

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Stoja L. Milovanović, dipl. inž.

**IMPREGNACIJA TIMOLA NA ČVRSTE NOSAČE
NATKRITIČNIM UGLJENIK(IV)-OKSIDOM**

Doktorska disertacija



Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Stoja L. Milovanovic, dipl. ing.

**IMPREGNATION OF THYMOL ON SOLID CARRIERS
USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE**

Doctoral dissertation



Belgrade, 2015.

Mentor:

Dr Irena Žižović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

Dr Melina Kalagasidis Krušić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Slobodan Petrović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Maja Radetić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Marko Stamenić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Vlada Veljković, redovni profesor
Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet

Kandidat:

Datum odbrane: _____

Izvod

Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje mogućnosti natkritične impregnacije čistog timola i ekstrakta timijana (*Thymus vulgaris*) na čvrste nosače kako bi se istražila mogućnost razvijanja novih, funkcionalizovanih materijala sa antimikrobnim dejstvom. Timol je odabran za procese natkritične impregnacije nosača sa polisaharidnom osnovom zbog njegovog jakog antimikrobnog, antifungalnog i antioksidativnog dejstva. Da bi se pristupilo istraživanju mogućnosti koje impregnacija timola natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom pruža, prvo je ispitana rastvorljivost timola u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu u opsegu temperatura i pritisaka od interesa. Pored čistog timola, u procesu impregnacije čvrstih nosača primenjen je i ekstrakt timijana bogat timolom dobijen postupkom natkritične ekstrakcije. Čvrsti nosači za ove aktivne komponente su izabrani na osnovu njihovih poželjnih osobina (biodegradabilnost, stabilnost, biokompatibilnost itd.) i mogućnosti primene u farmaceutskoj, biomedicinskoj, kozmetičkoj i industriji hrane. Odabrani su sledeći nosači: a) polisaharidni ksero- i aerogelovi (hitozan, kukuruzni i tapioka skrob) za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, b) acetat celuloze za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji i c) pamučna gaza u cilju dobijanja medicinskog tekstila sa antibakterijskim dejstvom za tretman rana. Definisani su optimalni parametri dobijanja poroznih ksero- i aerogelova (temperatura gelatinizacije, vrsta umreživača i metoda sušenja) koji daju najveći prinos impregnacije aktivne supstance. Definisani su i optimalni parametri integrisanog procesa natkritične ekstrakcije iz timijana i impregnacije dobijenog ekstrakta na čvrste nosače.

U svrhu određivanja rastvorljivosti timola, impregnacije timola i izvođenja integrisanog procesa natkritične ekstrakcije iz timijana i njegove impregnacije primenjene su statička i dinamička metoda, kao i njihova kombinacija, na sledećoj opremi: ćelija za rad pod visokim pritiscima, laboratorijsko postrojenje za rad pod visokim pritiscima i laboratorijsko postrojenje za natkritičnu ekstrakciju i adsorpciju. Prisustvo timola na površini pamučnih vlakana detektovano je FTIR metodom. Karakterizacija čvrstih nosača izvršena je SEM i BET metodama. Hemijski sastav natkritičnog ekstrakta timijana određen je GC/FID metodom. Za proveru antimikrobnog dejstva impregniranih čvrstih nosača korišćene su standardne mikrobiološke metode na sojevima *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* i *C. albicans*. Kinetika

otpuštanja timola iz acetata celuloze praćena je *in vitro*, u vodi na sobnoj temperaturi, pomoću UV-VIS spektrofotometra merenjem apsorbance na 274 nm.

Rezultati ove doktorske disertacije (Poglavlje 4) su prikazani kroz pet potpoglavlja.

U delu 4.1. je ispitana rastvorljivost timola u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu na temperaturama 35 °C, 40 °C i 50 °C i pritiscima 7,8-25 MPa (za opseg gustina ugljenik(IV)-oksida 335,89-849,60 kg/m³) statičkom metodom. Dobijeni podaci o rastvorljivosti su korelisani upotrebom semi-empirijskih jednačina: Chrastil, Adachi i Lu i del Valle i Aguilera. Na osnovu dobijenih rezultata, temperatura od 35 °C i pritisak od 15 MPa su odabrani kao optimalni za procese ekstrakcije i impregnacije.

U potpoglavlju 4.2. je predstavljena kinetika procesa impregnacije pamučne gaze timolom pomoću natkritičnog ugljenik(IV)-oksida. FTIR analiza je potvrdila prisustvo timola na površini pamučnih vlakana. Ostvareni prinos nakon 2 h impregnacije iznosio je 11,0% , a posle 24 h 19,6%. Impregirana gaza je imala jako antimikrobno dejstvo na odabrane mikroorganizme. Rezultati su modelovani kinetikom pseudo-prvog i pseudo-drugog reda.

U potpoglavlju 4.3. je optimizovan postupak pripreme polisaharidnih gelova (hitozana, kukuruznog i tapioka skroba) u odnosu na prinos impregnacije timolom. Utvrđen je uticaj botaničke vrste skroba, temperature pripreme hidrogela i metode sušenja na morfologiju i prinos impregnacije ksero- i aerogelova skroba. Specifična površina ksero- i aerogelova skrobova je bila u opsegu 0,02-5,52 m²/g. Gelovi kukuruznog skroba su imali veći prinos impregnacije (1,15-4,01%) nego gelovi tapioka skroba (0,58-3,63%). Prinos impregnacije timola je bio veći za kserogelove (1,75-4,01%) nego za aerogelove (0,58-3,31%). Rezultati su ukazali na veliki potencijal kukuruznog kserogela koji je dobijen od hidrogela geliranog na 100 °C uzimajući u obzir jednostavnost pripreme gela, njegovu morfologiju i kapacitet punjenja timolom (4,01%) na datim uslovima natkritične impregnacije. Ispitan je uticaj izbora umreživača (formaldehid i glutardialdehid) i metode sušenja na morfologiju i prinos impregnacije ksero- i aerogelova hitozana. Pri odabranim uslovima impregnacije (15 MPa, 35 °C, 24 h) najveći prinos impregnacije je postignut za aerogel hitozana (11,30%) koji je dobijen umrežavanjem zakišeljelog vodenog rastvora hitozana formaldehidom i koji je osušen natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom na 15 MPa i 50 °C.

U potpoglavlju 4.4. je utvrđena zavisnost prinosa impregnacije acetata celuloze od operativnih parametara. Prinos impregnacije acetata celuloze timolom je varirao od 4,51% do

72,26% u zavisnosti od pritiska, temperature i impregnacionog vremena kada je timol u sistemu bio u višku. Morfologija uzoraka se značajno menjala sa povećanjem prinosa impregnacije, što upućuje na uticaj timola na acetat celuloze. Impregnirani uzorci su imali izraženo antimikrobno dejstvo na izabrane mikroorganizme sa mikrobnom redukcijom od 99,9%. U zavisnosti od prinosa impregnacije, uzorci su kontinualno otpuštali timol u periodu od nekoliko časova do preko 10 dana.

U potpoglavlju 4.5. su definisani optimalni parametri integrisanog procesa natkritične ekstrakcije timijana i njegove impregnacije na pamučnu gazu. Optimizovani operativni uslovi integrisanog procesa su primenjeni na impregnaciju kserogela kukuruznog skroba, aerogela hitozana i acetata celuloze. Najveći prinos impregnacije ekstrakta timijana je dobijen za pamučnu gazu i iznosio je 7,18%.

Doprinos ove teze se ogleda u sledećem:

- Dobijene su informacije o vrednostima rastvorljivosti timola u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu na različitim uslovima pritiska i temperature
- Razvoj i verifikacija nove metode dobijanja modifikovane pamučne gaze kao medicinskog tekstila sa antimikrobnim dejstvom
- Razvoj i verifikacija procesa impregnacije polisaharidnih ksero- i aerogelova timolom
- Razvoj i verifikacija procesa impregnacije acetata celuloze timolom. Naime, poznato je da na uslovima od interesa, acetat celuloze ne menja svojstva u prisustvu natkritičnog ugljenik(IV)-oksida. Međutim, prisustvo timola dovodi do uspostavljanja vodoničnih veza između molekula timola i acetata celuloze, menjajući pri tome fizička svojstva polimera. Poseban doprinos predstavlja određivanje količine impregniranog timola koji dovodi do bubrenja, odnosno promena fizičkih svojstava polimera usled formiranja vodoničnih veza između molekula timola i acetata celuloze
- Razvoj integrisanog procesa natkritične ekstrakcije iz timijana i impregnacije dobijenog ekstrakta na čvrste nosače.

Ključne reči: natkritični ugljenik(IV)-oksid, natkritična impregnacija, timol, timijan, pamučna gaza, acetat celuloze, hitozan, kukuruzni i tapioka skrob, kserogel, aerogel

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Hemijsko inženjerstvo

UDK broj: 547.563:546.264-31

Abstract

The aim of this PhD thesis was to investigate the possibility of supercritical impregnation of pure thymol and thyme extract (*Thymus vulgaris*) into selected solid carriers in order to explore the possibility of developing new functionalized materials with antimicrobial properties. Thymol was selected for the supercritical impregnation process of the polysaccharide-based carrier because of its strong antimicrobial, antifungal and antioxidant effect. Before the examination of the thymol impregnation possibilities, the solubility of thymol in supercritical carbon dioxide in the range of temperatures and pressures of interest was examined first. In addition to pure thymol, in the process of solid carrier impregnation, thymol rich thyme extract obtained by the supercritical extraction was applied. Solid carriers for these active components were selected on the basis of desired properties (biodegradability, stability, biocompatibility etc.) and their potential applications in pharmaceutical, biomedical, cosmetic, and food industry. The selected carriers are: a) polysaccharide xero- and aerogels (chitosan, corn and tapioca starch) for use in pharmaceutical and food industries, b) cellulose acetate for application in pharmaceutical and food industries, and c) cotton gauze in order to obtain a medical textile with antibacterial effect in wound treatment. Optimum parameters for fabrication of porous xero- and aerogels (temperature of gelatinization, type of crosslinker and drying method) were defined with respect to the highest impregnation yield. Optimum process parameters of an integrated process of supercritical extraction and impregnation of thyme extract into solid carriers were defined as well.

In order to determine the solubility of thymol, and to perform thymol impregnation and integrated process of supercritical extraction of thyme and its impregnation, static and dynamic methods and their combination were applied using following equipment: high pressure view cell, high pressure system for supercritical extraction, and laboratory installation for supercritical extraction and adsorption. The presence of thymol on the surface of cotton fiber was detected by the FTIR method. Characterization of the solid carriers was performed using SEM and BET methods. Chemical composition of the supercritical thyme extract was determined by GC/FID method. To test the antimicrobial effect of the impregnated solid carriers, the standard methods for the microbiological examination were used using the strains of *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* and *C. albicans*. Kinetic of thymol release from cellulose

acetate was followed *in vitro*, in water at room temperature, using UV-VIS spectrophotometer measuring the absorbance at 274 nm.

The results of this doctoral dissertation (Chapter 4) are presented in five subsections.

In the subsection 4.1, the solubility of thymol in supercritical carbon dioxide was investigated at temperatures of 35 °C, 40 °C and 50 °C and pressures from 7.8 to 25 MPa (for the carbon dioxide density range from 335.89 to 849.60 kg/m³) using the static method. The obtained solubility data were correlated using semi-empirical equations introduced by Chrastil, Adachi & Lu, and del Valle & Aguilera. Based on these results, temperature of 35 °C and pressure of 15 MPa were selected as the optimal for the extraction and impregnation processes.

In the subsection 4.2, the kinetics of cotton gauze impregnation with thymol using supercritical carbon dioxide was presented. The FTIR analysis confirmed the presence of thymol on the surface of cotton fiber. The achieved impregnation yields after 2 h and 24 h were 11.0% and 19.6%, respectively. The impregnated gauze had strong antimicrobial activity against selected microorganisms. Results are modeled using pseudo-first and pseudo-second order kinetics.

In the subsection 4.3, preparation of the polysaccharide gels (chitosan, corn and tapioca starch) is optimized referred to the yield of thymol impregnation. The influence of starch botanical origin, the hydrogel preparation temperature, and drying method on the morphology and impregnation yield of starch xero- and aerogels was determined. The specific surface area of the starch xero- and aerogels was in the range of 0.02-5.52 m²/g. Corn starch gels had higher impregnation yields (1.15-4.01%) than tapioca starch gels (0.58-3.63%). The thymol impregnation yield was higher for xerogels (1.75-4.01%) than for aerogels (0.58-3.31%). The results showed the great potential of corn xerogels obtained from hydrogel prepared at 100 °C, taking into account the easiness of gel making, its morphology and thymol loading capacity (4.01%) at the given conditions of supercritical impregnation. The influence of the crosslinking agents (formaldehyde and glutardialdehyde) and drying method on the morphology and impregnation yield of the chitosan xero- and aerogels was examined. For the selected impregnation process conditions (15 MPa, 35 °C, 24 h), the highest impregnation yield was obtained for the chitosan aerogel (11.30%) which was obtained by formaldehyde crosslinking of acidified aqueous solution of chitosan and which was dried with supercritical carbon dioxide at 15 MPa and 50 °C.

In the subsection 4.4, the dependence of the cellulose acetate impregnation yield on operational parameters was determined. The thymol impregnation yield of the cellulose acetate varied from 4.51% to 72.26%, depending on the pressure, temperature, and the impregnation period when thymol was in the system in exes. The morphology of the samples was significantly changed with an increase of the impregnation yield, which indicated the effect of thymol on cellulose acetate. The impregnated samples had strong antimicrobial activity against selected microorganisms with microbial reduction of 99.9%. Depending on the impregnation yield, the samples released thymol continuously over a period from several hours to 10 days.

In the subsection 4.5, the optimal parameters of the integrated process of supercritical thyme extraction and its impregnation on cotton gauze were defined. The optimized operating conditions of the integrated process were applied to the corn starch xerogels, chitosan aerogel, and cellulose acetate impregnation. The highest thyme extract impregnation yield was obtained for the cotton gauze (7.18%).

The contribution of this thesis is reflected in the following:

- Information on the thymol solubility in supercritical carbon dioxide at different pressure and temperature conditions were obtained
- Development and verification of the new method of obtaining modified cotton gauze as a medical textile with antimicrobial activity
- Development and verification of the process of polysaccharide xero- and aerogels impregnation with thymol
- Development and verification of the cellulose acetate impregnation process with thymol. Namely, it is known that at the conditions of interest, cellulose acetate does not change its properties in the presence of supercritical carbon dioxide. However, the presence of thymol leads to a formation of hydrogen bonds between the molecules of thymol and cellulose acetate, altering the physical properties of the polymer. A particular contribution is determination of the amount of impregnated thymol which leads to the swelling, to the change in the polymer physical properties due to forming of hydrogen bonds between thymol molecule and the cellulose acetate.

- Development of the integrated process of thyme supercritical extraction and impregnation of obtained extract into the solid carriers.

Keywords: supercritical carbon dioxide, supercritical impregnation, thymol, thyme, cotton gauze, cellulose acetate, chitosan, corn and tapioca starch, xerogel, aerogel

Scientific field: Technological engineering

Narrower scientific field: Chemical engineering

UDC number: 547.563:546.264-31

Sadržaj

Izvod.....	i
Sadržaj.....	ix
Lista oznaka.....	xii
Lista skraćenica.....	xiii
1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	4
2.1. TIMIJAN.....	4
2.2. TIMOL.....	6
2.3. POLIMERI.....	9
2.3.1. Upotreba polimera.....	12
2.3.2. Hitozan.....	14
2.3.3. Skrob.....	17
2.3.4. Acetat celuloze.....	23
2.3.5. Pamučna gaza.....	25
2.4. NATKRITIČNI FLUIDI.....	26
2.4.1. Sposobnost rastvaranja natkritičnih fluida.....	29
2.4.2. Natkritično sušenje.....	31
2.4.3. Natkritična ekstrakcija.....	32
2.4.4. Dobijanje poroznih polimernih materijala primenom natkritičnih fluida.....	34
2.4.5. Natkritična impregnacija.....	37
2.4.6. Integrisani procesi natkritične ekstrakcije i natkritične impregnacije.....	40
2.4.7. Komercijalna upotreba natkritičnih fluida.....	43
2.5. METODE ANALIZE.....	44
2.5.1. Ispitivanje morfologije nosača aktivne komponente.....	44
2.5.2. Ispitivanje kinetike otpuštanja aktivne komponente iz impregniranog nosača.....	47
2.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST TIMIJANA I TIMOLA.....	48
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	55
3.1. MATERIJALI.....	55
3.2. METODE.....	55

3.2.1. Određivanje rastvorljivosti timola.....	55
3.2.2. Priprema polisaharidnih gelova.....	57
3.2.2.1. Dobijanje kserogelova hitozana, kukuruznog i tapioka skroba	58
3.2.2.2. Dobijanje aerogelova hitozana, kukuruznog i tapioka skroba	58
3.2.3. Natkritična impregnacija	61
3.2.4. Matematički modeli za korelisanje rastvorljivosti supstanci u natkritičnom fluidu.....	65
3.2.5. Kinetički model za korelisanje impregnacije tkanine	68
3.2.6. Metode analize	68
3.2.7. Određivanje antimikrobne aktivnosti impregniranog nosača.....	70
4. REZULTATI I DISKUSIJA	73
4.1. RASTVORLJIVOST TIMOLA U NATKRITIČNOM UGLJENIK(IV)-OKSIDU ...	73
4.1.1. Eksperimentalni rezultati	73
4.1.2. Korelisanje podataka o rastvorljivosti	76
4.1.3. Zaključci	78
4.2. IMPREGNACIJA TIMOLA NA GAZU NATKRITIČNIM UGLJENIK(IV)-OKSIDOM.....	78
4.2.1. Karakterizacija gaze.....	80
4.2.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti gaze impregnirane timolom.....	83
4.2.3. Zaključci	84
4.3. IMPREGNACIJA TIMOLA NA POLISAHARIDNE GELOVE NATKRITIČNIM UGLJENIK(IV)-OKSIDOM.....	85
4.3.1. Impregnacija timola na gelove skroba.....	85
4.3.1.1. Priprema gelova skroba.....	85
4.3.1.2. Impregnacija gelova kukuruznog i tapioka skroba.....	88
4.3.1.3. Karakterizacija gelova kukuruznog i tapioka skroba	90
4.3.1.4. Zaključci	96
4.3.2. Impregnacija timola na gelove hitozana.....	97
4.3.2.1. Priprema gelova hitozana	97
4.3.2.2. Impregnacija gelova hitozana.....	99
4.3.2.3. Karakterizacija gelova hitozana.....	100

4.3.2.4. Zaključci	103
4.4. IMPREGNACIJA TIMOLA NA ACETAT CELULOZE NATKRITIČNIM UGLJENIK(IV)-OKSIDOM.....	104
4.4.1. Karakterizacija acetata celuloze.....	109
4.4.2. Kinetika otpuštanja timola <i>in vitro</i>	112
4.4.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti acetata celuloze impregniranog timolom.....	115
4.4.4. Zaključci	117
4.5. INTEGRISANI PROCES ZA IMPREGNACIJU EKSTRAKTA TIMIJANA NA ČVRSTE NOSAČE NATKRITIČNIM UGLJENIK(IV)-OKSIDOM	117
4.5.1. Optimizacija integrisanog procesa za impregnaciju pamučne gaze ekstraktom timijana	119
4.5.2. Integrisani proces za impregnaciju polisaharidnih gelova i acetata celuloze ekstraktom timijana	122
4.5.3. Zaključci	123
5. ZAKLJUČAK.....	125
Literatura	129
Biografija autora	144

Lista oznaka

Oznaka	Značenje	Jedinica	Jednačina
I i Imp	Prinos impregnacije timola i ekstrakta timijana	-	1 i 3
Y i Y^*	Prinos ekstrakcije ekstrakta timijana i ekstrakta timijana nakon dovoljno dugog vremena	-	2 i 4
m_T	Masa timijana na početku procesa	g	2
m_{TE}	Masa ukupnog ekstrakta timijana	g	2
m_{TE}^{IMP}	Masa impregniranog ekstrakta timijana	g	3
E^{ef} i I^{ef}	Efikasnost ekstrakcije i impregnacije ekstrakta timijana	-	4 i 5
A	Rastvorak	-	6
k	Broj molekula	-	6
B	Gas (ugušćen gas)	-	6
AB_k	Molekul rastvorka i gasa	-	6
[A] i [B]	Molarna koncentracija pare rastvorka i gasa	mol/L	7
[AB_k]	Molarna koncentracija molekula rastvorka u gasu	mol/L	7
K	Konstanta ravnoteže	bezdimezionna	8
ΔH_{sol}	Toplota rastvaranja	kJ/mol	9
T	Temperatura	K	9
q_s i q_v	Konstante	bezdimezione	9, 10
ΔH_{vap}	Toplota isparavanja rastvorka	kJ/mol	10
ΔH	Ukupna toplota reakcije	kJ/mol	11
M_A i M_B	Molekulska masa rastvorka i gasa	g/mol	12
c	Koncentracija rastvorka u natkritičnom fluidu	kg/m ³	13
ρ	Gustina natkritičnog fluida	kg/m ³	13
d	Gustina gasa	g/L	14
a_1, a_2, a_3	Koeficijenti rastvorljivosti	-	15, 15, 17
e_1, e_2, e_3	Koeficijenti rastvorljivosti	-	15, 16, 16
y	Molska frakcija timola u natkritičnom fluidu	-	18
q_e	Masa supstrata apsorbovanog u ravnoteži	kg	20
q_t	Masa supstrata apsorbovanog u nekom vremenu	kg	21
k_1 i k_2	Kinetičke konstante pseudo-prvog i pseudo-drugog reda	h ⁻¹	20 i 21
M_t i M_∞	Količine bioaktivne supstance otpuštene u vremenu t i u beskonačno dugom vremenu	kg	23
n	Eksponent otpuštanja	-	23
k	Kinetička konstanta	min ⁻ⁿ	23

Lista skraćenica

Skraćenica	Pun naziv
T_f	temperatura tečenja
T_m	temperatura topljenja
T_g	temperatura prelaza u staklasto stanje, temperatura ostakljivanja
AM	amiloza
AP	amilopektin
T_{gel}	temperatura gelatinizacije
T_c	kritična temperatura
AC	acetat celuloze
CO ₂	ugljenik(IV)-oksid
n _k CO ₂	natkritični ugljenik(IV)-oksid
NKE	natkritična ekstrakcija
NKI	natkritična impregnacija
T _{gel-h}	Temperatura pripreme hidrogela
S _p	Specifična površina
V _{tot}	Ukupna zapremina pora
AARD	Prosečna apsolutna relativna devijacija
RSS	Suma kvadrata razlike

1. UVOD

Obimna proizvodnja i potrošnja antibiotika, koja je dovela do rezistencije bakterija na veliki broj lekova, podstakla je ispitivanje antibakterijskog delovanja supstanci koje nisu antibiotici (biljni ekstrakti i njihove komponente), a u cilju pronalaženja novih sredstava u borbi protiv infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima bakterija. Tokom prethodnih decenija dokazano je da ekstrakti lekovitog i začinskog bilja, kao i njihove komponente, ispoljavaju značajno antimikrobno delovanje (de Souza i sar., 2014). Međutim, veliki broj prirodnih bioaktivnih supstanci su hemijski nestabilne, slabo rastvorljive u vodi, loše se distribuiraju do željenog mesta delovanja, deluju intenzivno ali u kratkom vremenskom periodu i slično. Neki od ovih nedostataka mogu se prevazići impregnacijom aktivnih supstanci na čvrste nosače. Ovi nosači mogu efikasno da zaštite impregniranu supstancu od degradacije (pod dejstvom npr. pH, temperature ili enzima), da omoguće dostavljanje aktivne supstance do željenog mesta njenog dejstva, kao i da omoguće njeno kontrolisano otpuštanje. Inkorporacija ekstrakata biljaka i njihovih komponenata u različite nosače konvencionalnim metodama ima veći broj ograničenja. Metoda impregnacije pomoću natkritičnog fluida predstavlja efikasnu alternativu sa brojnim prednostima (de Souza i sar., 2014). Natkritični fluidi, zahvaljujući velikoj gustini bliskoj gustini tečnosti i difuzivnosti bliskoj difuzivnosti gasova, lako prodiru u čvrst materijal, što ih čini pogodnim rastvaračima za procese impregnacije. Separacija natkritičnog fluida od rastvorka i nosača je jednostavna, brza i potpuna. Variranjem procesnih parametara (temperatura, pritisak, protok, vreme, brzina dekompresije) može se dobiti proizvod željenih karakteristika. Među glavnim prednostima ove tehnike je odsustvo organskih rastvarača, mogućnost rada na relativno niskim temperaturama, kao i mogućnost rada sa hidrofobnim supstancama koje ne mogu biti impregnirane vodenim rastvorom ili suspenzijom. Takođe, impregnacijom određenih polimera natkritičnim fluidima mogu se proizvesti impregnirani polimerni materijali željene veličine i raspodele pora. Procesima pod visokim pritiscima uz primenu natkritičnih fluida je takođe moguće proizvesti porozne aerogelove koji naknadno mogu da se impregniraju aktivnom supstancom.

Da bi se zadovoljile potrebe potrošača za bezbednijim, ekološki prihvatljivim proizvodima većeg kvaliteta, razvoj biokompatibilnih i biodegradabilnih filmova, koji se mogu upotrebiti

kao zamena za polimere koji se dobijaju od petrohemijskih sirovina, je interesantna alternativa i obećavajuća oblast istraživanja. Sintetski polimeri su dominirali industrijom do skora ali njihova proizvodnja opada jer nisu biokompatibilni. Iako se veliki broj biokompatibilnih polimera proizvodi industrijski, njihova upotreba je ekonomski i ekološki problematičnija nego upotreba polimera iz poljoprivrednih izvora, a naročito polisaharida kao što su skrob ili celuloza. Skrob ima veliku primenu u proizvodnji biokompatibilnih filmova zbog poželjnih svojstava tih filmova koji su izotropni, bez mirisa i ukusa, bezbojni, netoksični i biodegradabilni (de Souza i sar., 2014). Trenutno, biomaterijali se smatraju glavnim komponentama za proizvodnju modifikovanih sistema za dostavljanje lekova. Među njima, upotreba prirodnih polisaharida i/ili njihovih derivata je posebno privlačna zbog njihove stabilnosti, dostupnosti, obnovljivosti, niske toksičnosti, biodegradabilnosti i biokompatibilnosti, što ih, uzimajući u obzir i mogućnost hemijske modifikacije, čini idealnim za upotrebu u farmaceutskim proizvodima sa različitim putem dostavljanja, mestima delovanja i profilima otpuštanja lekova (Garcia-Gonzalez i sar., 2011).

U prethodnim istraživanjima (Ivanovic i sar., 2012) je pokazano da timol ima snažno antibakterijsko dejstvo i na Gram pozitivne (Gram+) i na Gram negativne (Gram-) bakterije. Takođe je dokazano i snažno antibakterijsko dejstvo natkritičnog ekstrakta timijana (*Thymus vulgaris*), koji je bogat timolom, kako na Gram+ tako i na Gram- bakterije. Upravo zbog svog dejstva na Gram- bakterije, koje nije tipično za etarska ulja, timol i etarska ulja bogata timolom predstavljaju značajne prirodne antibakterijske agense za potencijalnu primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Timol ima veliku potencijalnu primenu zbog svojih svojstava i mogućnosti kombinacije sa bionosačima.

U okviru disertacije, ispitana je mogućnost impregnacije čistog timola na čvrste nosače, kao i ekstrakta timijana (*Thymus vulgaris*) bogatog timolom, a dobijenog postupkom natkritične ekstrakcije. Danas se u naučnoj literaturi može naći dosta podataka o antibakterijskoj aktivnosti ekstrakata timijana i njegove glavne komponente timola. S druge strane, nema podataka o antibakterijskoj aktivnosti čvrstih nosača koji su impregnirani ekstraktom timijana i timolom korišćenjem ugljenik(IV)-oksida. Da bi se započelo istraživanje mogućnosti koje impregnacija timola natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom pruža, neophodno je prethodno odrediti rastvorljivost timola u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu u opsegu temperatura i pritisaka od

interesa. Kao čvrsti nosači za impregnaciju timolom pod visokim pritiscima, u ovoj disertaciji korišćeni su: a) pamučna gaza u cilju dobijanja medicinskog tekstila sa antibakterijskim dejstvom za tretman rana, b) polisaharidni aero i kserogelovi (kukuruzni skrob, skrob tapioke i hitozan) za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji i c) acetat celuloze za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije se mogu grupisati na sledeći način:

- Određivanje rastvorljivosti timola u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu na različitim operativnim uslovima (pritisak, temperatura, vreme) i povezivanje eksperimentalnih rezultata sa postojećim empirijskim modelima.
- Optimizacija procesa natkritične impregnacije pamučne gaza timolom u cilju dobijanja medicinskih sredstava sa antimikrobnim dejstvom za tretman rana i provera antimikrobnog dejstva finalnog proizvoda.
- Proizvodnja ksero- i aerogelova skroba (skrob kukuruza i tapioke) i hitozana i njihova karakterizacija (SEM, BET).
- Optimizacija procesa natkritične impregnacije ksero- i aerogelova skroba (skrob kukuruza i tapioke) i hitozana timolom.
- Optimizacija procesa natkritične impregnacije acetata celuloze timolom i provera antimikrobnog dejstva finalnih proizvoda.
- Optimizacija integrisanog procesa natkritične ekstrakcije i impregnacije ekstrakta timijana na odabrane čvrste nosače.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. TIMIJAN

Timijan je zimzelena, drvenasta višegodišnja biljka sa malim zelenim ili sivim listovima. Cveta tokom kasnog proleća i leta cvetovima bele, roze ili ružičaste boje. Poreklom je iz južne Evrope (Španija, Italija), a komercijalno se uzgaja u većini zemalja sa umerenom i suptropskom klimom (Stahl-Biskup i sar., 2004).

Timijan pripada porodici Lamiaceae u okviru koje se javlja u nekoliko vrsta: *Thymus vulgaris* (baštenski timijan) koja je najpoznatija i najkorišćenija vrsta timijana, *T. zygis* (španski timijan), *T. serpyllum* (divlji timijan) i *T. pulegioides* (veliki timijan). *T. vulgaris* je hemijski polimorfozna biljka. Postoji nekoliko hemotipova koji su nazvani po dominantnom monoterpenu u njihovom etarskom ulju. Tako postoje timol tip, karvakrol tip, linalool tip, geraniol tip, α -terpineol tip, *trans*-tujanol (*trans*-sabinen hidrat) i cineol tip (Grosso i sar., 2010; Stahl-Biskup i sar., 2004). Poslednjih godina je proizvedena nova vrsta kultivisanog timijana (timol tip) tzv. nemački zimski timijan (selekcionisani *T. vulgaris*) koji je izrazito bogat timolom. Poreklo imena “*thymus*” je grčka reč koja znači “hrabrost”.

Hemijski sastav

Biološka aktivnost etarskog ulja timijana zavisi od hemijskog sastava ulja koji je pod velikim uticajem geografskog porekla biljke, prirodne sredine (varijacija zemljišta, klime i svetlosti), uslova gajenja itd. (Piccaglia i sar., 1993). Hemijski karakter timijana je predstavljen dvema glavnim klasama sekundarnih biljnih metabolita: lako isparljivo etarsko ulje i neisparljivi polifenoli. Etarsko ulje se nalazi u glandularnim trihomima sa obe strane listova. Najviše isparljivih materija koje se detektuju u ulju timijana pripadaju grupi monoterpena. Komponente koje su nosioci specifične arome su: timol, karvakrol, linalool, L-borneol, geraniol, amil alkohol, β -pinen, kamfen, *p*-cimen, kariofilen i 1,8-cineol. Pored etarskog ulja, timijan sadrži i flavonoide koji su najčešće prisutni u obliku aglikona (najčešće apigenin i luteolin). Osim etarskog ulja, tanini doprinose komercijalnoj upotrebi timijana (najčešće ruzmarinska kiselina i kofeinska kiselina) (Stahl-Biskup i sar., 2004).

Upotreba timijana

Biljka, ekstakt i etarsko ulje timijana imaju veliki spektar dejstva (npr. antimikrobno, antispazmolitičko, ekspektorantno, antibronholitičko, karmativno, antiinflamatorno, antioskidativno, antiparazitsko, ovicidalno i larvicidno dejstvo - toksično dejstvo na odrasle insekte, jajašca i larve) (Grosso i sar., 2010) i upotrebe (npr. u kulinarstvu, za očuvanje hrane, u obradi hrane, u medicini, u kozmetičkim preparatima, u mirisima, kao nematicid (ubija biljne parazite), kao insekticid itd.) (Cosentino i sar., 1999).

Antioksidativna svojstva timijana su pripisana timolu. Među antioksidantima koji su izolovani iz timijana, pored timola, nalaze se i karvakrol, *p*-cimen, kariofilen, karvon i borneol. Antioskidativno dejstvo je značajno i sa medicinske tačke gledišta jer može sprečiti oksidativni stres ljudskog organizma, kao i u nemedicinskom kontekstu jer omogućava očuvanje hrane sprečavanjem oksidacije lipida (Stahl-Biskup i sar., 2004).

Timijan ili njegovi izolati se mogu koristiti u kulinarstvu i/ili preradi hrane kao zaseban dodatak ili u kombinaciji sa začinima, aromama ili etarskim uljima. Spisak namirnica gde se timijan koristi je veliki (pića, riba, meso, sirevi, sosovi, povrće, supe i med). Zbog svojih senzornih karakteristika, timijan se ne upotrebljava u slatkim proizvodima (Stahl-Biskup i sar., 2004).

Timijan je, sa medicinskog aspekta, veoma vredna sirovina. Može se koristiti u različitim oblicima za tretmane zdravstvenih tegoba: čaj timijana se kao antiseptik može koristiti za grgljanje i lečenje upaljenog grla, za odbranu od upornih prehlada, protiv upornog kašlja i emfizema, crevnih parazita, gastrointestinalnih problema, bronhijalnih problema i laringitisa, menstrualnih grčeva, mamurluka i kao ekspektorant. Medicinska svojstva timijana su: spazmolitik (sprečava grčenje mišića), karminativ (umiruje), emenagog (stimuliše prokrvljenost karlice i materice), laksativ, antelmitik (za izbacivanje parazitskih crva iz organizma) i stomahik (popravlja funkcije želudca i povećava apetit) (Stahl-Biskup i sar., 2004).

Etarsko ulje timijana se može koristiti i za obradu i zaštitu (konzerviranje) kože u kožarskoj industriji. Kombinacijom etarskog ulja i sintetičkog sredstva za zaštitu kože, smanjuje se količina potrebnog sintetskog konzervansa i iritirajuće dejstvo preparata na potrošače (Širvaitytė i sar., 2012).

Potreba za postojanjem sigurnog, ekološki bezbednog i efikasnijeg pesticida, dovela je do ispitivanja ekstrakata aromatičnih biljaka u svrhu zamene sintetskih pesticida, na koje veliki broj insekata brzo stiče otpornost. Ekstrakt timijana ima insekticidno dejstvo na larve crva lista pamuka, kućne muve, kućnog komarca i krompirove bube (Sajfrtova i sar., 2013).

Toksičnost

Nerazblaženo ulje timijana može izazvati iritaciju kože i iritaciju mukoze. Citotoksični efekat ekstrakata timijana, koji su dobijeni hidrodestilacijom i natkritičnom ekstrakcijom, na ćelije VERO (ćelije bubrega velikog zelenog afričkog majmuna) se javlja u koncentraciji 80 µg/mL (Mišić i sar., 2009a). Kod miševa dolazi do akutnog trovanja pri dejstvu 0,5-3,0 g ekstrakta timijana/kg, do smanjenja lokomotorne aktivnosti i usporenja disanja. Letalna doza ekstrakta timijana za pacove je 2-5 g/kg (Stahl-Biskup i sar., 2004).

FDA (USA Food and Drug Administration) odobrava upotrebu etarskog ulja timijana i timijana kao začina i aditiva u hrani za ljudsku upotrebu. Etarsko ulje timijana i začini timijan imaju GRAS status (Generally Recognized as Safe) (21 CFR 180.10 i 180.20) (Delgado i sar., 2004; Rivas i sar., 2010).

Upotreba svežeg ili osušenog timijana je ograničena zbog kratkog roka upotrebe (engl. shelf-life). Ako se čuva na odgovarajućoj temperaturi i uslovima skladištenja, rok upotrebe sveže sečenog timijana se može produžiti do četiri nedelje. Čak i jednostavno sečenje biljke stvara promene u sastavu arome (usled isparljivosti ulja i podložnosti hemijskim promenama). Kada je ulje timijana inkapsulirano, njegove aromatske komponente su zaštićene od gubitka i degradacije. Takođe, inkapsuliranjem ulja timijana može se postići kontrolisano otpuštanje izborom odgovarajućeg materijala za inkapsulaciju (Stahl-Biskup i sar., 2004).

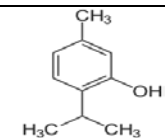
2.2. TIMOL

Timol (C₁₀H₁₄O) (Tabela 1) je prirodni lipofilni monoterpenski fenol koji je u relativno velikoj količini prisutan u etarskom ulju timijana i origana (Delago i sar., 2004; Rivas i sar.,

2010; Segvic Klaric, 2006; Sokovic i sar., 2006; Tippayatun i sar., 2007). Odgovoran je za tipično jak i oštar miris timijana (Stahl-Biskup i sar., 2004). Timol se u etarskom ulju timijana nalazi uvek sa karvakrolom, *p*-cimenom i *γ*-terpinenom, s tim što su *p*-cimen i *γ*-terpinen perkursori za nastanak timola i karvakrola (Noble i sar., 2008; Stahl-Biskup i sar., 2004).

Timol je bezbojna supstanca koja je na sobnoj temperaturi u čvrstom stanju. Slabo je rastvorljiv u vodi pri neutralnom pH, ali je veoma rastvorljiv u alkoholu i drugim organskim rastvaračima. Takođe, rastvorljiv je u veoma alkalnim vodenim rastvorima.

Tabela 1. Osobine timola (Material Safety Data Sheet- MSDS, 2012)

Ime	Struktura	M (g/mol)	T topljenja (°C)	T ključanja (°C)	Gustina (g/cm ³)
Timol (2-isopropil-5-metilfenol)		150,22	48-51	232	0,96

Upotreba timola

Timol ima raznovrsnu biološku aktivnost: antibakterijsku, antigljivičnu, antiinflamatornu, antioksidativnu, kao i antilipidna-peroksidativna svojstva (Archana i sar., 2011).

Postoji mnogo radova koji potvrđuju da timol ispoljava veoma značajnu antimikrobnu aktivnost (Tamura i Iwamoto, 2004; Wattanasatcha i sar., 2012). Njegovo antimikrobno dejstvo je potvrđeno na Gram+ i Gram- bakterijama, kao i na gljivicama koje su se pokazale kao najosetljivije na timol (Cosentino i sar., 1999). Ustanovljeno je da je timol efikasan čak i protiv stafilokoka koje su otporne na metacilin (MRSA) (Nostro i sar., 2004). Takođe, timol može smanjiti otpornost bakterija na dejstvo lekova, kao što je penicilin (Palaniappan i Holley, 2010). Fungicidno dejstvo timola na otporne gljivice, kao što je kandida, naročito je značajno (Klaric i sar., 2007).

Timol ima jako antioksidativno dejstvo. Ponaša se kao multifunkcionalni antioksidant jer ima jak afinitet prema vrstama koje sadrže aktivan kiseonik (Aeschbach i sar., 1994). Zbog takvog ponašanja, timol je značajan za tretman raznih bolesti koje nastaju kao posledica dejstva reaktivnih kiseoničkih vrsta (Kruk i sar., 2000). Timol ima jače antioksidativno dejstvo nego α -tokoferol (vitamin E) (Stahl-Biskup i sar., 2004).

Pokazano je da timol ima antimutageno dejstvo i antitumorna svojstva (Mezzouga i sar., 2007). Takođe, timol ispoljava radioprotektivni potencijal suzbijanjem sekvenci događaja koji dovode do ćelijskog oštećenja izazvanog radijacijom. Predtretmanom timolom *in vivo* mogu se sprečiti oksidativna oštećenja ćelija fibroblasta pod dejstvom radijacije i može se povećati broj preživelih ćelija hvatanjem slobodnih radikala. Takođe, dokazano je da je timol sposoban da redukuje oštećenja na DNK koja su izazvana gama zračenjem. Primena radioprotektora u medicini je neophodna u lečenju kancera jer bi se zaštitom ćelija od zračenja mogla povećati doza zračenja za uništavanje kancerogenih ćelija (Archana i sar., 2011).

Timol značajno poboljšava inflamatorne odgovore i ubrzava zarastanje rana tako što smanjuje edeme i umanjuje influks leukocita do rane (Riella i sar., 2012). Takođe, poznato je da timol utiče na kontrakciju glatkih mišića i da deluje na mikrozome i kanale membrana. Iako se loše rastvara u vodi i ima slab afinitet prema miozinu (protein mišića), njegovo dejstvo je jedinstveno jer deluje dvojako: deluje kao inhibitor i smanjuje kontraktivne sposobnosti mišićnih vlakana, ali istovremeno deluje i tako što uvećava aktivnost ATP-aza miozina (Tamura i Iwamoto, 2004).

Timol, kao repelent, obezbeđuje potpuno odbijanje komaraca *Anopheles stephensi* koji su odgovorni za prouzrokovanje malarije (Pandey i sar., 2009). Takođe, ispoljava antiparazitsko dejstvo na *Leishmania mexicana* i miticidno dejstvo (ubija grinje) (Stahl-Biskup i sar., 2004).

Kao alkoholni rastvor i puder, timol se koristi za tretman infekcija prstenastim crvima. Kao pesticid, može se koristiti za sprečavanje rasta buđi unutar kolonija pčela. Timol koji je impregniran u sojin lecitin se može koristiti u industriji hrane kao sastojak koji doprinosi zdravlju, daje ukus hrani i štiti je od oksidacije i kvarenja usled autooksidacije masti, masnih kiselina i lipida, i sprečava rast mikroorganizama. Timol se može dodati i anestheticima gde deluje kao konzervans, tečnostima za ispiranje usta gde deluje kao antiseptik, pastama za zube za smanjenje stvaranje plaka i gingivitisa. Može se upotrebiti i za eliminaciju nekih vrsta gljivičnih infekcija noktiju kod ljudi, za konzerviranje knjiga, kao dodatak cigaretama itd. (Lililolis i sar., 2009).

Toksičnost

FDA je odobrila upotrebu timola kao aditiva hrani (21 CFR 172.515). S druge strane, Komitet eksperata za začinske supstance Evropskog saveta (Committee of experts on flavoring

substances of the European council) je registrovao timol kao aromu na prehrambenoj listi. Utvrđena je gornja granica timola u hrani od 50 mg/kg, a u pićima 10 mg/kg. Timol se u prirodi brzo razgrađuje (16 dana u vodi i 5 dana u zemlji) (Klarić i sar., 2007), što ukazuje na mogućnost održivosti i niskih troškova odlaganja u industriji hrane (Falcone i sar., 2005).

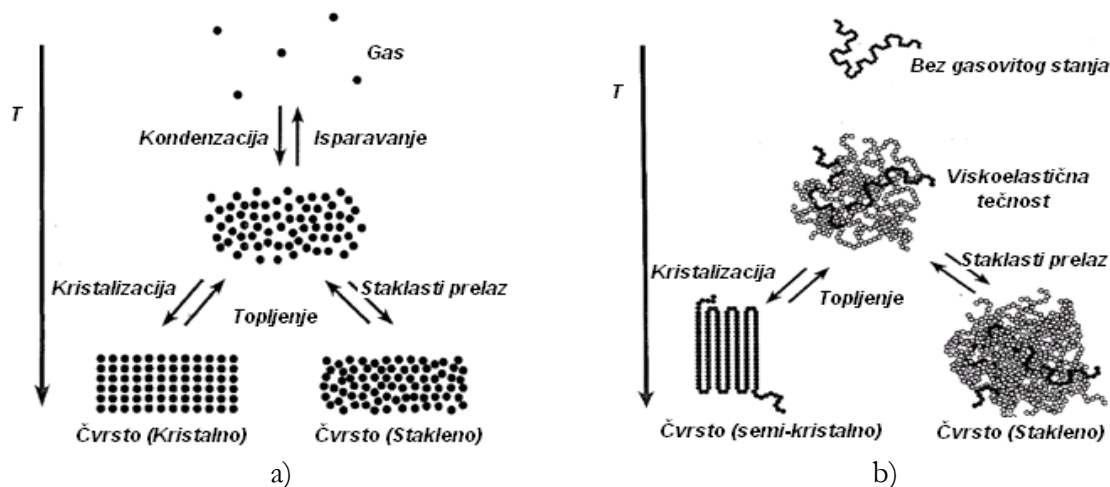
Upotreba prirodnih etarskih ulja ili njihovih komponenti kao antimikrobnih agenasa se suočava sa problemima, kao što su: laka degradacija ili hemijska reaktivnost mnogih komponenata ulja, ograničena rastvorljivost u vodi i kratko vreme bioaktivnosti usled isparavanja lako isparljivih komponenti. Iz ovih razloga prethodno je predložena hemijska modifikacija kako bi se povećala stabilnost aktivnih supstanci. Međutim, hemijska promena u strukturi prirodne komponente dovodi do toga da se ta komponenta više ne može klasifikovati u prirodne. Tako je upotreba timola, iako ima izraženo antimikrobno dejstvo, ograničena jer se, pored biološke nestabilnosti i slabe rastvorljivosti u vodi, timol loše distribuira do mesta delovanja. Zato su predložene metode koje doprinose njegovoj stabilnosti i bioaktivnosti, među kojima su i inkapsulacija i impregnacija, a kojima aktivna komponenta ostaje u nepromenjenom obliku. Ove metode smanjuju reaktivnost timola sa okolinom (voda, kiseonik, svetlost), smanjuju isparavanje, olakšavaju rukovanje, maskiraju ukus i olakšavaju rastvaranje (Wattanasatcha i sar., 2012).

2.3. POLIMERI

Reč „polimer” potiče od grčkih reči *poly* i *mer* koje znače mnogo jedinica ili delova. Osnovni pojmovi koji se javljaju u nauci o polimerima su: polimer (veliki molekul koji je sastavljen od monomernih ostataka), monomer (osnovni motiv), homopolimer (polimer u kome su svi monomeri isti), kopolimer (polimer koji je sastavljen od različitih monomera) i blenda (smeša polimera). Svi polimeri su makromolekuli u kojima su ostaci monomera povezani najčešće kovalentnim vezama. Njihova molarna masa se kreće od 10^4 - 10^7 g/mol. Polimeri mogu biti prirodni (npr. vuna, svila, celuloza, prirodna guma, elastin, DNA, drvo, kosti, zubi) ili sintetski (npr. najlon, PET- poli(etilentereftalat), silikon, poli(stiren), akrilne boje). Prema upotrebi,

moгу se klasifikovati na: plastiku (npr. polipeptidi, polistiren), vlakna (npr. vuna, svila, celuloza, najlon), elastomere (npr. elastin, prirodna guma, silikon), kompozite (drvo, kosti, zubi, staklo, ugljenična vlakna), boje (npr. akrilne boje), adhezive (npr. super lepak) itd. (Painter i Coleman, 2009).

Jedna od razlika između polimernih i nepolimernih materijala je razlika u njihovim agregatnim stanjima (Slika 1). Nepolimeri će na temperaturama iznad tačke ključanja biti u gasovitom stanju jer sile privlačenja između molekula nisu dovoljno jake da savladaju kretanje. Hlađenjem iz gasovitog stanja, na određenoj temperaturi dolazi do kondenzacije, stvaranja tečnosti, što se može pratiti i po značajnom smanjenju zapremine. Daljim hlađenjem, većina materijala kristališe sa malom promenom zapremine. Polimeri, kao npr. staklo, ponekad otežano kristališu zbog svoje neujednačene strukture. Potrebno je da prođe određeno vreme da bi se formirali veoma mali kristali koji se zovu nukleusi (inicijatori kristalizacije). Ukoliko se materijal, koji kristališe, ohladi dovoljno brzo dolazi do faznog prelaza koji se zove temperatura prelaza u staklasto stanje. Na ovoj temperaturi, materijal se kontrakovao do tačke kada molekuli postaju manje ili više zamrznuti i ne mogu se preurediti da bi formirali kristal. Materijal i dalje ima svojstva čvrstog stanja, ali raspored molekula ostaje neuređen kao u tečnom stanju (Painter i Coleman, 2009).



Slika 1. Šematski prikaz agregatnih stanja: a) nepolimeri i b) polimeri (Painter i Coleman, 2009)

Polimeri kristališu samo parcijalno u složenim lancima, a neki polimeri čak ni ne mogu da kristališu zbog ograničenja koja nameće njihova struktura. Polimerno tečno stanje ima neke

karakteristike koje se, inače, povezuju sa čvrstim stanjem. To stanje se objašnjava preplitanjem lanaca. Takođe, postoje neka stanja materije, kao što su gel ili tečni kristal, koja ne spadaju u uobičajene kategorije. Agregatno stanje koje polimeri nemaju je gasovito stanje jer su sile u polimeru takve da će se on razgraditi pre nego što rastop počne da ključa (Painter i Coleman, 2009). Da bi se objasnila agregatna stanja polimera bilo je neophodno uvesti koncept fizičkih stanja jer koncepti agregatnih i faznih stanja nisu obuhvatili sva moguća stanja polimera. Tako se polimeri mogu nalaziti u tri fizička stanja: staklastom, gumolikom (viskoelastičnom) i tečno-viskoznom (plastičnom). U gumolikom stanju, koje je karakteristično samo za polimere, individualni monomerni ostaci, grupe atoma i segmenti makromolekula podležu intenzivnom toplotnom kretanju, ali je kretanje makromolekula kao odvojene jedinice malo verovatno. U gumolikom stanju polimeri su sposobni da se pod dejstvom napona istežanja povratno izduže i do nekoliko stotina procenata. Gornja granična temperatura gumolikog stanja je temperatura tečenja (T), a donja granična temperatura je temperatura ostakljivanja (T_g) ispod koje je polimer u staklastom stanju. Pri temperaturama iznad temperature tečenja, ponašanje linearnog i umreženog polimera se razlikuje. Kod umreženih polimera, prisustvo umreženja, odnosno hemijskih veza između makromolekulskih lanaca, sprečava translaciono kretanje celih molekula pa ne dolazi do tečenja. Sa daljim povećanjem temperature, umreženi polimer će degradirati. Linearni polimer će sa povećanjem temperature iznad T_f preći u tečno stanje u kome dolazi do intenzivnog kretanja monomernih ostataka, velikih delova polimernog lanca, pa i kretanja celih makromolekula. Svojstva polimera u staklastom stanju se znatno razlikuju od onih u gumolikom stanju. U staklastom stanju polimeri su čvrsti i kruti, a u gumolikom su fleksibilni. Granica između ova dva stanja je T_g . Postoje različite definicije T_g , a najjednostavnija je da je to temperatura ispod koje je kretanje segmenata makromolekula zamrznuto. Na vrednost T_g utiče veliki broj faktora, kao što su: molarna masa, raspodela molarnih masa, molekulska struktura, fleksibilnost makromolekula, kohezijska energija i prisustvo niskomolekulskih supstanci (Jovanović i Jeremić, 2007).

Morfologija polimera može biti kristalna i amorfna. Kristalni polimeri imaju visok stepen uređenosti lanaca koji su složeni u slojevima, a kod amorfnih polimera lanci su neuređeni i isprepletani. Kod kristalnih polimera postoje već pomenuta tri fizička stanja s tim što se kod njih glavna promena dešava pri topljenju kristala (pri temperaturi topljenja- T_m) pri čemu dolazi do prelaza iz kristalnog u amorfno stanje. Pri temperaturama između T_g i T_m , kristalni polimeri

pokazuju odlična mehanička svojstva. Iako dolazi do kretanja segmenata makromolekula koji su u amorfnom stanju, ta kretanja nisu tako izražena pošto su makromolekuli fizički umreženi mnogobrojnim kristalima. Na temperaturama iznad T_m kristalni polimer prelazi u tečno stanje i ponaša se kao običan amorfni polimer. Nijedan polimer ne može biti sasvim u kristalnom stanju već je uvek jedan deo njegovih makromolekula u nesređenom amorfnom stanju tako da je većina polimera semi-kristalna (Jovanović i Jeremić, 2007).

2.3.1. Upotreba polimera

Polimeri imaju širok opseg fizičko-hemijskih karakteristika, zbog čega je i njihova upotreba veoma raznolika. Mogu se koristiti za izolaciju, kao adhezivi, nakit, lubrikanti, implantati, u proizvodnji odeće, delova automobila itd. U farmaceuticima, polimeri se mogu koristiti kao nosači aktivne supstance koji obezbeđuju kontrolisano otpuštanje. Upotreba polimera u medicinskim sredstvima, farmaceuticima, kozmetici i hrani raste zbog velikog broja mogućnosti modifikacije polimera i njihovog korišćenja. U tom smislu, najznačajnije svojstvo polimera je sposobnost biodegradacije. Biodegradabilni materijali su prirodni ili sintetski materijali koji se mogu razgraditi *in vitro* ili *in vivo*. *In vitro* biodegradacija je razgradnja materijala faktorima sredine, kao što su sunčeva svetlost, promena temperature ili aktivnost mikroba (Varian, 2012). *In vivo* biodegradacija se odvija delovanjem enzima ili neenzimski čime se dobijaju netoksični i sigurni sporedni proizvodi koji se mogu eliminisati normalnim metaboličkim putevima (Makadia i Siegel, 2011). Polimeri koji se raspadaju u prirodi su „zeleniji” u odnosu na često korišćene polimere koji nisu podložni biodegradaciji (Varian, 2012).

Lekovi i proteini su klasa farmaceutskih proizvoda čija proizvodnja brzo raste. Ipak, stabilnost i ograničenost dostavljanja proteina ili leka u određeni deo tela učinili su da postoji jako mali broj ovih proizvoda (Houchin i Topp, 2008). Korišćenje proteina zahteva oralnu upotrebu, ali je neophodno da se spreči njihova razgradnja u digestivnom traktu. Takođe, neophodno je da se smanji frekvencija uzimanja leka (Makadia i Siegel, 2011). Održanje adekvatne aktivnosti proteina ili lekova tokom njihovog skladištenja, često zahteva formulaciju proizvoda koja je u čvrstom stanju, da bi se smanjila hidrolitička razgradnja. U mnogim

slučajevima, konvencionalni farmaceutici, nakon aplikacije, obezbeđuju jako brz porast koncentracije leka (lako može dostići toksični nivo), zatim sledi relativno kratak period terapijske koncentracije, posle koga dolazi do naglog opadanja koncentracije leka (Duarte i sar., 2006). Iz navedenih razloga se javlja potreba da se lekovi i proteini smeste u nosač, kako bi se omogućilo njihovo ciljano i kontrolisano otpuštanje, čime se povećava njihova specifičnost, smanjuje toksičnost i smanjuje rizik koji je povezan sa terapijom (Houchin i Topp, 2008). Kontrolisano otpuštanje leka se dešava kada je sistem polimer-lek dizajniran tako da otpušta lek na unapred definisan način. Cilj kontrolisanog otpuštanja je da se postigne koncentracioni profil leka koji će omogućiti terapijsku koncentraciju leka tokom dužeg perioda, čime bi se sprečile velike oscilacije koncentracije leka i smanjila potreba da se lek često primenjuje (Duarte i sar., 2006). Da bi se neki polimer koristio kao nosač za kontrolisano otpuštanje leka ili proteina u organizmu, on mora dospeti do željenog tkiva (mora imati željenu biodistribuciju) (Makadia i Siegel, 2011). Takođe, potrebno je da se nakon dostavljanja leka polimer razgradi. Samo polimeri koji se u organizmu raspadaju na bezbedne proizvode, mogu se koristiti kao biološki nosači za ciljano dostavljanje leka u organizmu (Varian, 2012).

Neki od primera polimernog sistema za kontrolisano otpuštanje leka su: transdermalni sistemi, hirurški implantati i sistemi koji se umeću potkožno. Transdermalni sistemi koji mogu da dostave bioaktivnu supstancu u kožu i potkožni nivo kože su od velikog značaja u terapijskim tretmanima. Sistem koji se stavlja na ranu treba da bude biodegradabilan i biokompatibilan (Dias i Rey-Rico, 2013), da obezbedi fleksibilnost, kontrolisano prijanjanje na okolno tkivo, permeabilnost gasova i da je izdržljiv. Takođe, mora da ima kapacitet da apsorbuje fluide koji izlaze iz rane i da simultano kontroliše gubitak vode (Dias i Braga, 2011). U poređenju sa oralnim unošenjem, dostavljanje leka preko kože ima veliki broj prednosti, kao što su: zaobilaznje metabolizma jetre (nakon oralnog uzimanja leka, lek se apsorbuje digestivnim sistemom i dospeva do jetre pre nego što stigne do ostatka tela, jetra metaboliše lek i samo mali deo leka dospeva iz jetre u krvotok), održavanje konstantnog produženog dejstva sa terapijskom koncentracijom leka u krvi ili tkivu, brzo dostavljanje leka i prijetnost za pacijenta. U transdermalnim sistemima za dostavljanje leka, polimerna membrana je glavna komponenta koja se može upotrebiti da reguliše brzinu otpuštanja (Wang i sar., 2002). Izbor sistema za previjanje rane je veoma značajan jer njegova interakcija sa ranom može značajno

uticati na proces izlečenja (Dias i Rey-Rico, 2013). Interesovanje za sintezu biokompatibilnih i biodegradabilnih polimera koji se koriste u medicini se svakog dana uvećava. Ovakve vrste materijala se mogu koristiti kao implantati za pacijente kojima je potrebno nadoknaditi deo tkiva ili organa (Fanovich i Jeager, 2012). Biokompatibilnost i biodegradabilnost su ključni da bi se određeni materijal mogao koristiti za dostavljanje leka iz privremenih hirurških implanata unutar tela kako što su npr. šavovi (Varian, 2012) ili koštani implantati (Makadia i Siegel, 2011). Biodegradabilnost polimera eliminiše dalje uklanjanje implanta hirurškom intervencijom (Cabezas i sar., 2012). Ovakvi polimeri moraju biti i porozni da bi se omogućio rast ćelija okolnog tkiva. Porozna struktura ovih polimera omogućava smeštanje bioaktivnih supstanci unutar pora, čime se omogućava i kontrolisano otpuštanje leka (Fanovich i Jeager, 2012). Poslednje decenije značajni istraživački naporu su bili posvećeni razvijanju biodegradabilnih skafolda sa dobro definisanim svojstvima za kosti, tkiva i za sisteme za dostavljanje leka. Ipak, nijedan od razvijenih materijala nije uspešno ispunio sve potrebne zahteve. Utvrđeno je da idealni skafold treba da ima međusobno povezane pore, mehaničku snagu, kao i dobru interakciju sa okolnim ćelijama (Lee i sar., 2009). Pore prečnika u opsegu od 100 do 500 μm su neophodne da bi se omogućila ćelijska adhezija, proliferacija i trodimenzionalna kolonizacija. Takođe, prisustvo mikropora je neophodno zbog difuzije bioloških fluida (Fanovich i Jeager, 2012; Tai i sar., 2007). Da bi se izbeglo hirurško umetanje, biodegradabilni i biokompatibilni polimeri se mogu potkožno injektirati i na taj način koristiti za postepeno otpuštanje doze leka (Makadia i Siegel, 2011).

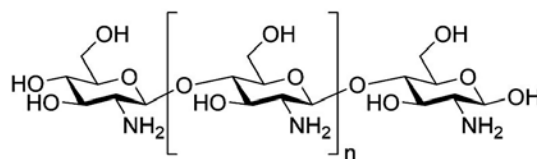
Među najčešće korišćenim polimerima u farmaceuticima, kozmetici i hrani nalaze se hitozan, skrob i celuloza.

2.3.2. Hitozan

Hitin je najrasprostranjeniji prirodni polisaharid posle celuloze i skroba. Dobija se iz prirodnih izvora, kao što su egzoskeleti insekata, ljuskara (kraba, jastoga, rakova) i nekih vrsta gljivica. Hitozan se dobija iz hitina procesom deacetilovanja (Berger i sar., 2004). Heteropolimer hitozan je linearni polisaharid sastavljen od nasumično raspoređenih

kopolimera D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina koji su povezani β -(1-4) glikozidnom vezom. Karakteristike dobijenog gela hitozana su određene vrstom hitina, stepenom deacetilovanja, kao i molekulskom masom dobijenog hitozana (Dash i sar., 2011; Garcia-Gonzales i sar., 2011).

Hitozan (Slika 2) je polikatjonski polimer koji ima jednu amino grupu i dve hidroksilne grupe u glikozidnom ostatku koji se ponavlja. Reaktivna amino grupa obezbeđuje mesto za vezivanje velikog broja funkcionalnih grupa pri blagim uslovima reakcije. Pri visokim pH vrednostima, hitozan je nerastvorljiv, dok se lako rastvara u razblaženim kiselinama (Dash i sar., 2011).



Slika 2. Struktura hitozana (Uragami i sar., 1994)

Kao sredstvo za dostavljanje lekova, hitozan se može koristiti u obliku tableta, kapsula, mikrosfera, nanočestica, perlica, filmova i gelova. Hidrogelovi hitozana su trodimenzionalne (3D) mreže polimera koji mogu da apsorbuju velike količine vode. Ovi materijali su vlažni, mekani i savitljivi. Visok sadržaj vode ih čini kompatibilnim sa većinom živih tkiva, a viskoelastična priroda gelova minimizuje oštećenje okolnog tkiva kada se ugradi u domaćina (Dash i sar., 2011). Osnovna podela hidrogelova hitozana je na fizičke i hemijske (Berger i sar., 2004). Fizički hidrogelovi hitozana se mogu dobiti taloženjem kiselog rastvora hitozana u alkalnom rastvoru. Nakon „starenja“ određeno vreme, gelovi hitozana se peru destilovanom vodom dok se ne dostigne neutralni pH. Voda unutar hidrogela se može zameniti etanolom ili acetonom, što olakšava sušenje gelova. Sušenjem se smanjuje zapremina gelova preko 60% (Garcia-Gonzales i sar., 2011). Polimerni lanci ovih hidrogelova se povezuju nekovalentnim interakcijama kao što su elektrostatičke i hidrofobne interakcije i vodonične veze. Pošto su sve ove interakcije fizičke, formiranje hidrogela je reverzibilno. Upotreba fizičkih hidrogelova ima sledeća ograničenja: teško kontrolisanje veličine pora, hemijska funkcionalizacija, rastvorljivost i degradacija (Dash i sar., 2011). Hemijski hidrogelovi se mogu dobiti iz kiselih rastvora hitozana korišćenjem umreživača (npr. mono- i dialdehida). Nakon zamene rastvarača i sušenja, dobijaju se gelovi hitozana koji imaju bolja morfološka svojstva u odnosu na fizičke gelove hitozana (Garcia-Gonzales i sar., 2011). Ovom metodom se dobijaju trajni hidrogelovi

usled kovalentnog vezivanja. Dostupne amino- i hidroksilne grupe hitozana su aktivna mesta sposobna da formiraju veliki broj veza, uključujući i amidne i estarske, kao i formiranje Šifovih baza (Dash i sar., 2011). U umreženim hidrogelovima, polimerni lanci su međusobno povezani umreživačem, što vodi stvaranju porozne mreže. Svojstva umreženog hidrogela zavise od odnosa molova umreživača i ponavljajućih jedinica hitozana. U zavisnosti od vrste umreživača, veze koje formiraju mrežu su kovalentne ili jonske. Umreživači su molekuli sa najmanje dve reaktivne funkcionalne grupe koje omogućavaju formiranje mostova između polimernih lanaca. Najčešće korišćeni umreživači su dialdehidi (npr. glioksal i glutardialdehid). Dialdehidi umrežavaju vodeni rastvor hitozana tako što aldehidne grupe umreživača formiraju kovalentne imino- veze sa amino-grupama hitozana. Veze sa OH- grupama hitozana se, takođe, ne mogu zanemariti. Mana upotrebe dialdehida je njihova toksičnost (glutardialdehid je neurootrov, a glioksal je mutagen). Iako se hidrogelovi prečišćavaju pre upotrebe, neizreagovali dialdehidi se ne mogu u potpunosti ukloniti. Iz ovih razloga istražuju se drugi umreživači npr. dietil skvarat, oksalna kiselina (toksična za pacove) ili genipin (nije citotoksičan, biokompatibilan za pacove). Ovi molekuli se umrežavaju mehanizmom koji nije u potpunosti razjašnjen (Berger i sar., 2004).

Hitozan je biokompatibilan i biodegradabilan polimer niske toksičnosti. Biokompatibilnost hitozana dozvoljava njegovu upotrebu za različite medicinske primene, npr. za površinu oka, za implantacije ili injekcije. Hitozan se smatra biodegradabilnim jer se degradira pod dejstvom ljudskim enzimima, naročito lizozomima (Berger i sar., 2004). Polimeri hitozana su semisintetički aminopolisaharidi koji imaju jedinstvenu strukturu, multidimenzionalna svojstva, veliku funkcionalnost i širok raspon primene (Dash i sar., 2011). Hitozan je biopolimer koji ima velike mogućnosti za hemijske i mehaničke modifikacije u cilju stvaranja polimera novih svojstava, funkcija i primena, naročito u biomedicini. Karakterišu ga sledeća svojstva: antimikrobna aktivnost, netoksičnost, biokompatibilnost, biodegradabilnost (Rinki i sar., 2009a; Sing i sar., 2006), veliki afinitet prema proteinima i ćelijskoj adheziji (Rinki i sar., 2009a) i antioksidativna aktivnost (Garcia-Gonzalez i sar., 2011). Ima primenu u farmaceutskoj, tekstilnoj i papirnoj industriji, u medicini, poljoprivredi i biotehnologiji, inženjerstvu tkiva i hromatografiji (Sing i sar., 2006). Biomedicinsko-farmaceutska primena gelova hitozana obuhvata: kontrolisano otpuštanje lekova, inženjerstvo tkiva (hrskavica, kosti, jetra, nervi), lečenje rana, gensku terapiju, bioimidžing i zelenu hemiju. Sredstva za kontrolisano otpuštanje,

zasnovana na hitozanu, dostavljaju proteine/peptide, faktore rasta, anti-inflamatorne lekove, antibiotike itd. Kao sredstvo u tretmanu rana, hitozan samostalno indukuje zarastanje rana i smanjuje stvaranje ožiljaka. Povećava prokrvljenost i omogućava dostavljanje oligomera u povređeno mesto, čime se povećava ugradnja kolagena u ekstracelularni matriks (Dash i sar., 2011). Uprkos velikom potencijalu hitozana u procesima sa hranom, kao aditiva ili za inkapsulaciju, njegova industrijska primena nije razvijena uglavnom zbog njegove ograničene rastvorljivosti u neutralnim i baznim rastvorima (Garcia-Gonzales i sar., 2011). Upotreba hitozana u ishrani je odobrena u Japanu, Italiji i Finskoj, a FDA je odobrila upotrebu hitozana kao sredstva u terapiji rana (Dash i sar., 2011).

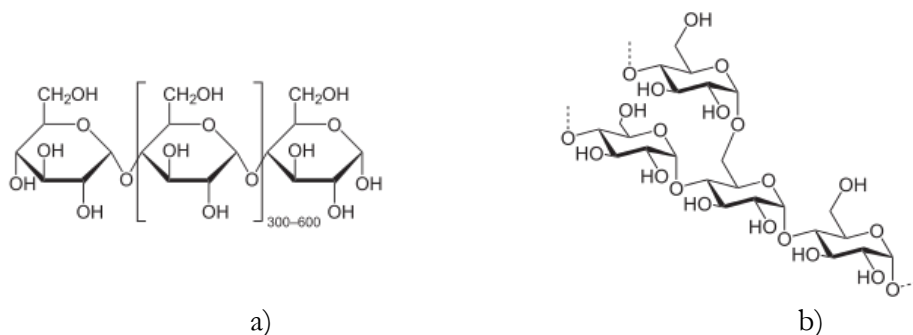
2.3.3. Skrob

Skrob je najrasprostranjeniji biopolimer na svetu posle celuloze. Služi kao esencijalni izvor energije za ishranu ljudi i životinja (Schirmer i sar., 2013). Skrob je ugljeni hidrat koji se nalazi u plodovima - zrnelju i/ili krtolama mnogih biljaka, a vrlo retko se može pronaći u stablu. Služi kao hrana biljci prilikom nicanja, za vreme dok se još ne razvijaju organi potrebni za rast i fotosintezu (Popov-Raljić, 2009). Skrob se u biljnim plodovima nalazi u obliku skrobnih zrnaca ili granula (Adejumo i sar., 2011), a smešten je u ćelijama endosperma. Prisustvo skroba je utvrđeno kod više desetina hiljada različitih biljaka, ali je samo industrijski izolovan iz oko pedeset vrsta. Kao sirovine od primarnog značaja za dobijanje skroba koriste se samo kukuruz, tapioka, pšenica i krompir, dok su sirovine od sekundarnog značaja pirinač, slatki krompir, sirak i sago (vrsta palme) (Popov-Raljić, 2009).

Skrob je prirodni polimer koji je veoma interesantan za istraživače jer je: lako dostupan u velikim količinama, jestiv, netoksičan i jeftin polisaharid koji se može naći u velikom broju biljaka. Dobra biodegradabilnost i stabilnost, kao i raznovrsnost modifikacija u procesima, čine da skrob ima veliku potencijalnu primenu kao nosač za dostavljanje leka u biomedicini (Garcia-Gonzalez i sar., 2012a) i kao skafold za zamenu tkiva (Comin i sar., 2012).

Granule skroba se razlikuju po obliku, veličini i sastavu. Karakteristike granula zavise od vrste biljke, što omogućava da se identifikuje botanički izvor skroba. Veličina granula varira od

1-100 μm (Adejumo i sar., 2011), kao i njihov oblik koji može biti amorfan, kristalan, loptast, elipsoidan, poliedarski itd. (Popov-Raljić, 2009). Skrob se sastoji od dva tipa molekula: linearne amiloze (AM) i razgranatog amilopektina (AP) (Slika 3) (Adejumo i sar., 2011) i sadrži veoma male količine proteina, lipida i minerala (Schirmer i sar., 2013). Molekuli AM i AP su međusobno povezani vodoničnim mostovima i grade radijalno orijentisane micle kristalnog karaktera. AP je odgovoran za kristalnost granula skroba, a AM za amorfnost (Adejumo i sar., 2011). Razlike među skrobovima su uslovljene: relativnim odnosom dve frakcije (AM i AP), stepenom polimerizacije AM i stepenom homogenosti, stepenom razgranatosti frakcija AP (Popov-Raljić, 2009). Odnos AM i AP u granulama skroba kao i njihova molekulska struktura utiču na rastvorljivost, temperaturu gelatinizacije, viskozitet, gelatinizaciju i retrogradaciju zbog čega predstavljaju glavni parametar kvaliteta, teksture i stabilnosti skroba i skrobnih proizvoda (Schirmer i sar., 2013).



Slika 3. Struktura molekula a) amiloze i b) amilopektina (Popov-Raljić, 2009)

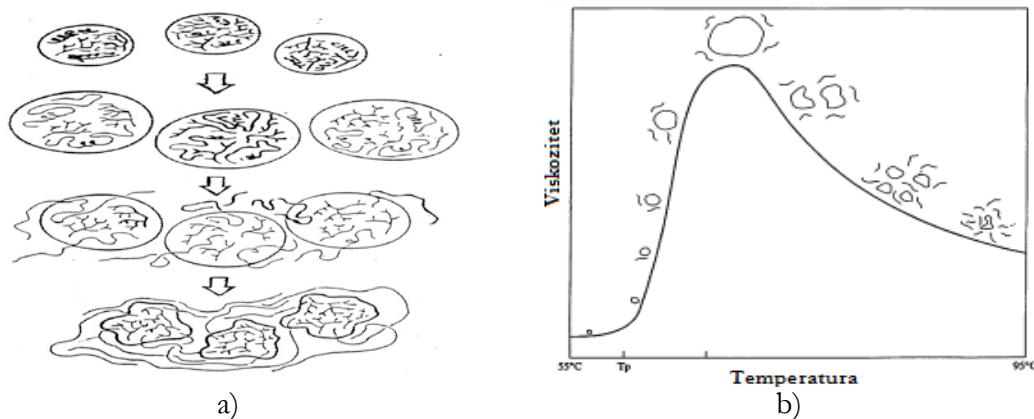
Skrob se uglavnom sastoji od 20-30% AM i 70-80 % AP (Schirmer i sar., 2013). Poznavanje porekla skroba je neophodno za dobijanje željene funkcionalnosti i jedinstvenih svojstava skrobnih gelova (Mishra i Rai, 2006). Linearna frakcija skroba služi za pravljenje prozirnih filmova koji se primenjuju u pakovanju prehrambenih proizvoda. Ovi filmovi AM u suvom stanju imaju odgovarajuću otpornost na kidanje dok su u vlažnom obliku neotporni. Višak AM u skrobovima daje jače filmove dok razgranata struktura AP daje, generalno, filmove sa drugačijim mehaničkim svojstvima kao što je manja jačinu na kidanje (Paes i sar., 2008).

Dobro je poznato da su molekulska masa, konformacija lanca, vezivanje molekula i kristalnost karakteristike koje, takođe, utiču na funkcionalna svojstva skrobnih filmova, ali je takođe i dokazano da na ova svojstva utiče i metoda pripreme (Paes i sar., 2008).

Gelatinizacija skroba je jedna od najvažnijih svojstava skroba. U najužem smislu, gelatinizacija je toplotno razaranje uređene strukture skrobnih granula, a u širem smislu uključuje i bubrenje granula i rastvaranje polisaharida (Tester i Morrison 1990). Veličine kao što su temperatura gelatinizacije (T_{gel}), viskozitet i entalpija su važni parametri. Oni mogu da odražavaju karakteristike i da imaju važnu ulogu u primeni skrobnih gelova (Peng i sar., 2007). T_{gel} skroba zavisi od vrste biljke, stepena umreženosti AP, količine prisutne vode, pH, tipa i koncentracije soli, šećera, masti i proteina kao i od primenjene tehnike proizvodnje. T_{gel} zavisi, takođe, od količine oštećenih granula skroba jer će one bubriti brže od neoštećenih granula (Jenkins i Donald, 1998). Do gelatinizacije skroba dolazi kada se skrobne granule nađu u vodi na određenoj temperaturi. Granula skroba je nerastvorna u hladnoj vodi (Peng i sar., 2007; Popov-Raljić, 2009). Iako skrobne granule bubre neznatno u hladnoj vodi (10-15% povećanje prečnika), ovakvo bubrenje je reverzibilno i granule se vraćaju na početne dimenzije nakon sušenja (Adejumo i sar., 2011). Ako se vodena suspenzija skroba zagreva iznad određene temperature, dolazi do kidanja slabijih veza u amorfnijim micelarnim regionima i granula bubri (Adejumo i sar., 2011; Popov-Raljić, 2009). Nakon apsorpcije vode u amorfnoj oblasti skroba, zagrejana voda se prenosi do kristalne oblasti. Dolazi do raskidanja intermolekularnih veza molekula skroba u prisustvu vode i toplote što vodi do vezivanja više vode. Prodor vode povećava nepravilnosti u granulama skroba i smanjuje broj i veličinu kristalnih mesta koja ne dozvoljavaju ulazak vode. Toplota omogućava da takva mesta postanu difuzna, a lanci počinju da se razdvajaju u amorfni oblik. Voda ulazi u čvrsto vezan amorfni region duple helikoidne strukture, AP bubri i dolazi do topljenja kristalne strukture. Stres izazavan ovim fenomenom bubrenja prekida strukturnu organizaciju i dozvoljava ispuštanje AM u okolnu vodu. Nakon određene granice, ovaj fenomen je nepovratan i zove se gelatinizacija. Tokom gelatinizacije, voda se ponaša kao plastifikator (Jenkins i Donald, 1998). Granule skroba su semi-kristalne što dovodi do povećanja indeksa prelamanja kada se posmatraju između ukrštenih polara. Kada granule skroba gelatiniraju, njihova struktura je narušena, a sposobnost prelamanja svetlosti je izgubljena (Adejumo i sar., 2011; Jenkins i Donald, 1998). Ako se skrobna pasta zagreva još jače, bubrenje se nastavlja, a granule sve više gube svoju prvobitnu strukturu, omogućavajući novim količinama vode da prodru u unutrašnjost. Uprkos bubrenju, većina micela ostaje netaknuta, a sistem predstavlja veoma nabubrelu i elastičnu strukturu. Tek ako se skrobna pasta zagreva na temperaturi od 120 °C i pod pritiskom, dolazi do razaranja micela i nastaje pravi

rastvor skroba. Isti efekat se može postići i određenim mehaničkim tretiranjem skroba (npr. snažnim mešanjem mikserima) ili prinudnim provođenjem skrobne paste kroz veoma fine otvore. Prilikom ovakvog tretiranja dolazi do mehaničke hidrolize skroba (Popov-Raljić, 2009).

Gelatinizacija nije trenutni fenomen, ona obuhvata nekoliko stupnjeva (Adejumo i sar., 2011) dok skrob prolazi kroz tranziciju red-nered (Jenkins i Donald, 1998): 1) granule skroba bubre upijajući vodu, 2) sa porastom temperature skrobne suspenzije, počinju da se pojavljuju pore na površini skrobnih granula, 3) neke rastvorljive komponente (prvenstveno AM) se razdvajaju i difunduju iz granula skroba, čime se stvara medijum oko granula koji se sastoji od rastvarača i AM i 4) na višim temperaturama, granule skroba se raspadaju i kristalne oblasti nestaju (Slika 4a) (Adejumo i sar., 2011; Peng i sar., 2007).



Slika 4. Uticaj temperature na: a) skrobne granule (Forte, 2011) i b) promenu viskoziteta skrobne paste (Peng i sar., 2007)

Viskozitet skrobnih pasta je pod uticajem oblika granula, sposobnosti bubrenja, umreženosti AM i AP i interakcija AM-AP. Tokom zagrevanja viskozitet brzo raste pri čemu i bubrenje granula raste. Kada se suspenzija kontinualno zagreva, zapremina granula skroba dostiže maksimum kao i viskozitet (na T_{ge}). Nakon što je dostignuta maksimalana viskoznost, ako temperatura nastavi da raste, granule će pući i potpuno se dispergovati što dovodi do naglog smanjenja viskoznosti (Slika 4b) (Adejumo i sar., 2011).

Retrogradacija je pored gelatinizacije, najvažnije svojstvo skroba koje je takođe pod uticajem frakcija AM i AP. Retrogradacija definiše reasocijaciju gelatiniziranih skrobnih molekula koja rezultuje sređenijom strukturom. Ova sređenija struktura utiče na viskoznost gelova i pasta

(Adejumo i sar., 2011). Pojava retrogradacije AM je najvažnija odlika rastvorenih linearnih molekula. Oni se zajedno prikupljaju (asociraju) pomoću vodoničnih veza koje se grade između OH- grupa susednih lanaca. Retrogradacija skroba tj. retrogradacija njegove linearne frakcije u osnovi je prenošenje vodoničnih veza (Popov-Raljić, 2009). Skrobovi će imati različito ponašanje tokom hlađenja u zavisnosti od odnosa AM-AP. Skrobnim pastama sa sadržajem AM većim od 20% viskoznost će rasti na sobnoj temperaturi. Ovo se dešava zbog reasocijacije poređanih lanaca AM. Malo povećanje viskoznosti nakon hlađenja je karakteristično za skrobne paste sa većim sadržajem AP. AP rekristališe sporije od AM i zato je neophodno par dana da bi se uočilo povećanje viskoznosti (Adejumo i sar., 2011).

Skrob zbog svojih fizičko-hemijskih svojstava ima široku primenu: prehrambena industrija (hleb, testenine...), farmaceutska industrija (Adejumo i sar., 2011; Garcia-Gonzalez i sar., 2012a; Popov-Raljić, 2009; Schirmer i sar., 2013), alkohol (pivo, viski, votka...), skrobni sirupi, skrobni šećeri, zaslađivači- polioli, vezivanje gipsa, energetska sirovina (Popov-Raljić, 2009), kozmetika, tekstilna industrija, industrija papira, adhezivi (lepila, termoplasti, poliuretani) (Comin i sar., 2012), bioetanol (Adejumo i sar., 2011) itd.

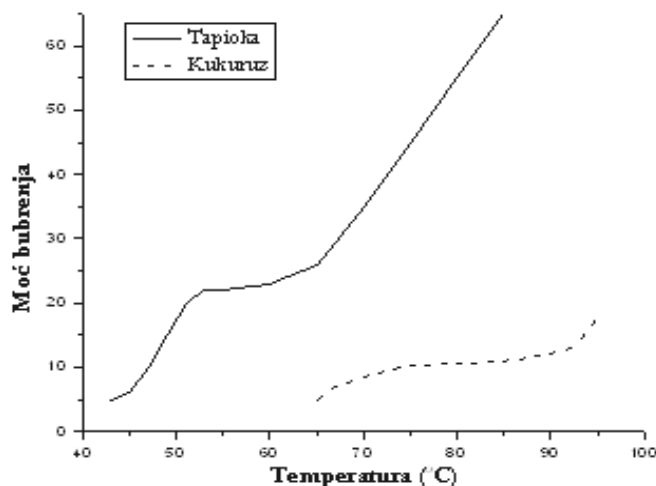
Kukuruzni i tapioka skrob

Kukuruz je poznat više od 5800 godina. Njegovo botaničko ime je *Zea mays* L. porodice Poaceae u okviru koje postoje brojni tipovi koji se međusobno razlikuju u pogledu strukture zrna. Celo zrno kukuruza sadrži oko 72% skroba (Popov-Raljić, 2009). Tapioka lat. *Manihot esculenta* je žbun drvenaste porodice Euphorbiaceae. Intenzivno se uzgaja u Južnoj Americi i Africi, a za jelo se koristi krtola. Tapioka je treći najveći izvor ugljenih hidrata za ljudsku ishranu na svetu. U različitim delovima sveta se naziva različito, pa tako nosi ime manioka u Južnoj Americi, kasava u Africi i tapioka u Indiji. Tapioka se upotrebljava u ishrani (ljudi i životinja), u medicinske i farmaceutske svrhe (vezivno sredstvo za proizvodnju lekova), kao i u industrijskoj proizvodnji (skrob, etanol, glukoza, aceton...) (Popov-Raljić, 2009). Eksploatacija kukuruznog skroba je nešto komplikovanija u odnosu na tapioku zbog potrebe da se suvi klipovi potapaju, da bi se olakšala ekstrakcija skroba, kao i zbog upotrebe sredstava za beljenje. Tapioka skrob se lako ekstrahuje pošto korenje sadrži jako malo proteina i masti i nije

potrebno dodatno beljenje dobijenog skroba. Zbog niskog sadržaja lipida, tapioka skrob nema ukus cerealijski (Moorthy, 2004). Najznačajnije karakteristike skrobnih granula kukuruza i tapioke su prikazane u Tabeli 2 (Mishra i Rai, 2006). Na Slici 5 je prikazana moć bubrenja skrobnih granula kukuruza i tapioke sa povećanjem temperature. Uočava se da tapioka skrob ima veliku moć bubrenja dok kukuruzni skrob bubri veoma slabo. Direktna posledica bubrenja skrobnih granula je promena viskoziteta skrobnih pasta. Kukuruzni skrob ima umereno izražen maksimum viskoziteta tokom zagrevanja suspenzije i slabo izraženo pucanje granula u toku kuvanja paste. On pokazuje veliku tendenciju povećanja viskoziteta tokom hlađenja paste, što je posledica veoma izražene retrogradacije njegove linearne frakcije (Popov-Raljić, 2009).

Tabela 2. Karakteristike skrobnih granula kukuruza i tapioke (Mishra i Rai, 2006)

	Tapioka skrob	Kukuruzni skrob
Veličina granula	oko 15,0 μm	oko 12,2 μm
Mikroskopski izgled granula	presečena sfera	poliedar
Stepen beline	87,0%	99,0%
Sadržaj AM	16,3%	25,6%



Slika 5. Moć bubrenja tapioka i kukuruznih granula skroba sa promenom temperature (Popov-Raljić, 2009)

T_{gel} skrobova zavisi od geografskog porekla biljke i uslova gajenja. Neki od literaturnih podataka vrednosti T_{gel} skrobova tapioke i kukuruza su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Literaturni pregled- T_{gel} i sadržaj AM kukuruznog i tapioka skroba

Kukuruzni skrob			Tapioka skrob		
T_{gel} (°C)	AM (%)	Literatura	T_{gel} (°C)	AM (%)	Literatura
70,7	29,4	Tester i Morrison, 1990	65,3	-	Jenkins i Donald, 1998
67,7	-	Jenkins i Donald, 1998	64-77	18-25	Moorthy, 2004
71	-	Peng i sar., 2007	66,2	16,3	Mishra i Rai, 2006
78,2	25,6	Mishra i Rai, 2006	70,6	18,2	Paes i sar., 2008
74,9	22,7	Schirmer i sar., 2013	70,5	17,1	Zhang i sar., 2013

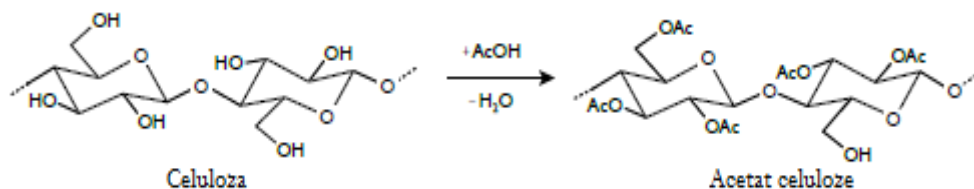
Među skrobovima koji su dobijeni iz korena biljke, tapioka poseduje najnižu T_{gel} . Takođe, tapioka skrob ima veću viskoznost u odnosu na druge korenaste skrobove i skrobove cerealijske. Na viskozitet utiče poreklo biljke, faktori prirode, brzina zagrevanja i drugih sastojaka koji su prisutni u sistemu. U zavisnosti od genetike tapioke, viskografi su pokazali različite pikove: jednostepenu gelatinizaciju sa visokim pikom viskoznosti i naglim padom viskoznosti, dvostepenu gelatinizaciju sa visokim pikom viskoznosti i sa naglim padom viskoznosti, kao i dvostepenu gelatinizaciju sa srednjom viskoznošću i srednjim padom viskoznosti (Moorthy, 2004).

U dostupnoj literaturi mogu se pronaći različite procesne metode gelatinizacije i sušenja za dobijanje skrobnih gelova. Procesni parametri (temperatura, brzina zagrevanja, vreme zagrevanja, mešanje, uslovi sušenja itd.) veoma variraju što rezultuje gelovima sa različitim fizičko-hemijskim i mehaničkim svojstvima (npr. duže vreme gelatinizacije i sporije hlađenje daje čvršće skrobne gelove sa većim stepenom kristalnosti). Još uvek ne postoji standardna metoda za pripremu skrobnih gelova za dobijanje filma željene funkcionalnosti.

2.3.4. Acetat celuloze

Osnovni sirovi materijal koji se koristi za pravljenje acetata celuloze (AC) je prečišćena celuloza dobijena iz biljne sirovine (GAMA, 2014). Celuloza je najrasprostranjenija materija u biljnom svetu. Najbogatiji je izvor ugljenih hidrata. Ima različite uloge u životu biljaka (najvažniji sastojak ćelijskih zidova) i metabolički je neaktivan ugljeni hidrat (Popov-Raljić,

2009). Da bi se dobio polimer AC, homopolimer celuloza se modifikuje sirćetnom kiselinom ili anhidridom sirćetne kiseline (Slika 6) u prisustvu sumporne kiseline (Fischer i sar., 2008; GAMA, 2014; Hofman i sar., 1929).



Slika 6. Struktura acetat celuloze (GAMA, 2014)

AC je najstabilniji derivat celuloze na normalnim uslovima starenja jer uzorci zadržavaju početne osobine tokom skladištenja oko 25 godina (Evans i sar., 1949). AC je rastvorljiv samo u nekoliko organskih rastvarača, kao što su aceton, smeša hloroforma i etanola (Hofman i sar., 1929) i sirćetna kiselina ako je stepen supstitucije veći od 0,8 (Fischer i sar., 2008).

Jedinstvene karakteristike AC omogućavaju širok raspon upotrebe: tekstil, filmovi, filteri, materijali za separacione tehnologije (tečna filtracija i osmoza), materijali za pakovanje i plastika. Od AC se mogu proizvesti materijali sa izgledom nalik svili, koji se mogu lako uklapati sa vlaknima ostalih materijala. Takvi materijali su mekani, hlade u dodiru sa kožom, prirodno imaju veliku sposobnost apsorpcije, propustljivi su za vazduh i smanjuju statičko slepljivanje. Uz upotrebu aditiva, fizička svojstva filmova AC mogu biti modifikovana za različite upotrebe. Filmovi od AC su odličan izbor zbog odlične providnosti, propustljivosti vlage, otpornosti na habanje i lakoće sečenja. Primeri krajnje upotrebe su: providne trake, kartoni, omotači za papire i knjige, sportske naočare, materijal za pakovanje tople hrane, proizvodi za ličnu negu, za proizvodnju LCD ekrana. Velika primena AC je za filtraciju duvanskog dima zbog dobrih filtracionih svojstava. Takođe, ima dobar biodegradabilni profil, što je značajno u slučaju da filteri završe u prirodi. Membrane koje su napravljene od AC imaju izuzetnu obradivost, razumnu otpornost na degradaciju hlorom i u nekim slučajevima bolji fluks u poređenju sa ostalim materijalima. Pored upotrebe u membranskim filterima u laboratorijama, AC filteri se koriste i za desalinaciju morske vode, prečišćavanje vode za piće, tretmane otpadnih voda, koncentraciju voćnih sokova i kod veštačkih bubrega. Smeše AC sa omekšivačima i aditivima

rezultuju formiranjem granula ili listova koji se koriste za proizvodnju plastičnih masa koje se procesiraju ekstruzijom, presovanjem i sečenjem. Tipični proizvodi su drške šrafcižera, četkice za zube, ukrasi za kosu, okviri za naočare, zaštitne naočari i električna izolacija. AC doprinosi da plastika ima određene karakteristike kao što su: odsustvo mirisa i ukusa, netoksičnost, hipoalergenost, providnost, svojstvo električne izolacije, otpornost na ulje i otpornost na atmosferske uslove. Neke od specijalnih primena AC su: medicinska sredstva za rane, higijenski proizvodi i specijalizovani papiri (GAMA, 2014). Estri celuloze imaju vitalnu ulogu u razvoju modernih tehnologija za proizvodnju sistema za dostavljanje lekova zbog njihove niske toksičnosti, endogenih i/ili dijetalnih proizvoda raspada, stabilnosti, velike propustljivosti vode, visoke T_g , jačine filmova, kompatibilnosti sa velikim brojem aktivnih komponenti i mogućnosti da formiraju mikro- i nanočestice (Fischer i sar., 2008).

AC ima veliki broj značajnih svojstava za prirodnu sredinu: pravi se od prirodnih i obnovljivih materijala i lako se razgrađuje različitim mehanizmima (biodegradacija, fotodegradacija, hemijska degradacija, dezintegracija) (GAMA, 2014).

2.3.5. Pamučna gaza

Transdermalni sistemi koji imaju sposobnost dostavljanja bioaktivne supstance preko kože imaju veliku primenu u terapijskim tretmanima. Takav sistem treba da bude fleksibilan, da kontrolisano prijanja uz tkivo, da može da propušta gasove i da može da adsorbuje tečnost koja izlazi iz povređene površine tela kontrolišući gubitak vode (Dias i sar., 2011). Izbor nosača bioaktivne supstance za transdermalnu primenu je veoma važan jer interakcija nosača sa ranom može značajno uticati na proces lečenja. Zbog toga, prirodni, biodegradabilni i biokompatibilni materijali dobijaju sve veći značaj (Dias i sar., 2013). Jedno od sredstava koje ispunjava ove zahteve je pamučna gaza. Pamučna gaza je u standardnoj upotrebi za negu i zbrinjavanje hroničnih rana, naročito onih koje su izrazito eksudativne i zahtevaju čestu promenu zavojnog materijala.

Gaza je pamučna tkanina (pamuk se sastoji od 88,0-96,5% α -celuloze). Pamučna vlakna su u upotrebi više hiljada godina jer pamuk ima prirodnu mekoću, veliku higroskopnost i sposobnost da apsorbuje različite fluide kao i sposobnost da zadržava toplotu (Katayama i sar.,

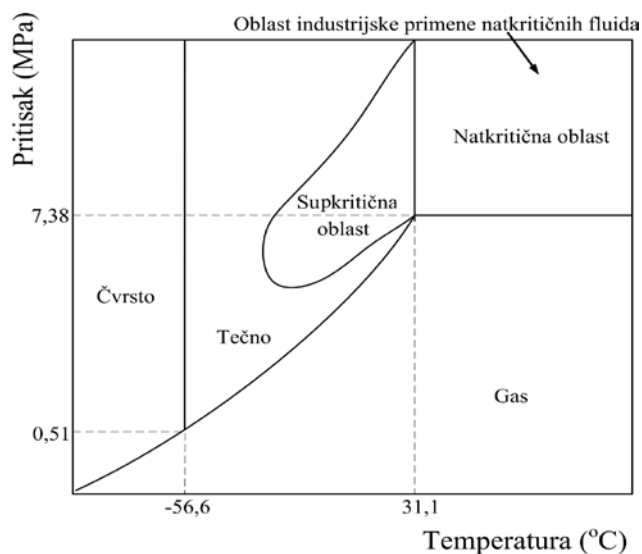
2012). Pošto sama gaza ne obezbeđuje vlaženje rana, kao ni antimikrobno delovanje na inficirane rane, poslednjih godina dostupni su podaci o razvoju modifikovanih gaza za previjanje rana sa hidrokolidima, hidroaktivnim alginatima, kolagenom, hidrogelovima polimera (Edwards i sar., 2001) i titan(IV)-oksidom (Katayama i sar., 2012).

2.4. NATKRITIČNI FLUIDI

Natkritični fluidi su fluidi koji se nalaze na temperaturi i pritisku iznad kritičnih vrednosti pritiska i temperature za dati fluid (iznad tzv. kritične tačke). U natkritičnim uslovima postoji samo jedna tzv. natkritična faza u kojoj se fluid nalazi u stanju ugušćenog gasa. Iznad kritične tačke, daljim povećanjem temperature, dato jedinjenje se ne može prevesti u gas, niti se daljim povećanjem pritiska može prevesti u tečnost.

Natkritične fluide je 1822. otkrio baron Charles Cagniard de la Tour prilikom izvođenja eksperimenta sa različitim zagrejanim fluidima i topovskim đuletom u zatvorenoj topovskoj cevi. Natkritični fluidi se mogu pronaći i u prirodi (npr. natkritična voda se formira u podvodnim vulkanima usled velikog hidrostatičkog pritiska i visokih temperatura vulkanske erupcije) (Knez i sar., 2014).

Natkritični fluidi, koji se najčešće primenjuju su: ugljenik(IV)-oksid (CO_2), voda, freon, azot, azot(II)-oksid, amonijak, eten, metan, etan, propan, propen, metilamin itd. Najširu primenu ima CO_2 zbog svojih optimalnih svojstava: netoksičan je, nezapaljiv, hemijski inertan, ima veliku čistoću, jeftin je, lako dostupan iz velikog broja izvora i ima povoljne kritične parametre. Na Slici 7. je prikazan fazni dijagram za CO_2 na kome se mogu uočiti trojna tačka ($-56,6\text{ }^\circ\text{C}$ i $0,51\text{ MPa}$) i kritična tačka ($31,1\text{ }^\circ\text{C}$ i $7,38\text{ MPa}$). U trojnoj tački čvrsta, tečna i gasovita faza su u ravnoteži. Iznad kritične tačke se nalazi natkritična oblast u kojoj je CO_2 u natkritičnom stanju. U oblasti iznad trojne tačke i ispod kritične tačke, CO_2 može postojati i kao bezbojna tečnost u tzv. supkritičnoj oblasti.

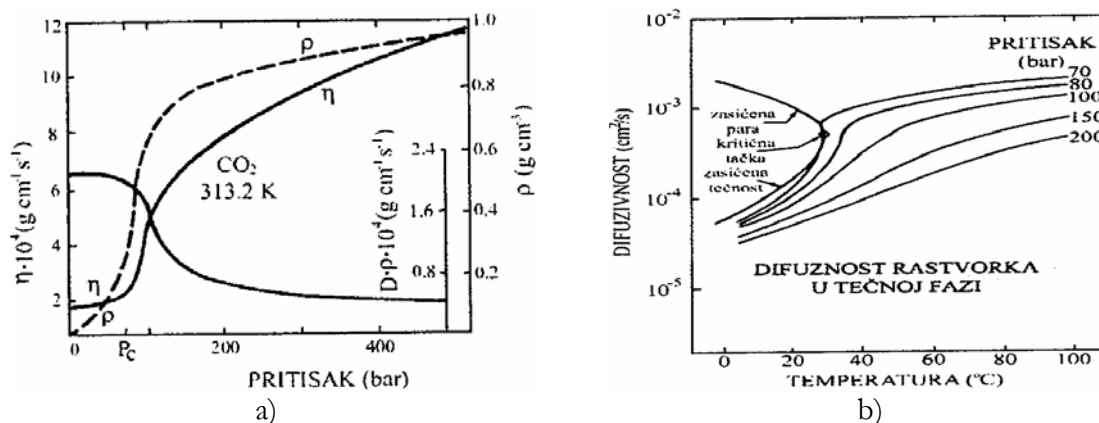
Slika 7. Fazni dijagram (pritisak-temperatura) za CO₂

Vrednosti gustine, viskoznosti i difuzivnosti fluida u natkritičnom stanju nalaze se između vrednosti ovih veličina za gasove i tečnosti (Tabela 4). Natkritični fluidi imaju veliku gustinu, blisku tečnosti, što pozitivno utiče na njihovu moć rastvaranja. Vrednosti difuzivnosti i viskoznosti natkritičnih fluida su slične vrednostima difuzivnosti i viskoznosti gasova, što olakšava njihovo prodiranje u poroznu strukturu čvrstog materijala (polimer, biljka) i dovodi do značajnog povećanja brzine ekstrakcije/impregnacije i lakog razdvajanja faza u poređenju sa ekstrakcijom/impregnacijom organskim rastvaračima (Brunner, 1987; Sparks i sar., 2008). Ova svojstva čine natkritične fluide idealnim rastvaračima za procese ekstrakcije/impregnacije.

Tabela 4. Vrednosti nekih fizičkih parametara fluida u različitim stanjima (Brunner, 2005)

		Gustina (kg/m³)	Difuzivnost (cm²/s)·10⁵	Viskoznost (g/cm s) · 10⁴
Gas	P=101,3 KPa T=15-30 °C	0,6-2,0	10000-40000	0,6-2,0
Natkritični fluid	P=P _c , T=T _c	200-500	70	1,0-3,0
	P=4P _c , T=T _c	400-900	20	3,0-9,0
Tečnost	P=101,3 KPa T=15-30 °C	600-1600	0,2-2,0	20-300

Karakteristične promene vrednosti gustine, difuzivnosti i viskoznosti natkritičnih fluida sa promenom pritiska i temperature se mogu videti na Slici 8 na primeru CO₂.



Slika 8. Fizičko-hemijske karakteristike CO₂: a) viskoznost, gustina i difuzivnost i b) difuzivnost (Brunner 2005)

Još jedna od prednosti upotrebe natkritičnih fluida se ogleda u širokom opsegu izbora procesnih parametara. Odabirom uslova (pritiska i temperatura) ekstrakcije/impregnacije može se uticati na sam proizvod. Sama separacija CO₂ od rastvorka se jednostavno može izvesti promenom temperature i pritiska. Kao što se sa Slike 8. može videti, u oblasti neposredno iznad kritične tačke, relativno male promene pritiska ili temperature, dovode do značajnih promena gustine fluida.

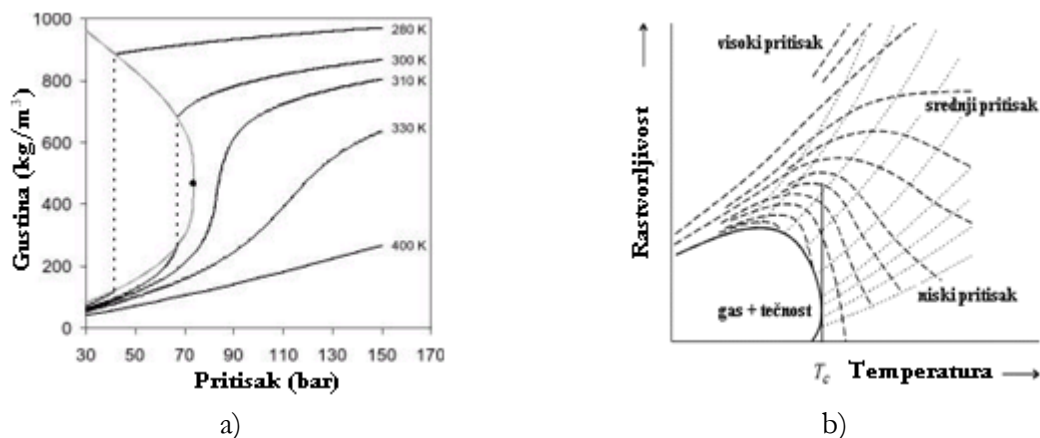
Već više od 75 godina naučnici i inženjeri su svesni da natkritični fluidi imaju potencijal za razvoj novih procesa. Od osamdesetih godina prošlog veka natkritični fluidi se istražuju ili primenjuju kao rastvarači za preradu hrane, nutraceutika, polimernih materijala, kao reakcioni medijum za procese polimerizacije, kao ekološki poželjniji rastvarač za oblaganje, formiranje pudera, impregnaciju, inkapsulaciju, čišćenje, rast kristala, taloženje i kao sredstvo za mešanje i/ili spajanje kristalnih ili viskoznih materijala (Shen i sar., 2008).

Natkritični fluidi se mogu upotrebljavati u velikom broju procesa među kojima su i: natkritično sušenje, natkritična ekstrakcija, natkritična impregnacija i brojni procesi generisanja čestica. Ovi procesi su mogući zbog izražene sposobnosti natkritičnih fluida da rastvaraju veliki broj supstanci i difunduju kroz veliki broj materijala.

2.4.1. Sposobnost rastvaranja natkritičnih fluida

Efikasnost procesa u natkritičnim uslovima zavisi od faznog ponašanja rastvorak-natkritični fluid kao, i od karakteristika procesa prenosa mase. Kako bi se u potpunosti iskoristio potencijal natkritičnog fluida, neophodno je poznavati rastvorljivost rastvorka u natkritičnom fluidu (Shen i sar., 2008). Poznavanje podataka o rastvorljivosti kosolventa i/ili aktivne komponente u natkritičnom fluidu je neophodno da bi se utvrdili optimalni procesni uslovi za projektovanje procesa (Adachi i Lu, 1983; Sovova i Jež, 1994), kako bi procesi sušenja, ekstrakcije ili impregnacije bili efikasni. Naučnici koji su prvi objavili da natkritični fluidi imaju sposobnost rastvaranja bili su Hannay i Hogarth (Hannay i Hogarth, 1879) koji su uočili da metalni halogenidi postaju rastvorljivi u natkritičnom tetrahloretanu i metanolu. Iako je ova informacija poznata već više od jednog veka, čak i danas su podaci o rastvorljivosti mnogih komponenata u natkritičnom fluidu oskudni ili ne postoje.

Natkritični fluidi imaju svojstva koja mogu da se podešavaju promenom temperature, pritiska ili promenom sastava fluida (Kiran i Balkan, 1994). Svojstva natkritičnih fluida na datim uslovima određuju rastvorljivost komponenata u sistemu. Na Slici 9a. se može videti promena gustine CO₂ po Benderovoj jednačini. Sa porastom temperature u natkritičnoj oblasti, gustina rastvarača znatno opada, pa je realno očekivati i smanjenje rastvorljivosti rastvorka. Međutim, na visokim temperaturama, porast napona pare rastvorka može imati veći uticaj na njegovu rastvorljivost od smanjenja gustine rastvarača, pa može doći i do porasta rastvorljivosti sa porastom temperature (Brunner, 2005). Koncentracija rastvorka pod natkritičnim uslovima može biti 10⁵, pa čak i do 10¹² puta veća u odnosu na idealnu rastvorljivost koja se očekuje na osnovu napona pare rastvorka (Adachi i Lu, 1983). Varijacije rastvorljivosti rastvorka sa promenom pritiska i temperature su veoma velike kako za tečne tako i za čvrste rastvorke. Na Slici 9b. se može videti čest oblik zavisnosti rastvorljivosti slabo isparljivih jedinjenja (tečnosti i čvrstih supstanci) od temperature i pritiska u supkritičnom ($T < T_c$) ili natkritičnom fluidu ($T > T_c$). Na datom dijagramu, izobare su označene isprekidanim linijama, dok su tačkastim linijama označena stanja jednake gustine fluida (Brunner, 2005).



Slika 9. a) Promena gustine CO₂ (Marr i Gamse, 2000) i b) Promena rastvorljivosti slabo isparljivih jedinjenja (Brunner, 2005)

Eksperimentalna merenja rastvorljivosti su neophodna za optimizovanje procesnih parametara, kao što su: pritisak, temperatura, vreme i protok rastvarača. Metode za eksperimentalno određivanje rastvorljivosti se mogu svrstati u tri kategorije: statičke, dinamičke i hromatografske metode. U statičkim metodama komponenta koja se ispituje i natkritični fluid su smešteni u zatvorenu ćeliju (sud) kao šarža. Moguće je koristiti mešalicu koja omogućava konvekciju fluida unutar suda. U dinamičke metode spadaju recirkulacione, protočne i saturacione metode. Recirkulacione metode su slične statičkim s tim što sistem poseduje spoljašnju recirkulacionu petlju koja pomaže ubrzanju uspostavljanje ravnoteže. Protočne metode imaju cirkulaciju svih komponenti unutar i izvan sistema. U saturacionim metodama, inicijalna količina rastvorka se smešta u ćeliju. Zatim, rastvarač prolazi kontinualno kroz ćeliju. Obezbeđivanjem adekvatnog kontaktnog vremena omogućava se da je faza koja napušta ćeliju zasićena rastvorkom. Hromatografske metode koriste natkritični fluid kao mobilnu fazu. Rastvorak se ubrizgava neposredno pre kolone. Metoda se zasniva na vezi između retencionog vremena i rastvorljivosti rastvorka u fluidu. Saturacione metode su najjednostavnije i najčešće korišćene metode za određivanje rastvorljivosti čvrstih rastvoraka. Za tečne rastvorke, statičke metode su dominantne (Knox i sar., 2005).

Direktna eksperimentalna merenja na visokim pritiscima zahtevaju puno vremena i skupu opremu. Željeno smanjenje broja eksperimenata se može postići uvođenjem metoda korelacije i predviđanja. Postoje dva pristupa u literaturi koja su primenjena na problem predstavljanja i

predviđanja podataka rastvorljivosti na visokim pritiscima: 1) upotreba izraza koji direktno povezuje koncentraciju rastvorka sa gustinom natkritičnog rastvarača i 2) upotreba jednačina stanja (Adachi i Lu, 1983; Sovova, 2000). Modeli jednačina stanja zahtevaju poznavanje fizičkih svojstava (za kubne jednačine stanja su potrebni makroskopska kritična svojstva i pritisak sublimacije) koji su dobijeni procenom na osnovu metoda doprinosa grupa, što dovodi do velikih grešaka. Sa druge strane, semi-empirijske jednačine, kao što su modeli zasnovani na gustini, zahtevaju poznavanje samo dostupnih nezavisnih promenljivih, kao što su pritisak, temperatura i gustina čistog natkritičnog fluida. One se zasnivaju na jednostavnoj minimizaciji greške (Asiabi i sar., 2013).

2.4.2. Natkritično sušenje

Natkritično sušenje podrazumeva uklanjanje tečnog rastvarača iz čvrste supstance pomoću natkritičnog fluida. Natkritično sušenje gelova uz pomoć CO₂ obuhvata prenos mase nkCO₂ i rastvarača gela u dva pravca (do i od pora vlažnog gela). Sušenje počinje pod uticajem visoke rastvorljivosti nkCO₂ u tečnom rastvaraču gela, što vodi do ekspanzije tečne faze i curenja viška tečnosti iz gela. Zatim, sadržaj CO₂ u porama gela raste sa vremenom dok se ne postignu natkritični uslovi za smešu CO₂-rastvarač. Na kraju, prisustvo natkritičnog fluida u porama bez tečne faze vodi do odsustva površinskog napona, čime se izbegava fenomen kolapsa pora gela.

Natkritično sušenje može biti klasifikovano na dva načina u zavisnosti od kontaktnog režima između gela i natkritičnog fluida: 1) sušenje gela sa kontinualnim protokom nkCO₂ kroz postrojenje (*dinamično natkritično sušenje*) i 2) sušenje gela pomoću nkCO₂ u šarži (*statičko natkritično sušenje*) (Garcia-Gonzalez i sar., 2011).

Tehnologija natkritičnog sušenja se može koristiti za sušenje vlažnih gelova i dobijanje aerogelova. Aerogelovi su laki materijali sa velikom specifičnom površinom i otvorenim porama koje su pogodne za punjenje aktivnim supstancama. Korišćenjem tehnologije natkritičnog sušenja se izbegava fenomen kolapsa pora i zadržava netaknuta porozna tekstura vlažnog materijala (Garcia-Gonzalez i sar., 2011).

2.4.3. Natkritična ekstrakcija

Postoje razne metode za dobijanje izolata biljaka, kao što su: ekstrakcija organskim rastvaračima, ekstrakcija uz primenu ultrazvuka, destilacija vodom i vodenom parom itd. Destilacija vodom i vodenom parom izlaže biljni materijal visokim temperaturama, što vodi do razgradnje termolabilnih i lako isparljivih komponenata, dok ekstrakcija organskim rastvaračima daje ekstrakt koji u sebi sadrži tragove rastvarača. Natkritična ekstrakcija (NKE) je alternativna tehnika ekstrakcije iz biljnog materijala čija je primena u porastu u poslednje tri decenije. Natkritična ekstrakcija se zasniva na rastvorljivosti datih jedinjenja (rastvorka) u ugušćenom fluidu koja se menja u zavisnosti od pritiska i temperature. Ekstrakcija sa nkCO_2 se pokazala kao pogodna metoda za izolovanje jedinjenja srednjih molarnih masa i relativno male polarnosti iz biljnog materijala. Na normalnim uslovima ($25\text{ }^\circ\text{C}$ i $0,1\text{ MPa}$) rastvorljivost ovih jedinjenja u gasu je zanemarljiva i direktno povezana sa njihovim naponom pare. Međutim, u natkritičnom fluidu, rastvorljivost datih komponenata je za deset redova veličine veća od rastvorljivosti u gasu na istoj temperaturi (Zhao i sar., 2010).

NkCO_2 je odličan lipofilni rastvarač pa se naširoko upotrebljava za ekstrakciju ukusnih i mirisnih komponenti (Reverchon, 1997a). NkCO_2 rastvara nepolarne supstance, dok je njegov afinitet prema polarnim supstancama slab. U praksi se često koriste smeše nkCO_2 i drugih rastvarača (kosolvenata) u cilju poboljšanja njegove moći rastvaranja polarnih supstanci. Obično se koristi tečni kosolvent (npr. etanol) koji se u malim količinama dodaje u nkCO_2 . Sa druge strane, povećana moć rastvaranja ima za posledicu smanjenje selektivnosti nkCO_2 (Cavero i sar., 2006). Pored toga, kosolventi su tečni na atmosferskom pritisku i u fazi separacije se izdvajaju zajedno sa željenim supstancama, tako da je potrebno izvesti i dodatnu operaciju razdvajanja kosolvenata i finalnog ekstrakta (Reverchon i De Marco, 2006). Prednost upotrebe nkCO_2 u odnosu na tečne rastvarače je njegova selektivnost ili moć rastvaranja koja se može podešavati od vrednost sličnih gasu do vrednosti koje imaju tečnosti. U procesima izolacije biološki aktivnih ekstrakata ili pojedinih komponenti iz biljnog materijala najčešće se koriste supkritični i nkCO_2 . CO_2 ima najčešću primenu u procesima NKE zato što je nereaktivan, netoksičan, nezapaljiv i stabilan rastvarač, bez boje, ukusa i mirisa, lako dostupan i jeftin, čist, potpuno neškodljiv po čovekovo zdravlje i životnu sredinu i može se reciklirati.

Relativno niske vrednosti kritičnih parametara CO₂ ($P_c=7,38$ MPa i $T_c=31,1$ °C) omogućavaju ekstrakciju na niskim pritiscima i temperaturama, čime se sprečava razgradnja termolabilnih komponenti u ekstraktu (Reverchon, 1997a). Podešavanjem procesnih parametara (pritiska, temperature) omogućava se lako, brzo i potpuno razdvajanje rastvarača od rastvorka. Na taj način se dobijaju ekstrakti koji ne sadrže tragove rastvarača, što ih čini posebno pogodnim za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Zamenom organskih rastvarača sa nkCO₂, koji se lako regeneriše u procesu, eliminisani su problemi i troškovi vezani za odlaganje i tretman velikih količina toksičnih organskih rastvarača. Tehnologijama koje se zasnivaju na primeni natkritičnih fluida dobijaju se proizvodi sa izuzetnim karakteristikama u pogledu kvaliteta. Takođe, operativni troškovi su znatno niži u poređenju sa konvencionalnim procesima koji zahtevaju velike količine energije za uparavanje organskog rastvarača ili vode. S druge strane, potrebna su veća ulaganja u poređenju sa procesima koji se izvode na niskim pritiscima.

Optimizacija procesa NKE podrazumeva izbor procesnih parametara u cilju izolacije najveće količine ekstrakta željenog kvaliteta (željenih fizičko-hemijskih karakteristika i biološke aktivnosti) uz minimalnu potrošnju natkritičnog fluida i energije. Opšte pravilo je da veći pritisak znači i veću gustinu nkCO₂, tj. veću moć rastvaranja, ali u većini slučajeva i smanjenu selektivnost. U blizini kritične tačke, sa porastom temperature gustina rastvarača znatno opada, što dovodi do smanjenja rastvorljivosti rastvorka. Međutim, na visokim temperaturama, porast napona pare rastvorka može da ima veći uticaj na njegovu rastvorljivost od smanjenja gustine rastvarača, pa u nekim slučajevima može doći do porasta rastvorljivosti sa porastom temperature. Na osnovu literaturnih podataka o rastvorljivosti etarskih ulja i selektivnosti nkCO₂ u odnosu na terpeniska jedinjenja, optimalni opseg pritisaka i temperatura za izolaciju etarskih ulja je 10-15 MPa i 40-60 °C (Reverchon i sar., 1997b). Povećanjem pritiska povećava se viskoznost i smanjuje difuzivnost natkritičnih fluida. Na izuzetno visokim pritiscima, povećanje temperature može dovesti do smanjenja prinosa ekstrakta usled smanjenja gustine fluida i moći rastvaranja fluida.

Više autora je ispitivalo proces NKE različitih vrsta timijana na različitim uslovima, kao i sastav dobijenih ekstrakata, a neki od relevantnih rezultata su predstavljeni u Tabeli 5. Uočava

se da poreklo biljke i izbor operativnih uslova imaju veliki uticaj na prinos i kvalitet dobijenih ekstrakata (prateći ciljanu komponentu - timol). NKE na pritiscima 8-40 MPa i temperaturama 40-50 °C su rezultovale prinosom 0,17-4,67% ekstrakta timijana sa sadržajem timola 0-77,08% (Tabela 5).

Tabela 5. Literaturni pregled- NKE timijana (*T. vulgaris*)

Literatura	Poreklo timijana	P (MPa)/T (°C)/t (h)	Prinos (%)	Timol (mas%)
Zeković i sar., 2000	Srbija	8 / 40 / 2,5	0,17	23,73
		10 / 40 / 2,5	0,78	37,29
		15 / 40 / 2,5	0,83	26,00
De Melo i sar, 2000	Italija	20 / 40 / 3	1,53	14,69
		20 / 40 / 4	1,72	6,81
Diaz-Maroto i sar., 2005	Španija	12 / 40 / 0,4	-	60,91
Žižović i sar., 2009	Južni Balkan	11,5 / 40 / -	1,23	-
Grosso i sar., 2010	Španija	9 / 40 / -	0,8	39,7
		9 / 50 / -	0,4	19,5
		10 / 40 / -	1,1	40,8
Garcia-Risco i sar., 2011	Španija	15 / 50 / >4	3,31	57,46
		30 / 50 / >4	4,14	77,08
		40 / 50 / >4	4,67	74,08
Ivanović i sar., 2011	Srbija	10 / 40 / 5	1,15	42,52
Ivanović i sar., 2012	Južni Balkan	11,5 / 40 / -	1,23	39,7
Petrović i sar., 2012	Srbija	11 / 40 / -	1,15	-
Sajfrtova i sar., 2013	Češka	28 / 50 / 8,3	3,5	0,05
		12 / 50 / 8,3	1,5	0

2.4.4. Dobijanje poroznih polimernih materijala primenom natkritičnih fluida

Veliki broj metoda je razvijen za proizvodnju trodimenzionalnih polimernih skafolda sa međusobno povezanim porama. Među ovim tehnikama, istakla se metoda stvaranja polimernih pena pomoću nkCO_2 , koji je značajan alternativni čist rastvarač, za dobijanje poroznih struktura bez zaostalog rastvarača i proizvodnju biodegradabilnih i biokompatibilnih polimera u farmaciji i medicini (Fanovich i Jeager, 2012). Dodatak male količine komprimovanog CO_2 polimeru može rezultovati u značajnoj promeni fizičkih svojstava polimera (uključujući i viskozitet, permeabilnost, površinski napon i T_g). NkCO_2 može delovati i kao plastifikator i

dovesti do bubrenja pojedinih polimera (Zhang i sar., 1997). Rastvorljivost CO₂ u polimerima, gustina nukleacije i brzina kojom CO₂ difunduje kroz polimer, zavise od procesnih parametara: temperature, pritiska i brzine dekompresije, što znači da se struktura polimerne pene može kontrolisati jednostavnom manipulacijom ovih procesnih parametara (Tai i sar., 2007). Proces dobijanja polimernih pena se može svesti na tri jednostavna koraka: 1) smeštanje polimera u sud za visoke pritiske i uvođenje nkCO₂, 2) kompresija određeno vreme na željenom pritisku i temperaturi i 3) dekompresija. Pene skafolda se dobijaju oslobađanjem CO₂ iz plastičnog polimernog rastopa. Proces formiranja skafolda zahteva simultanu promenu faza CO₂ i polimera, što rezultuje brzom ekspanzijom površine i dovodi do promena u reološkim svojstvima polimera (Tai i sar., 2007). Ključni parametri za kontrolisanje razvijanja pora su koncentracija CO₂ u polimeru i količina oslobođenog CO₂ iz polimera u jedinici vremena (Stafford i sar., 1999). Ovi parametri su u bliskoj vezi sa rastvorljivošću CO₂ u polimerima, koja zavisi od strukture polimera (moguće interakcije između CO₂ i molekulskih lanaca) i morfologije polimera (da li je kristalna ili amorfna) (Davies i sar., 2008). CO₂ ima mnogo manju rastvorljivost u semi-kristaliničnim polimerima u odnosu na amorfne polimere zbog efekta slobodne zapremine (Shieh i sar., 1996a,b). Takođe, polimeri sa etarskom grupom imaju mnogo jače interakcije sa CO₂ nego polimeri sa poliestarskim grupama. Afinitet CO₂ prema polimerima se javlja zbog interakcija CO₂ molekula sa karbonil grupom na polimernim lancima. Tokom ekspanzije polimera usled dekompresije, dugi lanci se prepliću da bi zarobili CO₂, dok kratki lanci dozvoljavaju lakše izdvajanje CO₂ iz polimera, čime se ubrzava rast pora, što dovodi do formiranja većih pora i do dobijanja skafolda krhke strukture (Liu i sar., 2007). Većina amorfni i semi-kristaliničnih polimera se mogu plastifikovati pomoću nkCO₂ (Kirby i McHugh, 1999; Lian i sar., 2006; Takahashi i sar., 2012). Takva promena polimera omogućava različite modifikacije kao što su inkorporacija aditiva, formiranje pena, priprema polimernih blendi itd.

Dok je CO₂ dobar rastvarač skoro svih nepolarnih i nekih polarnih supstanci, veoma je loš rastvarač za većinu polimera velikih molarnih masa pod blagim uslovima ($T < 100$ °C i $P < 35$ MPa). Polarnost polimera može, takođe, biti razlog njihove ograničene rastvorljivosti jer CO₂ nema permanentni dipol. Pored toga, CO₂ ima mogućnost da se ponaša kao slaba Luisova

kiselina i Luisova baza, pa teorijski, CO₂ može učestvovati u interakcijama vodoničnih veza, što je eksperimentalni dokazi potvrđuju (Davies i sar., 2008).

Tai sa saradnicima (Tai i sar., 2007) je pratio uticaj procesnih parametara na formiranje skafolda PLA i PLGA polimera, dok su Fanovich i Jaeger (Fanovich i Jaeger, 2012) pratili uticaj vremena, pritiska i temperature na strukturu dobijenih PCL skafolda. Oba istraživanja su potvrdila da nkCO₂ snižava T_g polimera, da deluje kao plastifikator i da menja zapreminu polimera usled apsorpcije. Zapremina se menja tako što se prvo smanjuje usled topljenja (dobija se polimerni rastop), ali potom počinje da raste usled apsorpcije CO₂. Na višim pritiscima apsorpcija gasa je veća i samim tim i plastifikujući efekat na polimer, što rezultuje povećanjem bubrenja polimera. Brzina dekompresije, takođe, utiče na morfologiju polimera. Brzom dekompresijom dobijaju se skafoldi sa neuniformnom poroznom strukturom, dok se sporom dekompresijom dobija uniformnija porozna struktura. Tai i saradnici (Tai i sar., 2007) su pokazali i da se veličina pora dobijenih skafolda smanjuje sa povećanjem molarne mase polimera i da su skafoldi dobijeni od polimera sa malom molarnom masom krtiji. Rastvorljivost CO₂ u polimeru raste sa sniženjem temperature na konstantnom pritisku jer raste gustina CO₂. Ukoliko pritisak raste, a ostali parametri su konstantni, uočava se da se veličina pora skafolda smanjuje. Difuzioni koeficijent CO₂ se povećava linearno sa povećanjem pritiska. Takođe, povećanje pritiska snižava T_g . Ukoliko se svi parametri osim vremena drže konstantnim, uočava se da skafoldi dobijeni posle dužeg operativnog vremena imaju gustu raspodelu malih pora. Ukoliko je operativno vreme kratko, CO₂ može biti neravnomerno rastvoren u polimeru, tj. više je koncentrisan bliže površini nego u unutrašnjosti polimera. Duže operativno vreme dozvoljava da CO₂ efikasnije difunduje u polimer i da se rasporedi uniformno, čime se nakon dekompresije dobija skafold sa uniformnim porama. Takođe, vreme za koje se postiže ravnoteža zavisi od veličine uzorka, tj. od njegove specifične površine. U skladu sa tim, kraće vreme za postizanje ravnoteže je potrebno za praškaste uzorke u odnosu na uzorke u obliku sfera (Tai i sar., 2007).

2.4.5. Natkritična impregnacija

Impregnacija leka ili drugih bioaktivnih supstanci u polimerne matrice se konvencionalnim metodama izvodi tako što se ove supstance izmešaju sa ostalim supstancama tokom sinteze polimera ili tako što se polimerni materijal potopi u rastvor koji sadrži bioaktivnu supstancu. Iako su jednostavne, ove metode imaju mane, kao što su: upotreba organskih rastvarača (organski rastvarači moraju biti uklonjeni zbog bezbednosnih i zdravstvenih razloga, kao i zbog održanja integriteta proizvoda), neželjene reakcije ili degradacije supstanci, niskog prinosa impregnacije i heterogene disperzije aktivne komponente u čvrstoj fazi. Natkritična impregnacija (NKI), a naročito sa CO₂ kao natkritičnim fluidom, jeste alternativna metoda kojom se izbegavaju problemi konvencijalnih impregnacija (Dias i sar., 2011). NkCO₂ nije poznat samo kao rastvarač za vredne aktivne komponente, već je poznat i po svojoj velikoj sposobnosti difuzije u organsku materiju. Navedena svojstva nkCO₂ se mogu iskoristiti za impregnaciju čvrstih matrica sa prirodnim aktivnim supstancama (Fanovich i sar., 2013).

NKI podrazumeva rastvaranje bioaktivne supstance u natkritičnom fluidu i kontakt rezultujućeg rastvora sa polimernim materijalom koji će se impregnirati (Kikic i Vecchione, 2003). Glavne prednosti tehnike NKI su: 1) mogućnost impregnacije velikog broja različitih prirodnih i sintetskih polimera (de Souza i sar., 2014), uključujući i polimerne matrice koje se koriste za medicinske svrhe, 2) izbegavanje organskih rastvarača, 3) mogućnost rada na relativno niskim temperaturama sa termolabilnim supstancama (Dias i sar., 2011), 4) mogućnost rada sa hidrofobnim supstancama (kao što su etarska ulja) koje ne mogu biti impregnirane vodenim rastvorom ili suspenzijom (Dias i sar., 2011; de Souza i sar., 2014), 5) kontrola punjenja i dubine penetracije aktivne komponente podešavanjem vremena impregnacije, brzine dekompresije i/ili promenom gustine natkritičnog rastvarača jednostavnom manipulacijom temperature i pritiska (de Souza i sar., 2014; Kazarian, 2000; Kikic i Vecchione, 2003), 6) kompletno uklanjanje rastvarača iz supstrata (de Souza i sar., 2014) bez degradacije bioaktivnih komponenata (Zhang i sar., 1997), 7) mogućnost rada na relativno blagim uslovima u sredini bez kiseonika što je poželjno naročito kada se impregnira prirodna komponenta sa biološkom aktivnošću (de Souza i sar., 2014) i 8) homogena raspodela leka unutar matrice polimera usled velike difuzivnosti nkCO₂ (Cabezs i sar., 2012).

Postoje dva različita mehanizma procesa NKI aktivne supstance u polimerne matrice. Jedan mehanizam se odnosi na jednostavno smeštanje aktivne supstance, koja je rastvorena u natkritičnom fluidu, unutar polimera usled dekompresije. Tokom dekompresije, CO₂ brzo napušta polimer dok rastvorak ostaje zarobljen unutar polimera. Ova vrsta impregnacije je karakteristična za sisteme u kojima rastvorak ima veliku rastvorljivost u natkritičnom fluidu, a polimer bubri usled izloženosti natkritičnom fluidu. Drugi mehanizam implicira interakcije, kao što su Van der Waals-ove sile/vodonične veze između rastvorka i polimera (Duarte i sar., 2007; Kazarian, 2000). NKI je proces kojim upravljaju sva fizičko-hemijska svojstva i interakcije koje se dešavaju između svih supstanci u procesu (bioaktivna supstanca, polimeri, nkCO₂, kosolventi i bilo koja druga supstanca koja se nađe u sistemu) (Cabezs i sar., 2012). Veoma značajnu ulogu u procesu imaju i operativni uslovi: pritisak, temperatura, procesno vreme, protok, brzina dekompresije itd. (Dias i sar., 2011; Kikic i Vecchione, 2003). Proces NKI može biti opisan istim termodinamičkim relacijama i bilansom mase koji se koriste za ekstrakciju pošto su ovi procesi inverzni.

Često nije moguće izmeriti rastvorljivost aktivne supstance u polimeru pošto je difuzija rastvorka u polimeru kinetički ograničena, a naročito na temperaturama koje su značajno ispod T_g polimera. Ipak, T_g se smanjuje kako se CO₂, ili neki drugi plastifikator, rastvara u polimeru. T_g može pasti značajno ispod operativne temperature, što znači da se u takvom stanju smeša polimer-CO₂ ponaša kao guma i da se brzina difuzije rastvorka može povećati za više redova veličine u poređenju sa difuzijom u staklastom polimeru. U pojedinim slučajevima može doći i do smanjenja rastvorljivosti rastvorka u polimeru iako polimer-CO₂ smeša ispoljava svojstva gume. Naime, na niskim pritiscima, gde polimer još uvek ispoljava staklasta svojstva, impregnacija polimera može biti ograničena zbog male difuzivnosti rastvorka iako postoji velika termodinamička pogonska sila za rastvaranje rastvorka. Međutim, na visokim pritiscima na kojima polimer bubri i ispoljava svojstva nalik gumi, impregnacija rastvorka može biti ograničena zbog niže termodinamičke pogonske sile za rastvaranje rastvorka iako je sama kinetička difuzivnost povećana. Može se desiti i da je sam rastvorak efikasniji nego CO₂ za bubrenje polimera i sniženje T_g polimera. Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da impregnacija aktivne supstance zavisi na kompleksan način od pritiska, T_g polimera u odnosu na operativnu temperaturu i od termodinamički kontrolisane rastvorljivosti rastvorka u čistom

polimeru i u smeši polimer-CO₂ gde i sam rastvorak može značajno uticati na bubrenje polimera i sniženje T_g (Shen i sar., 2008).

Bioaktivne komponente (antiinflamatorne, antimikrobne, antiseptične, antioksidantne itd.) se, u zavisnosti od svoje biološke uloge, mogu impregnirati u različite čvrste materijale. Materijali impregnirani bioaktivnom komponentom se mogu upotrebiti za stimulaciju zarastanja rana i ublažavanje infekcija, za inhibiciju procesa oksidacije, kao sredstvo za čišćenje i za ubrzavanje regeneracije tkiva (Dias i Braga, 2011). Polimerni materijali impregnirani tehnikom NKI imaju veliku čistoću jer ne sadrže tragove organskih rastvarača, što ih čini naročito pogodnim za farmaceutsku industriju i industriju hrane. Velika rastvorljivost, difuzivnost, bubrenje i plastifikujuće dejstvo nkCO_2 ubrzava sorpciju i omogućava uniformnu raspodelu aktivne supstance kroz ceo polimer, kao i veće prinose (Dias i sar., 2011; Zhang i sar., 1997). Mogu se dobiti različite forme impregniranih polimera, kao što su čestice, vlakna ili pene (Lee i sar., 2009). Polimeri se mogu impregnirati bubrenjem u CO₂ u rastvoru jedne ili više hemijskih komponenti (leka ili biološki aktivne supstance). Nakon dekompresije natkritičnog rastvora, hemijska komponenta biva zadržana u polimeru pošto ima lošiju difuzivnost nego CO₂. Kao prateći efekat dekompresije može se javiti penenje pojedinih polimera zbog čega je moguće u istom procesu kombinovati i impregnaciju i obrazovanje poroznog skafolda (Fanovich i Jeager, 2012). U studiji koju je izveo Cabezs sa saradnicima (Cabezs i sar., 2012) prezentovana je mogućnost impregnacije antibiotika u polimere PLA i PLGA. Uočeno je da na prinos impregnacije utiče više faktora među kojima je i brzina mešanja.

U Tabeli 6 je predstavljen literaturni pregled NKI aktivnih supstanci u čvrste polimerne nosače, gde se može videti zavisnost prinosa impregnacije od vrste polimera i aktivnih komponenata, kao i odabranih operativnih uslova. Osim nekoliko studija o impregnaciji timola u nekoliko različitih čvrstih nosača (karboksibutilhitozan, agaroz, linearni polietilen male gustine) koje su navedene u Tabeli 6, ne postoje podaci u dostupnoj literaturi o NKI timola na nosače koji su odabrani za ovu disertaciju. Takođe, u dostupnoj literaturi ne postoje podaci o NKI ekstrakta timijana na čvrste nosače.

2.4.6. Integrisani procesi natkritične ekstrakcije i natkritične impregnacije

Fanovich i saradnici su nedavno predložili integrisani proces NKE-NKI (Fanovich i sar., 2013). Osnovni princip integrisanog procesa se zasniva na minimizovanju gubitka ekstrakta usled taloženja u cevima i sudovima zbog fluktuacije u pritiscima i temperaturama. Integrisanjem procesa NKE i NKI, rastvor nkCO_2 i aktivne supstance (dobijen procesom NKE) se direktno upotrebljava za impregnaciju. Integrisanje NKE-NKI procesa isključuje međukorak dekompresije, koji je, inače, neizbežan kada se procesi odvijaju odvojeno. Prednosti upotrebe jednog integrisanog procesa su smanjenje gubitka ekstrakta, povećanje kvaliteta ekstrakta usled izbegavanja kontakta sa vazduhom pre impregnacije i ušteda vremena i energije.

Izazov ovakvog integrisanog procesa je određivanje pojedinačnih relevantnih parametara NKE i NKI i njihovo usklađivanje u cilju povećanja efikasnosti ekstrakcije i impregnacije. Glavni koraci u optimizaciji integrisanog procesa su: a) definisanje optimalnih uslova NKE (pritisak, temperatura, potrošnja CO_2), b) definisanje uslova pritiska i temperature NKI u odnosu na rastvorljivost rastvorka i ponašanja nosača u nkCO_2 , kao i izbor optimalnog načina punjenja adsorbera u cilju sprečavanja kanalisanja i c) usaglašavanje parametara koji utiču na efikasnost integrisanog procesa NKE-NKI. Prvi korak u projektovanju integrisanog NKE-NKI procesa je određivanje uslova koji maksimiziraju prinos ekstrakta odgovarajućeg sastava i kontrolišu kapacitet impregnacije nosača rastvorkom. Na taj način, rastvorljivost ciljane bioaktivne komponente se optimizuje uz kontrolisanu potrošnju CO_2 . Dizajn NKI procesa počinje ispitivanjem ponašanja izabranog nosača u prisustvu nkCO_2 . Ispitivanje fizičko-hemijskih svojstava nosača u prisustvu CO_2 pod povišenim pritiskom podrazumeva: vizuelno posmatranje, merenje CO_2 sorpcije, definisanje sniženja T_g i T_m u prisustvu CO_2 (efekat plastifikacije), kao i ispitivanje uticaja brzine dekompresije na krajnju strukturu nosača (penenje, kolaps pora). Pored pomenutih parametara, efikasnost procesa NKI može značajno biti pod uticajem protoka, vremena kontakta i geometrije pakovanja. Kratko vreme kontakta u apsorberu može dovesti do nedovoljne impregnacije. Ekstrakcija iz biljnog materijala je uglavnom mnogo brži proces nego apsorpcija rastvorka unutar nosača tokom procesa NKE-NKI, te je stoga projektovanjem procesa neophodno obezbediti optimalno vreme kontakta čvrstog nosača i natkritičnog fluida (Ivanovic i sar., 2014).

Tabela 6. Literaturni pregled- NKI aktivnih supstanci na čvrste nosače

Polimeri	Aktivna supstanca	P / T / t (MPa / °C / h)	Mešanje (min ⁻¹)	Dekomp. (MPa/min)	Prinos (%)	Upotreba	Literaturni izvor
PMMA	Ketoprofen	10 / 40 / 8	-	brza	8,22 ^a	Antiinflamatorni lekovi	Cortesi i sar., 2000
PVP	Nimesulid	16 / 40 / 8			6,48 ^a		
Etil celuloza	Nimesulid	13 / 40 / 8			2,12 ^a		
PS	ECMAFA	10 / 40 / 2	-	-	0,5-1 ^a	UV filteri	Nikitin i sar., 2003
PVP	Nimesulid	16-19 / 40 / 8	-	brza	6,42-9,61 ^a	Antiinflamatorni lekovi	Paolo i sar., 2003
PVP+PDMS					8,98-12,8 ^a		
PMMA	Naftalen	8-15 / 35-45 / 5	-	0,2	10,4-28,9 ^a	Lek	Uzer i sar., 2006
MMA-EGMA	Fluribiprofen	18 / 35 / 3	-	spora	0,82 ^b	Očni sistemi	Duarte i sar., 2007
			cirkulacija		0,22 ^b		
PLA	Indometacin	18 / 40 / 1	200-1000	0,2	6,4-21,7 ^b	Inženjerstvo tkiva	Cabezs i sar., 2012
PLGA				6	1,4-16,7 ^b		
Modifikovan kukuruzni skrob	Etarsko ulje lavande	10 / 40 / 2	magnet	10	13,1 ^b	Lekovi za životinje	Varona i sar., 2011
				0,1	9,5 ^b		
Tapioka skrobni filmovi	Cinamaldehyd	25 / 35 / 15	300	0,1	0,10 ^a	Pakovanje hrane	De Souza i sar., 2014
				1	0,25 ^a		
PCL blenda	Timolol maleat	11-20 / 40 / 2	750-800	0,5	0,9-3,3 ^b	Anti-glaukom lekovi	Natu i sar., 2008
PMMA	Triflusal	20 / 35 / 12	300	0,2-0,4	20-25 ^b	Antikoagulativna sredstva	Lopez-Periago i sar., 2009a
Zeolit	TFP	15 / 60 / 16-20	400	spora	3,7-6,7	Katalizatori	Lopez-Periago i sar., 2009b
		15 / 150 / 20			4,8		
Gelatziran kukuruzni skrob	Oleinska kiselina	15 / 40 / 8	-	brza	11,4	Hrana	Comin i sar., 2012
	Laneno ulje	30 / 80 / 8			6,6		
CBC membrane	Kuercetin	20 / 50 / 3	-	1	2,7 ^a	Previjanje rana	Dias i sar., 2010
	Timol				2,3 ^a		
L-PLA	Ibuprofen	7-10 / 40 / 3	-	spora	8,9-16,6 ^a	Antiinflamatorni lekovi	Ma i sar., 2010
	Aspirin				26,0-29,0 ^a		
	Naftalen				2,9-4,1 ^a		

Komercijalna sočiva	Flurbiprofen	9-16 / 40 / 1 9 / 40 / 1-2	magnet	0,1-0,2	0,9-1,3 ^a 0,9-1,4 ^a	Terapeutska sočiva	Costa i sar., 2010
CBC film/pena	Timol	20 / 40 / 3	900	1	1,1 ^a /2,5 ^a	Sredstvo za rane	Dias i sar., 2011
AGA pene					2,4 ^a		
H. skafoldi	Laktuloza	10 / 60, 100 / 1	cirkulacija	0,33	0,2-8,61 ^b	Prebiotik u hrani	Diez-Municio i sar., 2011
H. mikrosfere					2,4-3,96 ^b		
Vlakna AC	Mentol	6,9 / 40 / 0,5	mešalica	-	6	-	Shen i sar., 2008
	Vanilin	10 / 50 / 1			20		
Komercijalna sočiva	Acetazolamid	15-20 / 40-50 / 1	magnet	0,06	5,2-18,3 ^a	Terapeutska sočiva	Braga i sar., 2011
		17/ 40 / 1-3		0,06-0,15	10,5-19,7 ^a		
Komercijalna sočiva	Cefuroksim natrijum	8 / 35 / 2	magnet	brza	5,7-5,9 ^a	Terapeutska sočiva	Masmoudi i sar., 2011
		20 / 60 / 2			2,9-6,3 ^a		
PMMA film	Ibuprofen	13,8 / 40-50 / 6	magnet	-	17-26 ^a	Lek	Hussain i Grant, 2012
		20,7 / 40 / 6			11 ^a		
PLGA	5-fluorouracil	18 / 40 / 1	200-1000	6	8,3-14,98 ^b	Hemoterapijski lek	Cabezas i sar., 2013
PLA				0,2	5,5-16,88 ^b		
				6	5,4-14,59 ^b		
				0,2	9,8-15,30 ^b		
PCL	<i>Usnea</i> ekstrakt	15-17/35/1-6	cirkulacija	0,5-1	0,7-2,8 ^a	Skafoldi	Fanovich i sar., 2013
CBC	Juka (<i>Libidibia ferrea</i>) ekstrakt	27 / 50 / 15	900	3-10	45-48 ^b	Sredstvo za rane	Dias i sar., 2013
Promogran®					28-30 ^b		
Hyalofill®					24-27 ^b		
LLDPE film	Timol	7-12 / 40 / 4	-	-	0,5-1,3 ^b	Pakovanje hrane	Torres i sar., 2014
PVP	Ketoprofen	10-20 / 40 / 1-4	-	0,08-0,11	22-52 ^a	Oralni lek	Marizza i sar., 2014
Silika mikrosfere	Benzoeva kiselina	18 / 55 / 24	500	-	23,77 ^a	Oralni lek	Garcia-Gonzalez i sar., 2015
Alginat mikrosf.					18,92 ^a		
Pektin mikrosf.					14,66 ^a		
Skrob mikrosf.					21,54 ^a		

PVP- polivinilpirolidon; PS- polistiren; ECMAFA- etil1-2-cijano-3(4-dimetilaminofenil)akrilat; PDMS- polidimetilsiloksan; MMA-EGMA- poli(metilmetakrilat-ko-etilheksilakrilat-ko-etilenglikoldimetakrilat); TFP- 2,4,6-trifenilpirilium; CBC- karboksibutilhitozan; AGA- agaroz; H- hitozan; Promogran®- kolagen/celuloza; Hyalofill®- polimer na bazi hijaluronske kiseline; LLDPE- linearni polietilen male gustine; ^a- masa aktivne komponente u odnosu na početnu masu polimera; ^b- masa aktivne komponente u impregniranom uzorku.

Pakovanje nosača treba odabrati u skladu sa geometrijom nosača (tekstil, puder, granule) na način koji bi sprečio kanalisanje koje vodi smanjenju efikasnosti NKI (Ivanovic i sar., 2014).

Integrisani proces NKE-NKI se može izvesti šaržnim, protočnim režimom rada ili njihovom kombinacijom. U šaržnom režimu rada natkritični rastvor je doveden u kontakt sa nosačem određeno vreme, pri čemu natkritični fluid može da kruži kroz ekstraktor i apsorber ili kroz oba suda određeno vreme, a zatim samo kroz apsorber. U protočnom režimu rada postoji kontinualan protok natkritičnog fluida kroz sistem. Kombinacijom prethodnih režima može se projektovati proces kod koga se, nakon šaržne operacije, natkritični fluid obnavlja uvođenjem nove količine fluida.

2.4.7. Komercijalna upotreba natkritičnih fluida

Natkritični fluidi imaju primenu u industriji hrane, pića, kao i u petrohemijskoj, biohemijskoj, farmaceutskoj, polimernoj i biopolimernoj industriji (Knez i sar., 2014). Intenzivno proučavanje procesa NKE započeto je 70-tih godina XX veka, što je rezultovalo brojnim patentima u oblasti NKE hmelja, kafe, čaja, duvana i začina (Skala i sar., 2002). Primena NKE u industrijskim razmerama započeta je 80-tih godina dvadesetog veka, i to: u rafinerijskoj obradi nafte (ROSE proces), kod prerade kafe i čaja (proces dekofeinizacije) i ekstrakcije hmelja (Martinez i Samuel, 2008). U tom periodu, kompanije u Nemačkoj i Francuskoj su razvile različite procese u postrojenjima zapremine do nekoliko stotina litara za dobijanje aroma i drugih prehrambenih aditiva, farmaceutskih i kozmetičkih preparata. Krajem 80-tih godina prošlog veka izgrađena su velika postrojenja za preradu kafe i ekstrakciju hmelja u SAD-u i manja postrojenja za proizvodnju lekova, kozmetičkih preparata i prirodnih proizvoda u Japanu, Južnoj Koreji i Indiji. U novije vreme izgrađena su postrojenja za proizvodnju fitohemikalija i drugih prirodnih jedinjenja i na Dalekom Istoku. Danas su, pored navedenih primera, komercijalizovane i druge primene natkritičnih fluida, kao što su: suvo ili hemijsko čišćenje ili odmašćivanje finih elektronskih aparata, procesi impregnacije, dobijanje čestica definisane veličine i strukture u prehrambenoj, farmaceutskoj industriji, industriji boja i drugih premaza, proizvodnja penastih materijala, procesi bojenja tekstila itd. (Skala i sar., 2002).

Najveća postrojenja za NKE su postrojenje za ekstrakciju kofeina iz kafe i čaja (100 kt/god), hmelja (60 kt/god) i za uklanjanje pesticida iz pirinča (30 kt/god) (Gamse, 2005). Natkritični

fluidi se u industriji koriste i za hemijske i biohemijske reakcije (npr. heterogena kataliza organskih jedinjenja) kao zamena za organske rastvarače. Kompanija Thomas Swan Co LTD je 2002. god. pustila u rad postrojenje za kontinualnu hidrogenizaciju sa nkCO_2 sa proizvodnjom 1000 t/god. (Knez i sar., 2014). Primer kompanije koja uspešno primenjuje proces natkritične impregnacije sa nkCO_2 za impregnaciju drveta je Superwood (Danska) (Gamse, 2005). Još jedan primer uspešne industrijske primene natkritične impregnacije je Yeh Group (Tajland), kompanija koja koristi nkCO_2 za suvo bojenje tkanine tzv. Dry-dye tehnologijom (Zizovic i sar., 2014).

Danas u svetu postoji veliki pritisak na industriju za uvođenje novih alternativnih i održivih tehnologija koje minimizuju uticaj na prirodnu sredinu, koje ne uključuju primenu organskih rastvarača opasnih po životnu sredinu i čovekovo zdravlje, i koje su energetski efikasnije i sa manje sporednih proizvoda (Knez i sar., 2014). Pored zakonske regulative vezane za zaštitu životne sredine, postoje sve veći zahtevi potrošača za konzumiranjem tzv. „funktionalne“ hrane, koja, pored nutritivnih vrednosti, ima i ulogu u prevenciji različitih oboljenja. S tim u vezi, sve više pažnje se poklanja ispitivanju novih izvora prirodnih jedinjenja sa biološkim dejstvima i razvoju tehnologija za njihovu izolaciju u što čistijem stanju. U narednim godinama predviđa se dalji rast primene prirodnih aktivnih supstanci, pa samim tim i napredak u pogledu tehnologija za njihovo dobijanje u što čistijem stanju. U tom pogledu, imajući u vidu kvalitet i čistoću dobijenih ekstrakata, NKE će i pored većih ulaganja biti u prednosti u odnosu na konvencionalne tehnike.

2.5. METODE ANALIZE

2.5.1. Ispitivanje morfologije nosača aktivne komponente

Postoji veliki broj metoda za ispitivanje morfologije polimera, a neke od metoda sa najvećom primenom su: skenirajuća elektronska mikroskopija, infracrvena spektroskopija i metoda određivanje teksture pomoću adsorpcionih izoterma.

Elektronska mikroskopija

Elektronski mikroskop može postići uveličanje veće od 100000 puta. Umesto vidljive svetlosti i optičkih sočiva, za uveličanje slike objekta kod elektronskog mikroskopa se koristi snop elektrona koji se usmerava i fokusira uz pomoć elektromagnetnog polja. Fokusiranje elektrona se vrši magnetnim kalemovima u vakuumu, da bi se sprečilo rasipanje elektrona i jonizacija molekula vazduha. Rezolucija (najmanje rastojanje između dve tačke pri kome se one raspoznaju kao razdvojeni objekti) je određena talasnom dužinom osvetljavajućeg snopa. Za osvetljavanje objekta se koristi snop vidljive svetlosti (400-700 nm). Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) daje sliku površine objekta, dok transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) daje sliku kroz objekat. U obe tehnike se primenjuju elektronski zraci, ali za stvaranje slike se koriste različiti mehanizmi: TEM oblikuje sliku pomoću elektrona koji se propuštaju kroz preparat, a SEM oblikuje sliku detekcijom elektrona koji se odbijaju od spoljašnje površine preparata. Kod SEM-a skeniranje površine se ostvaruje prelaženjem uskog snopa (primarnih) elektrona preko površine uzorka. U svakoj tački uzorka u interakciji elektrona primarnog snopa i molekula (atoma) uzorka dolazi do stvaranja signala koji se detektuje. Signal se mapira na video ekranu- svaka tačka interakcije odgovara posebnoj slici na ekranu. Oštrina slike zavisi od jačine signala sa uzorka (energija sekundarnih elektrona). FESEM je SEM kod koje se, umesto klasične katode, emisija elektrona postiže pomoću jakih polja (eng. FE- field emission). Uzorak koji se analizira mora provoditi struju. Nprovodni materijali se zato prevlače slojem metala – zlato/platina (tzv. naparavanje). Sloj metala sprečava akumulaciju naelektrisanja u mikroskopu i eroziju uzorka (Putanov, 1995).

Ispitivanje teksture pomoću adsorpcionih izotermi

Pri ispitivanju teksturalnih svojstava koristi se isključivo fizička adsorpcija koja se odigrava pod dejstvom Van der Waals-ovih sila. Adsorpcione izoterme se dobijaju merenjem količine gasa koji se adsorbuje u širokom rasponu relativnih pritisaka na konstantnoj temperaturi. Desorpcione izoterme se dobijaju merenjem količine gasa koji se uklanja kako se pritisak smanjuje. Da bi se na osnovu adsorpcionih izotermi dobila prava slika, potrebno je da adsorbat bude hemijski inertan, da se adsorpcija vrši na dovoljno niskoj temperaturi i da male dimenzije molekula ili atoma adsorbata omogućće dobru rezoluciju u poroznoj strukturi. Kao adsorbat se najčešće koristi azot (tečni azot, 77 K). Uslov uspešne analize je da sa površine uzorka budu

uklonjeni svi prethodno adsorbovani molekuli. Degasiranje se vrši na sobnoj ili povišenoj temperaturi koja ne sme modifikovati teksturu materijala koji se ispituje. Snimanje adsorpcionih izoterma vrši se tako što se na očišćenu površinu u određenim količinama dovode pare adsorbata. Posle uspostavljanja adsorpcione ravnoteže, određuje se količina supstance adsorbovane pri datom ravnotežnom pritisku gasa iznad uzorka. Količina adsorbovanog gasa se može odrediti gravimetrijski ili volumetrijski (Putanov, 1995).

Izoterme fizičke adsorpcije dobijene eksperimentalnim putem imaju različite oblike (postoji pet osnovnih grupa izoterma) koji su karakteristični za određeni tip morfologije. Na osnovu adsorpcionih izoterma može se doći do informacija o obliku pora. U tu svrhu se koriste adsorpciono-desorpcioni dijagrami u kojima oblik histerezisne petlje ukazuje na prisustvo pora odgovarajućeg oblika. Tipovi adsorpcionih izoterma mogu se opisati pomoću jednačine koju su izveli Brunauer, Emmett i Teller (BET). BET adsorpciona izoterma je najkorišćenija metoda za određivanje specifične površine poroznih materijala. Eksperimentalno dobijene izoterme poklapaju se sa tipskim izotermama u ograničenim intervalima pritisaka, za koje važe pretpostavke na kojima je zasnovana BET jednačina (Putanov, 1995).

Infracrvena spektroskopija

Kada se kroz prostor ispunjen nekom supstancom propusti snop infracrvenog (eng. infrared-IR) zračenja koji se zatim optičkom prizmom (ili rešetkom) razloži na monohromatske komponente, pomoću odgovarajućeg detektora se primećuje da na pojedinim frekvencijama dolazi do većeg ili manjeg slabljenja jačine svetlosti. Razlog ove pojave je selektivna apsorpcija IR zračenja od strane molekula koji sa tim zračenjem dolaze u dodir. Ako se promena intenziteta propuštenog IR zračenja predstavi u zavisnosti od frekvencije i/ili talasne dužine dobija se infracrveni spektar. Spektar se najčešće meri automatski pomoću infracrvenog spektrofotometra kao zavisnost transmisije od talasnog broja i/ili talasne dužine. Na spektrima se može videti da se na frekvencijama na kojima dolazi do apsorpcije zračenja javljaju apsorpcioni maksimumi (minimumi propustljivosti). Oni se nazivaju i apsorpcionim trakama. Položaj, intenzitet, broj i oblik apsorpcionih maksimuma je u direktnoj vezi sa strukturom molekula tako da je izgled IR spektra karakterističan za određeno jedinjenje. Postoje dva načina identifikacije organskih i neorganskih jedinjenja. Prvi podrazumeva jednostavno poređenje IR spektra nepoznatog jedinjenja sa spektrom standarda (snimljenog pod istim uslovima). Drugi,

znatno češće upotrebljavan postupak je primena IR spektroskopije u kombinaciji sa ostalim instrumentalnim metodama i tada se uloga IR spektroskopije svodi na identifikaciju funkcionalnih grupa. Instrumenti pod nazivom FTIR spektrofotometri (FT je skraćenica od Fourier-ova transformacija) objedinjuju dve metode: interferometriju i Fourier-ovu transformaciju. Interferometar meri talasnu dužinu monohromatske svetlosti, a Fourier-ova transformacija interferograma direktno daje intenzitet zračenja (propuštenog kroz uzorak) u zavisnosti od frekvencije, što odgovara IR spektru (Milosavljević, 1994).

2.5.2. Ispitivanje kinetike otpuštanja aktivne komponente iz impregniranog nosača

Lekovi smešteni u polimernu matricu se otpuštaju difuzijom kroz polimernu barijeru, erozijom polimernog materijala (koja može biti površinska i u masi) ili kombinacijom ova dva mehanizma (Makadia i Siegel, 2011). Primeri sistema za dostavljanje leka koji koriste membranom kontrolisanu difuziju leka su: membrane za transdermalno dostavljanje leka, filmovi za premazivanje koji su formirani oko jezgra koje sadrži lek, polimerna mreža koja sadrži dispergovani lek, mikrosfere, nanosfere itd. Faktori kao što su poroznost, dodirna površina, debljina i kristalnost igraju veliku ulogu u kontroli brzine prolaska leka kroz membranu (Meier i sar., 2004). Dobijanje kvantitativne informacije o brzini migracije aktivne komponente iz nosača u okolni medijum je veoma važno za dizajniranje antimikrobnog sistema. Ti podaci mogu pružiti i informacije o mehanizmu difuzije i o interakcijama aktivne komponente sa nosačem i kontaktnim medijumom. U dostupnoj literaturi postoji veliki broj načina za ispitivanje kinetike otpuštanja aktivne komponente iz nosača. Mogu se koristiti različiti medijumi za otpuštanje (npr. vazduh, voda, heksan, metanol, etanol, etil acetat) na različitim temperaturama, sa ili bez mešanja.

Otpuštanje aktivne komponente iz polimera se odvija u dva koraka. Prvo molekuli tečnosti prodiru u impregnirani polimer zbog čega može doći do bubrenja polimera. Drugi korak podrazumeva izlazak aktivne komponente iz polimera. Aktivna komponenta difunduje u spoljašnji rastvor sve dok se ne uspostavi termodinamička ravnoteža između dve faze (Nobile i sar., 2008). Faktori koji utiču na otpuštanje aktivnih komponenti iz nosača su: fizička i hemijska svojstva nosača (sastav, kristalnost, T_g i molarna masa), svojstva aktivne komponente (Dash i

sar., 2011) i veličina i oblik matrice. Na svojstva polimernog nosača i mogućnost smeštanja aktivnih komponenti u pore polimera kao i na svojstva sistema polimer-aktivna komponenta i sposobnost otpuštanja aktivne komponente iz polimera, najviše uticaja ima struktura samog polimera (Makadia i Siegel, 2011). Veličina pora impregniranog polimera određuje stepen kontrolisanog otpuštanja (manje pore obezbeđuju kontrolisano otpuštanje) (Cabezs i sar., 2012).

Za praćenje otpuštanja aktivne komponente iz čvrstog nosača može se koristiti ultraljubičasta-vidljiva (UV-VIS) spektrofotometrija. Rastvarači za ovu analizu su najčešće voda za komponente koje se rastvaraju u vodi ili etanol za organski rastvorljive komponente. Organski rastvarači mogu imati značajnu UV apsorpciju što znači da nisu svi odgovarajući za upotrebu u UV spektroskopiji. Polarnost rastvarača i pH takođe mogu uticati na apsorpcioni spektar organske komponente. Takođe, boja rastvora nekada može biti suviše intenzivna da bi mogla da se koristi za kvantitativna merenja. Još jedan značajan faktor je čistoća svetla koje se koristi i zalutala svetlost. Detektori svetlosti koji se koriste su širokog opsega i odgovaraju svim svetlostima koje dospeju do njega pa mogu detektovati i zalutalu svetlost što utiče na tačnost merenja. Za određivanje koncentracije ispitivanog rastvora koristi se Lamber-Berov zakon koji kaže da je apsorbanca rastvora direktno proporcionalna koncentraciji vrste u rastvoru koja apsorbuje svetlost i dužini puta koju pređe svetlost. UV-VIS spektrofotometar meri intenzitet propuštene svetlosti kroz uzorak i poredi je sa intenzitetom svetlosti pre nego što ona prođe kroz uzorak.

2.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST TIMIJANA I TIMOLA

Najčešći uzročnici mikrobiološke infekcije kod čoveka i životinja su bakterije koje pripadaju grupi stafilokoka, enterokoka, bacilusa, ešerihija i gljivice koje pripadaju grupi kandida.

Stafilokoke su Gram-pozitivne fakultativno anaerobne bakterije loptastog oblika raspoređene u vidu grozdastih formacija. Rod *Staphylococcus* obuhvata 32 vrste bakterija od kojih su najznačajniji izazivači oboljenja kod ljudi *S. aureus* (striktni patogen), *S. epidermidis* i *S. saprophyticus*. Vrsta *S. aureus* poseduje veliki broj faktora virulencije koji mu omogućavaju veliku

prodornost, uništavanje tkivnih elemenata, izazivanje zapaljenske reakcije i intoksikaciju organizma domaćina. Zbog toga je u stanju da izazove veliki broj oboljenja npr. stafilokokno trovanje hranom, sindrom oparene kože, sindrom toksičnog šoka, kožne infekcije, infekcije respiratornih puteva, urogenitalnog trakta, sinuzitis, septični artritis, endokarditis, septikemija, oboljenja gotovo svih organa i tkiva čovečijeg organizma. Posедуje različite mehanizme rezistencije na antibiotike (Švabić-Vlahović i sar., 2008).

Enterokoke su Gram-pozitivne bakterije veličine 0,5-1 μm koje se obično ređaju u parovima ili lancima različite dužine. Većinom su fakultativni anaerobi, ali neke vrste su i kapnofilne (rastu bolje u prisustvu 2-10% CO_2). Sačinjavaju deo normalne mikroflore intestinalnog i bilijarnog trakta, a u malom broju mogu se naći i u usnoj duplji, vagini i uretri muškaraca. Najčešće se izoluju *E. faecalis* i *E. faecium*. Vrste roda *Enterococcus* izazivaju urinarne infekcije, posebno kod bolesnika sa kateterima. Kod imunokompromitovanih osoba dovode do infekcija bilijarnog trakta i apscesa mekih tkiva. Čest je uzročnik endokarditisa, posebno kod osoba sa oštećenim ili veštačkim srčanim zaliscima. Poslednjih godina vrste ovog roda spadaju u vodeće uzročnike unutarbolničkih infekcija koje su izuzetno rezistentne na antibiotike (Švabić-Vlahović i sar., 2008).

Bacilusi su Gram-pozitivne aerobne ili fakultativno anaerobne bakterije dužine do 10 μm . Rod *Bacillus* obuhvata više od 50 vrsta među kojima su najpoznatije patogeni *B. cereus*, *B. subtilis* i *B. anthracis*. *B. subtilis* se nalazi u prirodi, povrću, mleku, kobasicama i deo je normalne mikroflore čoveka. Može izazvati oportunističke infekcije npr. konjuktivitis kod osoba koje već imaju lezije ili hroničnu iritaciju sluzokože vežnjače i sepsu kod imunokompromitovanih bolesnika (Švabić-Vlahović i sar., 2008).

Ešerihije su štapići prečnika 1-1,5 μm , dužine 2-4 μm raspoređeni pojedinačno, u parovima i nepravilnim strukturama. Pripadnici roda *Escherichia* su Gram-negativni, pokretni, fakultativno anaerobni bacili koji čine najbrojniju vrstu fakultativno anaerobne flore digestivnog trakta čoveka i životinja i svrstavaju se u uslovno patogene (oportunističke) bakterije. Od nekoliko vrsta ovog roda jedino *E.coli* ima medicinski značaj. *E.coli* izaziva dve grupe infekcija kod čoveka: ekstraintestinalne infekcije (infekcije urinarnog trakta, sepsa i meningitis) i dijarejna oboljenja ili enterokolitis (Švabić-Vlahović i sar., 2008).

Kandide su Gram pozitivne kvasnice, loptaste ili jajaste formacije veličine 2-4 μm . U rod kandida su svrstane 22 vrste gljiva koje kod ljudi mogu izazvati širok spektar bolesti

(kandidijaze). Najčešće se radi o bolestima kože i sluzokože, a ređe o oboljenjima unutrašnjih tkiva i organa. Najznačajnija vrsta je *C. albicans* (Radulović, 1998).

Da bi se neko antimikrobno sredstvo moglo koristiti za lečenje i/ili sprečavanje infekcija, neophodno je odrediti osetljivost mikroorganizama. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti sredstva izolovanih iz prirodnog materijala koristi se veliki broj metoda, a najčešće difuziona metoda (disk metoda i metoda bunarčića) i diluciona metoda (u agaru i u bujonu). Difuzione metode se zasnivaju na principu da antimikrobno sredstvo difunduje u hranjivu podlogu pri čemu osetljivi mikroorganizmi neće rasti u zoni difuzije. Na hranjive podloge se mogu nanositi diskovi natopljeni ispitivanim antimikrobnim sredstvom (disk metoda) ili se prave udubljenja u koja se sipaju rastvori tih sredstava (metoda bunarčića). Nakon inkubacije, jasne zone inhibicije nastaju oko diska ili bunarčića, ako je mikroorganizam osetljiv na antimikrobnu supstancu. Ako su svi uslovi standardizovani (veličina inokuluma, sastav i debljina podloge, pH podloge, vreme inkubacije), onda je prečnik zone inhibicije proporcionalan koncentraciji datog antibakterijskog sredstva. Diluciona metoda se zasniva na razređenju ispitivane antimikrobne supstance koja se u određenim koncentracijama dodaje direktno u tečnu podlogu. Podloge se zaseju istim količinama inokuluma ispitivanog soja mikroorganizama i sve manjim količinama antimikrobne supstance. Nakon inkubacije, vrši se očitavanje rezultata. Ukoliko je ispitivani mikroorganizam otporan na antimikrobnu supstancu u datoj koncentraciji registruje se zamućenje podloge. Najmanja količina antimikrobne supstance u podlozi u kojoj nema zamućenja označava se kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Iako su difuzione metode podesnije za rutinski rad jer su jednostavnije za izvođenje, brže i jeftinije, dilucione metode su preciznije (Radulović, 1998; Švabić-Vlahović, 2008).

Dok se za uništavanje mikroorganizama na predmetima može koristiti veliki broj metoda i sredstava (*fizički agensi*- temperatura, pritisak, UV zračenje, jonizujuće zračenje, ultrazvuk; *hemijski agensi*- kiseline, alkalije, alkoholi, detergentsi, fenoli, halogeni elementi, teški metali, aldehidi itd.), za uništavanje mikroorganizama unutar/na čoveku i životinjama se mogu koristiti samo određena hemijska sredstva, antibiotici i supstance sa antibiotskim dejstvom. Raspon njihovog dejstva može biti od inhibitornog do letalnog (Radulović, 1998). Zabrinjava činjenica da farmaceutska industrija u poslednjih dvadesetak godina nije proizvela nijedan novi antibiotik

širokog spektra dejstva za široku upotrebu u humanoj i veterinarskoj medicini (Nordmann i sar., 2007). Razlozi za krizu u proizvodnji novih klasa antibiotika su nedovoljna selektivna toksičnost novih supstanci sa jakim antibakterijskim delovanjem kao i duga, skupa i neizvesna pretklinička i klinička ispitivanja novih antibiotika (od nekoliko godina do nekoliko decenija) (Mišić i sar., 2009b). Iz navedenih razloga, kao i zbog porasta otpornosti bakterija na postojeće antibiotike, u poslednjih deset godina u svetu su sve aktuelnija ispitivanja antibiotskog dejstva prirodnih supstanci kao što su etarska ulja, biljni ekstrakti i njihove komponente (sami ili u kombinaciji sa postojećim antibioticima) za lečenje infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima bakterija (Gutierrez i sar., 2009; Mišić i sar., 2009a, b; Misic i sar., 2010). U naučnoj literaturi se mogu naći podaci o *in vitro* ispitivanju antimikrobne aktivnosti etarskog ulja timijana (Tabela 7) i njegove komponente timola (Tabela 8).

Dokazano je da ekstrakt timijana ima antibakterijsko i antifungalno dejstvo. Takođe, dokazano je da etarsko ulje timijana ima širok spektar dejstva protiv bakterija koje su razvile otpornost prema antibioticima (Stahl-Biskup i sar., 2004). Jako antimikrobno dejstvo etarskog ulja timijana najvećim delom potiče od fenolnih komponenata, prvenstveno timola i karvakrola. Timol je jak antiseptik zbog fenolne grupe, pri čemu on ima 30 puta veći antiseptični efekat i 4 puta manju toksičnost nego fenol (Zeković i sar., 2000).

I pored brojnih studija antibakterijskog dejstva etarskih ulja i jedinjenja izolovanih iz lekovitog i začinskog bilja (Gutierrez i sar., 2009; Tajkarimi i sar., 2010), u literaturi ima malo podataka o tačnom mehanizmu njihovog dejstva. Na osnovu dosadašnjih istraživanja, generalno se pokazalo da su Gram-pozitivne bakterije osetljivije na prisustvo etarskih ulja aromatičnih biljaka, ekstrakata i njihovih komponenti nego Gram-negativne. To se objašnjava postojanjem spoljašnje membrane kod Gram-negativnih bakterija, koja otežava difuziju hidrofobnih jedinjenja kroz liposaharidni omotač (Burt, 2007). Antibakterijsko delovanje hidrofobnih etarskih ulja ogleda se u strukturnim i funkcionalnim oštećenjima bakterijske ćelije putem različitih mehanizama, kao što su: napad na fosfolipidni dvoslojni omotač ćelijske membrane, razaranje enzimskih sistema koji sadrže genetski materijal bakterije i formiranje hidroksiperoksidaza masnih kiselina oksidacijom nezasićenih masnih kiselina (Arques i sar., 2010). Na taj način omogućava se oslobađanje jona i drugih materija iz ćelije bakterije i usporavanje njenog razvoja što dovodi do odumiranja bakterijske ćelije. Uzimajući u obzir broj

Tabela 7. Literaturni pregled- *In vitro* ispitivanja antimikrobnog dejstva ekstrakta timijana

Literatura	Biljka	ME	Mikroorganizmi	AA
Piccaglia i sar., 1993	<i>T. vulgaris</i>	HD	<i>Acinetobacter calcoacetica</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Alcaligenas faecalis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Beneckea natriagens</i> , <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Broctobrix thermosphacta</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Enterobacter nergenes</i> , <i>Erwinia carotovora</i> , <i>E. coli</i> , <i>Flavobacterium suaveolens</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Moraxella</i> sp., <i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella pullorum</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	ZI 9,2-60,0 mm
Cosentino i sar., 1999	<i>T. herbarona</i>	HD	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i>	MIK 225-900 µg/mL
Hammer i sar., 1999	<i>T. vulgaris</i>	HD	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Aeromonas sobria</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>S. aureus</i>	MIK 0,12-2% (v/v)
Pinto i sar., 2006	<i>T. pulegioides</i>	HD	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida Papsilosis</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigatus</i>	MIK 0,16-0,64 µg/mL
Šegvic Klarić i sar., 2007	<i>T. vulgaris</i>	HD	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>	MIK 1-20 µg/mL
Rota i sar., 2008	<i>T. vulgaris</i> <i>T. zizis</i>	HD	<i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. aureus</i>	ZI 19-45 mm ZI 10-35 mm
Žižovic i sar., 2009	<i>T. vulgaris</i>	NKE i HD	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus Stearotermophillus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E.coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i>	MIK 40-640 µg/cm ³
Mišić i sar., 2009a	<i>T. vulgaris</i>	NKE i HD	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus intermedius</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (MRSA), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (MRSA), <i>Staphylococcus intermedius</i>	MIK 160-2560 µg/mL
Širivaityte i sar., 2012	<i>T. vulgaris</i>	HD	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>E. coli</i>	ZI 12-50 mm
Ivanovic i sar., 2012	<i>T. vulgaris</i>	NKE i HD	<i>Bacillus Cereus</i> , <i>Geobacillus stearotermophillus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> ,	MIK 40-640 µg/mL

ME- metoda ekstrakcije; AA- antimikrobna aktivnost; NKE- natkritična ekstrakcija; HD- hidrodestilacija; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija; ZI- zona inhibicije

Tabela 8. Literaturni pregled- *In vitro* ispitivanja antimikrobnog dejstva timola

Literatura	Mikroorganizmi	Antimikrobna aktivnost
Muller-Riebau i sar., 1995	<i>F. moniliforme</i> , <i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>P. capsici</i>	MIK 100 µg/mL
Cosentino i sar., 1999	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i>	MIK 56-450 µg/mL
Vazquez i sar., 2001	<i>Penicillium citrinum</i>	IK 100-200 µg/mL
Delgado i sar., 2004	<i>Bacillus cereus</i>	MIK 0,4 mmol/L
Falcone i sar., 2005	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Candida lusitaniae</i> , <i>Pichia subpelliculosa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MIK 307-941 ppm
Pinto i sar., 2006	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida Papsilosis</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigatus</i>	MIK 0,16 µg/mL
Tippayatum i sar., 2007	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i>	MIK 3-4 mg/mL
Šegvic Klarić i sar., 2007	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>	MIK 1-3 µg/mL
Nobile i sar., 2008	<i>B. cereus</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>Pseudomonas spp.</i>	-
Braga i sar., 2008	<i>Candida albicans</i>	MIK 125 µg/mL
Liolios i sar., 2009	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. viridans</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>L. monocytogenes</i>	ZI 8-16,5 mm
Rivas i sar., 2010	<i>verocytotoxigenic Escherichia coli</i> , <i>Hafnia alevi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	MIK 500 µg/mL
Palaniappan i Holley, 2010	<i>S. Typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i>	MIK 0,63-2,5 mM
Cetin-Karaca, 2011	<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>S. choleraesuis subsp.</i>	MIK 5-20 ppm
Guarda i sar., 2011	<i>S. aureus</i> , <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>A. niger</i>	MIK 125-250 ppm
Ivanovic i sar., 2012	<i>Bacillus Cereus</i> , <i>Geobacillus stearotermophilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i>	MIK 160-320 µg/mL
Li i sar., 2012	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>	ZI 15-19 mm
Wattanasatcha i sar, 2012	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	ZI 2-5 cm

MIK- minimalna inhibitorna koncentracija; IK- inhibitorna koncentracija; ZI- zona inhibicije

komponentata koje ulaze u sastav etarskih ulja i biljnih ekstrakata, vrlo je verovatno da se antibakterijsko delovanje ostvaruje putem više mehanizama (Burt, 2007).

Timol utiče na strukturu i elektrostatičnost površine ćelijske membrane čime stvara asimetričnu tenziju membrane. Timol se rastvara u hidrofobnom delu citoplazmatične membrane između masnih acil lanaca (Delgado i sar., 2004) unutar lipidnog dvosloja membrane čime se remeti lipidno pakovanje. Na taj način se povećava fluidnost i propustljivost membrane, a samim tim i funkcije membrane (Braga i sar., 2008). Timol se vezuje za amino- i hidoksilamino-grupe proteina bakterijskih membrana (hidrofobno i vodoničnim vezama), pri čemu dolazi do oslobađanja lipopolisaharida čime se menja njihova permeabilnost što rezultuje smrtnom bakterija (Helander i sar., 1998; Stahl-Biskup i sar., 2004). Vrednost pH, takođe, utiče na dejstvo timola, pa tako pri nižim pH vrednostima (5,5-6,5) timol manje disosuje i hidrofobniji je pa može bolje da se veže za proteine i samim tim da se bolje rastvori u lipidnoj fazi (Ultee i sar., 2002). Kada su u pitanju gljivice, timol prouzrokuje razgradnju hifi gljivica čime dolazi do gubljenja sadržaja citoplazme (Stahl-Biskup i sar., 2004). Terpeni inhibiraju respiraciju kandida što ima nepovoljan efekat na mitohondrije. Timol utiče na proizvodnju filamentoznih formi *C. albicans* tokom rane faze rasta (Braga i sar., 2008). Remećenje permeabilnosti dovodi do gubitka makromolekula. Fenoli mogu inaktivirati esencijalne enzime, reagovati sa proteinima ćelijske membrane ili poremetiti funkcionalnost genetičkog materijala, ali tačni uzročno-posledični odnos dejstva fenola nije utvrđen (Šegvić Klarić i sar., 2007). Mehanizam dejstva u ćelijama sisara nije sasvim poznat ali se pretpostavlja da ima veze sa jakim antioksidativnim svojstvima koje ima timol (Mezzouga i sar., 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom radu korišćen je timol (čistoća > 99%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Kao prirodni izvor timola, za dobijanje ekstrakata u procesima natkritične ekstrakcije, upotrebljen je nadzemni deo timijana (*Thymus vulgaris* sorta „Deutscher Winter“, Pharmasaat) gajen u Srbiji 2013. god. Kao natkritični fluid korišćen je komercijalni CO₂ (čistoća 99%, Messer-Tehnogas, Srbija). Za sintezu ksero- i aerogelova korišćeni su: hitozan molarne mase 310000-375000 g/mol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), kukuruzni skrob u prahu (Industrija skroba Jabuka, Srbija) i granule tapioka skroba (Sainsbury's Supermarket LTD, London). Glutarialdehid (25%, ACROS Organics, Belgija) i formaldehid (36-38%, Lach-ner, Češka) su korišćeni kao umreživači u procesu pripreme gelova hitozana. Za pripremu gelova korišćeni su i sirćetna kiselina (Zorka Pharma, Srbija) i aceton (Zorka Pharma, Srbija). U procesima impregnacije timola upotrebljeni su i acetat celuloze sa acetatnim sadržajem 32,0% u obliku granula (Eastman, Poljska) i sterilna pamučna gaza sa gustinom tkanja 17 niti/cm² (Niva, Srbija).

U svrhu antimikrobnih ispitivanja korišćeni su: dinatrijum-hidrogenfosfat-dodekahidrat (Centrohem, Srbija), natrijum-dihidrogenortofosfat-dihidrat (Fischer Scientific), natrijum-hlorid (Lach-ner, Češka), tripton soja agar, tripton soja bujon i ekstrakt kvasca (Torlak, Srbija).

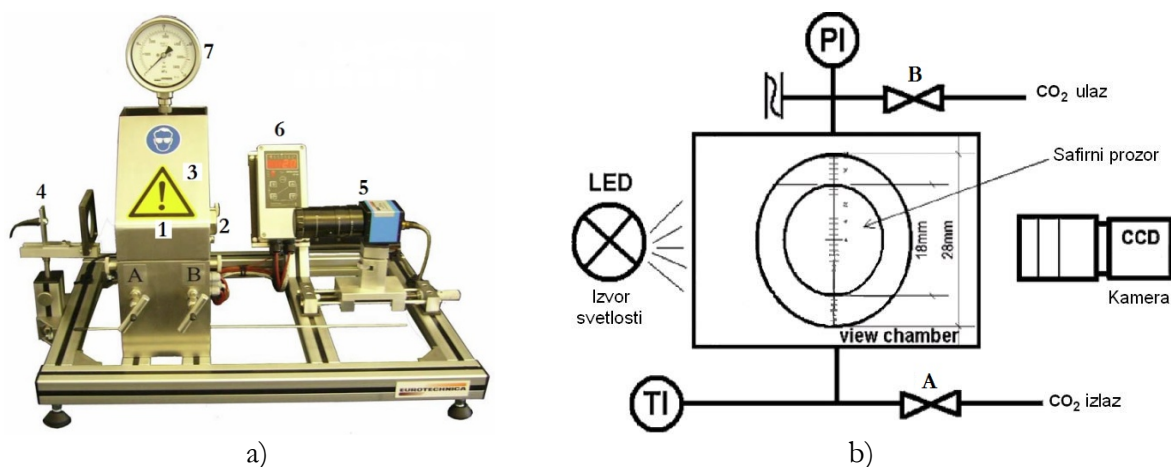
3.2. METODE

3.2.1. Određivanje rastvorljivosti timola

Rastvorljivost timola je određena statičkom metodom u ćeliji za rad pod visokim pritiscima (Eurotechnica GmbH, Nemačka) prikazanoj na Slici 10. Ćelija je uređaj za posmatranje materijala ili višefaznih sistema na povišenim pritiscima i temperaturama. Ona ima cilindričnu

unutrašnjost (Slika 10a, (1)) od nerđajućeg čelika sa zapreminom od 25 mL. Maksimalni radni pritisak je 35 MPa, dok maksimalna radna temperatura iznosi 150 °C. Brzo i uniformno zagrevanje ćelije omogućeno je električnom grejnom oblogom (Slika 10a, (3)). Promene unutar ćelije se mogu pratiti kroz safirne prozore (Slika 10a, (2)) pomoću izvora svetlosti (Slika 10a, (4)) i zabeležiti USB-CCD monohromnom kamerom (Slika 10a, (5)).

Eksperimentalni postupak je sledeći: uzorak timola (oko 1,00 g, odmereno na analitičkoj vagi sa četiri decimale) se smesti u staklenu čašicu koja se postavi unutar ćelije. Zatvore se safirni prozori i ventil A i sistem se dovede na željenu temperaturu. Zatim se pumpom za tečnosti visokog pritiska (Milton Roy, Francuska) (Slika 11c) CO₂ uvodi u sistem. Pritisak se prati pomoću manometra (Slika 10a, (7)), a temperatura pomoću kontrolora sa digitalnim displejom (Slika 10a, (6)). Nakon dostizanja željenog pritiska, zatvara se ventil B i sistem se održava na radnim uslovima u željenom vremenskom intervalu.



Slika 10. Čelija za rad pod visokim pritiscima: a) fotografija (1-ćelija, 2-safirni prozor, 3-grejna obloga, 4-izvor svetlosti, 5-kamera, 6-kontrolor i indikator temperature, 7-manometar) i b) uprošćena šema

Na kraju procesa, ventil A (Slika 10b) se otvara i pritisak se snižava do atmosferskog pritiska brzinom dekompresije od 0,33 MPa/min. Masa timola preostalog u čašici se određuje gravimetrijski analitičkom vagom tačnosti $\pm 0,1$ mg. Masa rastvorenog timola se izračunava kao razlika početne mase timola smeštenog u ćeliju i mase preostalog timola u čašici nakon dekompresije.

Opisanim postupkom, određena je rastvorljivost timola u nkCO_2 na temperaturama 35 °C, 40 °C i 50 °C i u opsegu pritisaka 7,8-25 MPa (za odabrani opseg gustina nkCO_2 335,89-849,60 kg/m^3).

3.2.2. Priprema polisaharidnih gelova

Procesni koraci za dobijanje ksero- i aerogelova sa polisaharidnom osnovom su sledeći: 1) formiranje gela iz vodenog rastvora čime se dobija hidrogel (formiranje gela je indukovano prometerom umrežavanja koji može biti hemijski pomoću umrežavajuće komponente ili fizički pomoću temperature ili pH), 2) zamena vode koja je prisutna u gelu rastvaračem, acetonom, koji vodi do stvaranja acetogela, 3) uklanjanje rastvarača iz gela (sušenje) čime se dobija ksero- ili aerogel u zavisnosti od izabrane metode sušenja.

Priprema acetogelova hitozana

Hidrogelovi hitozana su pripremljeni umrežavanjem zakišelenog vodenog rastvora hitozana odgovarajućim umreživačem na sobnoj temperaturi. Kao umreživači korišćeni su formaldehid i glutardialdehid.

Postupak umrežavanja sa formaldehidom

Prah hitozana se rastvori u 0,1 M sirćetne kiseline u masenom odnosu 1:100. Dobijeni rastvor hitozana se meša magnetnom mešalicom (Age Magnetic Stirrer, VELP Scientifica) brzinom mešanja od 1000 o/min na sobnoj temperaturi tokom 5 h. Zatim se, u cilju umrežavanja, počinje sa ukapavanjem formaldehida iz birete do zaustavljanja magnetnog zrna. Dobijeni hidrogel se, u cilju dobijanja acetogela prelije acetonom i ostavi u frižider na temperaturi od 8 °C.

Postupak umrežavanja sa glutardialdehidom

Prah hitozana se rastvori u 0,2 M rastvoru sirćetne kiseline u masenom odnosu 1,5:100. Dobijeni rastvor hitozana se meša magnetnom mešalicom (Age Magnetic Stirrer, VELP Scientifica) maksimalnom brzinom mešanja od 1000 o/min na sobnoj temperaturi tokom 2,5 h. Zatim se, u cilju umrežavanja, počinje sa ukapavanjem glutardialdehida iz birete do zaustavljanja magnetnog zrna. Dobijeni hidrogel se prelije acetonom i ostavi u frižider.

Priprema acetogelova kukuruznog i tapioka skroba

Za proces geliranja se koristi magnetna mešalica sa zagrevanjem (Heidolph MR Hei-Standard), uljano kupatilo, trogrli balon i termometri za uljano kupatilo i skrobnu suspenziju. Kada je uljano kupatilo zagrejano na željenu temperaturu, balon sa skrobom i destilovanom vodom u masenom odnosu 1:10 se stavlja u uljano kupatilo. Smeša skrob-voda se sve vreme meša magnetnim zrnom brzinom od 250-500 o/min. Nakon 20 minuta geliranja skroba na željenoj temperaturi, dobijeni hidrogel se izlije u petri šolju, prelije acetonom i ostavi u frižider na 8 °C da bi se dobio acetogel. Nakon 24 h, gel se iseče na diskove prečnika 1 cm, koji se zatim preliju svežim acetonom i ostave u frižider.

Opisanim postupkom, pripremljeni su hidrogelovi kukuruznog i tapioka skroba na temperaturama 70 °C, 80 °C, 90 °C i 100 °C.

3.2.2.1. Dobijanje kserogelova hitozana, kukuruznog i tapioka skroba

Kserogel hitozana se formira iz hidrogela koji je stajao potopljen u acetonu 6 dana. Dobijeni acetogel se, nakon odvajanja od viška rastvarača dodatno suši na vazduhu narednih 7 dana do dostizanja konstantne mase.

Kserogelovi skrobova su dobijeni od acetogelova skrobova, tako što su diskovi acetogelova izvađeni iz frižidera, odvojeni od acetona u kome su stajali 3 do 5 dana i ostavljeni da se osuše na vazduhu dok ne dostignu konstantnu masu.

3.2.2.2. Dobijanje aerogelova hitozana, kukuruznog i tapioka skroba

Aerogelovi su dobijeni sušenjem acetogelova pomoću nkCO_2 u posudi za rad pod visokim pritiscima (Autoclave Engineers Screening system) koja je prikazana na Slici 11. Uprošćena šema ovog postrojenja je prikazana na Slici 12. Ovaj sistem je predviđen za laboratorijska ispitivanja uz korišćenje CO_2 kao natkritičnog medijuma. Najveći dozvoljeni radni pritisak je 35 MPa na 238 °C.



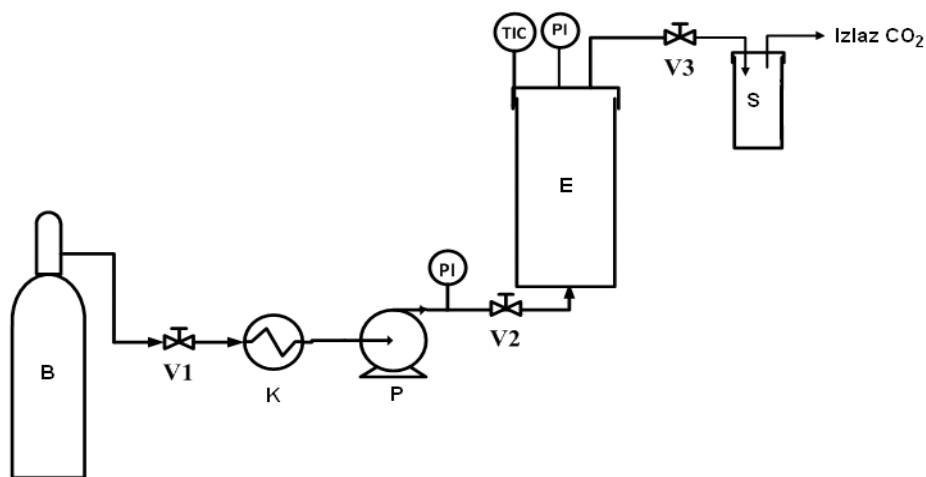
a)

b)

c)

Slika 11. a) Posuda za rad pod visokim pritiscima, b) ekstraktor i c) pumpa visokog pritiska

Delovi postrojenja su: boca sa CO₂ sa sifonom (B), kriostat (K), pumpa visokog pritiska za tečnosti (P), ekstrakcioni sud sa električnim grejačem, zapremine 300 cm³ (E) i separator (S). Pumpom za tečnosti visokog pritiska (Milton Roy, Francuska) (Slika 11c) ostvaruje se maksimalni izlazni pritisak od 42 MPa pri protoku od 0,5 kg/h. Glava pumpe se dodatno hladi radi obezbeđenja uslova za postojanje tečne faze CO₂.



Slika 12. Šema posude za rad pod visokim pritiscima

Acetogelovi se postavljaju na dno ekstraktora u metalne držače. Otvaranjem ventila V1, CO₂ se uvodi u ekstraktor koji je prethodno zagrejan do željene temperature. Nakon što se u sistemu dostigne željeni pritisak, ventili V1 i V2 se zatvaraju, i sistem se drži na željenim

uslovima određeno vreme. Proces sušenja se u zavisnosti od vrste uzorka, završi brzom ili sporom dekompresijom.

Metode i uslovi natkritičnog sušenja acetogelova hitozana

Uslovi i metode sušenja su izabrani na osnovu prethodnih studija koje su se bavile ispitivanjem natkritičnog sušenja acetogelova hitozana (Ozdemir i sar., 2013; Rinki i sar., 2009b) i preliminarnih ispitivanja.

Na acetogel hitozana koji je umrežen formaldehidom su primenjene dve metode natkritičnog sušenja. Metoda I: acetogel se suši u posudi za rad pod visokim pritiscima (Slika 12) pomoću nkCO_2 na temperaturi od 40 °C i pritisku od 20 MPa. Sušenje se odvija u dva koraka. Počinje se statičkim sušenjem (nakon što su dostignuti željeni pritisak i temperatura, ventili V2 i V3 su zatvoreni) koje traje 1 h i koje je praćeno brzom dekompresijom od 2,5 MPa/min. Nakon statičkog sušenja nastavlja se dinamičkim sušenjem (protok nkCO_2 kroz sistem) tokom 2 h, a koje se završava brzom dekompresijom od 2,5 MPa/min. Protok CO_2 kroz sistem tokom dinamičkog sušenja iznosi 0,35 kg/h. Metoda II: acetogel se suši na temperaturi od 50 °C i pritisku od 15 MPa. Sušenje se odvija u dva koraka (1 h statičkog i 2 h dinamičkog sušenja) isto kao u metodi I. Protok CO_2 kroz postrojenje tokom dinamičkog sušenja na ovim uslovima je iznosio 0,52 kg/h. Metoda III: acetogel hitozana umrežen glutardialdehidom se suši na temperaturi od 50 °C i pritisku od 15 MPa statičkom metodom 1 h nakon čega sledi brza dekompresija od 2,5 MPa/min. Ovaj postupak se ponavlja 5 puta.

Metode i uslovi natkritičnog sušenja acetogelova kukuruznog i tapioka skroba

Acetogelovi skroba su sušeni statičkom metodom. Nakon što su dostignuti željeni uslovi pritiska i temperature (20 MPa i 50 °C) svi ventili su zatvoreni i sistem je održavan na ovim uslovima 1 h. Nakon 1 h, pumpa je ponovo uključena i ventili V1, V2 i V3 (Slika 12) su otvoreni čime je CO_2 sa rastvorenim acetonom, izveden iz sistema i svežih 100 g CO_2 je uvedeno u sud. Protok nkCO_2 kroz sistem tokom zamene rastvarača sa rastvorenim acetonom čistim CO_2 je iznosio 0,59 kg/h. Nakon 10 min, svi ventili su zatvoreni i pumpa je isključena. Pritisak i temperatura su održavani konstantnim. Ovaj postupak jednočasovnog statičkog sušenja i zamene acetonom obogaćenog rastvarača svežim je ponavljen još tri puta, pri čemu

je ukupno vreme sušenja iznosilo 4 h i 40 min. Na kraju procesa je izvršena spora dekompresija u trajanju od 30 minuta.

3.2.3. Natkritična impregnacija

Impregnacija u ćeliji za rad pod visokim pritiscima

Impregnacija odabranih nosača (gelovi hitozana, gelovi kukuruznog i tapioka skroba i acetata celuloze) timolom, statičkom metodom, je izvedena u ćeliji za rad pod visokim pritiscima koja je opisana u poglavlju 3.2.1. i prikazana na Slici 10. Timol u staklenoj posudi je postavljen na dno suda, a odabrani nosači u poroznoj korpi od pocinkovanog čelika su postavljeni iznad timola. Nakon što je sud zatvoren i zagrejan, nkCO_2 je uveden sa vrha suda i pritisak je podignut do postizanja željenih uslova. Nakon željenog vremena impregnacije, CO_2 je izveden iz sistema sa dna suda brzinom od 0,3 MPa/min. Proces impregnacije svih nosača je izveden sa masenim odnosom nosač:timol 1:1 i sledećim operativnim uslovima: pritisak 15 MPa, temperatura 35 °C i vreme 24 h. Eksperimenti impregnacije AC su dodatno izvedeni i na pritiscima 10 MPa i 20 MPa i na temperaturi 50 °C tokom 2-44 h. Maseni odnos AC:timol je variran od 1:1 do 1:26 da bi se obezbedila dovoljna količina timola u sistemu tokom procesa.

Važno je napomenuti da se u naučnoj literaturi, u oblasti impregnacije poroznih struktura pod visokim pritiscima, termin količina impregnirane supstance koristi za celu količinu supstance koja je ostala zarobljena u poroznoj strukturi - bilo da se radi o adsorpciji u monosloju ili ne.

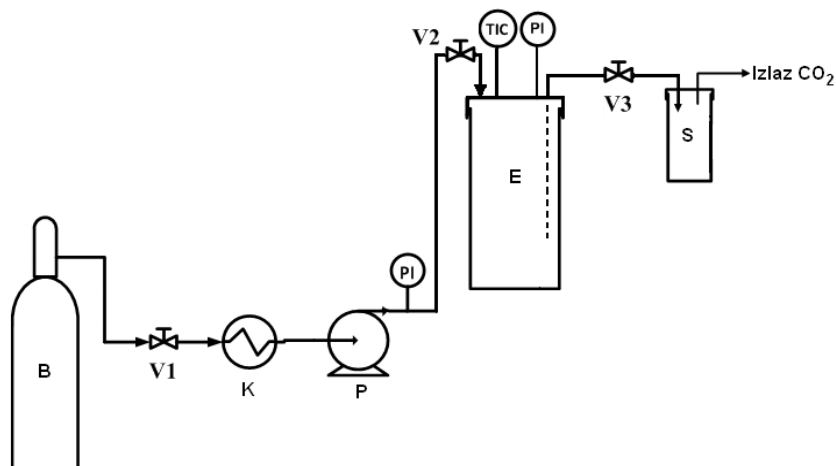
Masa impregniranog timola (m_{Timol}) je određena gravimetrijski iz razlike masa čvrstog nosača posle i pre impregnacije. Prinos impregnacije timola (I) je izračunat pomoću jednačine:

$$I(P, T, t) = \frac{m_{\text{Timol}}}{m_{\text{Nosač}} + m_{\text{Timol}}} \cdot 100\% \quad (1)$$

gde je $m_{\text{Nosač}}$ masa nosača na početku procesa.

Impregnacija u postrojenju za rad pod visokim pritiscima

Za statičku impregnaciju gaza timolom je korišćeno laboratorijsko postrojenje za rad pod visokim pritiscima (Autoclave Engineers Screening system) koje je opisano u poglavlju 3.2.2. na kome su modifikovani ulaz i izlaz CO₂ na način prikazan na Slici 13.



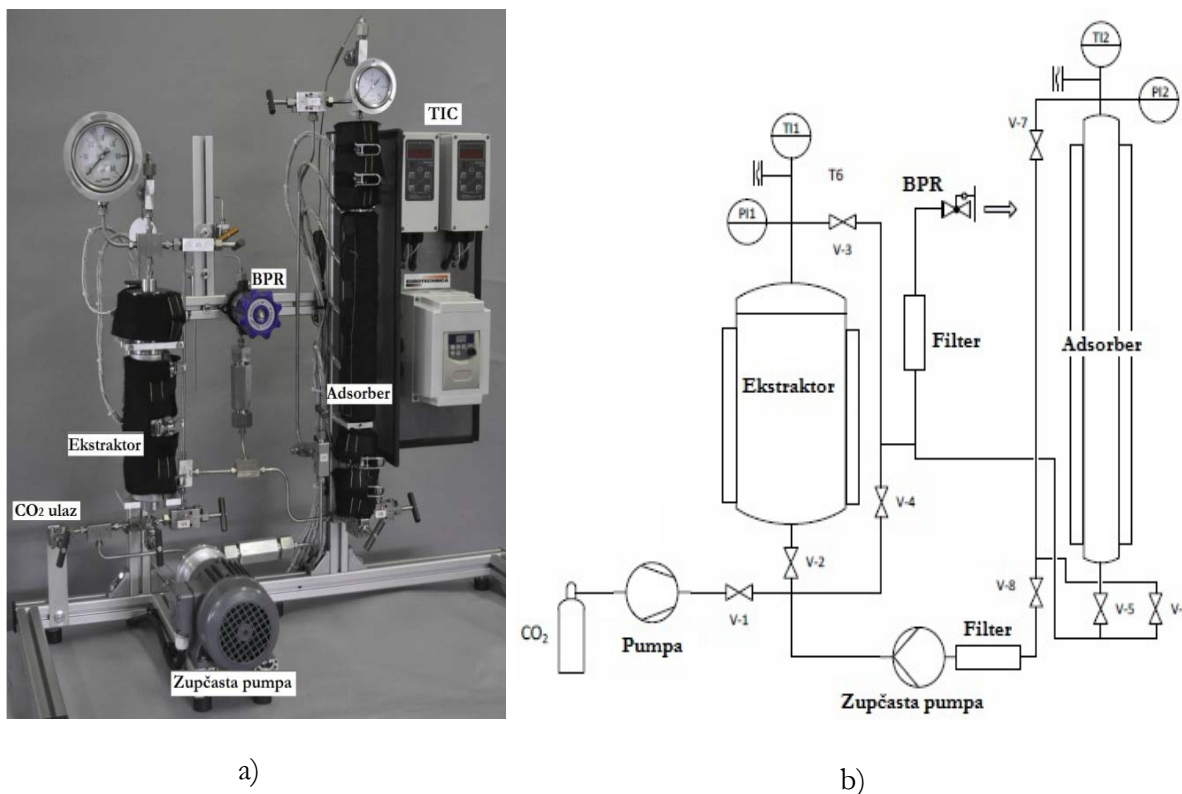
Slika 13. Šema posude za impregnaciju gaza

Gaza je stavljena u čelične držače i spakovana u ekstraktor, tako da stoji iznad timola a da ne dodiruje zidove ekstraktora. Između timola i gaza je stavljena porozna barijera sa porama veličine 0,09 mm pomoću koje je sprečeno da dođe do prskanja tečnog timola na gasu. Nakon što se temperatura kriostata spustila na -10 °C, i nakon što se ekstraktor zagrejavao na željenu temperaturu, CO₂ iz boce sa sifonom je uveden u sistem sa vrha ekstraktora. Nakon što je dostignut željeni pritisak od 15 MPa svi ventili su zatvoreni i ekstraktor sa gazom i timolom je održavan na ovim uslovima određeno vreme. Nakon završetka procesnog vremena impregnacije, CO₂ je izveden iz sistema sa dna reaktora, pri čemu je brzina dekompresije bila 0,33 MPa/min.

Integrisan proces ekstrakcije i impregnacije

Postrojenje u kome se izvodi integrisan proces ekstrakcije i impregnacije pod visokim pritiskom HPEA (High Pressure Extraction Adsorption) (Eurotechnica GmbH, Nemačka) je prikazano na Slici 14. Postrojenje je projektovano za laboratorijski rad sa nkCO₂ (P_{max}= 50

MPa i $T_{\max} = 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$). HPEA se sastoji od ekstraktora unutrašnje zapremine 280 mL (širine 38 mm i dužine 254 mm), adsorbera unutrašnje zapremine 100 mL (širine 17 mm i dužine 500 mm) i zupčaste pumpe za cirkulaciju nkCO_2 (P1).



Slika 14. Postrojenje HPEA 500: a) slika postrojenja i b) šema postrojenja

U postrojenju HPEA se mogu izvoditi procesi ekstrakcije, impregnacije i integrisan proces ekstrakcija-impregnacija pod visokim pritiskom u statičkom, semi-kontinualnom i kontinualnom režimu rada. Regulator pritiska BPR održava pritisak sistema konstantnim sa oscilacijama $\pm 0,5 \text{ MPa}$.

Natkritična ekstrakcija iz biljnog materijala bez impregnacije može biti izvedena u konfiguraciji u kojoj su otvoreni samo ventili V1, V2, V3 i BPR (Slika 14b). Na taj način nkCO_2 prolazi samo kroz ekstraktor u kome se nalazi biljni materijal. Nadzemni deo osušenog timijana se, nakon mlevenja, pakuje u filter kesice i smešta u ekstraktor. Sud se zatvara i nakon dostizanja željene temperature, CO_2 se uvodi u sistem otvaranjem ventila V1 i V2. Po

dostizanju željenog pritiska, otvara se ventil V3 čime je omogućen izlaz CO₂ sa ekstraktom. Ekstrakt se sakuplja u separatoru.

Optimizacija procesa NKE-NKI je izvedena korišćenjem timijana za ekstrakciju i gaze kao nosača za impregnaciju dobijenog ekstrakta. Samleveni timijan je spakovan u cev od nerđajućeg čelika (zapremine 150 mL sa perforacijama na dnu i vrhu) koja je smeštena u ekstraktor. Prethodno izmeren nosač je spakovan u adsorber i uključeno je zagrevanje oba suda. Kada se temperatura ustalila na 35 °C, otvoren je ventil V1 (Slika 14b) i CO₂ je uveden u ekstraktor kroz otvoren ventil V2, a zatim kroz ventile V3 i V5 u adsorber. Kada je dostignut pritisak od 15 MPa, prekida se dovod CO₂ u sistem (zatvara se ventil V1 i isključuje pumpa), a otvaraju se ventili V7 i V8 i uključuje se zupčasta pumpa (30,0 o/min) u cilju cirkulacije fluida kroz sistem. Optimizacija integrisanog procesa je izvedena korišćenjem dve različite metode. Metoda 1 podrazumeva jednokratno punjenje postrojenja HPEA sa CO₂ i cirkulaciju fluida istovremeno kroz ekstraktor i adsorber tokom različitih vremenskih perioda. Metoda 2 podrazumeva semi-kontinualan rad (rad u ciklusima) sa kombinacijom cirkulacije fluida prvo istovremeno kroz ekstraktor i kroz adsorber određeno vreme, a zatim cirkulacije rastvora samo kroz adsorber određeno vreme. Nakon svakog ciklusa, izvršena je dekompresija adsorbera i merena je masa impregniranog nosača. Masa ekstrakta koji je izašao iz sistema tokom dekompresije je sakupljana u separatoru i takođe merena. Tokom dekompresije adsorbera, ekstraktor je bio zatvoren i održavan pod pritiskom. Nakon merenja, impregnirani nosač je vraćan u adsorber, koji je zatvoren i vraćen na radni pritisak uvođenjem nove količine CO₂. Nakon završenog procesa je izvršena dekompresija sistema brzinom 0,33 MPa/min. Uslovi optimizovanog integrisanog procesa NKE-NKI su dalje primenjeni i na impregnaciju ekstrakta timijana na odabrane nosače (hitozan aerogel, kserogel kukuruznog skroba i acetat celuloze).

Prinosi ekstrakcije (Y) i impregnacije (Imp) kao i efikasnost ekstrakcije (E^{ef}) i impregnacije (I^{ef}) ekstrakta timijana su izračunati korišćenjem sledećih jednačina:

$$Y(P, T, t) = \frac{m_{TE}}{m_T} \cdot 100\% \quad (2)$$

$$Imp(P, T, t) = \frac{m_{TE}^{IMP}}{m_{TE}^{IMP} + m_{Nosač}} \cdot 100\% \quad (3)$$

$$E^{ef} = \frac{Y(P,T,t)}{Y^*(P,T,t \rightarrow \infty)} \cdot 100\% \quad (4)$$

$$I^{ef}(P,T,t) = \frac{m_{TE}^{IMP}}{m_T} \cdot 100\% \quad (5)$$

gde su m_T - masa timijana smeštenog u ekstraktor, m_{TE} - masa ekstrakta timijana (izračunata kao suma impregniranog ekstrakta i ekstrakta koji je sakupljen u separatoru), m_{TE}^{IMP} - masa impregniranog ekstrakta timijana i t - vreme procesa. Efikasnost ekstrakcije (E^{ef}) je računata u odnosu na prinost ekstrakcije koji je postignut u zasebnom eksperimentu nakon dovoljno dugog vremena ekstrakcije ($Y^*(P,T,t \rightarrow \infty)$). Efikasnost impregnacije (I^{ef}) se odnosi na frakciju impregniranog ekstrakta u odnosu na ukupni ekstrakt izolovan iz biljnog materija u datom eksperimentu.

3.2.4. Matematički modeli za korelisanje rastvorljivosti supstanci u natkritičnom fluidu

Prvu jednačinu koja povezuje rastvorljivost rastvorka i gustinu natkritičnog fluida u naučnu literaturu je uveo Chrastil (Chrastil, 1982). Do predložene jednačine se može doći uz sledeće pretpostavke: molekuli rastvorka stupaju u interakciju sa molekulima ugušćenog gasa i obrazuju rastvorni kompleks koji je u ravnoteži sa gasom. U idealnom slučaju, ako jedan molekul rastvorka A stupa u interakciju sa k molekula gasa B da bi obrazovao jedan molekul rastvorljivog kompleksa AB_k koji je u ravnoteži sa sistemom, može se napisati:



$$K = \frac{[AB_k]}{[A][B]^k} \quad (7)$$

$$\ln K + \ln[A] + k \ln[B] = \ln[AB_k] \quad (8)$$

gde je $[A]$ molarna koncentracija pare rastvorka, $[B]$ je molarna koncentracija gasa i $[AB_k]$ je molarna koncentracija kompleksa. K je konstanta ravnoteže koja može biti izražena kao:

$$\ln K = \frac{\Delta H_{Solv}}{RT} + q_s \quad (9)$$

gde je ΔH_{Solv} toplota rastvaranja dok je q_s konstanta, a T (K) temperatura. Molarna koncentracija pare rastvorka $[A]$ može se aproksimirati Clapeyron-Clausius-ovom jednačinom:

$$\ln[A] = \frac{\Delta H_{vap}}{RT} + q_V \quad (10)$$

gde je ΔH_{vap} toplota isparavanja rastvorka dok je q_V je konstanta. Uobičajeno je da je koncentracija pare rastvorka znatno manja od koncentracije kompleksa ($[A]$ $[AB_k]$). Kombinujući jednačine (8), (9) i (10), uz prethodno pomenuti uslov, dobija se:

$$\frac{\Delta H}{RT} + q + k \ln[B] = \ln[AB_k] \quad (11)$$

gde je ΔH ukupna toplota reakcije ($\Delta H = \Delta H_{sol} + \Delta H_{vap}$) i $q = q_s + q_V$.

Da bi se molarna koncentracija prevela u masenu koncentraciju, može se napisati:

$$[AB_k] = \frac{c}{M_A + kM_B} \quad (12)$$

$$[B] = \frac{\rho}{M_B} \quad (13)$$

gde je c masena koncentracija rastvorka u natkritičnom fluidu (kg/m^3), ρ je gustina fluida (kg/m^3), a M_A i M_B su molarne mase rastvorka i gasa. Iz jednačina (11), (12) i (13), dobija se:

$$\frac{\Delta H}{RT} + q + k \ln d - k \ln M_B = \ln c - \ln(M_A + kM_B) \quad (14)$$

Iz jednačine (14) se dobija Chrastil-ova jednačina:

$$c = \rho^{e_1} \exp\left(a_1 + \frac{a_2}{T}\right) \quad (15)$$

gde su a_1 i a_2 konstante rastvorljivosti pri čemu je a_2 funkcija entalpije rastvaranja i entalpije isparavanja ($a_2 = \Delta H / R$), dok je a_1 funkcija k i molarnih masa rastvoraka i natkritičnog fluida ($a_1 = \ln(M_A + kM_B) + q - k \ln M_B$). Koeficijenti rastvorljivosti e_1 , a_1 i a_2 imaju fizičko značenje koje se ogleda u sledećem: pretpostavljeno je da je jedan molekul rastvorka u interakciji sa e_1 molekula fluida; konstanta a_1 zavisi od molekulske mase rastvorka i rastvarača i takođe je funkcija e_1 ; konstanta a_2 je proporcionalna toploti rastvaranja i toploti isparavanja rastvorka.

Chrastil je utvrdio da je logaritamska zavisnost između gustine i rastvorljivosti linearna i za relativno visoke koncentracije rastvorka (100-200 g/L). Njegova jednačina je jednostavna za korišćenje i uključuje pretpostavku da je vrednost parametra k konstantna i da ne zavisi ni od gustine ni od temperature. Pored brojnih prednosti, ova jednačina ima ograničenja. Pri velikim

vrednostima rastvorljivosti rastvorka (većim od 200 g/L) gustina u Chrastil-ovoj jednačini mora biti korigovana. Takođe, ova jednačina nije validna za širok raspon temperatura. Zbog ovih ograničenja, razvijeno je nekoliko modifikovanih formi Chrastil-ove jednačine (Sparks i sar., 2008).

Adachi i Lu (Adachi i Lu, 1983) su modifikovali Chrastil-ovu jednačinu da bi proširili njene mogućnosti korelisanja podataka. Modifikovana jednačina ima oblik:

$$c = \rho^{e_1 + e_2 \rho + e_3 \rho^2} \exp\left(a_1 + \frac{a_2}{T}\right) \quad (16)$$

Adachi i Lu ističu da se korišćenjem ove zavisnosti postiže bolje slaganje sa eksperimentalnim rezultatima jer izoterme koje su dobijene crtanjem grafika nisu potpuno linearne.

Del Valle i Aguilera (Del Valle and Aguilera, 1988) su modifikovali Chrastil-ovu jednačinu temperaturnom zavisnošću entalpije rastvaranja, pri čemu modifikovana jednačina ima oblik:

$$c = \rho^{e_1} \exp\left(a_1 + \frac{a_2}{T} + \frac{a_3}{T^2}\right) \quad (17)$$

Molska frakcija timola u nkCO₂ može biti izračunata pomoću sledećeg izraza (Sovove i Jež, 1994):

$$y = \frac{c}{c + \frac{M_2}{M_1} \rho} \quad (18)$$

gde su M_1 and M_2 molarne mase nkCO₂ i timola.

Parametri modela su izračunati minimiziranjem srednje apsolutne relativne greške (AARD) funkcije koristeći Excel-Solver alatku:

$$AARD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{y_{i,exp} - y_{i,cal}}{y_{i,exp}} \right| \cdot 100\% \quad (19)$$

gde je n broj eksperimentalnih tačaka, $y_{i,exp}$ je eksperimentalna vrednost molske frakcije timola u nkCO₂ za eksperimentalnu tačku i , a $y_{i,cal}$ je izračunata vrednost molske frakcije timola u nkCO₂ koja odgovara tački i .

3.2.5. Kinetički model za korelisanje impregnacije tkanine

Chairat (Chairat i sar., 2008) i Gamal (Gamal i sar., 2010) su primenili kinetičke jednačine pseudo-prvog (jednačina 20) i pseudo-drugog (jednačina 21) reda za modelovanje adsorpcije boje u/na pamučna vlakna:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (20)$$

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (21)$$

gde je q_e masa supstrata adsorbovanog po masi pamuka u ravnoteži, q_t je vremenski zavisna masa supstrata adsorbovanog po masi pamuka, t je vreme adsorpcije, k_1 i k_2 su kinetičke konstante pseudo-prvog i pseudo-drugog reda. Iste jednačine su primenjene i u ovoj studiji za modelovanje kinetike impregnacije timola u pamučnu gazu.

Najbolje slaganje eksperimentalnih i izračunatih vrednosti se može dobiti minimizovanjem sume kvadrata razlike (residual sum of square- RSS):

$$RSS = \sum_{i=1}^n [Y_i - Y_{cal}]^2 \quad (22)$$

gde su Y_i i Y_{cal} vrednosti q_t koje su dobijene eksperimentalno i pomoću modela.

3.2.6. Metode analize

FESEM karakterizacija polimernih nosača

Morfologija polimernih nosača je ispitana pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa FESEM (Mira3 XMU Tescan, Republika Češka) pri voltaži od 10 kV (Slika 15a). Pre analize uzorci su presvučeni tankim slojem Au/Pd (85/15) pomoću neparivača (Polaron SC502, Fisons Instruments, UK).

FTIR karakterizacija pamučne gaze

FTIR kontrolne gaze i gaze impregnirane timolom je snimljen u ATR modu koristeći Nicolet 6700 FT-IR Spektrometar (Thermo Scientific) u 2 cm^{-1} rezoluciji u opsegu talasnih brojeva $500\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$.

BET adsorpciona izoterma

Adsorpciono-desorpciono izoterme azota za polisaharidne gelove su određene korišćenjem uređaja Micromeritics ASAP 2020 (Slika 15b).



a)



b)

Slika 15. Aparatura za karakterizaciju polimera: a) Mira3 Tescan i b) Micromeritics

Uzorci su prvobitno degasifikovani na 105 °C tokom 10 h pod sniženim pritiskom. Specifična površina uzoraka je izračunata prema BET modelu korišćenjem linearnih delova adsorpcionih izoterma azota. Ukupna zapremina pora (V_{tot}) je dobijena na relativnom pritisku $p/p_0=0,998$. Zapremina mezopora je izračunata prema metodi Barret-Joyner-Halend-a (BJH) iz desorpcionih grana izoterma. Zapremina mikro pora je izračunata iz alfa-S krive.

Određivanje sorpcije vode acetat celuloze

Kapacitet sorpcije vode acetat celuloze je određen prema metodi koju je opisala Dias sa saradnicima (Dias i sar., 2011). Perlice acetata celuloze su potopljene u 4D destilovanu vodu na 25 °C. Nakon određenog vremena (koje varira), perlice se vade iz vode. Nakon uklanjanja viška vode sa njihove površine, masa perlica se meri na vagi tačnosti $\pm 0,1$ mg. Kapacitet sorpcije vode se računa kao odnos mase uzorka nakon vremena t i početne mase suvog uzorka.

Kinetika *in vitro* otpuštanja timola

Kinetika otpuštanja timola iz impregniranog acetata celuloze u 4D destilovanoj vodi praćena je korišćenjem spektrofotometra (Cary 100 Scan, Varian) na 274 nm. Impregnirani uzorak se potopi u 50 mL ili 400 mL (u zavisnosti od količine impregniranog timola) destilovane vode

na 25 °C bez mešanja. U određenim vremenskim intervalima, uzima se alikvot (2,5 mL) rastvora za analizu i zatim vraća u rastvor. Otpuštanje timola iz impregniranih uzoraka se prati tokom tri nedelje. Koncentracija otpuštenog timola u rastvoru se računa korišćenjem prethodno određene kalibracione krive na 274 nm.

U svrhu matematičkog opisivanja krivih otpuštanja timola primenjena je jednačina koju su predložili Korsmeyer i Peppas (Korsmeyer i Peppas, 1981):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (23)$$

gde su M_t i M_∞ količine bioaktivne supstance koja je otpuštena u vremenu t i u beskonačno dugom vremenu; n je eksponent otpuštanja i k je kinetička konstanta.

Određivanje hemijskog sastava ekstrakta timijana

Gasnohromatografska analiza izvršena je na Hewlett-Packard gasnom hromatografu, model HP-5890 Series II apparatus (Hewlett-Packard, Nemačka), opremljenom split-splitless injektorom i autosemplerom povezanim sa HP-5 kolonom (25 m x 0,32 mm, debljine filma 0,52 µl) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Noseći gas je bio vodonik (1 mL/min) i korišćen je split režim od 1:30. Temperatura injektora iznosila je 250 °C, detektora 300 °C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40-260 °C (4 °C/min), a potom održavana konstantnom 10 min na 260 °C. Nakon postizanja zadatih uslova, injektovano je 1 µl rastvora uzoraka u hloroformu. Procenti površina pikova, dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC/FID), uzeti su kao osnova za kvantifikacione svrhe.

3.2.7. Određivanje antimikrobne aktivnosti impregniranog nosača

Antimikrobna aktivnost impregniranog acetata celuloze i impregnirane gaze ispitana je u odnosu na *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* ATCC 24433. Za gazu su dodatno testirani i sojevi *B. subtilis* ATCC 6633 i *E. faecalis* ATCC 29812. U svrhu kvantitativnog opisivanja antimikrobne aktivnosti primenjen je standardni mikrobiološki test ASTM E 2149-01 (AST, 2001). Mikrobni inokulumi su pripremljeni u tečnoj podlozi tripton

soja bujonu (TSB). Za ispitivanje je korišćen standardni (1%) inokulum prekonoćne kulture (16-18 h). TSB, obogaćena sa 0,6% kvašćevog ekstrakta, se priprema po uputstvu proizvođača. Tečna podloga je pre upotrebe sterilisana u autoklavu (Sutjeska, Srbija) na temperaturi od 120 °C u vremenu od 30 min i pri pritisku od 1,5 bar. Broj mikroorganizama u inokulumu je određen metodom decimalnog razblaženja. 0,1 mL rastvora se zasejava u sterilne Petri šolje na čvrstoj podlozi tripton soja agar (TSA). Podloga TSA je pripremana prema uputstvu proizvođača korišćenjem TSA obogaćenog sa 0,6% kvašćevog ekstrakta. Podloga je sterilisana u autoklavu na temperaturi od 120 °C u vremenu od 30 min i pri pritisku od 1,5 bar. Rastvor fosfatnog pufera (pH=7,2) je korišćen kao medijum za testiranje. U postupku ispitivanja antimikrobne aktivnosti acetata celuloze, 10 mL sterilnog rastvora fosfatnog pufera je zasejano sa 0,1 mL mikrobnog inokuluma. 0,2 g kontrolnog acetata celuloze i acetata celuloze impregniranog timolom, koji su prethodno sterilisani UV zracima (30 min), je stavljeno u erlenmajer i mešano 2 h u vodenom kupatilu na 37 °C. 1 mL alikvota iz erlenmajera je razblaženo sa fiziološkim rastvorom u odnosu 1:10 i 1:100. 0,1 mL dobijenog rastvora je zasejano na podlogu TSA u Petri šoljama i zatim termostatirano 24 h. U postupku ispitivanja antimikrobne aktivnosti gaze, mikroorganizmi su gajeni u 3 mL tečne podloge TSB bujona na 37 °C. Ostavljeni su preko noći čime je obezbeđeno da mikrobi budu u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta. 50 mL sterilnog rastvora fosfatnog pufera je zasejano sa 0,5 mL mikrobnog inokuluma. 1 g sterilne gaze isečen na male komade (oko 1x1 cm) je stavljen u erlenmajer. Erlenmajeri su mućkani 2 h u vodenom kupatilu WNE 14 (Memert, Nemačka) na 37 °C. 1 mL alikvota iz erlenmajera je razblaženo sa fiziološkim rastvorom u odnosu 1:10 i 1:100 i 0,1 mL rastvora je zasejano na podlogu TSA u Petri šoljama i zatim termostatirano 24 h na 37 °C.

Procenat redukcije mikroorganizama (R) je izračunat korišćenjem sledeće jednačine:

$$R = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100\% \quad (24)$$

gde je C_0 (CFU – colony forming units) je broj mikrobnih kolonija na kontrolnom uzorku (neimpregniran uzorak) i C (CFU) je broj mikrobnih kolonija izraslih posle kontakta sa uzorkom koji je impregniran timolom.

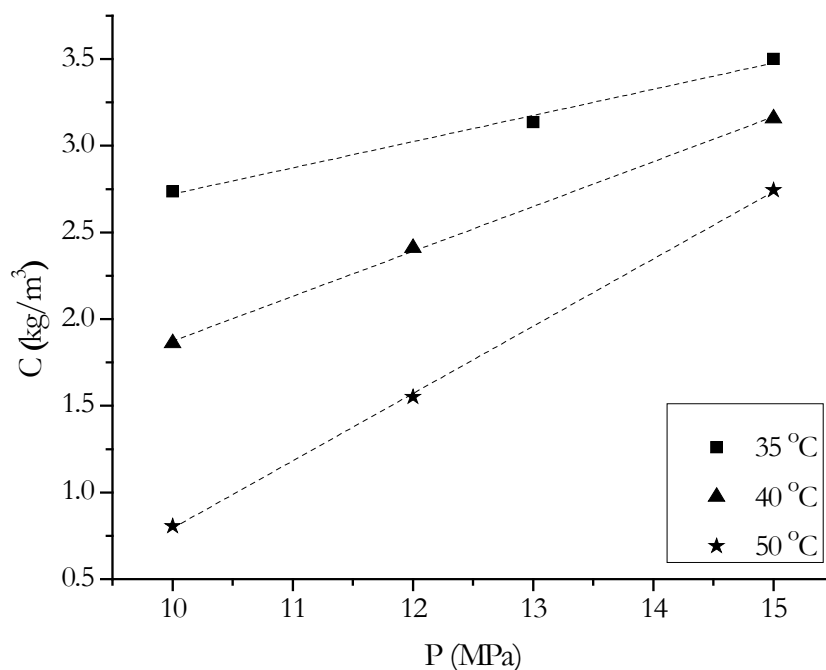
Agar disk difuzioni test je korišćen za kvalitativnu procenu antimikrobne aktivnosti acetata celuloze i gaze u odnosu na *E. coli*, *S. aureus* i *C. albicans*, s tim što je za gazu ispitan i *B. subtilis*. Mikrobni inokulumi su pripremljeni u TSB koji je upotrebljen kao medijum za rast mikroba. Mikrobi su kultivisani u 3 mL bujona na 37 °C i ostavljeni preko noći (kasna eksponencijalna faza rasta). Kontrolni uzorci i uzorci impregnirani timolom su sterilisani UV svetlošću 30 min nakon čega su postavljeni na TSA koji je inokuliran željenim mikroorganizmom. Prečnik zone inhibicije je određen posle 24 h inkubacije na 37 °C.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. RASTVORLJIVOST TIMOLA U NATKRITIČNOM UGLJENIK(IV)-OKSIDU

4.1.1. Eksperimentalni rezultati

Rastvorljivost timola u nkCO_2 je određena statičkom metodom u ćeliji za rad pod visokim pritiscima na način opisan u poglavlju 3.2.1. Za preliminarne eksperimente, odabrano je operativno vreme od 2 h, pritisak 10 MPa, 12 MPa i 15 MPa za temperature 35 °C, 40 °C i 50 °C. Dobijeni rezultati se mogu videti na Slici 16. Može se uočiti da koncentracija timola u nkCO_2 raste sa povećanjem pritiska i sniženjem temperature (za izabrani opseg pritiska i temperatura). Najveća koncentracija timola u nkCO_2 je postignuta na 15 MPa i 35 °C.



Slika 16. Promena koncentracije timola u nkCO_2 za 2 h sa temperaturom i pritiskom

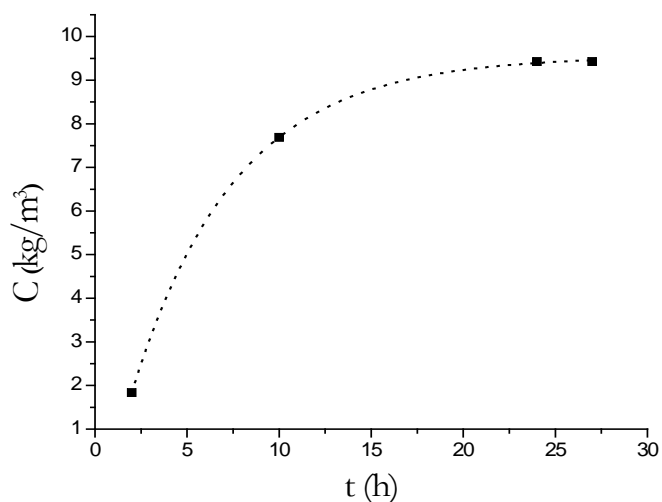
Na Slici 17 je prikazana fazna promena timola usled izloženosti ugušćenom gasu, kao i nivo tečnosti u čašici tokom vremena. Naime, timol koji je na sobnoj temperaturi i atmosferskom

pritisku u kristalnom stanju (Slika 17a), ubrzo nakon uvođenja CO₂ i dostizanja pritiska od oko 4 MPa, prelazi u tečno stanje (Slika 17b). Nakon 6 h izloženosti natkritičnom fluidu na 40 °C i 10 MPa, vidi se značajno smanjenje nivoa tečnog timola (Slika 17c) zbog njegovog rastvaranja u nkCO₂. Da bi se odredilo koliko je vremena potrebno za dostizanje ravnoteže u posmatranom sistemu, praćena je promena koncentracije timola u natkritičnom fluidu tokom 28 h na 10 MPa i 40 °C. Koncentracija timola u nkCO₂ je računata na osnovu eksperimentalno određene mase rastvorenog timola (razlika u masi timola u čašici pre i posle eksperimenta) i poznate zapremine natkritičnog fluida u ćeliji. Rezultati ovog eksperimenta su prikazani na Slici 18.



Slika 17. Timol u ćeliji za posmatranje a) pre uvođenja CO₂ u sistem, b) nakon 2 h i c) nakon 6 h na 40 °C i 10 MPa

Sa Slike 18 se može uočiti da koncentracija rastvorenog timola brzo raste tokom prvih nekoliko sati, dok je nakon 10 h izloženosti natkritičnom fluidu, rast koncentracije znatno sporiji. Svoju maksimalnu vrednost, u posmatranom sistemu, koncentracija dostiže nakon 24 h. Na osnovu dobijenih rezultata, vreme od 24 h je odabrano za operativno vreme u eksperimentima određivanja rastvorljivosti timola na različitim uslovima temperature i pritiska.



Slika 18. Promena koncentracije timola u nkCO₂ sa vremenom (40 °C i 10 MPa)

Molske frakcije timola u nkCO_2 na temperaturama 35 °C, 40 °C i 50 °C i pritiscima u opsegu od 7,8 MPa do 25 MPa (za opseg gustina nkCO_2 od 335,89 kg/m^3 do 849,60 kg/m^3) su računane pomoću jednačine (18), a na osnovu eksperimentalno određene količine rastvorenog timola u sistemu (razlika u masi timola u čašici pre i posle eksperimenta). Dobijene vrednosti su predstavljene u Tabeli 9.

Tabela 9. Molska frakcija timola u nkCO_2 na 35 °C, 40 °C i 50 °C

P (MPa)	$y \cdot 10^3$	ρ (kg/m^3)	P (MPa)	$y \cdot 10^3$	ρ (kg/m^3)	P (MPa)	$y \cdot 10^3$	ρ (kg/m^3)
35 °C			40 °C			50 °C		
7,8	0,90	335,89	8,5	0,84	356,78	10,0	1,88	385,35
8,0	2,37	426,85	9,0	1,26	487,29	11,0	3,05	504,10
8,2	4,64	545,32	10,0	4,49	629,75	14,0	7,05	673,58
8,7	6,12	637,35	13,0	6,77	744,09	16,0	8,15	723,17
12,5	9,27	777,71	16,0	8,65	795,79	25,0	14,7	834,97
15,5	11,0	822,08	21,0	12,3	849,60			

Mukhopadhyay i De (Mukhopadhyay i De, 1995) su merili rastvorljivost timola u nkCO_2 statičkom metodom na 50 °C i 70 °C i pritisku do 14 MPa. Autori su na 50 °C dobili rezultate slične rezultatima dobijenim u ovom radu. Pomenuti autori su dobili vrednosti molskih frakcija timola na 50 °C u opsegu od $0,83 \cdot 10^3$ (na 7,8 MPa) do $7,21 \cdot 10^3$ (na 12,7 MPa), dok su vrednosti dobijene u ovoj studiji za temperaturu 50 °C u opsegu od $1,88 \cdot 10^3$ (na 10 MPa) do $7,05 \cdot 10^3$ (na 14 MPa) i $14,7 \cdot 10^3$ (na 25 MPa).

Sovova i Jež (Sovova i Jež, 1994) su merile rastvorljivost mentola u nkCO_2 dinamičkom metodom u opsegu temperatura od 35 °C do 55 °C i pritisku do 11,56 MPa. Autori su dobili da je vrednost molske frakcije mentola na 35 °C u opsegu od $0,96 \cdot 10^3$ (na 7,52 MPa) do $12,6 \cdot 10^3$ (na 8,11 MPa), dok su vrednosti dobijene za molsku frakciju timola u ovoj studiji u opsegu od $0,9 \cdot 10^3$ (na 7,8 MPa) do $6,12 \cdot 10^3$ (na 8,7 MPa) i $11,0 \cdot 10^3$ (na 15,5 MPa) na temperaturi 35 °C.

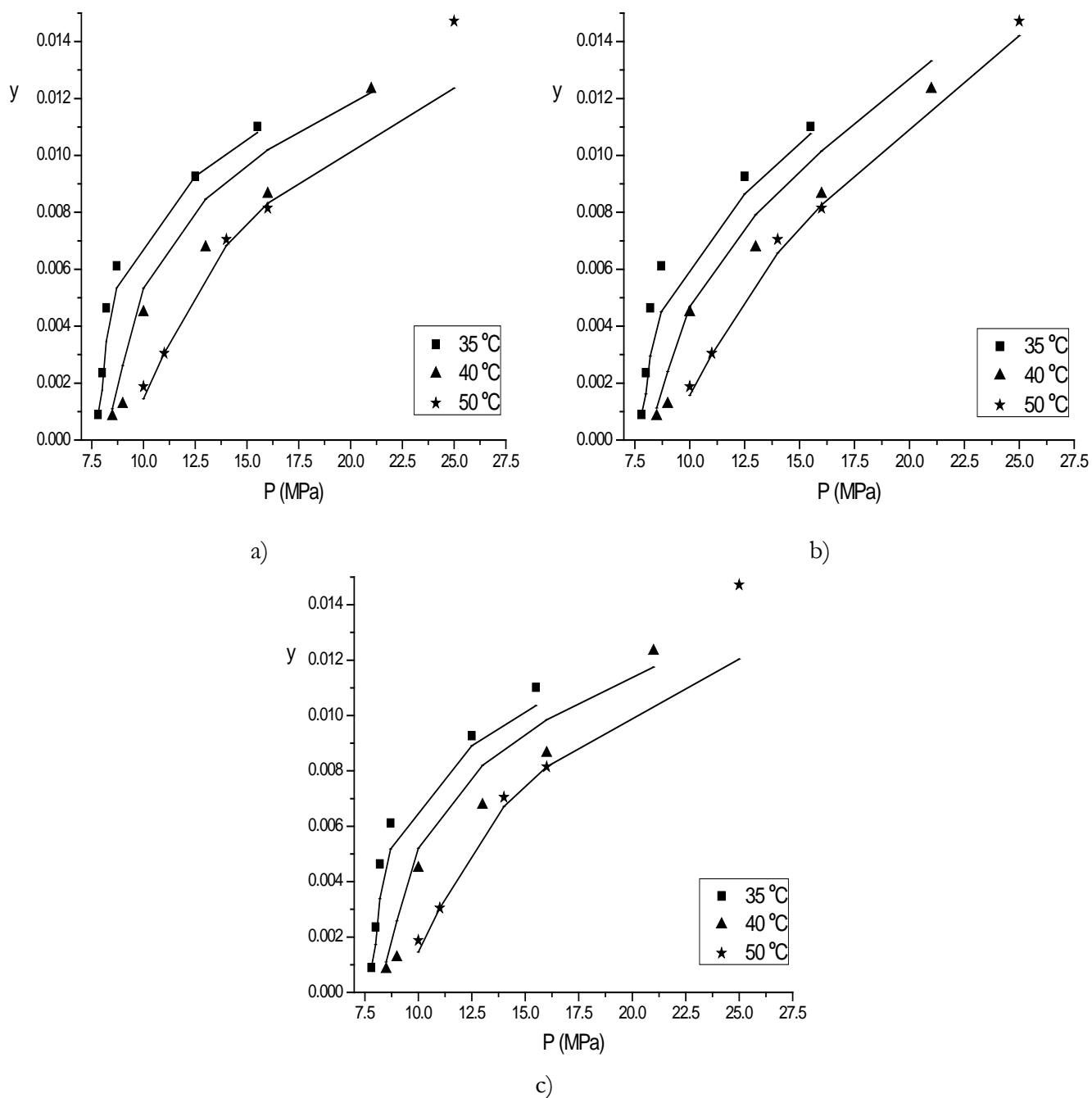
4.1.2. Korelisanje podataka o rastvorljivosti

Korelisanjem eksperimentalnih rezultata, izračunatih molskih frakcija timola prikazanih u Tabeli 9 primenom Chrastil, Adachi-Lu i Del Valle-Aguilera modela, dobijene su krive tri primenjena modela koje su predstavljene na Slici 19. Parametri primenjenih jednačina dati su u Tabeli 10.

Tabela 10. Parametri primenjenih semi-empirijskih jednačina za korelisanje podataka o rastvorljivosti

Jed.	e_1	e_2	e_3	a_1	a_2	a_3	T (°C)	AARD (%)	(%)
Chrastil	3,7876	/	/	-19,9815	-621,7667	/	35	10,99	17,82
							40	33,64	
							50	8,85	
Adachi i Lu	5,0732	-1,15E-03	7,63E-07	-23,0883	-1427,9593	/	35	16,84	16,45
							40	27,34	
							50	5,17	
Del Valle i Aguilera	3,7404	/	/	-19,3191	-754,6777	4079,9090	35	12,16	16,27
							40	31,30	
							50	5,35	

Sa Slike 19 se može videti da se sve testirane jednačine mogu upotrebiti za korelisanje rastvorljivosti timola u nkCO_2 . Prema vrednostima (Tabela 10) najveća preciznost je dobijena u slučaju del Valle-Aguilera modela, praćeno modelom Adachi-Lu. Sa Slike 19. se može uočiti i da su rastvorljivosti dobijene na 35 °C i nižim pritiscima uporedive sa vrednostima rastvorljivosti koje su dobijene na 50 °C i višim pritiscima. Uzevši u obzir i činjenicu da viši pritisci pogoduju koekstrakciji jedinjenja veće molarne mase iz biljnog materijala, a na osnovu dobijenih rezultata, temperatura od 35 °C i pritisak od 15 MPa su odabrani kao optimalni operativni uslovi za proces impregnacije. Na tim uslovima rastvorljivost timola u nkCO_2 iznosi 31,3 kg/m³.



Slika 19. Rastvorljivost timola u nkCO_2 . Podaci korelisani a) Chrastil, b) Adachi-Lu, c) del Valle i Aguilera modelom

4.1.3. Zaključci

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom potpoglavlju mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Rastvorljivost timola u nkCO_2 je određena statičkom metodom u ćeliji za rad pod visokim pritiscima na temperaturama od 35 °C, 40 °C i 50 °C i pritiscima 7,8-25 MPa (za opseg gustina nkCO_2 335,89-849,60 kg/m^3).
- U posmatranom sistemu je potrebno 24 h za postizanje ravnoteže. Koncentracija timola rastvorenog u nkCO_2 brzo raste tokom prvih nekoliko sati, dok je nakon 10 h njen rast znatno usporen.
- Rastvorljivost timola u nkCO_2 se može uspešno korelisati semi-empirijskim jednačinama koje su uveli Chrastil, Adachi-Lu i del Valle-Agulera.
- Vrednosti rastvorljivosti timola u nkCO_2 dobijene na 35 °C i nižim pritiscima uporedive su sa vrednostima rastvorljivosti koje su dobijene na 50 °C i višim pritiscima.
- Na osnovu dobijenih rezultata, temperatura od 35 °C i pritisak od 15 MPa su odabrani kao optimalni operativni uslovi za proces natkritične impregnacije. Na tim uslovima rastvorljivost timola u nkCO_2 iznosi 31,3 kg/m^3 .

4.2. IMPREGNACIJA TIMOLA NA GAZU NATKRITIČNIM UGLJENIK(IV)-OKSIDOM

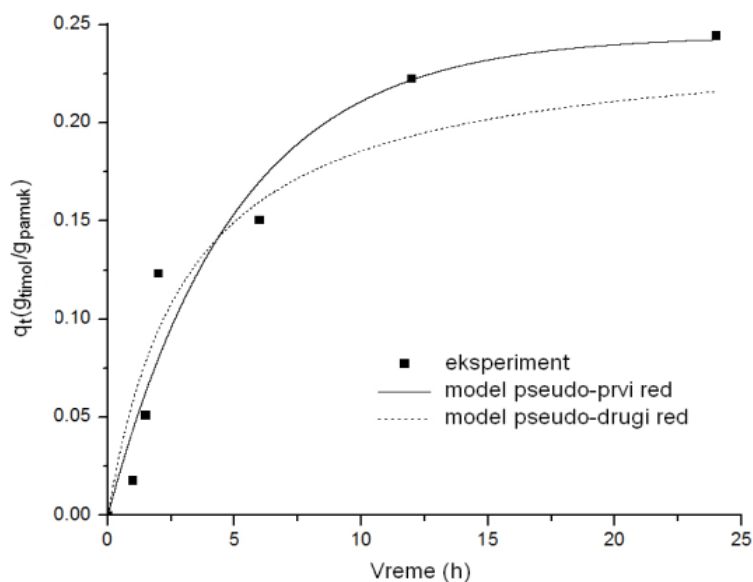
Pamućna gaza je impregnirana timolom u laboratorijskom postrojenju za procese pod visokim pritiscima Autoclave Engineers SCE Screening System na način opisan u poglavlju 3.2.3., na pritisku od 15 MPa i temperaturi od 35 °C. Radni uslovi statičkog procesa impregnacije su odabrani na osnovu prethodno prikazanih rezultata ispitivanja rastvorljivosti timola u nkCO_2 . Vreme impregnacije je varirano u opsegu od 2 h do 28 h. Eksperimentalno određene vrednosti prinosa impregnacije ($I(\%)$, jednačina 1) u funkciji vremena prikazane su u Tabeli 11. Na Slici 20. prikazana masa impregniranog timola po jedinici mase gaza u funkciji vremena. Iz Tabele 11. i sa Slike 20. se može videti da je impregnacija gaza timolom, u

posmatranom sistemu, brza u prva dva sata i da je u tom periodu uspostavljena gotovo linearna zavisnost mase impregniranog timola od vremena. Prinos koji se postiže nakon 2 h impregnacije iznosi 11,0%. Nakon toga, brzina impregnacije opada. Prinos impregnacije dostiže svoj maksimum (19,6%) nakon 24 h impregnacije.

Tabela 11. Prinos impregnacije (I, %) gaze u funkciji vremena

	Vreme (h)						
	1	1,5	2	6	12	24	28
I (%)	1,74	4,85	11,00	13,10	18,20	19,60	19,60

Na Slici 20 su prikazane i krive kinetičkog modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, dok su konstante modela date u Tabeli 12. Iz predstavljenih rezultata se može zaključiti da se modeli prethodno primenjeni za opisivanje adsorpcije boje u/na pamučna vlakna (Chairat i sar., 2008; Gamal i sar., 2010) (jednačine 20 i 21) mogu koristiti i za opisivanje impregnacije gaze timolom.



Slika 20. Kinetika natkritične impregnacije pamučne gaze timolom sa modelima pseudo-prvog i pseudo-drugog reda

Na osnovu Slike 20 i vrednosti RSS iz Tabele 12 može se zaključiti da model pseudo-prvog reda sa većom preciznošću opisuje posmatrani proces. Potrebno je napomenuti da izabrana tehnika statičke impregnacije takođe uključuje i proces rastvaranja timola u nkCO_2 . Zbog toga

se dobijeni kinetički parametri odnose na celokupan proces (rastvaranje + impregnacija), a ne samo na proces impregnacije.

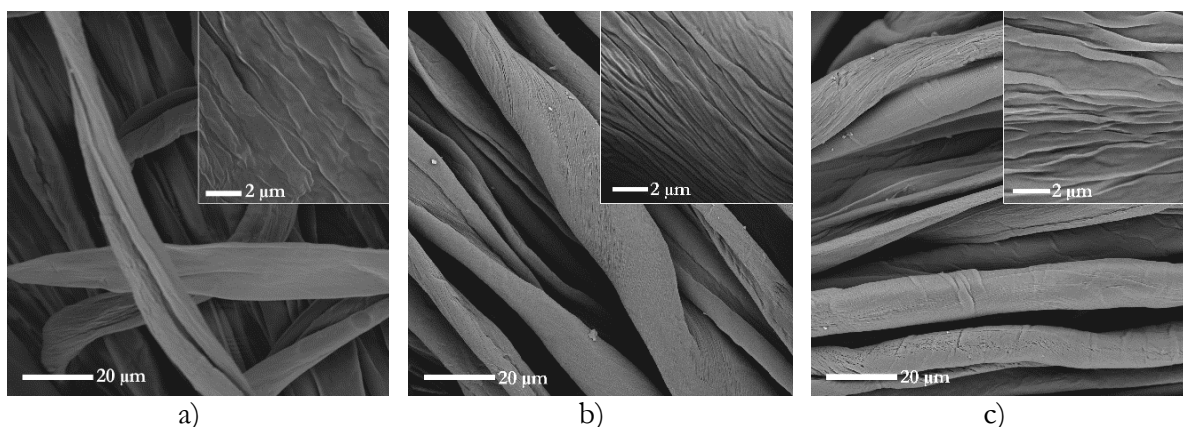
Tabela 12. Vrednosti parametara modela za impregnaciju pamučne gaze timolom

	q_e	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	RSS
Pseudo-prvi red	0,244	0,199	-	0,00294
Pseudo- drugi red		-	1,293	0,00339

Chairat i saradnici (Chairat i sar., 2008) i Gamal i saradnici (Gamal i sar., 2010) su dobili vrednosti konstante k_1 u opsegu od 1,17 h⁻¹ do 3,73 h⁻¹ za konvencionalne metode adsorpcije boje na pamučnim vlaknima u vodenom rastvoru. Te vrednosti su za red veličine veće od vrednosti dobijenih u ovom radu (Tabela 12) za impregnaciju timola pomoću nkCO₂.

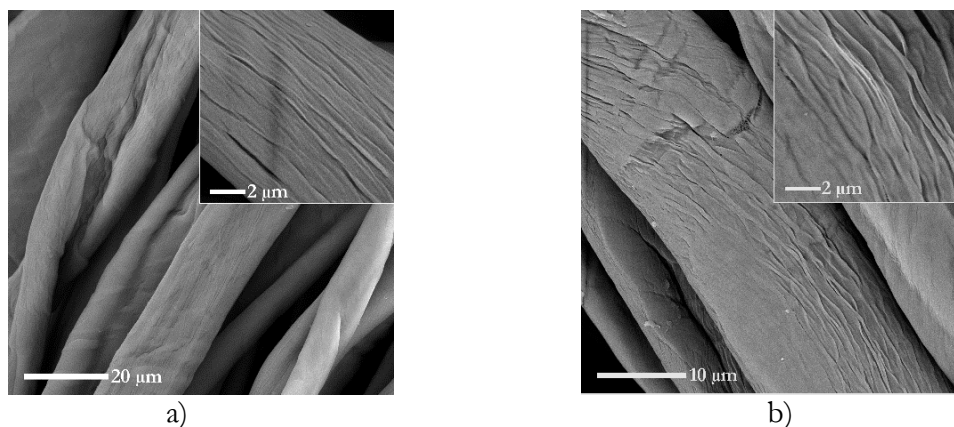
4.2.1. Karakterizacija gaze

FESEM slike netretirane pamučne gaze i pamučne gaze koja je tretirana sa nkCO₂ (bez prisustva timola) na 15 MPa i 35 °C tokom 2 h i 18 h su prikazane na Slici 21. Na Slici 21a se može uočiti karakteristična morfologija pamučnog vlakna. Pamučno vlakno ima neravnu površinu sa naborima koji se javljaju duž ose vlakna. Ukoliko se vlakno pamučne gaze izloži dejstvu nkCO₂, broj uzdužnih bora će se povećati i one će postati dublje (Slika 21b). Produženjem operativnog vremena dubina formiranih bora se uvećava (Slika 21c).



Slika 21. Morfologija pamučne gaze: a) netretiran uzorak, b) uzorak tretiran sa nkCO₂ 2 h i c) uzorak tretiran sa nkCO₂ 18 h

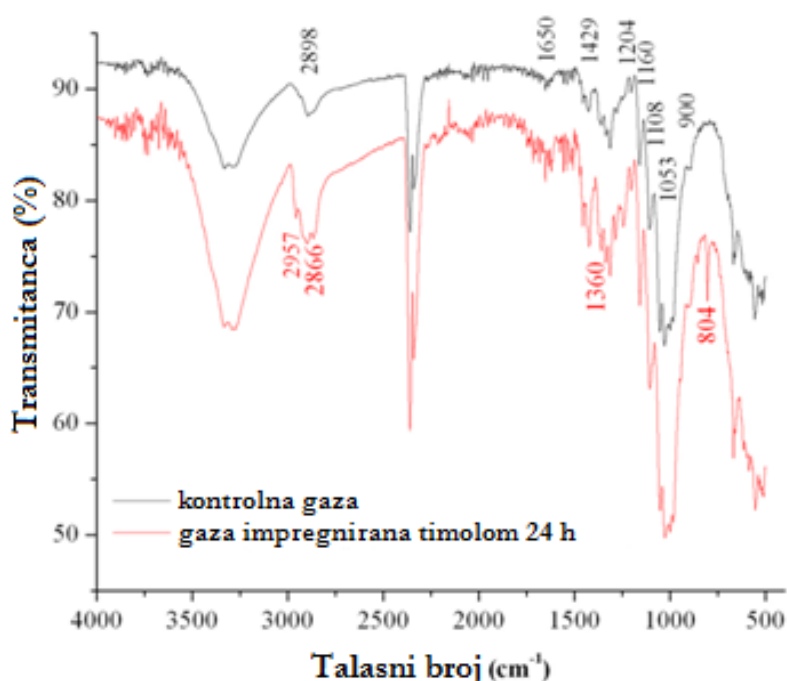
SEM slike gaze impregnirane timolom pomoću nkCO_2 na 15 MPa i 35 °C tokom 2 h i 24 h su prikazane na Slici 22.



Slika 22. SEM slike gaze impregnirane timolom: a) uzorak impregniran 2 h i b) uzorak impregniran 24 h

Promena u morfologiji vlakana je očigledna u poređenju sa netretiranom gazom. Može se primetiti da su tokom impregnacije formirane bore paralelne osi vlakna. Ukoliko se uporede uzorci gaze tretirane tokom kratkog vremena (2 h) sa natkritičnim fluidom bez prisustva timola (Slika 21b) i rastvorom timola u natkritičnom fluidu (Slika 22a), može se uočiti da su uzorci slični, kao i uzorci gaze tretirane tokom dužeg vremena (18 h i 24 h) (Slike 21c i 22b). Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da timol nema uticaja na morfologiju pamučne gaze, već da se formiranje bora dešava samo pod uticajem nkCO_2 . Katayama i saradnici (Katayama i sar., 2012) su, prateći uticaj nkCO_2 na morfologiju pamučnih vlakana, dobili slične rezultate. Pomenuti autori su zaključili da sa povećanjem temperature dolazi do smanjenja broja bora, dok sa povećanjem pritiska i operativnog vremena dolazi do povećanja broja bora na pamučnim vlaknima. Formiranje bora je u istom radu objašnjeno razlikom u brzini degasifikacije (tokom dekompresije) između površine i unutrašnjosti pamučnih vlakana, što je proizvelo razliku u skupljanju između ova dva segmenta.

Rezultati FTIR analize kontrolnog uzorka gaze i uzorka pamučne gaze koji je impregniran timolom tokom 24 h na datim uslovima su predstavljeni na Slici 23.



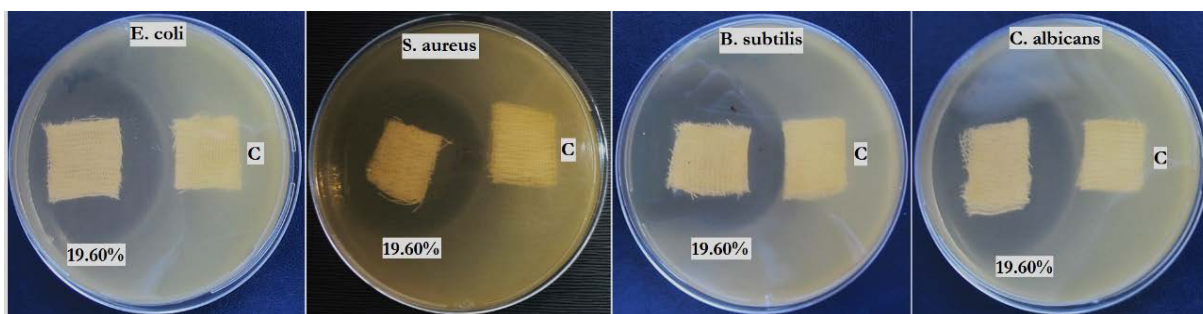
Slika 23. FTIR spektri kontrolne i impregnirane pamučne gaze

Široka traka uočena na FTIR spektru kontrolne pamučne gaze u oblasti između 3500 i 3200 cm^{-1} je pripisana istežućim vibracijama OH-grupe celuloze (Chung i sar., 2004; Ciolacu i sar., 2011; Oh i sar., 2005; Proniewicz i sar., 2001). Takođe, široka traka sa pikom koji se nalazi na 2898 cm^{-1} odgovara C-H asimetričnim istežućim vibracijama (Chung i sar., 2004). Trake na 1429, 1368, 1317 i 1281 cm^{-1} potiču od C-H savijajućih vibracija u ravni, C-H savijajućih vibracija, C-H klanjajućih vibracija i deformacionih C-H istežućih vibracija (Chung i sar., 2004; Oh i sar., 2005). Trake na 1337, 1247 and 1203 cm^{-1} odgovaraju savijajućim OH vibracijama u ravni (Chung i sar., 2004). Trake na 1160 i 1108 cm^{-1} su pripisane asimetričnom mostu C-O-C gde je pik na 1053 cm^{-1} pripisan asimetričnim istežanjima u ravni (Chung i sar., 2004). Pik na 1030 cm^{-1} je povezan sa C-O istežućim vibracijama (Chung i sar., 2004). Konačno, pik koji odgovara asimetričnim istežućim vibracijama van ravni prstena na $\text{C}_1\text{-O-C}_4$ sa β -glukozidnom trakom pojavljuje se na 900 cm^{-1} (Proniewicz i sar., 2001; Chung i sar., 2004; Oh i sar., 2005; Socrates, 2007; Ciolacu i sar., 2011). Uočene trake su karakteristične za pamuk i dobro se slažu sa literaturnim podacima. Prisustvo CO_2 (par na 2362 i 2334 cm^{-1}) i adsorbovane vode (na 1650 cm^{-1}) je takođe detektovano (Chung i sar., 2004; Guerrini i sar., 2009; Oh i sar., 2005; Proniewicz i sar., 2001; Socrates, 2007).

FTIR analiza pamučne gaze koja je impregnirana timolom tokom 24 h potvrdila je prisustvo timola na površini pamučnih vlakana. Pikovi u FTIR spektru na 2957 i 2866 cm^{-1} mogu biti pripisani asimetričnim C-H istežućim i deformacijama visokih harmonika CH_3 grupe (Mohammed i Al-Bayati, 2009; Socrates, 2007). Pikovi na 1623 i 1447 cm^{-1} odgovaraju istežućim vibracijama aromatičnog prstena C=C (Rukmani i Sundrarajan, 2011; Socrates, 2007). Trake detektovane na 1286 i 1259 cm^{-1} su pripisane kombinaciji OH deformacionih vibracija i C-O istežućim vibracijama (Socrates, 2007). Pik na 1360 cm^{-1} odgovara savijajućim vibracijama OH fenolne grupe (Rukmani i Sundrarajan, 2011). Traka na 804 cm^{-1} se odnosi na aromatične C-H klanjajuće vibracije van ravni (Schulz i sar., 2005).

4.2.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti gaze impregnirane timolom

Antimikrobna aktivnost gaze impregnirane timolom testirana je kvalitativno i kvantitativno. Kvalitativni test antimikrobne aktivnosti je urađen za gasu koja je impregnirana 24 h sa prinosom impregnacije timola 19,60%, pomoću Gram-negativne bakterije *E. coli*, Gram-pozitivnih bakterija *S. aureus* i *B. subtilis* i kvasca *C. albicans* (Slika 24).



Slika 24. Inhibicione zone kontrolnog uzorka (C) i impregnirane pamučne gaze

Sa Slike 24 je očigledno da gaza impregnirana timolom sa prinosom 19,60% ima jako antimikrobno dejstvo izraženo preko zone inhibicije. Prečnik zone inhibicije iznosi 53 mm za *E. coli*, 43 mm za *S. aureus*, 44 mm za *B. subtilis* i 55 mm za *C. albicans*. Za kontrolni uzorak gaze (C) nije postojala inhibiciona zona, što ukazuje da sama gaza ne pokazuje nikakvu antimikrobnu aktivnost.

Rezultati kvantitativne antimikrobne analize su prikazani u Tabeli 13. Analizirani su uzorci koji su bili impregnirani tokom 2 h sa prinosom impregnacije timola 11,0% i tokom 24 h sa prinosom 19,60%.

Tabela 13. Antimikrobna aktivnost gaze impregnirane timolom tokom 2 h i 24 h

Uzorak	Mikroorganizam	2 h		24 h	
		Broj kolonija mikroorganizama (CFU)	R (%)	Broj kolonija mikroorganizama (CFU)	R (%)
Kontrolna gaza	<i>E. coli</i>	$2,2 \times 10^4$	99,9	$7,0 \times 10^3$	99,9
Impregnirana gaza		<10	-	<10	-
Kontrolna gaza	<i>S. aureus</i>	$4,4 \times 10^4$	99,9	$5,0 \times 10^3$	99,9
Impregnirana gaza		<10	-	<10	-
Kontrolna gaza	<i>B. subtilis</i>	$1,5 \times 10^5$	99,9	$6,0 \times 10^3$	99,9
Impregnirana gaza		<10	-	<20	-
Kontrolna gaza	<i>E. faecalis</i>	$5,4 \times 10^5$	99,9	$4,7 \times 10^4$	99,9
Impregnirana gaza		<10	-	<10	-
Kontrolna gaza	<i>C. albicans</i>	$7,4 \times 10^4$	99,9	$6,0 \times 10^4$	99,9
Impregnirana gaza		<10	-	<10	-

Kako se iz Tabele 13 može videti, impregnirani uzorci su pokazali jaku antimikrobnu aktivnost protiv testiranih sojeva *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* i *C. albicans* sa maksimalnom mikrobnom redukcijom (R) od 99,9% za sve testirane mikroorganizme.

4.2.3. Zaključci

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom potpoglavlju mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Pamučna gaza je uspešno impregnirana timolom pomoću nkCO_2 na pritisku od 15 MPa i temperaturi 35 °C pri promeni procesnog vremena od 1 h do 28 h. U posmatranom sistemu, tokom 24 h impregnacije dolazi do uspostavljanja ravnoteže, pa se daljim produžavanjem operativnog vremena ne postiže dalje povećanje prinosa impregnacije.

- U posmatranom sistemu, tokom prvih nekoliko sati prinos impregnacije raste brzo, a zatim se usporava. Nakon 2 h impregnacije, prinos impregnacije iznosi 11,0% dok je nakon 24 h njegova vrednost 19,6%.
- Kinetika impregnacije pamučne gaze timolom u posmatranom sistemu se može korelisati modelom pseudo-prvog reda.
- Analiza SEM slika je pokazala da timol nema uticaja na morfologiju pamučne gaze, već da se formiranje bora dešava samo pod uticajem nkCO_2 . Pod dejstvom nkCO_2 , broj uzdužnih bora pamučnog vlakna se povećava i one postaju dublje. Produženjem operativnog vremena povećava se dubina formiranih bora.
- Rezultati FT-IR analize potvrđuju prisustvo timola na površini vlakana gaze.
- Uzorci impregnirane gaze su ispoljili jako antimikrobno dejstvo na *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* i *C. albicans* sa maksimalnom mikrobnom redukcijom (99,9%).

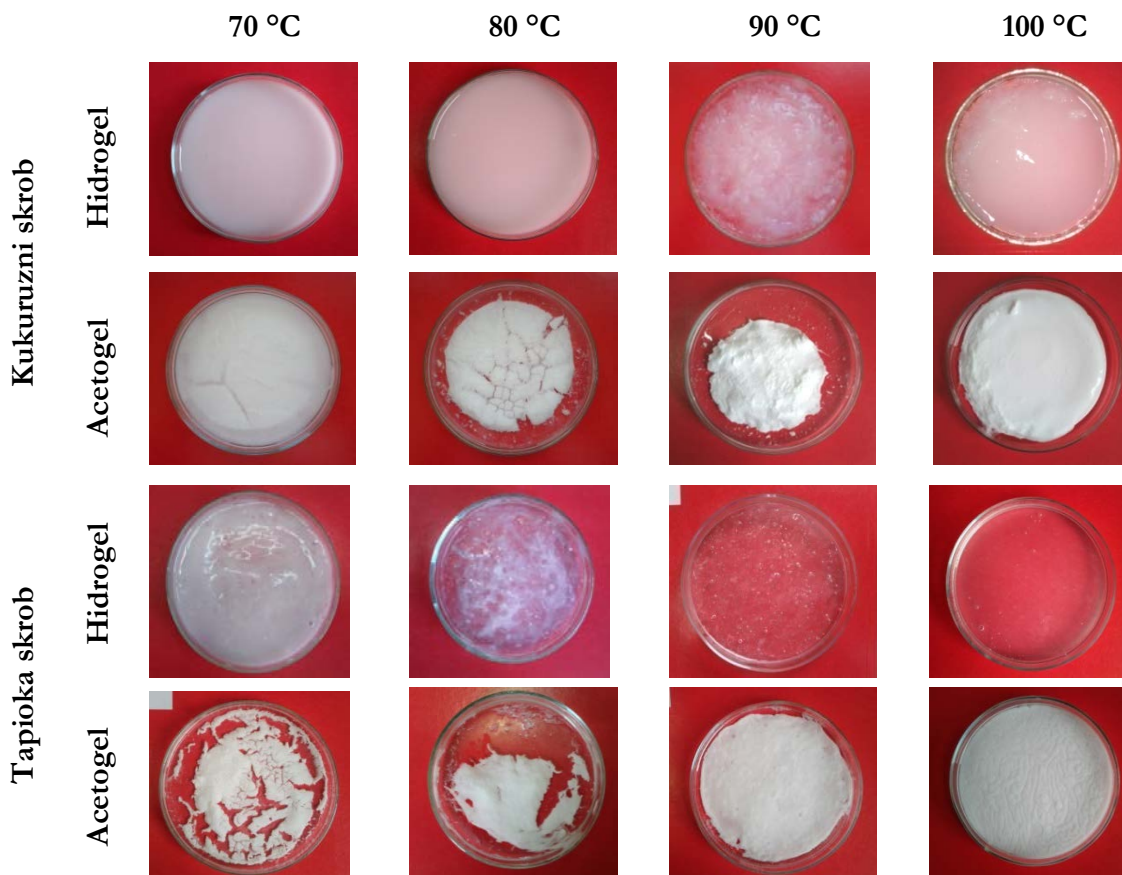
4.3. IMPREGNACIJA TIMOLA NA POLISAHARIDNE GELOVE NATKRITIČNIM UGLJENIK(IV)-OKSIDOM

4.3.1. Impregnacija timola na gelove skroba

4.3.1.1. Priprema gelova skroba

Hidro- i acetogelovi kukuruznog i tapioka skroba su dobijeni na način opisan u poglavlju 3.2.2. Skrobne granule su pomešane sa vodom u masenom odnosu 1:10 i zagrejane do određene temperature. Nakon geliranja, dobijeni hidrogelovi su izliveni u petri šolje (Slika 25). Sa Slike 25 se može uočiti da postoji razlika u transparentnosti hidrogelova u zavisnosti od temperature pripreme. Sa porastom temperature došlo je do promene boje hidrogelova kukuruznog skroba iz bele u delimično prozirnu mlečno-belu boju. Kod gelova tapioka skroba se može primetiti da se sa porastom temperature smanjuje broj nerastvorenih opni granula

tapioke, tako da se na 100 °C uočava tek po neka. Sa porastom temperature dolazi do promene boje hidrogelova tapioka skroba iz bele u bezbojnu.



Slika 25. Hidro- i acetogelovi kukuruznog skroba

Da bi se uklonila voda iz dobijenih hidrogelova, oni su potopljeni u aceton, čime su dobijeni acetogelovi. Tokom zamene vode acetonom, došlo je do promene boje hidrogelova u neprovidnu kreč-belu. Takođe, uočava se značajna razlika u kontrakciji i konzistenciji acetogelova pripremljenih na različitim temperaturama. Acetogelovi kukuruznog skroba pripremljeni na 70 °C i 80 °C imaju rastresito-sirastu konzistenciju i veliko smanjenje zapremine u odnosu na hidrogelove. Acetogelovi pripremljeni na višim temperaturama su čvrsti. Za gel pripremljen na temperaturi od 100 °C uočava se mala promena prečnika acetogela u odnosu na prečnik hidrogela. Kod acetogelova tapioka skroba koji su pripremljeni

na 70 °C i 80 °C došlo je do velike kontrakcije površine. Sa porastom temperature, kontrakcija acetogelova se smanjuje pa se na temperaturi od 100 °C ne može uočiti promena prečnika acetogela u odnosu na hidrogel. Promena boje hidrogelova sa porastom temperature pripreme je u skladu sa rezultatima Paes i saradnika (Paes i sar., 2008). Oni objašnjavaju promenu boje gela tapioke, sa porastom temperature pripreme, smanjenjem broja granula i ostataka od granula skroba. Isti autori su uočili da na 70 °C postoje granule skroba koje nisu potpuno nabubrile, da je bubrenje kompletno između 80 °C i 85 °C, da na temperaturama višim od 80 °C granule počinju da gube integritet svoje površine i da na 95 °C dolazi do potpunog kolapsa granula, kao i da na 100 °C dolazi do razdvajanja faza skrobne smeše.

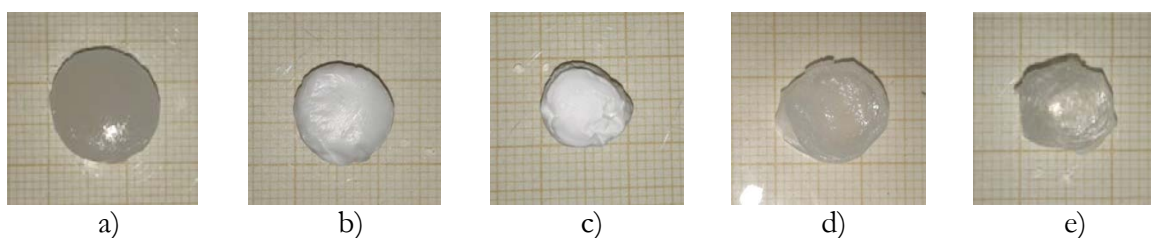
Botanički izvor skroba određuje fizičko-hemijske karakteristike skrobnih granula (kao što su srednja veličina granula, raspodela veličina granula, AM/AP odnos i sadržaj minerala) što utiče na ponašanje skrobne paste u sistemima sa vodom (Mishra i Rai, 2006; Schirmer i sar., 2013; Singh i sar., 2003). Veća providnost tapioka hidrogelova u odnosu na kukuruzne hidrogelove se može objasniti na sledeći način: za razliku od AM molekula koji imaju izraženu tendenciju ka retrogradaciji tokom procesa hlađenja skuvane skrobne paste, AP molekuli rekristalizuju tokom produženog perioda. Skrobovi sa manje AM (tapioka) imaju ograničeno oslobađanje AM i manje viskoznu matricu nakon hlađenja (Gunarathne i sar., 2007). Zbog toga viskozitet njihovih pasta raste postepeno tokom hlađenja i starenja (Schirmer i sar., 2013). Temperatura pripreme hidrogela (T_{gel-h}) određuje koje od promena skrobnih suspenzija će se desiti (promena boje, viskoziteta, teksture). Tapioka skrob ima bolju rastvorljivost u vodi na 70 °C u poređenju sa rastvorljivošću kukuruznog skroba na istim uslovima. Do ove pojave dolazi zbog razlike u T_{gel} skroba kukuruza i tapioke. U istraživanju koje su izveli Mishra i Rai (Mishra i Rai, 2006) tapioka skrob ima $T_{gel}=66,2$ °C koja zavisi od sadržaja AM (16,27%), dok kukuruzni skrob ima $T_{gel}=78,25$ °C koja je viša zbog većeg sadržaja AM (25,6%).

Zapremina acetogelova je delimično smanjena u poređenju sa zapreminom hidrogelova. Stepem kontrakcije gelova zavisi od primenjene temperature geliranja hidrogelova (T_{gel-h}). Manji stepen kontrakcije acetogelova dobijenih od hidrogelova koji su napravljeni na višim temperaturama ukazuje na veći stepen oslobođene AM i umrežavanja. Veći stepen umrežavanja rezultuje manjom količinom slobodne vode unutar hidrogela kao i jačim

interakcijama AM sa AP zbog čega skoro da nema vode u hidrogelu koja bi bila dostupna acetonu.

Činjenica da brzina zagrevanja, temperatura, vreme gelatinizacije i uslovi sušenja škrobnih gelova imaju veliki uticaj na kristalnu strukturu gelova koji su napravljeni od istog polaznog materijala jasno ukazuje na značaj metode pripreme gela (Paes i sar., 2008).

Ksero- i aerogelovi su dobijeni na način opisan u poglavlju 3.2.2.1. i 3.2.2.2. Sušenje gelova je kritičan korak za dobijanje suvih polimernih nosača sa očuvanom poroznom strukturom. Na primeru sušenja acetogela kukuruznog skroba pripremljenog na 100 °C, uočava se da dolazi do promene boje ksero- i aerogela, kao i njihovih prečnika (Slika 26). Nakon sušenja acetogelova vazduhom i pomoću nkCO_2 zapremina gelova se smanjila.



Slika 26. Gelovi kukuruznog skroba: a) hidrogel pripremljen na 100 °C, b) acetogel, c) kserogel, d) aerogel, e) aerogel nakon dodatnog sušenja na vazduhu

4.3.1.2. Impregnacija gelova kukuruznog i tapioka skroba

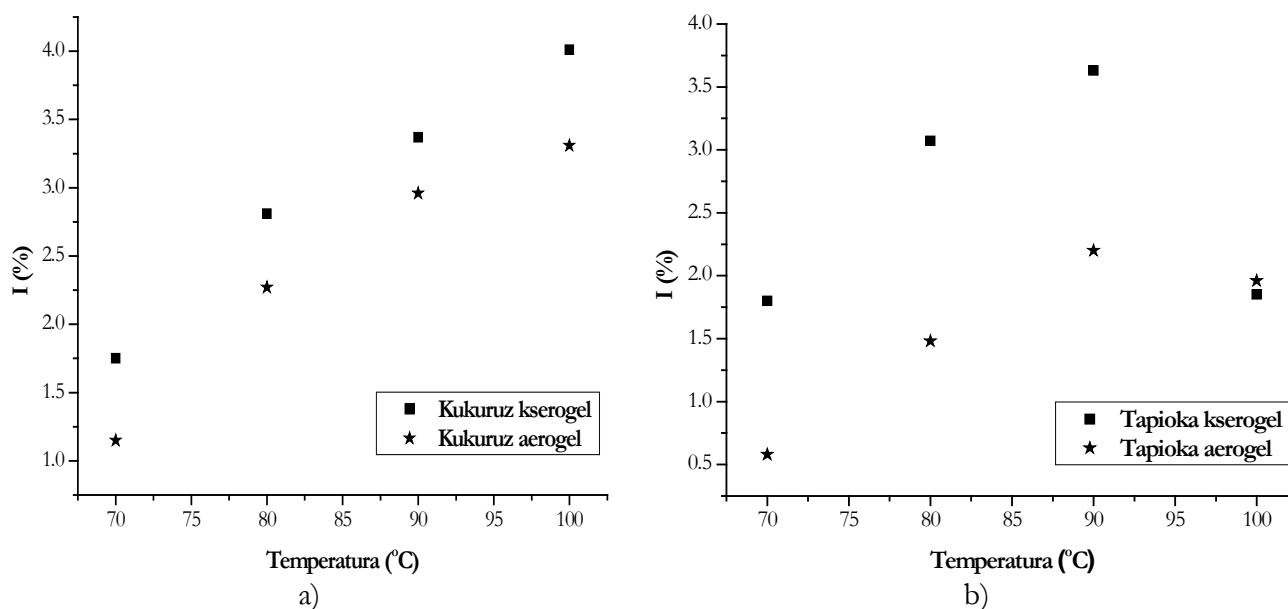
Proces NKI ksero- i aerogelova kukuruznog i tapioka skroba timolom je izveden u ćeliji za rad pod visokim pritiscima na način opisan u poglavlju 3.2.3. Primenjeni operativni uslovi (pritisak, temperatura, procesno vreme, protok, brzina dekompresije itd.) imaju veliku ulogu u procesu impregnacije (Dias i sar., 2011). Da bi se pratio uticaj pripreme gela na efikasnost impregnacije, uslovi impregnacije su bili konstantni. Pritisak od 15 MPa, temperatura od 35 °C, vreme impregnacije od 24 h, maseni odnos gel:timol 1:1 i spora dekompresija (0,3 MPa/min) na kraju procesa su primenjeni u svim eksperimentima. Prinos impregnacije osušenih škrobnih gelova, izražen kao maseni procenat timola u impregniranom gelu (I (%), jednačina 1), u zavisnosti od $T_{\text{gel-h}}$ i metode sušenja su prikazani u Tabeli 14 i na Slici 27. Dobijeni rezultati

upućuju na zaključak da prinos impregnacije zavisi od temperature na kojoj se izvodi geliranje skroba kao i do metode sušenja (na vazduhu ili sa nkCO_2). Kserogelovi skrobova su imali veći prinos impregnacije u poređenju sa aerogelovima koji su dobijeni na istoj temperaturi, osim u slučaju tapioka gela pripremljenog na 100 °C.

Tabela 14. Prinos impregnacije (I, %) ksero- i aerogelova kukuruznog skroba timolom

	I (%)	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C
Kukuruzni skrob	Kserogel	1,75	2,81	3,37	4,01
	Aerogel	1,15	2,27	2,96	3,31
Tapioka skrob	Kserogel	1,80	3,07	3,63	1,85
	Aerogel	0,58	1,48	2,20	1,96

S porastom $T_{\text{gel-h}}$ kukuruznog skroba, raste i prinos impregnacije. Najveći procenat impregnacije dobijen je za kserogel koji je pripremljen na 100 °C (4,01%). S porastom $T_{\text{gel-h}}$ tapioka skroba, raste i prinos impregnacije do temperature pripreme gela od 90 °C. Za gel pripremljen na 100 °C dolazi do smanjenja prinosa impregnacije.



Slika 27. Uticaj uslova pripreme skrobnih gelova na prinos impregnacije za a) kukuruzni skrob i b) tapioka skrob

Najveći procenat impregnacije kod tapioka skroba dobijen je za kserogel pripremljen na 90 °C (3,63%). Promena T_{gel-h} menja viskozitet suspenzije skrob-voda (Peng i sar., 2007). Dobijeni rezultati su pokazali da je najveći procenat impregnacije dobijen za kserogel kukuruznog skroba koji je dobijen od suspenzije najnižeg viskoziteta.

Kada se uporede rezultati NKI skrobnih gelova različitog botaničkog porekla (Tabela 14), uočava se da kserogelovi tapioka skroba imaju viši prinos impregnacije u poređenju sa gelovima kukuruznog skroba koji su pripremljeni na istim uslovima sa izuzetkom kserogela koji je dobijen na 100 °C. Aerogelovi kukuruznog skroba imaju viši prinos impregnacije u poređenju sa aerogelovima tapioka skroba.

U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o NKI gelova skroba timolom, ali postoje studije o NKI skrobova različitim bioaktivnim supstancama. Comin i saradnici (Comin i sar., 2012) su impregnirali prethodno gelatiniziran kukuruzni skrob lanenim uljem na 15 MPa i 40 °C tokom 8 h sa prinosom 5,25%. De Souza i saradnici (De Souza i sar., 2014) su impregnirali tapioka gel cinamaldehydom na 35 °C i 25 MPa tokom 15 h, pri čemu je ostvaren prinos od 0,25%. Varona i saradnici (Varona i sar., 2011) su impregnirali etarsko ulje lavande u *n*-oktenil sukcinat modifikovani kukuruzni skrob na 12 MPa i 40 °C tokom 2 h, pri čemu je ostvaren prinos od 9%.

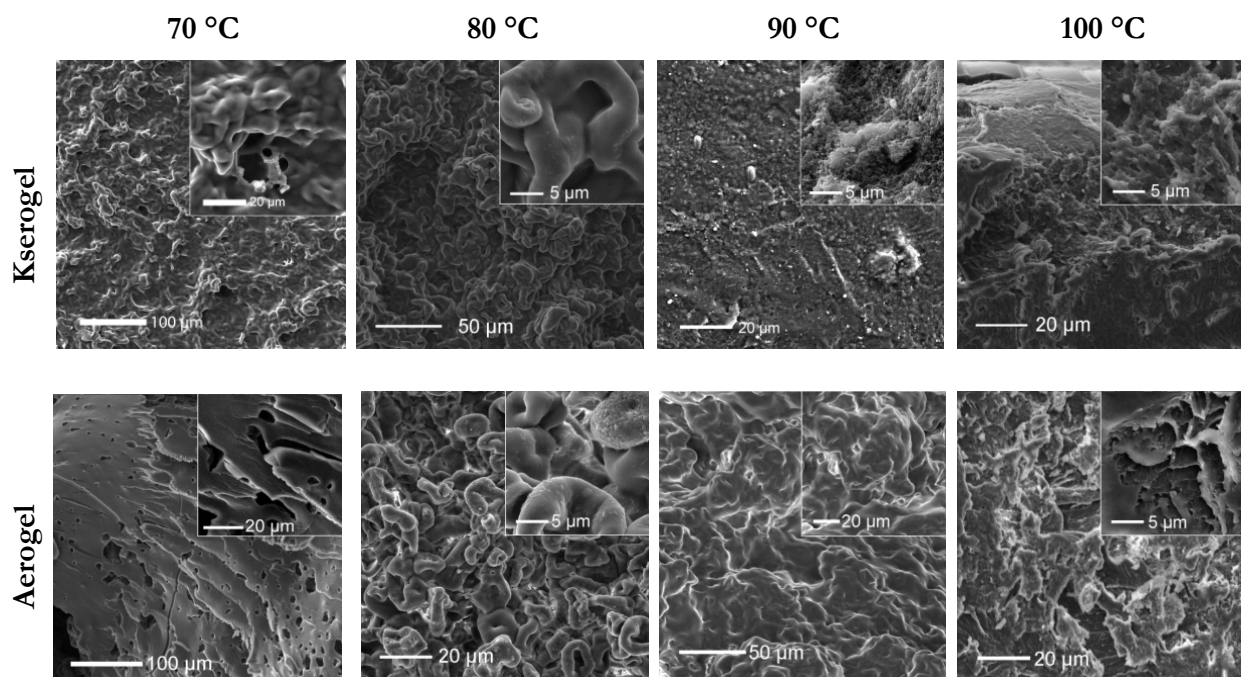
4.3.1.3. Karakterizacija gelova kukuruznog i tapioka skroba

Dobijeni rezultati NKI gelova kukuruznog i tapioka skroba timolom se mogu objasniti morfologijom dobijenih ksero- i aerogelova. Morfologija gelova (gustina, veličina pora, dodirna površina) utiču na adsorpciju aktivne supstance. Generalno, velika dodirna površina gela je poželjna da bi se dobio veći procenat impregnacije aktivne supstance (García-González i sar., 2011).

Morfologija skrobnih gelova je uslovljena poreklom skroba, T_{gel-h} i metodom sušenja. FESEM slike ksero- i aerogelova kukuruznog i tapioka skroba prikazane su na Slikama 28 i 29. Može se uočiti da su dobijeni ksero- i aerogelovi porozni. Takođe, može se videti da ksero- i aerogelovi, koji su dobijeni od hidrogelova pripremljenih na višim temperaturama (90 °C i 100

°C), imaju porozniju strukturu u poređenju sa ksero- i aerogelovima dobijenih od hidrogelova pripremljenih na nižim temperaturama (70 °C i 80 °C). Ova pojava se može objasniti pozitivnim uticajem povećanja temperature pripreme na bubrenje škrobnih granula i rastvaranja AM čime se povećao stepen umrežavanja.

Slike ksero- i aerogela kukuruznog škroba (Slika 28) koji su dobijeni od hidrogela pripremljenog na 70 °C ukazuju da uzorci nisu potpuno gelatinizovani.

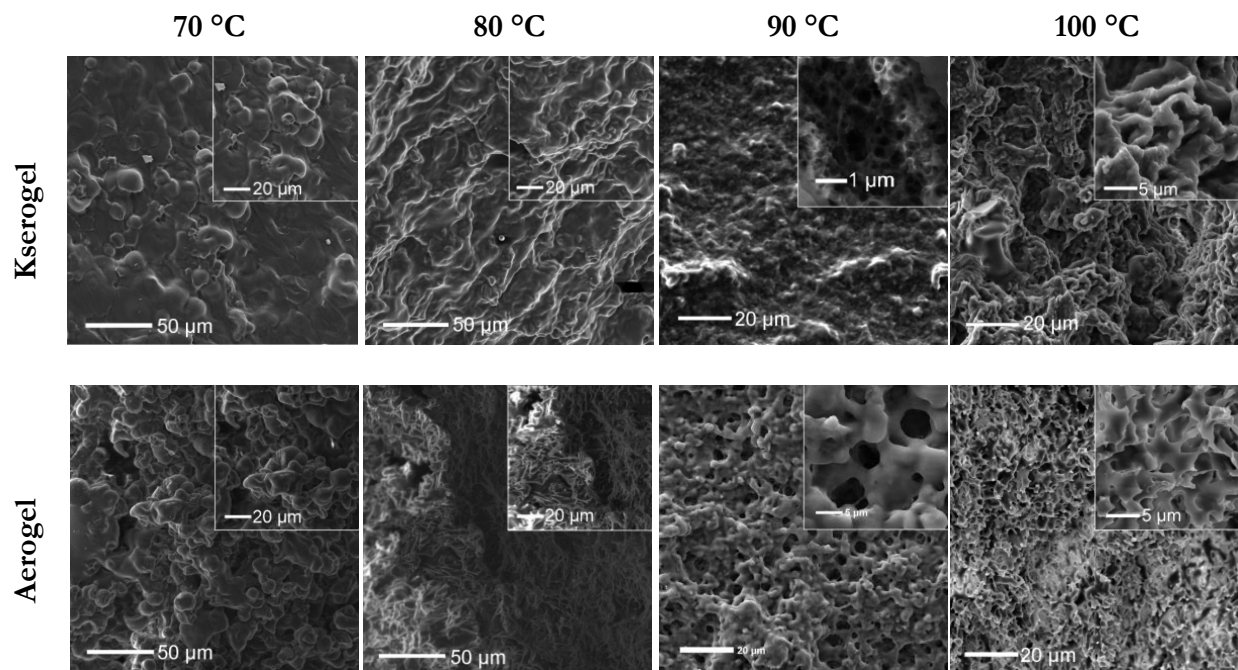


Slika 28. FESEM slike površine ksero- i aerogelova kukuruznog škroba

Zbog toga se delimično mogu videti nabubrele i slepljene granule škroba. Kod ksero- i aerogelova dobijenih od hidrogelova pripremljenih na 80 °C se i dalje mogu uočiti nabubrele i slepljene granule škroba. Ksero- i aerogelovi dobijeni od hidrogelova koji su pripremljeni na višim temperaturama (90 °C i 100 °C) imaju kompaktniju i porozniju strukturu zbog kompletne gelatinizacije hidrogelova kukuruznog škroba u ovom temperaturnom opsegu. Ova pojava se može objasniti pozitivnim uticajem povećanja temperature na bubrenje škrobnih granula i rastvaranja AM čime se povećava stepen umrežavanja.

Poređenjem slika ksero- i aerogelova tapioka škroba (Slika 29) koji su pripremljeni geliranjem hidrogelova na 70 °C i slike negeliranog tapioka škroba (Slika 30) može se videti da ni ovi

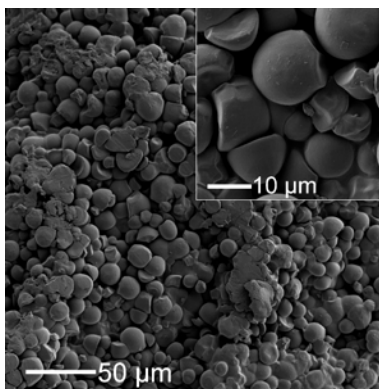
gelirani uzorci nisu potpuno gelatinizovani jer se delimično mogu videti nabubrele i splepljene granule skroba. Kod ksero- i aerogelova kukuruznog skroba dobijenih od hidrogelova na 80 °C (Slika 28) i dalje se mogu uočiti nabubrele i splepljene granule skroba, za razliku od tapioka skroba kod koga je struktura ksero- i aerogelova kompaktnija (Slika 29).



Slika 29. FESEM slike površine ksero- i aerogelova tapioka skroba

Ovakva pojava se dešava zbog razlike u T_{gel} skroba kukuruza i tapioke. Tapioka skrob ima nižu T_{gel} i samim tim i veći stepen hidratacije u odnosu na kukuruzni skrob na istoj temperaturi. Ksero- i aerogelovi dobijeni od hidrogelova koji su pripremljeni na višim temperaturama (90 °C i 100 °C) imaju kompaktniju i porozniju strukturu zbog kompletne gelatinizacije hidrogelova obe vrste skroba. SEM slike u gornjem desnom uglu gelova tapioka skroba (Slika 29) pokazuju da kserogel dobijen na 90 °C ima pore prečnika oko 1 μm, dok su pore aerogela pripremljenog na 90 °C i ksero- i aerogela pripremljenih na 100 °C prečnika oko 5 μm. Ovakva morfologija gelova je u skladu sa rezultatima NKI gelova tapioka skroba timolom (najveći prinos impregnacije 3,63% je dobijen za kserogel pripremljen na 90 °C dok su prinosi impregnacije aerogela pripremljenog na 90 °C i ksero- i aerogela pripremljenih na 100 °C imali nižu ali međusobno sličnu vrednost: 2,20%, 1,85% i 1,96%).

Tapioka granule pre geliranja uglavnom imaju izgled presečene sfere. Površina granula je glatka bez uočljivih pora što se može videti na Slici 30. Veličina granula tapioka skroba prema literaturnim podacima se kreće od 4 do 35 μm (Adejumo i sar., 2011).



Slika 30. SEM slika tapioka granule

Rezultati BET analize reprezentativnih uzoraka ksero- i aerogelova predstavljani su u Tabeli 15. Vrednosti koje u tabeli nedostaju nisu mogle biti izračunate zbog male vrednosti specifične površine (S_p). Kako se može videti, najveću vrednost S_p imaju kserogelovi kukuruznog skroba pripremljeni na 100 °C i 90 °C (5,52 i 4,25 m^2/g , redom), što je u skladu sa visokim prinosima impregnacije koji su postignuti impregnacijom ovih gelova (4,01% i 3,37%). Međutim, prema dobijenim rezultatima, aerogelovi kukuruznog skroba pripremljeni geliranjem na 90 °C i 100 °C imaju znatno manje S_p (0,019 m^2/g i 0,035 m^2/g) što ne bi bilo u skladu sa relativno visokim prinosom impregnacije dobijenim kod ovih gelova (2,96% i 3,31%). Takođe, mala vrednost S_p od 0,37 m^2/g je izmerena za kserogel tapioka skroba dobijen geliranjem na 90 °C, a koji je imao vrlo visok prinos impregnacije od 3,63%. Ovakvi rezultati bi se, uz pomoć SEM slika prikazanih na Slikama 28 i 29, mogli objasniti činjenicom da primenjena BET adsorpciona izoterma pruža informaciju o poroznosti materijala na nivou mezopora i da se ovom metodom ne mogu detektovati pore prečnika većeg od 300 nm. Na osnovu SEM slika (Slika 28 i Slika 29), uočava se da kod aerogelova kukuruznog skroba geliranih na 90 °C i 100 °C, kao i kod kserogela tapioka skroba geliranog na 90 °C postoje brojne pore veličine nekoliko mikrometara. Takve pore znatno doprinose procesu impregnacije, a nije ih moguće detektovati izabranom adsorpcionom metodom upotrebom azota. Dobijeni rezultati potvrđuju da je

mezoporoznost dobijenih gelova skroba samo mala frakcija ukupne poroznosti ksero- i aerogelova.

Ako se uporede kserogelovi i aerogelovi kukuruznog skroba, evidentno je da kserogelovi skroba imaju značajno veću S_p određenu BET adsorpcionom izotermom (Tabela 15). Prema SEM slikama (Slika 28), primenjena metoda sušenja sa $n\text{CO}_2$ je dala gelove sa uniformnijom raspodelom pora, ali su kserogelovi imali pore manjeg prečnika.

Tabela 15. Rezultati BET analize kukuruznih ksero- i aerogelova

	Uzorak	S_p (m^2/g)	V_{tot} (cm^3/g)	V_{mezo} (cm^3/g)	V_{mikro} (cm^3/g)	D_{sr} (nm)	D_{max} (nm)
KS	Aerogel ($T_{\text{gel-h}}=90\text{ }^\circ\text{C}$)	0,019	-	0,000061	$0,0004\pm 0,002$	1,83	-
	Kserogel ($T_{\text{gel-h}}=90\text{ }^\circ\text{C}$)	4,25	0,0198	0,0211	$0,008\pm 0,001$	15,6	9,78
	Aerogel ($T_{\text{gel-h}}=100\text{ }^\circ\text{C}$)	0,035	-	-	$0,003\pm 0,002$	-	-
	Kserogel ($T_{\text{gel-h}}=100\text{ }^\circ\text{C}$)	5,52	0,0238	0,0252	$0,009\pm 0,001$	13,3	9,62
TS	Aerogel ($T_{\text{gel-h}}=90\text{ }^\circ\text{C}$)	1,72	-	-	$0,0008\pm 0,00008$	-	-
	Kserogel ($T_{\text{gel-h}}=90\text{ }^\circ\text{C}$)	0,37	-	-	$0,0009\pm 0,0001$	-	-

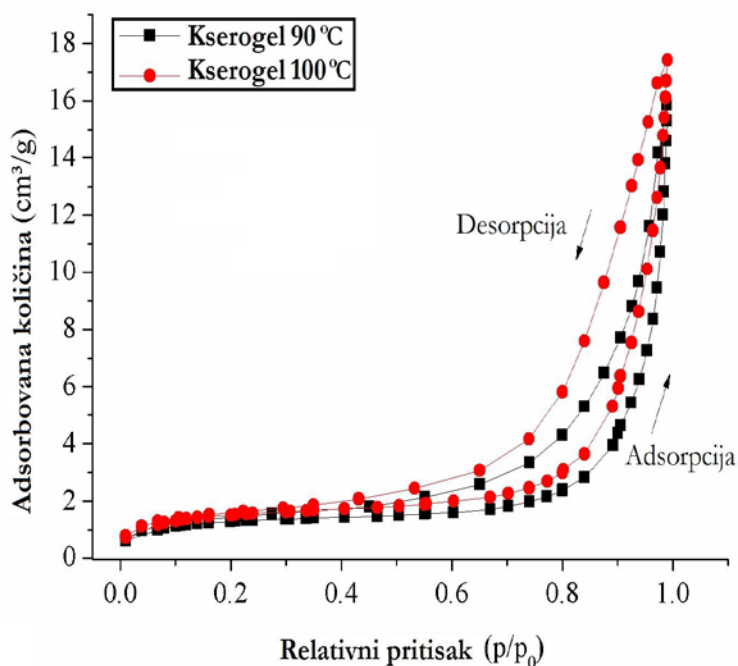
KS- kukuruzni skrob; TS- tapioka skrob; S_p - specifična površina; V_{tot} - ukupna zapremina pora; V_{mezo} - zapremina mezopora (pore između 1,7-300 nm); V_{mikro} - zapremina mikropora; D_{sr} - srednji prečnik pora; D_{max} - prečnik pora koje zauzimaju najveću zapreminu

Teksturalne karakteristike suvog nosača (npr. gustina, prečnik pora, S_p) utiču na maksimalni adsorpcioni kapacitet nosača (Garcia-Gonzalez, 2012b). Kao što se može videti, priprema hidrogela kukuruznog skroba na višoj temperaturi (100 $^\circ\text{C}$) ima prednosti naročito za proizvodnju kserogelova sa boljim teksturalnim karakteristikama. Na taj način se dobija veća S_p (30%), veća V_{tot} (20,3%) i manji D_{sr} (17,2%) kserogela pripremljenog na 100 $^\circ\text{C}$ u odnosu na kserogel pripremljen na 90 $^\circ\text{C}$ (Tabela 15).

Male vrednosti poroznosti osušenih gelova kukuruznog i tapioka skroba se mogu pripisati neadekvatnim uslovima i ulaznim parametara primenjene BET analize. Ipak, može se uočiti da je povećanje temperature sa 90 $^\circ\text{C}$ na 100 $^\circ\text{C}$ doprinelo smanjenju veličine pora (D_{sr}) i samim tim do povećanja S_p za gelove kukuruznog skroba, a veća S_p znači veći procenat impregnacije. S_p kserogelova kukuruznog skroba koja je određena u ovom radu (4,25-5,52 m^2/g) je u saglasnosti sa prethodno određenim vrednostima za krompirov skrobni gel koji je dobijen kriosušenjem alkogelova (0,15-24,6 m^2/g) (Te Wierik i sar., 1997). Isti autori su zaključili da

$S_p=1,5 \text{ m}^2/\text{g}$ skrobnih gelova obezbeđuje najbolje kontrolisano otpuštanje leka. Vrednosti S_p skrobnih aerogelova koje su dobijene u ovom radu ($0,02\text{-}0,35 \text{ m}^2/\text{g}$) su niže nego vrednosti S_p skrobnih aerogelova u objavljenoj studiji Garcia-Gonzalez i saradnika ($34\text{-}120 \text{ m}^2/\text{g}$) koji su pripremljeni metodom geliranja emulzije na temperaturama $95\text{-}140 \text{ }^\circ\text{C}$. Razmena rastvarača iz emulzije-gela su izveli etanolom, a sušenje pomoću nkCO_2 su izveli na $40 \text{ }^\circ\text{C}$ i $11\text{-}12 \text{ MPa}$ tokom 4 h, sa protokom CO_2 koji je veći $43\text{-}178\%$ nego u ovom radu ($0,86\text{-}1,67 \text{ kg/h}$) (Garcia-Gonzalez i sar., 2012b). Vrednosti S_p za aerogelove krompirovog i kukuruznog skroba bogatog AM, koji su sušeni 24 h na $9\text{-}12 \text{ MPa}$ i $40 \text{ }^\circ\text{C}$ sa nkCO_2 protokom $0,88\text{-}0,97 \text{ kg/h}$ je $72,5\text{-}90,3 \text{ m}^2/\text{g}$ (Mehling i sar., 2009). Razlika između ovih rezultata i rezultata koji su dobijeni u ovom radu se mogu objasniti različitim uslovima sušenja, a pre svega znatno većim protokom natkritičnog fluida.

Na Slici 31 se može videti adsorpciono-desorpciona izoterma azota reprezentativnih uzoraka (kserogelovi kukuruznog skroba pripremljeni geliranjem na $90 \text{ }^\circ\text{C}$ i $100 \text{ }^\circ\text{C}$) koji su imali najveću S_p . Oblik azotnih izoterma ukazuje na visoku mezoporoznost materijala.



Slika 31. Adsorpciono-desorpciona izoterma azota za kukuruzni kserogel

Dobijeni rezultati ukazuju na veliki potencijal i kukuruznog i tapioka skroba za proizvodnju funkcionalnih prirodnih i biodegradabilnih nosača za različite primene, a poželjno u farmaciji, kozmetici i industriji hrane. Rezultati BET analize ukazali su na potrebu za daljom optimizacijom metode proizvodnje aerogela koja se odnosi na vreme sušenja i CO₂ protok. U tom smislu, treba istaći da natkritično sušenje podrazumeva dodatne troškove zbog upotrebe opreme za visoke pritiske. Takođe, duže nkCO₂ sušenje ili veći CO₂ protoci zahtevaju kompleksniju proceduru. Ovaj rad je pokazao da u slučaju kukuruznih i tapioka kserogelova, naročito onih dobijenih od hidrogelova pripremljenih na 90 °C i 100 °C, to neće biti potrebno pošto su prinosi impregnacije timolom predloženom NKI tehnikom na primenjenim uslovima već zadovoljavajući (3,37%-4,01%).

4.3.1.4. Zaključci

- Temperatura na kojoj se geliraju kukuruzni i tapioka skrob određuje karakteristike dobijenih hidrogelova (boju, transparentnost, broj celih granula skroba). Hidrogelovi pripremljeni na 70 °C i 80 °C su beli, dok su hidrogelovi dobijeni na 90 °C i 100 °C delimično ili potpuno providni.
- Temperatura pripreme hidrogelova određuje stepen kontrakcije acetogelova. Acetogelovi dobijeni na 100 °C su se samo delimično ili nimalo kontrahovali, dok su se acetogelovi dobijeni od hidrogelova pripremljenih na nižim temperaturama vidno kontrahovali.
- Ksero- i aerogelovi kukuruznog i tapioka skroba su uspešno impregnirani timolom na 15 MPa i 35 °C tokom 24 h. Prinos impregnacije ksero- i aerogelova raste sa porastom temperature pripreme hidrogelova.
- Kserogelovi tapioka skroba imaju viši prinos impregnacije od kserogelova kukuruznog skroba koji su pripremljeni na istim uslovima sa izuzetkom kserogela koji je dobijen na 100 °C. Aerogelovi kukuruznog skroba imaju veći prinos impregnacije od aerogelova tapioka skroba. Najveći prinos impregnacije su imali kserogelovi kukuruznog skroba (dobijen na 100 °C) i tapioka skroba (dobijen na 90 °C) (4,01% i 3,63%).
- FESEM analizom je utvrđeno da su ksero- i aerogelovi kukuruznog i tapioka skroba porozni. Ksero- i aerogelovi, dobijeni od hidrogelova pripremljenih na 90 °C i 100 °C,

imaju porozniju strukturu u poređenju sa ksero- i aerogelovima dobijenih od hidrogelova pripremljenih na 70 °C i 80 °C.

- Od kserogelova i aerogelova analiziranih BET adsorpcionom izotermom, najveću specifičnu površinu (S_p) ima kserogel kukuruznog skroba pripremljen na 100 °C (5,52 m²/g) i aerogel tapioka skroba pripremljen na 90 °C (1,72 m²/g).
- Ksero- i aerogelovi imaju malu specifičnu površinu detektovanu BET adsorpcionom izotermom, što nije u skladu sa relativno visokim prinosom impregnacije ovih gelova. Iako ksero- i aerogelovi imaju pore veličine nekoliko mikrometara, koje doprinose procesu impregnacije, one se ne mogu detektovati BET metodom, što znači da je mezoporoznost dobijenih gelova skroba samo mala frakcija ukupne poroznosti ksero- i aerogelova.

4.3.2. Impregnacija timola na gelove hitozana

4.3.2.1. Priprema gelova hitozana

Hemijski umreženi hidrogelovi hitozana su dobijeni umrežavanjem zakišelenog vodenog rastvora hitozana na način opisan u poglavlju 3.2.2. U zavisnosti od primenjenog umreživača (formaldehid ili glutardialdehid) dobijeni su gelovi različite boje (Slika 32).



Slika 32. Acetogelovi hitozana umreženi a) formaldehidom i b) glutardialdehidom

Tokom umrežavanja vodenog rastvora hitozana formaldehidom, dobijen je providno-beo acetogel (Slika 32a). Umrežavanjem glutardialdehidom, vodeni rastvor je promenio boju od providno-bele do žute. Tokom zamene rastvarača acetonom, boja se promenila od žute, preko narandžaste do tamno braon (Slika 32b).

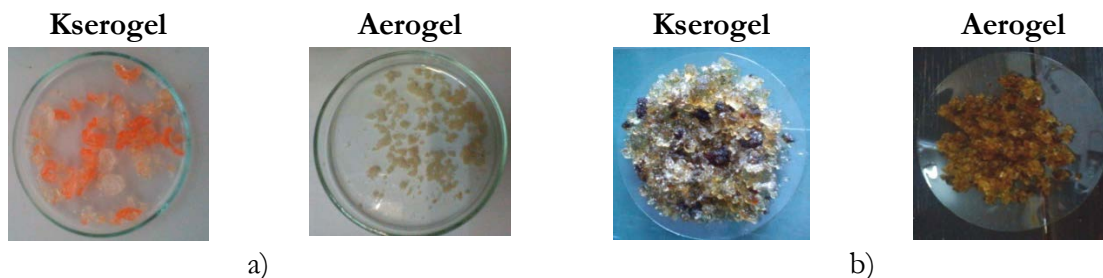
Dobijeni acetogelovi su sušeni na vazduhu u cilju dobijanja kserogelova i pomoću nkCO_2 u cilju dobijanja aerogelova hitozana. U literaturi se može naći određen broj studija u kojima su acetogelovi hitozana sušeni pomoću nkCO_2 . Pritisak i temperatura su pri tome varirani u opsegu 7-25 MPa i 35-55 °C (Ozdemir i sar., 2013; Rinki i sar., 2009b). Odabrani uslovi sušenja acetogelova u ovom radu su prikazani u Tabeli 16, dok su metode sušenja detaljno opisane u poglavlju 3.2.2.1. i 3.2.2.2. Ukratko, metoda I sušenja pomoću nkCO_2 podrazumeva kombinaciju statičkog sušenja u trajanju od 1 h i dinamičkog sušenja u trajanju od 2 h na 20 MPa i 40 °C. Metoda II sušenja pomoću nkCO_2 podrazumeva kombinaciju statičkog sušenja u trajanju od 1 h i dinamičkog sušenja u trajanju od 2 h na temperaturi od 50 °C i pritisku od 15 MPa, dok metoda III sušenja pomoću nkCO_2 podrazumeva 5 ponavljanja jednočasovnog statičkog sušenja na temperaturi od 50 °C i pritisku od 15 MPa nakon koga sledi brza dekompresija. Uočeno je da se, na izabranim uslovima sušenja, veća količina acetona izdvaja tokom statičkog dela sušenja u poređenju sa dinamičkim delom sušenja. Jedno od ograničenja primenjenih uslova sušenja je nemogućnost da se acetogelovi potpuno osuše zbog relativno malog protoka nkCO_2 u postojećem postrojenju. Zbog toga su gelovi nakon tretmana natkritičnim fluidom, dodatno sušeni još 2 dana na vazduhu usled čega je došlo do tamnjenja gelova i dodatnog smanjenja njihove zapremine.

Tabela 16. Uslovi za pripremu ksero- i aerogelova hitozana

Rastvarač	Umreživač	Metoda sušenja
0,1 M sirćetna kiselina	formaldehid	sušenje na vazduhu
		Metoda I: nkCO_2 20 MPa i 40 °C (statička 1h, dinamička 2 h)
		Metoda II: nkCO_2 15 MPa i 50 °C (statička 1h, dinamička 2 h)
0,2 M sirćetna	glutardialdehid	sušenje na vazduhu
		Metoda III: nkCO_2 15 MPa i 50 °C (statička, pet puta po 1 h)

U zavisnosti od primenjenog umreživača i uslova sušenja dobijeni su ksero- i aerogelovi različite boje i oblika (Slika 33). Uočeno je da tokom sušenja dolazi do značajnog smanjenja zapremine gelova. Promena boje hidrogelova, aceto- i alkogelova pod uticajem izbora umreživača i metode sušenja je u skladu sa istraživanjem koje su izveli Chang i saradnici (Chang i sar., 2008). Boja gelova hitozana se povezuje sa koncentracijom umreživača

formaldehida i glutardialdehida. Što je veći broj aldehidnih grupa umreživača, za formiranje gela hitozana, to će boja dobijenih gelova biti intenzivnija (boja može varirati od žute do braon) (Ostrowska-Czubenko i sar., 2011).



Slika 33. Gelovi hitozana umreženi a) formaldehidom i b) glutardialdehidom

4.3.2.2. Impregnacija gelova hitozana

Impregnacija gelova hitozana timolom je izvedena u ćeliji za rad pod visokim pritiscima na način opisan u poglavlju 3.2.3. U Tabeli 17 su predstavljeni rezultati impregnacije ksero- i aerogelova hitozana timolom u zavisnosti od vrste umreživača i metode sušenja.

Tabela 17. Rezultati impregnacije ksero- i aerogelova hitozana timolom

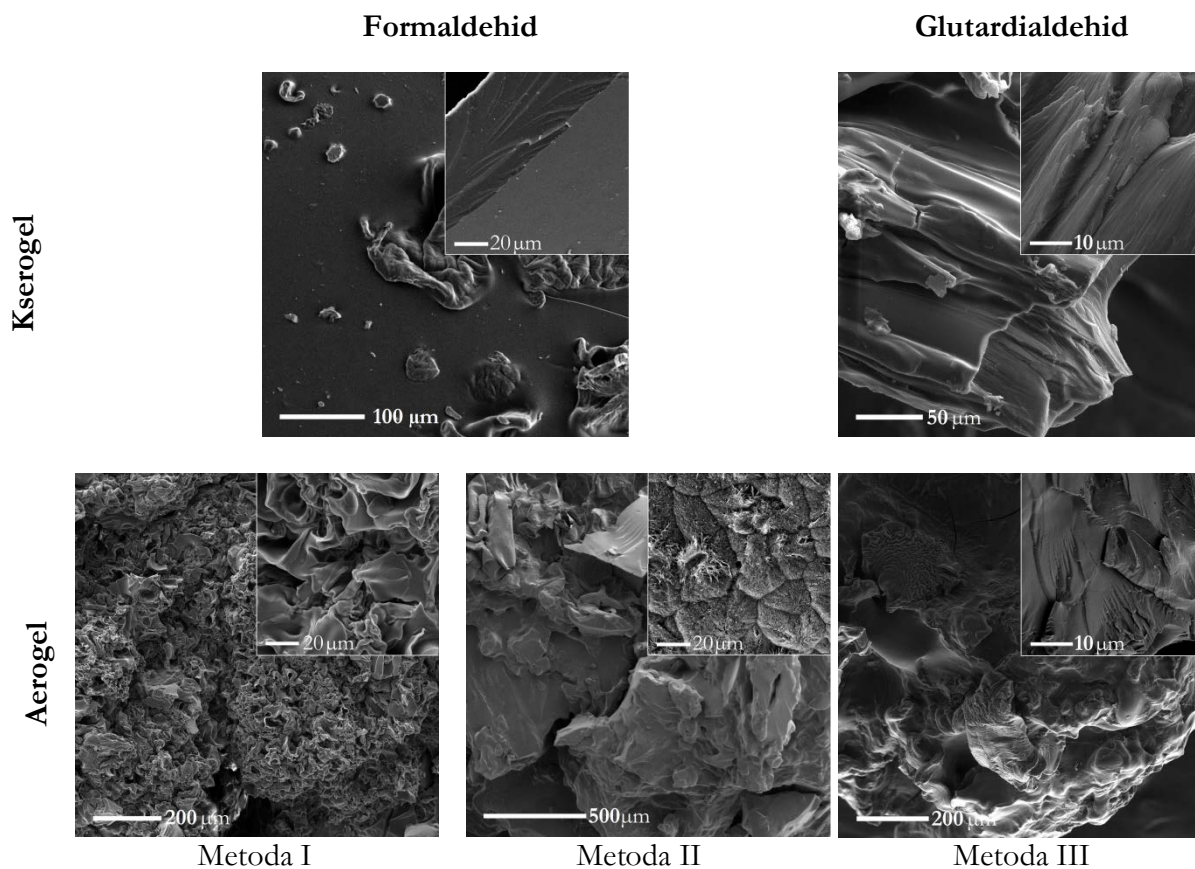
Rastvarač	Umreživač	Metoda sušenja	I (%)
0,1 M sirćetna kiselina	formaldehid	na vazduhu	3,76
		Metoda I	5,35
		Metoda II	11,30
0,2 M sirćetna kiselina	glutardialdehid	na vazduhu	10,62
		Metoda III	10,82

Kako se iz Tabele 17 može videti, aerogelovi hitozana su dali bolje rezultate sa većom količinom impregniranog timola nego kserogelovi u svim slučajevima. Takođe, mogu se uočiti značajne razlike u prinosu impregnacije aerogelova dobijenih metodom II na 50 °C i 15 MPa (11,30%) u poređenju sa aerogelovima koji su dobijeni metodom I na uslovima 40 °C i 20 MPa (5,35%) za hidrogel koji je umrežen formaldehidom. Diez-Municio i saradnici (Diez-Municio i sar., 2011) su dinamičkom metodom impregnirali kserogelove hitozana (dobijene sušenjem

hidrogelova pripremljenih iz rastvora sirćetne kiseline) i aerogelove hitozana (dobijene sušenjem acetogelova na 7,4 MPa i 32 °C) laktulozom na 10 MPa, 60 °C i 100 °C tokom 1 h uz kosolvent etanol. Dobijen je prinos u opsegu 0,24-8,61% za kserogelove i 2,45-3,96% za aerogelove. Kada se uporede umreživači koji su korišćeni za dobijanje gelova hitozana, najveći prinos impregnacije je dobijen za uzorak koji je pripremljen geliranjem formaldehidom (11,30%). Kada je u pitanju umreživač glutardialdehid, razlika u prinosu impregnacije između ksero- i aerogela nije velika (10,62% i 10,82%) tako da se u tom slučaju može i kserogel upotrebiti kao efikasan nosač za timol kao aktivnu supstancu i time izbegne natkritično sušenje

4.3.2.3. Karakterizacija gelova hitozana

FESEM slike gelova hitozana prikazane su na Slici 34. Problem koji je uočen tokom izvođenja SEM metode je da elektronski snop topi gelove hitozana tokom veoma kratkog vremena dejstva, što prouzrokuje menjanje teksture gelova. Isti problem su imali Chang i saradnici (Chang i sar., 2008). Iz tog razloga nije bilo moguće dobiti slike većih uvećanja. Kada se uporede dobijene slike gelova hitozana, može se videti da postoji očigledna razlika u morfologiji između ksero- i aerogelova. Dok je površina kserogelova uglavnom ravna i pri datim uvećanjima skoro bez pora, struktura aerogelova je izrazito porozna. Izbor umreživača utiče na strukturu dobijenog polimera na takav način da je hitozan umrežen formaldehidom i sušen sa nkCO_2 metodama I i II imao najizraženiju poroznu strukturu. Kserogel hitozana koji je umrežen formaldehidom ima ravnu, vlaknastu površinu i bez vidljivih pora pri datim uvećanjima. Aerogel i kserogel hitozana koji su umreženi glutardialdehidom imali su slične prinose impregnacije (10,82% i 10,62%). Ovi rezultati se slažu sa SEM slikama koje su prikazane na Slici 34 gde se može videti da ovi gelovi pri istim uvećanjima imaju sličnu površinu.



Slika 34. FESEM slike površine ksero- i aerogelova hitozana

Tokom izvođenja BET metode, gelovi hitozana su bili stabilni iako je degasifikacija uzoraka izvedena na 105 °C. Vrednosti specifičnih površina (S_p) reprezentativnih gelova hitozana su date u Tabeli 18. Za uzorak aerogela hitozana koji je umrežen formaldehidom i osušen na 15 MPa metodom II, uređaj nije mogao da očita BET vrednost specifične površine zbog veoma male vrednosti, tako da je ta vrednost dobijena merenjem specifične površine u jednoj tački. Dobijeni rezultati pružaju informaciju o poroznosti materijala, ali kako je u prethodnom poglavlju naglašeno ne može se sva poroznost detektovati ovom tehnikom. Na osnovu SEM slika (Slika 34), uočava se da kod posmatranih aerogelova postoje pore veličine nekoliko mikrometara. Takve pore su prevelike da bi se detektovale adsorpcionom metodom upotrebom azota, koja je ograničena na analizu pora veličine do 300 nm. Dobijeni rezultati potvrđuju da je mezoporoznost samo mala frakcija ukupne poroznosti ksero- i aerogelova hitozana.

Tabela 18. Vrednosti specifičnih površina gelova hitozana

	F-aerogel (Metoda I)	F-aerogel (Metoda II)	G-kserogel (Metoda III)
S_P (m²/g)^a	0,0467	-	0,2119
S_P (m²/g)^b	0,0567	0,0319	0,2074

^a BET metoda; ^b Metoda površine u jednoj tački; G- glutardialdehid; F- formaldehid

Od analiziranih uzoraka, uzorak aerogela hitozana koji je umrežen formaldehidom (F-aerogel) i osušen metodom II na 15 MPa i 50 °C ima najmanju, a uzorak kserogela hitozana koji je umrežen glutardialdehidom (G-kserogel) ima najveću specifičnu površinu (0,0319 m²/g i 0,2119 m²/g, redom). Dobijeni rezultati nisu u skladu sa vrednostima prinosa impregnacije koji su prikazani u Tabeli 17. Iako aerogelovi hitozana umreženih formaldehidom imaju veoma malu poroznost, oni su vezali značajnu količinu timola. Upravo uzorak sa najmanjom detektovanom specifičnom površinom (F-aerogel dobijen metodom II, S_P=0,0319 m²/g) je imao najveći prinos impregnacije timola (11,30%). Ovakvi rezultati se mogu objasniti postojanjem velikog broja pora veličine nekoliko mikrona kod ovog aerogela, koje su vidljive na SEM slikama, a nisu mogle biti detektovane primenjenom BET metodom.

Dobijeni aerogelovi hitozana u ovom radu imaju veoma malu specifičnu površinu kada se uporede sa podacima objavljenim u literaturi. Chang i saradnici (Chang i sar., 2008) su hidrogelove hitozana sušili pomoću CO₂ na 31,1 °C i 738 MPa. Specifična površina dobijenih aerogelova hitozana umreženih glutardialdehidom i formaldehidom iznosila je 569 m²/g i 845 m²/g. Ovakvi rezultati se mogu objasniti ograničenjima aparatura na kojima je izvršeno natkritično sušenje, a pre svega nedovoljno velikim protokom natkritičnog fluida u dinamičkom delu sušenja.

Ukoliko se uporede SEM slike gelova skroba (Slike 28 i 29) i gelova hitozana (Slika 34) kao i S_P gelova skroba (Tabela 15) i gelova hitozana (Tabela 18), uočava se da gelovi koji su dobijeni od skroba imaju izraženiju poroznu strukturu kao i značajno veću specifičnu površinu. Gel kukuruznog skroba sa najvećim prinosom impregnacije timola (4,01%) ima S_P=5,52 m²/g, dok gel hitozana sa najvećim prinosom impregnacije (11,30%) ima S_P=0,0319 m²/g. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da na veliki prinos impregnacije gelova hitozana

timolom, osim specifične površine, utiču i drugi faktori. Dias i saradnici (Dias et al., 2013) su uočili da je impregnacija aktivne supstance u polimerni nosač takođe pod uticajem funkcionalnih grupa polimera. Uopšteno, što je veća interakcija bioaktivnih molekula sa funkcionalnim grupama polimera, to će biti veća količina impregnirane supstance. Uragami i saradnici (Uragami i sar., 1994) su ispitivali uticaj količine umreživača glutardialdehida na strukturu gelova hitozana. Potvrdili su da sav glutardialdehid, koji se dodaje rastvoru, reaguje sa hitozanom, pri čemu finalni umreženi gel nema aldehidne grupe, a samim tim ni neizreagovali glutardialdehid, što je potvrđeno i drugim studijama (Ostrowska-Czubenko i sar., 2011; Ray i sar., 2010). To znači da su na gelu hitozana ostale amino i hidroksilne funkcionalne grupe sa kojima biokativna supstanca može reagovati. Gong i saradnici (Gong i sar., 2006) su impregnirali hitozan sa indometacinom pomoću nkCO_2 i analizom impregniranih uzoraka su zaključili da je došlo do interakcije amino grupe hitozana i karbonilne grupe indometacina. Na osnovu svega navedenog, može se pretpostaviti da gelovi hitozana koji su dobijeni u ovom radu, obezbeđuju veći prinos impregnacije od gelova skroba usled postojanja amino grupa gela hitozana sa kojima hidroksilna grupa timola može stupiti u interakciju.

4.3.2.4. Zaključci

- Izbor umreživača vodenog rastvora hitozana određuje karakteristike dobijenih hidrogelova, odnosno acetogelova hitozana.
- Sušenjem acetogelova na vazduhu dobijaju se kserogelovi, dok se sušenjem pomoću nkCO_2 dobijaju aerogelovi. Izvođenjem natkritičnog sušenja uočeno je da se na 15 MPa i 50 °C postiže bolje sušenje acetogelova u odnosu na 20 MPa i 40 °C.
- Na FESEM slikama je uočeno da izbor umreživača i metode sušenja određuje morfoligiju ksero- i aerogelova hitozana. Dobijeni kserogelovi imaju ravnu, dok aerogelovi imaju poroznu površinu.
- Ksero- i aerogelovi hitozana su uspešno impregnirani timolom na 15 MPa i 35 °C tokom 24 h. Aerogelovi hitozana imaju veći prinos impregnacije od kserogelova, a najveći prinos impregnacije je imao gel umrežen formaldehidom koji je osušen na 15 MPa i 50 °C

(11,30%). Od ksreogelova, najveći prinos impregnacije je imao gel dobijen umrežavanjem glutardialdehidom (10,62%).

- Od kserogelova i aerogelova analiziranih BET adsorpcionom izotermom, najveću specifičnu površinu (S_p) ima kserogel hitozana umrežen glutardialdehidom (0,2119 m^2/g). Ksero- i aerogelovi imaju malu S_p što nije u skladu sa visokim prinosom impregnacije ovih gelova. Iako ksero- i aerogelovi imaju pore veličine nekoliko mikrometara, koje doprinose procesu impregnacije, one se ne mogu detektovati BET adsorpcionom izotermom, što znači da je mezoporoznost dobijenih gelova hitozana samo mala frakcija ukupne poroznosti ksero- i aerogelova.

4.4. IMPREGNACIJA TIMOLA NA ACETAT CELULOZE NATKRITIČNIM UGLJENIK(IV)-OKSIDOM

Proces NKI acetata celuloze (AC) timolom je izveden u ćeliji za rad pod visokim pritiscima na način opisan u poglavlju 3.2.3. Analiziran je uticaj pritiska i temperature na proces NKI timola (pritisak 10 MPa, 15 MPa i 20 MPa i temperatura 35 °C i 50 °C) dok je vreme impregnacije bilo konstantno i iznosilo 24 h. Vreme impregnacije je usvojeno na osnovu eksperimenata određivanja rastvorljivosti timola u $nkCO_2$ koji su izvedeni na istoj opremi. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 19. Pri izvođenju eksperimenata, polazni odnos AC:timol bio je 1:1. Pri ovom odnosu, nezavisno od radnih uslova, uočeno je da je, nakon izvesnog vremena, sav timol nestao iz staklenog korita. To znači da je cela količina koja je stavljena u sud na početku eksperimenata vremenom rastvorena u $nkCO_2$ i impregnirana u AC. Zbog toga nije moguće zaključiti da je dostignut maksimalni mogući prinos impregnacije na datoj temperaturi, pritisku i pri datom vremenu impregnacije.

Da bi se dobili maksimalni prinosi impregnacije, u daljim eksperimentima maseni odnos AC:timol je menjan u korist timola sve dok nije uočeno da je timol preostao u staklenom koritu nakon 24 h impregnacije. Na ovaj način je obezbeđeno postojanje maksimalne pogonske

sila za proces impregnacije u sistemu. Odnosi AC:timol su, u tom slučaju, u Tabeli 19 obeleženi superskriptom (*) i opisani sa „timol u višku” u daljem tekstu. Rezultati pokazuju da se, kada je timol u višku u datom sistemu, prinos impregnacije povećava značajno sa povećanjem pritiska sa 10 na 15 MPa, i još neznatno sa povećanjem na 20 MPa (Slika 35).

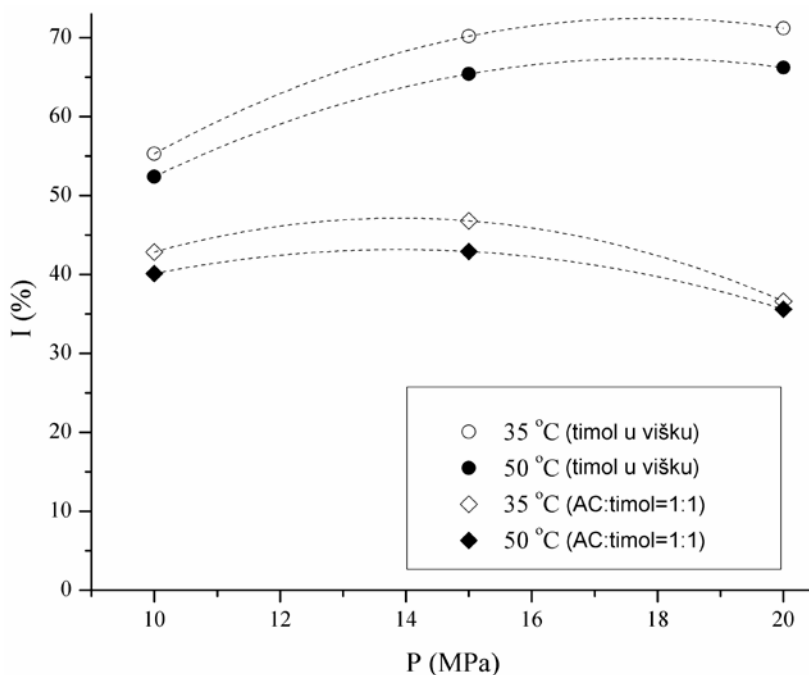
Tabela 19. Rezultati impregnacije AC timolom za različite odnose AC:timol i vreme impregnacije od 24 h

Pritisak (MPa)	35 °C		50 °C	
	m_{CA}/m_T (g/g)	I (%)	m_{CA}/m_T (g/g)	I (%)
10	1,0	42,86 ^B	1,0	40,12 ^B
	0,5	46,30 ^B	0,5	46,17 ^B
	0,3*	55,31 ^B	0,3*	52,40 ^B
15	1,0	46,81 ^B	1,0	42,91 ^B
	0,2	57,30 ^S	0,3	58,87 ^S
	0,1*	70,20 ^T	0,1*	65,42 ^T
20	1,0	36,62 ^B	1,0	35,60 ^S
	0,2	62,55 ^T	0,2	60,52 ^T
	0,04*	71,21 ^T	0,1*	66,23 ^T

*- timol u višku; B- bubrenje; S- slepljivanje; T- topljenje

Kada je odnos AC:timol 1:1 prinos impregnacije se povećava sa porastom pritiska od 10 do 15 MPa, ali sa dodatnim povećanjem na 20 MPa, impregnacioni prinos se smanjuje, što znači da je funkcija kompleksnih interakcija trojnog sistema. Bez obzira na odnos AC:timol, sa porastom temperature na datom pritisku, prinos impregnacije se smanjuje.

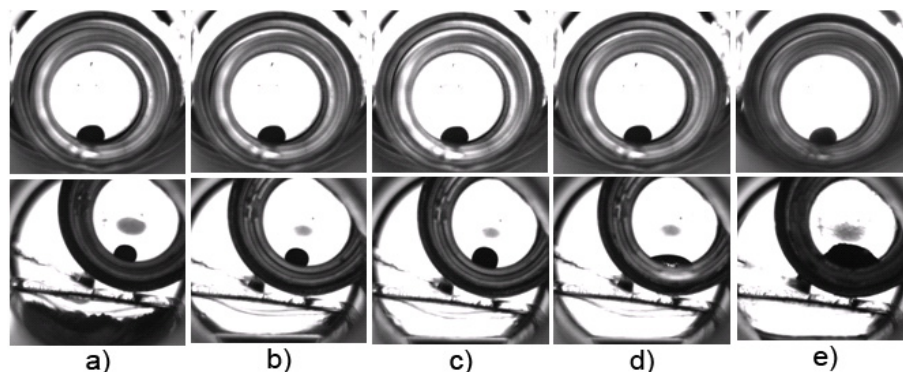
Uočeno je da su svi uzorci AC prošli kroz neku vrstu strukturalne promene tokom procesa impregnacije. U nekim slučajevima to je bilo bubrenje (B), u drugim bubrenje koje je praćeno slepljivanjem (S), dok je u pojedinim slučajevima dobijen mekani providni rastop (T). Promene koje su se desile su predstavljene u Tabeli 19 superskriptom pored vrednosti prinosa impregnacije za svaki uzorak.



Slika 35. Uticaj pritiska i temperature na prinos impregnacije za vreme impregnacije od 24 h

Naknadno su izvedeni dodatni eksperimenti da bi se utvrdilo da li na ove promene polimera presudni uticaj imaju operativni uslovi (pritisak i temperatura) ili su one pre svega uslovljene stepenom impregnacije timola. Takođe, ispitano je da li dolazi do promene AC usled dejstva čistog nkCO_2 .

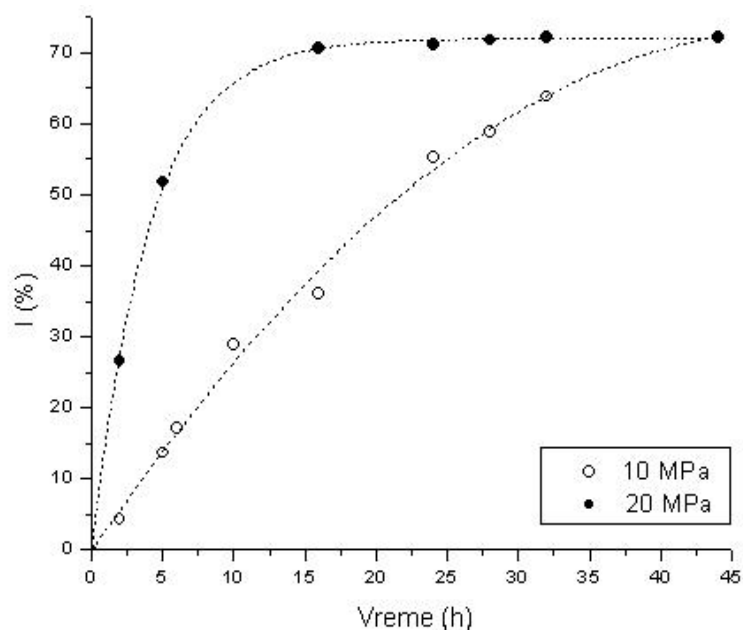
Uticaj čistog nkCO_2 i smeše nkCO_2 -timol (timol u višku) na AC tokom 24 h praćen je u ćeliji za rad pod visokim pritiscima. Fotografije polimera su prikazane na Slici 36. Sa Slike 36 se može videti da nema vidljivih efekata dejstva čistog nkCO_2 na AC. Dekompresija takođe nije imala uticaja na ispitivani polimer. Ovakvo zapažanje je u skladu sa literaturnim podacima (Beltrame i sar. 1998) da tretman diacetata celuloze sa nkCO_2 na pritiscima u opsegu 10-25 MPa i opsegu temperatura 40-90 °C nije rezultovao promenom termičkog ponašanja polimera, njegove kristaliničnosti i svojstvima skupljanja. Shen i saradnici (Shen i sar., 2008) su objavili da je rastvaranje nkCO_2 u AC ograničeno pošto su lanci AC, sa OH- grupama koje se ponavljaju, povezani međusobno vodoničnim vezama i nkCO_2 nema dovoljnu snagu rastvarača da prevaziđe te AC-AC interakcije.



Slika 36. Uticaj nkCO_2 (gornje slike) i smeše nkCO_2 -timol (donje slike) na AC na 10 MPa i 35 °C: a) na početku i nakon b) 2 h, c) 5 h, d) 24 h i e) dekompresije

Uvođenjem timola u sistem, dolazi do značajnih promena (Slika 36), počevši od bubrenja AC nakon 2 h, pa do gubljenja strukture celog polimera i njegovog prelaska u oblik providnog diska (polimerni rastop) nakon 24 h. Tokom dekompresije zapremina polimera se povećala kako je CO_2 napuštao njegovu mekanu unutrašnjost što je rezultovalo formiranjem pene. Evidentno je da timol, sa svojim OH- grupama, ima moć da naruši vodonične veze između lanaca AC. Učestvovanjem u međumolekulskim AC-AC vodoničnim vezama, timol je u izvesnoj meri promenio čvrstu strukturu polimera.

U narednim eksperimentima je ispitan kapacitet AC za impregnaciju timola (maksimalni prinos impregnacije) na temperaturi 35 °C i pritiscima 10 MPa i 20 MPa. Dobijeni rezultati su predstavljeni u Tabeli 20 i na Slici 37. Detektovane promene su predstavljene superskriptom pored ostvarenog prinosa impregnacije u Tabeli 20. Kao što se može videti, kapacitet AC za impregnaciju timolom ne zavisi od pritiska i u oba eksperimenta iznosi 72,26%. Iako se kapacitet AC za vezivanje timola nije povećao sa povećanjem pritiska, može se uočiti da je impregnacija mnogo brža na višem pritisku, verovatno zbog povećane difuzivnosti timola u čvrstoj fazi i veće rastvorljivosti timola u nkCO_2 , čime je pogonska sila za impregnaciju veća.



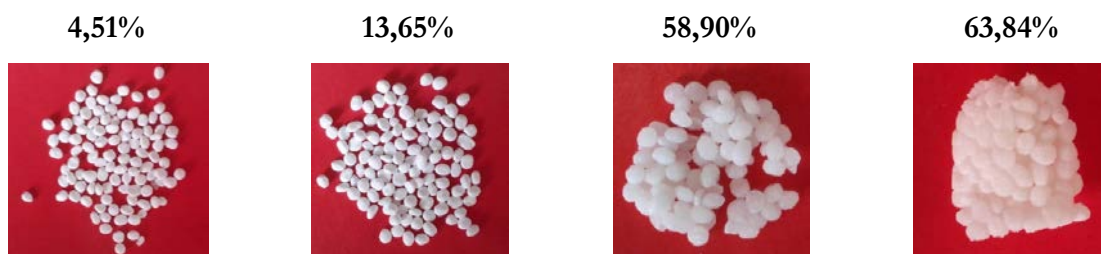
Slika 37. Uticaj vremena i pritiska na prinos impregnacije acetata celuloze na 35 °C i sa timolom u višku

Tabela 20. Prinos impregnacije AC timolom pri temperaturi 35 °C

P (MPa)	Vreme impregnacije (h)									
	2	4	5	6	10	16	24	28	32	44
10	4,51 ^N	9,06 ^N	13,65 ^B	17,09 ^B	28,83 ^B	36,02 ^B	55,31 ^B	58,90 ^S	63,84 ^T	72,26 ^T
20	26,60 ^B	-	51,81 ^B	-	-	70,70 ^T	71,21 ^T	71,78 ^T	72,21 ^T	72,26 ^T

N- bez vidljive promene, B- bubrenje, S- slepljivanje, T- topljenje

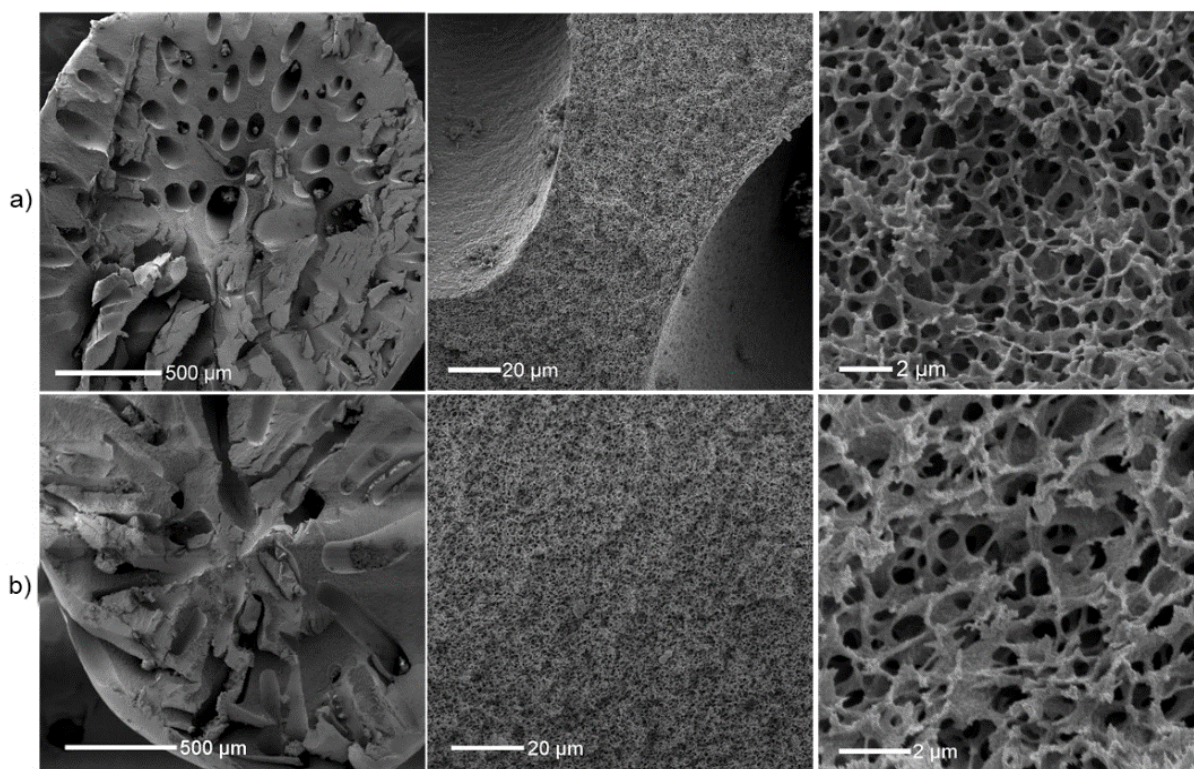
Na osnovu Tabela 19 i 20 se može zaključiti da je promena u morfologiji AC najvećim delom pod uticajem količine impregniranog timola. Sa prinosom impregnacije koji je niži od 9% nije došlo do promene u strukturi polimera. Pri prinosima impregnacije između 9% i 13%, AC počinje da bubri, dok slepljivanje perlica počinje između prinosa impregnacije od 55% i 57%. Sa prinosima impregnacije koji su veći od 60%, dolazi do formiranja polimernog rastopa. Primenjeni operativni uslovi (pritisak i temperatura), utiču na brzinu impregnacije (Slika 37). Na Slici 38 su prikazani uzorci AC impregniranog različitim količinama timola. Može se videti kako se izgled perlica AC menjao sa povećanjem količine impregniranog timola.



Slika 38. Uticaj prinosa impregnacije na promenu AC na 10 MPa i 35 °C

4.4.1. Karakterizacija acetata celuloze

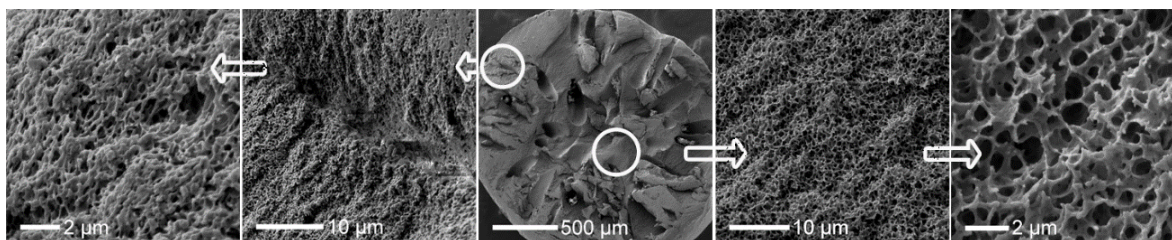
Da bi se opisale i bolje razumele morfološke promene AC tokom procesa NKI timolom, analizirani su uzorci netretiranog AC, uzorci AC tretiranog čistim nkCO_2 i uzorci timolom impregniranog AC.



Slika 39. Morfologija AC (poprečni preseki): a) pre tretmana i b) posle nkCO_2 tretmana (10 MPa, 35 °C, 24 h)

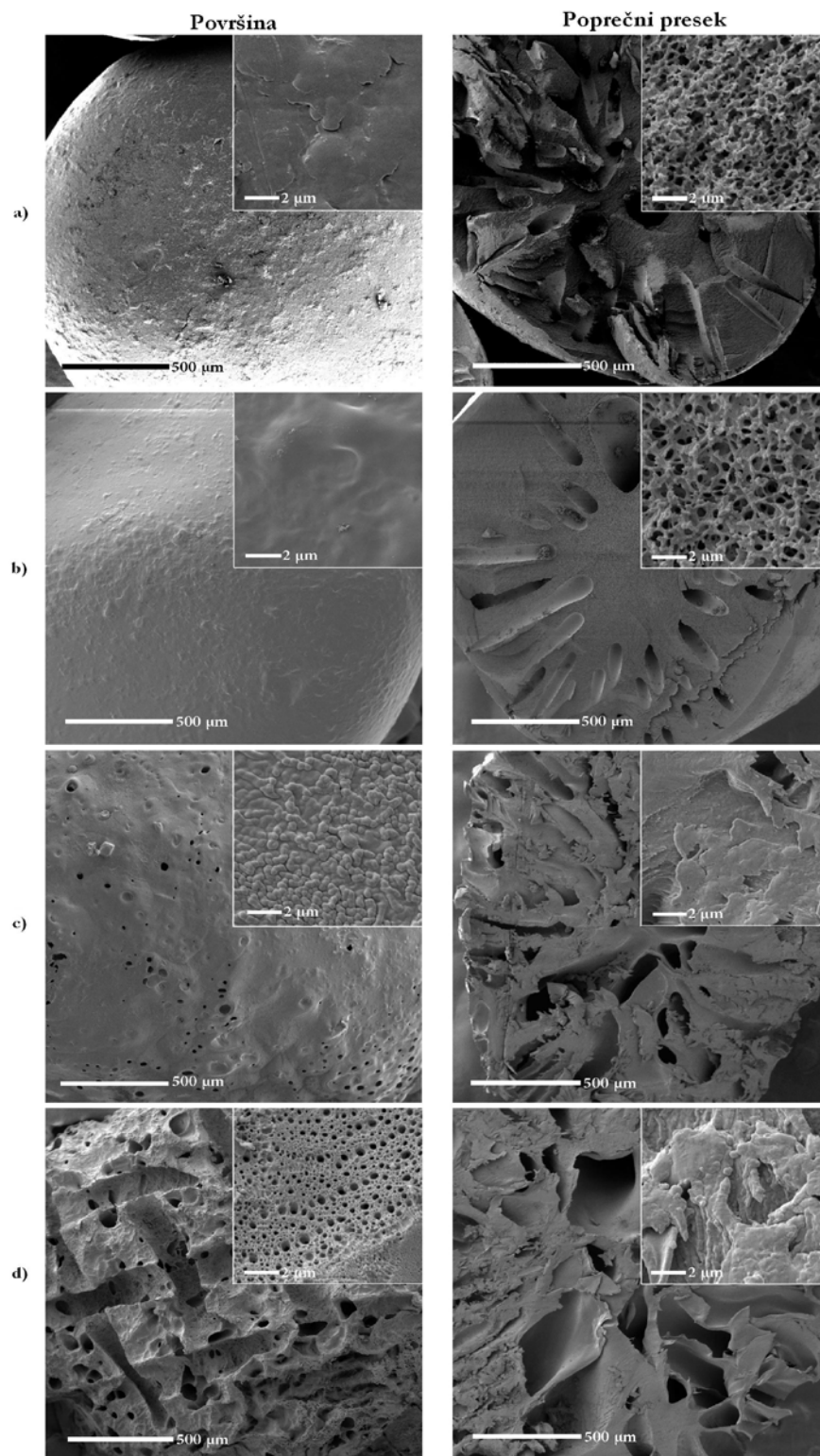
Morfologija netretirane perlice AC se može videti na Slici 39a, dok je morfologija perlice AC tretirane čistim nkCO_2 na 10 MPa i 35 °C tokom 24 h i sa sporom dekompresijom prikazana na Slici 39b. Netretirana perlica AC ima izraženu poroznu strukturu sa velikim i malim porama. Velike pore imaju prečnik oko 100 μm , a između njih se nalaze male pore sa prečnikom oko 1 μm . Kako se sa slika sa većim uvećanjima (bar 20 μm i 2 μm) može videti, nakon tretmana sa čistim nkCO_2 praktično ne dolazi do promene porozne strukture AC. Ovo je u skladu sa rezultatima dobijenim u ćeliji za rad pod visokim pritiscima (Slika 36) i literaturnim navodima da nkCO_2 ne utiče značajno na svojstva AC i međumolekulske vodonične veze.

Značaj masenog odnosa AC:timol, u predloženom procesu impregnacije, na morfologiju AC se može videti na Slici 40. Na ovoj slici su prikazane FESEM slike perlice AC koja je impregnirana timolom na 15 MPa i 35 °C tokom 24 h, pri čemu timol u sistemu nije bio u višku ($m_{\text{AC}}:m_{\text{T}}=1,4$). Rezultujući prinos impregnacije je bio 28,57%, što je mnogo niže nego 70,20% (Tabela 19) u slučaju timola u višku na istim uslovima. Strukturalne promene koje su se desile nisu iste kroz celu perlicu AC. Može se videti da su se značajne promene u morfologiji desile samo u blizini površine perlice, dok su pore u sredini perlice praktično ostale nepromenjene. To može značiti da na ovim uslovima količina timola koja je dospela do sredine perlice nije dovoljna da bi uticala na međumolekulske vodonične veze AC. Sa druge strane, blizu površine perlice je impregnirana dovoljna količina timola da izazove promenu strukture AC učestvovanjem u vodoničnim vezama i da na taj način potpuno promeni morfologiju ovog dela perlice.



Slika 40. Morfologija impregniranog AC sa prinosom 28,57% (poprečni presek); levo- pore blizu površine, desno- pore u sredini perlice

Uticaj procesa NKI timola na morfologiju AC takođe može biti objašnjen Slikom 41. Na ovoj slici su predstavljene SEM fotografije površine i unutrašnjosti perlica impregniranih na 10 MPa i 35 °C sa različitim prinosima impregnacije.



Slika 41. Morfologija površine i poprečnog preseka perlice AC (10 MPa, 35 °C) prinosa impregnacije: a) 4,51%, b) 13,65%, c) 58,90% i d) 63,84%

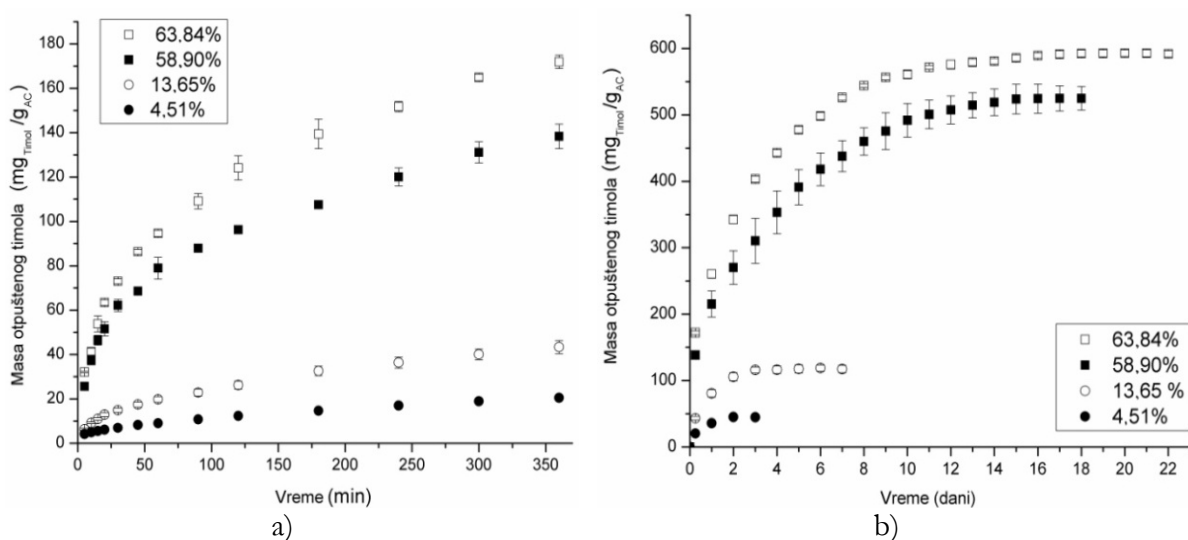
Pri malom prinosu impregnacije AC od 4,51% nije došlo do uočljive promene (Slika 41a). Promene se uočavaju sa porastom prinosa impregnacije, gde prvo dolazi do bubrenja (Slika 41b), slepljivanja (Slika 41c) i na kraju topljenja (Slika 41d). Svi uzorci su bili impregnirani u sistemu sa viškom timola, ali pri različitom operativnom vremenu. Kao što se može videti, uzorak sa najmanjim prinosom (4,51%) praktično nije imao nikakvu promenu morfologije (Slika 41a), dok su ostali uzorci pokazali promene od neznatnog povećanja prečnika pora (bubrenje, Slika 41b) do potpunog kolapsa porozne strukture (slepljivanje i topljenje, Slike 41c i 41d).

Ne postoji mnogo podataka u dostupnoj literaturi za proces NKI bilo sa timolom ili sa AC kao nosačem. Kada su Dias i saradnici (Dias i sar., 2011) impregnirali timol na *N*-karboksibutilhitozan i agarozu na 20 MPa, 40 °C tokom 3 h uz magnetno mešanje, dobili su prinos impregnacije 2,44% i 2,34%, redom. Takođe, Tores i saradnici (Tores i sar., 2014) su impregnirali polietilen male gustine timolom na 9 MPa i 40 °C tokom 4 h postigli su prinos 0,78%, na 12 MPa prinos 1,30%. Kada su Shen i saradnici (Shen i sar., 2008) impregnirali vlakna AC mentolom na 40 °C i 8,6 MPa tokom 30 min, postigli su prinos 3,85%. Ipak, u dostupnoj literaturi ne postoje podaci o kapacitetima i maksimalnim prinosima impregnacije na odabranim uslovima.

4.4.2. Kinetika otpuštanja timola *in vitro*

Prvo se pristupilo ispitivanju sorpcije vode netretiranog uzorka AC. Kao što je očekivano, velika poroznost AC je dovela do brze sorpcije vode i zbog toga je ravnoteža dostignuta nakon samo 1 h. Dostignuti sorpcioni odnos je iznosio 2,22%. Nakon 10 dana stajanja perlice AC u vodi, dodatna sorpcija vode nije uočena i AC perlica je ostala nepromenjena. Pilati i saradnici (Pilati i sar., 2013) su objavili da je antibakterijska plastika sa timolom (pripremljena fotopolimerizacijom rastvora timola u tripropilenglikoldiakrilik momomeru) imala veoma sporo otpuštanje timola u vodi usled sorpcionog kapaciteta vode tripropilenglikoldiakrilik polimera od 2,2%.

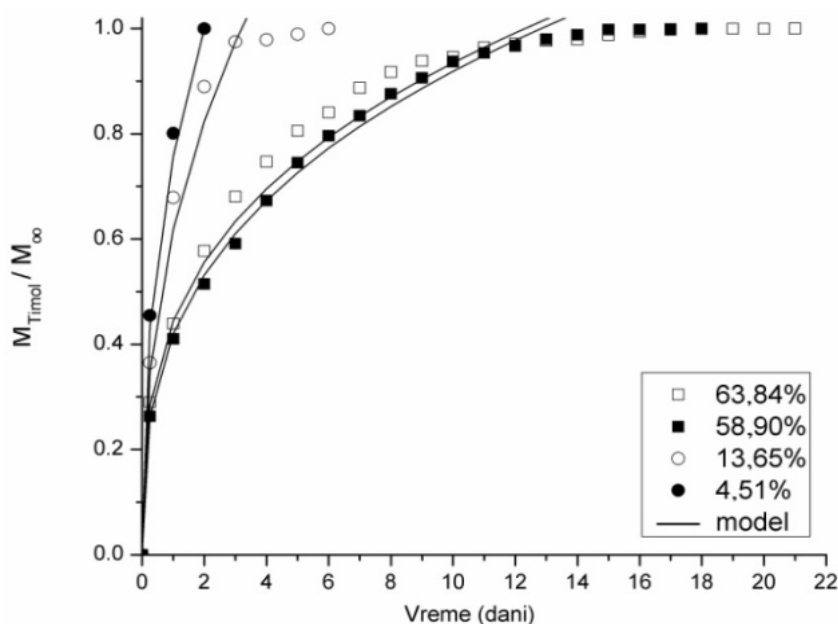
Kada se timol-polimer kompleks stavi u kontakt sa tečnošću, timol počinje da se rastvara i da difunduje iz polimera. Brzina difuzije timola u okolnu tečnost zavisi od hemijske prirode tečnosti, rastvorljivosti timola u tečnosti, koncentracije timola u polimeru i od temperature (Pilati i sar., 2013). Otpuštena masa timola po masi AC impregniranog na 35 °C i 10 MPa (prinosi impregnacije 4,51%, 13,65%, 58,90% i 63,84%) u funkciji vremena, za kratak period otpuštanja (6 h) i dug period otpuštanja (22 dana) predstavljena je na Slikama 42a i 42b. Uzorci su izabrani kao predstavnici svake morfološke promene koja se desila tokom NKI, od bubrenja do topljenja. Nakon završenog dugog perioda otpuštanja, nije uočena promena fizičkog izgleda ispitivanih uzoraka. Najveća količina otpuštenog timola je postignuta za uzorak sa prinosom impregnacije od 63,84%. Ovaj uzorak je dostigao najveću koncentraciju u sistemu za otpuštanje, sa vrednošću od 29,64 mg/L, što je značajno ispod literaturne vrednosti zasićenja rastvora timola u vodi (1000 mg/L) (Pilati i sar., 2013). Na osnovu navedenog može biti zaključeno da rastvorljivost timola u vodi u svim eksperimentima nije bio limitirajući faktor za otpuštanje timola. Na Slikama 41a i 41b se može videti da je svaki od uzoraka otpustio različitu količinu timola. Uzorak sa 4,51% impregniranog timola dostigao je maksimum nakon 2 dana, dok je uzorku sa prinosom impregnacije od 13,65% bilo potrebno 6 dana otpuštanja za dostizanje maksimuma. Uzorci sa velikom količinom impregniranog timola su dostigli ravnotežu za 16 i 18 dana (za prinose 58,90% i 63,84%).



Slika 42. Masa otpuštenog timola po masi AC impregnirane na 10 MPa i 35 °C za a) kratki period od 6 sati i b) za dugi period od 22 dana

Potrebno je napomenuti da kod uzoraka sa velikim prinosom impregnacije nije mogao biti otpušten sav impregniran timol. Uzorak sa prinosom od 58,90% otpustio je 89% impregniranog timola, dok je uzorak sa prinosom od 63,84% otpustio 93% impregniranog timola. Ovakav rezultat može značiti da je interakcija između timola i AC veoma jaka kroz celu zapreminu AC perlice u slučaju visokih impregnacionih prinosa. Takođe, može biti zaključeno da promene u morfologiji perlica utiču na otpuštanje timola. Sa Slike 41d je očigledno da je topljenje koje je uočeno za najveći procenat impregnacije (63,84%), a koje je praćeno dekompresijom otvorilo ili napravilo pore na površini perlice što je moglo uticati na lakše otpuštanje određene količine timola. Ovo može biti razlog veće količine timola koja je otpuštena iz ovog uzorka (93%) u poređenju sa uzorkom sa prinosom od 58,90% (89%).

Rezultati modelovanja kinetike otpuštanja su predstavljeni na Slici 43. Vrednosti parametara modela su prikazane u Tabeli 21.



Slika 43. Relativna masa otpuštenog timola iz AC impregnirana na 10 MPa i 35 °C za dug period otpuštanja od 22 dana

Kao što se može videti, za sve ispitivane uzorke, vrednost eksponenta otpuštanja (n) je manja od 0,43 što ukazuje da se otpuštanje timola iz AC odvija Fikovom difuzijom (Garcia-Gonzalez i sar. 2015). U svakom slučaju, faktori koji utiču na difuziju rastvora u polimeru su brojni:

poroznost, pokretljivost lanca, prepletenost lanaca, gustina umrežavanja, stepen bubrenja, kristalnost, prisustvo filera ili plastifikatora i rastvorljivost rastvora u polimeru (Korsmeyer i Peppas, 1981).

Tabela 21. Korelisani parametri kinetike otpuštanja timola

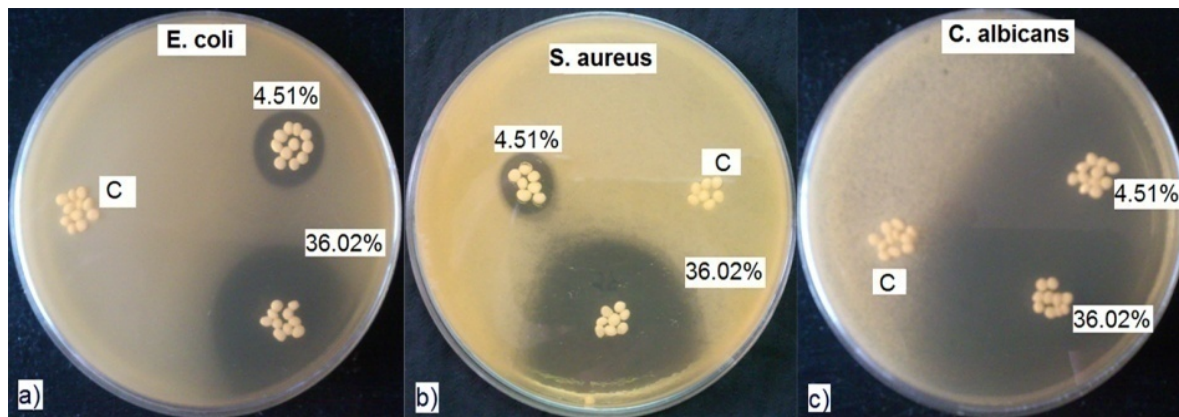
I (%)	<i>n</i>	<i>k</i> (min ⁻ⁿ)	AARD (%)
4,51	0,40	0,0410	4,00
13,65	0,42	0,0303	6,24
58,90	0,34	0,0356	3,40
63,84	0,32	0,0426	6,74

Različite primene polimera sa antimikrobnom aktivnošću mogu zahtevati različite brzine otpuštanja antimikrobnog agensa u okolni medijum. Ponekad je poželjno da otpuštanje bude brzo tokom kratkog vremenskog perioda, npr. za medicinska sredstva za sprečavanje infekcije, dok je u drugim slučajevima poželjno sporo otpuštanje tokom dužeg vremenskog perioda, npr. za materijale za pakovanje (Pilati i sar., 2013). Sveobuhvatni rezultati ispitivanja kinetike otpuštanja sugerišu da AC impregniran timolom može biti vrlo pogodan antimikrobni polimer za primenu u oba pomenuta granična slučaja.

4.4.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti acetata celuloze impregniranog timolom

Kvalitativni test antimikrobne aktivnosti je urađen korišćenjem Gram-negativne bakterije *E. coli*, Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* i gljivice *C. albicans*. Slika 44 pokazuje uticaj količine impregniranog timola na antimikrobnost impregniranih AC uzoraka. Evidentno je da AC impregniran većom količinom timola ima jače antimikrobno dejstvo koje je izraženo preko zone inhibicije. Prečnik zone inhibicije AC sa 4,51% prinosom je 17 mm za *E. coli* i 18 mm za *S. aureus*. Očigledno, povećanje količine timola u AC je povećalo zonu inhibicije pa tako uzorak AC sa prinosom 36,02% ima zonu inhibicije 33 mm i 45 mm za *E. coli* i *S. aureus*. Slika 44, takođe, pokazuje da oba uzorka impregniranog AC imaju veoma jako antifungalno dejstvo. Prečnik zone inhibicije za *C. albicans* je oko 47 mm i 64 mm za uzorke sa prinosima 4,51% i

36,02%. Očigledno, za kontrolni uzorak AC (C) nije postojala inhibiciona zona što ukazuje da sam AC ne pokazuje nikakvu antimikrobnu aktivnost.



Slika 44. Inhibicione zone kontrolnog uzorka (C) i impregniranog AC (prinos 4,51% i 36,02%)

Kvantitativni test antibakterijske i antifungalne aktivnosti AC sa prinosom od 4,51% je izveden za mikrobe *E. coli*, *S. aureus* i *C. albicans*. Rezultati mikrobne redukcije su prikazani u Tabeli 22. Rezultati ukazuju da AC sa prinosom 4,51% obezbeđuje maksimalnu mikrobnu redukciju (99,9%). Prezentovani rezultati ističu da čak i relativno mali procenat timola koji je impregniran u AC može imati odličnu antimikrobnu aktivnost.

Tabela 22. Antimikrobna aktivnost AC sa prinosom impregnacije timola 4,51%

Mikroorganizam	Uzorak	Broj kolonija mikroorganizama CFU)	R, %
<i>E. coli</i>	inokulum	$2,2 \times 10^5$	
	kontrolni uzorak	$2,0 \times 10^5$	
	impregniran AC	<10	99,9
<i>S. aureus</i>	inokulum	$2,7 \times 10^5$	
	kontrolni uzorak	$2,7 \times 10^5$	
	impregniran AC	<10	99,9
<i>C. albicans</i>	inokulum	$3,5 \times 10^3$	
	kontrolni uzorak	$5,6 \times 10^2$	
	impregniran AC	<10	99,9

4.4.4. Zaključci

- Acetat celuloze (AC) se može uspešno impregnirati timolom. Na prinos impregnacije AC utiču pritisak, temperatura, vreme i početni odnos AC:timol. Kada je timol u višku, pri pritiscima 10 MPa, 15 MPa i 20 MPa i temperaturama 35 °C i 50 °C za 24 h, moguće je dobiti veoma visoke prinose impregnacije (52,40%-72,26%).
- Brzina impregnacije je funkcija operativnih uslova (pritiska i temperature).
- Kapacitet ispitivanog AC za impregnaciju timolom iznosi 72,26% i nije funkcija operativnih uslova u ispitanom opsegu.
- Morfologija AC se značajno menja u funkciji količine impregniranog timola. Kada je prinos impregnacije timola niži od 9% ne dolazi do promene u strukturi polimera. Pri prinosu od 9% i 13%, AC počinje da bubri, dok slepljivanje perlica počinje u opsegu prinosa od 55% do 57%. Pri prinosima većim od 60%, AC počinje da se topi.
- U zavisnosti od prinosa impregnacije, dobijeno je vreme otpuštanja timola od 2 dana (uzorak sa 4,51% impregniranog timola) do 18 dana (uzorak sa 63,84% impregniranog timola).
- AC impregniran timolom sa prinosom od 4,51% ima jaku antimikrobnu aktivnost protiv *E. coli*, *S. aureus* i *C. albicans*.

4.5. INTEGRISANI PROCES ZA IMPREGNACIJU EKSTRAKTA TIMIJANA NA ČVRSTE NOSAČE NATKRITIČNIM UGLJENIK(IV)-OKSIDOM

Integrirani proces NKE-NKI podrazumeva ekstrakciju iz biljnog materijala i impregnaciju dobijenog ekstrakta na odabrani nosač u istom postrojenju i bez dekompresije do atmosferskih uslova nakon procesa ekstrakcije. Izbegavanjem dekompresije kao međukoraka, štedi se energija i izbegava neminovni gubitak ekstrakta u zasebnom ekstrakcionom procesu (masa ekstrakta zaostala u cevima, ventilima i sl.). Pri dizajnu integrisanog procesa neophodno je prvo definisati uslove svakog procesa ponaosob (pritisk, temperatura), a zatim optimizovati

parametre integrisanog procesa (način izvođenja procesa, odnos masa biljnog materijala i nosača u datom postrojenju).

U ovom istraživanju, pritisak od 15 MPa i temperatura od 35 °C su odabrani kao operativni uslovi za oba procesa (NKE i NKI), a na osnovu prethodno utvrđene rastvorljivosti timola u nkCO₂. Zapravo, uslovi visoke rastvorljivosti timola u nkCO₂ (15 MPa i 35 °C) su od interesa i za ekstrakciju i za impregnaciju. U literaturi se mogu pronaći podaci koji pokazuju da je, kod procesa NKE iz španskog timijana, uticaj temperature značajno veći od uticaja promene pritiska (Grosso i sar., 2010). Povećanjem pritiska sa 9 MPa na 10 MPa (na 40 °C), prinos ekstrakcije se povećao sa 0,8% na 1,1% dok je povećanje temperature sa 40 °C na 50 °C (na 9 MPa) dovelo do smanjenja prinosa sa 0,8% na 0,4% što je dovelo i do smanjenja količine timola u ekstraktu. Na osnovu navedenih literaturnih podataka se može zaključiti da procesna temperatura od 35 °C pogoduje dobijanju ekstrakta timijana bogatog timolom.

U cilju ispitivanja prinosa i sastava natkritičnog ekstrakta timijana na uslovima pritiska od 15 MPa i temperature 35 °C, izvedena je NKE u postrojenju HPEA na način opisan u poglavlju 3.2.3. Ekstrakcija je trajala do iscrpljena biljnog materijala (2,75 h). Odnos mase upotrebljenog CO₂ i početne mase timijana je bio $m_{\text{CO}_2}/m_{\text{TIMIJAN}}=38,2$, dok je protok nkCO₂ iznosio 0,53 kg/h. Dobijen je tečan ekstrakt narandžaste boje sa jakim karakterističnim mirisom timijana. Prinos ekstrakta je iznosio 3,6%. Rezultati hemijske analize isparljive frakcije ekstrakta prikazani su u Tabeli 23. Kako se iz Tabele 23 može videti, glavna komponenta etarskog ulja timijana dobijenog postupkom NKE je timol i njegov udeo iznosi 80,30%. Značajan je i udeo karvakrola (5,96%) koji takođe ima izraženo biološko dejstvo. Udeo timola i karvakrola u isparljivoj frakciji natkritičnog ekstrakta španskog timijana koji su dobili Grosso i saradnici na 10 MPa i 40 °C je bio 40,8% i 3,1 % (Grosso i sar., 2010).

Nakon što su definisani uslovi za pojedinačne procese NKE i NKI, potrebno je uskladiti parametre integrisanog procesa. Prvo je potrebno izabrati i testirati nekoliko načina izvođenja procesa (režim rada u odnosu na proticanje natkritičnog fluida kroz sistem), kao i procesno vreme. Veliki izazov je i sinhronizacija odnosa mase upotrebljenog natkritičnog fluida i mase biljnog materijala sa odnosom mase biljnog materijala i mase nosača. Izbor pomenutih parametara u ovom istraživanju je izvršen na osnovu preliminarnih eksperimenata, iskustva i

podataka o procesu NKE, a sa fokusom na sledeće ciljeve: a) ostvarivanje maksimalnih prinosa ekstrakcije i impregnacije u sistemu, b) postizanje ravnomerne raspodele ekstrakta na nosaču i c) sprečavanje desorpcije već impregniranog ekstrakta sa nosača.

Tabela 23. Najzastupljenije isparljive komponente ekstrakta zimskog timijana

Komponenta	Dobijeni KI	KI literaturni podatak	%	Komponenta	Dobijeni KI	KI literaturni podatak	%
<i>p</i> -cimen	1017,9	1020	0,48	Karvakrol	1036,5	1298	5,96
<i>trans</i> -pinokamfon	1052,5	1158	0,44	kariofilen oksid	1574,0	1582	0,95
borneol	1060,4	1065	0,70	geranil acetat	1450,8	1453	0,13
timol-metil etar	1229,8	1232	0,11	γ -kadinen	1504,7	1513	0,64
timokvinon	1237,5	1248	0,55	δ -kadinen	1517,7	1522	0,65
<i>p</i> -cimen-7-ol	1290,8	1289	0,16	τ -kadinol	1633,8	1638	1,06
timol	1298,5	1289	80,30	(<i>E</i>)-kariofilen	1409,0	1417	6,06
ID					98,19%		
Broj komponenti					14		

KI - Kovačevi indeksi; ID - Ukupni procenat identifikovanih jedinjenja

4.5.1. Optimizacija integrisanog procesa za impregnaciju pamučne gaze ekstraktom timijana

Na osnovu preliminarnih eksperimenata, za impregnaciju pamučne gaze ekstraktom timijana, izabrana su dva režima rada postrojenja (metoda 1 i metoda 2). Metoda 1 (Tabela 24, eksperimenti 1-3) podrazumeva jednokratno punjenje sistema sa CO₂ i njegovu cirkulaciju kroz ekstraktor i adsorber tokom izabranog vremena. Metoda 2 (Tabela 24, eksperimenti 4 i 5) podrazumeva rad u ciklusima između kojih se vrši zamena dela natkritičnog fluida svežim CO₂. Eksperiment 4 (Tabela 24) je dizajniran tako da se izvede u dva ciklusa koji traju po 5 h, pri čemu fluid cirkuliše kroz oba suda (ekstraktor i adsorber) tokom celog ciklusa. Eksperiment 5 (Tabela 24) je osmišljen tako da obuhvata 6 ciklusa. Svaki ciklus uključuje jedan sat cirkulacije fluida kroz oba suda i jedan sat cirkulacije samo kroz adsorber. Nakon svakog ciklusa, vrši se

dekompresija adsorbera i merenje impregniranog materijala. Tokom dekompresije adsorbera, ekstraktor se održava na radnim uslovima zatvaranjem ventila koji regulišu dovod fluida u ekstraktor i odvođenje iz njega. Nakon merenja mase, impregnirani nosač se vraća u adsorber, koji se zatvara i vraća na radni pritisak uvođenjem nove količine CO₂. Prinosi i efikasnosti ekstrakcije i impregnacije (definisani jednačinama 4 i 5) pri različitim procesnim parametrima prikazani su u Tabeli 24. Brzina dekompresije u svim eksperimentima je bila 0,65±0,10 MPa/min. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 24 se može zaključiti da povećanje odnosa mase utrošenog CO₂ i mase timijana ($m_{CO_2}:m_T$) pozitivno utiče na prinos ekstrakcije i impregnacije u prethodno opisanim eksperimentima. Kod metode 1 se uočava da produženje vremena trajanja procesa sa 5 h na 10 h ima negativan uticaj na prinos impregnacije. Na osnovu ovog rezultata se može zaključiti da je tokom 10 h impregnacije, u posmatranom sistemu, došlo do reverzibilnog procesa tj. desorpcije impregniranog ekstrakta sa gaze u natkritični fluid.

Tabela 24. Uticaj parametara na integrisani proces NKE-NKI

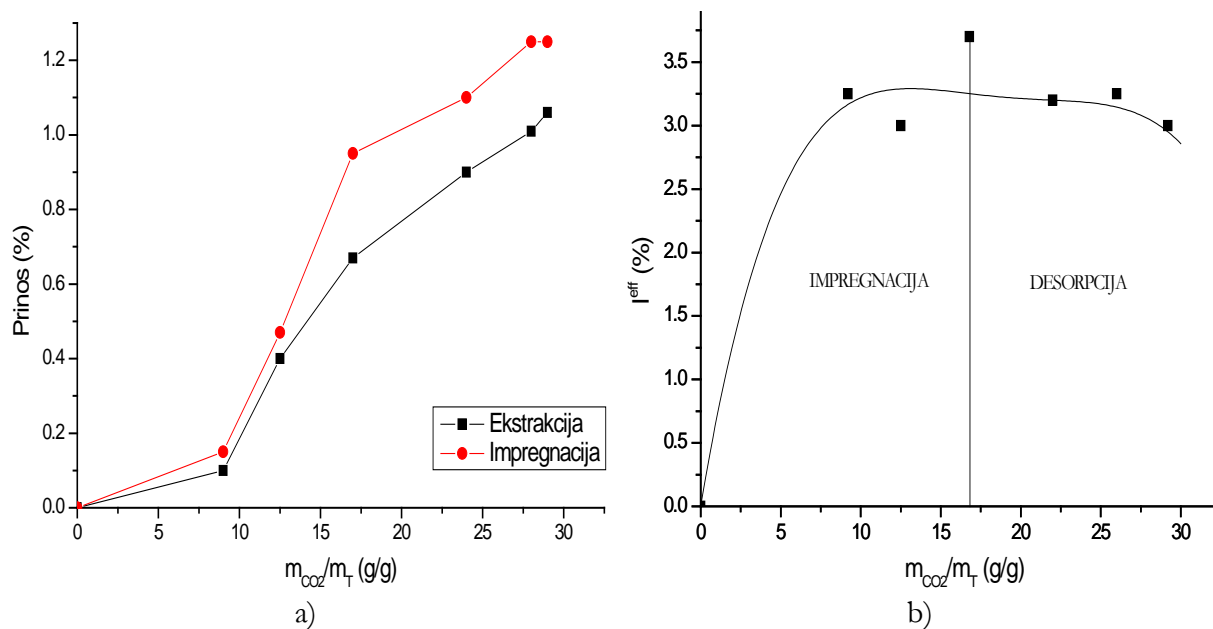
Metoda	Eks.	Br. ciklusa	m_{CO_2}/m_T (g/g)	m_T/m_G (g/g)	τ (h)	m_{TE}	m_{TE}^{IMP}	Y (%)	I (%)	E^{eff} (%)	I^{eff} (%)
1	1	1	7,1	20,9	5	0,295	0,138	0,60	5,58	16,7	46,8
	2		9,3	19,6	10	0,400	0,123	0,84	4,76	23,2	30,8
	3		17,6	26,8	5	0,454	0,074	1,77	7,18	49,3	16,3
2	4	2	20,1	20,6	10	0,809	0,227	1,44	8,99	40,0	33,4
	5	6	29,3	19,0	12	0,515	0,032	1,99	1,08	55,2	6,21

Eksperiment 4 je dizajniran kao nastavak eksperimenta 1, sa uvođenjem nove količine CO₂ nakon 5 h i još jednim ciklusom u trajanju od 5 h, kako bi se proverilo da li će usled uvođenja nove količine natkritičnog fluida doći do povećanja prinosa impregnacije ili do ispiranja impregniranog ekstrakta sa gaze. U skladu sa navedenim, za eksperimente 1 i 5 je uzet približan odnos mase timijana i gaze (m_T/m_G). Dobijeni rezultati su pokazali da je uvođenje nove količine CO₂ sa dva ciklusa, dalo bolje rezultate. U poređenju sa eksperimentom 1, došlo je do povećanja efikasnosti ekstrakcije sa 16,7% na 40,0%. Takođe, povećao se i prinos impregnacije (sa 5,98% na 8,99%). U eksperimentu 5 je zbog povećanja broja ciklusa i mase svežeg rastvarača ostvarena veća efikasnost ekstrakcije u odnosu na eksperiment 4. Međutim,

istovremeno je došlo do smanjenja efikasnosti impregnacije usled većeg broja dekompresija i uklanjanja ekstrakta iz sistema.

Kinetika procesa impregnacije izvedenog u eksperimentu 5, predstavljena kao kumulativni prinos impregnacije u funkciji utrošene količine natkritičnog fluida, prikazana je na Slici 44a. Kao što se može videti, nakon potrošenih 26,2 g CO₂ po g timijana (što odgovara procesu sa 5 ciklusa) prinos ekstrakcije raste, ali i dalje ostaje ispod prinosa za date uslove ostvarenog u zasebnom procesu NKE (3,6%). Bez obzira što sirovina nije u potpunosti iscrpljena, nije došlo do daljeg povećanja prinosa impregnacije kroz šesti ciklus. Efikasnost impregnacije (Slika 44b) je dostigla svoju najveću vrednost nakon što je potrošeno 17 g CO₂ po g timijana (nakon 3 ciklusa).

Niži prinos impregnacije ostvaren metodom 2 u eksperimentu 5 se može objasniti značajnim gubitkom ekstrakta koji je napustio sistem sa CO₂ tokom dekompresije na kraju svakog ciklusa. Nakon šest ciklusa, u separatoru nakon dekompresije je sakupljeno 93,79% od ukupnog ekstrakta.



Slika 45. a) Kinetika procesa NKE-NKI: Prinosi ekstrakcije i impregnacije i b) Efikasnost impregnacije u zavisnosti od specifične potrošnje CO₂

Izvođenje procesa NKE-NKI metodom 1, bez uvođenja nove količine nkCO_2 , ograničeno je ukupnom zapreminom sistema (ekstrakcionog i adsorpcionog suda, cevi). U ovakvim uslovima, promena odnosa $m_{\text{CO}_2}/m_{\text{T}}$ je moguća variranjem mase biljnog materijala. U cilju ostvarivanja većeg prinosa ekstrakcije, povećanje odnosa $m_{\text{CO}_2}/m_{\text{T}}$ se može postići smanjenjem mase timijana u ekstrakcionom sudu. Ukoliko se želi očuvati odabran odnos mase biljne sirovine i nosača, ovakvo smanjenje za posledicu ima proporcionalno smanjenje mase nosača, što rezultuje manjom količinom finalnog proizvoda.

4.5.2. Integrisani proces za impregnaciju polisaharidnih gelova i acetata celuloze ekstraktom timijana

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 24 vidi se da su uslovi eksperimenta 3 ($m_{\text{CO}_2}/m_{\text{T}} \sim 17$, $m_{\text{T}}/m_{\text{NOSAC}} \sim 25$) pogodovali dobijanju visokog prinosa impregnacije. Iz tog razloga, uslovi eksperimenta 3 su usvojeni za demonstraciju integrisanog procesa NKE-NKI za impregnaciju ekstrakta timijana na reprezentativne polisaharidne gelove i AC. Kao nosači u ovom procesu su, pored AC, izabrani kserogel kukuruznog skroba pripremljen geliranjem vodene suspenzije na 100 °C i aerogel hitozana dobijen umrežavanjem formaldehidom i tretiran sa nkCO_2 na 15 MPa i 50 °C. Rezultati integrisanog procesa su prikazani u Tabeli 25. U istoj tabeli su, radi poređenja, prikazani i rezultati eksperimenta 3 za pamučnu gazu.

Tabela 25. Rezultati integrisanog procesa NKE-NKI ekstrakta timijana

	I (%)	E^{eff} (%)	I^{eff} (%)
Pamučna gaza	7,18	49,30	16,30
Kserogel kukuruznog skroba	0,65	38,6	1,95
Aerogel hitozana	0,52	39,2	2,71
Acetat celuloze	1,44	39,2	4,17

Poređenjem rezultata koji su prikazani u Tabeli 25 uočava se da je najveći prinos impregnacije ekstrakta timijana dobijen korišćenjem gaze kao polimernog nosača (7,18%).

Na Slici 45 su prikazani odabrani nosači pre i posle integrisanog procesa NKE-NKI. Evidentno je da je došlo do promene boje polimera usled impregnacije ekstrakta timijana.



Slika 46. a) Polimer pre i b) polimer posle integrisanog procesa NKE-NKI ekstrakta timijana

4.5.3. Zaključci

- Procesom natkritične ekstrakcije iz timijana na 15 MPa i 35 °C dobijen je ekstrakt prinosa 3,6% i sa udelom timola u isparljivoj frakciji ekstrakta od 80,30%.
- Ekstrakcija timijana i impregnacija dobijenog ekstrakta na pamučnu gazu, integrisanim procesom natkritične ekstrakcije i impregnacije, data je kao primer koraka koje je potrebno preduzeti u cilju optimizacije integrisanog procesa.
- Integrisan proces impregnacije ekstrakta timijana na pamučnu gazu je optimizovan menjanjem masenog odnosa CO₂/biljni materijal i biljni materijal/nosač, kao i variranjem metode dinamičkog procesa, dok su uslovi pritiska i temperature bili konstantni i iznosili 15 MPa i 35 °C.
- Najveći prinos impregnacije pamučne gaze od 8,99% postignut je u eksperimentu 4 sa dva ciklusa, cirkulacijom nkCO₂ kroz ekstraktor i adsorber tokom 10 h pri odnosima CO₂/biljni materijal ~20,1 i biljni materijal/nosač ~20,6.

- Zadovoljavajući prinos impregnacije pamučne gaze od 7,18%, na odabranim operativnim uslovima, postignut je u eksperimentu 3 cirkulacijom nkCO_2 kroz ekstraktor i adsorber tokom 5 h pri odnosima CO_2 /biljni materijal ~ 17 i biljni materijal/nosač ~ 25 .
- U integrisanom procesu impregnacije ekstrakta timijana na odabrane polisaharidne gelove (skrob i hitozan) i acetat celuloze, na uslovima eksperimenta 3, postignuti su sledeći prinosi impregnacije: 0,65%, 0,52% i 1,44%, redom.

5. ZAKLJUČAK

- ❖ Istraživanje mogućnosti koje pruža impregnacija čvrstih nosača timolom, pomoću natkritičnog ugljenik(IV)-oksida (nkCO_2), započeto je ispitivanjem rastvorljivosti timola u nkCO_2 . Rastvorljivost timola u nkCO_2 određena je statičkom metodom na pritiscima 7,8-25 MPa i temperaturama 35 °C, 40 °C, 50 °C (za opseg gustina nkCO_2 335,89-849,60 kg/m^3) i kreće se u opsegu 1,020-42,580 kg/m^3 .
- ❖ Rastvorljivost timola u nkCO_2 na pritisku 15 MPa i temperaturi 35 °C (31,3 kg/m^3) je uporediva sa vrednostima rastvorljivosti na višim pritiscima. Zbog toga su navedeni uslovi odabrani za operativne uslove u procesima natkritične impregnacije čvrstih nosača timolom ili ekstraktom timijana.
- ❖ Pokazano je da je postupkom natkritične impregnacije timola na pamučnu gazu moguće dobiti modifikovanu gazu sa snažnim antimikrobnim dejstvom.
- ❖ Prinos natkritične impregnacije pamučne gaze timolom, izveden statičkom metodom, je funkcija vremena. Nakon 2 h impregnacije, na 15 MPa i 35 °C, prinos impregnacije je iznosio 11,0% dok je nakon 24 h ta vrednost bila 19,6%. Oba uzorka gaze su imala izraženo antimikrobno dejstvo na *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* i *C. albicans*.
- ❖ Pokazano je da je postupkom natkritične impregnacije timola na polisaharidne gelove skroba i hitozana moguće dobiti modifikovane gelove sa potencijalnom primenom u prehrambenoj, kozmetičkoj ili farmaceutskoj industriji.
- ❖ Da bi se skrob i hitozan impregnirali timolom pomoću nkCO_2 , bilo je potrebno prevesti ih u odgovarajuću formulaciju (suvi gel). Metoda pripreme ovih polisaharidnih gelova je odredila morfološke karakteristike gelova, pa samim tim i prinos impregnacije.

- ❖ Ksero- i aerogelovi kukuruznog i tapioka skroba su impregnirani timolom sa prinosom 0,58-4,01% koji je zavisio od temperature pripreme hidrogelova (70 °C, 80 °C, 90 °C ili 100 °C) i metode sušenja (vazduh ili nkCO_2). Najveći prinos impregnacije je imao kserogel kukuruznog skroba dobijen na 100 °C (4,01%). Prinos impregnacije skrobnih gelova je bio veći za gelove koji su dobijeni na višim temperaturama kao i za gelove koji su bili osušeni na vazduhu. Izuzetak su tapioka gelovi dobijeni na 100 °C koji su imali manji prinos impregnacije u odnosu na gelove dobijene na 90 °C.
- ❖ Rezultati su ukazali na veliki potencijal kukuruznog kserogela koji je dobijen od hidrogela geliranog na 100 °C za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji uzimajući u obzir jednostavnost pripreme gela, njegovu morfologiju i visok prinos impregnacije timolom (4,01%).
- ❖ Ksero- i aerogelovi hitozana su impregnirani timolom sa prinosom 3,76-11,30% koji je zavisio od izbora umreživača vodenog rastvora hitozana (formaldehid ili glutardialdehid) i metode sušenja gelova (vazduh ili nkCO_2). Aerogelovi hitozana su imali veći prinos impregnacije od kserogelova. Najveći prinos impregnacije timola (11,30%) je imao aerogel dobijen pomoću formaldehida koji je bio osušen na 15 MPa i 50 °C.
- ❖ Pokazano je da je postupkom natkritične impregnacije timola na acetat celuloze moguće dobiti modifikovane materijale sa širokim opsegom procenta impregniranog timola i za različite namene u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji.
- ❖ Na prinos impregnacije acetata celuloze timolom, statičkom metodom, utiču pritisak, temperatura i vreme impregnacije. Pri tome se mogu dobiti prinosi impregnacije od nekoliko procenata, pa do preko 70%. Kapacitet ispitivanog acetata celuloze za impregnaciju timolom iznosio je 72,26% i nije bio funkcija operativnih uslova u ispitanom opsegu. Operativni uslovi su odredili brzinu impregnacije.

- ❖ Morfologija acetata celuloze zavisi od količine impregniranog timola. Kada je prinos impregnacije timola niži od 9% ne dolazi do promene u strukturi polimera. Između prinosa od 9% i 13%, acetat celuloze počinje da bubri, dok slepljivanje perlica počinje u opsegu prinosa od 55% do 57%. Pri prinosima većim od 60%, acetat celuloze počinje da se topi.
- ❖ U zavisnosti od prinosa impregnacije, moguće je proizvesti materijal sa kontrolisanim otpuštanjem timola od par sati do preko 10 dana.
- ❖ Pokazano je da acetat celuloze impregniran timolom u malom procentu (4,51%) ima jaku antimikrobnu aktivnost protiv *E. coli*, *S. aureus* i *C. albicans*.
- ❖ Osnovna strategija integrisanog procesa natkritične ekstrakcije i natkritične impregnacije je zasnovana na direktnoj upotrebi rastvora nkCO_2 i ekstrakta za impregnaciju i minimizovanje vremena, potrošnje energije i gubitaka ekstrakata. Integrisan proces impregnacije ekstrakta timijana na gazu je optimizovan menjanjem masenog odnosa CO_2 : biljni materijal (7,1-29,3) i biljni materijal:nosač (19,0-26,8), kao i variranjem metode odvijanja dinamičkog procesa (sa ili bez dekompresija kao međukoraka) sa promenom operativnog vremena (5-12 h) dok su pritisak i temperatura bili konstantni (15 MPa i 35 °C).
- ❖ Prinos impregnacije gaze od 7,18% je postignut cirkulacijom nkCO_2 kroz ekstraktor i adsorber tokom 5 h pri odnosima CO_2 /biljni materijal ~17 i biljni materijal/nosač ~25. U integrisanom procesu impregnacije ekstrakta timijana na odabrane polisaharidne gelove (skrob i hitozan) i acetat celuloze, na istim uslovima, postignuti su sledeći prinosi impregnacije: 0,65%, 0,52% i 1,44%, redom.

Ovaj rad je prvi izveštaj o velikom potencijalu gaze, gelova hitozana i skroba, i acetata celuloze za impregnaciju timola i ekstrakta timijana korišćenjem tehnike natkritične impregnacije. Rezultatima koji su dobijeni u ovom radu, pokazana je izvodljivost procesa natkritične impregnacije timola i integrisanog procesa natkritične ekstrakcije i natkritične impregnacije ekstrakta timijana pomoću nkCO_2 , u cilju dobijanja efikasnog sredstva sa antimikrobnim svojstvima za primenu u farmaciji, medicini i industriji hrane.

Literatura

- Adachi, Y., Lu, B.C.Y., Supercritical fluid extraction with carbon dioxide and ethylene, *Fluid Phase Equilibria* 14 (1983) 147-156.
- Adejumo, A.L., Aderibigbe, A.F., Layokun, S.K., Cassava starch: Production, Physicochemical Properties and Hydrolysis - A Review, *Advances in Food and Energy Security* 2 (2011) 8-17.
- Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B.C. et al., Antioxidant Actions Of Thymol, Carvacrol, 6-Gingerol, Zingerone and Hydroxytyrosol, *Food and Chemical Toxicology* 32 (1994) 31-36.
- Archana, P.R., Rao, N.B., Rao, S.B.S., *In vivo* radioprotective potential of thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene, *Mutation Research* 726 (2011) 136-145.
- Arques, J.L., Rodriguez, E., Nunez, M., Medina, M., Inactivation of gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system, *European Food Research and Technology* 227 (2010) 77-82.
- Asiabi, H., Yamini, Y., Tayyebi, M. et al., Measurement and correlation of the solubility of two steroid drugs in supercritical carbon dioxide using semi empirical models, *The Journal of Supercritical Fluids* 78 (2013) 28-33.
- AST, ASTM Designation: E 2149-01 Method- Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions, 2001.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M. et al., Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 19-34.
- Braga, M.E.M., Costa, V.P., Pereira, M.J.T. et al., Effects of operational conditions on the supercritical solvent impregnation of acetazolamide in Balafilcon A commercial contact lenses, *International Journal of Pharmaceutics* 420 (2011) 231-243.
- Braga, P.C., Culici, M., Alfieri, M., Sasso, M.D., Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm, *International Journal of Antimicrobial Agents* 31 (2008) 472-477.

- Brunner, G., Stofftrennung mit überkritischen Gasen (Gasextraktion), *Chemie-Ingenieur-Technik* 59 (1987) 12–22.
- Brunner, G., Supercritical fluids: technology and application to food processing, *Journal of Food Engineering* 67 (2005) 21–33.
- Burt, S.A., Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food, Ph.D. Thesis, Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Veterinary Public Health, Utrecht University (2007)
- Cabezas, L.I., Fernandez, V., Mazarro, R. et al., Production of biodegradable porous scaffolds impregnated with indomethacin in supercritical CO₂, *Journal of Supercritical Fluids* 63 (2012) 155-160.
- Cabezas, L.I., Gracia, I., Garcia, M.T. et al., Production of biodegradable porous scaffolds impregnated with 5-fluorouracil in supercritical CO₂, *Journal of Supercritical Fluids* 80 (2013) 1-8.
- Cavero, S., García-Risco, M.R., Marín, F.R. et al., Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano, chemical and functional characterization via LC-MS and *in vitro* assays, *Journal of Supercritical Fluids* 38 (2006) 62-69.
- Cetin-Karaca, H., Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens, University of Kentucky, Masters Theses (2011) Paper 652.
- Chairat, M., Rattanaphani, S., Bremner, J.B., Rattanaphani, V., Adsorption kinetic study of lac dyeing on cotton, *Dyes and Pigments* 76 (2008) 435-439.
- Chang, X., Chen, D., Jiao, X., Chitosan-based aerogels with high adsorption performance, *Journal of Physical Chemistry B* 112 (2008) 7721-7725.
- Chrastil, J., Solubility of solids and liquids in supercritical gases, *Journal of Physical Chemistry* 86 (1982) 3016-3021.
- Chung, C., Lee, M., Choe, E.K., Characterization of cotton fabric scouring by FT-IR ATR spectroscopy, *Carbohydrate Polymers* 58 (2004) 417-420.
- Ciolacu, D., Ciolacu, F., Popa, V.I., Amorphous cellulose-structure and characterization, *Cellulose Chemistry and Technology* 45 (2011) 13-21.
- Comin, L.M., Temelli, F., Saldana, M.D.A., Impregnation of flax oil in pregelatinized corn starch using supercritical CO₂, *Journal of Supercritical Fluids* 61 (2012) 221-228.

- Cortesi, A., Alessi, P., Kikic, I. et al., Supercritical fluids chromatography for impregnation optimization, *Journal of Supercritical Fluids* 19 (2000) 61-68.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B. et al., *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of sardinian *thymus* essential oils, *Letters in Applied Microbiology* 29 (1999) 130-135.
- Costa, V.P., Braga, M.E.M., Guerraa, J.P. et al., Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method, *The Journal of Supercritical Fluids* 52 (2010) 306-316.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., Chiellini, E., Chitosan- A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 981-1014.
- Davies, O.R., Lewis, A.L., Whitaker, M.J. et al., Applications of supercritical CO₂ in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 373-387.
- Delgado, B., Fernandez, P.S., Palop, A., Periago, P.M., Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions, *Food Microbiology* 21 (2004) 327-334.
- De Melo, S.A.B.V., Costa, G.M.N., Garau. et al., B., Supercritical CO₂ extraction of essential oils from *Thymus vulgaris*, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 17 (2000)
- De Souza, A.C., Dias, A.M.A., Sousa, H.C., Tadini, C.C., Impregnation of cinnamaldehyde into cassava starch biocomposite films using supercritical fluid technology for the development of food active packaging, *Carbohydrate Polymers* 102 (2014) 830-837.
- Del Nobile, M.A., Conte, A., Incoronato, A.L., Panza, O., Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films, *Journal of Food Engineering* 89 (2008) 57-63.
- Del Valle, J.M., Aguilera, J.M., An improved equation for predicting the solubility of vegetable oils in supercritical CO₂, *Industrial and Engineering Chemistry Research* 27 (1988) 1551-1553.
- Dias, A.M.A., Braga, M.E.M., Seabra, I.J. et al., Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide, *International Journal of Pharmaceutics* 408 (2011) 9-19.

- Dias, A.M.A., Rey-Rico, A., Oliveira, R.A. et al., Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology, *Journal of Supercritical Fluids* 74 (2013) 34-45.
- Dias, A.M.A., Seabra, I.J., Braga, M.M.E. et al., Supercritical solvent impregnation of natural bioactive compounds in *N*-carboxybutyl chitosan membranes for the development of topical wound healing applications, *Journal of Controlled Release* 148 (2010) 33-35.
- Diaz-Maroto, M.C., Hidalgo, I.J.D-M., Sanches-Palomo, E., Perez-Coello, M.S., Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 5385-5389.
- Diez-Municio, M., Montilla, A., Herrero, M. et al., Supercritical CO₂ impregnation of lactulose on chitosan: A comparison between scaffolds and microspheres form, *Journal of Supercritical Fluids* 57 (2011) 73-79.
- Duarte, A.R.C, Casimiro, T., Aguiar-Ricardo, A. et al., Supercritical fluid polymerisation and impregnation of molecularly imprinted polymers for drug delivery, *Journal of Supercritical Fluids* 39 (2006) 102-106.
- Duarte, A.R.C., Simplicio, A.L., Vega-Gonzalez, A. et al., Supercritical fluid impregnation of a biocompatible polymer for ophtalmic drug delivery, *Journal of Supercritical Fluids* 42 (2007) 373-377.
- Edwards, J.V., Yager, D.R., Cohen, I.K., et al., Modified cotton gauze dressings that selectively absorb neutrophil elastase activity in solution, *Wound Repair and Regeneration* 9 (2001) 50-58.
- Evans, E.F., McBurney, L.F., Heat stability of cellulose acetate, *Industrial and Engineering chemistry* 41 (1949) 1260-1264.
- Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M.A. et al., A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative, *Journal of Food Protection* 68 (2005) 1664-1670.
- Fanovich, M.A., Ivanovic, J., Misic, D. et al., Development of polycaprolactone scaffold with antibacterial activity by an integrated supercritical extraction and impregnation process, *Journal of Supercritical Fluids* 78 (2013) 42-53.

- Fanovich, M.A., Jaeger, P., Sorption and diffusion of compressed carbon dioxide in polycaprolactone for the development of porous scaffolds, *Materials Science and Engineering C* 32 (2012) 961-968.
- Fischer, S., Thummler, K., Volkert, B. et al., Properties and applications of cellulose acetate, *Macromolecular Symposia* 262 (2008) 89-96.
- Forte, D., The role of ingredients in extrusion processing, *Process plant network* (2011) <http://processplant.info>. 20.09.2014.
- Garcia-Gonzalez, C.A., Alnaief, M., Smirnova, I., Polysaccharide-based aerogels- Promising biodegradable carriers for drug delivery systems, *Carbohydrate polymers* 86 (2011) 1425-1438.
- Garcia-Gonzalez, C.A., Camino-Rey, M.C., Alnaief, M. et al., Supercritical drying of aerogels using CO₂: Effect of extraction time on the end material textural properties, *Journal of Supercritical Fluids* 66 (2012a) 297-306.
- Garcia-Gonzalez, C.A., Jin, M., Gerth, J. et al., Polysaccharide-based aerogel microspheres for oral drug delivery, *Carbohydrate Polymers* 117 (2015) 797-806.
- Garcia-Gonzalez, C.A., Uy, J.J., Alnaief, M., Smirnova, I., Preparation of tailor-made starch-based aerogel microspheres by the emulsion-gelation method, *Carbohydrate Polymers* 88 (2012b) 1378-1386.
- Garcia-Risco, M., Vicente, G., Reglero, G., Fornari, T., Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography, *Journal of Supercritical Fluids* 55 (2011) 949-954.
- GAMA, Cellulose acetate polymer: Environmentally degradable material made from a modified natural polymer (www.acetateweb.com/pdf/Att.10_GAMA-article-prf1.pdf) 30.10.2014
- Gamal, A.M., Farha, S.A.A., Sallam, H.B. et al., Kinetic study and equilibrium isotherm analysis of reactive dyes adsorption onto cotton fiber, *Nature and Science* 8 (2010) 95-109.
- Gong, K., Darr, J.A., Rehman, I.U., Supercritical fluid assisted impregnation of indomethacin into chitosan thermosets for controlled release applications, *International Journal of Pharmaceutics* 315 (2006) 93-98.
- Grosso, C., Figueiredo, A.C., Burillo, J. et al., Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: Comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation, *Journal of Separation Science* 33 (2010) 2211–2218.

- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., Galotto, M.J., The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol, *International Journal of Food Microbiology* 146 (2011) 144-150.
- Guerrini, L.M., Branciforti, M.C., Canova, T., Bretas, R.E.S., Electrospinning and characterization of polyamide nanofibers with different molecular weights, *Materials Research* 12 (2009) 181-190.
- Gunaratne, A., Ranaweera, S., Corke, H., Thermal, pasting, and gelling properties of wheat and potato starches in the presence of sucrose, glucose, glycerol, and hydroxypropyl β -cyclodextrin, *Carbohydrate Polymers* 70 (2007) 112-122.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components, *Food Microbiology* 26 (2009) 142-150.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology* 86 (1999) 985-990.
- Hannay, L.B., Hogarth, J., On the solubility of solids in gases, *Proceedings of Royal Society* 29 (1879) 324-342.
- Houchin, M.L., Topp, E.M., Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: A review of reactions and mechanisms, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97 (2008) 2395-2404.
- Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K. et al., Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 3590-3595.
- Hofman, H.E., Reid, E.W., Cellulose acetate lacquers, *Industrial and Engineering chemistry* 21 (1929) 955-965.
- Hussain, Y.A., Grant, C.S., Ibuprofen impregnation into submicron polymeric films in supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids* 71 (2012) 127-135.
- Ivanovic, J., Milovanovic, S., Stamenic, M. et al., Application of an integrated supercritical extraction and impregnation process for incorporation of thyme extracts into different carriers, Ed. J. Osborne, *Handbook on Supercritical Fluids, Fundamentals, Properties and Applications* © Nova 2014, 257-280.

- Ivanovic, J., Misic, D., Zizovic, I., Ristic, M., *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates, *Food Control* 25 (2012) 110-116.
- Ivanovic, J., Zizovic, I., Ristic, M. et al., The analysis of simultaneous clove/oregano and clove/thyme supercritical extraction, *Journal of Supercritical Fluids* 55 (2011) 983-991.
- Jenkins, P.J., Donald, A.M., Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study, *Carbohydrate Research* 308 (1998) 133-147.
- Jovanović, S., Jeremić, K., Karakterisanje polimera, Tehnološko-metalurški fakultet (2007) 193-203.
- Katayama, S., Zhao, L., Yonezawa, S., Iwai, Y., Modification of the surface of cotton with supercritical carbon dioxide and water to support nanoparticles, *Journal of Supercritical Fluids* 61 (2012) 199-205.
- Kazarian, S.G., Polymer processing with supercritical fluids, *Polymer Science Series C* 42 (2000) 78-101.
- Kikic, I., Vecchione, F., Supercritical impregnation of polymers, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7 (2003) 399-405.
- Kiran, E., Balkan, H., High-pressure extraction and delignification of red spruce with binary and ternary mixtures of acetic acid, water and supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 7 (1994) 75-86.
- Kirby, C.F., McHugh, M.A., Phase behavior of polymers in supercritical fluid solvents, *Chemical Reviews* 99 (1999) 565-602.
- Klaric, M.S., Kosalec, I., Mastelic, J. et al., Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings, *Letters in Applied Microbiology* 44 (2007) 36-42.
- Knez, Ž., Markočič, E., Leitgeb, M. et al., Industrial applications of supercritical fluids: A review, *Energy* 77 (2014) 235-243.
- Knox, D.E., Solubilities in supercritical fluids, *Pure and Applied Chemistry* 77 (2005) 513-530.
- Kruk, I., Michalska, T., Lichszteld, K. et al., The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species, *Chemosphere* 41 (2000) 1059-1064.
- Lee, L.Y., Ranganath, S.H., Fu, Y., Raclitaxel release from micro-porous PLGA disks, *Chemical Engineering Science* 64 (2009) 4341-4349.

- Li, K.-K., Yin, S.-W., Yang, X.-Q. et al., Fabrication and characterization of novel antimicrobial films derived from thymol-loaded zein-sodium caseinate (sc) nanoparticles, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012) 11592-11600.
- Lian, Z., Epstein, S.A., Blenk, C.W., Shine, A.D., Carbon dioxide-induced melting point depression of biodegradable semicrystalline polymers, *Journal of Supercritical Fluids* 39 (2006) 107–117.
- Liu, D.H., Tomasko, D.L., Carbon dioxide sorption and dilation of poly(lactide-co-glycolide), *Journal of Supercritical Fluids* 39 (2007) 416-425.
- Lopez-Periago, A., Argemi, A., Andanson, J.M. et al., Impregnation of a biocompatible polymer aided by supercritical CO₂: Evaluation of drug stability and drug-matrix interactions, *Journal of Supercritical Fluids* 48 (2009a) 56-63.
- Lopez-Periago, A.M., Fraile, J., Garcia-Gonzalez, C.A., Domingo, C., Impregnation of a triphenylpyrylium cation into zeolite cavities using supercritical CO₂, *Journal of Supercritical Fluids* 50 (2009b) 305-312.
- Ma, S.-L., Lu, Z.-W., Wu, Y.-T., Zhang, Z.-B., Partitioning of drug model compounds between poly(lactic acid) and supercritical CO₂ using quartz crystal microbalance as an *in situ* detector, *Journal of Supercritical Fluids* 54 (2010) 129-136.
- Makadia, H.K., Siegel, S.J., Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers* 3 (2011) 1377-1397.
- Marizza, P., Keller, S.S., Mullertz, A., Boisen, A., Polymer-filled microcontainers for oral delivery loaded using supercritical impregnation, *Journal of Controlled Release* 173 (2014) 1-9.
- Marr, R., Gamse, T., Use of supercritical fluids for different process including new development- a review, *Chemical Engineering and Processing* 39 (2000) 19-28.
- Martinez, J.L., Samuel, V.W., Supercritical extraction plants-equipment, process and costs, *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*, Ed. Martínez, J.L., CRC Press, Boca Raton, FL (2008) 25-48.
- Masmoudi, Y., Azzouk, L.B., Forzano, O. et al., Supercritical impregnation of intraocular lenses, *Journal of Supercritical fluids* 60 (2011) 98-105.

- Meier, M.M., Kanis, L.A., Soldi, V., Characterization and drug-permration profiles of microporous and dense cellulose acetate membranes: influence of plasticizer and pore foming agent, *International Journal of Pharmaceutics* 278 (2004) 99-110.
- Mehling, T., Smirnova, I., Guenther, U., Neubert, R.H.H., Polysaccharide-based aerogels as drug carriers, *Journal of Non-Crystalline Solids* 355 (2009) 2472-2479.
- Mezzouga, N., Elhadri, A., Dallouh, A. et al., Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum Compactum* essential oil and some of its constituents, *Mutation Research* 629 (2007) 100-110.
- Milosavljević, S.M., *Strukturne instrumentalne metode*, Hemijski fakultet, Beograd (1994) 49-70.
- Mishra, S., Rai, T., Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches, *Food Hydrocolloids* 20 (2006) 557-566.
- Misic, D., Ivanovic, J., Zizovic, I., Antibacterial activity of supercritical *Usnea barbata* extract against staphylococci, streptococci and enterococci originated in animals, 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Vienna, Austria, 10-13th April 2010.
- Mišić, D., Nišavić, J., Žižović, I., Ivanović, J., Antibakterijsko delovanje i citotoksični efekat natkritičnog ekstrakta timijana i ekstrakta timijana dobijenog procesom hidrodestilacije, *Veterinarski glasnik* 63 (2009a) 17-27.
- Mišić, D., Ašanin, D., Ivanović, J., Žižović, I., Investigation of antibacterial activity of supercritical extracts of plants, as well as of extracts obtained by other technological processes on some bacteria isolated from animals, *Acta Veterinaria* 59 (2009b) 557-568.
- Mohammed, M.J., Al-Bayati, F.A., Isolation and identification of antibacterial compounds from *Thymus kotschyanus* and aerial parts of *Dianthus caryophyllus* flower buds, *Phytomedicine* 16 (2009) 632-637.
- Moorthy, S.N., Tropical sources of starch, *Starch in Food: Structure, Function and Applications*, Ed. Eliasson, A.C., Woodhead Publishing (2004) 321-334.
- Mukhopadhyay, M., De, S.K., Fluid phase behavior of close molecular weight finechemicals, *Journal of Chemical and Engineering Data* 40 (1995) 909-913.

- Muller-Riebau, F., Berger, B., Yegen, O., Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 43 (1995) 2262-2266.
- Natu, M.V., Gil, M.H., de Sousa, H.C., Supercritical solvent impregnation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) and poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene-vinyl acetate) blends for controlled release applications, *Journal of Supercritical Fluids* 47 (2008) 93-102.
- Nikitin, L.N., Gallyamov, M.O., Vinokur, R.A. et al., Swelling and impregnation of polystyrene using supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 26 (2003) 263-273.
- Nordmann, P., Naas, T., Fortineau, N., Poirel, L., Superbugs in the coming new decade: multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* in 2010, *Current Opinion in Microbiology* 10 (2007) 1-5.
- Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A. et al., Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol, *FEMS Microbiology Letters* 230 (2004) 191-195.
- Oh, S.Y., Yoo, D.I., Shin, Y., Seo, G., FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide, *Carbohydrate Research* 340 (2005) 417-428.
- Ostrowska-Czubenko, J., Pieróg, M., Gierszewska-Drużyńska, M., State of water in noncrosslinked and crosslinked hydrogel chitosan membranes- DSC studies, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its ...* 16 (2011) 147-156.
- Ozdemir, E., Sendemir-Urkmez, A., Yesil-Celiktas, O., Supercritical CO₂ processing of a chitosan-based scaffold: Can implantation of osteoblastic cells be enhanced?, *Journal of Supercritical Fluids* 75 (2013) 120-127.
- Paes, S.S., Yakimets, I., Mitchell, J.R., Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films, *Food Hydrocolloids* 22 (2008) 788-797.
- Painter, P.C., Coleman, M.M., *Essentials of polymer science and engineering*, DES tech Publications (2009) 2-83 i 205-208.
- Palaniappan, K., Holley, R.A., Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria, *International Journal of Food Microbiology* 140 (2010) 164-168.
- Paolo, A., Kikic, I., Cortesi, A. et al., Polydimethylsiloxanes in supercritical solvent impregnation (SSI) of polymers, *Journal of Supercritical Fluids* 27 (2003) 309-315.

- Peng, L., Zhongdong, L., Kennedy, J.F., The study of starch nano-unit chains in the gelatinization process, *Carbohydrate Polymers* 68 (2007) 360-366.
- Petrovic, S., Ivanovic, J., Milovanovic, S., Zizovic, I., Comparative analyses of diffusion coefficients for different extraction processes from Thyme, *Journal of Serbian Chemical Society* 77 (2012) 799–813.
- Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli, E. et al., Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants, *Industrial Crops and Products* 2 (1993) 47-50.
- Pilati, F., Esposti, M.D., Bondi, M. et al., Designing of antibacterial plastics: thymol release from photocured thymo-doped acrylic resins, *Journal of Material Science* 48 (2013) 4378-4386.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L. et al., Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species, *Journal of Medical Microbiology* 55 (2006) 1367-1373.
- Popov-Raljić, J., Tehnologija šećera i skroba, Drugi deo- Tehnologija skroba, Poljoprivredni fakultet, Beograd (2009) 183-324.
- Proniewicz, L.M., Paluszkiwicz, C., Weselucha-Birczyńska, A. et al., FT-IR and FT-Raman study of hydrothermally degraded cellulose, *Journal of Molecular Structure* 596 (2001) 163-169.
- Putanov, P., Uvod u heterogenu katalizu, Srpska Akademija Nauka i Umetnosti u Novom Sadu, Prosveta (1995) 101-106.
- Radulović, Š., Mikrobiologija sa epidemilogijom (peto izdanje), Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd (1998) 37-51, 226.
- Ray, M., Pal, K., Anis, A., Banthia, A.K., Development and characterization of chitosan based polymeric hydrogel membranes, *Designed Monomers & Polymers* 13 (2010) 193-206.
- Reverchon, E., Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *Journal of Supercritical Fluids* 10 (1997a) 1-37.
- Reverchon, E., Marrone, C., Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling, *Chemical Engineering Science* 52 (1997b) 3421-3428.
- Reverchon, E., De Marco, I., Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *Journal of Supercritical Fluids* 38 (2006) 146-166.

- Riella, K.R., Marinho, R.R., Santos, J.S. et al., Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents, *Journal of Ethnopharmacology* 143 (2012) 656-663.
- Rinki, K., Dutta, P.K., Hunt, A.J. et al., Preparation of chitosan based scaffolds using supercritical carbon dioxide, *Macromolecular Symposia* 277 (2009a) 36-42.
- Rinki, K., Tripathi, S., Dutta, P.K. et al., Direct chitosan scaffold formation via chitin whiskers by a supercritical carbon dioxide method: a green approach, *Journal of Materials Chemistry* 19 (2009b) 8651-8655.
- Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C.M. et al., Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol, *International Journal of Food Microbiology* 139 (2010) 70-78.
- Rukmani, A., Sundrarajan, M., Inclusion of antibacterial agent thymol on b-cyclodextrin-grafted organic cotton, *Journal of Technical Textiles* 42 (2011) 132-144.
- Sajfrtova, M., Sovova, H., Karban, J. et al., Effect of separation method on chemical composition and insecticidal activity of Lamiaceae isolates, *Industrial Crops and Products* 47 (2013) 69-77.
- Schulz, H., Özkan, G., Baranska, M. et al., Characterization of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy* 39 (2005) 249-256.
- Shen, Z., Huvard, G.S., Warriner, C.S. et al., CO₂- assisted fiber impregnation, *Polymer* 49 (2008) 1579-1586.
- Shieh, Z.T., Su, J.H., Manivannan, G. et al., Interaction of supercritical carbon dioxide with polymers, 1. Crystalline polymers, *Journal of Applied Polymer Science* 59 (1996a) 695-705.
- Shieh, Z.T., Su, J.H., Manivannan, G. et al., Interaction of supercritical carbon dioxide with polymers, 2. Amorphous polymers, *Journal of Applied Polymer Science* 59 (1996b) 707-717.
- Sing, A., Narvi, S.S., Dutta, P.K., Pandey, N.D., External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde, *Bulletin of Materials Science* 29 (2006) 233-238.
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L. et al., Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources, *Food Chemistry* 81(2003) 219-231.
- Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S., Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, *Hemijska Industrija* 56 (2002) 179-190.

- Sokovic, M., Van Griensven, L.J.L.D., Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*, *European Journal of Plant Pathology* 116 (2006) 211-224.
- Socrates, G., *Infrared and Raman characteristic group frequencies- Tables and Charts*, 3rd edition, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK (2007) 329.
- Sovova, H., Jež, J., Solubility of menthol in supercritical carbon dioxide, *Journal of Chemical and Engineering Data* 39 (1994) 840-841.
- Sovova, H., Solubility of natural products in scCO₂ - data condensed with Adachi-Lu equation, *Proceedings of the 7th Meeting on Supercritical Fluids* (2000) 915.
- Sparks, D.L., Hernandez, R., Estevez, L.A., Evaluation of density-based models for the solubility of solids in supercritical carbon dioxide and formulation of a new model, *Chemical Engineering Science* 63 (2008) 4292-4301.
- Stahl-Biskup, E., Venskutonis, R.P., *Handook of Herbs and Spices*, Vol 2, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge (2004)
- Stafford, C.M., Russell, T.P., McCarthy, T.J., Expansion of polystyrene using supercritical carbon dioxide: Effects of molecular weight, polydispersity and low molecular weight components, *Macromolecules* 32 (1999) 7610-7616.
- Šegvić Klarić, M., Kosalec, I., Mastelić, J. et al., Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings, *Letters in Applied Microbiology* 44 (2007) 36-42.
- Širvaitytė, J., Siugždaitė, J., Valeikac, V., Dambrauskiene, E., Application of essential oils of thyme as a natural preservative in leather tanning, *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* 61 (2012) 220-227.
- Švabić-Vlahović, M. i grupa autora, *Medicinska bakteriologija*, Savremena administracija, Beograd (2008)
- Tai, H., Mather, M.L., Howard, D., Control of pore size and structure of tissue engineering scaffolds produced by supercritical fluid processing, *European Cell and Materials* 14 (2007) 64-77.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food Control* 21 (2010) 1199-1218.

- Takahashi, S., Hassler, J.C., Kiran, E., Melting behavior of biodegradable polyesters in carbon dioxide at high pressures, *Journal of Supercritical Fluids* 72 (2012) 278–287.
- Tamura, T., Iwamoto, H., Thymol: a classical small-molecule compound that has a dual effect (potentiating and inhibitory) on myosin, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318 (2004) 786-791.
- Te Wierik, G.H.P., Eissens, A.C., Bergsma, J. et al., A new generation starch product as excipient in pharmaceutical tablets. III. Parameters affecting controlled drug release from tablets based on high surface area retrograded pregelatinized potato starch, *International Journal of Pharmaceutics* 157 (1997) 181-187.
- Tester, R.F., Morrison, W.R., Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effect of amylopectin, amylose, and lipids, *Cereal Chemists* 67 (1990) 551-557.
- Tippayatum, P., Chonhenchob, V., Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria, *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)* 41 (2007) 319-323.
- Torres, A., Romero, J., Macan, A. et al., Near critical and supercritical impregnation and kinetic release of thymol in LLDPE films used for food packaging, *Journal of Supercritical Fluids* 85 (2014) 41-48.
- Ultee, A., Bennink, M.H.J., Moezelaar, R., The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002) 1561-1568.
- Uragami, T., Matsuda, T., Okuno, H., Miyata, T., Structure of chemically modified chitosan membranes and their characteristics of permeation and separation of aqueous ethanol solutions, *Journal of Membrane Science* 88 (1994) 243-251.
- Uzer, S., Akman, U., Hortacsu, O., Polymer swelling and impregnation using supercritical CO₂: A model-component study towards producing controlled-release drugs, *Journal of Supercritical Fluids* 38 (2006) 119-128.
- Varian, Inc., Biodegradable Polymers, Analysis of biodegradable polymers by Gpc/Sec, (2012)
- Varona, S., Rodriguez-Rojo, S., Martin, A. et al., Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch, *Journal of Supercritical Fluids* 58 (2011) 313-319.

- Vazquez, B.I., Fente, C., Franko, C.M. et al., Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese, *International Journal of Food Microbiology* 67 (2001) 157-163.
- Wang, F.-J., Yang, Y.-Y., Zhang, X.-Z. et al., Cellulose acetate membranes for transdermal delivery of scopolamine base, *Materials Science and Engineering C* 20 (2002) 93-100.
- Wattanasatcha, A., Rengpipat, S., Wanichwecharungruang, S., Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent, *International Journal of Pharmaceutics* 434 (2012) 360-365.
- Zeković, Z., Lepojević, Ž., Vujić, Dj., Supercritical extraction of Thyme (*Thymus vulgaris* L.), *Chromatographia* 51 (2000) 175-178.
- Zhang, L., Gangwani, K.K., Lemert, R.M., Sorption and swelling of block copolymers in the presence of supercritical fluid carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 11 (1997) 115-119.
- Zhang, X., Tong, Q., Zhu, W., Ren, F., Pasting, rheological properties and gelatinization kinetics of tapioca starch with sucrose or glucose, *Journal of Food Engineering* 114 (2013) 255-261.
- Zhao, Y, Liu, W., Wu, Z., Solubility Model of solid solute in supercritical fluid solvent based on UNIFAC, *Industrial Engineering and Chemical Research* 49 (2010) 5952–5957.
- Zizovic, I., Ivanovic, J., Milovanovic, S., Stamenic, M., Impregnations using supercritical carbon dioxide, *Supercritical CO2 extraction and its applications*, Ed. Edward Rój, OIC Poland, Lublin (2014) 23-35.
- Žižović, I., Mišić, D., Ašanin, R., Ivanović, J., Antibacterial activity of essential oils of some Lamiaceae family species isolated by different methods, *Zbornik radova tehnološkog fakulteta u Leskovcu* 19 (2009) 20-26.

Biografija autora

Stoja Milovanović je rođena 1982. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 2010. godine na Katedri za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Diplomski rad na temu „Kinetika ekstrakcije aktivnih komponenti lavande, timijana, divizme i origana i njihovo antibakterijsko dejstvo” pod rukovodstvom mentora dr Irene Žižović odbranila je sa ocenom 10.

Doktorske studije upisala je 2010. godine na smeru Hemijско inženjerstvo. Prvu i drugu godinu doktorskih studija je završila sa prosečnom ocenom 9,83. Odbranila je završni ispit pod nazivom „Određivanje rastvorljivosti timola u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu i impregnacija biodegradabilnih nosača timolom“ pod rukovodstvom mentora dr Irene Žižović, vanrednog profesora.

Od januara 2011. godine angažovana je na projektu Ministarstva prosvete i nauke Rublike Srbije III45017 pod nazivom „Funkcionalni fiziološki aktivni biljni materijali sa dodatnom vrednošću za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji”. Od 2011. godine je zaposlena kao istraživač pripravnik, a zatim kao istraživač saradnik na Katedri za Organsku hemijšku tehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана: Стоја Миловановић

број индекса: 4051/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Импрегнација тимола на чврсте носаче наткритичним угљеник(IV)-оксидом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, 26.05.2015

Потпис докторанда

Стоја Миловановић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Стоја Миловановић

Број индекса: 4051/2010

Студијски програм: Хемијско инжењерство

Наслов рада: **Импрегнација тимола на чврсте носаче наткритичним угљеник(IV)-
оксидам**

Ментор: др Ирена Жижовић

Потписана: Стоја Миловановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 26.05.2015.

Стоја Миловановић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Импрегнација тимола на чврсте носаче наткритичним угљеник(IV)-оксидом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

У Београду, 26.05.2015.

Потпис докторанда

Симоја Милобановић