljana i raspodeljena je u vidu kapi u disperznom sredstvu, koje čini vodena faza. Kod V/U emulzija je obrnuta situacija, te disperznu fazu čini vodena, a disperzno sredstvo uljana faza [179, 180]. Pored dvofaznih emulzija, postoje i one kod kojih disperznu fazu čini neka druga emulzija, koje se nazivaju višefazne, višestruke, multiple ili emulzije višeg reda. Naime, u takvim sistemima su unutar kapi disperzne faze dispergovane kapi disperznog sredstva. Prema tome, razlikuju se V/U/V i U/V/U višefazne emulzije (**Slika 11**) [180].



Slika 11. Podela emulzija na osnovu polarnosti faza

Emulzije se na osnovu veličine dispergovanih kapi mogu podeliti na makroemulzije (konvencionalne emulzije ili samo emulzije), nanoemulzije (miniemulzije) i mikroemulzije. Konvencionalne emulzije su najčešće polidisperzni sistemi, sa prečnicima kapi iznad područja koloidnih veličina (**Tabela 5**). Ovakvi sistemi su termodinamički nestabilni, sa većom slobodnom energijom emulzije u poređenju sa slobodnim energijama odvojenih faza [182]. Iz tog razloga, makroemulzije pokazuju težnju da se tokom vremena razruše i formiraju odvojene slojeve tečnosti.

Poznato je da se zadovoljavajuća stabilnost emulzija može postići samo primenom visokih koncentracija surfaktanata, pa tako većina konvencionalnih kremova i losiona obično sadrži između 2% i 7% (m/m) surfaktanta [183]. Ovakve emulzije su karakteristično neprozirne, mutne, bele boje budući da je prečnik kapi približan talasnoj dužini elektromagnetnog zračenja iz vidljivog dela spektra, zbog čega jako rasipaju upadno zračenje [182]. Nanoemulzije se od makroemulzija razlikuju, pre svega, po veličini kapi disperzne faze. U literaturi se mogu pronaći različiti opsezi veličina kapi disperzne faze nanoemulzija (**Tabela 5**). Nanoemulzije su prozirne ili blago zamućene zahvaljujući maloj veličini dispergovanih kapi u poređenju sa talasnom dužinom vidljivog elektromagnetnog zračenja, te poseduju i veću stabilnost prema gravitacionom raslojavanju i agregaciji. Međutim, nanoemulzije takođe predstavljaju termodinamički nestabilne sisteme, koji pokazuju tendenciju da se razruše tokom vremena [182]. Mikroemulzije sadrže dispergovane kapi dimenzija manjih od 100 nm (područje koloidnih veličina) (**Tabela 5**). Kao i u slučaju nanoemulzija, mikroemulzije su prozirne. Budući da je ukupna slobodna energija emulzije manja od zbira slobodnih energija zasebnih faza, ovakve emulzije predstavljaju termodinamički stabilne sisteme i pod odgovarajućim uslovima (sastav, temperatura i sl.) ne teže da se razruše [182].

Tabela 5. Veličina kapi disperzne faze makroemulzija, nanoemulzija i mikroemulzija

Makroemulzije	Nanoemulzije	Mikroemulzije
100 nm - 100 μ m [182]	10 nm - 100 nm [182]	2 nm - 100 nm [182]
0,5 μ m - 100 μ m [184]	50 nm - 200 nm [185]	10 nm - 100 nm [184]
	5 nm - 50 nm [186]	
	100 nm - 1 μ m [184]	

Poznato je da koncentracija disperzne faze utiče na viskozitet, teksturne osobine, stabilnost emulzija, kao i na oblik, veličinu i raspodelu veličina kapi i dr. u emulzijama. Emulzije se na osnovu udela, odnosno koncentracije disperzne faze mogu podeliti na razblažene, koncentrovane i visokokoncentrovane. Razblažene emulzije sadrže disperznu fazu u zapreminskom udelu od 0,3 i prema reološkim karakteristikama često spadaju u njutnovske sisteme. Kapi disperzne faze ovakvih emulzija su sfernog oblika i razdvojene su značajnim slojem disperznog sredstva. Koncentrovane emulzije sadrže disperznu fazu u delu između 0,3 i 0,74. U ovakvim sistemima je izraženije međudejstvo kapi, te se povećava viskozitet emulzija i one imaju nenjutnovski karakter (pseudoplastičan, plastičan ili tiksotropan). Visokokoncentrovane emulzije sadrže disperznu fazu

u udelu većem od 0,74 [187]. Zbog pritiska jedne kapi o drugu, često dolazi do njihove deformacije, te one zauzimaju oblik poliedra [188].

Na osnovu namene, emulzije se mogu podeliti na prehrambene, farmaceutske i kozmetičke, emulzije koje se primenjuju u agrohemiji, industriji boja i dr. [179]. Emulzije koje su namenjene za ljudsku upotrebu se mogu se primenjivati peroralno, parenteralno ili topikalno [189].

2.8.2 Stabilnost emulzija

Stabilnost emulzija predstavlja sposobnost sistema da se odupre promenama osobina tokom vremena i obuhvata fizičku, hemijsku i mikrobiološku stabilnost. Pod fizičkom nestabilnošću se podrazumeva promena prostorne raspodele ili strukturne organizacije molekula (raslojavanje, flokulacija, koalescencija, Ostvaldovo zrenje i inverzija faza). Hemijskom nestabilnošću se smatraju promene vrste prisutnih molekula (oksidacija, hidroliza i dr.). Predmet izučavanja stabilnosti emulzija je najčešće njihova fizička stabilnost [180].

Emulzije predstavljaju termodinamički nestabilne sisteme i na njihovu stabilnost utiče veliki broj faktora. Usled različitih fizičko-hemijskih karakteristika dve faze (uljane i vodene faze), emulzije imaju tendenciju da se tokom vremena razruše. Naime, budući da je kontakt između ove dve faze energetski nepovoljan jer uljana i vodena faza ne pokazuju afinitet jedna prema drugoj, a istovremeno je velika slobodna površina dispergovanih kapi, sistem teži da smanji kontaktnu površinu između faza. Takođe, ulje usled manje gustine teži da se izdvoji iznad vodenog sloja pod dejstvom gravitacione sile. Stabilnim emulzijama se smatraju oni sistemi kod kojih se kapi sporo kreću, ne grade agregate i ne dolazi do razdvajanja faza [179, 180].

Postoji nekoliko procesa koji dovode do fizičke nestabilnosti emulzija. Pored toga, ovi procesi mogu da se odvijaju istovremeno, umesto jedan za drugim. Raslojavanje predstavlja pojavu izdvajanja kapi iz sistema. Dešava se pod dejstvom spoljašnje sile (gravitacione ili centrifugalne), a usled postojanja razlike u gustini vodene i uljane faze [179, 180]. U slučaju U/V emulzija ova pojava se naziva isplivavanje ili kriming, dok se u slučaju V/U emulzija naziva sedimentacija. Jedina pojava koja se dešava kod raslojavanja je promena u koncentraciji disperzne faze od vrha ka dnu emulzije, što se uočava kao razlika u mutnoći. Vizuelno se mogu uočiti dva sloja: sloj osiromašen kapima disperzne faze (donji sloj u slučaju U/V emulzija) i sloj u kojem su koncentrisane kapi disperzne faze (u U/V emulzijama se nalazi iznad sloja osiromašenog kapima

dispersne faze) [180]. Flokulacija (agregacija kapi) nastaje prilikom sudara kapi u sistemu, pri čemu nastaju agregati različitih oblika i veličina, u kojima su kapi odvojene tankim slojem disperznog sredstva. Dakle, u agregatima kapi zadržavaju svoju veličinu i oblik [179]. Koalescencija predstavlja spajanje dve ili više kapi u jednu kap većeg prečnika i može biti posledica smanjenja debljine ili narušavanja filma surfaktanta između kapi ili može nastati usled nedovoljne koncentracije upotrebljenog emulgatora [179]. Ovo je nepovratan proces, koji rezultuje promenom srednjeg prečnika i raspodele veličine kapi u sistemu. Kao krajnji stadijum koalescencije dolazi do razdvajanja faza emulzije. Ostvaldovo zrenje predstavlja difuziju molekula iz kapi manjih prečnika u kapi većih prečnika, a uzrokovano je razlikom u rastvorljivosti malih i velikih kapi [179]. Ovaj proces dovodi do povećanja srednjeg prečnika kapi u sistemu. Još jedan proces koji izaziva fizičku nestabilnost emulzije je inverzija faza, koja se najčešće dešava kod visokokoncentrovanih emulzija usled promene određenih parametara, kao što su temperatura, uslovi čuvanja itd. U tom slučaju, sa vremenom ili promenom uslova može doći do promene tipa emulzije (npr. U/V emulzija postaje V/U emulzija) [179, 190].

2.8.3 Reološke osobine emulzija

Reologija je nauka koja proučava deformaciju i proticanje materijala pod različitim uticajima spoljnih sila [191, 192]. U zavisnosti od fizičkog ponašanja, materijali se mogu klasifikovati i pozicionirati na jednoj listi. Na jednom kraju liste se nalaze tečnosti (rastvori ili razblažene emulzije), koje pokazuju idealno viskozno ponašanje definisano Njutnovim zakonom, na deformaciju reaguju ireverzibilno i deformacija je proporcionalna vremenu delovanja sile. Ovakvi sistemi se nazivaju njutnovskim. Na drugom kraju liste se nalaze čvrsta tela, koja pokazuju elastično ponašanje, odnosno kod njih je deformacija povratna i ne zavisi od vremena dejstva sile (ukoliko sila nije veća od vrednosti pri kojoj se javlja trajna deformacija). Između idealno viskoznih fluida i idealno čvrstih tela se nalaze svi ostali materijali, u koje spadaju i emulzije. Prilikom delovanja spoljne sile, ovi materijali pokazuju osobine oba idealna stanja u određenom udelu, te se nazivaju viskoelastičnim telima [191, 193].

Emulzije uglavnom pokazuju pseudoplastično proticanje, odnosno njihov viskozitet (tzv. prividni viskozitet) nije konstantna veličina i opada sa povećanjem brzine smicanja. Pored toga, pojedine emulzije pokazuju plastično proticanje pri niskim brzinama smicanja, odnosno primenom

intenziteta napona smicanja nižeg od prinosnog napona ponašaju se kao čvrsta tela, a iznad vrednosti prinosnog napona kao tečnosti. Reološke osobine emulzija utiču na njihovu stabilnost i primenu. Faktori koji u najvećoj meri utiču na reološke karakteristike emulzija obuhvataju: udeo disperzne faze, reološke karakteristike pojedinačnih faza, veličina kapi disperzne faze i dr. [194]. Takođe, određivanje reoloških osobina emulzija pruža informaciju o fizičkoj stabilnosti emulzija [195].

2.8.4 Emulzije kao nosači aktivnih supstanci

Emulzije (konvencionalne, mikroemulzije i nanoemulzije) se često u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji primenjuju kao nosači i hidrofilnih i lipofilnih lekovitih supstanci [189]. Prednost emulzija kao nosača ogleda se, pored povećavanja rastvorljivosti i bioraspoloživosti u vodi slabo rastvornih lekovitih supstanci, u pospešivanju transdermalnog transporta hidrofilnih jedinjenja [189, 196]. Emulzije tipa ulje u vodi se često primenjuju kao nosači koji se lako mešaju sa vodom zbog toga što voda čini kontinualnu fazu. Ulje u emulzijama ovog tipa predstavlja pogodno okruženje za rastvaranje lipofilnih jedinjenja [196, 197]. Inkorporiranjem aktivnih supstanci u emulzije se takođe omogućava kontrolisano oslobađanje, kombinovanje i lipofilnih i hidrofilnih jedinjenja u okviru jedne formulacije, kao i zaštita nestabilnih supstanci [189, 196, 198, 199]. Takođe, surfaktanti, a posebno polimerni surfaktanti, mogu biti vrlo efikasni u stabilizaciji emulzija [197].

Poznate su brojne formulacije u kojima su lekovite supstance uklopljene u emulzije, uključujući nanoemulzije za parenteralnu primenu (deksametazon, diazepam, flurbiprofen propofol, liposolubilne vitamine i dr.) [200, 201], preparate za topikalnu i transdermalnu primenu čiju osnovu čine konvencionalne, mikro-, ili nano-emulzije (naproksen, bifonazol, itrakonazol, aceklofenak, nimesulid) [202-206] i ređe emulzije za peroralnu primenu budući da se za ovaj vid primene najčešće formulišu tečni ili polučvrsti preparati sa visokim udelom uljane faze i vrlo niskim udelom ili bez vodene komponente [201].

Najveći broj komercijalno dostupnih medicinskih emulzija namenjen je topikalnoj primeni. Tip emulzije se bira na osnovu prirode aktivne supstance i indikacije za koju je proizvod namenjen, te su podjednako zastupljene U/V i V/U dermatološke i kozmetičke emulzije. Kao topikalni nosači aktivnih supstanci, emulzije mogu predstavljati sastavni deo sledećih formulacija: losiona, krema,

pena, emulgelova i dr. Formulacije čiju osnovu čine emulzije pogodnije su za primenu na koži, u poređenju sa drugim topikalnim i transdermalnim doziranim oblicima, kao što su rastvori, masti ili flasteri. Budući da se površinski sloj kože (*stratum corneum*) sastoji od 10-20% lipida i 70-80% proteina, dok u normalnom stanju voda čini 15-20%, emulzije koje se sastoje iz adekvatno dispergovane vodene i uljane faze, po svom sastavu su najbližnje sastavu i uslovima površinskog sloja kože i prema tome, imaju najveću kompatibilnost sa kožom. Za razliku od masti, emulzije primenjene topikalno ne sprečavaju normalni gubitak vode i posledično ne stvaraju osećaj nelagodnosti. Takođe, emulzije se lakše uklanjaju vodom sa površine kože. U poređenju sa rastvorima, viskozitet emulzija se može lakše podesiti kako bi se sprečilo razlivanje formulacije nakon nanošenja i kako bi se lakše nanosila na željenu, ograničenu površinu kože [207].

Retinol [208-210], vitamin E [154, 211] i prirodni antioksidansi, kao što su polifenolna jedinjenja [198, 212-216] predstavljaju neke od supstanci inkorporiranih u različite kozmetičke emulzije. Topikalna primena polifenolnih antioksidanasa predstavlja jedan od načina za podršku endogenom antioksidativnom sistemu kože i za prevenciju oštećenja koja mogu biti izazvana UV zračenjem [198, 216]. Jedan od izazova prilikom formulisanja proizvoda koji sadrži polifenole predstavlja različita polarnost ovih jedinjenja, pri čemu pojedini predstavnici imaju nisku rastvorljivost u vodi (npr. kvercetin, resveratrol i dr.) [216], te iz tog razloga emulzije predstavljaju pogodne nosače za ekstrakte bogate polifenolima. Do sada je pokazano da se polifenolna jedinjenja i ekstrakti bogati ovim jedinjenjima mogu efikasno inkorporirati u U/V ili V/U/V konvencionalne emulzije, kao i mikro- i nanoemulzije, primenom različitih tehnika homogenizacije [198, 217-219], uz održanje hemijske stabilnosti i antioksidativnog kapaciteta ovih jedinjenja [220].

3. Ciljevi i hipoteze

Imajući u vidu sve prethodno iznešeno, postavljeni su ciljevi ovog istraživanja:

- Ispitati efikasnost različitih tipova nejonskih surfaktanata i njihovih smeša u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz komine crnog grožđa; uporediti efikasnosti ekstrakcije primenom nejonskih surfaktanata i njihovih smeša i ekstrakcije primenom konvencionalnih rastvarača.
- Ispitati uticaj koncentracije surfaktanata, kiselosti rastvora i odnosa mase uzorka i zapremine ekstrakcionog medijuma na efikasnost ekstrakcije polifenola primenom vodenih rastvora nejonskih surfaktanata.
- Karakterizacija dobijenih ekstrakata – kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola prisutnih u ekstraktima primenom odgovarajućih analitičkih metoda.
- Izraditi modele emulzija stabilisane surfaktantima koji su pokazali najveću sposobnost ekstrakcije polifenola (kontrolne emulzije) i modele emulzija koji sadrže ekstrakte sa najvećim sadržajem polifenola; ispitivanje fizičke stabilnosti i reoloških karakteristika dobijenih emulzija.

Očekivani rezultati istraživanja predstavljeni su sledećim hipotezama:

- Pojedini tipovi nejonskih surfaktanata i/ili njihove smeše pokazaće efikasnost ekstrakcije uporedivu ili veću u poređenju sa konvencionalnim rastvaračima.
- Uslovi ekstrakcije (koncentracija surfaktanta, kiselost rastvora i odnos mase uzorka i zapremine ekstrakcionog medijuma) će uticati na efikasnost ekstrakcije primenom vodenih rastvora surfaktanata.
- Ekstrakti dobijeni primenom ispitivanih tipova surfaktanata će imati različit kvalitativni i kvantitativni sastav polifenola.
- Izrađeni modeli emulzija imaće adekvatnu fizičku stabilnost i pogodne reološke karakteristike.

4. Materijal i metode

4.1. Uzorak komine grožđa

Komina crnog grožđa sorte *Cabernet Franc* dobijena je tokom procesa proizvodnje crvenog vina tehnikom „kontrolisane divlje fermentacije” u lokalnoj vinariji. Uzorak komine je podvrgnut procesu liofilizacije, nakon čega je usitnjen i skladišten u zamrzivaču na temperaturi od -20 °C do momenta upotrebe u procesima ekstrakcije.

4.2. Priprema vodenih rastvora pojedinačnih nejonskih surfaktanata

Pripremljeni su vodeni rastvori sledećih nejonskih surfaktanata u masenim koncentracijama 0,5%, 1%, 2% i 3% (m/V):

- poloksamer 237 (Kolliphor® P407, BASF, Nemačka),
- poloksamer 407 (Kolliphor® P237, BASF, Nemačka),
- polioksietilen (10) stearil etar, Brij S10 (Brij® S10, Sigma-Aldrich, Nemačka),
- polioksietilen (20) stearil etar, Brij S20 (Brij® S20, Sigma-Aldrich, Nemačka),
- polioksietilen (10) oleil etar, Brij O10 (Brij® O10, Sigma-Aldrich, Nemačka),
- polioksietilen (20) oleil etar, Brij O20 (Brij® O20, Sigma-Aldrich, Nemačka),
- polioksietilen (20) sorbitan monolaurat, Tween 20 (Tween® 20, Comcen, Srbija),
- polioksietilen (20) sorbitan monostearat, Tween 60 (Tween® 60, Fluka, Nemačka),
- polioksietilen (20) sorbitan monooleat, Tween 80 (Tween® 80, J.T.Baker, SAD),
- polioksietilen (20) sorbitan trioleat, Tween 85 (Tween® 85, Sigma-Aldrich, Nemačka),
- polioksietilen (9,5) oktil fenol etar, Triton X-100 (Triton® X-100, J.T.Baker, SAD).

Za pripremu rastvora korišćena je destilovana voda provodljivosti $< 0.3 \mu\text{S}/\text{cm}$ na 25 °C (Zavod za farmaciju, Medicinski fakultet Novi Sad, Srbija). Za određena ispitivanja pripremljeni su i rastvori pojedinih surfaktanata (poloksamer 407 i Brij S20) masene koncentracije 5% (m/V). Korišćenjem InoLab pH-metra (WTW, Nemačka) uz dodavanje potrebnih zapremina 0,1 M HCl (Lach-Ner, Češka Republika) i 0,1 M NaOH (Centrohém, Srbija) podešene su pH vrednosti rastvora surfaktanata na $3,00 \pm 0,05$, $4,00 \pm 0,05$ ili $5,00 \pm 0,05$.

4.3. Priprema vodenih rastvora smeša nejonskih surfaktanata

Pripremljeni su vodeni rastvori binarnih smeša nejonskih surfaktanata Brij S20 (BS20) i poloksamer 407 (P407) variranjem masenih udela pojedinačnih surfaktanata tako da oni iznose: 9:1, 1:1 i 1:9 (BS20/P407 (9:1), BS20/P407 (1:1) i BS20/P407 (1:9)), što je ekvivalentno molskim udelima poloksamera u smešama od 0,0098, 0,08178 i 0,445. Vodeni rastvori smeša surfaktanata su pripremljeni u masenoj koncentraciji 3% (m/V). pH vrednosti rastvora smeša surfaktanata su podešene na $3,00 \pm 0,05$, $4,00 \pm 0,05$ i $5,00 \pm 0,05$ uz dodavanje potrebnih zapremina 0,1 M HCl i 0,1 M NaOH, korišćenjem InoLab pH-metra.

4.4. Poredbeni ekstrakcioni medijumi

Kao poredbeni ekstrakcioni medijumi upotrebljeni su destilovana voda, 96% etanol (Reahem, Novi Sad) i smeša vode i 96% etanola u razmeri 1:1 (V/V), kao konvencionalni rastvarači koji se najčešće primenjuju u postupcima ekstrakcije polifenola iz komine grožđa [16]. Na osnovu literaturnih podataka [171], za konvencionalne rastvarače je odabrana pH vrednost $4,00 \pm 0,05$, koja je podešena uz dodavanje potrebnih zapremina 0,1 M HCl i 0,1 M NaOH, korišćenjem InoLab pH-metra.

4.5. Ispitivanja površinske aktivnosti pojedinačnih surfaktanata i smeša surfaktanata

4.5.1 Priprema rastvora

U cilju ispitivanja površinske aktivnosti pojedinačnih surfaktanata Brij S20 (BS20), Tritona X-100 (T100) i poloksamera 407 (P407), kao i binarnih smeša klasičnih surfaktanata sa polimernim surfaktantom (BS20/P407 i T100/P407), sa vrednostima molskog udela polimernog surfaktanta (α P407) od 0,1, 0,5, i 0,9 meren je površinski napon (γ) vodenih rastvora surfaktanata i njihovih smeša različitih molarnih koncentracija. Površinski napon rastvora je određivan koristeći Krüss Easy Dyne tenziometar (Nemačka), pomoću du Nouüy metode. Prilikom merenja površinskog napona temperatura rastvora surfaktanata je bila konstantna ($25 \pm 0,01$ °C). Površinski napon svakog vodenog rastvora je meren najmanje sedam puta. Dobijene su srednje vrednosti površinskog napona svakog vodenog rastvora. Standardna devijacija (SD) merenja površinskog

napona je bila manja od 0,39 mN/m. Relativna standardna devijacija merenja površinskog napona (RSD) je bila manja od 1,2 %.

4.5.2 Određivanje kritičnih micelarnih koncentracija i ispitivanje agregacionih svojstava pojedinačnih surfaktanata i smeša surfaktanata

Vrednosti dobijene merenjem površinskog napona vodenih rastvora surfaktanata i njihovih smeša različitih koncentracija su korišćene za određivanje eksperimentalnih vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija (cmk^{eks}). Vrednosti cmk^{eks} su određene pomoću grafika zavisnosti površinskog napona od prirodnog logaritma molarne koncentracije određenog surfaktanta, tj. smeše surfaktanata ($\ln(c)$).

4.6. Postupak ekstrakcije

Ekstrakti su pripremljeni tačnim odmeravanjem odgovarajuće mase samlevene liofilizirane komine na analitičkoj vagi (AS 60/C/2, Radwag, Poljska) i dodavanjem 10 ml ekstrakcionog medijuma, kako bi se postigao odgovarajući odnos zapremine rastvarača i mase komine. Ekstrakcija je vršena na sobnoj temperaturi uz mešanje pomoću magnetne mešalice (Hei-Standard, Heidolph Instruments, Nemačka) brzinom od 300 rpm u trajanju od 45 minuta. Ekstrakti su potom dekantovani i podvrgnuti centrifugiranju (Centrifuge 2-5, Sigma, Nemačka) u trajanju od 20 minuta na 3500 rpm. Dobijeni supernatanti su filtrirani kroz membranske filtere (0,45 μm , Agilent, SAD). Postupci ekstrakcije su ponovljeni tri puta i rezultati svih analiza izraženi su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD).

4.6.1 Postupak ekstrakcije - variranje zapremine rastvarača i mase komine

Prilikom ispitivanja uticaja zapremine rastvarača i mase komine na efikasnost ekstrakcije, ekstrakti su pripremljeni tačnim odmeravanjem $100,00 \pm 0,50$ mg, $500 \pm 0,50$ mg ili $1000 \pm 0,50$ mg samlevene liofilizirane komine i dodavanjem 10 ml ekstrakcionog medijuma, kako bi se postigli odnosi zapremine rastvarača i mase komine 100:1, 20:1 i 10:1. Ekstrakcija je potom vršena na prethodno opisan način.

4.6.2 Postupak ekstrakcije – sukcesivna ekstrakcija

Sukcesivna ekstrakcija polifenola iz komine grožđa vršena je u tri stepena. Proces ekstrakcije je u sva tri koraka izvršen na prethodno opisan način. Sva tri stepena ekstrakcije izvedena su pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine 100:1. Ekstrakt koji je dobijen u prvom stepenu ekstrakcije iskorišćen je kao ekstrakcioni medijum u drugom stepenu ekstrakcije na novom uzorku komine, dok je ekstrakt koji je dobijen u drugom stepenu ekstrakcije iskorišćen kao ekstrakcioni medijum za treći stepen ekstrakcije polifenola iz odgovarajuće mase novog uzorka komine. Istovremeno je izvedena i ekstrakcija istim rastvaračima pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine od 100:3.

4.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (eng. *total phenolic content*, TPC) u ekstraktima je određen spektrofotometrijski primenom Folin Chioalceu reagensa (Mol, Srbija), na osnovu prethodno opisanih metoda [221, 222]. Apsorbance standardnih rastvora i uzoraka očitavane su na talasnoj dužini od 740 nm (8453 UV-Visible Spectroscopy System, Agilent, SAD). Serija standardnih rastvora galne kiseline (Alfa Aesar, Nemačka) u opsegu koncentracija 10 - 100 mg/l je korišćena za izradu kalibracione krive ($y = 0,01282x$, $r^2 = 0,99975$). Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po 1 g liofilizirane komine (mg GAE/g komine) i kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po 1 l ekstrakta (mg GAE/l ekstrakta). Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

4.8. Određivanje sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja

Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima određen je metodom visokoeфикаsne tečne hromatografije [223], korišćenjem HPLC Agilent 1100 series (Agilent, SAD) visokoeфикаsnog tečnog hromatografa, opremljenog binarnom pumpom, degaserom i DAD (eng. *diode array detector*) detektorom. Hromatografsko razdvajanje je izvedeno korišćenjem Poroshell 120 EC-C18 kolone ($4,6 \times 100$ mm, 2,7 μ m; Agilent, SAD), gradijentnom elucijom. Mobilnu fazu su činile komponenta A (destilovana voda sa 0,1% glacijalne sirćetne kiseline) i komponenta B (acetonitril sa 0,1% glacijalne sirćetne kiseline). Glacijalna sirćetna kiselina je od proizvođača POCH (Poljska), a acetonitril HPLC stepena čistoće od J.T. Baker (SAD). Brzina protoka mobilne faze je bila 1,0 ml/min, injekcioni volumen je iznosio 10 μ l, dok je temperatura kolone bila 25 °C.

Kvantifikacija pojedinačnih fenolnih komponenti je izvršena primenom metode eksternog standarda. Korišćene su sledeće standardne supstance čistoće do 99%: hlorogenska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, vanilinska kiselina, kafena kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, rutin, resveratrol, kvercetin, *t*-cimetna kiselina, naringenin, kempferol (Sigma Aldrich, Nemačka), galna kiselina (Alfa Aesar, Nemačka), benzoeva kiselina (Lach-Ner, Češka Republika), katehin i hesperetin (Fluka, Nemačka). Standardni rastvori za izradu kalibracione krive pripremljeni su od rastvora pojedinačnih standardnih supstanci u dimetilsulfoksidu (J.T. Baker, SAD), razblaživanjem komponentom A mobilne faze, tako da je opseg koncentracija bio 1-25 mg/l. Kalibracione krive su pokazale visok stepen linearnosti, sa koeficijentom korelacije većim od 0,998 za sve komponente. Detekcija fenolnih jedinjenja je vršena na sledećim talasnim dužinama (nm): 225 (vanilinska i benzoeva kiselina), 280 (galna kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, katehin, siringinska kiselina, *t*-cimetna kiselina, hesperetin, naringenin), 305 (*p*-kumarinska kiselina, resveratrol), 330 (hlorogenska i kafena kiselina), 360 (rutin, kvercetin, kempferol). Svaki uzorak je analiziran tri puta.

4.9. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH slobodnih radikala

In vitro antioksidativni potencijal ekstrakata određen je spektrofotometrijski procenom sposobnosti neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnih radikala (Alfa Aesar, Nemačka) primenom ranije opisane metode [224]. Nakon dodatka rastućih zapremina ekstrakata u rastvor DPPH i inkubacije reakcionih smeša u trajanju od 1 h na tamnom mestu i na sobnoj temperaturi, smanjenje vrednosti apsorbance je praćeno na talasnoj dužini od 515 nm (8453 UV-Visible Spectroscopy System, Agilent, SAD). Slepu probu je predstavljao rastvor DPPH slobodnih radikala u 96% etanolu, dok je kao referentni rastvor korišćen 96% etanol. Sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (eng. *radical scavenging capacity*, RSC) izračunata je za svaki koncentracioni nivo uzorka i izražena procentualno, prema formuli:

$$\text{RSC (\%)} = 100 - 100 \cdot \frac{A}{A_0} \quad (1)$$

gde je *A* apsorbancia reakcione smeše sa dodatim ispitivanim ekstraktom, dok je *A*₀ apsorbancia slepe probe. Iz dobijenih vrednosti RSC, primenom regresione analize izračunata je IC₅₀ vrednost (µl/ml) kao koncentracija ekstrakta neophodna za neutralizaciju polovine slobodnih radikala, odnosno za dostizanje RSC od 50%. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

4.10. Ispitivanje sposobnosti inhibicije ksantin oksidaze

Sposobnost ekstrakata za inhibiciju enzima ksantin oksidaze (eng. *xanthin oxidase*, XO) ispitivana je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 295 nm u aerobnim uslovima, prema ranije opisanoj metodi [225]. Reakcionu smešu su činili ispitivani ekstrakt, fosfatni pufer (pripremljen od natrijum dihidrogen fosfata i dinatrijum hidrogen fosfata; Sigma-Aldrich, Nemačka), supstrat - rastvor ksantina (Sigma-Aldrich, Nemačka) u vodi, i rastvor ksantin oksidaze (Roche, Švajcarska) u fosfatnom puferu. Ispitivana je aktivnost ekstrakata pri koncentraciji od 10 mg/ml. Rastvor alopurinola (Sigma-Aldrich, Nemačka) je korišćen kao pozitivna kontrola, dok je voda korišćena kao slepa proba. Sposobnost inhibicije ksantin oksidaze je izražena procentualno i izračunata korišćenjem sledeće formule:

$$\text{Inhibicija XO (\%)} = (1 - \Delta A / \text{min}_{\text{uzorak}} / \Delta A / \text{min}_{\text{slepa proba}}) \cdot 100 \quad (2)$$

gde $\Delta A / \text{min}_{\text{uzorak}}$ predstavlja linearnu promenu apsorbance ispitivanog uzorka u minuti, a $\Delta A / \text{min}_{\text{slepa proba}}$ predstavlja linearnu promenu apsorbance slepe probe u minuti. Sva merenja izvedena su u tri ponavljanja.

4.11. Određivanje veličine micela

Hidrodinamički radijusi čestica (monomera i micela) određeni su u 1% i 3% rastvorima pojedinačnih surfaktanata Brij S20 i poloksamer 407 i smeša surfaktanata BS20/P407 (9:1), BS20/P407 (1:1) i BS20/P407 (1:9), kao i u ekstraktima dobijenim primenom ovih rastvora (odnos zapremine rastvarača i mase komine 100:1, pH=4), primenom tehnike dinamičkog rasejanja svetlosti, korišćenjem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Detektor je bio pozicioniran na 173 ° u odnosu na pravac upadne svetlosti. Rastvori surfaktanata i ekstrakti su pre merenja profiltrirani korišćenjem membranskih filtera (0,45 μm, Agilent, SAD) kako bi se odstranile nečistoće, kao i veliki agregati molekula u slučaju ekstrakata. Sva merenja su izvedena na temperaturi od 25 °C. Svaka vrednost je dobijena kao prosek tri merenja sa po 10 skeniranja.

4.12. Postupak izrade emulzija

Sve emulzije su izrađene kao emulzije tipa ulje u vodi (U/V), sadržale su 20% (m/m) suncokretovog ulja (Bimal Sunce, Srbija), dok je ukupna masa emulzija iznosila 100 g. Kao

emulgatori korišćeni su: čist polimerni surfaktant poloksamer 407, kao i smeše surfaktanata Brij S20/poloksamer 407 (BS20/P407) i Tween 60/poloksamer 407 (T60/P407), gde su pojedinačni surfaktanti pomešani u masenim odnosima 9:1, 1:1 i 1:9. Surfaktanti su dodati kontinualnoj fazi u koncentracijama od 3% (m/m) ili 5% (m/m) u odnosu ukupnu masu emulzije. U kontinualnu fazu je dodat konzervans natrijum-azid (Sigma-Aldrich, Nemačka), u koncentraciji od 0,02% (m/m), računato na ukupnu masu emulzije, a potom je dodata i odgovarajuća masa ulja. Primarna homogenizacija je izvršena korišćenjem T25 digital ULTRA-TURRAX homogenizatora, opremljenog S 25 N - 18 G disperzivnim elementom (IKA, Nemačka), na sobnoj temperaturi i na 10000 rpm i u trajanju od 10 minuta. Sekundarna homogenizacija izvršena je upotrebom ultrazvučnog homogenizatora LHDM502 Universal Ultrasonic Generator Homogenizer (Colo, Slovenija), podešavanjem frekvencije na 20 kHz, u trajanju od 5 minuta.

Za izradu kontrolnih emulzija kontinualna faza je pripremljena rastvaranjem odgovarajućeg surfaktanta / smeše surfaktanata u vodi, bez dodatog ekstrakata.

U izradi emulzija sa inkorporiranim ekstraktom komine grožđa, kontinualnu fazu su činile smeše ekstrakata i surfaktanata. Ekstraktima je dodata odgovarajuća masa istovetnih surfaktanata koji su korišćeni za ekstrakciju, kako bi se dostigle željene koncentracije surfaktanata u emulzijama u odnosu na ukupnu masu emulzije (3% ili 5% m/m).

4.13. Određivanje veličine kapi disperzne faze emulzija

Raspodela veličine kapi disperzne faze određena je metodom statičkog rasejanja svetlosti, upotrebom instrumenta Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). Indeks refrakcije i apsorpcije za kontinualnu fazu su bili podešeni na 1,33 i 0,10. Indeks refrakcije disperzne faze je bio podešen na 1,52. Svako merenje je ponovljeno tri puta, a kao rezultat je uzeta srednja vrednost merenja. Dobijena raspodela veličina čestica (eng. *particle size distribution*, PSD) opisana je korišćenjem nekoliko parametara [226]:

- S – specifična površina (eng. *specific surface area*)
- d_{32} – površinski srednji prečnik (eng. *surface weighted mean*),
- d_{43} – zapreminski srednji prečnik (eng. *volume weighted mean*),

- prečnici čestica – $d(0,1)$, $d(0,5)$ i $d(0,9)$, koji predstavljaju srednje masene prečnike zapreminske raspodele i ukazuju da je 10% uzorka manje od vrednosti $d(0,1)$, zatim da je 50% uzorka manje od $d(0,5)$ i da je 90% uzorka manje od $d(0,9)$,
- Span (raspon) – širina raspodele veličine čestica, izračunava se prema sledećoj formuli:

$$\text{Span} = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad (3)$$

Stabilnost emulzija je ispitana praćenjem veličine kapi disperzne faze na sobnoj temperaturi. Veličine kapi su određene odmah nakon pripreme emulzija, kao i nakon 14 dana. Rezultati su obrađeni korišćenjem programa Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK).

4.13.1 Mikroskopska analiza emulzija

Emulzije su posmatrane pod ZEISS STEMI 508 stereo mikroskopom sa digitalnom AXIOCM ERc 5s kamerom, koja je korišćena za dobijanje fotografija.

4.14. Ispitivanje reoloških karakteristika emulzija

Ispitivanje reoloških osobina emulzija vršena su na rotacionom viskozimetru HAAKE MARS (Thermo Scientific, Nemačka) na konstantnoj temperaturi od $25 \pm 0,1$ °C. Za merenje reoloških karakteristika emulzija korišćen je cilindar DG41/Ti. Merenja su vršena nakon 24 h od momenta izrade emulzija. Pre ispitivanja, emulzije su ostavljene na sobnoj temperaturi zaštićene od otparavanja vodene faze iz sistema.

Određivanje krivih proticanja rađeno je na sledeći način: emulzije su najpre izlagane postepenom povećanju brzine smicanja od $0,001$ do 100 s^{-1} u toku 120 s, da bi sledećih 60 s brzina smicanja bila konstantna. Nakon toga, poslednjih 120 s brzina smicanja je postepeno opadala do vrednosti od 0 s^{-1} .

Krive proticanja koje su snimane u toku procesa merenja obrađene su programom HAAKE Rheo Win 4 Data Manager (Thermo Scientific, Nemačka).

4.15. Određivanje kriming indeksa emulzija

Kriming indeks (eng. *creaming index*, CI) je određen u cilju kvantitativnog praćenja raslojavanja emulzija na sloj osiromašen kapima disperzne faze i na sloj u kojem su koncentrisane kapi disperzne faze. Praćenje promena visine navedenih slojeva vršeno je u graduiranim menzurama zapremine 10 ml. Nakon pripreme, emulzije su odmah prenete u menzure, zatvorene i ostavljene na sobnoj temperaturi. Kriming indeks je izračunat korišćenjem sledeće jednačine:

$$CI (\%) = \frac{H_s}{H_e} \cdot 100 \quad (4)$$

gde H_s predstavlja visinu sloja osiromašenog kapima disperzne faze (serum), koji se formira u donjem delu menzure, dok H_e predstavlja ukupnu visinu uzorka emulzije. Visine H_s i H_e su očitavane vizuelno [180]. Tokom prvih 24 h nakon izrade emulzija, kriming indeks je praćen u vremenskim razmacima od 1 h. Nakon toga, kriming indeks je praćen narednih 7 dana, očitavanjem vrednosti u vremenskim razmacima od 24 h.

4.16. Statistička obrada podataka

Svi dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Rezultati su obrađeni testiranjem razlike između dobijenih vrednosti primenom sledećih parametrijskih testova: T-testa nezavisnih uzoraka i jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) (za utvrđivanje postojanja statističke značajnosti primenjen je *Tukey HSD post-hoc* test). U cilju procene korelacije rezultata izračunat je Pirsonov koeficijent korelacije. Svi testovi su urađeni na nivou statističke značajnosti od 95% ($p < 0,05$).

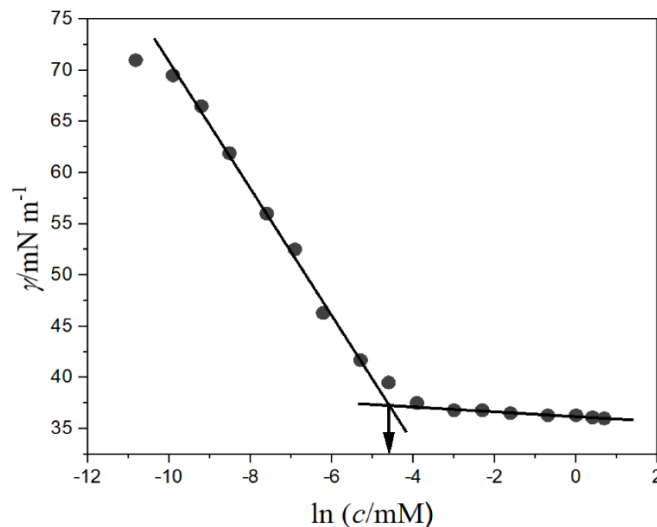
Za obradu podataka korišćeni su programi Microsoft Excel (Microsoft, SAD) i IBM SPSS Statistics verzija 22.0 (SPSS Inc., SAD). Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

5. Rezultati i diskusija

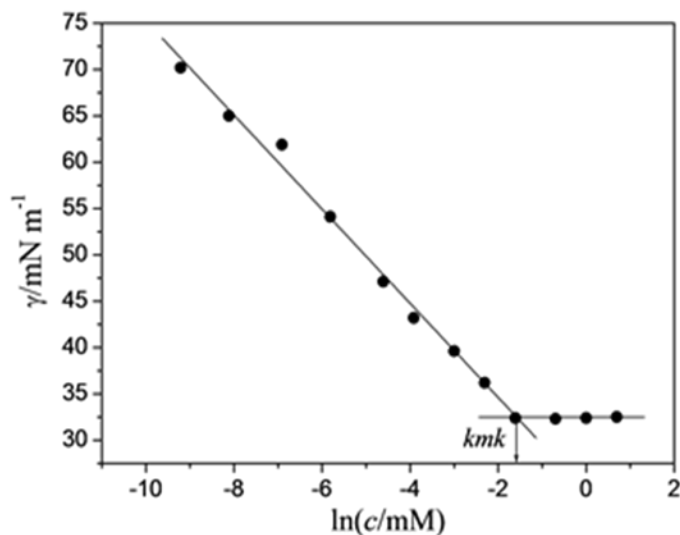
5.1. Određivanje kritičnih micelarnih koncentracija i ispitivanje agregacionih svojstava pojedinačnih surfaktanata i smeša surfaktanata

Kako bi se ispitalo postojanje sinergizma u smešama polimernog surfaktanta i predstavnika klasičnih surfaktanata, određene su vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija, dodatna Gibsova energija i parameter interakcije. Ove vrednosti su određene za smeše surfaktanata Brij S20 i Triton X-100 sa poloksamerom 407 (BS20/P407 i T100/P407). Takođe, ranije je utvrđeno postojanje sinergizma u smešama polimernog surfaktanta poloksamera 407 i polisorbata (Tween 20, Tween 60, Tween 80 i Tween 85). Pored toga, pokazano je da razlike u hemijskoj strukturi hidrofobnih lanaca polisorbata određuju stepen interakcije među molekulima surfaktanata i način njihovog pakovanja u unutrašnjosti mešovityh micela [167].

Eksperimentalno su određene kritične micelarne koncentracije pojedinačnih surfaktanata Brij S20, Triton X-100 i poloksamer 407, kao i binarnih smeša klasičnih surfaktanata sa polimernim surfaktantom, sa različitim molskim udelima polimernog surfaktanta (0,1, 0,5, i 0,9). Kritične micelarne koncentracije su određene pomoću grafika zavisnosti površinskog napona od prirodnog logaritma molarne koncentracije ($\ln(c)$), kao što je prikazano na **Slikama 12 i 13**. Vrednosti cmk^{eks} su dobijene povlačenjem dve prave linije, u opadajućem (premicelarnom opsegu koncentracija) i približno konstantnom delu krive (micelarnom opsegu koncentracija), određivanjem dve jednačine prave (oblika $y=ax+b$) i izračunavanjem njihove presečne tačke rešavanjem sistema dve jednačine po x [167]. Antilogaritmovanjem dobijenih vrednosti, određene su kritične micelarne koncentracije ispitivanih surfaktanata i njihovih smeša. Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija surfaktanata i smeša surfaktanata određene su u vodenim rastvorima bez podešavanja pH vrednosti budući da, prema literaturnim podacima, pH vrednost rastvora ne utiče značajno na vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija surfaktanata [227]. Takođe, u ovom istraživanju je ispitan i uticaj kisele sredine (pH=4) na vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija i nisu uočene razlike u odnosu na vrednosti koje se dobiju u neutralnoj sredini. Osim toga, poređenjem vrednosti cmk^{eks} ekstrakata i rastvora surfaktanata korišćenih za ekstrakciju zapaženo je da prisustvo polifenola u ekstraktima nije uticalo na vrednosti.



Slika 12. Zavisnost površinskog napona od prirodnog logaritma molarne koncentracije smeše surfaktanata BS20/P407 ($\alpha_{\text{P407}}=0.5$). Strelicom je obeležena vrednost kritične micelarne koncentracije



Slika 13. Zavisnost površinskog napona od prirodnog logaritma molarne koncentracije smeše surfaktanata T100/P407 ($\alpha_{\text{P407}}=0.1$). Strelicom je obeležena vrednost kritične micelarne koncentracije

Kako bi se ispitalo postojanje sinergizma u ispitivanim smešama surfaktanata, izračunate su idealne kritične micelarne koncentracije (kmk^{id}) ispitivanih smeša surfaktanata na osnovu Klintove jednačine [228]:

$$1/kmk^{id} = \alpha_1/kmk_1 + \alpha_2/kmk_2 \quad (5)$$

gde su kmk_1 i kmk_2 eksperimentalno dobijene vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija pojedinačnih surfaktanata, α_1 i α_2 su molski udeli pojedinačnih surfaktanata u odgovarajućim smešama. Idealna kritična micelarna koncentracija određene smeše surfaktanata predstavlja kritičnu micelarnu koncentraciju koju bi ta smeša surfaktanata imala kada između surfaktanata ne bi postojala međudejstva. Hipotetičke micide u kojima između različitih surfaktanata ne postoje međudejstva se u literaturi nazivaju „idealne mešovite micide“ i u takvim micelama ne postoje dodatne interakcije u odnosu na jednokomponentne micide [229]. Ukoliko u sistemu surfaktanata postoje privlačna međudejstva, tada je kmk^{eks} manja od kmk^{id} , odnosno u sistemu surfaktanata postoji sinergizam. Vrednosti eksperimentalnih i idealnih kritičnih micelarnih koncentracija, kao funkcije sastava BS20/P407, odnosno T100/P407 smeša surfakatanata, prikazane su u **Tabeli 6**.

Tabela 6. Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija pojedinačnih surfaktanata Brij S20, Triton X-100 i poloksamer 407, i njihovih smeša sa različitim udelima polimernog surfaktanta, kao i termodinamičke karakteristike binarnih sistema surfakatanata

$\alpha(P407)^1$	kmk^{eks} (mM)	kmk^{id} (mM)	x_1	β_{12}	G^E (J/mol)
T100/P407					
0,0	0,2410				
0,1	0,2049	0,1736	0,279	0,763	380,460
0,5	0,1165	0,0819	0,480	3,324	2056,603
0,9	0,0773	0,0537	0,636	6,001	3443,713
1,0	0,0494				
BS20/P407					
0,0	0,0062				
0,1	0,0060	0,0068	0,896	-2,620	-605,184
0,5	0,0098	0,0110	0,816	-0,944	-351,338
0,9	0,0277	0,0291	0,472	-0,197	-121,699
1,0	0,0494				

¹ $\alpha(P407)$ – molski udeo polimernog surfaktanta poloksamer 407 u binarnim smešama

Uočava se da su eksperimentalne vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija za smeše BS20/P407 manje od izračunatih idealnih vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija za sve ispitivane smeše, ukazujući na postojanje sinergizma između surfaktanata unutar mešovitih micela. Takođe, primećuje se da eksperimentalne vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija opadaju sa opadanjem molskog udela polimernog surfaktanta polokamera 407 u smešama, dostižući

minimum u slučaju $\alpha(P407)=0,1$. Osim toga, smeša sa molskim udelom poloksamera od 0,1 ima nižu vrednost k_{mk}^{eks} od vrednosti dobijenih za čist poloksamer 407 i Brij S20, što takođe ukazuje na postojanje sinergizma u smešama BS20/P407.

Kako bi se kvantifikovao sinergizam u binarnim smešama surfaktanata, odnosno kako bi se utvrdilo u kojoj meri su realne mešovite micelle termodinamički stabilnije od idealnih mešovityh micela, određene su vrednosti dodatne Gibsova energije (G^E) i parametar interakcije β_{12} [167, 229]. Negativne vrednosti G^E ukazuju da u sistemu surfaktanata postoje entalpijske i/ili entropijske promene (tj. međudejstva) koje povećavaju termodinamičku stabilnost sistema [229]. U takvim smešama je favorizovano formiranje mešovityh micela, tj. veća je verovatnoća formiranja mešovityh agregata nego „čistih“, jednokomponentnih micela, građenih samo od istog surfaktanta. U sistemima kod kojih je $G^E > 0$ mešovite micelle su manje stabilne od jednokomponentnih micela, usled čega je verovatnoća formiranja mešovityh micela manja, tj. u takvim sistemima ne postoji sinergizam [167, 229].

Dodatna Gibsova energija se računa pomoću Holand-Rubingove jednačine [230]:

$$G^E = RT\beta_{12}(x_1 - (x_1)^2) \quad (6)$$

gde je β_{12} parametar interakcije, x_1 molski udeo hidrofobnijeg surfaktanta u mešovitoj miceli, R je univerzalna gasna konstanta (8,314 J/molK), a T je temperatura (K). Molski udeo hidrofobnijeg surfaktanta u mešovitoj miceli određen je iterativno, na osnovu sledeće jednačine [230, 231]:

$$1 = \frac{(x_1)^2 \ln(\alpha k_{mk}^{eks} / k_{mk_1} x_1)}{(1 - x_1)^2 \ln((1 - \alpha) k_{mk}^{eks} / k_{mk_2} (1 - x_1))} \quad (7)$$

gde je α molski udeo hidrofobnijeg surfaktanta u smeši surfaktanata. Parametar β_{12} se računa po sledećoj jednačini [230, 231]:

$$\beta_{12} = 1/(1 - x_1)^2 \ln(\alpha k_{mk}^{eks} / k_{mk_1} x_1) \quad (8)$$

Prema tome, određivanjem vrednosti x_1 , β_{12} može se odrediti dodatna Gibsova energija. Izračunate vrednosti x_1 , β_{12} i G^E za sve ispitivane smeše prezentovane su u **Tabeli 6**. U tabeli se uočavaju negativne vrednosti G^E za sve ispitivane smeše, što znači da sinergizam postoji u svim ispitivanim molskim odnosima polimernog surfaktanta i Brij S20. Sinergizam je najverovatnije posledica unapređenog pakovanja hidrofobnih delova surfaktanata u jezgru mešovutih micela. Naime, polioksiopropilenski lanci poloksamera 407 sadrže lateralne metil grupe koje otežavaju uklapanje ovih hidrofobnih delova u jezgro jednodokomponentnih micela, što olakšava prodor molekula vode u hidrofobni domen i smanjuje stabilnost agregata. Ova pojava je u skladu sa rezultatima studije u kojoj je zapaženo da molekuli vode u većoj meri prodiru u unutrašnjost micela poloksamera nego micela polisorbata tj. klasičnih surfaktanata [167]. Sa druge strane, prilikom formiranja mešovutih micela polimernog surfaktanta i Brij S20, alifatični, fleksibilni, hidrofobni repovi Brij surfaktanta se verovatno inkorporiraju između polioksiopropilenskih lanaca i poboljšavaju pakovanje micelnog jezgra, smanjujući prodor molekula vode u hidrofobno jezgro, usled čega se povećava stabilnost micela. Pored toga, dobijene negativne vrednosti za parametar interakcije β_{12} ukazuju da između molekula Brij S20 i poloksamera 407 u mešovitim micelama verovatno postoje privlačne entalpijske interakcije, koje doprinose uočenoj stabilnosti u ovim sistemima.

Za razliku od BS20/P407 smeša, smeše T100/P407 imaju veće vrednosti kmk^{eks} od kmk^{id} i pozitivne vrednosti G^E što znači da u ovim smešama nema sinergizma, odnosno veća je težnja surfaktanata ka formiranju „čistih“ micela, nego mešovutih agregata. Može se pretpostaviti da je ovo posledica prisustva sterne krute aromatične grupe u hidrofobnom delu T100, koja za razliku od fleksibilnog alifatičnog hidrofobnog lanca BS20 ne poboljšava pakovanje micelnog jezgra mešovutih agregata sa polimernim surfaktantom. Aromatična grupa Tritona X-100 zbog sterne rigidnosti ne smanjuje prodiranje molekula vode u hidrofobni domen. Zbog toga je verovatnoća formiranja mešovutih micela manja, odnosno, sistem je stabilniji ukoliko su u rastvoru prisutne jednodokomponentne micide građene samo od P407 i T100.

5.2. Ispitivanje efikasnosti konvencionalnih rastvarača u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz komine crnog grožđa

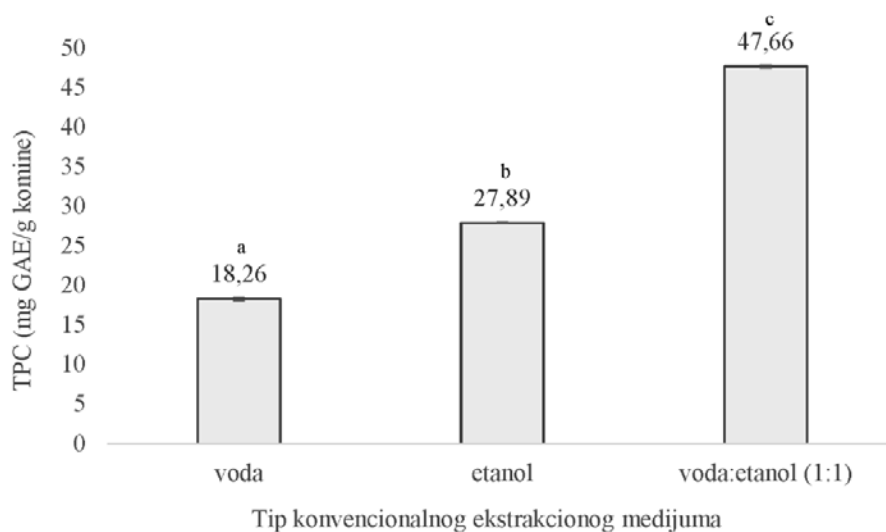
U cilju ispitivanja efikasnosti konvencionalnih rastvarača - vode, 96% etanola i smeše vode i 96% etanola u razmeri 1:1 (V/V) u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz komine crnog grožđa određen je sadržaj ukupnih fenola i sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima, *in vitro* antioksidativni potencijal ekstrakata u vidu sposobnosti neutralizacije DPPH slobodnih radikala, kao i sposobnost ekstrakata za inhibiciju enzima ksantin oksidaze.

5.2.1 Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa dobijenim primenom odabranih konvencionalnih rastvarača

5.2.1.1 Uticaj tipa primenjenog konvencionalnog rastvarača na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom odabranih konvencionalnih rastvarača pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine 100:1 i pH=4 prikazan je na **Slici 14**. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u efikasnosti ekstrakcije polifenola iz komine grožđa uočene su između ispitivanih rastvarača, pri čemu se smeša vode i 96% etanola u razmeri 1:1 izdvojila kao najefikasnija, sa sadržajem ukupnih fenola u ekstraktu od $47,66 \pm 0,08$ mg GAE/g komine. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima, kojima je pokazano da smeša vode i etanola u razmeri 1:1 ima najveću sposobnost ekstrakcije polifenola iz komine grožđa sorte *Cabernet* u poređenju sa vodom, etanolom, smešama vode i etanola u razmerama 3:1 i 1:3, metanolom i etil-acetatom [16]. Ovakvi rezultati potvrđeni su i istraživanjima na komini crnog grožđa sorte *Barbera*, u kojima su smeše vode i etanola sa udelom vode od 30 do 50% ispoljile najveći potencijal za ekstrakciju polifenola [130]. Ranijim istraživanjima je takođe pokazano da su vodeni rastvori etanola, metanola i acetona efikasniji u ekstrakciji fenolnih jedinjenja iz samlevenog semena *Vitis rotundifolia*, u poređenju sa primenom vode ili čistih organskih rastvarača, pri čemu su se među ispitanim vodeno-etanolnim sistemima kao najefikasniji izdvojili sistemi rastvarača u kojima je udeo etanola između 50% i 70% [232]. Ovim istraživanjem potvrđene su tvrdnje da vrsta i polarnost upotrebljenih konvencionalnih rastvarača određuju prinos ekstrakcije polifenola iz komine grožđa. Iako stepen hidrofilnosti/lipofilnosti fenolnih derivata određuju broj i stepen konjugacije fenolnih grupa, oni se generalno smatraju polarnim jedinjenjima i polarni protični

rastvarači obezbeđuju najbolje rezultate ekstrakcije [121]. Pretpostavljeno je da se upotrebom polarnih konvencionalnih rastvarača u većoj meri ekstrahuju polarnija polifenolna jedinjenja od manje polarnih, koja se zadržavaju u komini [168]. Prema Nayak i sar. (2018), visoka efikasnost smeše vode i etanola u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz biljnog materijala posledica je sinergističkog delovanja ova dva rastvarača na bubrenje strukturnih polisaharida ćelijskih zidova, tj. izbegava se dehidratacija materijala pod uticajem čistog etanola, što smanjuje mogućnost difuzije polifenola u ekstrakcioni medijum [16]. Pored toga, prisustvo vode u smešama sa organskim rastvaračima slabi postojeće vodonične veze između polifenola i komponenti ćelijskog matriksa, obezbeđujući visok prinos ekstrakcije vodeno-etanolnih rastvarača [16]. Uzimajući u obzir prisustvo velikog broja različitih polifenolnih jedinjenja u komini grožđa, kao i širok opseg polarnosti, uočene razlike u efikasnosti ekstrakcije (tj. u sadržaju ukupnih fenola u ekstraktima) među ispitanim konvencionalnim rastvaračima verovatno predstavljaju posledicu sposobnosti rastvarača za rastvaranje i polarnih i nepolarnih polifenolnih jedinjenja.

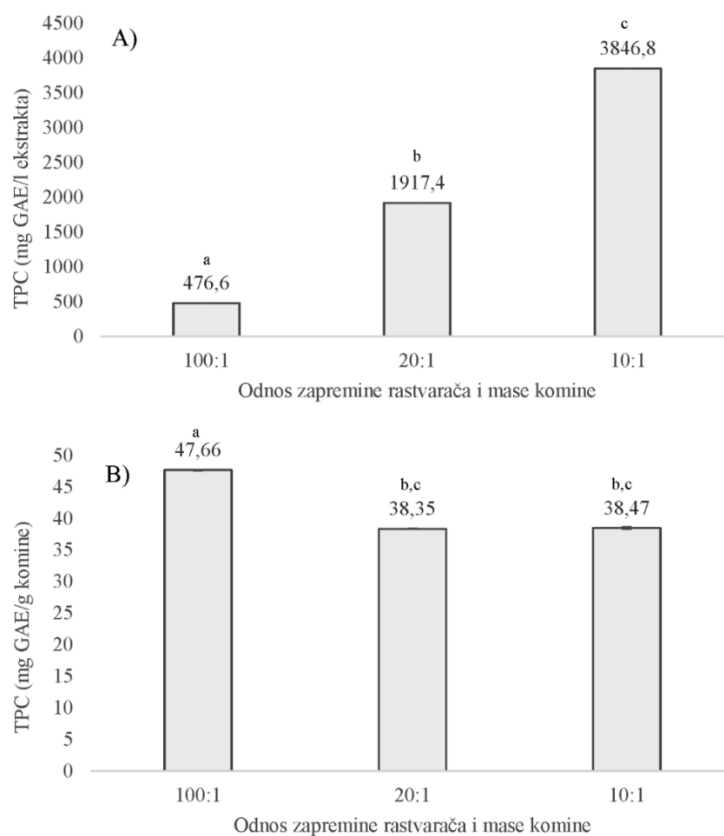


Slika 14. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom konvencionalnih rastvarača

5.2.1.2 Uticaj odnosa zapremine rastvarača i mase komine na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa

U cilju ispitivanja uticaja odnosa zapremine rastvarača i mase uzorka na efikasnost ekstrakcije konvencionalnih rastvarača, sadržaj ukupnih fenola je određen u ekstraktima dobijenim primenom smeše vode i etanola (1:1), kao najefikasnijeg među ispitanim konvencionalnim rastvaračima,

pri odnosima zapremine rastvarača i mase komine 100:1, 20:1 i 10:1, i pH vrednosti 4. Promenom odnosa zapremine rastvarača i mase komine od viših ka nižim vrednostima uočeno je povećanje koncentracije polifenola u dobijenim ekstraktima (**Slika 15A**). Takođe, promenom odnosa zapremine rastvarača i mase komine od 100:1 do 20:1 uočeno je smanjenje efikasnosti ekstrakcije u vidu smanjenja mase ekstrahovanih polifenola po jedinici mase komine, dok se daljim smanjenjem odnosa zapremine rastvarača i mase komine na 10:1 efikasnost ekstrakcije smeše vode i etanola nije značajno promenila (**Slika 15B**).



Slika 15. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom konvencionalnog rastvarača voda:etanol (1:1) pri odnosima zapremine rastvarača i mase komine 100:1, 20:1 i 10:1, izražen kao: A) koncentracija polifenola u ekstraktima i B) masa ekstrahovanih polifenola po jedinici mase komine. ^{a-c} Srednje vrednosti sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima za različite odnose zapremine rastvarača i mase komine, različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$)

Isti efekat primenjene zapremine rastvarača na efikasnost ekstrakcije uočen je i prilikom primene vode kao ekstrakcionog medijuma za ekstrakciju polifenola iz komine crnog grožđa sorte *Cabernet*. Među ispitanim razmerama rastvarač/uzorak (10:1, 20:1 i 40:1), najvećom razmerom je postignut najviši sadržaj ukupnih fenola izražen kao masa ekstrahovanih polifenola po jedinici mase komine [16]. Slični rezultati dobijeni su i pri ekstrakciji polifenola iz nadzemnog dela biljke *Thymus serpyllum* primenom vodeno-etanolnih rastvarača pri razmerama zapremine rastvarača i mase uzorka od 10:1, 20:1 i 30:1 [233]. Pozitivan uticaj većih zapremina rastvarača na efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja je uočen i u slučaju ultrazvukom potpomognute ekstrakcije polifenola iz plodova *Lycium ruthenicum* vodeno-etanolnim rastvaračima, gde su ispitani sledeći odnosi zapremine rastvarača i mase uzorka: 20:1, 30:1 i 40:1 [234]. Efikasnija ekstrakcija polifenola iz biljnog materijala većim zapreminama rastvarača u odnosu na masu uzorka je u literaturi objašnjena većim koncentracionim gradijentom, koji ima glavnu ulogu u transferu mase u ekstrakcionom postupku, što za posledicu ima veći stepen difuzije i prinos ekstrakcije [16]. U takvim uslovima proces ekstrakcije polifenola je brži, ali je koncentracija fenola u ekstraktu niža [235]. Još jedan razlog niskih vrednosti sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim prilikom ekstrakcije sa malim zapreminama rastvarača u odnosu na masu uzorka je i visoka viskoznost takvih sistema, koja ometa difuziju polifenola u ekstrakcionom medijumu [233].

5.2.1.3 Uticaj sukcesivne ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa

Smeša vode i etanola (1:1), kao najefikasniji među ispitanim konvencionalnim rastvaračima, upotrebljena je za ispitivanje efikasnosti sukcesivnih postupaka ekstrakcije polifenola iz komine grožđa. Ekstrakcija je izvedena u tri stepena, pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine od 100:1 i pri pH=4. U postupku sukcesivne ekstrakcije su u svakom narednom stepenu na novim uzorcima komine korišćeni ekstrakti iz prethodnog ekstrakcionog koraka. Istovremeno je izvedena i ekstrakcija istim rastvaračem pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine od 100:3, u cilju poređenja dobijenih rezultata. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima prikazan je u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom smeše vode i etanola (1:1), u postupku sukcesivne ekstrakcije i u kontrolnom ekstrakcionom postupku

Rastvarač	Stepen ekstrakcije	TPC (mg GAE/l ekstrakta)	TPC (mg GAE/g komine)
Voda:etanola (1:1)	prvi	391,2 ± 0,09 ^a	39,1 ± 0,01 ^a
	drugi	887,2 ± 1,31 ^b	44,4 ± 0,13 ^{bc}
	treći	1342,7 ± 0,56 ^c	44,7 ± 0,05 ^{bc}
	kontrola	1205,05 ± 0,14	40,02 ± 0,01

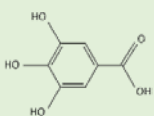
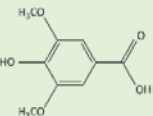
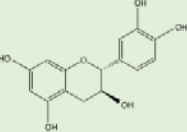
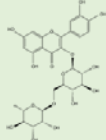
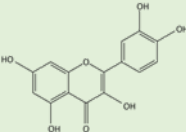
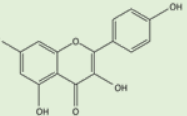
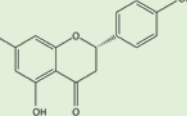
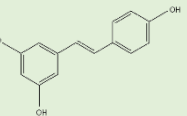
^{a-c} Srednje vrednosti sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim sukcesivnom ekstrakcijom, različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$)

Zapažen je porast koncentracije fenola u ekstraktima od prvog prema trećem stepenu ekstrakcije, dok je sadržaj ekstrahovanih fenola po jedinici mase komine (mg GAE/g komine) bio uporediv u sva tri stepena, što ukazuje da ograničenje u efikasnosti ekstrakcije potiče od ukupnog sadržaja polifenola u uzorku komine. U kontrolnom ekstrakcionom postupku upotrebom smeše vode i etanola dobijena je koncentracija polifenola uporediva sa vrednošću dobijenom u trećem stepenu sukcesivne ekstrakcije, a takođe je i efikasnost kontrolne ekstrakcije polifenola, izražena kao mg GAE/g komine, bila uporediva sa sva tri stepena ekstrakcije. U prilog navedenom zaključku idu i prethodna istraživanja efikasnosti sukcesivne ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz perikarpa nara primenom vode pod visokim pritiskom [236]. Naime, u postupku sukcesivne ekstrakcije primenom istog uzorka i „svežih” ekstrakcionih medijuma ustanovljeno je da se u prvom ciklusu ekstrahuje 81,7% od vrednosti sadržaja ukupnih fenola za pet ciklusa. Drugim, trećim i četvrtim ciklusom ekstrahovano je oko 90%, 95% i 99% fenola [236].

5.2.2 Sadržaj pojedinačnih fenolnih komponenti u ekstraktima dobijenim primenom konvencionalnih rastvarača

Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja određen je u ekstraktima dobijenim primenom svih ispitivanih konvencionalnih rastvarača pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine od 100:1 i pri pH=4. Pored toga, sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja određen je u vodeno-etanolnim ekstraktima dobijenim pri višim odnosima zapremine rastvarača i mase komine (20:1 i 100:1). Rezultati su prikazani u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Koncentracija polifenola (mg/l) u ekstraktima komine grožđa dobijenim primenom konvencionalnih rastvarača vode, etanola i smeše vode i etanola (1:1) pri odnosu zapremine i rastvarača 100:1 i pH=4, kao i u vodeno-etanolnim ekstraktima dobijenim pri različitim odnosima zapremine rastvarača i mase komine, određeno HPLC metodom

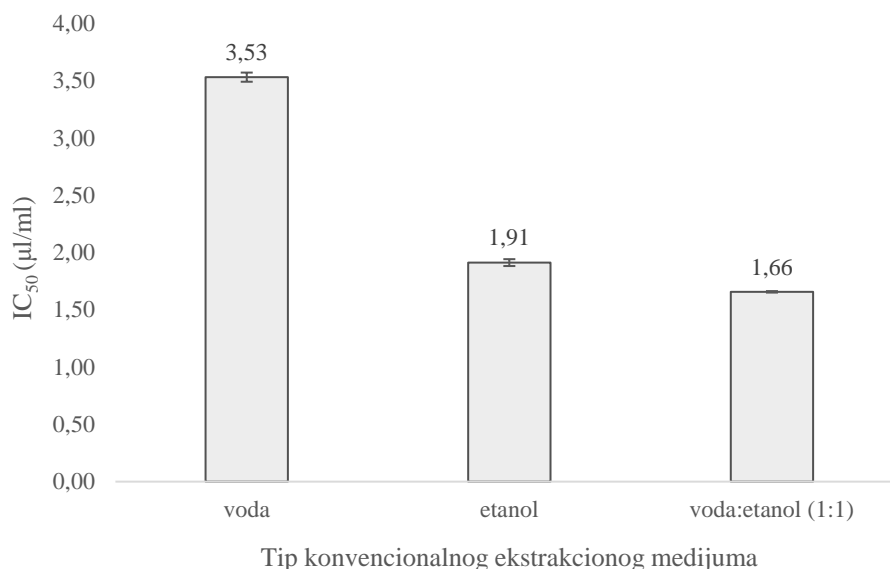
Ekstrakcioni medijum	Odnos zapremine rastvarača i mase komine	Fenolne kiseline		Flavan-3-oli		Flavonoli		Flavanoni	Stilbeni	Ukupno
		Galna kiselina	Siringinska kiselina	Katehin	Rutin	Kvercetin	Kempferol	Naringenin	Resveratrol	
										
Voda:etanol (1:1)	100:1	0,65 ± 0,003 ^a	0,95 ± 0,03 ^a	3,91 ± 0,10 ^a	2,24 ± 0,04 ^a	2,54 ± 0,004 ^a	0,50 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,0003 ^a	ND ^a	10,89 ± 0,19 ^a
	20:1	3,70 ± 0,05 ^b	4,86 ± 0,09 ^b	16,00 ± 0,13 ^b	6,68 ± 0,21 ^b	16,17 ± 0,05 ^b	2,89 ± 0,06 ^b	1,41 ± 0,04 ^b	0,24 ± 0,04 ^b	51,96 ± 0,67 ^b
	10:1	6,86 ± 0,23 ^c	8,14 ± 0,11 ^c	33,56 ± 0,22 ^c	10,51 ± 0,47 ^c	24,30 ± 0,30 ^c	4,21 ± 0,06 ^c	2,08 ± 0,10 ^c	0,29 ± 0,03 ^c	89,95 ± 1,52 ^c
Voda	100:1	0,72 ± 0,002	0,88 ± 0,06	2,33 ± 0,08	0,83 ± 0,01	ND	ND	ND	ND	4,77 ± 0,15
Etanol	100:1	0,48 ± 0,01	0,31 ± 0,05	0,88 ± 0,13	0,95 ± 0,005	2,93 ± 0,003	0,54 ± 0,01	0,13 ± 0,01	ND	6,22 ± 0,22

¹ND: Komponenta nije detektovana

^{a-c} Srednje vrednosti koncentracije ± standardna devijacija (n=3) za jednu polifenolnu komponentu u vodeno-etanolnim ekstraktima pri različitim odnosima zapremine rastvarača i mase komine, različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

Između ekstrakata dobijenih različitim konvencionalnim rastvaračima se uočavaju razlike u ukupnom sadržaju pojedinačnih fenolnih jedinjenja: najniži ukupni sadržaj je imao vodeni ekstrakt, dok je najviši ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja zapažen u vodeno-etanolnom ekstraktu. Takođe, najmanji broj fenolnih jedinjenja je detektovan u vodenom ekstraktu. U vodenom ekstraktu su koncentracije manje polarnih fenolnih jedinjenja (npr. kvercetin i kempferol) bile ispod limita detekcije, što nije bio slučaj u ekstraktima dobijenim primenom etanola i smeše vode i etanola. Kvalitativni profil fenolnih jedinjenja vodenog ekstrakta odgovara profilu fenolnih jedinjenja vodenog ekstrakta komine crnog grožđa sorte *Montepulciano* [56]. Na osnovu tabelarno prikazanih rezultata se može zapaziti da je najzastupljenije fenolno jedinjenje u vodenom ekstraktu bio katehin, dok je sadržaj ostalih fenolnih jedinjenja značajno niži, što je takođe u saglasnosti sa literaturnim podacima [56]. Kvalitativni profil fenolnih jedinjenja vodeno-etanolnih ekstrakta u saglasnosti je sa rezultatima prethodnih istraživanja, gde su u vodeno-etanolnom ekstraktu komine crnog grožđa (sorte *Cabernet*) dobijenom pri zapremini rastvarača i mase komine od 20:1 detektovani i kvercetin i resveratrol [16].

5.2.3 Antioksidativni kapacitet ekstrakata – sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala

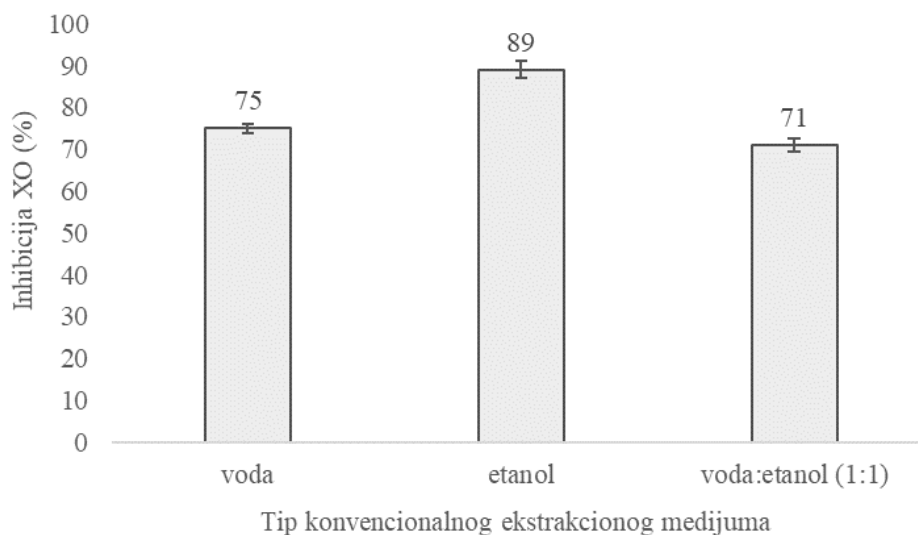


Slika 16. Sposobnost ekstrakata dobijenih konvencionalnim rastvaračima za neutralizaciju DPPH slobodnih radikala (IC₅₀ vrednost)

Svi ekstrakti dobijeni primenom konvencionalnih rastvarača (voda, 96% etanol i smeša vode i 96% etanola (1:1)) ispoljili su antioksidativnu aktivnost. Najvišu aktivnost je imao vodeno-etanolni ekstrakt (najniža IC₅₀ vrednost), dok je najnižu aktivnost pokazao vodeni ekstrakt (najviša IC₅₀ vrednost), što je u saglasnosti sa sadržajem ukupnih fenola i pojedinačnih fenolnih jedinjenja u navedenim ekstraktima (**Slika 16**). Uočena relacija je u saglasnosti sa ranijim studijama, kojima je pokazan visok stepen korelacije između antioksidativnog kapaciteta ekstrakata i koncentracije fenolnih jedinjenja [232].

5.2.4 Sposobnost ekstrakata za inhibiciju ksantin oksidaze

Enzim ksantin oksidaza je odgovoran za nastajanje mokraćne kiseline od purinskih baza hipoksantina i ksantina, a takođe predstavlja i značajan biološki izvor kiseoničnih slobodnih radikala, čime doprinosi nastanku oksidativnih oštećenja tkiva [225]. *In vitro* testom je izvršeno ispitivanje sposobnosti ekstrakata dobijenih primenom konvencionalnih rastvarača (voda, 96% etanol i smeša vode i 96% etanola (1:1)) da inhibišu enzim ksantin oksidazu (**Slika 17**). Ekstrakti dobijeni primenom konvencionalnih rastvarača ispoljili su izuzetno visoku sposobnost inhibicije ksantin-oksidaze.



Slika 17. Stepen inhibicije ksantin oksidaze ekstrakata dobijenih konvencionalnim rastvaračima

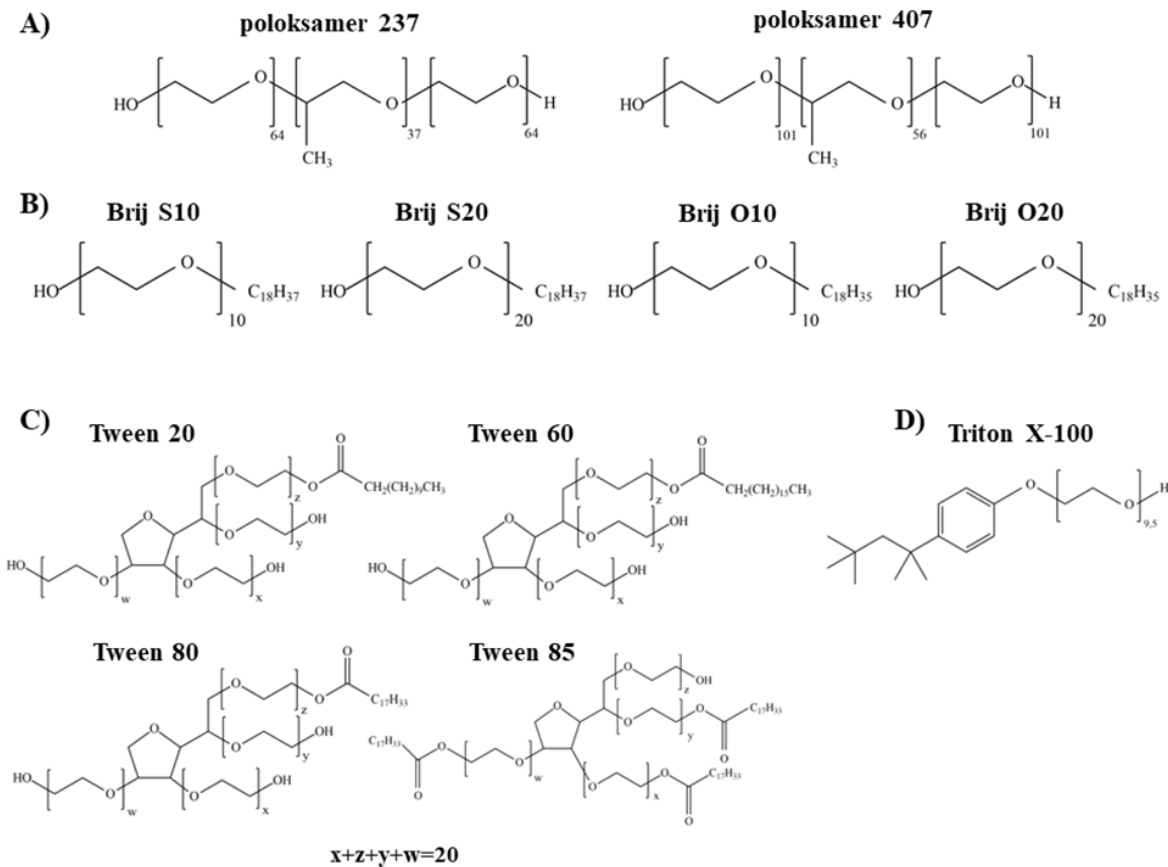
5.3. Ispitivanje efikasnosti vodenih rastvora pojedinačnih nejonskih surfaktanata u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz komine crnog grožđa

U cilju ispitivanja efikasnosti vodenih rastvora različitih tipova nejonskih surfaktanata u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz komine crnog grožđa određen je sadržaj ukupnih fenola i sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima, *in vitro* antioksidativni potencijal ekstrakata u vidu sposobnosti neutralizacije DPPH slobodnih radikala, sposobnost ekstrakata za inhibiciju enzima ksantin oksidaze, kao i uticaj ekstrakcije polifenola na veličinu micela.

5.3.1 Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa dobijenim primenom vodenih rastvora pojedinačnih nejonskih surfaktanata

5.3.1.1 Uticaj tipa nejonskog surfaktanta na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa

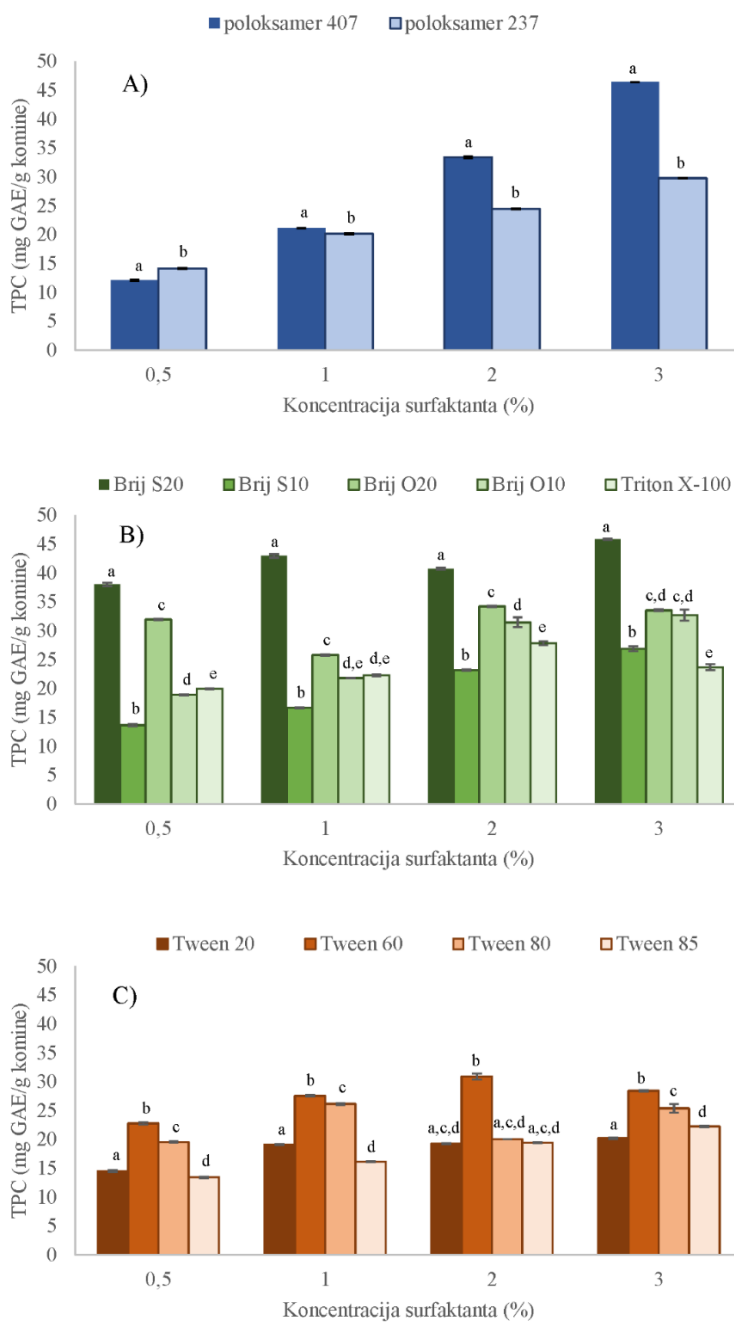
Kako bi se ispitaio uticaj tipa nejonskog surfaktanta i njegove hemijske strukture na efikasnost ekstrakcije polifenola iz komine crnog grožđa, određen je sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora 11 predstavnika nejonskih surfaktanata iz grupa poloksamera, Brij, Tween i Triton (hemijske strukture surfaktanata prikazane su na **Slici 18**). Ispitani su vodeni rastvori poloksamera 237, poloksamera 407, Brij S10, Brij S20, Brij O10, Brij O20, Tween 20, Tween 60, Tween 80, Tween 85 i Triton X-100, pripremljeni u koncentracijama 0,5%, 1%, 2% i 3% (m/V), pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine 100:1 i pri pH=4.



Slika 18. Hemijske strukture A) poloksamer, B) Brij i C) Tween surfaktanata, kao i D) Triton-a X-100

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom surfaktanata iz grupe poloksamera (poloksamer 237 i poloksamer 407) predstavljen je grafički (**Slika 19A**). Od ispitanih triblok kopolimera, poloksamer 407 je generalno pokazao veću efikasnost ekstrakcije polifenola iz komine u poređenju sa poloksamerom 237. Uočene razlike u efikasnosti ekstrakcije polifenola između ispitanih predstavnika triblok kopolimera verovatno su uzrokovane razlikama u dužini i hidrofилnih i hidrofobnih delova molekula surfaktanata. Naime, prema podacima dostupnim na deklaracijama ispitivanih surfaktanata, molekuli poloksamera 407 sadrže u proseku 101 jedinicu monomera oksietilena u svakom od dva hidrofилna lanca i 56 monomernih jedinica oksipropilena u hidrofobnom delu molekula, dok molekuli poloksamera 237 u proseku sadrže po 64 oksietilenskih i 37 oksipropilenskih jedinica. Može se pretpostaviti da ekstrakcija vodenim rastvorima poloksamera 407 obezbeđuje viši sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima zbog većeg

kapaciteta za solubilizaciju i polarnijih i manje polarnih polifenolnih jedinjenja unutar micela zahvaljujući dužim hidrofилnim i hidrofobnim lancima ovih molekula.



Slika 19. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora različitih koncentracija nejonskih surfaktanata: A) poloksamer, B) Brij i Triton i C) Tween. ^{a-e} Srednje vrednosti sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima različitih surfaktanata pri istoj koncentraciji, različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

U poređenju sa konvencionalnim rastvaračima vodom i etanolom (**Slika 14**), ispitanim pod istim ekstrakcionim uslovima, primenom 3% (m/V) rastvora poloksamera 407 dobijeni su ekstrakti sa 2,5 i 1,6 puta višim sadržajem ukupnih fenola. Pored toga, sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom 3% rastvora poloksamera 407 uporediv je sa sadržajem u vodeno-etanolnom ekstraktu.

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora Brij i Triton surfaktanata različite koncentracije prikazan je na **Slici 19B**. Surfaktanti Brij S20 i Brij O20 su na svim koncentracionim nivoima pokazali veću efikasnost ekstrakcije u poređenju sa Brij S10 i Brij O10. Ovakav efekat se može objasniti razlikama u hemijskoj strukturi navedenih surfaktanata. Naime, molekuli Brij S20 i Brij O20 sadrže po 20 oksietilenskih jedinica unutar svojih hidrofilnih lanaca, dok molekuli Brij S10 i Brij O10 u hidrofilnim lancima sadrže po 10 monomera oksietilena. Osim toga, uočava se veća efikasnost rastvora Brij S20 i Brij O20 u poređenju sa rastvorom Tritona X-100, čiji hidrofilni delovi molekula sadrže u proseku 9 do 10 oksietilenskih jedinica. Navedene razlike u sadržaju ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom Brij i Triton surfaktanata ukazuju na postojanje uticaja dužine hidrofilnih oksietilenskih lanaca molekula surfaktanata na njihovu sposobnost ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala, odnosno na veću efikasnost ekstrakcije nejonskih surfaktanata sa dužim oksietilenskim nizovima. U poređenju sa Triton X-100 i svim Brij surfaktantima, Brij S20 pokazao je najveći potencijal za ekstrakciju polifenola iz komine grožđa. Poređenjem sa efikasnošću ekstrakcije konvencionalnih rastvarača uočava se da je sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima Brij S20 bio daleko viši od sadržaja u vodenom i etanolnom ekstraktu ponaosob, dok je bio uporediv sa vrednosti dobijenom za vodeno-etanolni ekstrakt. Ranijim istraživanjima je takođe pokazano da vodeni rastvori Brij 35 surfaktanta imaju veći kapacitet ekstrakcije polifenolnih jedinjenja (zaključeno na osnovu ukupne koncentracije fenola dobijene hromatografskom analizom) u poređenju sa nejonskim surfaktantima Triton X-100 i PEG 2000, kao i u poređenju sa jonskim surfaktantima cetiltrimetilamonijum bromidom i natrijum dodecil sulfatom, kada su primenjeni na uzorak jabuke [136]. Osim toga, najveća sposobnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz začinskih biljaka je dobijena primenom vodenih rastvora Brij 35, u poređenju sa Tritonom X-100, natrijum dodecil sulfatom i cetilpiridinium bromidom, u ekstrakciji potpomognutom ultrazvučnim talasima, gde su se kao parametri efikasnosti ekstrakcije koristile vrednosti ukupnog antioksidativnog kapaciteta, sposobnost redukcije Fe^{3+} , sposobnost redukcije Ce^{4+} i sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala [174]. Ispitivanjem uticaja

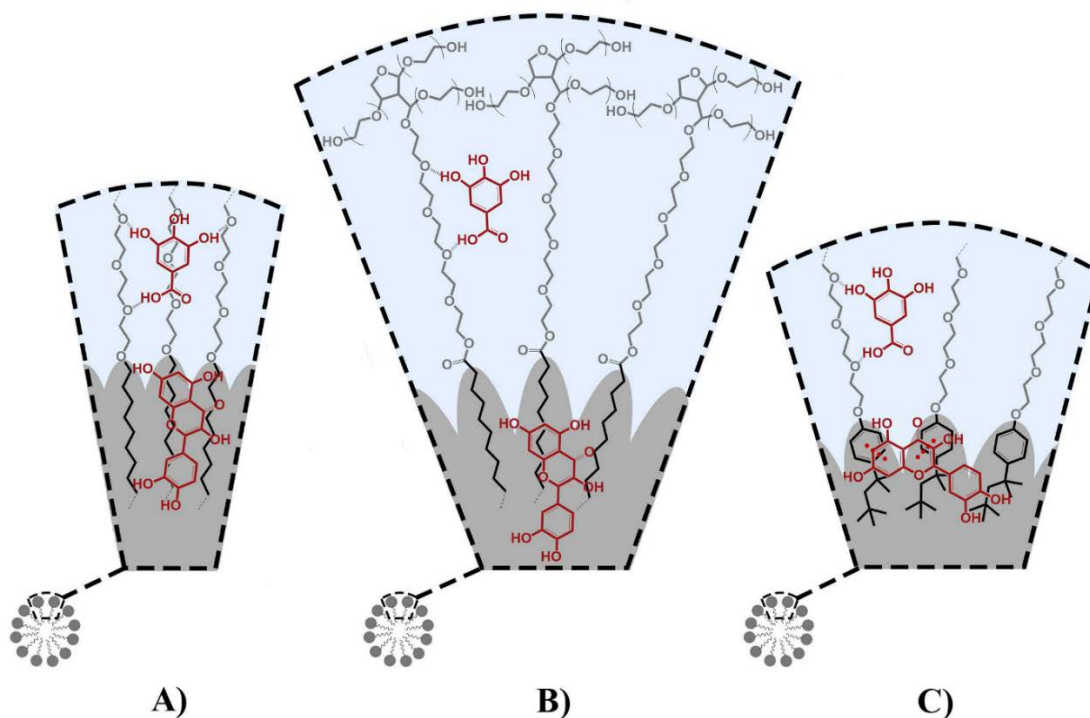
tipa surfaktanta na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima soka jabuke, slatkog limuna i manga ustanovljeno je da među nejonskim surfaktantima (Brij 58, Brij 35, Triton X-100 i Span 40) vodeni rastvor Brij 58 (polioksietilen (20) cetil etar), a potom i Brij 35 (polioksietilen (23) lauril etar) postižu najveću efikasnost kada se primene kao ekstrakciona sredstva [168]. Pored toga, surfaktant Brij 58 je pokazao veću efikasnost ekstrakcije u poređenju sa Brij 35, što je objašnjeno dužim hidrofobnim delom molekula prvog surfaktanta, dok se dužine hidrofilnih delova ovih molekula smatraju uporedivim [168]. Suprotno rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, Śliwa i Śliwa (2020) uočili su viši sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima stabljike *Biden's tripartite* dobijenim primenom nejonskih surfaktanata sa manjim brojem oksietilenskih jedinica kada je primenjena ultrazvučnim talasima potpomognuta ekstrakcija vodenim rastvorima surfaktanata Steareth-20, Oleth-20, Oleth-10, and Oleth-5 [173].

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora Tween surfaktanata različitih koncentracija prikazan je na **Slici 19C**. Dobijeni rezultati pokazuju veći kapacitet vodenih rastvora Tween surfaktanata za ekstrakciju polifenola u poređenju sa vodom. Međutim, efikasnost ekstrakcije ovih rastvora je niža u poređenju sa ostalim ispitanim tipovima surfaktanata (**Slika 19A i 19B**). Vodeni rastvor Tween 60 je bio najefikasniji ekstrakcioni medijum među ispitanim Tween surfaktantima, na svim ispitanim koncentracionim nivoima. Efikasnost Tween surfaktanata u jednostavnom postupku ekstrakcije fenolnih komponenti ispitana je i na uzorku komine jabuke dobijenoj nakon proizvodnje soka, gde je pokazano da Tween 80 daje ekstrakte sa najvišim sadržajem ukupnih fenola u poređenju sa Tween 20, Triton X-100 i Span 20 surfaktantima, kao i u poređenju sa vodom i 70% etanolom [171]. Osim toga, u ekstrakciji polifenola potpomognutoj ultrazvučnim talasima iz uzorka stabljike i listova *Ampelopsis grossedentata* Tween 80 je pokazao znatno višu efikasnost od Triton-a 114 i vode, gde je sadržaj ukupnih fenola određen u ekstraktima nakon „*cloud point*” prekoncentracije [169].

5.3.1.1.1 Predloženi mehanizmi solubilizacije polifenola unutar micela ispitanih tipova nejonskih surfaktanata

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da ispitivani Tween surfaktanti nisu efikasni u ekstrakciji polifenola iz komine grožđa kao Brij S20 i poloksamer 407, što može biti posledica postojanja rigidnog hidrofilnog dela unutar molekula polisorbata koji smanjuje mogućnost gustog pakovanja molekula surfaktanata u micelama. Poznato je da svi ispitanii surfaktanti u vodenim rastvorima pri

koncentracijama jednakim ili višim od kritične micelarne koncentracije formiraju sferne micelle [141]. Molekuli surfaktanata se prilikom formiranja micela orijentišu tako da alkil lanci čine hidrofobno jezgro micela, dok se na površini jezgra micela obrazuju „šupljine”, odnosno prostori koji mogu biti ispunjeni ili polioksietilenskim nizovima molekula surfaktanata ili molekulima vode. Suprotno od Brij surfaktanata, Tween surfaktanti poseduju rigidnu strukturu sorbitana u okviru hidrofilne glave molekula. Pretpostavlja se da zbog postojanja rigidne strukture unutar molekula, površina jezgra micela Tween surfaktanata verovatno nije kompaktna kao u slučaju Brij surfaktanata, što dalje omogućava molekulima vode da penetriraju u unutrašnjost micela (**Slika 20A i 20B**). Ova pojava smanjuje sposobnost micela Tween surfaktanata za solubilizaciju polifenolnih molekula u hidrofobnom jezgru. Istovremeno, između molekula polifenola i spoljašnjeg, hidrofilnog omotača micela Tween surfaktanata se gradi manji broj vodoničnih veza u poređenju sa micelama Brij surfaktanata, zbog manje kompaktnog omotača micela usled prisustva rigidne strukture sorbitana u hidrofilnom delu molekula polisorbata. Kao posledica navedene pojave, smanjen je stepen solubilizacije polifenola i unutar hidrofilnog omotača micela Tween surfaktanata.



Slika 20. Pretpostavljeni mehanizmi solubilizacije polifenola u micelama nejonskih surfaktanata:

A) Brij, B) Tween i C) Triton X-100

Visoka efikasnost ekstrakcije polifenola vodenim rastvorima poloksamera može se pripisati većoj molekulskoj masi ovih polimernih surfaktanata u poređenju sa ispitanim klasičnim nejonskim surfaktantima (grupe Tween, Brij i Triton surfaktanata). Naime, kao posledica postojanja dužih polioksietilenskih nizova, hidrofilni region micela poloksamera zauzima mnogo veću zapreminu i posledično ima sposobnost vezivanja većeg broja molekula polifenola formiranjem vodoničnih veza. Istovremeno, zbog dugačkih polioksipropilenskih nizova u molekulima poloksamera hidrofobno jezgro njihovih micela zauzima mnogo veću zapreminu nego što je to slučaj u micelama konvencionalnih surfaktanata. Može se pretpostaviti da ova pojava doprinosi većoj sposobnosti solubilizacije manje polarnih polifenola.

Sposobnost micela Triton X-100 da solubilizuju polifenolne komponente komete grožđa je takođe uočena. Pored solubilizacije u spoljašnjem hidrofilnom regionu micela sastavljenom od polioksietilenskih nizova, moguće je da se solubilizacija polifenolnih jedinjenja u micelama Tritona X-100 jednim delom dešava i zbog postojanja fenil grupe u nepolarnom delu molekula surfaktanta, koje su pozicionirane na površini jezgra micela. Ovakav položaj fenil grupe u micelama Triton-a X-100 verovatno omogućava stvaranje privlačnih π - π interakcija sa aromatičnim grupama molekula polifenola. Navedene interakcije mogu doprineti stabilnosti polifenolnih jedinjenja unutar micela Triton-a X-100 i posledično povećavati sposobnost solubilizacije polifenola (**Slika 20C**).

Za razliku od polarnih konvencionalnih rastvarača (koji u najvećoj meri ekstrahuju polarna polifenolna jedinjenja, a u manjoj meri nepolarna jedinjenja), vodeni rastvori nejonskih surfaktanata koji sadrže polioksietilenske lance povećavaju sposobnost ekstrakcije i za polarne i za nepolarne polifenolne komponente, preko dva pretpostavljena mehanizma. Prvi mehanizam se zasniva na formiranju vodoničnih veza između kiseonika oksietilenskih grupa u spoljašnjem polarnom delu micela i hidroksilnih grupa polifenola. Sa druge strane, između delova molekula surfaktanata koji grade jezgro micela i lipofilnih delova molekula polifenola se verovatno ostvaruju hidrofobne interakcije. Dobijeni rezultati ukazuju da specifičnosti hemijske strukture različitih tipova surfaktanata, kao što je dužina oksietilenskog niza hidrofilnog dela molekula ili veličina hidrofobnog dela, u značajnoj meri utiču na efikasnost ekstrakcije polifenola.

5.3.1.2 Uticaj koncentracije surfaktanta na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa

U cilju ispitivanja uticaja koncentracije surfaktanta na efikasnost ekstrakcije polifenola iz komine crnog grožđa, upoređen je sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora 11 nejonskih surfaktanta (poloksamer 237, poloksamer 407, Brij S10, Brij S20, Brij O10, Brij O20, Tween 20, Tween 60, Tween 80, Tween 85 i Triton X-100) sledećih masenih koncentracija: 0,5%, 1%, 2% i 3% (m/V). Dodatno je ispitana efikasnost ekstrakcije rastvora surfaktanta Brij S20 i poloksamer 407 (koji su se pokazali kao najefikasniji) u koncentraciji od 5% (m/V). Ekstrakcija je vršena pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine 100:1.

U većini ispitanih sistema je uočen porast sadržaja ekstrahovanih fenola sa povećanjem koncentracije surfaktanta u rastvoru (**Slika 19**). Vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije između sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima i primenjene koncentracije surfaktanta za ekstrakciju prikazane su tabelarno (**Tabela 9**). Uočene su veoma jaka i jaka korelacija za sledeće surfaktante: poloksamer 237, poloksamer 407, Brij S10, Brij S20, Brij O10, Tween 20 i Tween 85.

Tabela 9. Vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije između sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima i primenjene koncentracije surfaktanta za ekstrakciju

Surfaktant	Vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije
Poloxamer 237	0,981*
Poloxamer 407	0,998*
Brij S10	0,990*
Brij S20	0,786*
Brij O10	0,928*
Brij O20	0,538
Tween 20	0,817*
Tween 60	0,603*
Tween 80	0,283
Tween 85	0,992*
Triton X-100	0,452

* Korelacija se smatra značajnom na nivou $p=0,01$

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom 3% rastvora poloksamera 407 i Brij S20 bio je najviši u poređenju sa ostalim koncentracijama ($46,40 \pm 0,01$ mg GAE/g komine za

poloksamer 407 i $45,84 \pm 0,10$ mg GAE/g komine za Brij S20). Ove vrednosti su uporedive sa sadržajem ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom smeše vode i etanola. Prilikom ispitivanja efikasnosti ekstrakcije polifenola primenom 5% (m/V) vodenih rastvora poloksamera 407 i Brij S20 dobijene su sledeće vrednosti sadržaja ukupnih fenola: $36,51 \pm 0,11$ mg GAE/g komine za poloksamer 407 i $45,85 \pm 0,10$ mg GAE/g komine za Brij S20. Uočava se da sa porastom koncentracija surfaktanata u ekstrakcionim medijumima preko 3% (m/V) ne dolazi do statistički značajnog povećanja efikasnosti ekstrakcije polifenola. Ovo zapažanje se može dovesti u vezu sa povećanjem viskoziteta rastvora surfaktanata sa porastom koncentracije. Naime, što je viskozitet rastvarača manji, veći je koeficijent difuzije i bolje prodiranje u pore biljnog materijala, čime se postiže i veća efikasnost ekstrakcije biološki aktivnih jedinjenja [170]. Prema tome, utvrđeno je da se koncentracija od 3% (m/V) može smatrati optimalnom koncentracijom surfaktanata poloksamer 407 i Brij S20 za efikasnu ekstrakciju polifenola iz komine grožđa. Takođe, ukoliko bi se ovakav postupak ekstrakcije primenio na velikim masama sirovine, upotrebljena količina surfaktanata bi bila ekonomski održiva (za dobijanje 1 l ekstrakta bilo bi potrebno utrošiti 30 g surfaktanta).

5.3.1.3 Uticaj pH vrednosti rastvora na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa

Kako bi se ispitaio uticaj pH vrednosti na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima, izvršena je ekstrakcija rastvorima Brija S20 i poloksamera 407 (kao najefikasnijih surfaktanata) u koncentracijama od 3% i 5% (m/V), pri pH vrednosti 3, 4 i 5. Odnos zapremine rastvarača i mase uzorka bio je podešen na 100:1 (**Tabela 10**). U većini ispitanih sistema je pri pH vrednosti 4 postignut najviši stepen ekstrakcije polifenola iz komine. Ovakav rezultat je u skladu sa literaturnim podacima o efikasnosti ekstrakcije polifenola iz različitog biljnog materijala primenom rastvora pojedinačnih nejonskih surfaktanata [171]. Pretpostavlja se da se najveći stepen ekstrakcije polifenola rastvorima nejonskih surfaktanata postiže ukoliko se molekuli polifenola nalaze u nedisosovanom obliku (što se postiže u blago kiselim uslovima) zbog moguće izraženije interakcije ovakvog oblika sa hidrofobnom unutrašnjosti micela surfaktanata [136, 171].

Tabela 10. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora Brij S20 i poloksamera 407 koncentracija 3% i 5% (m/V), pri pH vrednosti 3, 4 i 5

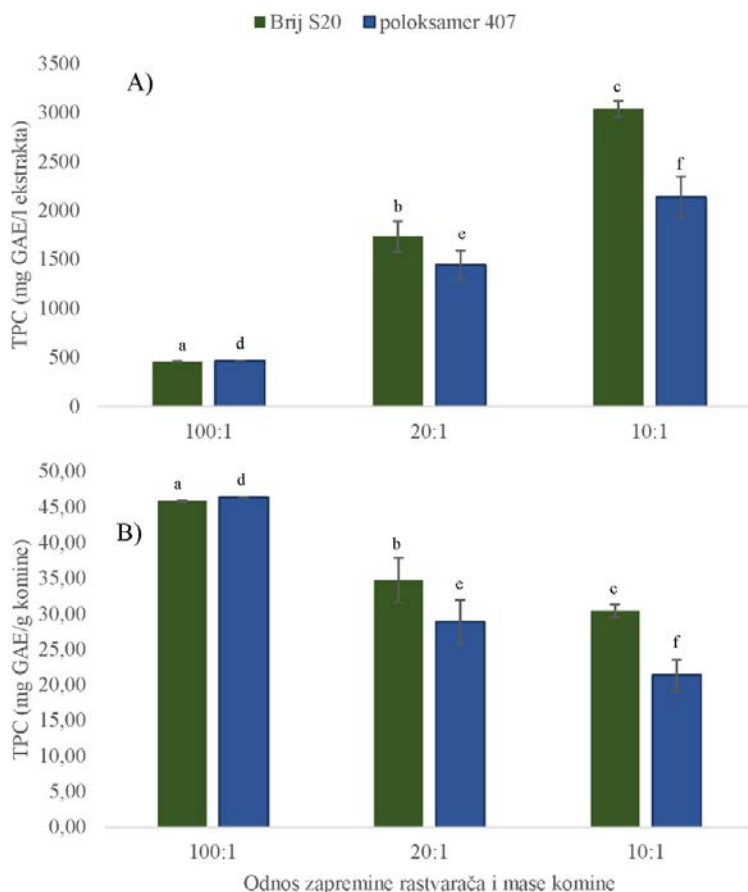
Surfakant	Koncentracija surfaktanta	pH vrednost rastvora	TPC (mg GAE/g komine)
Brij S20	3%	3	34,82 ± 0,10
		4	45,84 ± 0,10
		5	41,32 ± 0,15
	5%	3	42,33 ± 0,11
		4	45,85 ± 0,10
		5	49,77 ± 0,17
Poloksamer 407	3%	3	34,54 ± 0,04
		4	46,40 ± 0,01
		5	36,79 ± 0,03
	5%	3	31,24 ± 0,08
		4	36,51 ± 0,11
		5	28,25 ± 0,01

5.3.1.4 Uticaj odnosa zapremine rastvarača i mase komine na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grodža

Nakon utvrđene optimalne masene koncentracije (3%, m/V) i pH vrednosti (pH=4) rastvora surfaktanata, dalje je ispitan uticaj odnosa zapremine rastvarača i mase uzorka na efikasnost ekstrakcije polifenola. U tu svrhu je određen sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom 3% rastvora Brij S20 i poloksamera 407 (koji su se pokazali kao najefikasniji surfaktanti) pri odnosima zapremine rastvarača i mase komine 100:1, 20:1 i 10:1. Rezultati su pokazali da odabir odnosa zapremine rastvarača i mase komine na dva načina utiče na efikasnost ekstrakcije polifenola. Promenom odnosa zapremine rastvarača od 100:1 ka 10:1 uočen je porast koncentracije polifenola u dobijenim ekstraktima (**Slika 21A**). Istovremeno, navedena promena odnosa zapremine rastvarača i mase komine od viših ka nižim vrednostima utiče na smanjenje efikasnosti ekstrakcije u vidu smanjenja mase ekstrahovanih polifenola po jedinici mase komine (**Slika 21B**). Slične pojave uočene su i prilikom ispitivanja konvencionalnog rastvarača voda:etanol (1:1), sa tom razlikom da je kod analiziranog konvencionalnog rastvarača pri manjim razmerama zapremine rastvarača i mase komine (20:1 i 10:1) uočena pojava platoa kada se

posmatra masa ekstrahovanih polifenola po jedinici mase komine (**Slika 15**). Daljim smanjenjem zapremine rastvarača u odnosu na masu komine (manje od 10:1) došlo je do poteškoća pri rukovanju i obradi dobijenih ekstrakata zbog visoke koncentracije suspendovanih čestica komine. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da manje razmere zapremine rastvarača i mase komine tokom ekstrakcije obezbeđuju dobijanje uzoraka sa višom koncentracijom polifenola, dok se u slučaju većih razmera postiže efikasnije iskorišćenje sirovine.

Primenom 7% vodenog rastvora Tween 80 surfaktanta u ekstrakciji polifenola iz biljne droge *Ampelopsis grossedentata*, uz primenu ultrazvuka i na temperaturi od 50 °C, uočeno je da sa porastom razmere zapremine rastvarača i mase uzorka od 15:1 do 30:1 dolazi do povećanja sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima, dok je za razmeru 35:1 uočen blagi pad efikasnosti ekstrakcije [169]. Sa druge strane, rezultati našeg istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima Skrypnik i sar. (2020), koji su pokazali da sa porastom odnosa zapremine rastvarača i mase komine jabuke raste sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima (posmatrano od 40:1 do 100:1), dok je povećanje razmere preko 100:1 rezultovalo blagim padom sadržaja ukupnih fenola, gde je kao ekstrakcioni medijum korišćen vodeni rastvor Tween 80 [171]. Takođe, statističkom obradom podataka dobijenih na istom uzorku, zaključeno je da je razmera zapremine rastvarača i mase uzorka faktor koji u najvećoj meri određuje efikasnost procesa ekstrakcije polifenola, u poređenju sa koncentracijom surfaktanta, vremenom trajanja ekstrakcionog procesa i pH vrednošću medijuma [171].



Slika 21. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom 3% (m/V) rastvora Brij S20 i poloksamera 407 pri odnosima zapremine rastvarača i mase komine 100:1, 20:1 i 10:1: A) izražen kao koncentracija polifenola u ekstraktima i B) izražen kao masa ekstrahovanih polifenola po jedinici mase komine. ^{a-c} Srednje vrednosti sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima Brij S20, kao i ^{d-f} srednje vrednosti sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima poloksamera 407 za različite odnose zapremine rastvarača i mase komine, različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$)

5.3.1.5 Uticaj primene sukcesivne ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa

Kako bi se ispitala efikasnost sukcesivne ekstrakcije polifenola iz komine grožđa primenom vodenih rastvora surfaktanata, ekstrakcija je izvedena u tri stepena 3% (m/V) vodenim rastvorima Brij S20 i poloksamera 407, pri razmeri zapremine rastvarača i mase komine od 100:1 i pH=4. Paralelno je izvedena i ekstrakcija istim rastvaračima pri odnosu zapremine rastvarača i mase

komine od 100:3, u cilju poređenja dobijenih rezultata. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima je prikazan tabelarno (**Tabela 11**).

Tabela 11. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora Brij S20 i poloksamera 407 koncentracije 3% (m/V), u postupku sukcesivne ekstrakcije, kao i u ekstrakcionom postupku sa odnosom zapremine rastvarača i mase komine od 100:3

Surfaktant	Stepen ekstrakcije	TPC (mg GAE/l ekstrakta)	TPC (mg GAE/g komine)
Brij S20	Prvi	339,3 ± 1,36 ^a	33,9 ± 0,14
	Drugi	667,8 ± 1,21 ^b	33,4 ± 0,12
	Treći	1194,3 ± 2,01 ^c	39,8 ± 0,20
	Kontrola (100:3)	1160,4 ± 1,69	38,7 ± 0,17
poloksamer 407	Prvi	269,2 ± 11,76 ^a	26,9 ± 1,17
	Drugi	595,0 ± 0,13 ^b	29,7 ± 0,01
	Treći	729,7 ± 0,34 ^c	24,3 ± 0,03
	Kontrola (100:3)	753,9 ± 2,29	25,1 ± 0,23

^{a-c} Srednje vrednosti sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim sukcesivnom ekstrakcijom, različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$)

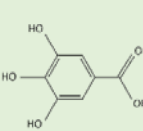
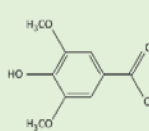
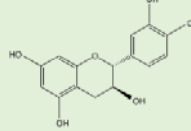
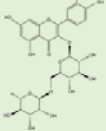
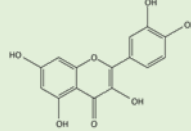
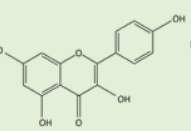
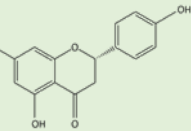
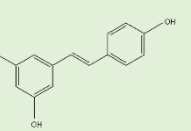
Sprovedenjem postupka sukcesivne ekstrakcije korišćenjem ekstrakata iz prethodnog ekstrakcionog koraka na svežim uzorcima komine u svakom narednom stepenu, uočen je trend porasta koncentracije fenola u ekstraktima u slučaju oba ispitivana surfaktanta, što ukazuje da se pri prvom stepenu ekstrakcije sa razmerom zapremine rastvarača i mase komine od 100:1 ne ekstrahuje ukupna količina fenola koju je moguće ekstrahovati datim rastvaračima. Isti zaključak je izveden i posmatranjem ekstrahovanog sadržaja polifenola koji je izražen kao mg GAE/g komine, budući da su dobijene uporedive vrednosti u sva tri stepena ekstrakcije. Dodatno, sprovedenjem ekstrakcionog postupka sa odnosom zapremine rastvarača i mase komine od 100:3 uočeno je da je efikasnost ekstrakcije u takvom postupku jednaka efikasnosti trećeg stepena sukcesivne ekstrakcije kada se posmatra koncentracija polifenola. Ukoliko se posmatra efikasnost ekstrakcije po gramu komine dobijena vrednost je uporediva sa sva tri stepena ekstrakcije kod oba ispitivana surfaktanta, potvrđujući pretpostavku o ograničenju efikasnosti ekstrakcije polifenolnim sadržajem uzorka komine. Ova zapažanja su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim ispitivanjem mogućnosti primene konvencionalnih rastvarača u postupcima sukcesivne ekstrakcije.

5.3.2 Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora pojedinačnih nejonskih surfaktanata

Karakterizacija fenolnih jedinjenja u odabranim ekstraktima izvršena je tehnikom visokoefikasne tačne hromatografije. Budući da su se u pogledu sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima kao najefikasniji ekstrakcioni medijumi među ispitanim pojedinačnim surfaktantima pokazali Brij S20 i poloksamer 407 (**Slika 19**), ekstrakti ovih surfaktanata su odabrani za karakterizaciju. U **Tabeli 12** prikazane su koncentracije polifenolnih jedinjenja u ekstraktima Brij S20 i poloksamera 407 pri koncentracijama 0,5%, 1%, 2% i 3% (m/V) i pri pH=4 (odnos zapremine rastvarača i mase komine je na svim koncentracionim nivoima bio podešen na 100:1, a za koncentraciju od 3% (m/V) izvršena je analiza i pri razmerama zapremine rastvarača i mase komine od 20:1 i 10:1).

U ekstraktima je detektovano ukupno 8 fenolnih jedinjenja. Između koncentracije surfaktanta i sadržaja svih detektovanih pojedinačnih fenolnih jedinjenja uočena je pozitivna korelacija, za oba ispitivana sistema (Brij S20 i poloksamer 407). Uočen porast koncentracije fenolnih jedinjenja u vodenim rastvorima sa porastom koncentracije surfaktanata je u skladu sa pretpostavkom o solubilizaciji fenolnih jedinjenja unutar micela surfaktanata, odnosno o izraženijoj solubilizaciji u rastvorima viših koncentracija surfaktanata zahvaljujući formiranju većeg broja micela [237]. Rastvorima oba surfaktanta koncentracije 3% ekstrahovane su značajno više koncentracije svih identifikovanih fenolnih jedinjenja u poređenju sa čistom vodom ($p < 0,05$) (**Tabela 8**). Ovakva pojava nije uočena za niže koncentracije surfaktanata kada su u pitanju polarnije fenolne komponente (galna kiselina, siringinska kiselina i katehin). Sa druge strane, rastvori oba surfaktanta su pokazali sposobnost da ekstrahuju manje polarna jedinjenja (kvercetin, kempferol, naringenin i resveratrol), što nije bio slučaj sa čistom vodom kao ekstrakcionim medijumom. Dobijeni rezultati potvrđuju pretpostavku da polarni rastvarači, kao što su voda ili etanol, imaju sposobnost ekstrakcije polarnijih fenolnih jedinjenja, dok se manje polarna fenolna jedinjenja ne ekstrahuju u značajnoj meri i uglavnom ostaju zadržana u matriksu [168]. Sa druge strane, ovim rezultatima je potvrđeno da agregati surfaktanata u vodenim rastvorima imaju sposobnost solubilizacije i polarnih i manje polarnih fenolnih jedinjenja i na taj način povećavaju efikasnost ekstrakcije rastvora u poređenju sa čistom vodom [168].

Tabela 12. Koncentracija polifenola (mg/l) u ekstraktima komine grožđa dobijenim primenom vodenih rastvora Brij S20 i poloksamera 407 rastućih koncentracija, pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine 100:1 i pH=4, kao i u ekstraktima koncentracije 3% (m/V) dobijenim pri različitim odnosima zapremine rastvarača i mase komine, određeno HPLC metodom

Ekstrakcioni medijum	Odnos zapremine rastvarača i mase komine	Fenolne kiseline		Flavan-3-oli		Flavonoli		Flavanoni		Stilbeni		Ukupno
		Galna kiselina	Siringinska kiselina	Katehin	Rutin	Kvercetin	Kempferol	Naringenin	Resveratrol			
												
Brij s20	0,5%	100:1	0,67 ± 0,005 ^{ab}	0,67 ± 0,01 ^a	1,96 ± 0,05 ^a	1,46 ± 0,01 ^{ab}	2,18 ± 0,001 ^a	0,43 ± 0,01 ^{abcd}	0,08 ± 0,0002 ^{abcd}	0,15 ± 0,01 ^{abcd}	7,61 ± 0,10 ^c	
	1%	100:1	0,71 ± 0,03 ^{ab}	0,78 ± 0,03 ^b	2,32 ± 0,01 ^b	1,62 ± 0,09 ^{abcd}	2,48 ± 0,04 ^b	0,45 ± 0,01 ^{abcd}	0,10 ± 0,002 ^{abcd}	0,15 ± 0,01 ^{abcd}	8,61 ± 0,21 ^b	
	2%	100:1	0,94 ± 0,08 ^c	1,11 ± 0,06 ^{cd}	2,96 ± 0,08 ^c	1,71 ± 0,08 ^{bcd}	2,73 ± 0,002 ^c	0,48 ± 0,0002 ^{abcd}	0,14 ± 0,01 ^{abcd}	0,15 ± 0,001 ^{abcd}	10,22 ± 0,31 ^c	
		100:1	1,11 ± 0,02 ^d	1,13 ± 0,04 ^{cd}	3,39 ± 0,1 ^d	1,73 ± 0,02 ^{bcd}	3,17 ± 0,1 ^d	0,49 ± 0,015 ^{abcd}	0,15 ± 0,01 ^{abcd}	0,14 ± 0,0004 ^{abcd}	11,28 ± 0,41 ^d	
	3%	20:1	4,88 ± 0,05 ^e	3,11 ± 0,14 ^e	11,20 ± 0,95 ^{ef}	7,37 ± 0,33 ^e	13,63 ± 0,08 ^e	2,42 ± 0,09 ^e	0,86 ± 0,05 ^e	0,26 ± 0,05 ^e	43,73 ± 3,76 ^e	
10:1		8,13 ± 0,73 ^f	5,26 ± 0,11 ^f	12,44 ± 0,79 ^{ef}	11,92 ± 0,43 ^f	21,23 ± 0,41 ^f	3,67 ± 0,04 ^f	1,09 ± 0,01 ^f	0,56 ± 0,03 ^f	64,28 ± 6,90 ^f		
Poloxamer 407	0,5%	100:1	0,70 ± 0,03 ^{ab}	0,63 ± 0,11 ^{abc}	1,84 ± 0,07 ^{ab}	0,94 ± 0,04 ^{abc}	0,21 ± 0,01 ^a	ND ^{1 a}	ND ^{abcd}	0,15 ± 0,003 ^{ab}	4,47 ± 0,25 ^a	
	1%	100:1	0,81 ± 0,01 ^{abc}	0,82 ± 0,10 ^{abcd}	2,05 ± 0,02 ^{abc}	1,00 ± 0,02 ^{abc}	0,71 ± 0,02 ^b	0,15 ± 0,00003 ^b	ND ^{abcd}	0,22 ± 0,02 ^{ab}	5,76 ± 0,18 ^b	
	2%	100:1	0,93 ± 0,01 ^{bc}	0,87 ± 0,05 ^{abcd}	2,52 ± 0,04 ^{bcd}	1,09 ± 0,01 ^{abc}	1,85 ± 0,03 ^c	0,33 ± 0,01 ^c	0,08 ± 0,0004 ^{abcd}	0,35 ± 0,01 ^{cd}	8,03 ± 0,12 ^c	
		100:1	1,10 ± 0,004 ^d	0,99 ± 0,1 ^{bcd}	2,72 ± 0,1 ^{cd}	1,19 ± 0,06 ^d	2,51 ± 0,1 ^d	0,49 ± 0,03 ^d	0,10 ± 0,01 ^{abcd}	0,39 ± 0,01 ^{cd}	9,49 ± 0,41 ^d	
	3%	20:1	3,56 ± 0,06 ^e	1,36 ± 0,06 ^e	6,51 ± 0,07 ^e	4,03 ± 0,34 ^e	10,62 ± 0,06 ^e	2,02 ± 0,06 ^e	0,41 ± 0,005 ^e	0,79 ± 0,001 ^{ef}	29,29 ± 1,89 ^e	
10:1		8,19 ± 0,08 ^f	4,27 ± 0,07 ^f	8,90 ± 0,33 ^f	11,51 ± 0,82 ^f	17,14 ± 0,28 ^f	3,07 ± 0,03 ^f	1,27 ± 0,14 ^f	0,73 ± 0,07 ^{ef}	55,09 ± 5,70 ^f		

¹ND: Komponenta nije detektovana

^{a-f} Srednje vrednosti koncentracije ± standardna devijacija (n=3) za jednu polifenolnu komponentu u ekstraktima istog surfaktanata pri različitim koncentracijama i odnosima zapremine rastvarača i mase komine, različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

Parmar i sar. (2011) su primenom *2D NMR Noesy* metode ranije utvrdili da struktura i hidrofobnost fenolnih jedinjenja određuju tip interakcija sa molekulima surfaktanata i njihov položaj u micelama triblok kopolimera Pluronic P104. Naime, najpolarnije među ispitanim jedinjenjima (*p*-hidroksibenzoeva kiselina) raspoređena je uniformno u micelama i intereaguje i sa PEO (polioksietilenskim) i sa PPO (polioksipropilenskim) blokovima surfaktanta, dok je hidrofobni kvercetin solubilizovan u području micelnog jezgra [237]. Takođe, za sinapinsku i siringinsku kiselinu je dalje pokazano da pojedine funkcionalne grupe stupaju u interakciju sa PEO, a pojedine grupe sa PPO lancima, što je određeno prirodom grupe u pogledu hidrofilnosti/hidrofobnosti [237].

Polifenolni kvalitativni profil ekstrakata dobijenih primenom rastvora Brij S20 i poloksamera 407 koncentracije 3% (m/V) odgovara kvalitativnom profilu vodeno-etanolnog ekstrakta (**Tabela 8**), sa tom razlikom da je resveratrol u ovom konvencionalnom rastvaraču detektovan samo pri manjim odnosima zapremine rastvarača i mase komine. Kada se posmatraju koncentracije pojedinačnih fenolnih jedinjenja, u ekstraktima dobijenim uz korišćenje surfaktanata dominantni su bili flavan-3-ol katehin i flavonol kvercetin, dok je u vodenim ekstraktima katehin bio prisutan u najvišoj koncentraciji, što je u skladu sa literaturnim podacima [56]. Najpolarnija komponenta među detektovanim, galna kiselina, približno jednakom efikasnošću je ekstrahovana rastvorima Brij S20 i poloksamera 407. Siringinska kiselina, koja se od galne kiseline razlikuje po tome što su dve fenolne grupe zamenjene metoksi grupama, što je čini manje polarnim jedinjenjem, generalno je efikasnije ekstrahovana rastvorima Brij S20 u poređenju sa poloksamerom 407. Osim toga, ekstrakti Brij S20 sadržali su u poređenju sa ekstraktima poloksamera 407 više koncentracije flavan-3-ola katehina, flavonola rutina, kvercetina i kempferola, kao i flavanona naringenina, pri svim ispitanim koncentracijama surfaktanata. Sva prethodno navedena jedinjenja pripadaju klasi flavonoida sa zajedničkom osnovnom C₆-C₃-C₆ strukturom, dok se u hemijskoj strukturi rutina (kvercetin-3-*O*-rutinozid) nalazi i disaharid vezan za navedenu osnovu, koji povećava njegovu hidrofilnost [57]. Dakle, uočeno je da manje polarna polifenolna jedinjenja (npr. klasa flavonoida) imaju veći afinitet ka micelama Brij S20 surfaktanta u poređenju sa poloksamerom 407. Mogući razlog ovakve pojave je razlika u hidrofobnosti micelnog jezgra ova dva tipa surfaktanta. Naime, micle Brij S20 imaju kompaktnije i hidrofobnije jezgro od micelnog jezgra poloksamera 407. Hidrofobni deo molekula poloksamera 407, odnosno polioksipropilenski lanac poseduje veću sternu rigidnost zbog prisustva bočno orijentisanih metil grupa, što povećava poroznost jezgra za prodiranje molekula vode. Pretpostavlja se da je iz tog razloga jezgro micle poloksamera 407

polarnije [167, 238] i ima manju sposobnost za solubilizaciju nepolarnijih molekula (npr. manje polarnih polifenola, kao što su flavonoidi). Pored toga, može se pretpostaviti da je solubilizacija hidrofobnijih polifenola smanjena i zbog sterne rigidnosti samih polioksiopropilenskih lanaca poloksamera. Kada je u pitanju resveratrol (jedinjenje male molekulske mase i umerene polarnosti, koje sadrži dva fenolna prstena povezana etilenskom grupom), rastvori oba surfaktanta su pokazali veću sposobnost ekstrakcije u poređenju sa svim kontrolnim rastvaračima (**Tabela 8**), a poloksamer 407 se izdvojio kao efikasniji ekstrakcioni medijum.

5.3.3 Antioksidativni kapacitet ekstrakata – sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala

Antioksidativni kapacitet ekstrakata dobijenih primenom rastvora Brij S20 i poloksamera 407, koncentracija 0,5%, 1%, 2% i 3% (m/V), pri pH=4 i odnosu zapremine rastvarača i mase komine 100:1, procenjen je na osnovu sposobnosti ekstrakata za neutralizaciju DPPH slobodnih radikala. Svi ispitani uzorci dali su ekstrakte koji ispoljavaju antioksidativni kapacitet. Poređenjem IC₅₀ vrednosti ekstrakata dobijenih primenom rastvora surfaktanata različitih koncentracija, ustanovljeno je da su ekstrakti dobijeni primenom rastvora surfaktanata najviše koncentracije pokazali najviši antioksidativni potencijal, što korelira sa najvišim sadržajem ukupnih fenola, kao i ukupnim sadržajem pojedinačnih fenolnih komponenti. Pirsonovi koeficijenti korelacije između IC₅₀ vrednosti, sadržaja ukupnih fenola i ukupnog sadržaja pojedinačnih fenolnih komponenti ekstrakata dobijenih primenom rastvora Brij S20 i poloksamera 407 prikazani su tabelarno (**Tabela 13**). Visok stepen korelacije je uočen između svih ispitanih parametara. IC₅₀ vrednosti su iznosile $1,89 \pm 0,0005 \mu\text{L/mL}$ i $2,25 \pm 0,017$, za ekstrakte dobijene primenom 3% rastvora Brij S20 i poloksamera 407, što je u nivou vrednosti dobijene za najefikasniji sistem među ispitanim konvencionalnim rastvaračima (voda:etanol (1:1)). Takođe, ekstrakti dobijeni primenom 3% vodenih rastvora navedenih surfaktanata ispoljili su statistički značajno višu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa vodenim ekstraktom ($p < 0,05$).

Tabela 13. Vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije između antioksidativne aktivnosti, odnosno između IC₅₀ vrednosti (DPPH), sadržaja ukupnih fenola (TPC) i ukupnog sadržaja pojedinačnih fenolnih komponenti (HPLC) ekstrakata dobijenih primenom rastvora Brij S20 i poloksamera 407 koncentracija 0,5%, 1%, 2% i 3% (m/V)

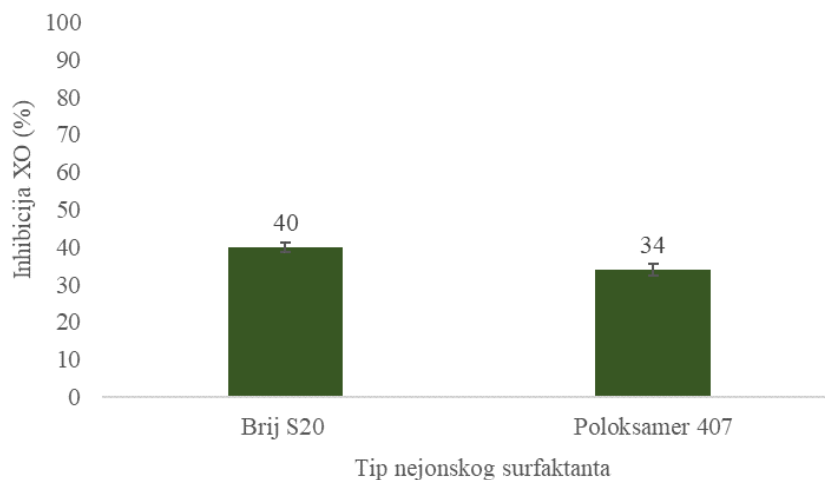
	Brij S20			Poloxamer 407		
	DPPH	TPC	HPLC	DPPH	TPC	HPLC
DPPH	1,000			1,000		
TPC	-0,972*	1,000		-0,941*	1,000	
HPLC	-0,819	0,770	1,000	-0,972*	0,980*	1,000

* Statistički značajna korelacija na nivou p=0,05

Dodatno je ispitana antioksidativna aktivnost čistih rastvora surfaktanata (3%, m/V, rastvori Brij S20 i poloksamera 407) i nije uočena sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala u ovim sistemima. Na osnovu ovog rezultata može se pretpostaviti da antioksidativni kapacitet ekstrakata dobijenih primenom rastvora surfaktanata potiče od antioksidativne sposobnosti ekstrahovanih polifenolnih jedinjenja. Sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala nije uočena ni u ranijim studijama u rastvorima Tween-a 20 i Tween-a 80 [239].

5.3.4 Sposobnost ekstrakata za inhibiciju ksantin oksidaze

Ispitana je sposobnost ekstrakata dobijenih primenom vodenih rastvora pojedinačnih surfaktanata Brij S20 i poloksamera 407 (3% (m/V), pH=4, 100:1) da inhibišu enzim ksantin oksidazu (**Slika 22**). Uočeno je da oba primenjena ekstrakta ispoljavaju sposobnost inhibicije ksantin-oksidaze. Poznato je da su flavonoidi potentni inhibitori ksantin oksidaze [240]. Međutim, aktivnosti ekstrakata dobijenih primenom rastvora pojedinačnih surfaktanata bile su niže u poređenju sa ekstraktima dobijenim konvencionalnim rastvaračima (voda, etanol i voda:etanol (1:1)), što navodi na pretpostavku da prisustvo surfaktanata u rastvorima na neki način interferira sa enzimom ksantin oksidaze i ometa njegovu inhibiciju (**Slika 17**).



Slika 22. Stepen inhibicije ksantin oksidaze ekstrakata dobijenih rastvorima pojedinačnih surfaktanata

5.3.5 Uticaj ekstrakcije polifenola iz komine grožđa na veličinu micela u rastvorima pojedinačnih surfaktanata

Veličine čestica određene su tehnikom dinamičkog rasejanja svetlosti u vodenim rastvorima pojedinačnih surfaktanata Brij S20 i poloksamera 407, koncentracija 1% i 3% (m/V), kao i u ekstraktima komine grožđa dobijenim ekstrakcijom uz korišćenje navedenih rastvora kao ekstrakcionih medijuma (pH=4, 100:1). Veličine čestica su određene na osnovu raspodele veličine čestica po intenzitetu rasejane svetlosti, zapremini čestica, kao i po broju čestica. Rezultati su prikazani u **Tabeli 14** i na **Slici 23**.

Poređenjem veličine čestica u vodenim rastvorima pojedinačnih surfaktanata koncentracija 1% i 3% uočeno je da povećanje koncentracije surfaktanta u oba ispitana sistema dovodi samo do neznatnih promena u veličinama čestica.

Tabela 14. Veličine čestica u vodenim rastvorima surfaktanata Brij S20 i poloksamera 407 i u odgovarajućim ekstraktima

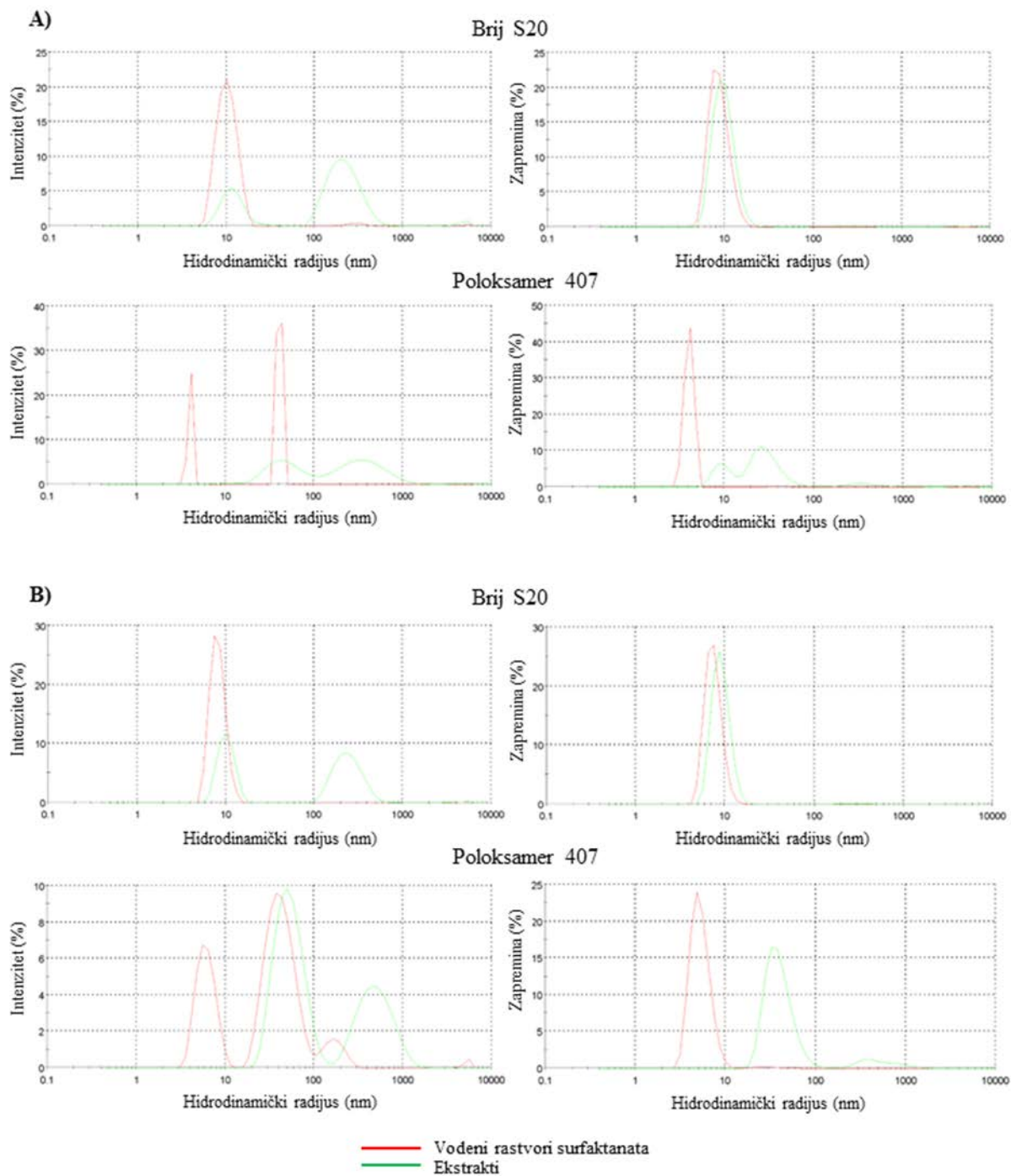
Sistem	PdI ¹	Raspodela po intenzitetu rasejane svetlosti			Raspodela po zapremini čestica			Raspodela po broju čestica	
		1. pik (nm)/%	2. pik (nm)/%	3. pik (nm)/%	1. pik (nm)/%	2. pik (nm)/%	3. pik (nm)/%	Srednja veličina čestica (nm)	
Rastvori surfaktanata									
1%	Brij S20	0,130	10,41/97,8	298,3/1,8	5477/0,4	8,785/100,0	/	/	7,67
	Poloksamer 407	0,443	4,09/30,2	40,93/69,8	/	4,070/99,8	40,53/0,2	/	4,02
Ekstrakti									
	Brij S20	1	12,47/27,3	227,0/70,8	4838/1,9	9,934/99,1	256,8/0,5	5048/0,4	8,69
	Poloksamer 407	0,561	11,64/1,5	49,75/41,8	393,2/56,4	9,657/25,9	29,94/66,1	404,5/7,0	24,10
Rastvori surfaktanata									
3%	Brij S20	0,203	8,25/100,0	/	/	7,511/100,0	/	/	6,90
	Poloksamer 407	0,296	6,21/29,9	43,74/61,7	169,7/7,7	5,330/98,9	31,14/1,1	/	4,71
Ekstrakti									
	Brij S20	0,822	10,28/45,0	249,1/54,5	4768/0,5	9,154/99,8	278,1/0,2	/	8,28
	Poloksamer 407	0,482	55,57/63,9	521,5/36,1	/	40,27/90,7	541,7/9,3	/	32,30

¹Indeks polidisperznosti

Prema dobijenim raspodelama veličine čestica po intenzitetu rasejane svetlosti (**Tabela 14, Slika 23**), za vodene rastvore Brij S20 surfaktanta se uočava ili postojanje samo jednog pika ili postojanje jednog dominantnog pika, koji ukazuju na pojavu micela srednjeg hidrodinamičkog radijusa između 10,41 nm i 8,25 nm, za koncentracije od 1% i 3% (m/V). Sa druge strane, dva dominantna pika se uočavaju na raspodeli veličine čestica po intenzitetu rasejane svetlosti (bimodalna raspodela) u slučaju rastvora poloksamera 407 pri obe ispitane koncentracije (**Tabela 14, Slika 23**), što je u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja [241-243]. Prvi pik ukazuje na postojanje čestica prosečnog dijametra 4,09 nm i 6,21 nm u 1%, odnosno u 3% (m/V) rastvoru. Drugi pik se uočava pri srednjoj veličini čestica od 40,93 nm i 43,74 nm, u 1% i 3% (m/V) rastvoru poloksamera 407. Raspodele veličine čestica sa pojavom dva dominantna pika su zabeležene i ranije u rastvorima poloksamera 407 različitih koncentracija (0,0003 mM – 2 mM vodeni rastvori), koji su ukazivali na postojanje čestica dijametara 4-8 nm i 20-150 nm [243]. Bergh and Tønnesen (2017) su takođe uočili dva pika na raspodeli veličine čestica u vodenom rastvoru poloksamera 407, pri koncentraciji od 2 mM. Prvi pik, pri srednjoj veličini od $5,88 \pm 0,22$ nm su pripisali monomerima poloksamera 407, dok su pretpostavili da drugi pik, koji se pojavljuje pri srednjoj vrednosti dijametra od $38,7 \pm 1,70$ nm, ukazuje na dijametar micela poloksamera 407 [241]. Na osnovu literaturnih podataka može se zaključiti da prvi pik koji se uočava na raspodelama veličine čestica polimernog surfaktanta u ovom istraživanju ukazuje na prosečan dijametar monomera surfaktanta, dok drugi pik odgovara dijametru formiranih micela.

Rezultati (**Tabela 14, Slika 23**) ukazuju na povećanje prečnika micela oba ispitana surfaktanta nakon ekstrakcije polifenola iz komine grožđa, što predstavlja posledicu solubilizacije polifenola unutar micela. Pored toga, u ekstraktima poloksamera 407 se ne uočavaju čestice opsega 4-6 nm, koje su prisutne u rastvorima ovog surfaktanta i odgovaraju monomerima surfaktanta. Ovo povećanje veličine čestica nakon ekstrakcije u saglasnosti je sa rezultatima ranije studije Sliwa i sar. (2019), gde su praćene promene u veličini agregata surfaktanata C9-11 Pareth-5, PPG-6 Steareth-7 i PPG-4 Laureth-5 u 1% vodenim rastvorima nakon ekstrakcije flavonoida iz nadzemnog dela biljke *Bidens tripartite* [175]. Takođe, povećanje dijametra micela surfaktanta Pluronic P104 je zabeleženo nakon solubilizacije pojedinačnih fenolnih jedinjenja, kao što su *p*-hidroksibenzoeva kiselina, siringinska kiselina, sinapinska kiselina i kvercetin [237].

Između vodenih rastvora pojedinačnih surfaktanata i odgovarajućih ekstrakata uočavaju su razlike u vrednostima indeksa polidisperznosti (PdI). Naime, indeks polidisperznosti ima vrednosti niže od 0,70 u svim ispitanim vodenim rastvorima pojedinačnih surfaktanata (**Tabela 14**), što ukazuje na monomodalnu raspodelu veličine čestica u rastvorima, tj. da su sve čestice u rastvorima približno istog prečnika [244]. Sa druge strane, u slučaju ekstrakata dobijenih primenom vodenih rastvora Brij S20 raspodele veličine čestica imale su vrednosti indeksa polidisperznosti više od 0,70 (**Tabela 14**). Takođe, u slučaju ekstrakata poloksamera, PdI vrednosti su bile više nego u slučaju rastvora ovog surfaktanta. Ovakve vrednosti indeksa polidisperznosti ukazuju na multimodalnu distribuciju veličine čestica u ekstraktima, odnosno na neravnomeran stepen solubilizacije polifenola unutar micela pojedinačnih surfaktanata tokom procesa ekstrakcije. Može se pretpostaviti da primenjeni uslovi ekstrakcije polifenola iz komine grožđa primenom rastvora surfaktanata u velikoj meri utiču na stepen solubilizacije polifenola u micelama i posledično na veličinu micela nakon solubilizacije. Takođe, moguće je da se kontrolom određenih procesnih parametara ekstrakcionog postupka može doprineti ujednačenom stepenu solubilizacije polifenola unutar micela.



Slika 23. Raspodela veličine čestica u vodenim rastvorima pojedinačnih surfaktanata i odgovarajućim ekstraktima: A) rastvori koncentracije 1% (m/V), B) rastvori koncentracije 3% (m/V)

5.4. Ispitivanje efikasnosti vodenih rastvora smeša nejonskih surfaktanata u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz komine crnog grožđa

Budući da su se među pojedinačnim nejonskim surfaktantima po efikasnosti ekstrakcije polifenola izdvojili Brij S20 i poloksamer 407, kao i da je pokazano postojanje sinergizma u binarnim smešama ovih surfaktanata, ispitana je efikasnost ovih smeša u ekstrakciji polifenola iz komine crnog grožđa. U tu svrhu određen je sadržaj ukupnih fenola i sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima, *in vitro* antioksidativni potencijal ekstrakata u vidu sposobnosti neutralizacije DPPH slobodnih radikala, sposobnost ekstrakata za inhibiciju enzima ksantin oksidaze, kao i uticaj ekstrakcije polifenola na veličinu mešovutih micela.

5.4.1 Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa dobijenim primenom vodenih rastvora smeša nejonskih surfaktanata

Sadržaj ukupnih fenola određen je u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora smeša nejonskih surfaktanata Brij S20 i poloksamera 407, sa različitim masenim udelima pojedinačnih surfaktanata (9:1, 1:1 i 1:9), koncentracije 3% (m/V) i pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine 100:1 (**Tabela 15**).

Tabela 15. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora smeša surfaktanata Brij S20 i poloksamera 407, pri koncentraciji od 3%, odnosu zapremine rastvarača i mase komine 100:1 i uz variranje pH vrednosti

Ekstrakcioni medijum	pH vrednost rastvora	TPC (mg GAE/g komine)
BS20/P407 (9:1)	3	49,33 ± 0,08
	4	54,49 ± 0,12
	5	39,66 ± 0,11
BS20/P407 (1:1)	3	31,37 ± 0,11
	4	54,73 ± 0,26
	5	39,05 ± 0,36
BS20/P407 (1:9)	3	32,86 ± 0,12
	4	36,85 ± 0,07
	5	41,32 ± 0,08

5.4.1.1 Uticaj pH vrednosti rastvora na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa

Slično rezultatima ispitivanja uticaja pH vrednosti na efikasnost ekstrakcije rastvora pojedinačnih surfaktanata, i u slučaju smeša surfaktanata je zapaženo da se u većini ispitanih sistema najveća efikasnost postiže pri pH vrednosti 4. Ovakav rezultat je u skladu sa pretpostavkom da se najveći stepen ekstrakcije polifenola rastvorima nejonskih surfaktanata postiže kada se slabo kisela fenolna jedinjenja nalaze u nedisosovanom obliku, zbog mogućnosti ostvarivanja većeg broja interakcija sa hidrofobnim jezgrom micela [136, 171].

5.4.1.2 Uticaj masenog udela pojedinačnih surfaktanata u binarnim smešama na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima komine crnog grožđa

Budući da je pokazano da se u slučaju smeša nejonskih surfaktanata najveća efikasnost ekstrakcije polifenola iz matriksa postiže pri blago kiselim uslovima (pH=4) (**Tabela 15**), uticaj sastava binarnih smeša na efikasnost ekstrakcije polifenola iz komine crnog grožđa analiziran je pri ovoj pH vrednosti.

Upotrebom vodenih rastvora binarnih smeša surfaktanata pri svim ispitanim masenim odnosima surfaktanata Brij S20 i poloksamera 407 dobijeni su ekstrakti komine grožđa sa višim sadržajem ukupnih fenola u poređenju sa vodenim ekstraktom (**Slika 14**). Ovakav efekat se može objasniti procesom ugrađivanja tj. solubilizacije polifenola unutar mešovitih micela. Pored toga, smeše BS20/P407 (9:1) i BS20/P407 (1:1) su ispoljile efikasnost ekstrakcije polifenola veću i od smeše vode i etanola (1:1), koja se u ovom, kao i u ranijim istraživanjima pokazala kao najefikasniji među konvencionalnim rastvaračima za ekstrakciju polifenola [16]. Takođe, uočavaju se razlike u efikasnosti ekstrakcije polifenola primenom rastvora smeša surfaktanata sa različitim masenim odnosima Brij S20 i poloksamera 407 (**Tabela 15**). Može se pretpostaviti da se sa porastom masenog udela Brij S20 surfaktanta u smešama povećava udeo ovog surfaktanta unutar jezgra mešovitih micela, što dovodi do unapređenog pakovanja molekula surfaktanata u micelarnom jezgru. U takvim slučajevima jezgra micela imaju hidrofobniju prirodu i povećanu sposobnost solubilizacije polifenola. Stoga, povećanjem udela Brij S20 surfaktanta u smešama postiže se veća sposobnost ekstrakcije polifenola. Međutim, može se pretpostaviti da nakon što udeo Brij S20 surfaktanta dostigne odgovarajući nivo, dalje povećanje njegovog udela ne dovodi do boljeg

pakovanja molekula surfaktanata unutar jezgra mešovutih micela. Kao rezultat toga, slična efikasnost ekstrakcije polifenola dobijena je primenom smeša BS20/P407 (9:1) i BS20/P407 (1:1), a sadržaj ukupnih fenola u ovim ekstraktima nadmašio je vrednosti dobijene primenom rastvora pojedinačnih surfaktanata, pri istoj koncentraciji i istim uslovima ekstrakcije (**Slika 19**). Sa druge strane, rastvor BS20/P407 (1:9) se pokazao kao najmanje efikasan ekstrakcioni medijum među ispitanim smešama. Može se pretpostaviti da viši udeo poloksamera 407 u binarnim smešama čini micelarna jezgra hidrofilnijim, što smanjuje efikasnost solubilizacije polifenolnih jedinjenja.

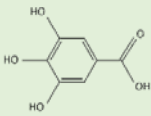
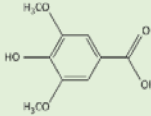
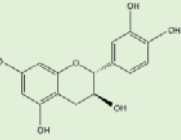
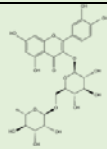
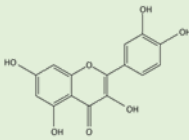
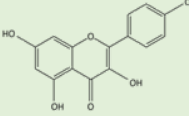
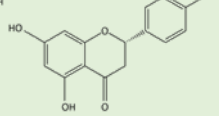
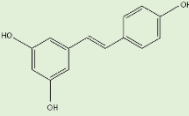
Primenom rastvora određenih smeša surfaktanata postignuto je povećanje efikasnosti ekstrakcije polifenola u pogledu sadržaja ukupnih fenola u poređenju sa ekstrakcijom rastvorima pojedinačnih surfaktanata. Naime, sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim primenom rastvora BS20/P407 (9:1) i BS20/P407 (1:1) bio je veći za 18,87% (95% CI: 18,23–19,51), odnosno 19,39% (95% CI: 18,68–20,10) u poređenju sa Brij S20 ekstraktom. Takođe, u poređenju sa ekstraktom dobijenim primenom rastvora poloksamera 407, sadržaj ukupnih fenola je u smešama BS20/P407 (9:1) i BS20/P407 (1:1) bio veći za 17,43% (95% CI: 17,13–17,73) i 17,95% (95% CI: 17,31–18,58). Dodatno, uočava se da su najveću sposobnost solubilizacije u pogledu sadržaja ukupnih fenola pokazale smeše surfaktanata koje su imale najniže vrednosti kritične micelarne koncentracije (**Tabela 6**). Na osnovu prethodnog zapažanja se može pretpostaviti da sinergizam u formiranju mešovutih micela dovodi do unapređenja solubilizacije polifenolnih jedinjenja u mešovitim micelama. Zhou i Zhu (2005) su takođe uočili razlike u solubilizacionim kapacitetima mešovutih micela prema policikličnim aromatičnim ugljovodonicima sa promenama molskih udela nejonskog surfaktanta Triton-a X-405 i anjonskog surfaktanta natrijum lauril sulfata u binarnim smešama. Osim toga, u smešama Triton-a X-405 i natrijum lauril sulfata najviši solubilizacioni kapacitet uočen je u smešama sa najnižom vrednošću kritične micelarne koncentracije [245].

5.4.2 Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora smeša nejonskih surfaktanata

Koncentracije pojedinačnih fenolnih jedinjenja određene su u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora binarnih smeša surfaktanata Brij S20 i poloksamer 407, (3% (m/V), pH=4 i 100:1) i rezultati su prikazani tabelarno (**Tabela 16**).

U svim ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora binarnih smeša surfaktanata detektovana su i kvantifikovana sledeća polifenolna jedinjenja: galna kiselina, siringinska kiselina, katehin, rutin, kvercetin, kempferol, naringenin i resveratrol. Dobre solubilizacione karakteristike ispitanih binarnih sistema ogledaju se u generalno višim sadržajima pojedinačnih fenolnih komponenti u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora smeša surfaktanata u poređenju sa vodenim ekstraktom (**Tabela 8**). Takođe, njihova efikasnost ekstrakcije u pogledu ukupnog sadržaja pojedinačnih fenola je bila uporediva sa efikasnošću smeše vode i etanola (1:1). Osim toga, pojedina polifenolna jedinjenja, kao što su flavonoli kvercetin i kempferol, flavanon naringenin i stilben resveratrol su detektovani u ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora smeša surfaktanata, kao i u ekstraktima dobijenim primenom pojedinačnih surfaktanata Brij S20 i poloksamer 407 (**Tabela 12**), ali nisu detektovani u vodenom ekstraktu. U ekstraktima dobijenim primenom rastvora smeša surfaktanata najzastupljenija polifenolna jedinjenja bili su flavanol katehin i flavanol kvercetin, kao i kod ekstrakata dobijenih primenom rastvora pojedinačnih surfaktanata (**Tabela 12**).

Tabela 16. Koncentracija polifenola (mg/l) u ekstraktima komine grožđa dobijenim primenom vodenih rastvora smeša BS20/P407 (9:1), BS20/P407 (1:1), i BS20/P407 (1:9), masene koncentracije 3% (m/V), pri odnosu zapremine rastvarača i mase komine 100:1 i pH=4, određeno HPLC metodom

Ekstrakcioni medijum	Fenolne kiseline		Flavan-3-oli		Flavonoli		Flavanoni	Stilbeni	Ukupno
	Galna kiselina	Siringinska kiselina	Katehin	Rutin	Kvercetin	Kempferol	Naringenin	Resveratrol	
									
BS20/P407 (9:1)	1,14 ± 0,02 ^{ab}	1,00 ± 0,04 ^a	3,02 ± 0,1 ^a	1,97 ± 0,03 ^{ab}	3,75 ± 0,05 ^{ab}	0,55 ± 0,01 ^{ab}	0,16 ± 0,02 ^{abc}	0,15 ± 0,0001 ^a	11,74 ± 0,24 ^a
BS20/P407 (1:1)	1,23 ± 0,02 ^{ab}	1,13 ± 0,03 ^b	3,34 ± 0,1 ^b	1,94 ± 0,03 ^{ab}	3,62 ± 0,1 ^{ab}	0,54 ± 0,001 ^{ab}	0,16 ± 0,01 ^{abc}	0,26 ± 0,03 ^{bc}	12,22 ± 0,27 ^b
BS20/P407 (1:9)	0,91 ± 0,01 ^c	0,78 ± 0,02 ^c	2,21 ± 0,02 ^c	1,10 ± 0,03 ^c	2,50 ± 0,1 ^c	0,39 ± 0,01 ^c	0,14 ± 0,02 ^{abc}	0,26 ± 0,02 ^{bc}	8,29 ± 0,26 ^c

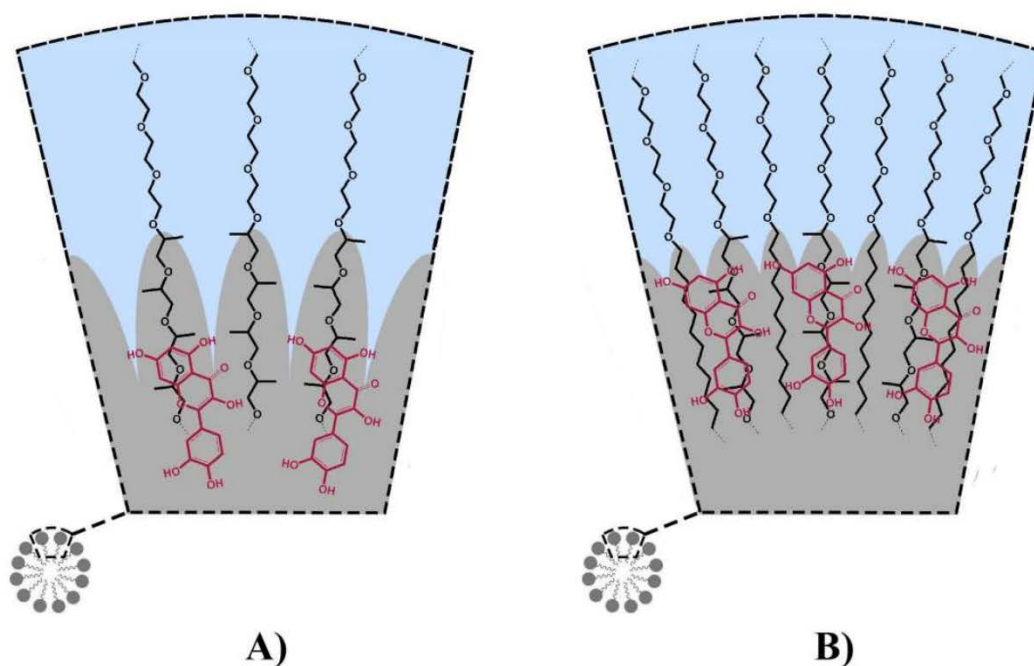
^{a-c} Srednje vrednosti koncentracije ± standardna devijacija (n=3) za jednu polifenolnu komponentu u ekstraktima različitih smeša surfaktanata, različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

Uočava se da maseni udeo surfaktanata u binarnim smešama utiče na koncentraciju pojedinačnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima. Naime, najviši ukupni sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja dobijen je u ekstraktu smeše BS20/P407 (1:1), a zatim u ekstraktu smeše BS20/P407 (9:1). Ekstrakt BS20/P407 (1:9) imao je značajno nižu ukupnu koncentraciju pojedinačnih fenolnih komponenti u poređenju sa ekstraktima dobijenim primenom preostala dva sistema binarnih smeša (BS20/P407 (1:1) i BS20/P407 (9:1)), ali značajno višu ukupnu koncentraciju u poređenju sa vodenim ekstraktom. Pored toga, ukupni sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima BS20/P407 (1:1) i BS20/P407 (9:1) bio je viši nego u ekstraktima pojedinačnih surfaktanata. Na osnovu zbira koncentracija pojedinačnih polifenolnih komponenti u ekstraktima, može se zaključiti da niži maseni udeo poloksamera u binarnim smešama surfaktanata obezbeđuje veću efikasnost ekstrakcije polifenola. Isti trend se uočava i ako se posmatra uticaj masenog udela surfaktanata u smešama na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima. Takođe, i u ovom slučaju najviše efikasnosti ekstrakcije polifenola uočene su kod binarnih smeša surfaktanata koje su imale najniže vrednosti eksperimentalno određenih kritičnih micelarnih koncentracija. Ukupni sadržaj pojedinačnih fenolnih komponenti je u ekstraktima BS20/P407 (1:1) i BS20/P407 (9:1) bio značajno viši u poređenju sa sadržajem u kontrolnim ekstraktima, uključujući i smešu vode i etanola (1:1), kao najefikasniji kontrolni ekstrakcioni medijum.

Kada su u pitanju pojedinačna fenolna jedinjenja, povećana efikasnost ekstrakcije smeša surfaktanata (BS20/P407 (9:1) i BS20/P407 (1:1)) u poređenju sa sistemima pojedinačnih surfaktanata uočena je kod manje polarnih polifenolnih jedinjenja. Povećanje efikasnosti ekstrakcije kvercetina je iznosilo 18,30% (95% CI: 13,71–22,88) i 14,20% (95% CI: 8,78–19,61) u slučaju BS20/P407 (9:1) i BS20/P407 (1:1), kada se poredi sa Brij S20. U slučaju kempferola je zabeleženo povećanje koncentracije od 12,24% (95% CI: 7,72–16,77) i 10,20% (95% CI: 6,38–14,03) u ekstraktima BS20/P407 (9:1) i BS20/P407 (1:1), u poređenju sa Brij S20. Koncentracija rutina je u ekstraktima BS20/P407 (9:1) i BS20/P407 (1:1) bila viša u poređenju sa ekstraktom Brij S20 za 13,87% (95% CI: 11,41–16,34), odnosno 12,14% (95% CI: 9,69–14,59).

Sinergizam između poloksamera 407 i Brij S20 je ranije zabeležen u mešovitim monoslojevima na granici faza voda/vazduh [246]. Takođe, ranije je pretpostavljeno da u hidrofobnoj unutrašnjosti mešovitim micela poloksamera 407 i polisorbata postoje privlačne interakcije dipol-indukovani dipol [167]. Pored entalpijskih promena, termodinamička stabilnost mešovitim agregata

poloksamera 407 i polisorbata je takođe pripisana unapređenom pakovanju molekula surfaktanata u hidrofobnim jezgroma micela. Slično polisorbatnim surfaktantima, Brij S20 molekuli kada se nađu u binarnim smešama sa molekulima poloksamera 407, zahvaljujući svojim fleksibilnim hidrofobnim lancima unapređuju pakovanje micelarnih jezgara poloksamera 407. Kao rezultat unapređenog pakovanja nastaju termodinamički stabilnije mešovite micelle, čije je jezgro manje porozno za prodor molekula vode i posledično ima hidrofobniju prirodu u poređenju sa jednokomponentnim agregatima (**Slika 24**). Može se pretpostaviti da je pojava sinergizma u mešovitim micelama Brija S20 i poloksamera 407 razlog većeg kapaciteta smeša surfaktanata za solubilizaciju nepolarnijih polifenolnih jedinjenja (npr. kvercetin, kempferol, rutin) u poređenju sa jednokomponentnim sistemima. Ova zapažanja su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim molekulsko-dinamičkim simulacijama, gde je uočeno da se solubilizacija polifenola različitim tipovima nejonskih surfaktanata dešava u najvećoj meri zahvaljujući hidrofobnim interakcijama, dok u mnogo manjoj meri predstavlja posledicu formiranja vodoničnih veza, budući da se formira samo ograničeni broj ovakvih veza [173].



Slika 24. Pretpostavljeni mehanizmi solubilizacije polifenola u micelama: A) poloksamera 407 i B) BS20/P407 mešovitim micelama

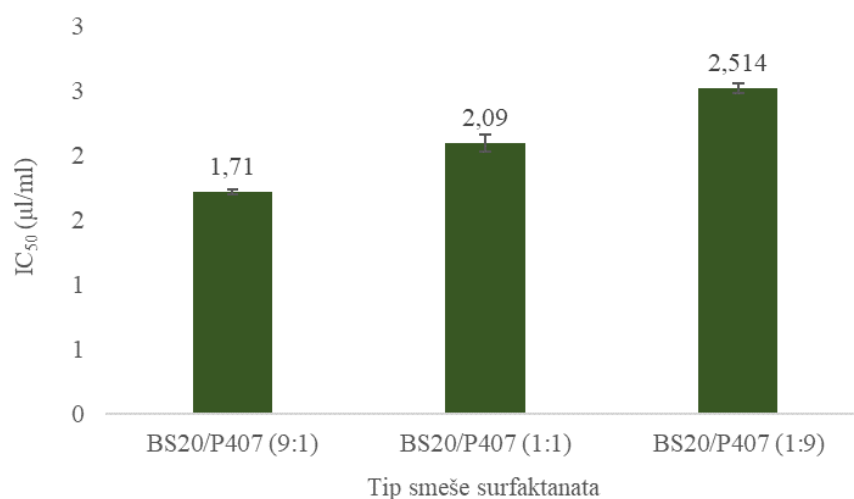
U slučaju polarnijih polifenolnih jedinjenja (kao što je galna kiselina) značajno povećanje koncentracije zabeleženo je u ekstraktu smeše BS20/P407 (1:1), dok je smeša BS20/P407 (9:1) pokazala samo blago povećanje efikasnosti ekstrakcije u poređenju sa pojedinačnim surfaktantima. Pored toga, u slučaju siringinske kiseline i katehina (polifenolnih jedinjenja manje polarnosti u poređenju sa galnom kiselinom), povećanje efikasnosti ekstrakcije zabeleženo je u smešama BS20/P407 (1:1) i BS20/P407 (9:1) u odnosu na rastvor poloksamera 407, dok koncentracije ovih jedinjenja nisu nadmašile koncentracije dobijene rastvorom Brija S20. Prilikom analize sadržaja resveratrola u ekstraktima je uočen potpuno drugačiji obrazac u poređenju sa ostalim polifenolnim jedinjenjima. Naime, sa porastom masenog udela poloksamera 407 u ekstrakcionom sistemu zapažen je porast koncentracije resveratrola u ekstraktima.

5.4.3 Antioksidativni kapacitet ekstrakata – sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala

Svi ekstrakti dobijeni primenom smeša surfaktanata (3% (m/V), pH=4, 100:1) ispoljili su sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala (**Slika 25**) značajno višu u poređenju sa vodenim ekstraktom komine grožđa (IC_{50} vrednost vodenog ekstrakta iznosila je $3,48 \pm 0,06$ μ l/ml). Među ispitanim smešama, smeša BS20/P407 (9:1) je ispoljila najveći kapacitet neutralizacije DPPH slobodnih radikala ($IC_{50} = 1,71 \pm 0,02$ μ l/ml), dok su preostale dve smeše pokazale nižu antioksidativnu aktivnost. Takođe, antioksidativni kapacitet ekstrakta BS20/P407 (9:1) bio je uporediv sa antioksidativnim kapacitetom vodeno-etanolnog rastvora ($1,66 \pm 0,02$ μ l/ml), koji se smatra jednim od najefikasnijih medijuma u klasičnoj čvrsto-tečnoj ekstrakciji polifenola konvencionalnim rastvaračima [16, 130]. Smeša BS20/P407 (1:9), koja je istovremeno imala i najniži sadržaj ukupnih fenola, pokazala je najmanju sposobnost vezivanja slobodnih radikala.

Pirsonovi koeficijenti korelacije između antioksidativnog kapaciteta (IC_{50} vrednosti) i sadržaja ukupnih fenola, kao i između antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja pojedinačnih fenolnih komponenti ekstrakata dobijenih primenom vodenih rastvora smeša surfaktanata iznose -0,876, odnosno -0,823. Dobijene vrednosti ukazuju na postojanje korelacije između fenolnog sadržaja i antioksidativnog kapaciteta ekstrakata. Uprkos korelaciji između sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti uočenoj kod ekstrakata smeša surfaktanata, kao i kod ekstrakata

pojedinačnih surfaktanata (**Tabela 9**), rezultate određivanja antioksidativne aktivnosti micelarnih rastvora neophodno je interpretirati obazrivo [171]. Naime, iako surfaktanti sami nemaju sposobnost neutralizacije DPPH radikala, prisustvo surfaktanata u reakcionoj smeši može da modifikuje antioksidativnu aktivnost biološki aktivnih jedinjenja, kao i da utiče na mehanizam reakcije između jedinjenja i slobodnih radikala [247-249]. Prema literaturnim podacima, zabeleženi su slučajevi gde je prisustvo surfaktanata u reakcionim smešama uticalo i na povećanje i na smanjenje antioksidativnog kapaciteta biološki aktivnih jedinjenja [247-249]. Pored toga, Chat i sar. (2011) su ustanovili da priroda surfaktanta, veličina micela, kao i polarnost polifenolnih jedinjenja i njihov položaj unutar micela utiču na sposobnost polifenola za neutralizaciju DPPH slobodnih radikala [250]. Prema tome, može se pretpostaviti da svi navedeni faktori mogu uticati na rezultate testova procene antioksidativnog kapaciteta ekstrakata komine grožđa.

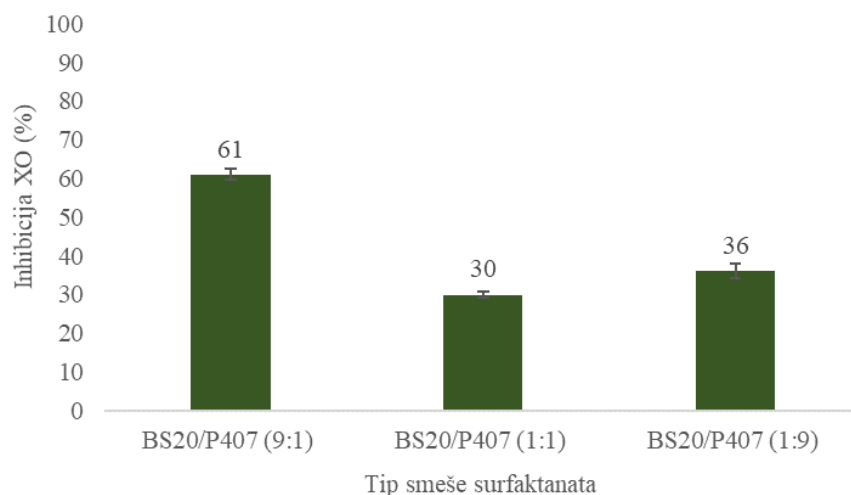


Slika 25. Sposobnost ekstrakata dobijenih rastvorima smeša surfaktanata za neutralizaciju DPPH slobodnih radikala (IC₅₀ vrednosti)

5.4.4 Sposobnost ekstrakata za inhibiciju ksantin oksidaze

Sposobnosti ekstrakata dobijenih primenom vodenih rastvora smeša surfaktanata (3% (m/V), pH=4 i 100:1) da inhibišu enzim ksantin oksidazu ispitana je *in vitro* testom i pokazano je da svi ekstrakti dobijeni primenom vodenih rastvora smeša surfaktanata ispoljavaju značajnu sposobnost inhibicije ksantin-oksidaze (**Slika 26**). Među svim ispitanim ekstraktima dobijenim primenom vodenih rastvora surfaktanata (i pojedinačnih surfaktanata i binarnih smeša surfaktanata) (**Slike**

22 i 26), najveću sposobnost inhibicije ksantin oksidaze ispoljio je ekstrakt BS20/P407 (9:1). Međutim, stepen inhibicije ksantin oksidaze koji su ispoljili ekstrakti dobijeni primenom rastvora surfaktanata (pojedinačnih surfaktanata i smeša surfaktanata) bio je niži u poređenju sa kontrolnim rastvaračima (voda, etanol i voda:etanol (1:1)) (**Slika 17**). Pored toga, nije uočena korelacija između stepena inhibicije ksantin oksidaze i sadržaja ukupnih fenola, kao i ukupnog sadržaja pojedinačnih fenolnih komponenti (Pirsonovi koeficijenti korelacije: -0,574 i -0,569) kada se posmatraju svi ispitani ekstrakti (dobijeni primenom smeša surfaktanata, pojedinačnih surfaktanata i konvencionalnih rastvarača). Uzimajući u obzir da su najviše inhibitorne aktivnosti dobijene u slučaju kontrolnih ekstrakata, kao i da nije uočen visok stepen korelacije između stepena inhibicije ksantin oksidaze i polifenolnog sastava ekstrakata može se pretpostaviti da postoji određeni vid interferencija surfaktanata sa enzimom ksantin oksidaza koji utiče na rezultate primenjenog *in vitro* testa.



Slika 26. Stepen inhibicije ksantin oksidaze ekstrakata dobijenih rastvorima smeša surfaktanata

5.4.5 Uticaj ekstrakcije polifenola iz komine grožđa na veličinu micela u rastvorima smeša surfaktanata

Tehnikom dinamičkog rasejanja svetlosti su određene veličine čestica u vodenim rastvorima smeša surfaktanata (BS20/P407 (9:1), BS20/P407 (1:1) i BS20/P407 (1:9)) koncentracija 1% i 3% (m/V), kao i u ekstraktima komine grožđa dobijenim ekstrakcijom uz korišćenje navedenih rastvora kao ekstrakcionih medijuma (pH=4 i 100:1). Veličine čestica su određene na osnovu raspodele veličine

čestica po intenzitetu rasejane svetlosti, zapremini čestica, kao i po broju čestica. Rezultati su prikazani u **Tabeli 17** i na **Slici 27**.

Poređenjem rezultata dobijenih analizom vodenih rastvora smeša surfaktanata DLS metodom uočeno je da povećanje koncentracije rastvora dovodi samo do malih promena u veličinama čestica. Posmatranjem dominantnih pikova u raspodeli veličine čestica na osnovu intenziteta rasejane svetlosti u slučaju vodenih rastvora smeša surfaktanata pri obe ispitane koncentracije uočene su razlike u veličini čestica koje se mogu dovesti u vezu sa masenim udelom pojedinačnih surfaktanata u smešama. Veličine mešovitih micela su bile u rasponu od 7,34 nm do 17,32 nm u rastvorima smeša surfaktanata koncentracije 1% (m/V) i u rasponu od 10,79 nm do 22,00 nm u rastvorima koncentracije 3% (m/V). Naime, uočava se povećanje veličine čestica u binarnim smešama sa porastom masenog udela poloksamera 407. Ova pojava bi se mogla objasniti načinom pakovanja surfaktanata u mešovitim micelama, kao i polimernom strukturom poloksamera 407. Pored toga, slično vodenim rastvorima poloksamera 407, u vodenom rastvoru smeše sa dominantnim udelom poloksamera 407 (BS20/P407 (1:9)) koncentracije 3% (m/V) prvi pik je prisutan pri srednjoj vrednosti prečnika čestica od 4,02 nm (sa udelom od 4,7% u raspodeli intenziteta rasejane svetlosti), što se može pripisati prečniku monomera poloksamera 407 (**Slika 23**).

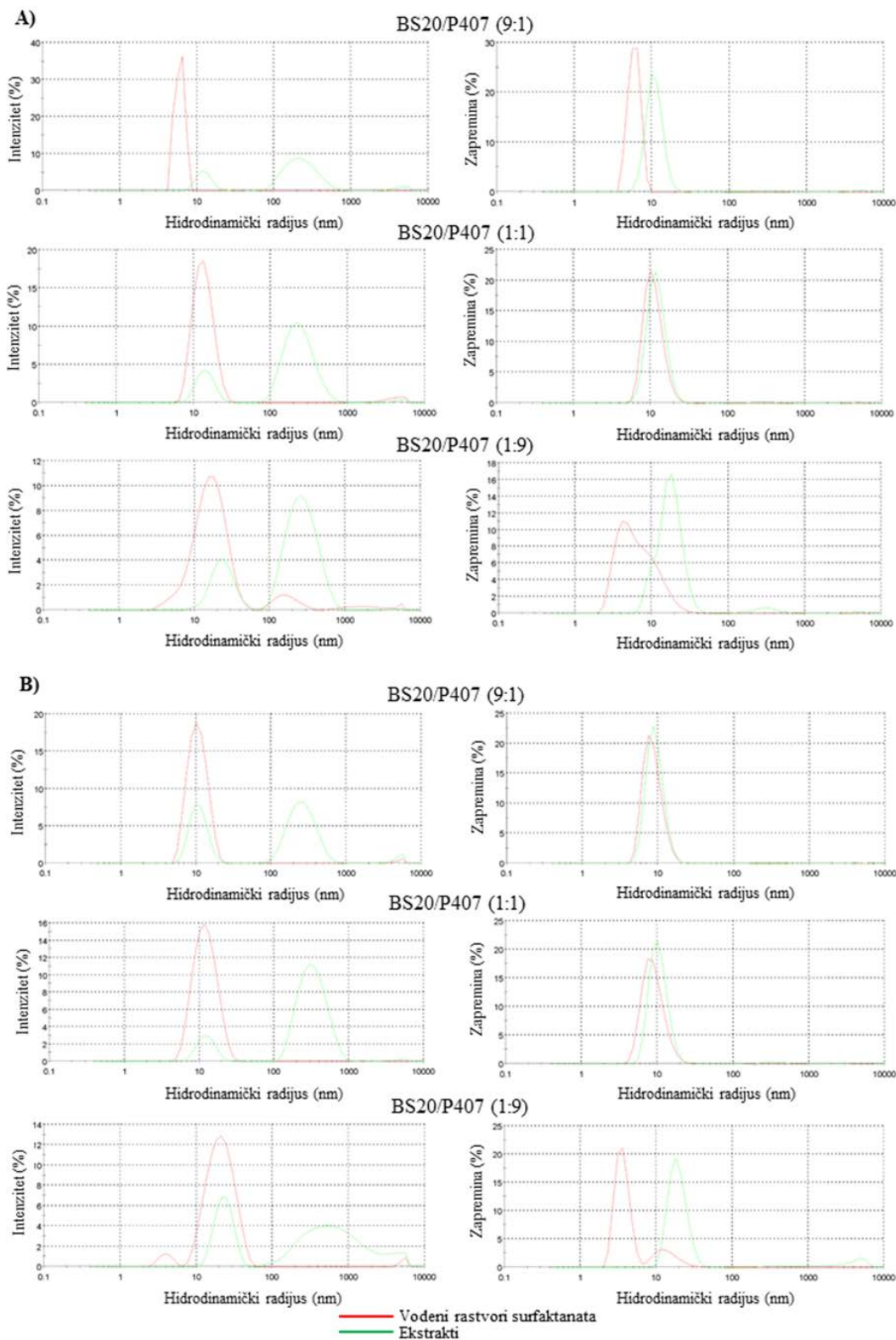
Tabela 17. Veličine čestica u vodenim rastvorima smeša surfaktanata i u odgovarajućim ekstraktima

Sistem	PdI ¹	Raspodela po intenzitetu rasejane svetlosti			Raspodela po zapremini čestica			Raspodela po broju čestica	
		1. pik (nm)/%	2. pik (nm)/%	3. pik (nm)/%	1. pik (nm)/%	2. pik (nm)/%	3. pik (nm)/%	Srednja veličina čestica (nm)	
Rastvori surfaktanata									
1%	BS20/P407 (9:1)	0,291	7,34/100,0	/	/	6,802/100,0	/	/	6,42
	BS20/P407 (1:1)	0,175	13,83/96,4	4147/3,6	/	11,12/99,9	4465/0,1	/	9,46
	BS20/P407 (1:9)	0,250	17,32/88,1	173,3/7,8	1855	7,379/100,0	/	/	4,48
	Ekstrakti								
	BS20/P407 (9:1)	1	12,94/21,8	241,3/74,1	4473/4,1	11,03/97,9	271,1/0,9	4821/1,3	9,89
	BS20/P407 (1:1)	1	14,72/20,2	250,6/78,5	4688/1,3	12,15/97,9	281,1/1,4	4953/0,6	10,50
BS20/P407 (1:9)	0,662	24,86/24,6	288,4/75,1	4693/0,3	17,94/95,0	313,4/4,4	4955/0,6	14,99	
Rastvori surfaktanata									
3%	BS20/P407 (9:1)	0,173	10,79/98,8	4992/1,2	/	8,673/100,0	/	/	7,37
	BS20/P407 (1:1)	0,139	12,55/100,0	/	/	9,128/100,0	/	/	7,40
	BS20/P407 (1:9)	0,250	4,02/4,7	22,00/93,8	5222/0,5	3,630/80,5	14,22/19,5	/	3,35
	Ekstrakti								
	BS20/P407 (9:1)	0,918	11,09/36,8	272,3/60,4	4980/2,8	9,292/99,3	299,0/0,3	5162/0,4	8,17
	BS20/P407 (1:1)	0,785	12,73/14,4	344,1/84,9	4960/0,7	10,62/98,0	360,9/1,7	5132/0,3	9,23
BS20/P407 (1:9)	0,881	23,68/33,2	787,0/60,3	4263/6,4	19,63/89,0	368,6/1,7	3624/9,4	16,92	

¹Indeks polidisperznosti

Rezultati određivanja veličine čestica u vodenim rastvorima smeša surfaktanata koncentracija 1% i 3% (m/V) i u odgovarajućim ekstraktima ukazuju na povećanje prečnika mešovitih micela svih ispitanih smeša nakon ekstrakcije polifenola iz komine grožđa (**Tabela 17, Slika 27**). Uočeno povećanje veličine mešovitih micela nakon ekstrakcije polifenola iz komine grožđa uzrokovano je procesom solubilizacije polifenola unutar micela. Takođe, u skladu sa zapažanjem koje se odnosi na promene veličine čestica u rastvorima pojedinačnih surfaktanata nakon ekstrakcije (**Tabela 14**), u ekstraktu dobijenom primenom 3% rastvora smeše BS20/P407 (1:9) nije uočeno postojanje čestica veličine oko 4-6 nm (monomeri poloksamera 407), koje su, sa druge strane, prisutne u vodenom rastvoru navedene smeše pre ekstrakcije. Povećanje veličine čestica nakon ekstrakcije rastvorima smeša surfaktanata, kao i rastvorima pojedinačnih surfaktanata, u saglasnosti je sa rezultatima ranijih istraživanja [175].

Između vodenih rastvora smeša surfaktanata i odgovarajućih ekstrakata uočene su razlike u vrednostima indeksa polidisperznosti. Naime, indeks polidisperznosti imao je vrednosti niže od 0,70 u svim ispitanim sistemima vodenih rastvora smeša surfaktanata (**Tabela 17**), što ukazuje na monomodalnu raspodelu veličine čestica, odnosno pokazuje da su čestice približno istog prečnika. Sa druge strane, u slučaju ekstrakata dobijenih primenom vodenih rastvora smeša surfaktanata dobijene raspodele veličine čestica imale su vrednosti indeksa polidisperznosti bliske ili više od 0,70 (**Tabela 17**), što ukazuje na multimodalnu distribuciju veličina. Ovaj efekat ukazuje na neravnomeran stepen solubilizacije tokom procesa ekstrakcije. Može se pretpostaviti da se ujednačen stepen solubilizacije polifenola u mešovitim micelama može postići kontrolom procesnih parametara (kao što su dužina ekstrakcionog postupka ili brzina mešanja).



Slika 27. Raspodela veličine čestica u vodenim rastvorima smeša surfaktanata i odgovarajućim ekstraktima: A) rastvori koncentracije 1% (m/V), B) rastvori koncentracije 3% (m/V)

5.5. Određivanje karakteristika emulzija

Ispitane su karakteristike kontrolnih emulzija izrađenih uz upotrebu sledećih emulgatora: čistog poloksamera 407, smeša BS20/P407 i smeša T60/P407 (pojedinačni emulgatori su pomešani u masenim odnosima 9:1, 1:1 i 1:9). Za izradu svih emulzija upotrebljeno je suncokretovo ulje, čija je koncentracija bila konstantna (20%, m/m). Ispitana je koncentracija emulgatora od 3% i 5% (m/m). Na isti način su izrađene i emulzije sa ekstraktima komine grožđa kao kontinualnom fazom. Ekstrakti komine grožđa su za potrebe izrade emulzija dobijeni korišćenjem istog surfaktanta/smeše surfaktanata koji su upotrebljeni kao emulgatori.

5.5.1 Veličina kapi unutrašnje faze emulzija

Najznačajnije disperzne osobine emulzionih sistema predstavljaju veličina dispergovanih kapi i raspodela učestalosti veličina kapi (raspodela veličina kapi) i one imaju značajan uticaj na osobine sistema (izgled, tekstura, reološke karakteristike, stabilnost i dr.) [184, 187, 251]. Veličina i raspodela veličina kapi unutrašnje faze u emulzijama predstavlja rezultat ravnoteže između dva suprotna procesa, smanjivanja veličine kapi i njihove koalescencije, koji se dešavaju istovremeno tokom procesa homognizacije emulzije [184]. Poznato je da različiti faktori utiču na veličinu i raspodelu veličina kapi, uključujući tip surfaktanta, njegovu koncentraciju i brzinu adsorpcije, primenjene tehnike homogenizacije, komponente koje čine emulziju (priroda sastojaka, količinski sastav i dr.), kao i uslovi čuvanja gotovog proizvoda [184, 252, 253]. Generalno, emulzije predstavljaju polidisperzne sisteme. Pored predstavljanja celokupne raspodele učestalosti veličina kapi, u cilju jednostavnog upoređivanja različitih sistema značajno je prikazivanje veličine kapi polidisperznih emulzija pomoću odgovarajućih parametara, kao što su specifična površina (S), površinski srednji prečnik (d_{32}), zapreminski srednji prečnik (d_{43}) i dr. Parametar d_{32} je u vezi sa specifičnom površinom kapi tj. odnosi se na specifičnu površinu kapi koja je izložena kontinualnoj fazi po jedinici zapremine emulzije. Parameter d_{43} predstavlja zbir zapreminskih udela kapi svakog ranga veličina pomnožen sa srednjim prečnikom kapi tog ranga, te je u većoj meri osetljiv na prisustvo kapi većih prečnika u poređenju sa d_{32} (npr. ovaj parameter je više osetljiv na pojavu flokulacije).

Veličina i raspodela veličina kapi unutrašnje faze emulzija ispitivana je sa ciljem dobijanja informacija o emulgujućim sposobnostima čistog poloksamera 407 i smeša poloksamera 407 sa

Brij S20 i Tween 60, kao i o uticaju inkorporiranja ekstrakata komine grožđa u kontinualnu fazu na emulgjuće sposobnosti navedenog emulgatora i smeša emulgatora. Takođe, praćenje promene parametara veličine (pre svega srednjih prečnika) sa vremenom rađeno je u cilju određivanja sposobnosti stabilizacije emulzija.

Vrednosti d_{32} i d_{43} , kao i $d(0,1)$, $d(0,5)$ i $d(0,9)$ statistički su značajno više u kontrolnim emulzijama stabilizovanim sa 3% (m/m) u poređenju sa 5% (m/m) poloksamera 407. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa ranijim ispitivanjima, kojima je utvrđeno da se primenom viših koncentracija različitih tipova emulgatora (npr. različitih prirodnih, niskomolekularnih i polimernih emulgatora) u U/V emulzijama dobijaju kapi manjih dijametara [160, 254]. Zhang i sar. (2017) su analizirali dimenzije kapi U/V emulzija stabilizovanih pomoću tri različite koncentracije poloksamera 407 (3%, 5% i 8%, m/V) i pri najvišoj koncentraciji dobijene su kapi najmanjih dimenzija ($130,30 \pm 1,10$ nm) [160]. Uticaj koncentracije emulgatora na dimenzije kapi unutrašnje faze može se objasniti preko dva mehanizma: a) pri višim koncentracijama veći je broj molekula emulgatora koji su dostupni i mogu se adsorbovati na površinu kapi tokom procesa homogenizacije; b) ukoliko je emulgator prisutan u višoj koncentraciji, ubrzava se proces adsorpcije molekula emulgatora na površinu uljanih kapi, čime se efikasnije sprečava proces koalescencije [160, 254].

Na osnovu prethodno iznetih rezultata, kao i na osnovu efikasnosti ekstrakcije polifenola iz komine grožđa, koja je postignuta pri različitim koncentracijama surfaktanata, za dalja ispitivanja emulgjućih sposobnosti smeša polimernog sa niskomolekularnim surfaktantima odabrana je ukupna masena koncentracija surfaktanata u emulzijama od 5% (m/m). U **Tabelama 18 i 19** su predstavljeni rezultati dobijeni merenjem raspodele veličine čestica u emulzijama.

Među kontrolnim emulzijama stabilizovanim poloksamerom i smešama BS20/P407 najmanju d_{32} vrednost imala je emulzija koja je sadržala čist poloksamer 407, dok je statistički značajno najmanja d_{43} vrednost zabeležena kod emulzije koja je sadržala smešu BS20/P407 (9:1). Statistički značajno najveće d_{32} i d_{43} vrednosti imala je emulzija stabilizovana smešom BS20/P407 (1:1) (**Tabela 18**). Sa druge strane, u drugoj grupi kontrolnih emulzija, koje su kao emulgatore sadržale poloksamer i smeše T60/P407, najniže d_{32} i d_{43} vrednosti određene su u smeši T60/P407 (9:1), dok su navise vrednosti uočene kod emulzija sa čistim poloksamerom (kod parametra d_{43} postoje statistički značajne razlike) (**Tabela 19**). Poređenjem d_{32} i d_{43} vrednosti emulzija stabilizovanim smešama BS20/P407 i T60/P407 uočavaju se manji dijometri kapi u slučaju smeša polimernog

surfaktanta i Tween-a 60. U emulzijama čiju kontinualnu fazu čine ekstrakti komine grožđa ni u jednom slučaju nije došlo do statistički značajnog povećanja površinskog srednjeg prečnika kapi (d_{32}) u odnosu na odgovarajuće kontrolne emulzije. Interesantna pojava je uočena kod svih emulzija sa ekstraktima komine stabilizobanih smešama BS20/P407, gde je zabeleženo statistički značajno smanjenje površinskog srednjeg prečnika kapi u odnosu na odgovarajuće kontrolne emulzije.

Tabela 18. Parametri raspodele veličina kapi kontrolnih emulzija stabilizovanih čistim poloksamerom 407 i smešama poloksamera 407 sa Brij S20, kao i odgovarajućih emulzija sa ekstraktima komine grožđa inkorporiranim u kontinualnu fazu

Uzorak	Specifična površina S (m ² /g)	Površinski srednji prečnik d ₃₂ (μm)	Zapreminski srednji prečnik d ₄₃ (μm)	d (0,1) (μm)	d (0,5) (μm)	d (0,9) (μm)	Span	Ujednačenost
Kontrolne emulzije								
Pokolsamer 407	3,717 ± 0,023 ^{abd}	1,614 ± 0,011 ^{abd}	3,702 ± 0,084 ^{ab*}	0,788 ± 0,005 ^{ab}	1,945 ± 0,012 ^{abd}	8,973 ± 0,601 ^{ad*}	4,212 ± 0,287 ^{ab*}	1,293 ± 0,038 ^{ac*}
BS20/P407 (1:9)	3,583 ± 0,070 ^{abd*}	1,677 ± 0,033 ^{abd*}	3,557 ± 0,187 ^{ab*}	0,808 ± 0,011 ^{abd*}	2,047 ± 0,049 ^{abd*}	8,793 ± 0,663 ^{b*}	3,898 ± 0,238 ^{ab*}	1,130 ± 0,065 ^{b*}
BS20/P407 (1:1)	3,277 ± 0,099 ^{c*}	1,833 ± 0,054 ^{c*}	4,240 ± 0,150 ^{c*}	0,863 ± 0,019 ^{cd}	2,279 ± 0,088 ^{c*}	10,648 ± 0,485 ^{c*}	4,295 ± 0,044 ^{c*}	1,273 ± 0,011 ^{ac*}
BS20/P407 (9:1)	3,603 ± 0,075 ^{abd*}	1,666 ± 0,033 ^{abd*}	3,034 ± 0,147 ^{d*}	0,836 ± 0,014 ^{bcd*}	2,027 ± 0,039 ^{abd*}	5,973 ± 0,334 ^{ad*}	2,533 ± 0,113 ^{d*}	0,877 ± 0,047 ^{d*}
Emulzije sa ekstraktom komine								
Poloksamer 407	3,950 ± 0,166 ^{efgh}	1,520 ± 0,062 ^{efgh}	3,010 ± 0,258 ^{efg*}	0,752 ± 0,024 ^{efgh}	1,843 ± 0,079 ^{efgh}	6,341 ± 0,744 ^{efg*}	3,024 ± 0,273 ^{ef*}	1,019 ± 0,083 ^{ef*}
BS20/P407 (1:9)	3,960 ± 0,105 ^{efgh*}	1,516 ± 0,039 ^{efgh*}	2,769 ± 0,129 ^{efg*}	0,756 ± 0,020 ^{efgh*}	1,842 ± 0,053 ^{efgh*}	5,721 ± 0,024 ^{efg*}	2,697 ± 0,090 ^{efg*}	0,890 ± 0,104 ^{efg*}
BS20/P407 (1:1)	3,803 ± 0,150 ^{efgh*}	1,579 ± 0,062 ^{efgh*}	2,682 ± 0,038 ^{efgh*}	0,799 ± 0,038 ^{efgh}	1,915 ± 0,066 ^{efgh*}	5,418 ± 0,187 ^{efg*}	2,412 ± 0,082 ^{fg*}	0,779 ± 0,033 ^{fg*}
BS20/P407 (9:1)	3,993 ± 0,100 ^{efgh*}	1,503 ± 0,037 ^{efgh*}	2,344 ± 0,074 ^{gh*}	0,769 ± 0,022 ^{efgh*}	1,803 ± 0,076 ^{efgh*}	4,397 ± 0,134 ^{h*}	1,980 ± 0,020 ^{h*}	0,643 ± 0,014 ^{gh*}

^{a-d} Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) kontrolnih emulzija izrađenih korišćenjem različitih emulgatora, u kolonama različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

^{e-h} Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) emulzija sa ekstraktom komine izrađenih korišćenjem različitih emulgatora, u kolonama različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

* Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) za kontrolne emulzije i emulzije sa ekstraktom komine izrađene korišćenjem istog emulgatora, statistički značajno se razlikuju (p<0,05)

Tabela 19. Parametri raspodele veličina kapi kontrolnih emulzija stabilizovanih čistim poloksamerom 407 i smešama poloksamera 407 sa Tween 60, kao i odgovarajućih emulzija sa ekstraktima komine grožđa inkorporiranim u kontinualnu fazu

Uzorak	Specifična površina S (m ² /g)	Površinski srednji prečnik d ₃₂ (μm)	Zapreminski srednji prečnik d ₄₃ (μm)	d (0,1) (μm)	d (0,5) (μm)	d (0,9) (μm)	Span	Ujednačenost
Kontrolne emulzije								
Pokolsamer 407	3,717 ± 0,023 ^{abcd}	1,614 ± 0,011 ^{abc}	3,702 ± 0,084 ^{a*}	0,788 ± 0,005 ^{abcd}	1,945 ± 0,012 ^{abc}	8,973 ± 0,601 ^{a*}	4,212 ± 0,287 ^{a*}	1,293 ± 0,038 ^{a*}
T60/P407 (1:9)	3,937 ± 0,176 ^{abcd}	1,526 ± 0,066 ^{abcd}	2,860 ± 0,196 ^{bc}	0,760 ± 0,028 ^{abcd}	1,843 ± 0,079 ^{abcd}	6,310 ± 0,701 ^{bc}	3,004 ± 0,242 ^{b*}	0,932 ± 0,445 ^b
T60/P407 (1:1)	3,770 ± 0,065 ^{abcd}	1,591 ± 0,029 ^{abcd}	2,602 ± 0,147 ^{bcd}	0,817 ± 0,012 ^{abcd}	1,918 ± 0,052 ^{abcd}	5,173 ± 0,365 ^{bcd}	2,270 ± 0,137 ^{cd*}	0,728 ± 0,062 ^{cd*}
T60/P407 (9:1)	3,990 ± 0,101 ^{abcd}	1,504 ± 0,038 ^{bcd}	2,244 ± 0,090 ^{cd*}	0,801 ± 0,039 ^{abcd*}	1,799 ± 0,024 ^{bcd}	3,991 ± 0,188 ^{cd*}	1,775 ± 0,143 ^{cd*}	0,603 ± 0,074 ^{cd*}
Emulzije sa ekstraktom komine								
Pokolsamer 407	3,950 ± 0,166 ^{efgh}	1,520 ± 0,062 ^{efgh}	3,010 ± 0,258 ^{efg*}	0,752 ± 0,024 ^{efgh}	1,843 ± 0,079 ^{efgh}	6,341 ± 0,744 ^{efg*}	3,024 ± 0,273 ^{ef*}	1,019 ± 0,083 ^{e*}
T60/P407 (1:9)	3,933 ± 0,038 ^{efgh}	1,525 ± 0,015 ^{efgh}	2,755 ± 0,055 ^{efgh}	0,766 ± 0,007 ^{efgh}	1,848 ± 0,014 ^{efgh}	5,511 ± 0,135 ^{efgh}	2,567 ± 0,055 ^{fg*}	0,871 ± 0,024 ^{fg}
T60/P407 (1:1)	3,797 ± 0,231 ^{efgh}	1,584 ± 0,093 ^{efgh}	2,851 ± 0,146 ^{efgh}	0,782 ± 0,048 ^{efgh}	1,804 ± 0,367 ^{efgh}	5,930 ± 0,470 ^{efg}	2,630 ± 0,079 ^{fg*}	0,848 ± 0,019 ^{fg*}
T60/P407 (9:1)	4,017 ± 0,030 ^{efgh}	1,493 ± 0,011 ^{efgh}	2,518 ± 0,134 ^{fgh*}	0,756 ± 0,009 ^{efgh*}	1,832 ± 0,008 ^{efgh}	4,731 ± 0,072 ^{fh*}	2,169 ± 0,029 ^{h*}	0,754 ± 0,010 ^{gh*}

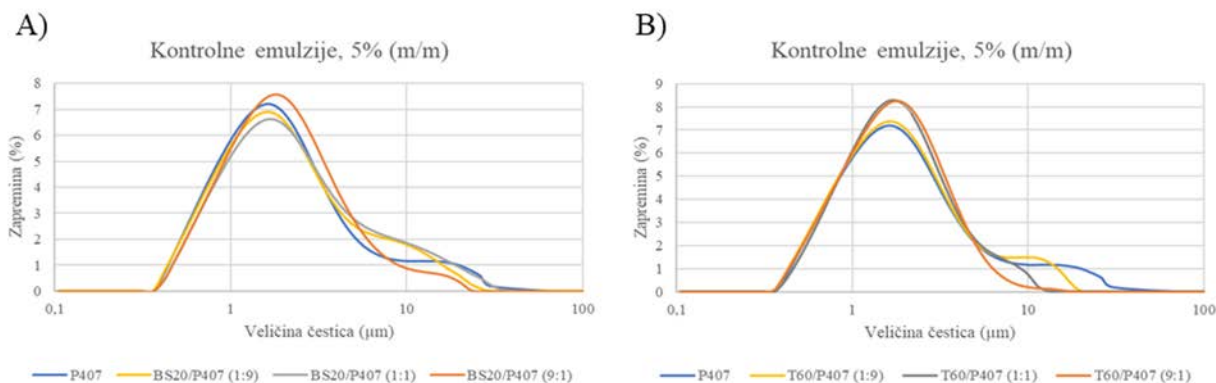
^{a-d} Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) kontrolnih emulzija izrađenih korišćenjem različitih emulgatora, u kolonama različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

^{e-h} Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) emulzija sa ekstraktom komine izrađenih korišćenjem različitih emulgatora, u kolonama različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

* Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) za kontrolne emulzije i emulzije sa ekstraktom komine izrađene korišćenjem istog emulgatora, statistički značajno se razlikuju (p<0,05)

Na osnovu Span vrednosti dobijenih merenjem raspodele veličine kapi zapaža se da kontrolne emulzije stabilizovane čistim poloksamerom i smešom BS20/P407 (9:1) imaju kapi uniformnije veličine u odnosu na ostale emulzije stabilizovane smešama poloksamera i Brij S20, dok je najšira distribucija prisutna u smeši sa jednakim masenim udelima ova dva emulgatora (**Tabela 18**). Sa druge strane, u slučaju kontrolnih emulzija stabilizovanih smešama poloksamera 407 i Tween 60 i čistim poloksamerom zapaža se najuža raspodela u T60/P407 (9:1) emulziji. Emulzija sa čistim poloksamerom je dala emulziju sa najširom raspodelom veličine čestica u ovoj grupi (**Tabela 19**). U većini emulzija sa ekstraktima je zapaženo smanjenje Span vrednosti u odnosu na odgovarajuće kontrolne emulzije.

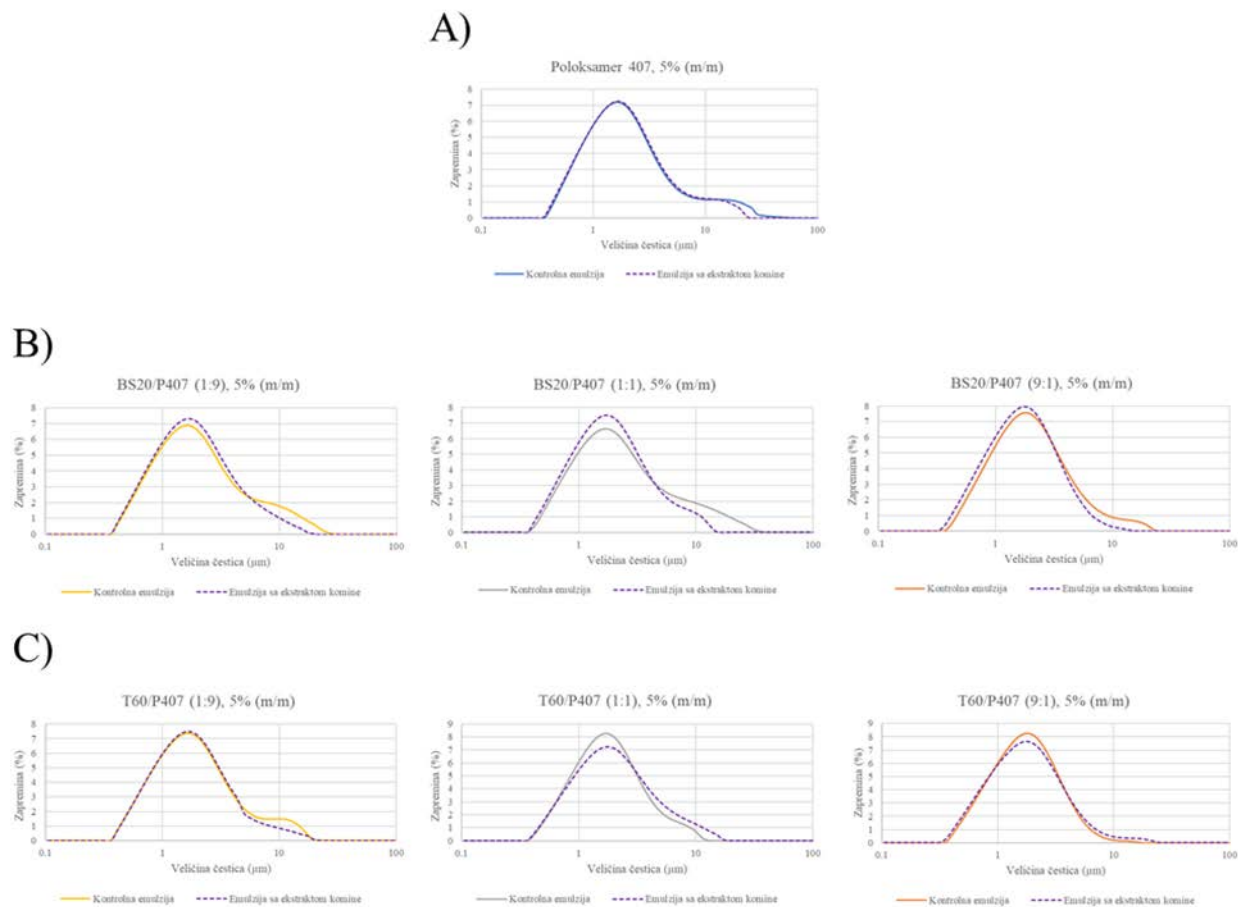
Na **Slici 28** prikazane su raspodele veličine čestica kontrolnih emulzija stabilizovanih čistim poloksamerom 407 i smešama poloksamera sa Brij S20, odnosno sa Tween 60. Dijagrami raspodele veličina kapi se poklapaju sa tabelarno prikazanim rezultatima (**Tabele 18 i 19**). Generalno se uočavaju bimodalne raspodele sa jednim izraženim pikom i drugim vrlo malim pikom koji odgovara dimenzijama kapi oko 10 μm . Bimodalna raspodela veličina kapi unutrašnje faze zapažena je i u emulzijama stabilizovanim poloksamerom 407 u kombinaciji sa nejonskim (tetraetilenglikol monododecil etar), anjonskim (natrijum dodecil sulfat) i katjonskim (cetiltrimetilamonijum bromid) kosurfaktantima [165].



Slika 28. Raspodela veličina kapi unutrašnje faze kontrolnih emulzija stabilizovanih: A) poloksamerom 407 i smešama BS20/P407 i B) poloksamerom 407 i smešama T60/P407

U emulzijama sa ekstraktima komine grožđa inkorporiranim u kontinualnu fazu nisu uočene bitne promene u obliku krive raspodele veličina kapi u odnosu na kontrolne emulzije, kao ni u broju

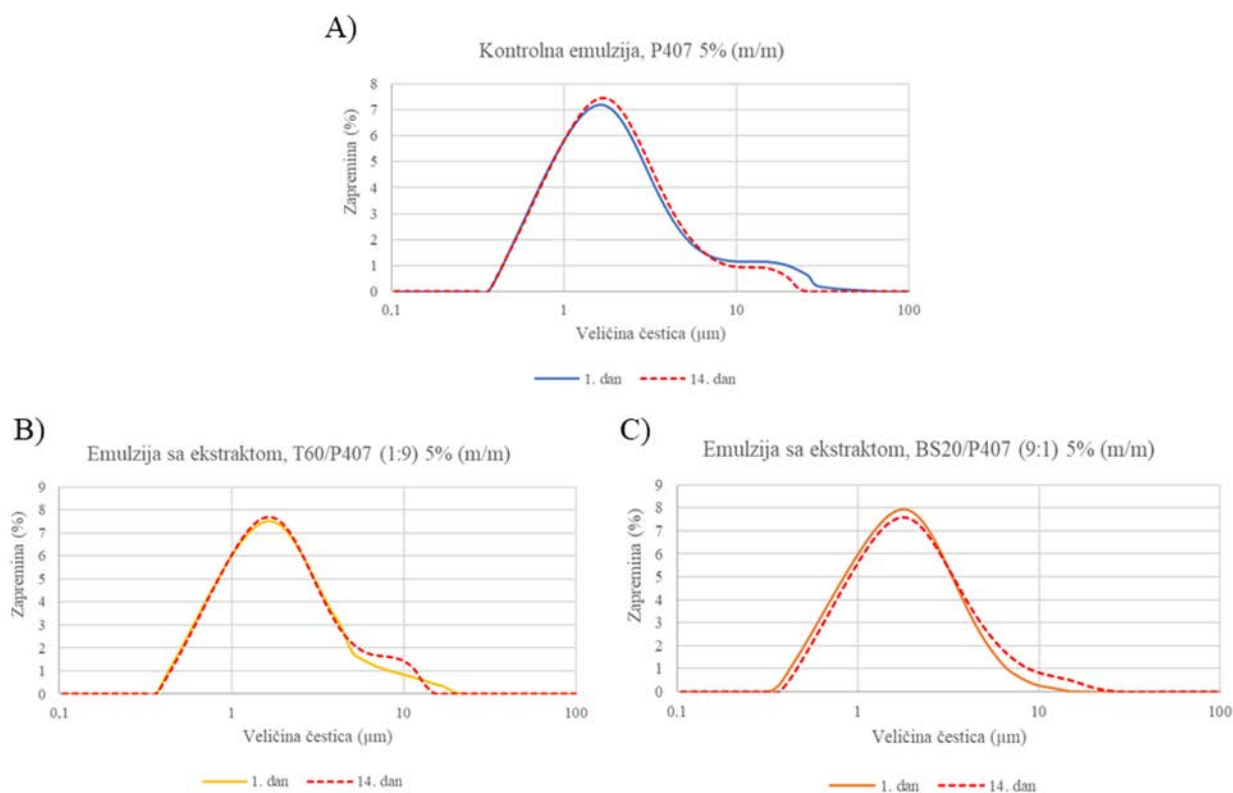
pikova (**Slika 29**). Naime, uočava se da emulzije koje sadrže ekstrakte komine grožđa generalno imaju bimodalnu raspodelu sa dominantnim prvim pikom i slabo izraženim drugim pikom, koji se pojavljuje pri dimenzijama kapi oko 10 μm , isto kao i u slučaju kontrolnih emulzija. Takođe se može uočiti da emulzije sa uklopljenim ekstraktima generalno imaju manji broj čestica većih dimenzija nego u slučaju kontrolnih emulzija, što je u saglasnosti sa tabelarno prikazanim rezultatima ($d(0,9)$ i Span vrednosti).



Slika 29. Raspodela veličina kapi unutrašnje faze kontrolnih i emulzijama sa ekstraktima komine stabilizovanih: A) poloksamerom 407, B) smešama BS20/P407 i C) smešama T60/P407

Nakon perioda praćenja od 14 dana na sobnoj temperaturi nisu uočene statistički značajne razlike u veličini kapi unutrašnje faze (d_{32} i d_{43} vrednosti) ni u slučaju kontrolnih emulzija, ni u slučaju emulzija sa ekstraktima komine kao kontinualnom fazom. Takođe, poređenjem krivih raspodela veličina kapi disperzne faze emulzija nakon 14 dana uočeno je da nije došlo do pomeranja pika ili pojave još jednog dodatnog pika (na **Slici 30** prikazane su krive raspodele odabranih emulzija). Na

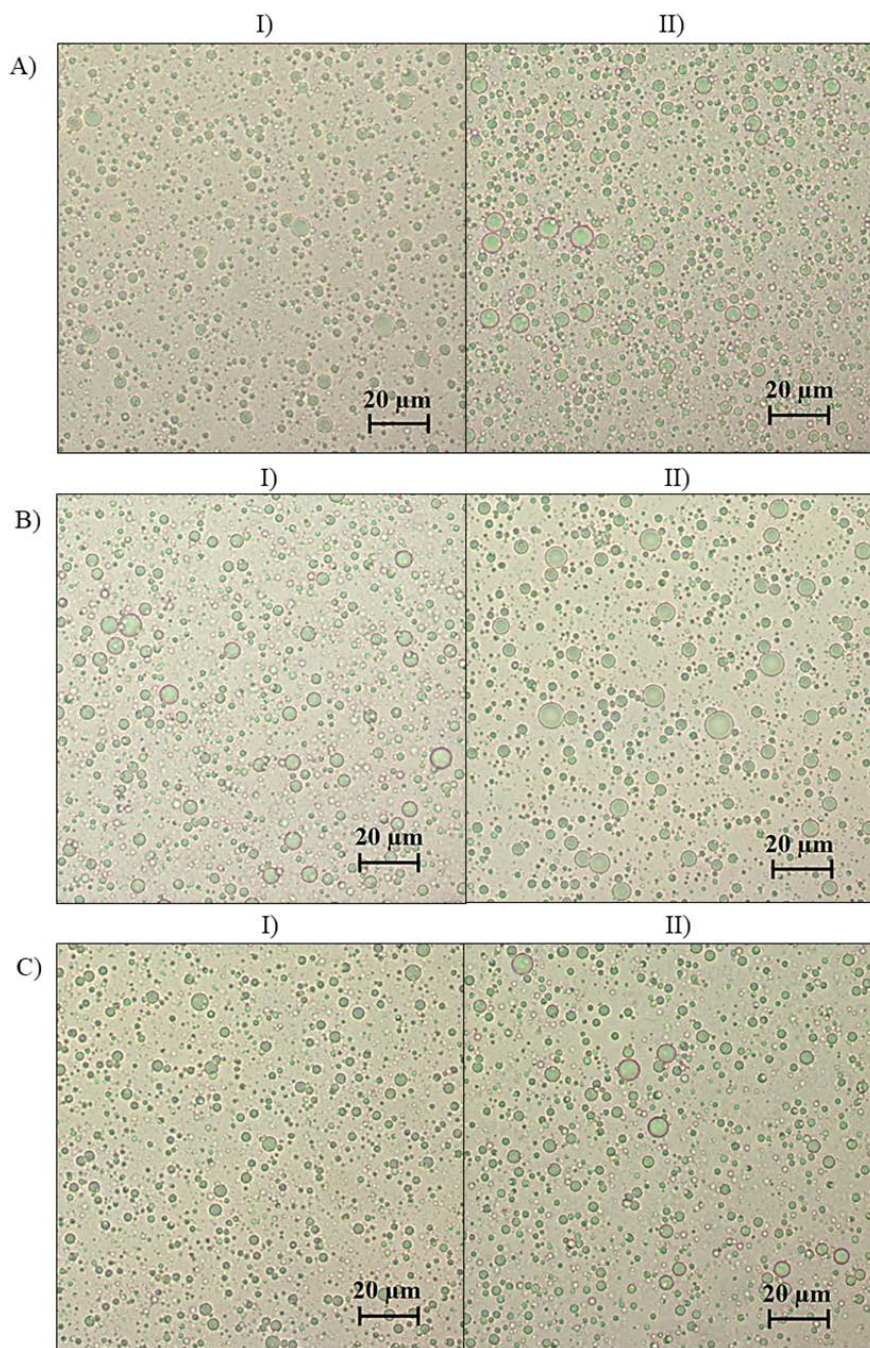
osnovu ovih rezultata se zaključuje da nakon dve nedelje nije došlo do pojave koalescencije u kontrolnim emulzijama stabilizovanim ispitivanim sistemima emulgatora, kao ni u emulzijama sa ekstraktima komine grožđa. Kabong i sar. (2020) su ispitivanjem stabilnosti emulzija tokom perioda od 48 dana na temperaturi od 60 °C zapazili da emulzije stabilizovane sa 3,5 mM poloksamera 407 i nejonskim kosurfaktantom tetraetilenglikol monododecil etrom u koncentracijama većim od 5 mM ostaju stabilne, odnosno da kod njih ne dolazi do promene u raspodeli veličina čestica unutrašnje faze. Isti autori su, sa druge strane, uočili da kod emulzija stabilizovanih poloksamerom 407 i anjonskim natrijum dodecil sulfatom ili katjonskim cetiltrimetilamonijum bromidom kao kosurfaktantima tokom vremena dolazi do pojave dva ili više pikova, što odgovara pojavi koalescencije kapi [165].



Slika 30. Raspodele veličina kapi unutrašnje faze emulzija merene 1. i 14. dana nakon izrade; A) kontrolna emulzija stabilizovana poloksamerom 407, 5% (m/m), B) emulzija sa ekstraktom stabilizovana sa T60/P407 (1:9), 5% (m/m), C) emulzija sa ekstraktom stabilizovana sa BS20/P407 (9:1), 5% (m/m)

Na mikrofotografijama svih ispitanih emulzija (kontrolnih i emulzija sa ekstraktima komine) uočene su kapi unutrašnje faze dimenzija koje odgovaraju vrednostima prikazanim u **Tabelama**

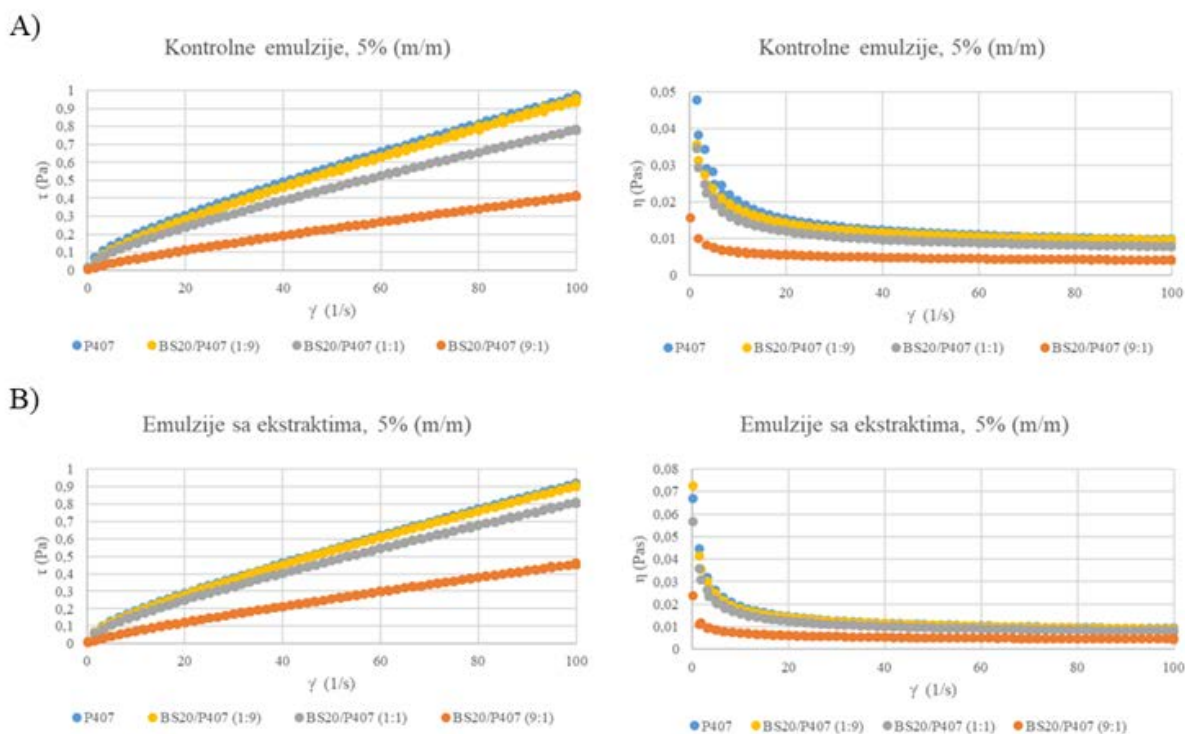
18 i 19. Mikrofotografije odabranih kontrolnih emulzija i emulzija sa inkorporiranim ekstraktima komine su prikazane na **Slici 31**, na kojima se takođe može uočiti polidisperznost kapi, nezavisno od surfaktanta/smeše surfaktanata koji su upotrebljeni za stabilizaciju. Takođe, nakon 14 dana na osnovu mikrofotografija nisu uočene promene u stabilnosti ispitivanih emulzija.



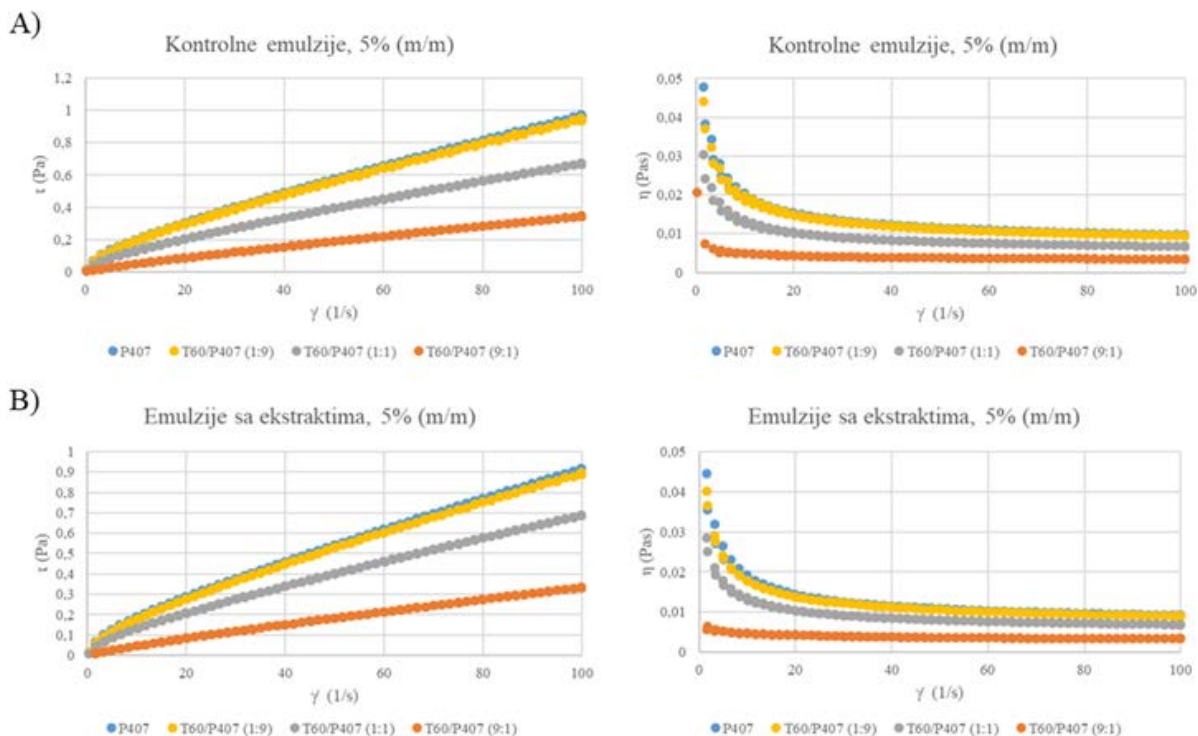
Slika 31. Mikrofotografije kontrolnih (I) i emulzija sa ekstraktima (II) stabilizovanih: A) poloksamerom 407, B) BS20/P407 (1:9) i C) T60/P407 (9:1)

5.5.2 Reološke osobine emulzija

Na reološke karakteristike emulzija utiču sastav emulzija, odnosno udeo uljane i vodene faze, hemijska struktura emulgatora, kao i prisustvo pojedinih komponenata, kao što su makromolekuli koji modifikuju viskozitet kontinualne faze u U/V emulzijama [160, 187]. Na **Slikama 32 i 33** prikazane su krive proticanja ispitanih kontrolnih i emulzija sa ekstraktima komine grožđa kao kontinualnom fazom. Merenjem krivih proticanja utvrđeno je da sve ispitivane emulzije (kontrolne i emulzije sa ekstraktima komine grožđa kao kontinualnom fazom) pokazuju pseudoplastično proticanje bez tiksotropne petlje (uzlazna i silazna kriva se preklapaju). Pseudoplastično proticanje se karakteriše opadanjem prividnog viskoziteta (η) sistema sa povećanjem brzine smicanja ($\dot{\gamma}$) [187].



Slika 32. Krive proticanja emulzija stabilizovanih poloksamerom 407 i smešama poloksamera sa Brij S20: A) kontrolne emulzije, B) emulzije sa ekstraktima

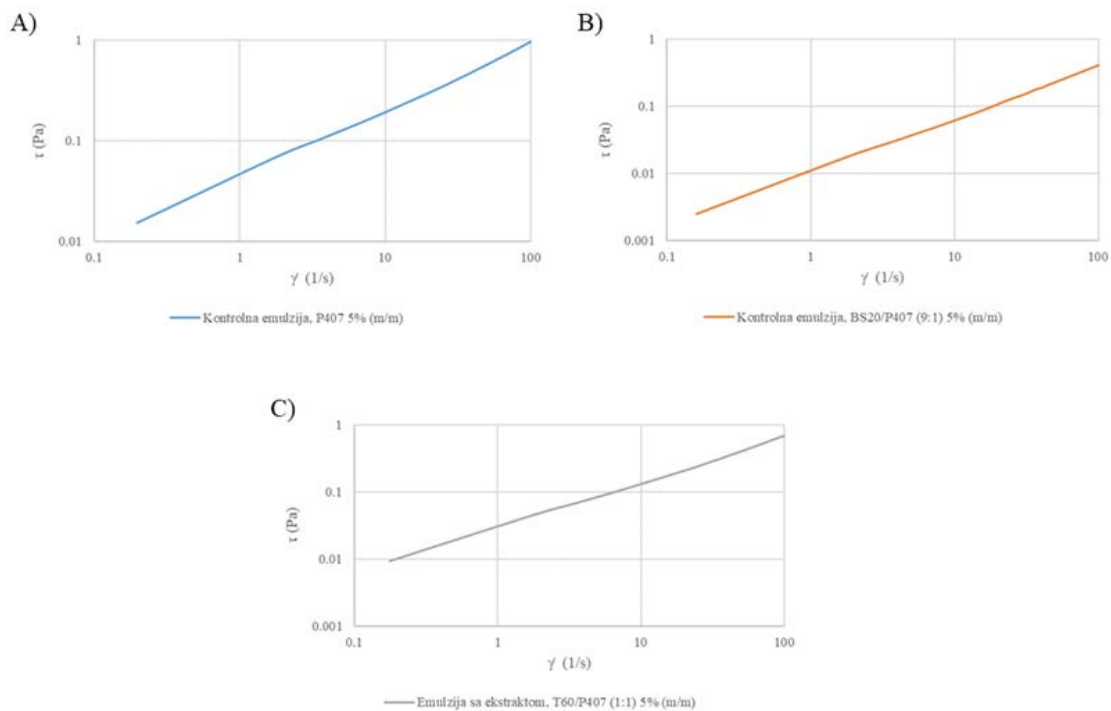


Slika 33. Krive proticanja emulzija stabilizovanih poloksamerom 407 i smešama poloksamera sa Tween 60: A) kontrolne emulzije, B) emulzije sa ekstraktima

Nijedna od ispitanih emulzija nije imala linearni viskoelastični region, što predstavlja prvi pokazatelj da emulzije ne pokazuju prisustvo prinosnog napona pri niskim brzinama proticanja, odnosno plastično proticanje. Odsustvo prinosnog napona je potvrđeno i na logaritamskim raspodelama krivih proticanja svih emulzija (na **Slici 34** prikazane su krive odabranih emulzija), kao i na osnovu koeficijenata korelacije, koji su imali više vrednosti za jednačinu stepenog zakona, nego u slučaju Herschel-Bulkley-jeve jednačine [255], koja uključuje i prinosni napon kao parametar za fitovanje krive proticanja.

Budući da sistemi nisu pokazali prisustvo prinosnog napona, parametri krivih proticanja (konstante K i n) određeni su korišćenjem stepenog zakona, pomoću jednačine:

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (9)$$



Slika 34. Logaritamske raspodele krivih proticanja: A) kontrolne emulzije stabilizovane poloksamerom 407, B) kontrolne emulzije stabilizovane sa BS20/P407 (9:1) i C) emulzije sa ekstraktom komine stabilizovane sa T60/P407 (1:1)

U **Tabelama 20 i 21** prikazane su vrednosti indeksa konzistencije (K) i stepena nenjutnovskog ponašanja (n) analiziranih emulzija. Koeficijent K predstavlja merilo konzistencije sistema i indikator je njegovog viskoziteta, dok konstanta n određuje stepen odstupanja sistema od idealnog njutnovskog ponašanja. Stepen nenjutnovskog ponašanja može imati vrednosti između 0 i 1. U slučaju njutnovskog proticanja n ima vrednost 1, dok niže vrednosti ukazuju na nenjutnovsko ponašanje, odnosno što n ima manju vrednost, izraženiji je nenjutnovski karakter ispitivanog sistema [187]. Pseudoplastično proticanje svih analiziranih emulzija (kontrolnih i emulzija sa ekstraktom komine kao kontinualnom fazom) potvrđeno je i na osnovu vrednosti indeksa n , budući da su u svim slučajevima vrednosti ovog indeksa bile niže od 1. Na osnovu vrednosti prikazanih u **Tabelama 20 i 21** uočava se da stepen odstupanja od njutnovskog ponašanja raste sa povećanjem udela poloksamera 407 u svim ispitanim emulzijama, što je uočljivo i na **Slikama 32 i 33**. Takođe, vrednosti koeficijenta K rastu sa porastom udela poloksamera 407, ukazujući na porast prividnog viskoziteta sistema. Naime, budući da je poloksamer 407 makromolekularni emulgator, on pored emulgujućih svojstava usled svoje amfifilne prirode, povećava viskozitet kontinualne faze

emulzija u mnogo većoj meri u poređenju sa klasičnim niskomolekularnim emulgatorima (Brij S20 i Tween 60). Zamenom dela koncentracije poloksamera 407 emulgatorima male molekulske mase, čiji je uticaj na viskozitet zanemarljiv, snižava se viskozitet kontinualne faze, a time i viskozitet celog sistema. Ranije je ustanovljeno da proticanje rastvora hidroksipropilmetilceluloze, metilceluloze, želatina, poloksamera 407 i poloksamera 188 pokazuje nenjutnovski karakter, pri čemu rastvori makromolekula koji imaju dugačke i uvijene lance imaju veći viskozitet. Zhang i sar. (2017) su takođe utvrdili da najizraženiji uticaj na fizičku stabilnost emulzija ima viskozitet kontinualne faze (rastvora makromolekularnog emulgatora), dok veličina kapi unutrašnje faze i površinski napon imaju manje izražen uticaj [160]. Dokić i sar. (2008) su ispitivanjem reoloških karakteristika emulzija stabilizovanih makromolekularnim OSA skrobom, Tween-om 80 i njihovom smešom utvrdili da emulzija stabilizovana makromolekularnim emulgatorom ima najviši indeks konzistencije K, dok emulzija stabilizovana čistim Tween-om 80 ima najmanje vrednosti K, što ukazuje na najmanji viskozitet [256]. Takođe, sa porastom udela natrijum lauril sulfata u smešama sa OSA skrobom kao emulgatorom, primećeno je smanjenje indeksa konzistencije, odnosno prividnog viskoziteta U/V emulzija [257].

Tabela 20. Vrednosti indeksa konzistencije K i stepena nenjutnovskog ponašanja n emulzija stabilizovanih primenom čistog poloksamera 407 i smeša poloksamera 407 sa Brij S20, kao i emulzija sa inkorporiranim ekstraktima komine grožđa u kontinualnu fazu

Uzorak	K (Pa·s ⁿ)	n
Kontrolne emulzije		
Pokolsamer 407	0,03256 ± 0,00198 ^a	0,71847 ± 0,0087 ^{ac}
BS20/P407 (1:9)	0,02954 ± 5,42·10 ⁻⁴ ^b	0,74470 ± 0,0038 ^{bc}
BS20/P407 (1:1)	0,02633 ± 3,65·10 ⁻⁴ ^{c*}	0,73363 ± 0,0015 ^{abc*}
BS20/P407 (9:1)	0,00965 ± 7,68·10 ⁻⁴ ^d	0,81877 ± 0,0076 ^d
Emulzije sa ekstraktom komine		
Poloksamer 407	0,03541 ± 0,00144 ^e	0,71503 ± 0,0067 ^{efg}
BS20/P407 (1:9)	0,03137 ± 0,0025 ^{fg}	0,72497 ± 0,0121 ^{efg}
BS20/P407 (1:1)	0,02878 ± 5,06·10 ⁻⁴ ^{fg*}	0,72393 ± 0,0048 ^{efg*}
BS20/P407 (9:1)	0,00978 ± 7,72·10 ⁻⁴ ^h	0,82220 ± 0,0072 ^h

^{a-d} Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) kontrolnih emulzija izrađenih korišćenjem različitih emulgatora, u kolonama različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

^{e-h} Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) emulzija sa ekstraktom komine izrađenih korišćenjem različitih emulgatora, u kolonama različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

* Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) za kontrolne emulzije i emulzije sa ekstraktom komine izrađene korišćenjem istog emulgatora, statistički značajno se razlikuju (p<0,05)

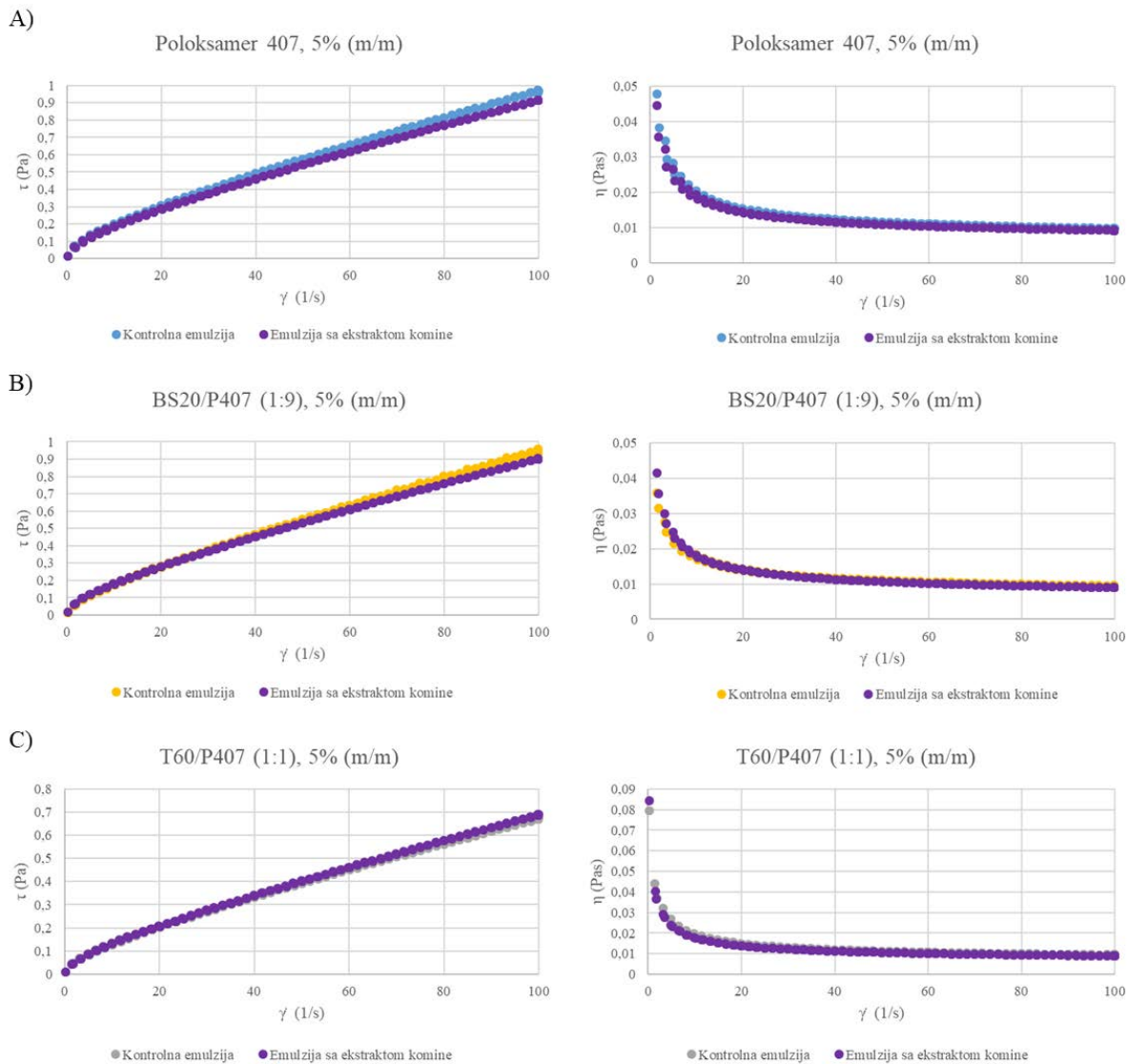
Tabela 21. Vrednosti indeksa konzistencije K i stepena nenjutnovskog ponašanja n emulzija stabilizovanih primenom čistog poloksamera 407 i smeša poloksamera 407 sa Tween 60, kao i emulzija sa inkorporiranim ekstraktima komine grožđa u kontinualnu fazu

Uzorak	K (Pa·s ⁿ)	n
Kontrolne emulzije		
Pokolsamer 407	0,03256 ± 0,00198 ^{ab}	0,71847 ± 0,00866 ^{abc}
T60/P407 (1:9)	0,02801 ± 0,00644 ^{abc}	0,72711 ± 0,04786 ^{abc}
T60/P407 (1:1)	0,02296 ± 3,76·10 ⁻⁴ ^{bc}	0,72803 ± 0,00404 ^{abc}
T60/P407 (9:1)	0,00617 ± 5,71·10 ⁻⁴ ^d	0,86697 ± 0,01023 ^d
Emulzije sa ekstraktom komine		
Pokolsamer 407	0,03541 ± 0,00144 ^{ef}	0,71503 ± 0,00675 ^{efg}
T60/P407 (1:9)	0,03297 ± 0,00191 ^{ef}	0,71907 ± 0,00841 ^{efg}
T60/P407 (1:1)	0,02274 ± 2,41·10 ⁻⁴ ^g	0,73827 ± 0,00352 ^{efg}
T60/P407 (9:1)	0,00697 ± 6,62·10 ⁻⁴ ^h	0,83987 ± 0,02105 ^h

^{a-d} Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) kontrolnih emulzija izrađenih korišćenjem različitih emulgatora, u kolonama različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

^{e-h} Srednje vrednosti ± standardna devijacija (n=3) emulzija sa ekstraktom komine izrađenih korišćenjem različitih emulgatora, u kolonama različita slova označavaju statistički značajne razlike (p<0,05)

Vrednosti koeficijenta K i indeksa n se statistički značajno ne razlikuju za kontrolne emulzije i emulzije sa ekstraktom komine kao kontinualnom fazom, pripremljene korišćenjem istog emulzionog sistema osim u slučaju sistema BS20/P407 (1:1). Dakle, na osnovu vrednosti datih u **Tabelama 20 i 21**, kao i na osnovu odabranih krivih proticanja (**Slika 35**) može se zaključiti da ekstrakt komine grožđa bogat polifenolima ne utiče bitno na viskozitet i reološke karakteristike emulzija.



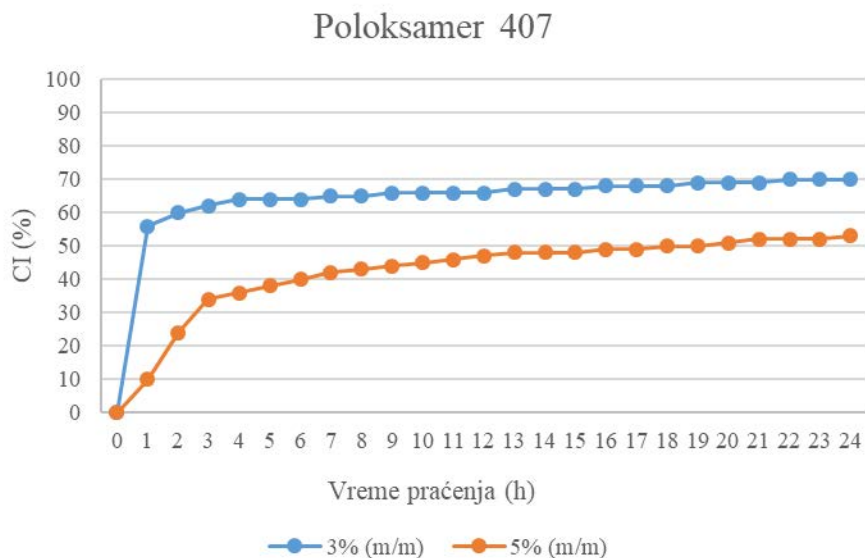
Slika 35. Krive proticanja kontrolnih i emulzija sa ekstraktima komine grožđa stabilizovanih: A) poloksamerom 407, B) BS20/P407 (1:9) i C) T60/P407 (1:1)

5.5.1 Određivanje kringing indeksa emulzija

Kriming ili isplivavanje kapi predstavlja jedan od procesa koji dovode do fizičke nestabilnosti U/V emulzija, a koji se dešava pod dejstvom gravitacione sile zbog razlike u gustinama faza [180].

Uticaj koncentracije emulgatora na vrednost kringing indeksa emulzija ispitan je na kontrolnim emulzijama stabilizovanim čistim poloksamerom 407. Ispitane su koncentracije emulgatora od 3% i 5% (m/m), koje se nalaze u opsegu koncentracija koje su ispitivane u ranijim studijama [160,

197]. Na **Slici 36** se uočava značajna kringing nestabilnost ispitanih emulzija, kao i velika razlika u stabilnosti, tj. kringing indeksu (CI) pri različitim koncentracijama emulgatora, koja se javlja već prvog sata praćenja. Na osnovu rezultata kringing indeksa koji ukazuju na veću stabilnost emulzija, koncentracija od 5% (m/m) je odabrana za dalja ispitivanja.



Slika 36. Vrednosti kringing indeksa (praćeno prvih 24 h) kontrolnih emulzija stabilizovanih različitim koncentracijama poloksamera 407

Prema Stoksovom zakonu, brzina kretanja čestice kroz fluid, odnosno brzina isplivavanja kapi, tj. kringinga, zavisi od kvadrata prečnika čestice, razlike u gustinama čestica i fluida, kao i viskoziteta fluida [187]:

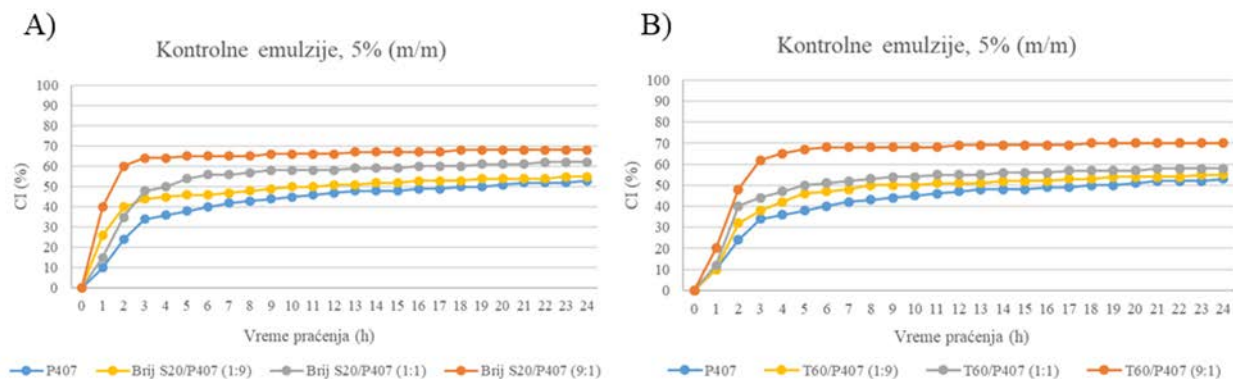
$$w = \frac{d^2 g \Delta \rho}{18 \eta} \quad (10)$$

gde su: w [m/s] brzina čestice, d prečnik čestice, g sila gravitacije, $\Delta \rho$ razlika u gustini čestica i fluida, η viskozitet fluida. Veće kapi se brže kreću u poređenju sa manjim kapima, odnosno veće su šanse za njihovo isplivavanje. Smanjenje broja većih kapi u emulzijama, kao i povećanje viskoziteta kontinualne faze, koje usporava kretanje kapi, utiču na povećanje stabilnosti emulzija i usporavaju ili odlažu pojavu kringinga. Prema tome, veća nestabilnost emulzija sa nižom koncentracijom emulgatora u saglasnosti je sa statistički značajno većim površinskim i

zapreminskim srednjim prečnikom kapi u ovim emulzijama. Takođe, veća stabilnost emulzije sa većom koncentracijom emulgatora u saglasnosti je sa uticajem ovog makromolekula na povećanje viskoziteta kontinualne faze.

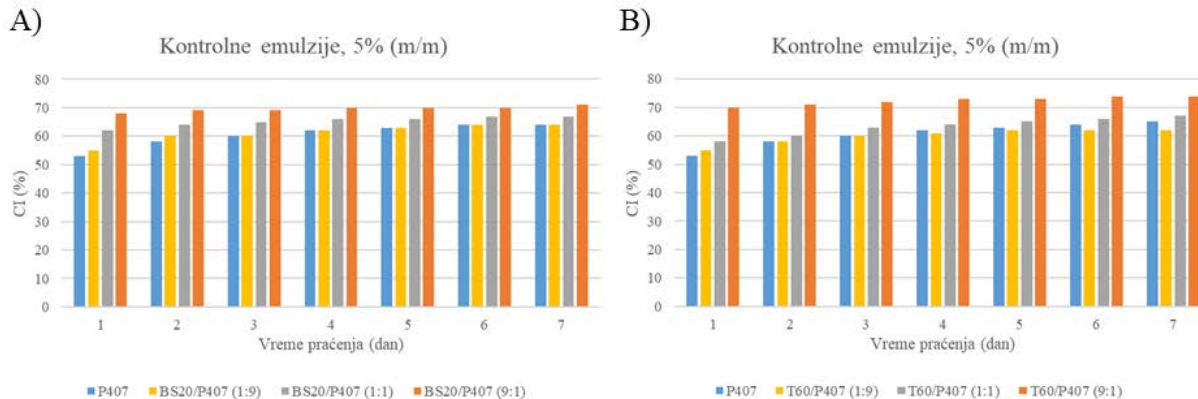
Sa ciljem ispitivanja uticaja tipa emulgatora na stabilnost emulzija praćen je kriming indeks kontrolnih emulzija izrađenih uz upotrebu sledećih sistema emulgatora (koncentracije 5% (m/m)): poloksamer 407, BS20/P407 (1:9), BS20/P407 (1:1), BS20/P407 (9:1), T60/P407 (1:9), T60/P407 (1:1) i T60/P407 (9:1). Na **Slici 37** se uočava nestabilnost svih ispitanih kontrolnih emulzija, koja se javlja tokom prvih 24 h nakon izrade emulzija. Iako Stoksov zakon pokazuje da brzina isplivavanja kapi, tj. kriminga, zavisi od kvadrata prečnika kapi disperzne faze, razlike u gustinama kontinualne i disperzne faze, kao i viskoziteta kontinualne faze [187], nije uočena korelacija između dimenzija kapi (vrednosti d_{32} i d_{43}) i kriming indeksa ispitanih emulzija sa različitim udelima pojedinih emulgatora. Može se pretpostaviti da glavni razlog kratkog vremena do pojave kriminga ispitanih U/V emulzija predstavlja nedovoljan viskozitet kontinualne faze da uspori kretanje kapi (**Tabele 20 i 21**). Budući da su poloksameri nejonski surfaktanti, smatra se da se stabilizacija emulzija obezbeđuje sternim mehanizmom usled postojanja voluminoznih polarnih grupa molekula, koje su adsorbovane na površini uljanih kapi i snažno hidratisane u kontinualnoj fazi, te formiraju slojeve koji obezbeđuju odbijanje dve kapi [258]. Na **Slici 37** se uočava da sa porastom udela makromolekularnog emulgatora poloksamera 407 raste stabilnost emulzija, odnosno zabeležene su niže vrednosti kriming indeksa tokom perioda praćenja od 24 h. Ova pojava se može objasniti porastom viskoziteta kontinualne faze u emulzijama sa porastom udela poloksamera budući da je u pitanju makromolekul koji rastvaranjem u vodi značajno povećava njen viskozitet, što potvrđuju vrednosti indeksa konzistencije K emulzija, prikazane u tabelama **Tabelama 20 i 21**. Poređenjem vrednosti kriming indeksa tokom prvih 24 časa za kontrolne emulzije izrađene uz upotrebu smeša BS20/P407 i T60/P407, ne uočavaju se značajne razlike u stabilnosti emulzija izrađenih uz korišćenje ova dva sistema emulgatora (**Slika 37A i 37B**).

Raslojavanje faza ovako izrađenih U/V emulzija bi se moglo usporiti i potencijalno zaustaviti dodavanjem hidrokoloida velikih molekulskih masa, kojima se povećava viskoznost i modifikuju reološke karakteristike kontinualne faze [259, 260].



Slika 37. Vrednosti kringing indeksa (praćeno prvih 24 h) kontrolnih emulzija stabilizovanih sledećim emulgatorima: A) poloksamerom 407 i smešama poloksamera 407 sa Brij S20, B) poloksamerom 407 i smešama poloksamera 407 sa Tween 60

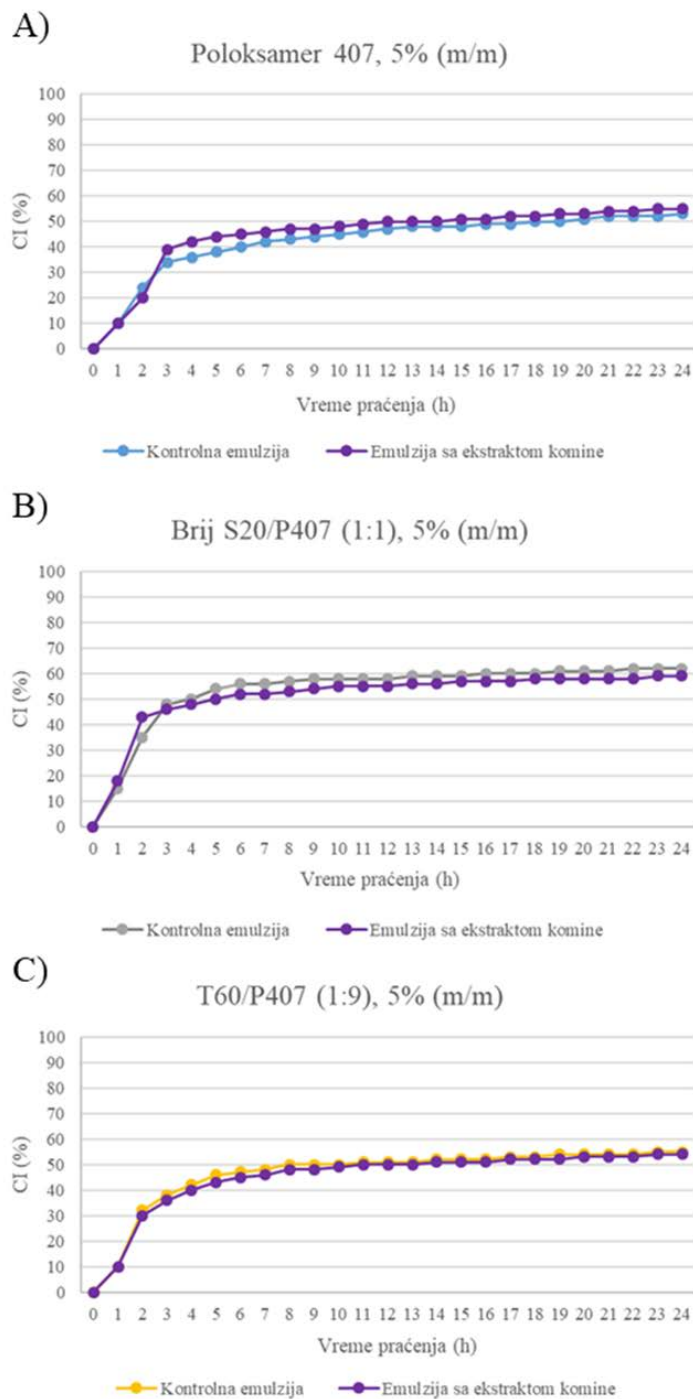
U periodu od 7 dana kod svih kontrolnih emulzija je došlo do neznatnih promena u vrednosti kringing indeksa u odnosu na vrednost koja je zabeležena nakon prvih 24 časa (**Sika 38**).



Slika 38. Vrednosti kringing indeksa (praćeno 7 dana) kontrolnih emulzija stabilizovanih sledećim emulgatorima: A) poloksamerom 407 i smešama poloksamera 407 sa Brij S20, B) poloksamerom 407 i smešama poloksamera 407 sa Tween 60

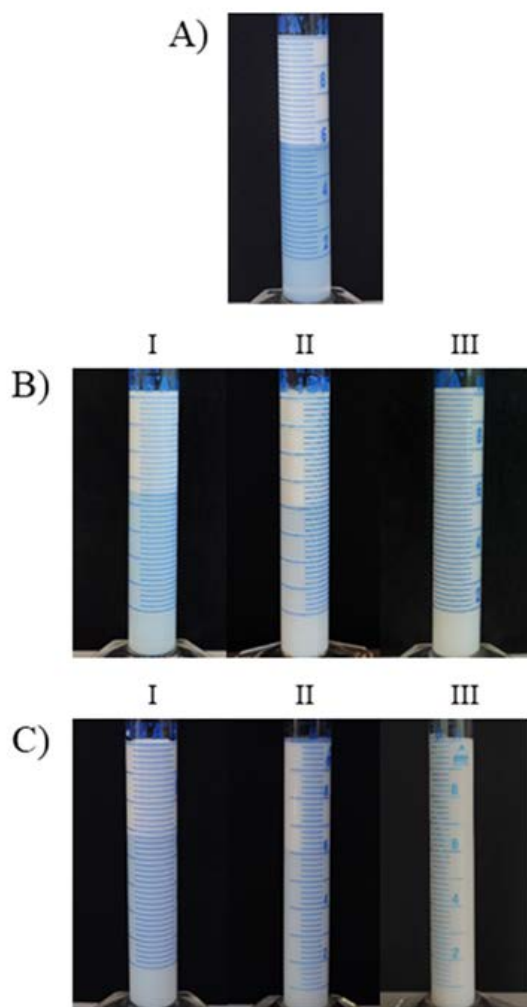
Inkorporiranjem ekstrakata komine grožđa u kontinualnu fazu emulzija uočeno je da ekstrakt nema uticaj na promene u vrednostima kringing indeksa tokom 24 časa (**Slika 39**). Budući da u emulzijama sa ekstraktom komine nije došlo do statistički značajnog povećanja srednjeg površinskog srednjeg prečnika kapi (d_{32}), do promena u raspodeli veličina čestica, kao ni generalno

do značajnog povećanja vrednosti koeficijenta konzistencije K, nepostojanje razlika u stabilnosti emulzija je u skladu sa očekivanjima. Dobijeni rezultati dakle ukazuju da emulzije mogu biti nosači polifenola kao aktivnih supstanci budući da inkorporiranje ekstrakata komine grožđa u ispitane modele emulzija nije dovelo do promena disperzionih i reoloških karakteristika, kao ni fizičke stabilnosti sistema. Ranije je utvrđeno da se inkorporiranjem vodeno-etanolnog ekstrakta jabuke u U/V emulzije u ukupnom udelu od 6% (m/m) ne narušava fizičko-hemijska stabilnost emulzija (praćene su emulzije nakon izlaganja centrifugiranju, pH vrednost i viskozitet emulzija) [261]. Pored toga, inkorporiranje ekstrakata bogatih polifenolima može da utiče i na povećanje hemijske stabilnosti ekstrakata. Utvrđeno je da se inkorporiranjem vodeno-etanolnog ekstrakta u rastućim koncentracijama (od 0,06% do 3% (V/V)) u U/V emulzije stabilizovane Tween-om 20 (1%) postiže veća inhibicija lipidne peroksidacije u sistemima [262].

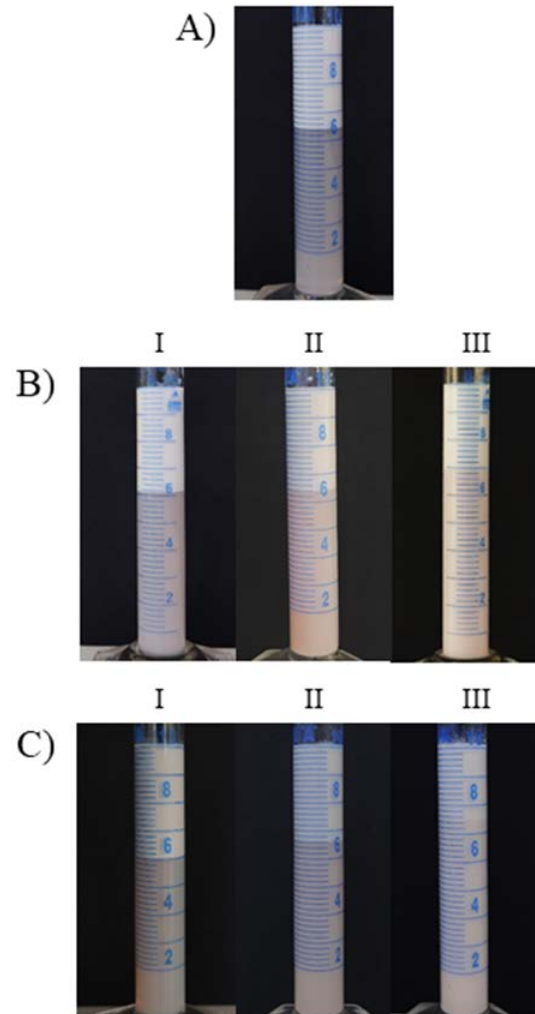


Slika 39. Vrednosti kriming indeksa (praćeno prvih 24 h) kontrolnih emulzija i emulzija sa ekstraktima komine stabilizovanih: A) poloksamerom 407, B) smešom BS20/P407 (1:1) i C) smešom T60/P407 (1:9)

Na Slikama 40 i 41 jasno se uočavaju dva formirana sloja emulzije, nastala usled isplivavanja kapi uljane faze. Gornji sloj je zamućen budući da su u njemu koncentrisane kapi disperzne faze, dok je donji sloj osiromašen kapima disperzne faze, te je manje zamućen u svim ispitanim emulzijama. Veće zamućenje sloja osiromašenog kapima disperzne faze uočeno je kod kontrolnih emulzija stabilizovanih smešama BS20/P407 (9:1) i T60/P407 (9:1) (Slika 40). Kod emulzija za čiju izradu su iskorišćeni ekstrakti komine grožđa donji sloj je obojen usled postojanja antocijana u ekstraktima. U svim ispitivanim emulzijama se uočavala jasna granica između dva formirana sloja (Slika 41).



Slika 40. Kontrolne emulzije stabilizovane: A) poloksamerom 407 (5%, m/m); B) smešama BS20/P407 (5%, m/m), masenih odnosa I) 1:9, II) 1:1 i III) 9:1; C) smešama T60/P407 (5%, m/m), masenih odnosa I) 1:9, II) 1:1 i III) 9:1



Slika 41. Emulzije sa ekstraktima komine stabilizovane: A) poloksamerom 407 (5%, m/m); B) smešama BS20/P407 (5%, m/m), masenih odnosa I) 1:9, II) 1:1 i III) 9:1; C) smešama T60/P407 (5%, m/m), masenih odnosa I) 1:9, II) 1:1 i III) 9:1

6. Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

- Karakterizacijom ekstrakata komine grožđa dobijenih ekstrakcijom rastvorima nejonskih surfaktanata utvrđeno je da efikasnost ekstrakcije polifenola zavisi od hemijske strukture primenjenih surfaktanata. Među ispitanim nejonskim surfaktantima, najveću efikasnost su ispoljili Brij S20 i triblok kopolimer poloksamer 407, a njihova efikasnost je bila viša od čiste vode i etanola, a uporediva sa efikasnošću smeše vode i etanola (1:1). Takođe, pokazano je da rastvori binarnih smeša surfaktanata Brij S20 i poloksamera 407 ispoljavaju veću efikasnost ekstrakcije polifenola iz komine grožđa u poređenju sa rastvorima pojedinačnih surfaktanata. Osim toga, zaključeno je da efikasnost ekstrakcije zavisi od sastava binarnih smeša surfaktanata, pri čemu je najveća efikasnost postignuta smešama koje su imale najniže vrednosti kritične micelarne koncentracije.
- Na efikasnost ekstrakcije polifenola rastvorima pojedinačnih nejonskih surfaktanata i njihovih smeša utiču sledeći faktori: koncentracija surfaktanata, kiselost rastvora, kao i odnos zapremine ekstrakcionog medijuma i mase komine. Utvrđeno je da su optimalni uslovi ekstrakcije koncentracija od 3%, pH vrednost 4 i odnos zapremine ekstrakcionog medijuma i mase komine 100:1.
- Variranjem tipa i koncentracije surfaktanata u vodenim rastvorima, kao i udela pojedinačnih surfaktanata u smešama, dobijeni su ekstrakti različitih polifenolnih profila, te su na osnovu hemijskih struktura surfaktanata i polifenola komine grožđa pretpostavljeni mehanizmi solubilizacije polifenolnih jedinjenja.
- Modeli U/V emulzija izrađeni uz upotrebu makromolekularnog emulgatora poloksamera 407 i smeša poloksamera sa niskomolekularnim surfaktantima Brij S20 i Tween 60 ispoljili su adekvatnu fizičku stabilnost tokom perioda praćenja od 14 dana, bez pojave koalescencije kapi unutrašnje faze. Sve emulzije su pokazale pseudoplastično proticanje, a uočeno je da reološke karakteristike i kriming nestabilnost emulzija zavise od udela makromolekularnog emulgatora. Inkorporiranje ekstrakata komine grožđa dobijenih primenom rastvora surfaktanata u kontinualnu fazu nije imalo uticaja na ispitivane osobine emulzija (disperzione osobine, fizička stabilnost i reološke karakteristike).

Istraživanjima sprovedenim u okviru ove doktorske disertacije potvrđena je sposobnost vodenih rastvora nejonskih surfaktanata, kao biokompatibilnih i ekološki prihvatljivih medijuma, za ekstrakciju polifenola iz nusproizvoda vinske industrije. Takođe, utvrđeno je da inkorporiranje ovih ekstrakata u emulzije tipa ulje u vodi ne dovodi do promena u reološkim karakteristikama ili narušavanja fizičke stabilnosti. Stoga, ovakvi ekstrakti dobijeni „zelenom” metodom mogu se iskoristiti za razvoj odgovarajućih proizvoda u farmaceutskoj, kozmetičkoj ili prehrambenoj industriji.

7. Literatura

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAOSTAT Crops*. 2021 [citirano 2023 Mart 15]. Dostupno na: <http://www.fao.org/>.
2. International Organisation of Vine and Wine. Annual Assessment of the World Vine and Wine Sector in 2021. 2021 [citirano 2023 Jun 19]. Dostupno na: <https://www.oiv.int/>.
3. International Organisation of Vine and Wine. *Statistics Search results 2022*. 2022 [citirano 2023 Mart 15]. Dostupno na: <https://www.oiv.int/>.
4. International Organisation of Vine and Wine. State of the world vine and wine sector in 2022. 2022 [citirano 2023 Jun 16]. Dostupno na: <https://www.oiv.int/>.
5. Beres C, Costa GN, Cabezudo I, da Silva-James NK, Teles AS, Cruz AP, i sar. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manage.* 2017;68:581-94.
6. International Organisation of Vine and Wine. 2019 Statistical Report on World Vitiviniculture. 2019 [citirano 2023 Mart 15]. Dostupno na: <https://www.oiv.int/>.
7. Radović N, Milićević S. The examination and assessment of winery business and contribution to the development of wine tourism of Serbia. *Економика пољопривреде*. 2020;67(4):1103-23.
8. Simonović Z, Petrović D, Ćurčić N. Production of grapes and wine in Serbia. *Ekonomika*. 2019;65(4):11-20.
9. Falstaff. SERBIA – A WINE COUNTRY ON THE RISE. 2022 [citirano 2023 Maj 1]. Dostupno na: <https://www.falstaff.com/>.
10. Sirohi R, Tarafdar A, Singh S, Negi T, Gaur VK, Gnansounou E, i sar. Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresource Technology*. 2020;314:123771.
11. Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA, Skotti E. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresour Bioprocess*. 2018;5(1):1-21.
12. Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno DA, i sar. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):15638-78.

13. Tehnologija hrane. Tehnologija proizvodnje vina. 2013 [citirano 2023 Mart 15]. Dostupno na: <https://www.tehnologijahrane.com/>.
14. Soceanu A, Dobrinas S, Sirbu A, Manea N, Popescu V. Economic aspects of waste recovery in the wine industry. A multidisciplinary approach. *Sci Total Environ.* 2021;759:143543.
15. Dwyer K, Hosseinian F, Rod M. The market potential of grape waste alternatives. *Journal of Food Research.* 2014;3(2):91-106.
16. Nayak A, Bhushan B, Rosales A, Turienzo LR, Cortina J. Valorisation potential of Cabernet grape pomace for the recovery of polyphenols: Process intensification, optimisation and study of kinetics. *Food Bioprod Process.* 2018;109:74-85.
17. Lingua MS, Fabani MP, Wunderlin DA, Baroni MV. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *J Funct Foods.* 2016;20:332-45.
18. Hogervorst JC, Miljić U, Puškaš V. Extraction of bioactive compounds from grape processing by-products. In: Galanakis CM, editor. *Handbook of grape processing by-products.* Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 105-35.
19. Boussetta N, Lanoisellé J-L, Bedel-Cloutour C, Vorobiev E. Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *J Food Eng.* 2009;95(1):192-8.
20. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JP. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients.* 2010;2(11):1106-31.
21. Lafka T-I, Sinanoglou V, Lazos ES. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* 2007;104(3):1206-14.
22. González-Centeno M, Rosselló C, Simal S, Garau M, López F, Femenia A. Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT-Food Science and Technology.* 2010;43(10):1580-6.
23. Jin Q, O'Hair J, Stewart AC, O'Keefe SF, Neilson AP, Kim Y-T, i sar. Compositional characterization of different industrial white and red grape pomaces in Virginia and the potential valorization of the major components. *Foods.* 2019;8(12):667.
24. Antičić B, Jančíková S, Dordević D, Tremlová B. Grape pomace valorization: A systematic review and meta-analysis. *Foods.* 2020;9(11):1627.

25. Hixson J, Wilkes E, Smith P, Forsyth K. Understanding the composition of grape marc and its potential as a livestock feed supplement. The Australian Wine Research Institute (AWRI) Technical Review. 2014;213:11-5.
26. Muhlack RA, Potumarthi R, Jeffery DW. Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. Waste management. 2018;72:99-118.
27. Iora SR, Maciel GM, Zielinski AA, da Silva MV, Pontes PVdA, Haminiuk CW, i sar. Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. Int J Food Sci Tech. 2015;50(1):62-9.
28. Bordiga M, Travaglia F, Locatelli M. Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity—a review. Int J Food Sci Tech. 2019;54(4):933-42.
29. Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA, Skotti E. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. Bioresources and Bioprocessing. 2018;5(1):46.
30. Devesa-Rey R, Vecino X, Varela-Alende J, Barral M, Cruz J, Moldes A. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. Waste Manage. 2011;31(11):2327-35.
31. Barbera A, Maucieri C, Cavallaro V, Ioppolo A, Spagna G. Effects of spreading olive mill wastewater on soil properties and crops, a review. Agric Water Manage. 2013;119:43-53.
32. The European Commission. Regulations. 2019 [citirano 2023 Maj 10]. Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/>.
33. Caldas TW, Mazza KE, Teles AS, Mattos GN, Brígida AIS, Conte-Junior CA, i sar. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. Ind Crops Prod. 2018;111:86-91.
34. Ilyas T, Chowdhary P, Chaurasia D, Gnansounou E, Pandey A, Chaturvedi P. Sustainable green processing of grape pomace for the production of value-added products: An overview. Environmental Technology & Innovation. 2021;23:101592.
35. El-Bassi L, Ibn Ferjani A, Jeguirim M, Bennici S, Jellali S, Akrouit H, i sar. Production of a biofertilizer from exhausted grape marc waste: Agronomic and environmental impact on plant growth. Biomass Conversion and Biorefinery. 2020:1-14.
36. Ferjani AI, Jeguirim M, Jellali S, Limousy L, Courson C, Akrouit H, i sar. The use of exhausted grape marc to produce biofuels and biofertilizers: Effect of pyrolysis temperatures on biochars properties. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2019;107:425-33.

37. Ebrahimzadeh S, Navidshad B, Farhoomand P, Aghjehgheshlagh FM. Effects of grape pomace and vitamin E on performance, antioxidant status, immune response, gut morphology and histopathological responses in broiler chickens. *S Afr J Anim Sci.* 2018;48(2):324-36.
38. Chedea VS, Palade LM, Pelmus RS, Dragomir C, Taranu I. Red grape pomace rich in polyphenols diet increases the antioxidant status in key organs—kidneys, liver, and spleen of piglets. *Animals.* 2019;9(4):149.
39. Etxabide A, Kilmartin PA, Guerrero P, de la Caba K, Hooks DO, West M, i sar. Polyhydroxybutyrate (PHB) produced from red grape pomace: Effect of purification processes on structural, thermal and antioxidant properties. *Int J Biol Macromol.* 2022;217:449-56.
40. Papadaki E, Kontogiannopoulos KN, Assimopoulou AN, Mantzouridou FT. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. *Bioresour Technol.* 2020;309:123317.
41. Peixoto CM, Dias MI, Alves MJ, Calhelha RC, Barros L, Pinho SP, i sar. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chem.* 2018;253:132-8.
42. Ky I, Teissedre P-L. Characterisation of Mediterranean grape pomace seed and skin extracts: polyphenolic content and antioxidant activity. *Molecules.* 2015;20(2):2190-207.
43. Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A.* 2004;1054(1-2):95-111.
44. Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. *Nature.* 2001;411(6839):843-7.
45. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science.* 2021;4:200-14.
46. Bubalo MC, Vidović S, Redovniković IR, Jokić S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod Process.* 2018;109:52-73.
47. Egbuna C, Dable-Tupas G. Functional foods and nutraceuticals. Springer Nature Switzerland AG. 2020;1:1-632.
48. Lewis NG. Plant phenolics. *Antioxidants in higher plants: CRC press; 2017. p. 135-69.*
49. Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science.* 2012;3:222.

50. Soto ML, Falqué E, Domínguez H. Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics*. 2015;2(3):259-76.
51. Muhlack RA, Potumarthi R, Jeffery DW. Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. *Waste Manag*. 2018;72:99-118.
52. Pantelić MM, Zagorac DČD, Davidović SM, Todić SR, Bešlić ZS, Gašić UM, i sar. Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chem*. 2016;211:243-52.
53. Zdunić G, Gođevac D, Šavikin K, Krivokuća D, Mihailović M, Pržić Z, i sar. Grape seed polyphenols and fatty acids of autochthonous Prokupac vine variety from Serbia. *Chem Biodivers*. 2019;16(7):e1900053.
54. Silva V, Igrejas G, Falco V, Santos TP, Torres C, Oliveira AM, i sar. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*. 2018;92:516-22.
55. Mohd Maidin N, Michael N, Oruna-Concha MJ, Jauregi P. Polyphenols extracted from red grape pomace by a surfactant based method show enhanced collagenase and elastase inhibitory activity. *J Chem Technol Biotechnol*. 2018;93(7):1916-24.
56. Chiavaroli A, Balaha M, Acquaviva A, Ferrante C, Cataldi A, Menghini L, i sar. Phenolic characterization and neuroprotective properties of grape pomace extracts. *Molecules*. 2021;26(20):6216.
57. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010;2(12):1231-46.
58. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem*. 2022:132531.
59. de Freitas V, Mateus N. Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours. *Environ Chem Lett*. 2006;4:175-83.
60. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE, Kupina CETGMHJHHKSKD, JD SMSMBMTPFRASGTUW. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J AOAC Int*. 2005;88(5):1269-78.

61. Langcake P, Pryce R. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*. 1976;9(1):77-86.
62. Atanacković M, Petrović A, Jović S, Gojković-Bukarica L, Bursać M, Cvejić J. Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry*. 2012;131(2):513-8.
63. Cvejić J, Atanacković M. Effect of wine production techniques on wine resveratrol and total phenolics. *Processing and impact on active components in food: Elsevier*; 2015. p. 501-8.
64. Renaud Sd, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. 1992;339(8808):1523-6.
65. De Lange D. From red wine to polyphenols and back: A journey through the history of the French Paradox. *Thromb Res*. 2007;119(4):403-6.
66. Averilla JN, Oh J, Kim HJ, Kim JS, Kim J-S. Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. *Food Sci Biotechnol*. 2019;28(6):1607-15.
67. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. 2018;10(11):1618.
68. Zhong J, Shi G. Regulation of inflammation in chronic disease. *Frontiers Media SA*; 2019. p. 737.
69. Medina-Remón A, Casas R, Tresserra-Rimbau A, Ros E, Martínez-González MA, Fitó M, i sar. Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. *Br J Clin Pharmacol*. 2017;83(1):114-28.
70. Overman A, Bumrungpert A, Kennedy A, Martinez K, Chuang C, West T, i sar. Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *Int J Obesity*. 2010;34(5):800-8.
71. Ghanim H, Sia CL, Korzeniewski K, Lohano T, Abuaysheh S, Marumganti A, i sar. A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(5):1409-14.
72. Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Villegas I, Talero E, de la Lastra CA. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol*. 2010;633(1-3):78-84.

73. Moussa C, Hebron M, Huang X, Ahn J, Rissman RA, Aisen PS, i sar. Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2017;14:1-10.
74. Martín AR, Villegas I, Sánchez-Hidalgo M, De La Lastra CA. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol*. 2006;147(8):873-85.
75. Collins B, Hoffman J, Martinez K, Grace M, Lila MA, Cockrell C, i sar. A polyphenol-rich fraction obtained from table grapes decreases adiposity, insulin resistance and markers of inflammation and impacts gut microbiota in high-fat-fed mice. *J Nutr Biochem*. 2016;31:150-65.
76. Haghghatdoost F, Gholami A, Hariri M. Effect of grape polyphenols on selected inflammatory mediators: A systematic review and meta-analysis randomized clinical trials. *EXCLI journal*. 2020;19:251.
77. Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, i sar. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre-and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *The Journal of nutrition*. 2005;135(8):1911-7.
78. F. Maluf D, Gonçalves MM, D'Angelo RW, Girassol AB, Tulio AP, Pupo YM, i sar. Cytoprotection of antioxidant biocompounds from grape pomace: Further exfoliant phytoactive ingredients for cosmetic products. *Cosmetics*. 2018;5(3):46.
79. Wittenauer J, Mäckle S, Sußmann D, Schweiggert-Weisz U, Carle R. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*. 2015;101:179-87.
80. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali-istituto superiore di sanita*. 2007;43(4):394.
81. Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Gálvez J, i sar. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure–activity relationship. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(8):1010-21.
82. Blonska M, Czuba Z, Krol W. Effect of flavone derivatives on interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA expression and IL-1 β protein synthesis in stimulated RAW 264.7 macrophages. *Scand J Immunol*. 2003;57(2):162-6.

83. Pragasam SJ, Venkatesan V, Rasool M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation*. 2013;36:169-76.
84. Decendit A, Mamani-Matsuda M, Aumont V, Waffo-Teguo P, Moynet D, Boniface K, i sar. Malvidin-3-O- β glucoside, major grape anthocyanin, inhibits human macrophage-derived inflammatory mediators and decreases clinical scores in arthritic rats. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(10):1461-7.
85. Rodríguez-Morgado B, Candiracci M, Santa-María C, Revilla E, Gordillo B, Parrado J, i sar. Obtaining from grape pomace an enzymatic extract with anti-inflammatory properties. *Plant Foods Hum Nutr*. 2015;70:42-9.
86. Luceri C, Caderni G, Sanna A, Dolara P. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors. *The Journal of nutrition*. 2002;132(6):1376-9.
87. Rasheed Z, Akhtar N, Anbazhagan AN, Ramamurthy S, Shukla M, Haqqi TM. Polyphenol-rich pomegranate fruit extract (POMx) suppresses PMACI-induced expression of pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF- κ B in human KU812 cells. *J Inflammation*. 2009;6:1-12.
88. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*. 2016;8:33-42.
89. Sun S, Pan S, Ling C, Miao A, Pang S, Lai Z, i sar. Free radical scavenging abilities in vitro and antioxidant activities in vivo of black tea and its main polyphenols. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012;6(1):114-21.
90. Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiol Biochem*. 2019;144:135-43.
91. Zhou Y, Jiang Z, Lu H, Xu Z, Tong R, Shi J, i sar. Recent advances of natural polyphenols activators for Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Chem Biodivers*. 2019;16(11):e1900400.
92. Martínez-Huélamo M, Rodríguez-Morató J, Boronat A, De la Torre R. Modulation of Nrf2 by olive oil and wine polyphenols and neuroprotection. *Antioxidants*. 2017;6(4):73.
93. Na H-K, Surh Y-J. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(4):1271-8.

94. Magrone T, Magrone M, Russo MA, Jirillo E. Recent advances on the anti-inflammatory and antioxidant properties of red grape polyphenols: in vitro and in vivo studies. *Antioxidants*. 2019;9(1):35.
95. Houde V, Grenier D, Chandad F. Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens. *J Periodontol*. 2006;77(8):1371-9.
96. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol Res*. 2013;68(1):125-31.
97. Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Étienne-Selloum N, Li H, Martínez MC, i sar. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr*. 2012;108(9):1532-49.
98. Gojković-Bukarica L, Protić D, Kanjuh V, Heinle H, Novaković R, Šćepanović R. Cardiovascular effects of resveratrol. *Vojnosanit Pregl*. 2013;70(12):1145-50.
99. Gostimirović M, Rajković J, Đokić V, Terzić D, Putnik S, Gojković-Bukarica L. ULOGA BILJNIH POLIFENOLA U OČUVANJU ZDRAVLJA: EFEKTI NA KARDIOMETABOLIČKU FUNKCIJU ČOVEKA. *Medicinski podmladak*. 2021;72(1):34-42.
100. Thandapilly SJ, LeMaistre JL, Louis XL, Anderson CM, Netticadan T, Anderson HD. Vascular and cardiac effects of grape powder in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*. 2012;25(10):1070-6.
101. Behbahani J, Thandapilly SJ, Louis XL, Huang Y, Shao Z, Kopilas MA, i sar. Resveratrol and small artery compliance and remodeling in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*. 2010;23(12):1273-8.
102. Lekakis J, Rallidis LS, Andreadou I, Vamvakou G, Kazantzoglou G, Magiatis P, i sar. Polyphenols compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2005;12(6):596-600.
103. Barona J, Aristizabal JC, Blesso CN, Volek JS, Fernandez ML. Grape polyphenols reduce blood pressure and increase flow-mediated vasodilation in men with metabolic syndrome. *The Journal of nutrition*. 2012;142(9):1626-32.
104. Vaisman N, Niv E. Daily consumption of red grape cell powder in a dietary dose improves cardiovascular parameters: A double blind, placebo-controlled, randomized study. *Int J Food Sci Nutr*. 2015;66(3):342-9.

105. Feringa HH, Laskey DA, Dickson JE, Coleman CI. The effect of grape seed extract on cardiovascular risk markers: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Diet Assoc.* 2011;111(8):1173-81.
106. Terauchi M, Horiguchi N, Kajiyama A, Akiyoshi M, Owa Y, Kato K, i sar. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on menopausal symptoms, body composition, and cardiovascular parameters in middle-aged women: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Menopause.* 2014;21(9):990-6.
107. Yubero N, Sanz-Buenhombre M, Guadarrama A, Villanueva S, Carrión JM, Larrarte E, i sar. LDL cholesterol-lowering effects of grape extract used as a dietary supplement on healthy volunteers. *Int J Food Sci Nutr.* 2013;64(4):400-6.
108. Iqbal J, Abbasi BA, Mahmood T, Kanwal S, Ali B, Shah SA, i sar. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2017;7(12):1129-50.
109. Perde-Schrepler M, Chereches G, Brie I, Tatomir C, Postescu ID, Soran L, i sar. Grape seed extract as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2013;118:16-21.
110. Filip A, Daicoviciu D, Clichici S, Bolfa P, Catoi C, Baldea I, i sar. The effects of grape seeds polyphenols on SKH-1 mice skin irradiated with multiple doses of UV-B. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2011;105(2):133-42.
111. Aziz MH, Afaq F, Ahmad N. Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in Survivin \square . *Photochem Photobiol.* 2005;81(1):25-31.
112. Adhami VM, Afaq F, Ahmad N. Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF- κ B in normal human keratinocytes by resveratrol. *Neoplasia.* 2003;5(1):74-82.
113. Singh CK, Mintie CA, Ndiaye MA, Chhabra G, Dakup PP, Ye T, i sar. Chemoprotective effects of dietary grape powder on UVB radiation-mediated skin carcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *J Invest Dermatol.* 2019;139(3):552-61.
114. Zhao J, Wang J, Chen Y, Agarwal R. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation–promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis.* 1999;20(9):1737-45.

115. Mohansrinivasan V, Devi C S, Deori M, Biswas A, Naine S J. Exploring the anticancer activity of grape seed extract on skin cancer cell lines A431. *Braz Arch Biol Technol.* 2015;58:540-6.
116. Imran M, Iqbal MK, Imtiyaz K, Saleem S, Mittal S, Rizvi MMA, i sar. Topical nanostructured lipid carrier gel of quercetin and resveratrol: Formulation, optimization, in vitro and ex vivo study for the treatment of skin cancer. *Int J Pharm.* 2020;587:119705.
117. Engelbrecht A-M, Mattheyse M, Ellis B, Loos B, Thomas M, Smith R, i sar. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. *Cancer Lett.* 2007;258(1):144-53.
118. Cedo L, Castell-Auvi A, Pallares V, Macia A, Blay M, Ardévol A, i sar. Gallic acid is an active component for the anticarcinogenic action of grape seed procyanidins in pancreatic cancer cells. *Nutr Cancer.* 2014;66(1):88-96.
119. Sun T, Chen Q, Wu L, Yao X, Sun X. Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(10):3462-7.
120. Galanakis CM. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci Technol.* 2012;26(2):68-87.
121. Gil-Martín E, Forbes-Hernández T, Romero A, Cianciosi D, Giampieri F, Battino M. Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chem.* 2022;378:131918.
122. Pinelo M, Del Fabbro P, Manzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.* 2005;92(1):109-17.
123. Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci Technol.* 2006;17(11):579-90.
124. Pintać D, Majkić T, Torović L, Orčić D, Beara I, Simin N, i sar. Solvent selection for efficient extraction of bioactive compounds from grape pomace. *Ind Crops Prod.* 2018;111:379-90.
125. Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules.* 2016;21(7):901.

126. Drosou C, Kyriakopoulou K, Bimpilas A, Tsimogiannis D, Krokida M. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Ind Crops Prod.* 2015;75:141-9.
127. Amendola D, De Faveri DM, Spigno G. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *J Food Eng.* 2010;97(3):384-92.
128. Fontana AR, Antonioli A, Bottini Rn. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric Food Chem.* 2013;61(38):8987-9003.
129. Popsavin M, Vukojević N, Hranisavljević J, Kovačević I, Srećo Zelenović B, Svirčev M. *Praktikum iz hemije prirodnih proizvoda.* Novi Sad, Serbia: Prirodno-Matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine; 2018.
130. Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng.* 2007;81(1):200-8.
131. Brazinha C, Cadima M, Crespo JG. Optimization of extraction of bioactive compounds from different types of grape pomace produced at wineries and distilleries. *J Food Sci.* 2014;79(6):E1142-E9.
132. U.S. Food and Drug Administration. Direct food substances affirmed as generally recognized as safe. 1977 [citirano 2023 Maj 10]. Dostupno na: <https://www.ecfr.gov/>.
133. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010;15(10):7313-52.
134. Ameer K, Shahbaz HM, Kwon JH. Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2017;16(2):295-315.
135. Lavilla I, Bendicho C. *Fundamentals of ultrasound-assisted extraction. Water extraction of bioactive compounds:* Elsevier; 2017. p. 291-316.
136. Hosseinzadeh R, Khorsandi K, Hemmaty S. Study of the effect of surfactants on extraction and determination of polyphenolic compounds and antioxidant capacity of fruits extracts. *PLoS One.* 2013;8(3):e57353.
137. Płotka-Wasyłka J, Rutkowska M, Owczarek K, Tobiszewski M, Namieśnik J. Extraction with environmentally friendly solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2017;91:12-25.

138. Takla SS, Shawky E, Hammada HM, Darwish FA. Green techniques in comparison to conventional ones in the extraction of Amaryllidaceae alkaloids: Best solvents selection and parameters optimization. *J Chromatogr A*. 2018;1567:99-110.
139. Mohd Maidin N, Oruna-Concha MJ, Jauregi P. Surfactant TWEEN20 provides stabilisation effect on anthocyanins extracted from red grape pomace. *Food Chem*. 2019;271:224-31.
140. Yutani R, Morita S-y, Teraoka R, Kitagawa S. Distribution of polyphenols and a surfactant component in skin during aerosol OT microemulsion-enhanced intradermal delivery. *Chem Pharm Bull*. 2012;60(8):989-94.
141. Rosen MJ, Kunjappu JT. *Surfactants and interfacial phenomena*: John Wiley & Sons; 2012.
142. Holmberg K, Jönsson B, Kronberg B, Lindman B. *Polymers in aqueous solution*. Wiley-Blackwell. 2002.
143. Tanford C. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science*. 1978;200(4345):1012-8.
144. Gonçalves RA, Holmberg K, Lindman B. Cationic surfactants: A review. *J Mol Liq*. 2023:121335.
145. Fredell DL. Biological properties and applications of cationic surfactants. *Cationic Surfactants*: CRC Press; 2019. p. 31-60.
146. Scheibel JJ. The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. *Journal of surfactants and detergents*. 2004;7(4):319-28.
147. Ribeiro ME, de Moura CL, Vieira MG, Gramosa NV, Chaibundit C, de Mattos MC, i sar. Solubilisation capacity of Brij surfactants. *Int J Pharm*. 2012;436(1-2):631-5.
148. Chen S, Hanning S, Falconer J, Locke M, Wen J. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019;144:18-39.
149. Aboelwafa AA, El-Setouhy DA, Elmeshad AN. Comparative study on the effects of some polyoxyethylene alkyl ether and sorbitan fatty acid ester surfactants on the performance of transdermal carvedilol proniosomal gel using experimental design. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11:1591-602.
150. Kumar GP, Rajeshwarrao P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. *Acta pharmaceutica sinica B*. 2011;1(4):208-19.

151. Kaur G, Mehta S. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. *Int J Pharm.* 2017;529(1-2):134-60.
152. Kerwin BA. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *J Pharm Sci.* 2008;97(8):2924-35.
153. Scomoroscenco C, Teodorescu M, Raducan A, Stan M, Voicu SN, Trica B, i sar. Novel gel microemulsion as topical drug delivery system for curcumin in dermatocosmetics. *Pharmaceutics.* 2021;13(4):505.
154. Montenegro L, Rapisarda L, Ministeri C, Puglisi G. Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic emulsions containing vitamin E. *Cosmetics.* 2015;2(1):35-47.
155. Jyothi BJ, Sreelakshmi K. Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery system of flutamide. *J Young Pharm.* 2011;3(1):4-8.
156. Prieto C, Calvo L. Performance of the biocompatible surfactant Tween 80, for the formation of microemulsions suitable for new pharmaceutical processing. *Journal of Applied Chemistry.* 2013;2013.
157. Perugini L, Cinelli G, Cofelice M, Ceglie A, Lopez F, Cuomo F. Effect of the coexistence of sodium caseinate and Tween 20 as stabilizers of food emulsions at acidic pH. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2018;168:163-8.
158. Bollenbach L, Buske J, Mäder K, Garidel P. Poloxamer 188 as surfactant in biological formulations—An alternative for polysorbate 20/80? *Int J Pharm.* 2022:121706.
159. Schmolka IR. A review of block polymer surfactants. *J Am Oil Chem Soc.* 1977;54(3):110-6.
160. Zhang M, Yang B, Liu W, Li S. Influence of hydroxypropyl methylcellulose, methylcellulose, gelatin, poloxamer 407 and poloxamer 188 on the formation and stability of soybean oil-in-water emulsions. *asian journal of pharmaceutical sciences.* 2017;12(6):521-31.
161. Moghimi SM, Hunter AC. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.* 2000;18(10):412-20.
162. Pitto-Barry A, Barry NP. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. *Polymer Chemistry.* 2014;5(10):3291-7.

163. Singh-Joy SD, McLain VC. Safety assessment of poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, poloxamer 105 benzoate, and poloxamer 182 dibenzoate as used in cosmetics. *Int J Toxicol.* 2008;27:93-128.
164. Russo E, Villa C. Poloxamer hydrogels for biomedical applications. *Pharmaceutics.* 2019;11(12):671.
165. Kabong MA, Focke WW, Du Toit EL, Rolfes H, Ramjee S. Breakdown mechanisms of oil-in-water emulsions stabilised with Pluronic F127 and co-surfactants. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects.* 2020;585:124101.
166. Holland PM, Rubingh DN. Mixed surfactant systems: an overview. 1992.
167. Ćirin D, Krstonošić V, Poša M. Properties of poloxamer 407 and polysorbate mixed micelles: Influence of polysorbate hydrophobic chain. *Journal of industrial and engineering chemistry.* 2017;47:194-201.
168. Sharma S, Kori S, Parmar A. Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices. *Food Chem.* 2015;185:284-8.
169. Li F, Raza A, Wang Y-W, Xu X-Q, Chen G-H. Optimization of surfactant-mediated, ultrasonic-assisted extraction of antioxidant polyphenols from rattan tea (*Ampelopsis grossedentata*) using response surface methodology. *Pharmacogn Mag.* 2017;13(51):446.
170. Carullo D, Bosi M, Dermiki M, Bassani A, Jauregi P, Spigno G. Exploring different strategies of separation of antioxidant compounds from winery by-products via surfactant-assisted processes for process intensification and integration. *Food Bioprod Process.* 2022;131:191-201.
171. Skrypnik L, Novikova A. Response surface modeling and optimization of polyphenols extraction from apple pomace based on nonionic emulsifiers. *Agronomy.* 2020;10(1):92.
172. Malinowska M, Śliwa K, Sikora E, Ogonowski J, Oszmiański J, Kolniak-Ostek J. Ultrasound-assisted and micelle-mediated extraction as a method to isolate valuable active compounds from apple pomace. *Journal of Food Processing and Preservation.* 2018;42(10):e13720.
173. Śliwa K, Śliwa P. The Accumulated Effect of the Number of Ethylene Oxide Units and/or Carbon Chain Length in Surfactants Structure on the Nano-Micellar Extraction of Flavonoids. *Journal of functional biomaterials.* 2020;11(3):57.

174. Ziyatdinova G, Ziganshina E, Cong PN, Budnikov H. Ultrasound-assisted micellar extraction of phenolic antioxidants from spices and antioxidant properties of the extracts based on coulometric titration data. *Anal Methods*. 2016;8(39):7150-7.
175. Śliwa P, Śliwa K, Sikora E, Ogonowski J, Oszmiański J, Nowicka P. Incorporation of bioflavonoids from *Bidens tripartite* into micelles of non-ionic surfactants—experimental and theoretical studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;184:110553.
176. More PR, Arya SS. A novel, green cloud point extraction and separation of phenols and flavonoids from pomegranate peel: An optimization study using RCCD. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2019;7(5):103306.
177. Motikar PD, More PR, Arya SS. A novel, green environment-friendly cloud point extraction of polyphenols from pomegranate peels: a comparative assessment with ultrasound and microwave-assisted extraction. *Separation Science and Technology*. 2021;56(6):1014-25.
178. Cortés-Rojas D, Souza C, Oliveira W. Surfactant mediated extraction of antioxidants from *Syzygium aromaticum*. *Sep Sci Technol*. 2015;50(2):207-13.
179. Tadros TF. Emulsion science and technology: a general introduction. *Emulsion science and technology*. 2009;1(1):1-55.
180. McClements DJ. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007;47(7):611-49.
181. Wilde P. Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2000;5(3-4):176-81.
182. McClements DJ, Rao J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2011;51(4):285-330.
183. Niraula B, King TC, Chun TK, Misran M. Rheology properties of glucopyranoside stabilized oil–water emulsions: effect of alkyl chain length and bulk concentration of the surfactant. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects*. 2004;251(1-3):117-32.
184. Jafari SM, Assadpoor E, He Y, Bhandari B. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food hydrocolloids*. 2008;22(7):1191-202.
185. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci*. 2004;108:303-18.

186. Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrason Sonochem.* 2013;20(1):338-44.
187. Krstonošić V. *Primena biopolimera u proizvodnji emulzija.* Novi Sad, Serbia: Medicinski fakultet; 2020.
188. Chang H-Y, Tsao H-K, Sheng Y-J. Solid-like elastic behavior of nanosized concentrated emulsions: Size-dependent Young's and bulk moduli. *J Mol Liq.* 2023;380:121745.
189. Marti-Mestres G, Nielloud F. Emulsions in health care applications—an overview. *J Dispersion Sci Technol.* 2002;23(1-3):419-39.
190. Tadros TF. Emulsion formation, stability, and rheology. *Emulsion formation and stability.* 2013:1-75.
191. Barnes HA, Hutton JF, Walters K. *An introduction to rheology:* Elsevier; 1989.
192. Tadros TF. *Rheology of dispersions: principles and applications:* John Wiley & Sons; 2011.
193. Schoff CK, Kamarchik Jr P. *Rheology and rheological measurements.* Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 2000.
194. Tadros TF. Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects.* 1994;91:39-55.
195. Tadros T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004;108:227-58.
196. Khan BA, Akhtar N, Khan H, Braga VdA. Development, characterization and antioxidant activity of polysorbate based O/W emulsion containing polyphenols derived from Hippophae rhamnoides and Cassia fistula. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013;49:763-73.
197. Lucia A, Guzmán E, Rubio RG, Ortega F. Enhanced solubilization of an insect juvenile hormone (JH) mimetic (piriproxyfen) using eugenol in water nanoemulsions stabilized by a triblock copolymer of poly (ethylenglycol) and poly (propilenglycol). *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects.* 2020;606:125513.
198. Mancuso A, Cristiano MC, Pandolfo R, Greco M, Fresta M, Paolino D. Improvement of ferulic acid antioxidant activity by multiple emulsions: In vitro and in vivo evaluation. *Nanomaterials.* 2021;11(2):425.

199. Aditya N, Aditya S, Yang H, Kim HW, Park SO, Ko S. Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. *Food Chem.* 2015;173:7-13.
200. Hörmann K, Zimmer A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions—A review. *J Controlled Release.* 2016;223:85-98.
201. Cannon JB, Shi Y, Gupta P. Emulsions, microemulsions, and lipid-based drug delivery systems for drug solubilization and delivery—Part I: parenteral applications. *Water-insoluble drug formulation: CRC Press;* 2018. p. 211-45.
202. Froelich A, Osmalek T, Kunstman P, Jadach B, Brzostowska M, Białas W. Design and study of poloxamer-based microemulsion gels with naproxen. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects.* 2019;562:101-12.
203. Hiranphinyophat S, Otaka A, Asaumi Y, Fujii S, Iwasaki Y. Particle-stabilized oil-in-water emulsions as a platform for topical lipophilic drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2021;197:111423.
204. Alam MS, Algahtani MS, Ahmad J, Kohli K, Shafiq-un-Nabi S, Warsi MH, i sar. Formulation design and evaluation of aceclofenac nanogel for topical application. *Ther Deliv.* 2020;11(12):767-78.
205. Turk CTS, Oz UC, Serim TM, Hascicek C. Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide-loaded PLGA-based nanoparticles by design of experiments. *AAPS PharmSciTech.* 2014;15:161-76.
206. Moghddam SMM, Ahad A, Aqil M, Imam SS, Sultana Y. Optimization of nanostructured lipid carriers for topical delivery of nimesulide using Box–Behnken design approach. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology.* 2017;45(3):617-24.
207. Lu GW, Gao P. Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. *Handbook of non-invasive drug delivery systems: Elsevier;* 2010. p. 59-94.
208. Lee M-H, Oh S-G, Moon S-K, Bae S-Y. Preparation of silica particles encapsulating retinol using O/W/O multiple emulsions. *J Colloid Interface Sci.* 2001;240(1):83-9.
209. Park H, Mun S, Kim Y-R. UV and storage stability of retinol contained in oil-in-water nanoemulsions. *Food Chem.* 2019;272:404-10.

210. Yousefi S, Rajaei P, Nateghi L, Nodeh HR, Rashidi L. Encapsulation of sesamol and retinol using alginate and chitosan-coated W/O/W multiple emulsions containing Tween 80 and Span 80. *Int J Biol Macromol.* 2023;242:124766.
211. Diane JMM, Burgess J. Vitamin E nanoemulsions characterization and analysis. *Int J Pharm.* 2014;465(1-2):455-63.
212. Glampedaki P, Dutschk V. Stability studies of cosmetic emulsions prepared from natural products such as wine, grape seed oil and mastic resin. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects.* 2014;460:306-11.
213. Yarovaya L, Waranuch N, Wisuitiprot W, Khunkitti W. Effect of grape seed extract on skin fibroblasts exposed to UVA light and its photostability in sunscreen formulation. *J Cosmet Dermatol.* 2021;20(4):1271-82.
214. Bae J, Kim N, Shin Y, Kim S-Y, Kim Y-J. Activity of catechins and their applications. *Biomedical Dermatology.* 2020;4:1-10.
215. Yang S, Liu L, Han J, Tang Y. Encapsulating plant ingredients for dermocosmetic application: An updated review of delivery systems and characterization techniques. *Int J Cosmetic Sci.* 2020;42(1):16-28.
216. Lu W, Kelly AL, Miao S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends Food Sci Technol.* 2016;47:1-9.
217. Wu T-H, Yen F-L, Lin L-T, Tsai T-R, Lin C-C, Cham T-M. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *Int J Pharm.* 2008;346(1-2):160-8.
218. Zillich O, Schweiggert-Weisz U, Eisner P, Kerscher M. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmetic Sci.* 2015;37(5):455-64.
219. Ramful D, Aumjaud B, Neergheen V, Soobrattee M, Googoolye K, Aruoma O, i sar. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro and in model emulsion systems. *Food Res Int.* 2011;44(5):1190-6.
220. Velderrain-Rodríguez GR, Acevedo-Fani A, González-Aguilar GA, Martín-Belloso O. Encapsulation and stability of a phenolic-rich extract from mango peel within water-in-oil-in-water emulsions. *J Funct Foods.* 2019;56:65-73.
221. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16(3):144-58.

222. Ćućuz V, Cvejić J, Torović L, Gojković-Bukarica L, Acevska J, Dimitrovska A, i sar. Design of experiments (DoE) to model phenolic compounds recovery from grape pomace using ultrasounds. *J Food Sci Technol*. 2022;59(7):2913-24.
223. Atanacković Krstonošić M, Cvejić Hogervorst JC, Mikulić M, Gojković-Bukarica L. Development of HPLC method for determination of phenolic compounds on a core shell column by direct injection of wine samples. *Acta Chromatogr*. 2020;32(2):134-8.
224. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*. 1995;28(1):25-30.
225. Sweeney AP, Wyllie SG, Shalliker RA, Markham J. Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *J Ethnopharmacol*. 2001;75(2-3):273-7.
226. Stojanović ZS, Marković S. Merenje raspodele veličina čestica metodom difrakcije laserske svetlosti. *Tehnika-Novi materijali*. 2010:1-15.
227. Rahman A, Brown C. Effect of pH on the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulphate. *Journal of Applied Polymer Science*. 1983;28(4):1331-4.
228. Clint JH. Micellization of mixed nonionic surface active agents. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*. 1975;71:1327-34.
229. Poša M, Vapa I, Ćirin D. Influence of surfactant hydrophobic segment length on the thermodynamic parameters of binary mixed micelles of homologues polysorbates and Triton X-100. *Fluid Phase Equilib*. 2014;376:124-31.
230. Holland PM. Nonideal mixed micellar solutions. *Adv Colloid Interface Sci*. 1986;26:111-29.
231. Holland P, Rubingh D. Nonideal multicomponent mixed micelle model. *The Journal of Physical Chemistry*. 1983;87(11):1984-90.
232. Yilmaz Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J Food Compost Anal*. 2006;19(1):41-8.
233. Jovanović AA, Đorđević VB, Zdunić GM, Pljevljakušić DS, Šavikin KP, Gođevac DM, i sar. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat-and ultrasound-assisted techniques. *Sep Purif Technol*. 2017;179:369-80.

234. Chen S, Zeng Z, Hu N, Bai B, Wang H, Suo Y. Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. fruit using response surface methodology. *Food Chem.* 2018;242:1-8.
235. Oreopoulou A, Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. *Polyphenols in plants.* 2019:243-59.
236. Çam M, Hıışıl Y. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chem.* 2010;123(3):878-85.
237. Parmar A, Singh K, Bahadur A, Marangoni G, Bahadur P. Interaction and solubilization of some phenolic antioxidants in Pluronic® micelles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2011;86(2):319-26.
238. Goldmints I, Yu G-e, Booth C, Smith KA, Hatton TA. Structure of (deuterated PEO)–(PPO)–(deuterated PEO) block copolymer micelles as determined by small angle neutron scattering. *Langmuir.* 1999;15(5):1651-6.
239. Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigueral S. Antioxidant activity of Tween-20 and Tween-80 evaluated through different in-vitro tests. *J Pharm Pharmacol.* 2015;67(5):666-72.
240. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, i sar. Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod.* 1998;61(1):71-6.
241. Bergh VJV, Tønnesen HH. Interactions and solubilization of 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin with poloxamer 407 and β -cyclodextrin-derivatives in binary and ternary systems. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2017;37:51-60.
242. Perinelli DR, Cespi M, Pucciarelli S, Casettari L, Palmieri GF, Bonacucina G. Effect of phosphate buffer on the micellisation process of Poloxamer 407: Microcalorimetry, acoustic spectroscopy and dynamic light scattering (DLS) studies. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects.* 2013;436:123-9.
243. Thapa RK, Cazzador F, Grønlien KG, Tønnesen HH. Effect of curcumin and cosolvents on the micellization of Pluronic F127 in aqueous solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2020;195:111250.

244. Ree BJ, Lee J, Satoh Y, Kwon K, Isono T, Satoh T, i sar. A comparative study of dynamic light and X-ray scatterings on micelles of topological polymer amphiphiles. *Polymers*. 2018;10(12):1347.
245. Zhou W, Zhu L. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by anionic–nonionic mixed surfactant. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects*. 2005;255(1-3):145-52.
246. Ćirin D, Krstonošić V, Szdanić D. Synergism and antagonism in mixed monolayers: Brij S20/poloxamer 407 and Triton X-100/poloxamer 407 mixtures. *Fluid Phase Equilib*. 2018;473:220-5.
247. Guo R, Wei P. Studies on the antioxidant effect of rutin in the microenvironment of cationic micelles. *Microchimica Acta*. 2008;161:233-9.
248. Guo R, Wei P, Liu W. Combined antioxidant effects of rutin and Vitamin C in Triton X-100 micelles. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;43(4):1580-6.
249. Wojtunik-Kulesza K, Ciesla L, Oniszczyk A, Waksmundzka-Hajnos M. The influence of micellar system on antioxidant activity of common terpenoids measured by UV-Vis spectrophotometry. *ACTA POLONIAE PHARMACEUTICA*. 2018;75(2):321-8.
250. Chat OA, Najar MH, Mir MA, Rather GM, Dar AA. Effects of surfactant micelles on solubilization and DPPH radical scavenging activity of Rutin. *J Colloid Interface Sci*. 2011;355(1):140-9.
251. Jurado E, Bravo V, Camacho F, Vicaria JM, Fernández-Arteaga A. Estimation of the distribution of droplet size, interfacial area and volume in emulsions. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects*. 2007;295(1-3):91-8.
252. Dapčević Hadnađev T, Dokić P, Krstonošić V, Hadnađev M. Influence of oil phase concentration on droplet size distribution and stability of oil-in-water emulsions. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2013;115(3):313-21.
253. Kanafusa S, Chu BS, Nakajima M. Factors affecting droplet size of sodium caseinate-stabilized O/W emulsions containing β -carotene. *European journal of lipid science and technology*. 2007;109(10):1038-41.
254. Bai L, Huan S, Gu J, McClements DJ. Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*. 2016;61:703-11.

255. Herschel WH, Bulkley R. Konsistenzmessungen von gummi-benzollösungen. *Kolloid-Zeitschrift*. 1926;39:291-300.
256. Dokić P, Dokić L, Dapčević T, Krstonošić V, editors. Colloid characteristics and emulsifying properties of OSA starches. *Colloids for nano-and biotechnology*; 2008: Springer.
257. Krstonošić V, Dokić L, Nikolić I, Dapčević T, Hadnađev M. Influence of sodium dodecyl sulphate concentration on disperse and rheological characteristics of oil-in-water emulsions stabilized by OSA starch-SDS mixtures. *J Serb Chem Soc*. 2012;77(1):83-94.
258. Torcello-Gómez A, Wulff-Pérez M, Gálvez-Ruiz MJ, Martín-Rodríguez A, Cabrerizo-Vílchez M, Maldonado-Valderrama J. Block copolymers at interfaces: Interactions with physiological media. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014;206:414-27.
259. Dickinson E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food hydrocolloids*. 2009;23(6):1473-82.
260. Krstonošić V, Dokić L, Nikolić I, Milanović M. Influence of xanthan gum on oil-in-water emulsion characteristics stabilized by OSA starch. *Food Hydrocolloids*. 2015;45:9-17.
261. Sansone F, Esposito T, Mencherini T, Piccinelli AL, Gazzo P, Picerno P, i sar. Annurca peel extract: From the chemical composition, through the functional activity, to the formulation and characterisation of a topical oil-in-water emulsion. *Nat Prod Res*. 2016;30(12):1398-403.
262. Segovia F, Lupo B, Peiró S, Gordon MH, Almajano MP. Extraction of antioxidants from borage (*Borago officinalis* L.) leaves—optimization by response surface method and application in oil-in-water emulsions. *Antioxidants*. 2014;3(2):339-57.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Карактеризација полифенола комине грозђа добијених екстракцијом воденим растворима нејонских сурфактаната и примена екстраката у изради емулзија
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
Медицински факултет Универзитета у Новом Саду
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије – Претклиничка истраживања
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p>Истраживање је конципирано као претклиничка студија, која обухвата:</p> <ul style="list-style-type: none">• Екстракцију полифенолних једињења из комине црног грозђа применом водених раствора одабраних нејонских сурфактаната, воденим растворима смеша појединих сурфактаната и конвенционалним растварачима при одабраним условима екстракције (концентрација сурфактанта, киселост раствора и однос масе узорка и запремине екстракционог медијума).• Процену ефикасности екстракције применом наведених медијума на основу <i>in vitro</i> тестова.

• **Израђивање модела емулзија за топикалну примену које садрже екстракте добијене применом сурфактанта/смеше сурфактаната који су показали највећу ефикасност екстракције полифенола при оптималним условима екстракције и које су стабилизоване сурфактантима коришћеним за екстракцију; испитивање стабилности израђених емулзија.**

1.2 Врсте података

а) квантитативни

б) квалитативни

1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту /

г) административни подаци: навести врсту /

д) узорци ткива: навести врсту /

ђ) снимци, фотографије: фотографије и микрофотографије емулзија

е) текст: литературни наводи

ж) мапа, навести врсту /

з) остало: припремљени екстракти комине грожђа; израђене емулзије; хроматографска и спектрофотометријска анализа, реолошка мерења, одређивање величине честица методама статичког и динамичког расејања светлости

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) Excel фајл, датотека **.xlsx**
- b) SPSS фајл, датотека **.sav; .spv**
- c) PDF фајл, датотека **.pdf**
- d) Текст фајл, датотека **.docx**
- e) JPG фајл, датотека **.jpg**
- f) PNG фајл, датотека **.png**
- g) CZI фајл, датотека **.dzi**
- h) DLS фајл, **.del**
- i) MEA фајл, **.mea**

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли: **велики број**
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): **велики број**

1.3.3. Поновљена мерења

- a) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је **14 дана**
- б) варијабле које се више пута мере односе се на **процену физичке стабилности емулзија**
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као „**након 14 дана**”

Напомене: /

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити /

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: претклиничка *in vitro* испитивања (спектрофотометријске методе, метода високоефикасне течне хроматографије, техника динамичког расејања светлости, техника статичког расејања светлости, визуелне методе праћења криминг индекса, метода микроскопске анализе емулзија, методе испитивања реолошких карактеристика)

б) корелационо истраживање, навести тип /

ц) анализа текста, навести тип: прикупљање података анализом доступне литературе

д) остало, навести шта /

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

/

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? /

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

/

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Контрола квалитета података је спроведена применом статистичких тестова.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података је спроведена вишеструким личним проверавањем, независном проверавама од стране ментора и поређењем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs//searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI /

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до /

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог /

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење /

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? /

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум. /

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд. /

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

/

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање
19.08.2022., Етички одбор Медицинског факултета у Новом Саду

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

/

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

/

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Дарија Сазданић, darija.sazdanic@mf.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Дарија Сазданић, darija.sazdanic@mf.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Дарија Сазданић, darija.sazdanic@mf.uns.ac.rs