

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Светолик Н. Максимовић

**ЕКСТРАКЦИЈА ИЗ СМИЉА
(*Helichrysum italicum*) И
ИМПРЕГНАЦИЈА ЧВРСТИХ НОСАЧА
ЕКСТРАКТОМ ПРИМЕНОМ
НАТКРИТИЧНОГ УГЉЕНИК(IV)-
ОКСИДА**

Докторска дисертација

Београд, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Svetolik N. Maksimovic

**EXTRACTION FROM CURRY PLANT
(*Helichrysum italicum*) AND
IMPREGNATION OF SOLID CARRIERS
WITH THE EXTRACT USING
SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017

Ментор:

Др Ирена Жижовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Чланови комисије:

Др Слободан Петровић, професор емеритус
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Јасна Ивановић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Вања Тадић, научни саветник
Институт за проучавање лековитог биља “Др Јосиф Панчић”

Кандидат:

Датум одбране: _____

Извод

Смиље (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil., Asteraceae) је медитеранска биљка, позната по својој традиционалној употреби у третману упалних процеса претежно на кожи и у дигестивном систему. Смиље представља вредан извор биолошки активних компонената, међу којима су најзаступљеније терпени и фенолна једињења. На основу прегледа литературних података може се закључити да екстракција помоћу наткритичног угљеник(IV)-оксида није довољно истражена у погледу хемијског састава и могућих примена добијених наткритичних екстраката. У овој дисертацији испитана је наткритична екстракција из смиља и, по први пут је наткритични екстракт смиља коришћен као активна супстанца за импрегнацију различитих чврстих носача у наткритичним условима.

За добијање екстракта богатог етарским уљем смиља одабрани су услови притиска од 15 МПа и температуре од 40°C. При томе, испитан је косолвентски утицај етарског уља жалфије додатог у различитим количинама. Присуство етарског уља жалфије изазвало је појаву одређеног броја монотерпена у екстракту смиља, које није било могуће изоловати помоћу чистог наткритичног угљеник(IV)-оксида. Такође је показано да са порастом масе додатог етарског уља жалфије селективност наткритичног угљеник(IV)-оксида према монотерпенима расте, док селективност према сесквитерпенима, дитерпенима, восковима и осталим једињењима опада. При екстракцији из смиља са додатком етарског уља жалфије као косолвента, оптимална количина етарског уља која је условила издвајање највеће додатне масе (маса која није могла бити издвојена у процесу без косолвента) екстракта износила је 30% масе екстракта смиља добијеног без додатка косолвента. Додатак етарског уља жалфије изазвао је и повећање брзине екстракције у периоду екстракције у којем је брзина процеса лимитирана растворљивошћу у наткритичној фази.

Наткритична екстракција компонената више молекулске масе из смиља реализована је на притиску од 35 МПа и температури од 40°C, при чему је испитано косолвентско дејство етанола. Додатак етанола као косолвента изазвао је дупло повећање екстракционог приноса. GC-FID и GC-MS аналитичке методе

као и методе за одређивање укупних садржаја фенола и флавоноида показале су значајно повећање укупног садржаја терпена, деривата кумарина и аморфена и флавоноида у екстракту добијеном уз додатак косолвента, на рачун значајног смањења укупног садржаја фенола и масних киселина, естара, алдехида и алкохола. Упркос разлици у хемијском саставу, оба екстракта су показала умерено антиоксидативно дејство, утврђено помоћу DPPH и FRAP теста.

Интегрисани процес наткритичне екстракције из смиља и наткритичне импрегнације памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом изведен је на претходно оптимизованим условима: притиску од 35 МПа и температури од 40°C, при односу масе биљног материјала и носача од 10, времену импрегнације од 5 h и при брзини декомпресије од 3,5 МПа/min. Испитан је утицај присуства етанола у систему на комбиновани процес. Највећи принос импрегнације (4,75%) постигнут је када је као носач употребљена памучна газе, уз додатак етанола као косолвента. Показано је да додатак косолвента утиче на повећање приноса импрегнације у експериментима са памучном газом, док је у случају импрегнације поли(пропилен)ске тканине његов утицај негативан. Резултати *in vivo* испитивања дејства импрегнираних текстилних материјала на иритирану кожу показали су њихов потенцијал за топикалну примену.

Интегрисани процес наткритичне екстракције и импрегнације је такође изведен на 35 МПа и 40°C са циљем да се импрегнишу ксерогелови кукурузног скроба екстрактом смиља, погодни за орални унос екстракта у људски организам. За ту сврху синтетисани су ксерогелови сушењем на ваздуху ацето- и алкогелова кукурузног скроба. Испитан је утицај припреме ксерогелова, присуства етанола у систему, као и процесних параметара на принос импрегнације. Показано је да је додатак етанола као косолвента у случају импрегнације ксерогелова добијених од ацетогелова значајно смањио принос импрегнације. Исти ефекат је имало и повећање времена импрегнације са 5 на 8 h. Такође, повећање односа масе биљног материјала и масе носача са 10 на 20, за оба типа ксерогела, изазвало је смањење приноса импрегнације. Највеће вредности приноса импрегнације постигнуте су у процесу са чистим наткритичним угљеник(IV)-оксидом, током 5 h и при односу масе биљног материјала и масе носача од 10. Значајно већи принос импрегнације постигнут при овим условима, током импрегнације ксерогелова добијених од

алкогелова, може се приписати морфолошким разликама ксерогелова и контролисаној измени воде током синтезе ксерогелова добијених сушењем алкогелова.

Кључне речи: смиље, *Helichrysum italicum*, наткритична екстракција, наткритична импрегнација, памучна газа, поли(пропилен)ска тканина, ксерогелови скроба

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Хемијско инжењерство

Abstract

Curry plant (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil., Asteraceae) is Mediterranean plant, known for its traditional use in treatment of inflammatory processes mostly on skin and in the digestive system. This plant presents a valuable source of bioactive components, among which the most common are terpenes and phenolic compounds. According to available literature data, supercritical extraction with carbon dioxide from curry plant has not been investigated enough regarding chemical composition and possible uses of the supercritical extracts. In this dissertation, supercritical extraction from curry plant was investigated, and for the first time, supercritical extract of curry plant was used as an active component for impregnation of different solid carriers under supercritical conditions.

For obtaining the extract rich in curry plant's essential oil, pressure of 15 MPa and temperature of 40°C were selected. Thereby, co-solvent influence of sage essential oil added to the system in different quantities was investigated. Addition of sage essential oil caused presence of particular number of monoterpenes in curry plant's extract, which could not be isolated by pure supercritical CO₂. It was also shown that selectivity of supercritical CO₂ towards monoterpenes increased, while selectivity towards sesquiterpenes, diterpenes, waxes and other compounds decreased by an increase of mass of added essential oil. The optimal quantity of essential oil added, which induced the highest quantity of additional mass (mass that couldn't be extracted without co-solvent) of extract, was 30% of the mass of the curry plant extract obtained without addition of co-solvent. The addition of sage essential oil also increased the extraction rate in the period of extraction governed by the solubility in supercritical phase.

Supercritical extraction of higher molecular weight compounds from curry plant was performed at pressure of 35 MPa and temperature of 40°C, whereby the co-solvent activity of ethanol was investigated. Addition of ethanol as co-solvent caused more than double increase of the extraction yield. GC-FID and GC-MS analytic methods, as well as methods for determination of total phenolic and total flavonoid contents revealed significant increase of total terpenic content and content of coumarin and amorphene derivatives and flavonoids in the extract obtained with the co-solvent, at the expense of

significant reduction of total phenolic content and content of fatty acids, esters, aldehydes and alcohols. Furthermore, despite the difference in chemical composition, both extracts showed moderate antioxidant activity, determined by the DPPH free-radical and FRAP assays.

Integrated process of supercritical extraction from curry plant and supercritical impregnation of cotton gauze and polypropylene fabric was performed at previously optimized conditions: pressure of 35 MPa and temperature of 40°C, under the constant values of plant material to carrier mass ratio of 10, impregnation time of 5 h and decompression rate of 3,5 MPa/min. Influence of the presence of ethanol in the system on the impregnation yield was investigated. The highest impregnation yield (4,75%) was obtained with cotton gauze as a carrier, with addition of ethanol as a co-solvent. It was shown that the addition of ethanol caused increase of the impregnation yield in the experiments with cotton gauze, while in the case of polypropylene fabric impregnation addition of ethanol lowered the impregnation yield. Results of *in vivo* testing of the impregnated textile materials' effect on the irritated skin revealed their potential for topical application.

In addition, the integrated process of supercritical extraction and impregnation was performed at 35 MPa and 40°C with the aim to impregnate corn starch xerogels with the curry plant's extract as suitable carrier for oral intake of the extract into the human organism. For that purpose, xerogels obtained by air-drying of corn starch acetogel and alcogel were employed. Influence of xerogels' preparation method, presence of ethanol in the system and process parameters on the impregnation yield was investigated. It was shown that addition of ethanol as a co-solvent in the case of impregnation of the xerogel obtained from acetogel significantly lowered the impregnation yield. Increase of the impregnation time from 5 h to 8 h had the same effect. Furthermore, increase of the plant material to carrier mass ratio from 10 to 20 for both xerogel types caused decrease of the impregnation yield. The highest impregnation yields were obtained in the processes with pure supercritical CO₂, during 5 h and with plant material to carrier mass ratio of 10. Significantly higher impregnation yield obtained under these conditions in case of the xerogel obtained from alcogel could be attributed to different morphology compared to the xerogel obtained from acetogel and controlled water replacement during the xerogel production.

Keywords: curry plant, *Helichrysum italicum*, supercritical extraction, supercritical impregnation, cotton gauze, polypropylene fabric, starch xerogels

Scientific field: Technological engineering

Narrower scientific field: Chemical engineering

Листа скраћеница и ознака

^1H NMR	протонска нуклеарна магнетна резонанца
^{13}C NMR	нуклеарна магнетна резонанца угљеника
A375	ознака ћелија малигног меланома коже човека
A _c	апсорбанција контролног једињења
A _s	апсорбанција узорка
ABTS	2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска) киселина
APCI-MS/MS	масена спектрометрија са употребом хемијске јонизације на атмосферском притиску
Caco-2	ознака ћелија људског епителног колоректалног аденокарцинома
CIGAR-HMBC	корелациона спектроскопија на бази хетеронуклеарних вишеструких веза рескалирана инверзном детекцијом градијента хармоника при константном времену
CE	еквиваленти катехина
COSY	корелациона спектроскопија
D	кофицијент дифузије
DNA	дезоксирибонуклеинска киселина
DPPH	2,2-дифенил-1-пикрилхидразил
DQF-COSY	корелациона спектроскопија са двоквантним филтером
DSC	диференцијална скенирајућа калориметрија
EC	електрична капацитивност
EDTA	етилендиамин-тетраацетатна киселина
EI	еритема индекс
EI-MS	електрон-јонизујућа масена спектрометрија
ESIMS	електроспреј-јонизујућа масена спектрометрија
f	масени проценат фракције у екстракту
FABMS	масена спектрометрија са употребом брзог бомбардовања атомима
FD-MS	масена спектрометрија са десорпцијом поља
FE-SEM	скенирајућа електронска микроскопија емисијом електрона/применом поља
FRAP	редукција гвожђа Fe ³⁺ у Fe ²⁺ у присуству антиоксиданата

FTIR	инфрацрвена спектроскопија са Fourier-овом трансформацијом
GAE	еквиваленти галне киселине
GC-C-IRMS	гасна хроматографија спрегнута са сагоревањем и масеном спектрометријом на бази односа изотопских маса
GC-FID	гасна хроматографија са употребом пламено-јонизујућег детектора
GC-MS	гасна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом
H2BC	ознака интегрисаних HSQC и COSY или HSQC и TOCSY спектроскопија
HCEC	ћелије епитела људске роњаче
HIV	вирус хумане имунодефицијенције
HMBC	корелациона спектроскопија на бази хетеронуклеарних вишеструких веза
HPEA	екстракција и адсорпција на високом притиску
HPLC	течна хроматографија високих перформанси
HPLC-DAD	течна хроматографија високих перформанси са употребом диодног детектора
HR-MS	масена спектрометрија високе резолуције
HR-MALDITOF-MS	масена спектрометрија високе резолуције заснована на времену лета уз употребу матрично потпомогнуте ласерске десорпције/јонизације
HREIMS	електрон-јонизујућа масена спектрометрија високе резолуције
HRESIMS	електроспреј-јонизујућа масена спектрометрија високе резолуције
HSQC	хетеронуклеарна једноквантна корелациона спектроскопија
I	принос наткритичне импрегнације
IR	инфрацрвена спектроскопија
K562	ознака еритролеукемијских ћелија човека
LC-ESI(IT)MSMS	течна хроматографија спрегнута са електроспреј-јонизујућом масеном спектрометријом
LDH	лактат дихидрогеназа
LDL	липопротеин ниске густине
MECC-DAD	мицеларна електрокинетичка капиларна хроматографија са употребом диодног детектора
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид

m	почетна маса носача за импрегнацију
m_1	маса узорка ксерогела скроба
m_2	маса пикнометра са водом
m_3	маса пикнометра са водом и узорком ксерогела скроба
m_e	маса екстракта
m_{exp}	очекивана маса екстракта
m_{HI}	почетна маса смиља
m_i	маса импрегнираног носача на крају експеримента
m_s	почетна маса биљног материјала
m_{SO}	маса етарског уља жалфије
NADPH	никотинамид аденидинуклеотид фосфат
NBD	4-(хексадециламино)-7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол
p_c	критични притисак
PI	процент инхибиције DPPH-радикала
PMR	протонска магнетна резонанца
Q-TOF HRMS	масена спектрометрија високе резолуције заснована на четвороструком времену лета
QE	еквиваленти кверцетина
RP-HPLC	течна хроматографија високих перформанси са повратном фазом
ROESY	спектроскопија заснована на нуклеарном Overhauser-овом ефекту ротирајућег оквира
s	процент површине компоненте у гасном хроматограму екстракта
SEM	скенирајућа електронска микроскопија
T	температура
T_c	критична температура
TEWL	трансепидермални губитак влаге
TLC	танкослојна хроматографија
TOCSY	спектроскопија са тоталном корелацијом
TPA	12- <i>O</i> -тетрадеканоилфорбол 13-ацетат
TPTZ	2,4,6-три(2-пиридил)- <i>s</i> -триазин
UV	ултраљубичаста спектроскопија
UV-Vis	ултраљубичаста спектроскопија спрегнута са видљивом

UPLC-MS/MS течна хроматографија ултра-перформанси спрегнута са масеном спектрометријом

V_c критична запремина

VERO ознака ћелија изолованих из епитела бубрега мајмуна

w_c укупан проценат компонената у екстракту

y принос наткритичне екстракције

y_0 принос наткритичне екстракције из чистог смиља

$n\text{KCO}_2$ наткритични угљеник(IV)-оксид

НКЕ наткритична екстракција

НКИ наткритична импрегнација

НКЕ-НКИ интегрисани процес наткритичне екстракције и наткритичне импрегнације

Грчка слова

ε порозност узорка ксерогела скроба

η кинематска вискозност

λ топлотна проводљивост

μ динамичка вискозност

ρ густина

$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ густина воде

ρ_s густина сировог скроба

ρ_x густина ксерогела скроба

σ површински напон

Садржај

1. УВОД.....	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО	4
2.1. НАТКРИТИЧНИ ФЛУИДИ – ЕКСТРАКЦИЈА И ИМПРЕГНАЦИЈА У НАТКРИТИЧНИМ УСЛОВИМА	4
2.1.1. Карактеристике наткритичних флуида. Наткритични угљеник(IV)-оксид	4
2.1.2. Наткритична екстракција	9
2.1.3. Наткритична импрегнација	12
2.1.4. Интегрисани процес наткритичне екстракције и наткритичне импрегнације.....	20
2.2. СМИЉЕ	26
2.2.1. Таксономски подаци и традиционална употреба.....	26
2.2.2. Хемијски састав изолата смиља – литературни преглед поступака изолације активних састојака.....	28
2.2.2.1. Хидродестилација смиља	28
2.2.2.2. Дестилација смиља воденом паром.....	34
2.2.2.3. Наткритична екстракција из смиља	35
2.2.2.4. Екстракција из смиља помоћу органских растварача	37
2.2.2.4.1. Екстракција из смиља помоћу ацетона.....	38
2.2.2.4.2. Екстракција из смиља помоћу метанола	41
2.2.2.4.3. Екстракција из смиља помоћу етанола	46
2.2.2.4.4. Екстракција из смиља помоћу других органских растварача ...	49
2.2.3. Фармаколошко дејство изолата смиља и њихових компонената	50
2.2.4. Токсичност изолата смиља и њихових компонената.....	55
2.3. НОСАЧИ ЗА ИМПРЕГНАЦИЈУ ЕКСТРАКТОМ СМИЉА	56
2.3.1. Носачи за топикалну употребу	57
2.3.1.1. Памучна газа	57
2.3.1.2. Поли(пропилен)ска тканина	58

2.3.2. Скроб	59
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	63
3.1. МАТЕРИЈАЛИ	63
3.2. МЕТОДЕ	63
3.2.1. Наткритична екстракција	63
3.2.1.1. Наткритична екстракција на нижем притиску	63
3.2.1.2. Наткритична екстракција на вишем притиску	66
3.2.2. Синтеза ксерогелова скроба	67
3.2.3. Наткритична импрегнација	68
3.2.3.1. Опис постројења за интегрисани процес наткритичне екстракције и наткритичне импрегнације	68
3.2.3.2. Наткритична импрегнација памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом смиља	70
3.2.3.3. Наткритична импрегнација ксерогелова скроба екстрактом смиља	70
3.2.4. Методе анализе	71
3.2.4.1. Гасна хроматографија (GC-FID)	71
3.2.4.2. Гасна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом (GC-MS)	71
3.2.4.3. Одређивање укупног садржаја фенола	71
3.2.4.4. Одређивање укупног садржаја флавоноида	72
3.2.4.5. Карактеризација ксерогелова	72
3.2.5. Одређивање антиоксидативног дејства екстраката	73
3.2.6. <i>In vivo</i> тестирање дејства импрегнираних материјала на иритирану кожу	75
3.2.6.1. Мерење трансепидермалног губитка влаге (TEWL)	76
3.2.6.2. Мерење еритема индекса (EI)	76
3.2.6.3. Мерење рН коже	77
3.2.6.4. Мерење електричне капацитивности (EC) коже	77
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	78

4.1. НАТКРИТИЧНА ЕКСТРАКЦИЈА ИЗ СМИЉА НА НИЖЕМ ПРИТИСКУ	78
4.1.1. Принос наткритичне екстракције и утицај косолвента	78
4.1.2. Хемијски састав екстраката и утицај косолвента	80
4.2. НАТКРИТИЧНА ЕКСТРАКЦИЈА ИЗ СМИЉА НА ВИШЕМ ПРИТИСКУ	85
4.2.1. Принос наткритичне екстракције и утицај косолвента	85
4.2.2. Хемијски састав екстраката и утицај косолвента	86
4.2.2.1. Резултати GC-FID и GC-MS аналитичких метода	86
4.2.2.2. Укупни садржаји фенола и флавоноида у екстрактима	88
4.2.3. Антиоксидативно дејство екстраката смиља.....	89
4.3. НАТКРИТИЧНА ИМПРЕГНАЦИЈА ПАМУЧНЕ ГАЗЕ И ПОЛИ(ПРОПИЛЕН)СКЕ ТКАНИНЕ ЕКСТРАКТОМ СМИЉА	91
4.3.1. Принос импрегнације и утицај косолвента.....	91
4.3.2. Резултати <i>in vivo</i> тестирања дејства импрегнираних текстилних материјала на иритирану кожу	93
4.4. НАТКРИТИЧНА ИМПРЕГНАЦИЈА КСЕРОГЕЛОВА СКРОБА ЕКСТРАКТОМ СМИЉА	96
4.4.1. Карактеризација ксерогелова	96
4.4.2. Принос импрегнације и утицај процесних параметара	97
5. ЗАКЉУЧАК	101
ЛИТЕРАТУРА	105
ПРИЛОГ	122
Биографија аутора	131

1. УВОД

Међу великим бројем лековитих биљака смиље (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil., Asteraceae) традиционално заузима значајно место, захваљујући претежно свом благотворном дејству у третману оштећења коже и дигестивних поремећаја (Viegas и сар., 2014). Поред тога, изолати смиља поседују дејства као што су антиупално, антибактеријско и антиоксидантно (Viegas и сар., 2014). Медитеранско порекло и специфичан, постојан мирис цветова смиља представљају додатни мотив за, како етнофармаколошка, тако и друга научна истраживања. Током последње две деценије значајно је порасло интересовање научника за биолошко дејство и хемијски састав изолата смиља добијених применом различитих поступака, од којих су највише у употреби хидродестилација, екстракција помоћу органских растварача и екстракција помоћу наткритичног угљеник(IV)-оксида. Реализоване студије су показале да изолати смиља поседују више различитих класа једињења, међу којима су најзаступљенији терпени и фенолна једињења. Многе од компонената, захваљујући својим биолошким активностима, биле су предмет детаљнијих испитивања, како *in vitro*, тако и *in vivo*.

Технологије засноване на употреби наткритичних флуида доживеле су током последњих неколико деценија експанзију као својеврсна алтернатива за многе конвенционалне процесе (Vyas и сар., 2009). Прогрес технологија заснованих на употреби наткритичних флуида базиран је на мултидисциплинарном приступу и у последњим деценијама учињен је значајан напредак у примени наткритичних флуида у многим гранама индустрије, као што су фармацеутска, прехранбена, текстилна, итд.

Екстракција помоћу наткритичних флуида, од којих је највише у употреби угљеник(IV)-оксид, изузетно је популаран процес, захваљујући својим многобројним предностима у односу на класичне поступке екстракције органским растварачима, дестилацију и пресовање, најчешће биљног материјала, у циљу добијања етарских или масних уља, као и осталих секундарних биљних метаболита. Ова метода своју предност дугује пре свега нетоксичном, незапаљивом, неексплозивном, некорозивном, јефтином растварачу, који је уз то

и без мириса и боје, чија вредност критичне температуре не превазилази значајно вредност амбијенталне температуре и који се лако и у потпуности одваја од екстракта. Овај енергетски ефикасан процес захвалан је са аспекта заштите животне средине и као такав налази значајно место у прехранбеној и фармацеутској индустрији, као и у биотехнологији. Овим поступком се добијају екстракти високог квалитета, ослобођени заосталог растварача и деградационих продуката.

Са друге стране, наткритични флуиди, а превасходно наткритични угљеник(IV)-оксид (нкСО_2), употребљавају се у процесима импрегнације због изузетно ниске вредности површинског напона, ниске вискозности и високих вредности густине и дифузивности, чиме се избегавају бројни недостаци конвенционалних процеса импрегнације. Употребом нкСО_2 у процесу импрегнације различитих материјала активним супстанцама, између осталог, проширен је избор материјала погодних за импрегнацију, избегнути су употреба токсичних органских растварача и неопходност додатног сушења након завршетка процеса и обезбеђени су дубље продирање и униформнија расподела активне супстанце у унутрашњој структури материјала носача. Данас је помоћу нкСО_2 могуће ефикасно импрегнирати разне полимерне материјале фармацеутски активним супстанцама, разне типове дрвета биоцидима, као и бојити материјале попут коже или текстила.

Заједничку важну карактеристику процеса наткритичне екстракције и наткритичне импрегнације представља чињеница да се променом вредности процесних параметара попут притиска, температуре, протока нкСО_2 , времена трајања експеримента, брзине декомпресије и др., може директно утицати на моћ растварања нкСО_2 , као и на његову селективност према одређеним активним компонентама, а самим тим и на карактеристике жељених производа.

Предмет проучавања ове дисертације била је врста смиља *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil., Asteraceae. С обзиром на то да је, на основу литературних података, међу процесима изолације активних компонената из смиља наткритична екстракција далеко најмање заступљена, део експеримената реализованих у овој дисертацији посвећен је наткритичној екстракцији из смиља на nižем (15 МПа) и вишем притиску (35 МПа), са и без додатка одговарајућих

косолвената. У сврху хемијске карактеризације екстраката смиља примењене су GC-FID и GC-MS аналитичке методе. Испитано је косолвентско дејство етарског уља жалфије на принос и хемијски састав екстракта добијеног на нижем притиску (15 МПа). По први пут, екстракт смиља је употребљен као активна супстанца за наткритичну импрегнацију текстилних материјала – памучне газе и поли(пропилен)ске тканине, у циљу добијања материјала за топикалну примену, чија је безбедност и ефикасност тестирана *in vivo*. Екстрактом смиља импрегнирани су и ксерогелови скроба у циљу добијања формулација за потенцијалну оралну употребу у терапијској или дијететској дневној дози. При томе су вариране вредности појединих процесних параметара, а у циљу испитивања њиховог утицаја на принос импрегнације. Импрегнација наведених чврстих носача екстрактом смиља реализована је помоћу недавно развијеног интегрисаног процеса наткритичне екстракције и наткритичне импрегнације, у специјално за то прилагођеној апаратури.

Експериментални део ове дисертације реализован је са следећим циљевима:

- одређивање приноса наткритичне екстракције из смиља на нижем притиску (15 МПа) и хемијског састава екстраката, са испитивањем утицаја додатка етарског уља жалфије као косолвента;
- одређивање приноса наткритичне екстракције из смиља на вишем притиску (35 МПа), хемијског састава екстраката и његовог антиоксидантног дејства, уз испитивање утицаја етанола као косолвента;
- импрегнација памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом смиља у наткритичним условима применом комбинованог процеса наткритичне екстракције и импрегнације, уз испитивање утицаја етанола као косолвента на принос импрегнације;
- *in vivo* испитивање дејства импрегнираних текстилних материјала на вештачки иритирану кожу;
- импрегнација ксерогелова кукурузног скроба екстрактом смиља применом комбинованог процеса наткритичне екстракције и импрегнације, уз испитивање утицаја начина припреме ксерогелова као и различитих процесних параметара на принос импрегнације.

2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1. НАТКРИТИЧНИ ФЛУИДИ – ЕКСТРАКЦИЈА И ИМПРЕГНАЦИЈА У НАТКРИТИЧНИМ УСЛОВИМА

2.1.1. Карактеристике наткритичних флуида. Наткритични угљеник(IV)-оксид

Критична тачка за неку супстанцу дефинише се вредностима критичне температуре, T_c и критичног притиска, p_c . На вредностима температуре и притиска изнад критичних вредности флуиди прелазе у наткритично стање (Слика 1). Након достизања критичне тачке, немогуће је даљим повећањем температуре изазвати испаравање, као што је и даљим повећањем притиска немогуће изазвати кондензацију датог флуида. Флуид који се налази у наткритичном стању постоји у једној, тзв. наткритичној фази, а само наткритично стање се описује као стање "између" гасовитог и течног.



Слика 1. Фазни дијаграм угљеник(IV)-оксида

Први помен наткритичних флуида датира с краја XIX века када су Napau и Hogarth на конференцији Лондонског краљевског друштва презентовали

результате испитивања растварања или таложења појединих неорганских соли у етанолу, на температури изнад критичне за етанол ($T_c = 234^\circ\text{C}$) (Mc Hugh и Krukoniš, 1994). Током наредног века појава повећане растворљивости супстанци у наткритичним флуидима била је предмет многих проучавања, да би наткритични флуиди своју пуну примену достигли током последње три деценије.

Међу флуидима у наткритичном стању највише су у употреби: угљеник(IV)-оксид, етан, етилен, пропан, пропилен, вода, бензен, толуен, амонијак, *n*-хексан, метанол итд (Mc Hugh и Krukoniš, 1994; Pereda и сар., 2008). У Табели 1 дате су вредности критичних параметара за одабране супстанце које се користе у наткритичном стању.

Табела 1. Вредности критичних параметара супстанци најчешће употребљаваних у наткритичном стању (Pereda и сар., 2008)

Флуид	Критична температура (T_c , К)	Критичан притисак (p_c , МПа)	Критична запремина (V_c , cm^3/mol)
CO ₂	304,12	7,39	94,07
етан	305,3	4,87	145,5
пропан	369,8	4,25	200,0
вода	647,1	22,06	55,95
амонијак	405,4	11,35	72,47
<i>n</i> -хексан	507,5	3,02	368,0
метанол	512,6	8,09	118,0

Захваљујући ниским вредностима критичних температуре и притиска, угљеник(IV)-оксид ($T_c = 31,06^\circ\text{C}$, $p_c = 7,386$ МПа) је један од најчешће примењиваних флуида. НкСО₂ је нетоксичан, незапаљив, хемијски инертан и јефтин (Reverchon и De Marco, 2006). Иако се налази у изобиљу у атмосфери и као такав је доступан, угљеник(IV)-оксид се јавља и као нуспроизвод у процесима добијања амонијака, водоника, етанола итд. Ниске вредности критичне температуре и критичног притиска омогућавају да се лако преводи у наткритично стање, док се из система уклања једноставно, декомпресијом до атмосферског притиска. Најзад, употреба нкСО₂ не мора имати допринос ефекту стаклене баште, јер се током процеса може рецикловати (Brunner, 2005).

Вредности физичких параметара наткритичних флуида налазе се између вредности истих параметара за гасове и течности (Табела 2). Наткритични флуиди

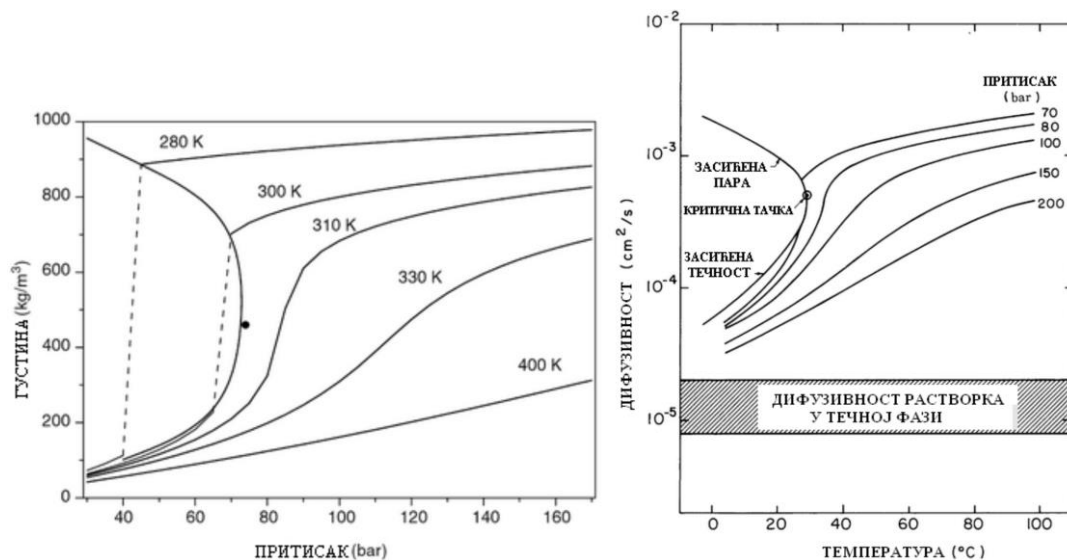
поседују специфичне вредности транспортних величина – ниже вредности коефицијената вискозности, блиске вредностима вискозности гасова, и око два реда величине више вредности коефицијената дифузије у поређењу са одговарајућим величинама за класичне, течне раствараче. Вредности густине наткритичних флуида блиске су вредностима густине течности (Brunner, 2005). Вредности топлотне проводљивости наткритичних флуида су релативно високе, с обзиром на то да вредности топлотних капацитета флуида теже бесконачности у близини критичне тачке (Pereda и сар., 2008). Такође, у близини критичне тачке, површински напон флуида у наткритичном стању тежи нули.

Табела 2. Упоредни приказ вредности физичких параметара гасова, наткритичних флуида и течности (Pereda и сар., 2008)

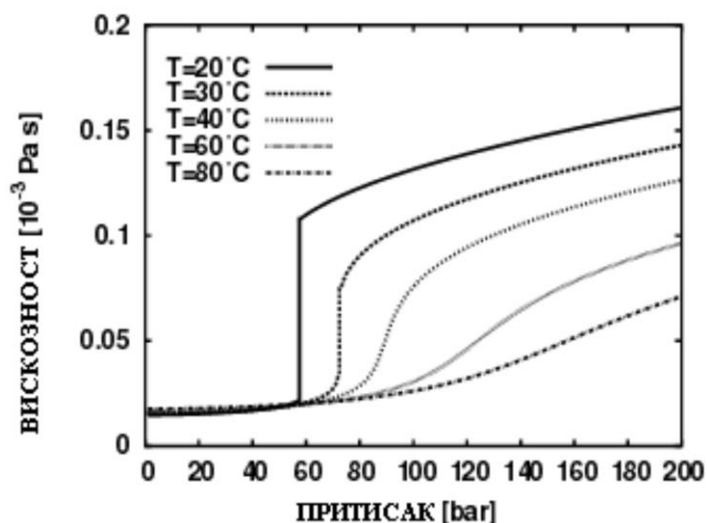
Параметар	Гас (собна температура)	Наткритични флуид (T_c, p_c)	Течност (собна температура)
Густина (ρ , kg/m ³)	0,6-2	200-500	600-1600
Динамичка вискозност (μ , mPas)	0,01-0,3	0,01-0,03	0,2-3
Кинематска вискозност (η , 10 ⁶ m ² /s)	5-500	0,1-0,2	0,1-5
Топлотна проводљивост (λ , W/mK)	0,01-0,025	максимална ^a	0,1-0,2
Коефицијент дифузије (D , 10 ⁶ m ² /s)	10-40	0,07	0,0002-0,002
Површински напон (σ , dyn/cm ²)	-	-	20-40

^aТоплотна проводљивост представља максималну вредност у близини критичне области, зависну од температуре

На Сликама 2 и 3 приказане су промене вредности густине, дифузивности и вискозности CO₂.



Слика 2. Промена густине (Askin и сар., 2009) и дифузивности (Mc Hugh и Krukonis, 1994) CO_2 са притиском и температуром



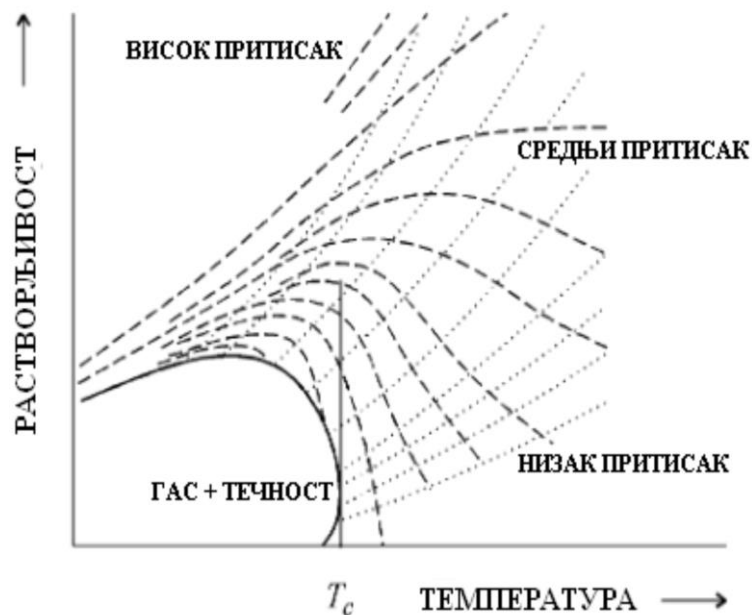
Слика 3. Промена вискозности CO_2 са притиском и температуром (Bielinski, 2007)

Посматрајући Сликe 2 и 3 уочава се да се са малим променама притиска и температуре густина наткритичних флуида значајно мења. Комбинација овог својства са високим вредностима дифузивности и ниским вредностима вискозности и површинског напона, омогућава наткритичним флуидима лако продирање кроз порозне чврсте материјале и широку примену у процесима као што су екстракција и импрегнација, о чему ће више бити речи у наредним поглављима.

Флуиди у наткритичном стању се, захваљујући поменутиим својствима, сматрају и изузетним растварачима. Могућност финог подешавања густине малим

променама притиска и температуре, у наткритичној области, обезбеђује и могућност финог подешавања моћи растварања наткритичних флуида (Adschiri, 2002). Моћ растварања наткритичних флуида је знатно већа у односу на растворну моћ обичних гасова и блиска је вредностима за течности.

На Слици 4 приказана је зависност растворљивости слабо испарљивих супстанци од притиска и температуре у супкритичним ($T < T_c$) или наткритичним флуидима ($T > T_c$). Примећује се да на ниским притисцима растворљивост слабо испарљивих супстанци у наткритичним флуидима опада са повећањем температуре зато што се густина наткритичних флуида значајно смањује са порастом температуре на притисцима блиским критичним вредностима. Са друге стране, на високим притисцима повећање напона паре раствора са температуром постаје доминантан фактор који утиче на повећање растворљивости у наткритичном флуиду (Brunner, 2005).



Слика 4. Промена растворљивости слабо испарљивих супстанци у супкритичним и наткритичним флуидима у зависности од температуре, притиска (испрекидане линије) и густине наткритичног флуида (тачкасте линије) (Brunner, 2005)

HкCO_2 је погодан растварач за липофилне и неполарне компоненте (Reverchon и De Marco, 2006). У ширем смислу, његова моћ растварања почива на 5 генералних правила:

- погодан је растварач за неполарна и слабо поларна једињења;

- његова моћ растварања за једињења мале молекулске масе је велика и смањује се са порастом молекулске масе;
- поседује висок афинитет према оксигенованим органским једињењима средње молекулске масе;
- не раствара протеине, полисахариде, шећере и минералне соли;
- способан је за сепарацију слабо испарљивих, тежих и/или једињења веће поларности на високим притисцима (Brunner, 2005).

Наткритични флуиди данас имају примену у многим процесима, како у лабораторијским, тако и у индустријским. Употреба наткритичних флуида као растварача у процесима наткритичне екстракције за потребе фармацеутске, козметичке и прехранбене индустрије, као и у процесима импрегнације дрвета и бојења текстила, сматра се главним пољем њихове примене. Међутим, распрострањена је употреба наткритичних флуида и у процесима као што су: синтеза микро- и наночестица, наткритична хроматографија, хемијске реакције у наткритичним медијумима, импрегнација различитих носача активним компонентама за синтезу формулација за контролисано отпуштање, модификација полимера и хемијско чишћење (da Silva и сар., 2010).

2.1.2. Наткритична екстракција

Наткритична екстракција (НКЕ) представља операцију преноса масе засновану на чињеници да поједини флуиди приликом преласка у наткритичну област постају моћни растварачи/екстрагенци за разна једињења. На овај начин могуће је ефикасно изоловати супстанце средњих моларних маса и релативно ниске поларности (Skala и сар., 2002).

Процес наткритичне екстракције састоји се из два корака: екстракција компонената растворљивих у наткритичном флуиду и сепарација изолованог раствора од растварача (Martinez и Vance, 2008).

НКЕ из биљних материјала је последњих деценија веома популаран процес захваљујући предностима у односу на традиционалне поступке изолације (хидродестилација, дестилација воденом паром, екстракција помоћу органских

растварача итд.). Важну карактеристику овог процеса представља флексибилност која се постиже захваљујући могућности модификације моћи растварања и/или селективности наткритичног флуида променама густине, изазваних променама притиска и температуре (Reverchon и De Marco, 2006).

Као што је већ поменуто, захваљујући многим погодним својствима, као екстрагенс у процесима наткритичне екстракције највише је у употреби угљеник(IV)-оксид. У току екстракције, флуид у екстрактору са паковањем биљног материјала се прво доведе на жељене услове притиска и температуре (наткритично стање), а затим се креће са континуалним процесом у којем hкCO_2 протиче кроз слој честица уситњеног биљног материјала и раствара екстракцибилне материје из чврсте фазе. Сепарација раствора од CO_2 постиже се у сепаратору који се налази иза екстрактора, редукацијом притиска, при чему се драстично смањује моћ растварања CO_2 . Гасовити CO_2 напушта растворак који се таложи у сепаратору, док се чист гасовити CO_2 може поново употребити или пустити у атмосферу (код малих лабораторијских јединица). На овај начин добија се екстракт потпуно ослобођен растварача. Значајну предност оваквог процеса у односу на друге поступке изолације представља одсуство употребе токсичних органских растварача, тако да није потребно додатно пречишћавање екстраката од остатака растварача, као што је то случај у процесима екстракције класичним органским растварачима.

Услови који се најчешће примењују у процесима екстракције помоћу hкCO_2 су умерене вредности температуре (40-50°C) и притисци у опсегу 9-30 МПа. Умерене вредности температуре погодују екстракцији термички нестабилних једињења, као што су терпени. Умерене вредности притиска се препоручују на основу општег правила: са повећањем притиска повећава се моћ растварања наткритичног флуида, док се његова селективност смањује (Fornari и сар., 2012). Увођење виших притисака (до 60 МПа) и температура (до 120°C) значајно мења селективност hкCO_2 и води ка екстракцији тежих компонената (Marostica Junior и сар., 2010). Вредности густине hкCO_2 варирају између 0,15 и 1 g/cm^3 и зависе од притиска и температуре (Reverchon и De Marco, 2006). С обзиром на то да је hкCO_2 погодан за растварање неполарних и слабо поларних једињења, за екстракцију једињења високе поларности, као што су флавоноиди,

потребно је модификовати његову моћ растварања и поларност додатком одређене количине косолвента (Marostica Junior и сар., 2010; Pereira и Meireles, 2010). Као косолвенти у процесу наткритичне екстракције најчешће су у употреби органски растварачи – етанол, метанол итд.

Употреба секундарних метаболита једне биљне врсте као косолвента за НКЕ из друге биљне врсте до сада није забележена у литератури. Етарско уље жалфије, истог географског порекла као смиље, одабрано је као косолвент за НКЕ из смиља у овој дисертацији у циљу испитивања његовог утицаја на растварачку моћ и селективност нкСО₂ и покушаја да се поспеши издвајање компонената из смиља које су заједничке за обе биљне врсте, попут монотерпена, али су у смиљу заступљене у мањој мери или их је немогуће изоловати помоћу чистог нкСО₂ (Ivanovic и сар., 2011; Micic и сар., 2009; Marongiu и сар., 2003; Costa и сар., 2015; Jerkovic и сар., 2016).

Поред температуре и притиска, остале битне параметре у процесу НКЕ представљају: проток нкСО₂, величина честица биљног материјала и време трајања процеса. Правилан избор параметара зависи од механизма који контролише брзину процеса. Проток нкСО₂ је значајан у случају да спољашњи пренос масе или фазна равнотежа диктирају кинетику процеса. Са друге стране, величина честица има најважнију улогу када је унутрашњи пренос масе најспорији ступањ процеса. У општем случају, мање честице обезбеђују краћи пут којим растворак треба да дође до масе наткритичног флуида. Међутим, превише мале честице могу изазвати појаву каналисања тока флуида у екстрактору, при чему део флуида остаје ван контакта са раствором чиме се смањује ефикасност процеса. Такође, претераним уситњавањем честица може доћи до губитка лако испарљивих компонената у процесу предтретмана биљне сировине. Стога, у пракси се обично користе честице димензија 0,25-2 mm. Време трајања екстракције је потребно прилагодити постизању максималног приноса (Reverchon и De Marco, 2006).

Екстракција помоћу нкСО₂ данас има бројне примене, од којих су најважније добијање екстраката хмеља за пиварску индустрију, биоактивних екстраката и компонената за фармацеутску примену (ксантахумол, артемизинин, сквален), етарских уља, зачина (зачинско биље, воће, ванила), олеорезина

(паприка, црни бибер, орашчић), биљних уља и масти (уље соје, шљиве, кајсије, репице), природних боја (каротен, хлорофил), природних пестицида, кофеина (кафа, чај, какао), холестерола (жуманца јаја и животињска ткива), никотина (дуван), екстраката за парфеме (јоргован, лимунова кора), ланолина (вуна). Овај процес је погодан и за фракционисање глицерида (рибље уље, бутерна маст, слабо испарљива уља), екстракцију остатака растварача из производа добијених конвенционалном екстракцијом (хексан, етанол), екстракцију нежељених компонената из фракција нафте итд. (Skala и сар., 2002; Mukhopadhyay и сар., 2000).

Детаљан преглед литературних података о екстракцији из смиља помоћу hкCO_2 дат је у поглављу 2.2.2.3.

2.1.3. Наткритична импрегнација

У најширем смислу, импрегнација се дефинише као натапање или испуњавање одређеног материјала другим у циљу заштите носећег материјала од разних спољашњих штетних утицаја, контролисаног отпуштања активне супстанце у медицинске, фармацеутске, козметичке сврхе, синтезе катализатора за многе хемијске реакције, нарочито у петрохемији, итд. Детаљнија дефиниција каже да импрегнирати значи довести у контакт материјал (супстрат), било да се он налази у финалној физичкој форми или у виду интермедијера, са функционалном (активном) супстанцом (импрегнантом), која се може увести из гасовите, течне или чврсте фазе. Импрегнанти могу бити хомогено или неуниформно распоређени унутар материјала, зависно од њихових особина и функција (Weidner, 2012). Такође, импрегнанти се могу уводити у материјал у чистом стању или у виду раствора или дисперзија. У финалном производу, импрегнанти могу бити везани како физичким, тако и хемијским везама. У пракси су познати примери импрегнације материјала као што су кожа, полимери, дрво, текстил и сл. многим активним супстанцама, међу којима предњаче фармацеутски активне супстанце, биоциди, боје, мономери за полимеризације итд (Weidner, 2012).

Импрегнација различитих материјала активним супстанцама се традиционално одвијала применом течних растварача, преко којих се растворена

активна супстанца транспортује у супстрат. При томе је за транспорт раствора активне супстанце у супстрат неопходан висок притисак или вакуум или комбинација два поменута фактора.

Међутим, импрегнација различитих материјала активним супстанцама помоћу течних растварача у комбинацији са притиском, поседује одређене недостатке. Многе врсте материјала ниске пермеабилности су отпорне на протоке течних растварача, због површинског напона течности, што прилично отежава процес импрегнације. Самим тим, број врста таквих материјала, који могу бити импрегнирани употребом течних растварача је ограничен. Такође, након импрегнације течним раствором, импрегниран материјал је неопходно осушити. С обзиром на то да импрегнација течним растворима активне супстанце укључује употребу великих количина органских растварача или генерисање великих количина отпадне воде, проблеми који се јављају код конвенцијалних начина импрегнације су и у великој изложености радника и животне средине штетним супстанцама. Главни технички проблеми се односе на слабу пенетрацију и неуниформну расподелу активних супстанци у појединим врстама супстрата, као и на некомпатибилност активних супстанци са материјалом (Weidner, 2012).

Употреба наткритичних флуида, превасходно ncCO_2 , у процесима импрегнације, захваљујући њиховим повољним карактеристикама тј. великој густини, ниским вредностима вискозности и површинског напона, као и високој дифузивности, што је пресудно за ефикасније продирање у унутрашњост супстрата у односу на течне раствараче, представља потенцијално решење за поменуте проблеме.

Потреба за развојем нових процеса импрегнације јавила се услед бројних недостатака класичних процеса, од којих су најупечатљивији следећи (Weidner, 2012):

- ниске вредности коефицијената дифузије;
- потреба за високим температурама;
- ограничена дубина продирања импреганта;
- дуго време контакта супстрата и импреганта;
- мали просторни принос (потребно је пуно простора за импрегнацију малих количина супстрата)

- употреба токсичних растварача;
- потреба за додатним сушењем импрегнираног материјала;
- генерисање чврстог отпада проузроковано предозирањем импрегнанта;
- висока потрошња растварача.

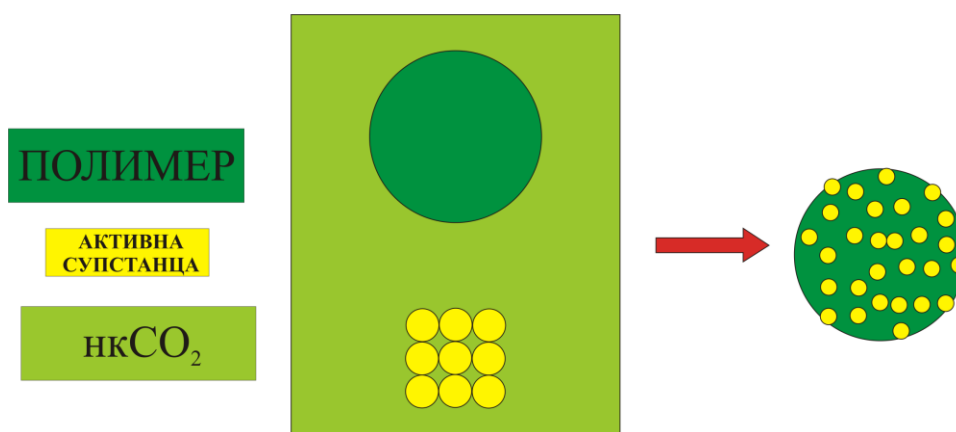
Употреба наткритичних флуида као растварача у процесима импрегнације може бити ефикасно решење за поменуте проблеме. Захваљујући наведеним својствима hкCO_2 , импрегнација у наткритичним условима поседује следеће карактеристике (Weidner, 2012):

- процес се изводи на ниским температурама;
- импрегнант може бити распоређен кроз целу запремину супстрата;
- време контакта је знатно краће;
- употреба токсичних растварача је избегнута;
- непотребно је додатно сушење импрегнираног материјала;
- избегнуто је загађење животне средине услед предозирања импрегнанта и генерисања отпадних токова;
- енергетски захтеви процеса су доста нижи.

Процесима наткритичне импрегнације (НКИ) су у пракси подложни многи материјали. Употребом hкCO_2 могуће је успешно импрегнирати разне врсте дрвета биоцидима ради заштите производа од дрвета, многе фармацеутски, медицински или козметички активне супстанце је могуће наносити на различите носаче, међу којима предњаче полимери, како природни тако и синтетски. Материјали, као што су кожа, текстил, полимери и др. могу се успешно бојити процесом НКИ. Такође, у многе прехранбене производе је могуће увести супстанце чије дејство изазива продужетак рока трајања. Процесом НКИ се успешно производе катализатори, наношењем активних састојака на носаче, међу којима предњаче силика гелови, зеолити, молекулска сита и неки полимери (da Silva и сар., 2010; Weidner, 2012). НКИ је изводљива уколико је активна супстанца растворљива у hкCO_2 (Слика 5).

Примена hкCO_2 у процесирању полимера наишла је на велико интересовање научника током последње три деценије. Објављени научни радови су показали да сорпција hкCO_2 код великог броја полимера резултује њиховим бубрењем и, сходно томе, променом његових механичких и физичких својстава.

Један од најважнијих ефеката hкCO_2 на полимер је његова пластификација тј. смањење температуре остакљивања до којег долази код великог броја аморфних и семи-кристалиничних полимера када су изложени дејству hкCO_2 . Овај ефекат се користи за смањење вискозности полимера током процеса екструзије, производњу полимерних бленди и модификацију морфологије полимера у жељеном смеру. До пластификације полимера у присуству hкCO_2 долази услед смањења интеракција између полимерних ланаца и повећања њихове покретљивости изазваних сорпцијом CO_2 у наткритичним условима. (Verreck et al., 2007). hкCO_2 је у стању да изазове повратно бубрење стакластих и гумастих полимера и смањење вискозности полимерних растопа за читав ред величине (Kikic и Vecchione, 2003).



Слика 5. Графички приказ НКИ полимера активним супстанцама

Импрегнација у наткритичним условима се може класификовати на основу два критеријума (Kikic и Vecchione, 2003; Kazarian, 2000):

- афинитет импрегнанта према супстрату
- модификација импрегнанта у полимерној структури.

Имајући у виду први од два наведена критеријума, могу се разликовати два механизма импрегнације. Први подразумева расподелу активне супстанце са малим афинитетом према полимеру, у полимерној структури услед декомпресије. Односно, чак и ако импрегнант има мали афинитет према супстрату (полимеру), може остати заробљен унутар полимерне структуре након декомпресије. Други механизам подразумева висок партициони коефицијент импрегнанта (активне супстанце) између полимера и флуидне фазе, који је последица високог афинитета активне супстанце према полимеру. Поједини импрегнанти могу успостављати

међумолекулске силе, попут van der Waals-ових, или хемијске везе, као што је водонична, са функционалним групама полимера.

Посматрајући други критеријум, могуће је разликовати:

- импрегнанте који нису модификовани у полимерној структури – лекови и боје (како за текстил тако и за полимере);
- импрегнанте који подлежу модификацији током процеса импрегнације – органометални комплекси импрегнирани на полимерима (90% случајева) и мономери са иницијаторима (за формирање полимерних бленди).

Параметри који утичу на принос импрегнације у наткритичним условима су: притисак, температура, време контакта између импрегнанта, раствореног у hкСО_2 , и супстрата, начин импрегнације (шаржни, континуални), проток hкСО_2 код континуалног процеса, концентрација импрегнанта (активне супстанце) у наткритичној фази и афинитет импрегнанта према супстрату. Сви наведени параметри могу да утичу на вредност приноса импрегнације (пуњења активне супстанце) у наткритичним условима, за разлику од импрегнације применом течних растварача где значајан утицај имају само концентрација активне супстанце и температура (Belhadj-Ahmed и сар., 2009).

Када је у питању импрегнација чврстих носача биљним изолатима у наткритичним условима, постоји одређен број литературних података и они су приказани у Табели 3. Акцент је на приказу експерименталних услова (притисак, температура и време), вредности приноса импрегнације и могућности примене добијених материјала. Као чврсти носачи доминирају природни и синтетички, биоразградиви и/или биокомпатибилни полимери у различитим формама (микрочестице, ксеро- и аерогелови, филмови, пене, текстилни материјали итд.). Изузетак представља рад Gruner-Richter-а и сар. (2012) у коме је испитивана импрегнација плодова коштуњавог воћа (бадем, лешник, кикирики, орах и аустралијски орах) екстрактом рузмарина.

Табела 3. Приказ литературних података о наткритичној импрегнацији чврстих носача биљним изолатима

Носач	Активна супстанца	Притисак (МПа)	Температура (°C)	Време (h)	Принос (%)	Примена	Извор
Нуалофилл® (текстил) N-карбоксибутил хитозан (пена)	екстракт јуке (<i>Libidibia ferrea</i>)	27	50	15	25-28 46-48	третман рана	Dias и сар. (2013)
Промогран® (пена) скроб (микрочестице)	етарско уље лаванде (<i>Lavandula hybrida</i>)	10-12	40-50	2	28-31 2,5-14,7	лечење стоке	Varona и сар. (2011)
скроб (гел-прах)	уље лана (<i>Linum usitatissimum</i>)	15-30	40-80	8	0,51-6,60	заштита хране од ужеглости	Comin и сар. (2012a)
скроб (микрочестице)	етарско уље оригана (<i>Origanum vulgare</i>)	8-15	40-50	3-24	0,16-17	антиоксидантно и антиупално дејство	Almeida и сар. (2013)
β-глюкан (аерогел)	уље лана (<i>Linum usitatissimum</i>)	15-30	40-60	2-8	65,39	заштита хране од ужеглости	Comin и сар. (2012b)
коштуњаво воће (плодови)	екстракт рузмарина (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	28-32	50-60	0.5-2	-	спречавање окидације у унутрашњости плода	Gruner-Richter и сар. (2012)
поли(уретан) (пена)	уље борача (<i>Borago officinalis</i>)	9-30	35-55	3	3-11,8	третман рана	Da Silva и сар. (2016)

Табела 3. Наставак

Носач	Активна супстанца	Притисак (МРа)	Температура (°С)	Време (h)	Принос (%)	Примена	Извор
силика (аерогел) алгинат (аерогел)	екстракт малезијске змијске траве (<i>Clinacanthus nutans</i>)	15	40	24	22,1 30,1	системи за контролисано отпуштање	Mustara и сар. (2016)
поли(млечна-ко-гликолна киселина) (микрочестице)	уље маракује (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>)	9-11	35-45	0,33	67,8-91	системи за контролисано отпуштање	Oliveira и сар. (2017)
Spongostan® (пена) Promogran® (пена)	уље копаибе (<i>Copaifera</i> ssp.)	13,2-31,7	45	3	0,54-2,07 0,53-1,46	третман лишманијазе	Pascoal и сар. (2017)
поли(L-лактид) (филмови)	етарско уље јапанске хибе (<i>Thujopsis dolabrata</i>)	10-20	40-100	1-5	4,0-14,2	системи за контролисано отпуштање	Tsutsumi и сар. (2014)
поли(L-лактид-ко-ε-капролактон) (филмови)					5,9-40,2		
поли(L-лактид-ко-тетраметилен карбонат) (филмови)					5,4-37,7		
поли(L-лактид-ко-1,5-диоксепан-2-он) (филмови)					4,0-43,0		

Међу природним полимерима, коришћеним за НКИ биљним изолатима, највише су у употреби полисахариди, међу којима предњачи скроб. Скроб је у различитим формама у литератури коришћен за НКИ не само биљним изолатима, већ и појединачним активним супстанцама. Детаљан приказ литературних података о употреби скроба као носача за импрегнацију активним супстанцама у наткритичним условима дат је у поглављу 2.3.2.

Биљни изолати, који су као активне супстанце инкорпорисани у носаче процесом НКИ су етарска и масна уља и екстракти добијени поступком екстракције органским растварачима (Gruner-Richter и сар., 2012; Mustapa и сар., 2016) као и екстракти добијени помоћу nkCO_2 (Dias и сар., 2013; Gruner-Richter и сар., 2012; Oliveira и сар., 2017; Ivanovic и сар., 2014; Zizovic и сар., 2014; Fanovich и сар., 2013, 2016). Mustapa и сар. (2016) су користили и 10%-ни етанол као косолвент са циљем да повећају растворљивост импреганта у nkCO_2 .

Као што се може видети у Табели 3, приказани резултати обухватају вредности притиска у опсегу од 8-31,7 МПа и температуре у опсегу од 35-100°C. У већини научних радова мењане су вредности притиска и температуре, као и протока nkCO_2 /времена контакта, у циљу налажења оптималних услова за постизање највећег приноса импрегнације, тј. највећег масеног процента импрегниране активне супстанце. Као главни циљеви импрегнације материјала у студијама наведеним у Табели 3 истичу се добијање формулација у којима би до изражаја дошло антиупално (топикална примена) или антиоксидантно дејство биљног изолата, као и добијање система за контролисано отпуштање активне супстанце. Dias и сар. (2013) су у свом раду показали да *N*-карбоксивбутил хитозан поседује значајан потенцијал за импрегнацију екстрактом јуке у циљу добијања материјала за третман рана. Слично, склоност ка успешном синтетисању материјала за третман лишманијазе, путем НКИ уљем копаибе, показали су пенасти полимери комерцијалних назива Spongostan® (полимер на бази желатина) и Promogran® (полимер на бази колагена), у раду Pascoal-а и сар. (2017). Поменути аутори су показали да је у оба носача могуће успешно инкорпорисати β -кариофилен, као носиоца антиупалног дејства уља копаибе, помоћу nkCO_2 .

Заједнички за све примере НКИ наведене у Табели 3, је шаржни (дисконтинуални) режим рада. Суштина извођења процеса НКИ у наведеним

примерима своди се на првобитно довођење носача, заједно са активном супстанцом, у контакт са nkCO_2 , у одговарајућем суду током одређеног времена и без протицања наткритичног флуида, након чега се CO_2 уклања из система декомпресијом.

2.1.4. Интегрисани процес наткритичне екстракције и наткритичне импрегнације

Интегрисани процес наткритичне екстракције и наткритичне импрегнације (НКЕ-НКИ) недавно је развијен од стране Fanovich и сар. (2013). Процес је базиран на тежњи да се утросци времена и енергије, као и губици екстракта таложењем у цевима и судовима услед декомпресије након НКЕ као одвојеног процеса сведу на минимум. Интегрисањем процеса НКЕ и НКИ омогућава се директна употреба раствора екстракта у nkCO_2 који напушта екстрактор за импрегнацију изабраног носача. Такође, избегавањем декомпресије као међукорака постиже се уштеда наткритичног растварача.

Интегрисани процес НКЕ-НКИ садржи следеће процесе:

- екстракцију активних компонената из биљног материјала која се одвија у екстрактору;
- импрегнацију супстрата импрегнантом која се одвија у адсорпционој колони;
- финалну формулацију импрегнираног материјала у циљу постизања жељених својстава (Ivanovic и сар., 2014).

Од суштинског значаја за овај процес је усклађивање оперативних услова екстракције и импрегнације како би се постигле жељене вредности приноса импрегнације, равномерна расподела растворка у структури носача, као и хомогена морфологија импрегнираног материјала.

Први корак у пројектовању интегрисаног НКЕ-НКИ процеса представља дефинисање оперативних услова за постизање максималног приноса екстракције и капацитета импрегнације за дати систем активна супстанца/носач. За оптималне параметре НКЕ се могу сматрати вредности притиска и температуре при којима се постиже максимални принос, уз истовремено добијање екстракта одговарајућег

састава и минималну потрошњу наткритичног флуида. Такође, неопходно је испитати растворљивост активних компонената од интереса у нкСО₂.

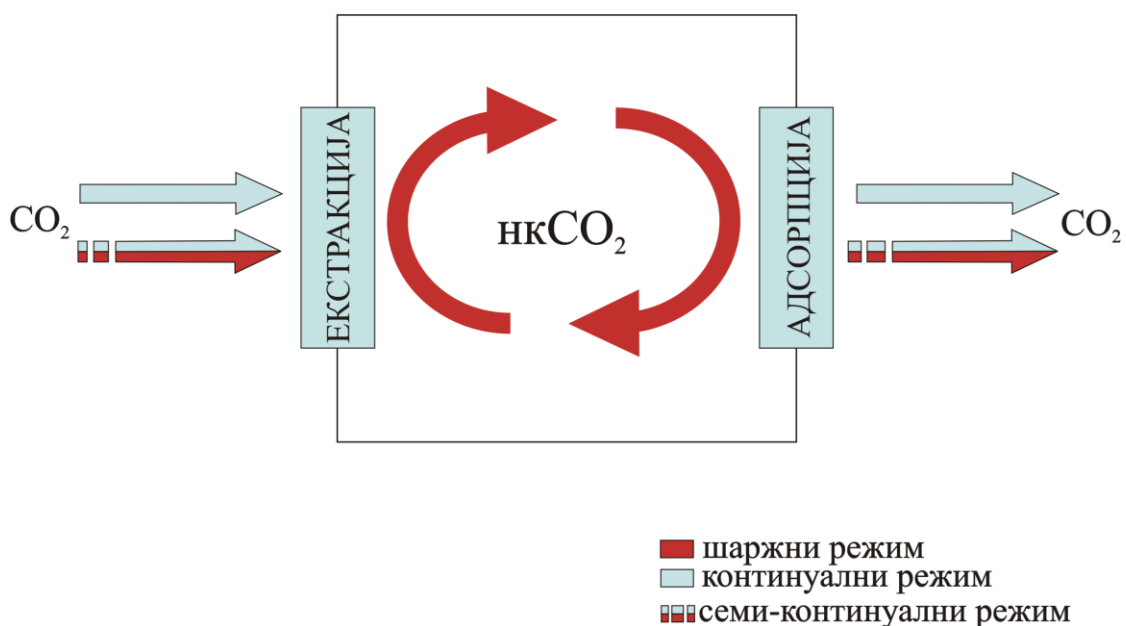
Са друге стране, почетни корак у пројектовању процеса НКИ представљају испитивања физико-хемијских карактеристика и понашања носача у присуству нкСО₂, тј. под високим притиском. Поменути испитивања подразумевају следеће:

- визуелно праћење уз квантификацију бубрења материјала;
- мерење сорпције нкСО₂ у супстрату;
- одређивање температуре остакљивања и температуре топљења полимерних носача (диференцијална скенирајућа калориметрија, DSC), идентификација функционалних група (инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом, FTIR);
- дефинисање смањења температуре остакљивања и температуре топљења полимерних носача у присуству нкСО₂ (испитивање ефекта пластификације);
- испитивање утицаја брзине декомпресије на структуру носача (Ivanović и сар., 2014).

Поред наведених параметара, проток нкСО₂, време контакта и геометрија паковања носача могу значајно утицати на ефикасност процеса НКИ. Слаб пренос масе током растварања активне супстанце у нкСО₂ и током импрегнације носача, условљен кратким временом контакта, може довести до недовољно ефикасне импрегнације. Начин паковања носача за импрегнацију мора бити у складу са његовом геометријом, у циљу избегавања каналисаног струјања наткритичног флуида и у њему раствореног импрегнанта, а самим тим и смањења ефикасности импрегнације.

Након дефинисања оптималних услова појединачних процеса НКЕ и НКИ, потребно је дате параметре ускладити у оквиру интегрисаног процеса. Од суштинског је значаја за процес ускладити односе маса утрошеног нкСО₂ и биљног материјала са односом маса биљног материјала и носача и дефинисати оптимални начин протицања и време трајања процеса у циљу постизања максималних приноса екстракције и импрегнације, равномерне расподеле екстракта/активних компонената у структури носача и спречавања десорпције везаног екстракта из носача.

Интегрисани НКЕ-НКИ процес може да се изводи у шаржном, континуалном и семи-континуалном режиму (Слика 6). У првом случају, уведени нкСО₂ циркулише током одређеног времена кроз систем пролазећи кроз екстрактор и адсорпциону колону. На крају експеримента врши се декомпресија. Континуални режим рада подразумева непрекидно увођење свежег нкСО₂ у систем, пролазак кроз екстрактор и адсорпциону колону, а затим напуштање система. Семи-континуални режим рада састоји се из више шаржних циклуса. Након сваког шаржног циклуса систем се делимично или потпуно декомпримује након чега се у систем уводи одговарајућа количина свежег СО₂ за нови шаржни поступак.



Слика 6. Упрошћени приказ режима рада интегрисаног НКЕ-НКИ процеса

Избор режима рада, односно начина протицања, зависи од разлике у брзинама појединачних процеса НКЕ и НКИ. Екстракција из биљног материјала је обично доста бржи процес у односу на адсорпцију активне супстанце на носач током процеса импрегнације. С тим у вези, потребно је извршити избор адекватног режима рада (шаржни, континуални, семи-континуални или њихова комбинација) са циљем да се време трајања интегрисаног процеса сведе на минимум (Ivanović и сар., 2014).

У Табели 4 приказани су литературни подаци о употреби овог процеса за импрегнацију различитих чврстих носача биљним екстрактима.

Интергисани НКЕ-НКИ процес су у свом раду употребили Fanovich и сар. (2013) за импрегнацију поли(ϵ -капролактона) екстрактом шумског лишљаја (*U. barbata*). У екстрактору се одвијала НКЕ из лишљаја на притиску од 30 МПа и температури од 40°C. У адсорпционој колони су импрегниране грануле полимера на притисцима у опсегу 15-17 МПа и температури од 35°C. Између екстрактора и адсорпционе колоне постављена је комора са прозором, у којој су праћене промене растворљивости екстракта у нкСО₂. Након континуалне НКИ, систем је подврднут шаржном режиму са кружењем наткритичног раствора кроз оба суда на 17 МПа и температури од 35°C. Испитани су утицаји различитих времена континуалног режима, као и различитих времена шаржног режима. Највећи принос импрегнације (2,8%) постигнут је при двочасовном континуалном раду и при једночасовном шаржном раду. Импрегнирани материјал је показао значајну антибактеријску активност против соја *Listeria innocua*.

Исти аутори су у свом другом раду интегрисани процес употребили за импрегнацију композита поли(ϵ -капролактона) и хидроксиапатита екстрактом шумског лишљаја (*U. lethariiformis*), у циљу добијања материјала са антибактеријским дејством (Fanovich и сар., 2016). Процес је вршен континуално, са једним пролазом наткритичног раствора кроз екстрактор (30 МПа и 40°C) и адсорпциону колону (17 МПа и 35°C или 30 МПа и 40°C) у трајању од 2 h, док су поједини експерименти садржали и додатни корак који се састојао из једночасовног кружења наткритичног раствора кроз апаратуру. Показано је да је носач који је садржао 20% хидроксиапатита био најподеснији за постизање највећег приноса импрегнације (5,9%) на притиску од 17 МПа и температури од 35°C са једночасовним кружењем наткритичног раствора. Истовремено, импрегнирани узорак добијен у овом процесу је показао највећу активност у сузбијању испитаних сојева бактерије *Staphylococcus aureus*.

Табела 4. Приказ литературних података о наткритичној импрегнацији чврстих носача биљним екстрактима помоћу интегрисаног НКЕ-НКИ процеса

Носач	Активна супстанца	Притисак (МПа)	Температура (°C)	Време (h)	Принос (%)	Примена	Извор
поли(ε-капролактон) (грануле)	екстракт шумског лишaja (<i>Usnea barbata</i>)	15-17	35	1-6	0,7-2,8	антибактеријско дејство	Fanovich и сар. (2013)
поли(ε-капролактон)/ хидроксиапатит (филмови)	екстракт шумског лишaja (<i>U. lethariiformis</i>)	17-30	35-40	2-3	1,7-5,9	антибактеријско дејство	Fanovich и сар. (2016)
памучна газа	екстракт тимијана (<i>Thymus vulgaris</i>)	15	35	5-12	1,08-8,99	третман рана	Ivanovic и сар. (2014)
поли(пропилен)ска тканина				5	4,78		
целулоза ацетат (грануле)					1,44	системи за контролисано отпуштање	
скроб (ксерогел)					-		
хитозан (ксерогел)					0,96		
поли(ε-капролактон) (грануле)					9,04	инжењерство ткива	
скроб (ксерогел)	екстракт	29	50	5	2,58	системи за контролисано отпуштање	Zizovic и сар. (2014)
поли(пропилен)ска тканина	хмеља (<i>Humulus lupulus</i>)			5-8	3,66-4,36		
поли(ε-капролактон) (грануле)		15	35	5	6,04		

Интегрисани процес је примењен и у раду Ivanović и сар. (2014) за импрегнацију више различитих полимерних носача екстрактом тимотијана, у коме као активна супстанца у значајној количини фигурише тимол. Циљ рада је био испитивање изводљивости оваквог поступка, с обзиром на то да у литератури нема података о импрегнацији чврстих носача екстрактом тимотијана. Избор носача за импрегнацију извршен је на основу биолошких активности тимотијана за следеће намене: топијална употреба (третман рана) – памучна газа и поли(пропилен)ска тканина, системи за контролисано отпуштање активне супстанце – ацетат целулозе и гелови скроба и хитозана, инжењерство ткива – поли(ϵ -капролактон). Оптимизација интегрисаног процеса извршена је за шаржни режим рада са циркулацијом наткритичног раствора кроз оба суда у току одређеног времена, као и за семи-континуални режим рада који се састојао из циркулисања наткритичног раствора кроз оба суда у току 1 h, а затим циркулисања у току 1 h само кроз адсорпциону колону у циљу повећања степена импрегнације, при чему се ова процедура понављала у више циклуса увођењем свежег hкСО_2 . Када је као носач употребљена памучна газа, највећи приноси екстракције (1,77%) и импрегнације (7,18%) постигнути су применом шаржног режима рада, при масеним односима hкСО_2 /биљни материјал од 17,6 и биљни материјал/носача од 27 током 5 h. Применом истих експерименталних услова постигнут је значајан принос импрегнације поли(ϵ -капролактона) (9,04%) и поли(пропилен)ске тканине (4,78%), док су приноси импрегнације ацетата целулозе и хитозана износили 1,44% и 0,96% респективно. Различите вредности приноса импрегнације указују на различите интензитете интеракција између раствора, hкСО_2 и носача.

Zizović и сар. (2014) су у свом раду применили интегрисани процес за НКЕ из хмеља и НКИ поли(ϵ -капролактона), поли(пропилен)ске тканине и ксерогелова кукурузног скроба добијеним екстрактом. Примењена су два режима рада – шаржни (циркулација у систему кроз екстрактор и адсорпциону колону и семи-континуалан режим који се састојао из више шаржних, при чему је по завршетку сваког од циклуса вршена декомпресија, мерен принос импрегнације, а затим увођена нова количина свежег hкСО_2 . Највећи принос импрегнације (6,04%) остварен је када је као носач коришћен поли(ϵ -капролактон), при односу маса

нкСО₂ и биљног материјала од 22,5, односу маса биљног материјала и носача од 7,5 и при времену трајања процеса од 5 h, у континуалном режиму рада.

У овој дисертацији први пут је коришћен екстракт смиља као активна супстанца за импрегнацију чврстих носача.

2.2. СМИЉЕ

2.2.1. Таксономски подаци и традиционална употреба

Смиље је вишегодишња зељаста биљка, карактеристична за медитеранско подручје. Расте на сувом, стеновитом или песковитом тлу, на висинама до 2200 m изнад нивоа мора. Одликује се ниским, ароматичним жбуновима са жутиим цветовима (Слика 7). Дршке цветова су у основи дрвенасте и могу достићи висину од 30-70 cm. Смиље потиче из рода *Helichrysum*. Род *Helichrysum* припада фамилији *Asteraceae* и састоји се од око 600 врста. Име је добио од две грчке речи – *helios* (сунце) и *chrysos* (злато) (Viegas и сар., 2014).

У овој дисертацији коришћена је врста смиља *Helichrysum italicum* (пун назив *H. italicum* (Roth) G. Don fil. (syn. *H. angustifolium* subsp. *italicum* (Roth) Briq. & Cavill.)). Ова врста се даље може поделити на 6 подврста, у зависности од дела Медитерана на коме су заступљене: *H. italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum*, карактеристична за уже подручје Медитерана, *H. italicum* subsp. *mycrophyllum* (Wild.) Numan, карактеристична за Балеарска острва (Мајорка и Драгонера), Сардинију, Корзику, Крит и Кипар, *H. italicum* subsp. *picardii* Franco, која је део флоре Француске, Италије, Португала и Шпаније, *H. italicum* subsp. *pseudolitoreum* (Fiori) Vascch, везана за италијанске крајеве Аргентарио, Гаргано и Монте Конеро, *H. italicum* subsp. *serotinum* (Boiss) P. Fourn., смештена на Пиринејском полуострву и *H. italicum* subsp. *siculum* (Jord. & Fourr.) Galbany, карактеристична за Сицилију (Viegas и сар., 2014). У оквиру ових подврста дефинисане су карактеристичне релације између географског порекла и генетичких података (Galbany-Casalas и сар., 2011).



Слика 7. Смиље (*H. italicum*)

Резултати етнофармаколошких студија, спроведених широм Европе, а посебно у Италији, Шпанији и Португалу, током последњих неколико деценија, дефинишу смиље као биљку са израженим благотворним дејствима против одређених поремећаја претежно у дигестивном и респираторном систему, као и општећења на кожи. Традиционална употреба смиља подразумева припрему инфузија и декокта како цветова тако и листова, у третману алергија, прехлада, несанице, поремећаја рада јетре и жучне кесе, упала, инфекција, кожних обољења и при чему су малобројне научне студије у којима је вршена валидација поменутих дејстава. Позната је и употреба смиља у козметичким препаратима и дијететским суплементима, при чему су недоступни подаци о клиничким студијама о њиховој ефикасности. За сада је познато само то да смиље, као део козметичких препарата, показује умирујућа и антимикробна дејства, док у оралним суплементима до изражаја долазе његово умирујуће дејство на кашаљ и склоност ка поспешивању циркулације (Viegas и сар., 2014).

2.2.2. Хемијски састав изолата смиља – литературни преглед поступака изолације активних састојака

Хемијски састав изолата смиља је разноврсан, а међу најзаступљенијим активним компонентама истичу се терпени и фенолна једињења, уз одређене мање заступљене групе једињења. Ова груба подела последица је резултата поступака изолације активних компонента из смиља доступних у литератури. Поступци изолације активних састојака из смиља, који су примењивани у објављеним радовима су: хидродестилација, дестилација воденом паром и екстракција помоћу hCO_2 , као поступци за изолацију претежно терпена и екстракција органским растварачима, као поступак за изолацију претежно фенолних компонента. У даљем тексту ће бити детаљније приказани резултати сваког од поступака изолације активних компонента из смиља, пронађени у литератури, са одговарајућим табеларним приказима.

2.2.2.1. Хидродестилација смиља

Према подацима доступним у литератури, хидродестилација по Clevenger-у представља далеко најпримењиванији поступак изолације активних састојака - етарског уља из смиља. Од подврста смиља, које су биле изложене овом поступку, највише су коришћене *H. italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* и *H. italicum* subsp. *mycrophyllum* (Wild.) Nyman. Време током којег је вршен поступак хидродестилације креће се од 1 h до 5 h, док су вредности приноса релативно ниске и крећу се у опсегу од 0,02-0,78%. Најзаступљеније аналитичке методе које су коришћене за квантификацију и идентификацију компонента етарског уља биле су гасна хроматографија (GC-FID) и гасна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом (GC-MS). Детаљан приказ експерименталних услова и резултата поступака хидродестилације смиља доступних у литератури дат је у Табели 5.

На основу приказаних података о времену и одговарајућим приносима хидродестилације смиља у Табели 5 може се закључити да се највећи део етарског уља смиља издваја након 2-3 h.

Међу најзаступљенијим групама једињења која се налазе у етарском уљу смиља доминирају моно- и сесквитерпени. Од значајних једињења која се могу наћи у етарском уљу смиља треба поменути и β -дикетоне, који се још називају и италодионима. Поједини аутори су показали да хемијски састав етарског уља смиља зависи од услова гајења, географског порекла биљке, типа земљишта на којој се биљка налази, као и времена брања. Leopardi и сар. (2013) су у свом раду, испитујући састав етарских уља узорака смиља, прикупљених са 7 различитих локација на острву Елба у току три различита временска периода (јануар, мај и октобар 2010.), указали на разлике у саставу етарских уља као последице различитих подручја и типова земљишта (магматске стене, песковито тло, растресито тло итд.) на којима је вршено брање. Paolini и сар. (2011) су показали да је састав етарског уља смиља, убраног на подручју Тоскане, сличан саставу етарског уља смиља са подручја Корзике, Сардиније и Северне Америке. Satta и сар. (1999) су у свом раду изводили хидродестилацију смиља, пореклом са Сардиније, сакупљеног на различитим надморским висинама. Показано је да етарско уље смиља, убраног на надморској висини од 100-200 m, поседује значајан садржај линалола и γ -куркумена, док етарско уље смиља, убраног на надморској висини од 500-900 m, поседује значајан садржај нерола, нерил ацетата, нерил пропаноата и γ -куркумена. Usai и сар. (2000) су показали да је, у погледу добијања етарског уља смиља са највећим садржајем терпена, месец јул оптималан за бербу. Слично њима, Bianchini и сар. (2001) су показали да етарско уље смиља, убраног током периода цветања (јун-јул), поседује највећу количину нерил ацетата, као значајне активне компоненте. Са друге стране, етарско уље узорака смиља, прикупљених током ране фазе цветања, је богато β -дикетонима. Charles и Simon (1991) су, проучавајући хемијски састав етарског уља смиља, установили да је 16 компонената заслужно за мирис смиља, који подсећа на кари. Међу тим компонентама доминантну улогу имају нерил ацетат, α -пинен, α - и β -еудезмол, геранил пропаноат, лимонен и камфен.

Табела 5. Литературни подаци о хидродестилацији смиља

Време (h)	Принос (%)	Број изолованих копонената	Укупан процентуални састав изолованих копонената (%)	Главне компоненте у старском уљу	Аналитичке методе	Извор
2	0,1-0,6	115	96,8-99,9	нерол, нерил ацетат, еудезм-5-ен-11-ол, γ -куркумен, α -пинен, лимонен, 1,8-цинеол, нерил пропаноат	GC-FID, GC-MS	Leonardi и сар. (2013)
-	0,27-0,78	49	83,6-97,7	нерол, β -дикетони, еудезм-5-ен-11-ол, <i>ar</i> - и γ -куркумен, α -пинен, β -селинен, нерил ацетат	GC-FID, GC-MS, ^{13}C NMR	Paolini и сар. (2006)
1,5	0,09-0,21	33	-	линалол, нерол, нерил ацетат, нерил пропаноат, γ -куркумен	GC-MS	Satta и сар. (1999)
-	0,02-0,12	97	47,3-66,7	<i>trans</i> - α -бергамотен, β -акорадиен, нерил ацетат, розифолиол	GC-MS	Zeljko и сар. (2015)
1	0,31-0,45	34	-	лимонен, линалол, нерил ацетат, нерил пропаноат, γ - и <i>ar</i> -куркумен, β -еудезмол, еудезм-7-(11)-ен-4-ол	GC-MS	Melito и сар. (2016)
3	0,11	57	89,7	нерил ацетат, δ - и γ -кадинен, розифолиол, нерил пропаноат	GC-FID, GC-MS	Ornano и сар. (2015)
1	0,03-0,18	-	~90	лимонен, линалол, α -терпинен, нерол, нерил ацетат, нерил пропаноат, <i>ar</i> - и γ -куркумен, гвајол, розифолиол	GC-MS	Angioni и сар. (2003)
-	-	35	-	кариофилен, еудезм-5-ен-11-ол, нерил пропаноат, нерол, нерил ацетат, <i>cis</i> - β -гвајен, <i>trans</i> - β -гвајен, α -терпинен, γ -кадинен	GC-MS	Melito и сар. (2013)
1	-	-	-	изоиталицен епоксид, 8-цедрен-13-ол, (<i>Z</i>)- α - <i>trans</i> -бергамотол, β -костол	GC-FID, GC-MS	Mancini и сар. (2011)
3	0,02	44	90,0	нерол, нерил ацетат, еудезм-5-ен-11-ол	GC-FID, GC-MS	Usai и сар. (2010)
4	0,07-0,22	48	83,0-96,5	нерил ацетат, α -пинен, α - и β -еудезмол, геранил	GC-FID, GC-MS	Charles и Simon (1991)
1	0,67	16	90,63	пропионат, лимонен, камфен	GC-FID, GC-MS	
5	0,11-0,42	43	82,9-93,6	нерил ацетат, γ -куркумен	GC-FID, GC-MS	Bianchini и сар. (2001)
4	0,25-0,41	45	84,5-94,2	нерил ацетат, нерол, нерил пропаноат, β -дикетони, α -пинен, α - и β -селинен, γ -куркумен, еудезм-5-ен-11-ол	GC-FID, GC-MS, ^{13}C NMR	Bianchini и сар. (2003)

Табела 5. Наставак

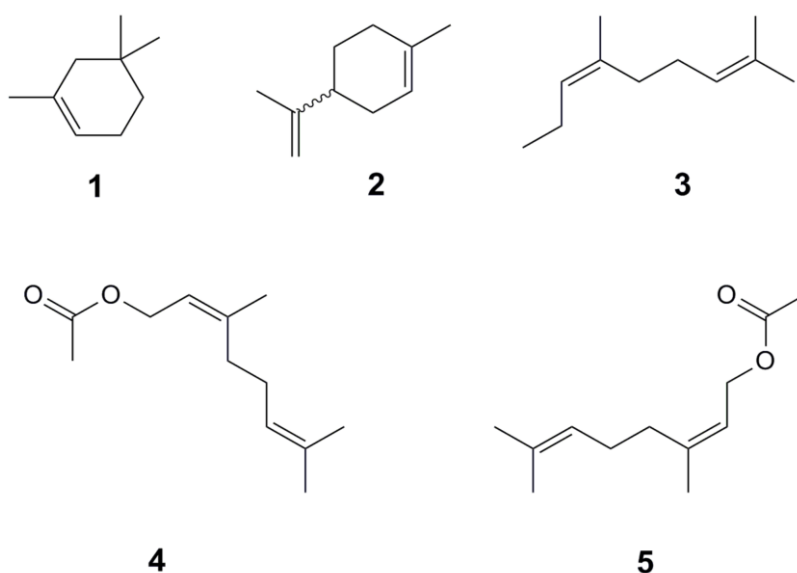
Време (h)	Принос (%)	Број изолованих копонената	Укупан процентуални састав изолованих копонената (%)	Главне компоненте у старском уљу	Аналитичке методе	Извор
5	0,02-0,44	28	67,8-94,9	лимонен, 4,6-диметилоктан-3,5-дион, нерол, нерил ацетат, нерил пропаноат, γ -куркумен, еудезм-5-ен-11-ол	GC-FID, GC-MS, ^{13}C NMR	Bianchini и сар. (2009)
3	0,12	52	90,6	α -пинен, α -цедрен, аромадендрен, β -кариофилен, лимонен, нерил ацетат, геранил ацетат	GC-MS	Mastelic и сар. (2005)
3	0,21	44	98,0	α -пинен, нерил ацетат, 2-метил-циклохексил пентаноат, 1,7-ди-епи- α -цедрен	GC, GC-MS	Mastelic и сар. (2008)
3	0,44	67	99,2	α -пинен, лимонен, нерол, геранил ацетат, α -цедрен, α -куркумен, нерил ацетат	GC-MS	Djihane и сар. (2016)
-	0,25	39	91,1	α -пинен, нерил ацетат, β - и γ -куркумен, (<i>E</i>)-кариофилен	GC-FID, GC-MS	Bezic и сар. (2016)
5	0,46	54	97,1	лимонен, нерол, нерил ацетат, 4,6,9-триметилдец-8-ен-3,5-дион, 2,4,6,9-тетраметилдец-8-ен-3,5-дион, γ -куркумен	GC-FID, GC-MS	Cristofari и сар. (2012)
-	-	18	91,8	нерил ацетат, α -пинен, лимонен, γ -куркумен, нерил пропаноат, нерол	GC-FID, GC-MS	Conti и сар. (2010)
-	-	-	-	нерил ацетат, нерил пропаноат, 2,4,6,9-тетраметилдец-8-ен-3,5-дион	-	Drapeau и сар. (2009)
-	0,3	-	-	-	GC-FID, GC-MS	Moretti и сар. (2002)
-	-	18	97	α -пинен, лимонен, нерол, нерил ацетат, нерил пропаноат, γ -куркумен	GC-FID, GC-MS	Bertoli и сар. (2012)
-	-	7	61,9	лимонен, нерил ацетат, нерил пропаноат, α -куркумен	GC-FID, GC-MS	Idaomar и сар. (2002)
4	-	19	84,05	α -пинен, нерил бутират, γ -куркумен, <i>trans</i> - β -кариофилен	GC-FID	Rossi и сар. (2007)
4	0,23	46	76,8	нерил ацетат, <i>trans</i> - β -кариофилен, γ -куркумен, α - и β -селинен	GC-FID, GC-MS	Ivanovic и сар. (2011)

Табела 5. Наставак

Време (h)	Принос (%)	Број изолованих копонената	Укупан процентуални састав изолованих копонената (%)	Главне компоненте у старском уљу	Аналитичке методе	Извор
-	0,47	16	75,48	нерил ацетат, <i>trans</i> -кариофилен, γ -куркумен, α - и β -селинен	GC, GC-MS	Micic и сар. (2009)
2	-	40	92,8	α -пинен, лимонен, нерил ацетат, италицен, <i>trans</i> -кариофилен, α - и β -селинен, γ -куркумен	GC-MS	Jerkovic и сар. (2016)
4	0,7	74	94,3	нерил ацетат, <i>cis</i> -дихидро-оциденталол, нерол, нерил пропаноат, <i>ar</i> - и γ -куркумен, α -кадинол	GC-MS	Marongiu и сар. (2003)
3	0,6	30	91,7	α -пинен, италицен, γ - и <i>ar</i> -куркумен, <i>epi</i> - β -бисаболол	GC-FID, GC-MS	Costa и сар. (2015)
-	0,15	27	96,1	нерил ацетат, нерил пропаноат, <i>ar</i> - и γ -куркумен	GC-MS	Kladar и сар. (2015)
3	0,11-0,68	100	93,65-95,58	α -пинен, β -селинен, γ -куркумен	GC-MS	Roussis и сар. (2000)
3	-	68	86,1	гвајол, нерол, β -кариофилен	GC-FID, GC-MS	Tsoukatou и сар. (1999)
3	0,14-0,44	34-54	95,2-97,3	α -пинен, β -кариофилен, α -селинен, еремофилен, α -мууролол, β -еудезмол	GC-FID, GC-MS	Maggio и сар. (2016)
-	0,04-0,07	29-35	63,09-91,19	γ -куркумен, нерил ацетат, нерил пропаноат, нерол, линалол, лимонен	GC-MS	Tucker и сар. (1997)
-	-	40-48	-	α -пинен, лимонен, β -кариофилен, аромадендрен, γ -куркумен, α -селинен, нерил ацетат, ледол, розифолиоол	GC-FID, GC-MS, GC-C-IRMS	Schipilliti и сар. (2016)
-	-	14	80,47	нерил ацетат, лимонен, γ -куркумен, β -дикетони	GC-MS	Cui и сар. (2015)
-	-	12	81,09	нерил ацетат, лимонен, γ -куркумен, β -дикетони	GC-MS	Cui и сар. (2016)
-	-	60	98,47	α -пинен, β -селинен, γ -куркумен, нерил ацетат	GC-FID, GC-MS	Stupar и сар. (2014)
-	-	9	75,91	италицен, β -дикетони, нерил ацетат, нерил пропаноат	GC	Bakkali и сар. (2005)
-	-	37	92,8	α -пинен, лимонен, α -копаен, кариофилен, α -цедрен, нерил ацетат, β -бисаболен, <i>ar</i> -куркумен, 2-метилциклохексил октаноат	GC-MS	Politeo и сар. (2006)

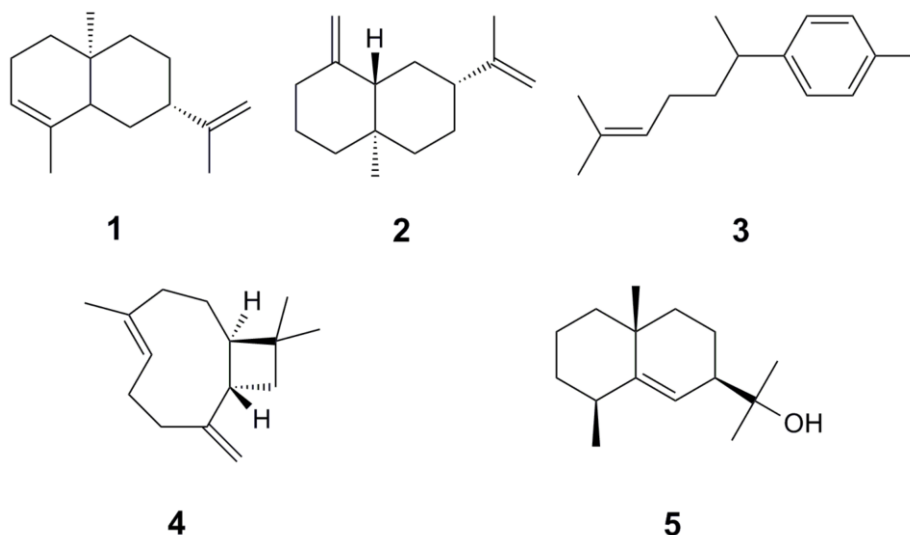
Што се тиче идентификације компонената из групе фенолних једињења у етарском уљу смиља, у литератури је забележен само један поступак одређивања укупног садржаја фенола, као еквивалената галне киселине (Wang и сар., 2008).

Имајући у виду литературне податке о главним компонентама етарског уља смиља, наведене у Табели 5, примећује се да међу њима доминирају монотерпени – α -пинен, лимонен, нерол, нерил ацетат и нерил пропаноат (Слика 8) и сесквитерпени – α - и β -селинен, γ -куркумен, *trans*- β -кариофилен и изомер розифолиола еудезм-5-ен-11-ол (Bianchini et al., 2004) (Слика 9).



Слика 8. Структурне формуле најзаступљенијих монотерпена у етарском уљу смиља: 1 – α -пинен, 2 – лимонен, 3 – нерол, 4 – нерил ацетат, 5 – нерил пропаноат

Наведене компоненте се могу сматрати носиоцима биолошких активности етарског уља смиља, с тим што се даља истраживања морају усмерити ка тачном дефинисању компонената које имају највећи утицај на дату биолошку активност.



Слика 9. Структурне формуле најзаступљенијих сесквитерпена у етарском уљу смиља: 1 – α -селинен, 2 – β -селинен, 3 – γ -куркумен, 4 – *trans*- β -кариофилен и 5 – еудезм-5-ен-11-ол

2.2.2.2. Дестилација смиља воденом паром

Када је у питању врста смиља *H. italicum*, у литератури су објављена два рада у којима је примењена дестилација воденом паром, као поступак изолације етарског уља. Perrini и сар. (2009) су у свом раду тестирали етарска уља узорака два генотипа подврсте смиља *H. italicum* subsp. *microphyllum* (Wild.) Nyman, прикупљених са две локације на острву Корзика, док су Morone-Fortunato и сар. (2010) извршили дестилацију воденом паром узорака 20 генотипова смиља подврсте *H. italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum*, прикупљених са различитих локација у Италији и на острву Корзика. У оба рада изведена је двоипочасовна дестилација воденом паром, а приноси етарских уља су се кретали у опсегу од 0,05-0,54% за први, односно 0,1-0,5% за други рад. Оба аутора су указала на повезаност разлика у приносима, броју и процентуалном садржају компонената идентификованих помоћу GC-FID и GC-MS метода, са разликама у географском пореклу узорака и условима гајења. Доминантне компоненте у етарским уљима, добијеним применом овог поступка, биле су монотерпени – нерол, нерил ацетат и нерил пропаноат и сесквитерпени – *ar*- и γ -куркумен. На основу овога, може се претпоставити да хидродестилација и дестилација воденом паром, у случају смиља, резултују добијањем етарских уља сличног састава.

2.2.2.3. Наткритична екстракција из смиља

Екстракција из смиља помоћу hкCO_2 испитивана је у неколико радова у литератури. Експерименталне вредности притиска и температуре крећу се у опсегу од 8-35 МРа и 35,86-64,14°C, редом. Није забележена употреба косолвената током процеса екстракције. Детаљан приказ литературних података о НКЕ из смиља дат је у Табели 6.

Према подацима приказаним у Табели 6, аналитичке методе, од којих су највише у употреби биле GC-FID и GC-MS, показале су да је НКЕ из смиља подесан поступак за изолацију α -пинена, нерил ацетата и γ -куркумена, који се могу наћи и у производима хидродестилације и дестилације воденом паром. Поред ових једињења, наткритични екстракти смиља садрже и нерол, нерил пропаноат, као и изомере селинена и кариофилена. Са друге стране, овим поступком се могу изоловати и тежи сесквитерпени. Поред једињења која припадају терпенима, наткритични екстракти смиља поседују и значајан садржај воскова (тежих угљоводоника) (Ivanović и сар., 2011; Mićić и сар., 2009; Jerković и сар., 2016). Marongiu и сар. (2003) су у свом раду показали да су наткритични екстракти добијени из листова смиља посебно богати восковима.

Са друге стране, Jokić и сар. (2016) су применом течне хроматографије високих перформанси (HPLC) и ултраљубичасте спектроскопије спрегнуте са видљивом (UV-Vis) успели да детектују скополетин у наткритичном екстракту смиља. Скополетин је једињење из групе кумарина. HPLC је употребљена и у раду Molnar и сар. (2017) са циљем да се идентификује кумарин у наткритичном екстракту смиља, али без успеха. На крају, Jerković и сар. (2016) су успели да помоћу GC-MS-а тентативно идентификују неколико деривата треметона, од којих су најпознатији 12-хидрокситреметон (биталин А), 12-ацетокситреметон и флавоноид гнафалиол, а који се могу изоловати екстракцијом помоћу органских растварача, о чему се детаљније може видети у наредном поглављу.

Табела 6. Литературни подаци о наткритичној екстракцији из смиља

Притисак (МРа)	Температура (°С)	Време (h)	Принос (%)	Број изолованих копонената	Укупан процентуални састав изолованих копонената (%)	Главне компоненте у екстракту	Аналитичке методе	Извор
10-20	40-60	1,5	1,37-4,1	59-65	75,75-76,92	α -пинен, нерил ацетат, <i>ar</i> -куркумен, α - и β -селинен, кариофилен оксид, еудезм-7(11)-ен-4-ол, воскови	GC-FID, GC-MS	Ivanović и сар. (2011)
9	50	2-4	0,4-1	59-77	88,9-96,3 ^a	нерил ацетат, нерол, нерил пропаноат, линалол, γ -куркумен	GC-MS	Marongiu и сар. (2003)
8-35	40	3	0,35-5,71	18-20	75,78-94,62	<i>trans</i> -кариофилен, γ -куркумен, воскови	GC, GC-MS	Mićić и сар. (2009)
9-12	40	-	0,36-0,60	26-30	86,99-97,76	α -пинен, италицен, 9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-кариофилен, γ - и <i>ar</i> -куркумен	GC-FID, GC-MS	Costa и сар. (2015)
26	50	3	3,9-4,9	-	-	-	-	Poli и сар. (2003)
7,93-22,07	35,86-64,14	1,5	0,43-6,31	-	-	скополетин	RP-HPLC, UV-Vis	Jokić и сар. (2016)
7,93-22,07	35,86-60	1,5	0,58-4,85	24-43	87,4-95,1	<i>ar</i> -куркумен, воскови, треметони ^b , сквален	GC-MS	Jerković и сар. (2016)
15-30	40	1,5	2,86-4,85	-	-	-	HPLC	Molnar и сар. (2017)

^a без воскова; ^b тентативна идентификација

У сваком случају, хемијски састав екстраката добијених помоћу H_2O и његова промена у зависности од процесних параметара су недовољно испитани (Ivanović и сар., 2011). Имајући у виду податке из Табеле 6, може се закључити да су етарска уља, добијена хидродестилацијом и дестилацијом воденом паром, и наткритични екстракти смиља, добијени на нижим притисцима, сличног састава у погледу садржаја терпена као активних компонената. Примена виших притисака уз могућност увођења косољвената, отвара могућности за изолацију тежих и поларних компонената из групе фенолних једињења, које могу бити идентификоване применом различитих метода, а пре свега HPLC-а.

2.2.2.4. Екстракција из смиља помоћу органских растварача

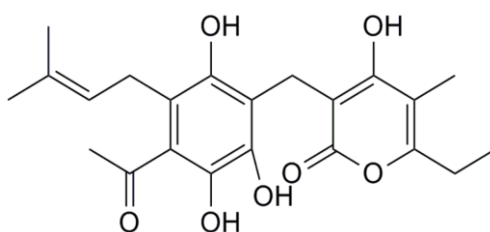
Поступак екстракције из смиља помоћу органских растварача представља поступак за изолацију махом компонената из групе фенолних једињења, од којих су најзаступљенија следећа: флавоноиди, ацетофенони, флороглуциноли, треметони, кумарини са кумаратима, фенолне киселине и естри, са дериватима. По заступљености у литератури, овај поступак је одмах иза хидродестилације. Експериментална процедура подразумева натапање биљног материјала одговарајућим растварачем, након чега се систем остави да стоји током одређеног времена на собној температури. Следећи корак представља фракционисање екстракта помоћу других растварача. Добијене фракције потом подлежу различитим методама сепарације, најчешће танкослојној хроматографији или хроматографији на колони, са применом различитих средстава за елуирање, у циљу изолације појединачних активних компонената. За идентификацију добијених појединачних компонената најчешће су коришћене спектроскопске методе. С обзиром на то да је процедура за сепарацију индивидуалних активних компонената сложена, поступак екстракције помоћу органских растварача захтева велике количине сировог/сувог биљног материјала. С тим у вези, могу се постићи значајно већи приноси у односу на поступке хидродестилације, дестилације воденом паром и НКЕ, чак до 19,77% (Kladar и сар., 2015). Растварачи који су највише коришћени за екстракцију из смиља, наведени у литератури, су ацетон, метанол, етанол, хлороформ, петрол етар, дихлорметан и диетил етар. Прва три

растварача су у далеко већој употреби него остали и за њих су у наставку дати табеларни прикази литературних података, укључујући опште експерименталне услове и елементе процедуре за изолацију појединачних активних компонената.

2.2.2.4.1. Екстракција из смиља помоћу ацетона

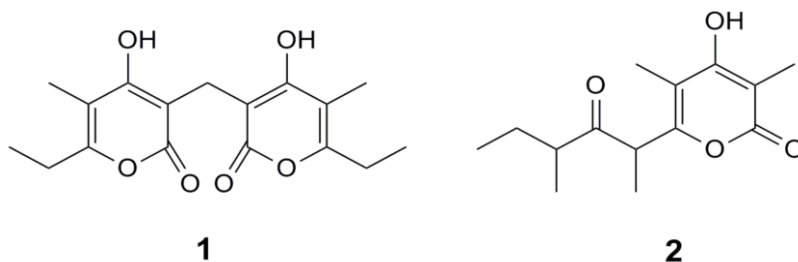
Литературни подаци о екстракцији из смиља помоћу ацетона детаљно су приказани у Табели 7.

Арзанол представља једну од најзначајнијих активних компонената смиља која се добија екстракцијом помоћу ацетона. По својој структури арзанол је прениловани хетеродимерни флороглуцинолни α -пирон, познат и под називом 3-(3-ацетил-2,4,6-трихидрокси-5-(3-метилбут-2-ен-1-ил)бензил)-6-етил-4-хидрокси-5-метил-2Н-пиран-2-он (Слика 10).



Слика 10. Структурна формула арзанола

Од осталих активних компонената смиља из групе фенолних једињења, које се могу изоловати из ацетонског екстракта, издвајају се хели- и микропирон (Слика 11), деривати хидрокситретона (биталина А), као и флавоноиди галангин, гнафалин, пиноцембрин и др., са својим дериватима.



Слика 11. Структурне формуле: 1 – хелипирона и 2 – микропирона

Табела 7. Литературни подаци о екстракцији из смиља помоћу ацетона

Маса биљног материјала (g)	Маса екстракта (g)	Иzolоване компоненте	Елементи изолације			Аналитичке методе	Извор
			Растварачи за фракционисање	Методe сепарације	Средства за елуирање		
1000	51	арзанол, ω -олеоилоксилиналол, хелипирон, микропирон, треметони	петрол етар, етил ацетат, ацетон	вакуум и гравитациона хроматографија на силика гелу	петрол етар-етил ацетат (95:5, 8:2, 5:5, 4:6, 3:7)	IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, HREIMS	Appendino и сар. (2007)
540	12	арзанол, метиларзанол, хелипирон, микропирон, розифолиол, 10-хидрокситреметон, ацетоксидрокси-треметон	етил ацетат, <i>n</i> -хексан	рекристализација из смеше толуена и ацетона, гравитациона хроматографија на силика гелу	<i>n</i> -хексан-етил ацетат (6:4, 9:1, 7:3, 6:4)	^1H NMR, ^{13}C NMR, UV, IR, HR-MS	Rosa и сар. (2007)
5000	202	урсолна киселина, нерил ацетат, ω -олеоилоксилиналол, кумарати, хелипирон, олеоилбиталин А, нонаноилбиталин А, сантиноли, микропирон, пропаноилбиталин А, изокапроилбиталин А, арзанол	петрол етар, вода-метанол (1:9), ацетон	рекристализација из метанола, кристализација из етра, филтрација на неутралној алумини, гравитациона хроматографија на силика гелу, HPLC на нормалној фази хроматографија на силика гелу	метанол-вода (93:7), петрол етар-етил ацетат (9:1, 7:3), <i>n</i> -хексан-етил ацетат (8:2, 9:1, 85:15, 55:45)	^1H NMR, ^{13}C NMR, ESIMS, HRESIMS	Tagliatela-Scafati и сар. (2013)
256	12,3	арзанол, микропирон, хелипирон, 3-хидрокси-ацетилбиталин А, пропаноилбиталин А гнафалиол, кафена киселина, урсолна киселина, 7- <i>O</i> - β -(<i>D</i> -глукопиранозил)-5-метокси-1(3H)-изобензофуранон, 6- <i>O</i> -(β - <i>D</i> -глукопиранозилокси)-4-метокси-1(3H)-изобензофуранон, гнафалиол-9- <i>O</i> - β - <i>D</i> -глукопиранозид, гнафалиол-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -глукопиранозид	-	-	хлороформ-метанол (95:5, 70:30), етил ацетат-пропанол (90:10, 60:40)	^1H NMR, ^{13}C NMR, ESIMS, HRESIMS	Venditti и сар. (2016)

Табела 7. Наставак

Маса биљног материјала (g)	Маса екстракта (g)	Иоловане компоненте	Елементи изолације			Аналитичке методе	Извор
			Растварачи за фракционисање	Методe сепарације	Средства за елуирање		
-	-	галангин, галангин -3-метил етар, 8-хидроксигалангин, 8-хидроксигалангин -3-метил етар, гнафалин, кемферол-3-метил етар, хербацетин-3-метил етар, кверцетин-3-метил етар, госипетин-3-метил етар, госипетин-3,8-диметил етар, пиноцембрин	метанол	гравитациона хроматографија на Sephadex LH-20, силика гелу, полиамиду SC-6 и ацетилован-ом полиамиду, танкослојна хроматографија на полиамиду и силика гелу	метанол, толуен, метилетил кетон, PE ₁₀₀₋₁₄₀ -толуен-метилетил кетон-метанол (12:6:1:1, 6:12:2:1), толуен-диоксан-метанол (8:1:1), толуен-метилетил кетон-метанол (12:5:3), толуен-метилетил кетон (9:1), толуен-диоксан-сирћетна киселина (18:5:1)	UV-Vis, ¹ H NMR, ¹³ C NMR, APCI-MS/MS	Wollenweber и сар. (2005)

Ацетон је послужио и као добар растварач за изолацију тритерпенске урсолне киселине, као и појединих моно- и сесквитерпена: ω -олеоилоксилиналола, нерил ацетата и розифолиола.

2.2.2.4.2. Екстракција из смиља помоћу метанола

Метанол, на основу литературних података, представља погодан растварач за изолацију претежно флавоноида и ацетофенона са дериватима из смиља. Детаљан приказ литературних података о екстракцији из смиља помоћу метанола дат је у Табели 8.

Међу флавоноидима који се могу изоловати из метанолног екстракта смиља водећу улогу имају гнафалин, пиноцембрин и тилирозид (Слика 12).

Заступљени су и други флавоноиди попут нарингенина, кемферола и др. и њихових деривата. Поједини аутори су открили и присуство једињења из групе ацетофенона (Sala и сар., 2001, 2003b; D'Abrosca et al., 2016).

Од активних компонената из групе фенолних једињења, заступљених у метанолним екстрактима смиља, треба поменути и фенолне киселине, као што су кафена, хлорогенска, гална, хинска и др.

Што се тиче терпена, према подацима из Табеле 8, као и код екстракције ацетоном, могуће је помоћу метанола изоловати урсолну киселину. Поред ње, забележено је и присуство α -терпинолена, нерил ацетата и *trans*-кариофилена (Tundis и сар., 2005). Mari и сар. (2014) су у свом раду изоловали сесквитерпен 6,11-диацетил-9,11-дихидроксидриман из метанолног екстракта смиља.

Литературни подаци из Табеле 8 указују и на присуство липида, ситостерола, нео- и оксинеолигнана у екстракту смиља добијеног помоћу метанола.

Табела 8. Литературни подаци о екстракцији из смиља помоћу метанола

Време (h)	Маса биљног материјала (g)	Маса екстракта (g)	Иzolоване компоненте	Елементи изолације			Аналитичке методе	Извор
				Растварачи за фракционисање	Методe сепарације	Средства за елуирање		
-	400	50	урсолна киселина, гнафалин, пиноцембрин, тилирозид, 4-хидрокси-3-(3-метил-2-бутенил)ацетофенон, 4-хидрокси-3-(2-хидрокси-3-изопентенил) ацетофенон, 12-хидрокситреметон, 3-(3-метил-2-бутенил)ацетофенон-4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -глукопиранозид, 12-хидрокситреметон-12- <i>O</i> - β - <i>D</i> -глукопиранозид, 3-(2-хидроксиетил)ацетофенон-4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -глукопиранозид, малтол- β - <i>D</i> -глукопиранозид	<i>n</i> -хексан, дихлорметан, етил ацетат, <i>n</i> -бутанол	таложeње, гел-филтрација на Sephadex LH-20, вакуум течна и гравитациона хроматографија на силика гелу, пречишћавање на Lobar LiChroprep RP-18 (Merck) колони	метанол, дихлорметан-метанол, дихлорметан-етил ацетат (9:1, 95:5), метанол-вода (4:6, 2:8)	UV, IR, ¹ H NMR, ¹³ C NMR, EIMS, FABMS, HREIMS	Sala и сар. (2001)
-	400	55	урсолна киселина, 4'-хидрокси-3'-(3-метил-2-бутенил)ацетофенон, гнафалин, флавоноиди, деривати ацетофенона, липиди, ситостероли	<i>n</i> -хексан, дихлорметан, етил ацетат, <i>n</i> -бутанол	-	-	TLC, HPLC-DAD	Sala и сар. (2003b)
-	400	55	гнафалин, тилирозид	вода, дихлорметан, метанол, етил ацетат	гравитациона хроматографија на силика гелу, хроматографија реверзне фазе на ниском притиску (RP-18)	дихлорметан-етил ацетат, 40%-ни метанол	-	Schinella и сар. (2007)
48	500	-	α -терпинолен, нерил ацетат, <i>trans</i> -кариофилен	метанол-вода (9:1), <i>n</i> -хексан	гравитациона хроматографија на силика гелу	<i>n</i> -хексан-ацетон (98 : 2)	GC-FID, GC-MS	Tundis и сар. (2005)

Табела 8. Наставак

Време (h)	Маса биљног материјала (g)	Маса екстракта (g)	Изоловане компоненте	Елементи изолације			Аналитичке методе	Извор
				Растварачи за фракционисање	Методе сепарације	Средства за елуирање		
3	1-5	-	фенолне киселине (гална, кафена, хлорогенска, хлорогенска киселина-3- <i>O</i> -глукозид), флавоноиди (флаванони – нарингенин, нарингенин -7- <i>O</i> -глукозид, нарингенин дигликозид, нарирутин, нарингенин -4'-глукозид-7-рутинозид, хесперидин; флавоноли – кемферол, кемферол -3- <i>O</i> -глукозид, кемферол рутинозид, мирицетин глукозид; флаволи – метоксилутеолин; флаваноли – <i>epi</i> -галокатехин-3- <i>O</i> -галат)	-	-	-	UPLC-MS/MS	De la Garza и сар. (2013) ^a
1	-	38,7	стирилпирони, изобензофуранон гликозиди, 3-хидроксидихидробензофуран гликозиди, неолигнани, оксинеолигнани, фенолни глукозиди мале молекулске масе	вода, етил ацетат, метанол	хроматографија на Amberlite XAD-4 и Sephadex LH-20, танкослојна хроматографија на SiO ₂ , хроматографија на RP-18 колони	вода, метанол, метанол-вода (1:3), хлороформ-метанол-вода (13:7:2, 13:7:3), <i>n</i> -хексан-хлороформ-метанол (1:1:1), ацетонитрил-метанол-вода (1:1:8, 3:3:14)	UV, ¹ H NMR, ¹³ C NMR, Q-TOF HRMS, COSY, TOCSY, HSQC, CIGAR-HMBC, H2BC, HSQC-TOCSY	D'Abrosca и сар. (2013) ^b

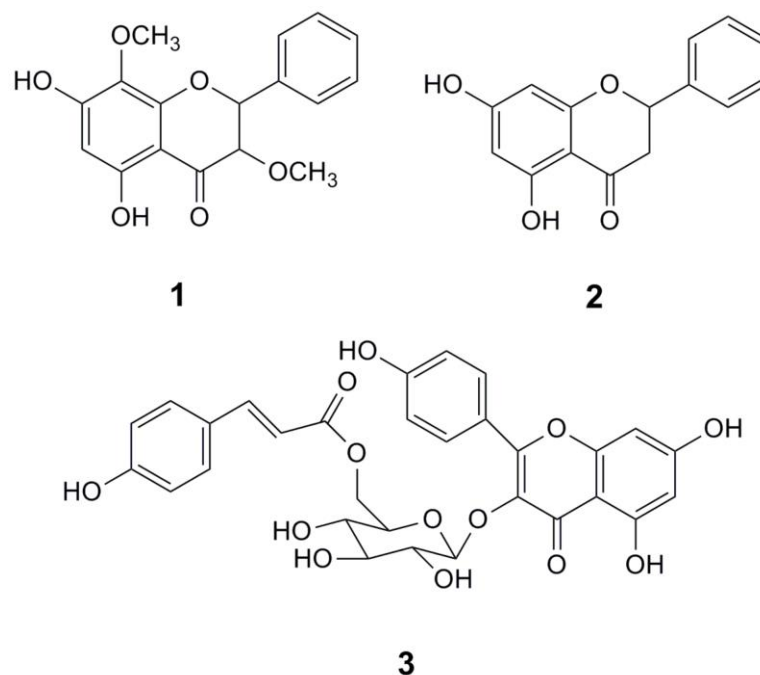
Табела 8. Наставак

Време (h)	Маса биљног материјала (g)	Маса екстракта (g)	Иzolоване компоненте	Елементи изолације			Аналитичке методе	Извор
				Растварачи за фракционисање	Методe сепарације	Средства за елуирање		
1	-	38,7	хеликриталицини, хелипирон, ацетофенони, феноли и флавоноли мале молекулске масе, треметони, урсолна киселина	вода, етил ацетат, хлороформ	хроматографија на силика гелу, хроматографија на Sephadex LH-20, танкослојна хроматографија на силика гелу, хроматографија на RP-18 колони	<i>n</i> -хексан-хлороформ-метанол (3:1:1, 4:1:1, 5:1:1), 2-бутанон- <i>n</i> -хексан, бутанон- <i>n</i> -хексан (1:9,1:4), етил ацетат-хлороформ (1:9, 1:4), 0.1%-на сирћетна киселина, етил ацетат- <i>n</i> -хексан (1:9, 1:4, 1:1), метанол-вода (2:3, 1:4), ацетон- <i>n</i> -хексан (1:4), 2-бутанон-хлороформ (1:19), хлороформ-метанол-вода (13:7:7, 13:7:2)	UV, ¹ H NMR, ¹³ C NMR, Q-TOF HRMS, COSY, TOCSY, HSQC, CIGAR-HMBC, H2BC, HSQC-TOCSY	D'Abrosca et al. (2016) ^b

Табела 8. Наставак

Време (h)	Маса биљног материјала (g)	Маса екстракта (g)	Изоловане компоненте	Елементи изолације	Аналитичке методе	Извор		
				Растварачи за фракционисање	Методе сепарације	Средства за елуирање		
-	500	-	кафена киселина, хлорогенска киселина, кверцетин-3- <i>O</i> -глукозид, 5- <i>O</i> -кафеоил-4-метилхинска киселина, кемферол-3- <i>O</i> -глукозид, изорамнетин-3- <i>O</i> -глукозид, 4,5-дикафеоилхинска киселина, 3,4- дикафеоилхинска киселина, кверцетин-3'- <i>O</i> -глукозид, 6,11-диацетил-9,11-дихидроксидриман, метил естар 3,5 дикафеоилхинске киселине, тилирозид, 12-хидрокситреметон, гнафалиол	-	хроматографија на Sephadex LH-20, HPLC на Phenomenex C18 Synergi-Hydro-RP колони, HPLC-IR реверзне фазе, RP-HPLC-UV	метанол-вода (38:62), 0.5%-на сирћетна киселина, 0.5%-на сирћетна киселина-ацетонитрил	¹ H NMR, ¹³ C NMR, HRESIMS, DQF-COSY, HSQC, HMBC, ROESY, LC-ESI(IT)MSMS	Mari и сар. (2014) ^c

^a растварач за екстракцију је био метанол-вода (3:1); ^b екстракција је реализована уз примену ултразвука; ^c биљни материјал је пре екстракције био третиран петрол етром и хлороформом



Слика 12. Структурне формуле најзаступљенијих флавоноида у метанолном екстракту смиља: 1 – гнафалин, 2 – пиноцембрин, 3 – тилирозид

2.2.2.4.3. Екстракција из смиља помоћу етанола

Према подацима доступним у литератури, етанол представља најчешће употребљавани органски растварач за екстракцију активних компонената из смиља. Детаљан приказ литературних података о екстракцији из смиља помоћу етанола дат је у Табели 9.

Етанол се, према литературним подацима, показао као погодан растварач за изолацију флавоноида апигенина, лутеолина, кемферола, нарингенина и др. и њихових деривата. Помоћу етанола могуће је из смиља изоловати и фенолне киселине, као што су кафена, ферулна, хлорогенска, кафеоилхинска и др. Rigano и сар. (2013, 2014) су у својим радовима успели да изолују и једињења из групе ацетофенона из екстракта смиља, као и 12-ацетокситреметон, који се показао као активна супстанца (Слика 13).

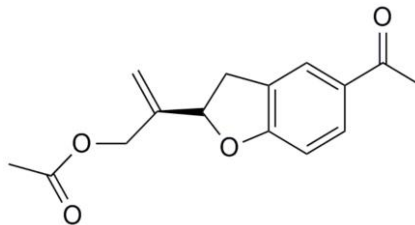
Табела 9. Литературни подаци о екстракцији из смиља помоћу етанола

Време (h)	Маса биљног материјала (g)	Маса екстракта (g)	Изоловане компоненте	Елементи изолације			Аналитичке методе	Извор
				Растварачи за фракционисање	Методe сепарације	Средства за елуирање		
-	-	-	апигенин, гликозил-апигенин, лутеолин, гнафалин, нарингенин, гликозил-нарингенин, гликозил-халкон	-	-	-	UV-Vis, EI-MS, FD-MS	Facino и сар. (1988)
-	-	20	4,2',4',6'-тетрахидроксиалкон-2'-глукозид, кемферол-3-глукозид, нарингенин-гликозид	вода	танкослојна хроматографија	етил ацетат-мравља киселина-сирћетна киселина-вода (100:11:11:27)	UV-Vis, FD-MS, ¹ H NMR, ¹³ C NMR, HPLC	Facino и сар. (1990)
-	6	0,5	нарингенин-4'-глукозид, кемферол-3-глукозид, 4,2',4',6'-тетрахидроксиалкон-2'-глукозид	метанол, вода	HPLC, танкослојна хроматографија	2-пропанол-вода (20:80 етил ацетат-мравља киселина-сирћетна киселина-вода (100:11:11:27))	HPLC, UV-Vis	Pietta и сар. (1991)
-	6	0,5	лутеолин-7-глукозид, изокверцитрин, кемферол-3-глукозид, апигенин-7-глукозид, хиперозид, кверцитрин, 4,2',4',6'-тетрахидроксиалкон-2'-глукозид, нарингенин-4'-глукозид	метанол, вода	HPLC, танкослојна хроматографија	2-пропанол-вода (20:80 етил ацетат-мравља киселина-сирћетна киселина-вода (100:11:11:27))	MECC-DAD, HPLC-DAD, UV-Vis	Pietta и сар. (1992)
24	-	-	еквиваленти галне киселине и кверцетина	вода	-	-	UV-Vis	Kladar и сар. (2015)
120	20	-	еквиваленти галне киселине	-	-	-	HPLC	Molnar и сар. (2017) ^a
-	-	-	<i>p</i> -кумаринска киселина, кафена ферулна и хлорогенска киселина, 7-хидрокси-5-метоксифталид, биталин А	-	-	-	UV-Vis, IR, PMR, MS	Zapochnaya и сар. (1990)

Табела 9. Наставак

Време (h)	Маса биљног материјала (g)	Маса екстракта (g)	Иоловане компоненте	Елементи изолације			Аналитичке методе	Извор
				Растварачи за фракционисање	Методe сепарације	Средства за елуирање		
-	-	-	3-кафеоилхинска киселина, 4-кафеоилхинска киселина, 5-кафеоилхинска киселина, кафена киселина, биталозид, 1,3-дикафеоилхинска киселина, <i>p</i> -кумаринска киселина, хеликрizin, биталосидин, изокверцитрин, 3,5-дикафеоилхинска киселина, 1,5-дикафеоилхинска киселина, 1,4-дикафеоилхинска киселина, 4,5-дикафеоилхинска киселина	-	HPLC, танкослојна хроматографија на Silufol 254, гравитациона хроматографија на силика гелу L 40/100	вода-ацетонитрил-тетрахидрофуран-сирћетна киселина (85:10:2:3), хлороформ-метанол-вода (26:14:3), хлороформ-метанол (од 100:0 до 60:40)	HPLC, ¹ H NMR	Zapochnaya и сар. (1992)
12	535	18	12-ацетокситреметон, [2,3-дихидро-2-[1-(хидроксиметил)етенил]-5-бензофуранил]-етанон	10%-ни метанол, <i>n</i> -хексан, хлороформ, <i>n</i> -бутанол	гравитациона хроматографија на силика гелу, танкослојна хроматографија, HPLC нормалне фазе на силика гел колони	хлороформ-метанол (од 100:0 до 0:100), петролеј-етил ацетат (1:1)	UV, IR, ¹ H NMR, ¹³ C NMR, COSY, HSQC, HMBC, ESIMS	Rigano и сар. (2013)
12	235	18	12-ацетокситреметон, [2,3-дихидро-2-[1-(хидроксиметил)етенил]-5-бензофуранил]-етанон, 13-(2-метилпропаноилокси)токсол, гнафалиол-9- <i>O</i> -пропаноат, 1-[2-[1-(ацетокси)метил]етенил]-2,3-дихидро-3-хидрокси-5-бензофуранил]-етанон, гнафалиол	10%-ни метанол, <i>n</i> -хексан, хлороформ, <i>n</i> -бутанол	гравитациона хроматографија на силика гелу, танкослојна хроматографија, HPLC нормалне фазе на силика гел колони	хлороформ-метанол (од 100:0 до 0:100), петролеј-етил хлороформ-метанол (90:10, 85:15), <i>n</i> -хексан-етил ацетат (70:30, 50:50)	UV, IR, ¹ H NMR, ¹³ C NMR, ESI-MS, HR-MALDITOF-MS, DQF-COSY, HSQC, HMBC, TOCSY, ROESY	Rigano и сар. (2014)

^a екстракција је извршена по Soxhlet-у, помоћу 50%-ног и 96%-ног етанола



Слика 13. Структурна формула 12-ацетокситреметона

2.2.2.4.4. Екстракција из смиља помоћу других органских растварача

Nostro и сар. (2000) су у свом раду употребили петрол етар, дихлорметан, дихлорметан-метанол (9:1) и диетил етар, као раствараче за екстракцију из смиља. У екстракту добијеном помоћу диетил етра утврђено је присуство кумарина, флавоноида, стероида и терпена. Идентификација компонената извршена је помоћу танкослојне хроматографије и UV-спектроскопије, са употребом смеше хлороформ-метанол-вода (80:18:2) као средства за елуирање.

Tomas-Barberan и сар. (1990) су извели екстракцију из смиља помоћу хлороформа, а као активна компонента екстракта изолован је 4-хидрокси-3(изопентен-2-ил)ацетофенон. У циљу изолације ове компоненте извршена је хроматографија на силика гелу, уз употребу *n*-хексан-етил ацетата (5:1) као средства за елуирање и низа спектроскопских метода. Хлороформ су као растварач за екстракцију из смиља употребили и Karasartov и сар. (1992), а након примене хроматографије на силика гелу, уз употребу хлороформ-метанола и хлороформ-петрол етра као средстава за елуирање, изолована су три једињења из групе кумарина – ескулетин, скополетин и изоскополетин и три флавоноида – кемферол, 3,5,7-трихидрокси-8-метоксифлавон и 3,5-дихидрокси-6,7,8-триметоксифлавон.

У литератури је забележен и један поступак екстракције из смиља помоћу воде (Kazazic и сар., 2016), при чему је вода, као растварач за екстракцију, коришћена на исти начин као органски растварачи описани у овом поглављу. Екстракција је извршена са циљем да се одреди укупни садржај фенола, као еквивалената галне киселине.

Molnar и сар. (2017) су у свом раду извршили екстракцију из смиља по Soxhlet-у помоћу *n*-хексана. Даље је примењена HPLC са циљем да се детектује

кумарин у екстракту, али без успеха. Такође је одређен укупни садржај фенола у екстракту, као еквивалената галне киселине.

2.2.3. Фармаколошко дејство изолата смиља и њихових компонената

Антимикробно дејство представља једно од најраспрострањенијих дејстава изолата смиља и њихових појединачних компонената.

In vitro методе, диск-дифузиони и агар-дифузиони тест, показале су да етарско уље смиља, у мањој или већој мери, зависно од порекла биљке и састава превасходно терпенских компонената, поседује антибактеријско дејство у сузбијању следећих сојева бактерија: *S. aureus* (Mastelic и сар., 2005; Rosi и сар., 2007; Roussis и сар., 2000; Tsoukatou и сар., 1999; Cui и сар., 2015; Djihane и сар., 2016; Orchard и сар., 2017; Chao и сар., 2008), *Escherichia coli* (Rosi и сар., 2007; Roussis и сар., 2000; Cui и сар., 2015, 2016; Lorenzi и сар., 2009; Orchard и сар., 2017), *Pseudomonas aeruginosa* (Rosi и сар., 2007; Roussis и сар., 2000; Tsoukatou и сар., 1999; Cui и сар., 2015; Djihane и сар., 2016; Lorenzi и сар., 2009; Orchard и сар., 2017), *Enterobacter aerogenes* (Rosi и сар., 2007; Lorenzi и сар., 2009), *Campylobacter jejuni* (Rosi и сар., 2007), *Bacillus cereus* (Marongiu и сар., 2003; Djihane и сар., 2016), *S. epidermidis* (Roussis и сар., 2000; Tsoukatou и сар., 1999; Djihane и сар., 2016; Orchard и сар., 2017), *Klebsiella pneumoniae* (Roussis и сар., 2000; Tsoukatou и сар., 1999; Cui и сар., 2015), *E. cloacae* (Roussis и сар., 2000), *B. subtilis* (Cui и сар., 2015; Djihane и сар., 2016), *B. pumilus* (Cui и сар., 2015), *Salmonella typhimurium* (Cui и сар., 2015), *Micrococcus luteus* (Djihane и сар., 2016), *Enterococcus cereus* (Djihane и сар., 2016), *E. faecalis* (Djihane и сар., 2016), *Proteus mirabilis* (Djihane и сар., 2016), *Acinetobacter baumannii* (Lorenzi и сар., 2009). Marongiu и сар. (2003) су тестирали антибактеријско дејство наткритичног екстракта смиља на неколико сојева бактерија, међутим само сој *B. cereus* је показао умерену осетљивост на екстракт. Снажно дејство против соја бактерија *S. aureus* показали су и хетеродимерни флороглуциноли, изоловани из ацетонског екстракта смиља, у раду Tagliatela-Scafati и сар. (2013). Антибактеријско дејство је испитивано помоћу бујон-дилуционог теста. Помоћу истог теста утврђено је дејство стирилпирона, 3-хидроксибензофуран гликозида, хлорогенске и 3,5-

дикафеоилхинске киселине (D'Abrosca и сар. 2013) на *P. aeruginosa*, као и значајно дејство хеликриталицина, деривата ацетофенона и урсолне киселине, изолованих из метанолног екстракта смиља, против соја бактерија *S. epidermidis* (D'Abrosca и сар. 2016). Терпени α -терпинолен, *trans*-кариофилен и нерил ацетат, изоловани из метанолног екстракта смиља, показали су снажан антибактеријски ефекат на сој бактерија *M. luteus* (Tundis и сар., 2005). Бујон-дилуциони тест показао је да етанолни екстракт смиља поседује снажно деловање на сој бактерије *Streptococcus mutans* (Nostro и сар., 2004). Исти аутори су утврдили да етарски екстракт смиља има јако антибактеријско дејство на *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* и *Propionibacterium acnes* (Nostro и сар., 2000, 2001, 2002). Nostro и сар. (2000) су показали да и екстракт смиља добијен помоћу петрол етра показује активност на сојеве бактерија *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium sporogenes*, *P. acnes*.

Међу осталим антимицробним дејствима изолата смиља, у литератури се помиње и антигљивично дејство етарског уља смиља против врста гљивица *Penicillium sp.* (Stupar и сар., 2014), *Epicozum nigrum* (Stupar и сар., 2014), *Aspergillus niger* (Stupar и сар., 2014, Djihane и сар., 2016), *Fusarium solani* (Djihane и сар., 2016), *Alternaria alternate* (Djihane и сар., 2016), *Ascochyta rabiei* (Djihane и сар., 2016) и квасаца *Candida albicans* (Mastelic и сар., 2005; Djihane и сар., 2016; Orchard и сар., 2017) и *Saccharomyces cerevisiae* (Djihane и сар., 2016). Терпени α -терпинолен, *trans*-кариофилен и нерил ацетат, изоловани из метанолног екстракта смиља, испољили су јако дејство против гљивица *Pythium ultimum* и *Trichophyton mentagrophytes* (Tundis и сар., 2005). Етарски екстракт смиља показао је јако дејство против гљивица *A. fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* и квасаца *C. albicans* и *C. tropicalis* (Nostro и сар., 2000). Tomas-Barberan и сар. (1990) су у свом раду показали да 4-хидрокси-3(изопентен-2-ил)ацетофенон, изолован из екстракта смиља добијеног помоћу хлороформа, поседује јако дејство на гљивице из рода *Penicillium sp.*, *Cladosporium herbarum* и *Phytophthora capsici*.

Етарско уље смиља је у раду Bezic и сар. (2016) показало склоност ка спречавању инфекције биљке *Chenopodium amaranticolor* дуванским мозаик-

вирусом. Антивирусне карактеристике показао је и арзанол, активна компонента која се налази у ацетонском екстракту смиља. Appendino и сар. (2007) су у свом раду показали да арзанол спречава репликацију HIV-1-вируса у зараженим Јуркат Т-ћелијама.

Антиоксидантно дејство етарског уља смиља тестирано је у неколико радова у литератури. Резултати примењених тестова, од којих су највише у употреби били DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) и FRAP (редукција гвожђа Fe^{3+} у Fe^{2+} у присуству антиоксиданата) показали су да етарско уље смиља поседује умерену антиоксидантну активност, која као и антимикуробна, зависи од биљног порекла и хемијског састава уља (Ornato и сар., 2015; Kladar и сар., 2015; Politeo и сар., 2006; Wang и сар., 2008). Умерену антиоксидантну активност, тестирану у систему β -каротен/линолеинска киселина/Tween 40 и при стварању супероксид-радикала (Poli и сар., 2003), као и помоћу DPPH-теста (Costa и сар., 2015; Poli и сар., 2003; Molnar и сар., 2017), показали су и наткритични екстракти смиља. Са друге стране, изолати смиља добијени екстракцијом помоћу органских растварача и њихове појединачне компоненте, показали су већи антиоксидантни потенцијал, који је, за разлику од истог код етарских уља и наткритичних екстраката, испитиван и у *in vivo* тестовима. Арзанол, заједно са метиларзанолом и хелипироном, показао је ефикасност у спречавању аутооксидације и оксидације, изазване дејством дикалијумове соли етилендиамин-тетраацетатне киселине (EDTA), линолеинске киселине. Такође, арзанол је показао снажну инхибицију аутооксидације холестерола и оксидативног стреса изазваног дејством терц-бутил хидропероксида (Rosa и сар., 2007; Rosa и сар., 2011), у VERO ћелијама (ћелијама изолованих из бубрега мајмуна) (Rosa и сар., 2007) и људским интестиналним епителним ћелијама (Caco-2 ћелијама) (Rosa и сар., 2011). Са друге стране, розифолиол, изолован из ацетонског екстракта смиља, испољио је значајан ефекат у спречавању оксидације линолеинске киселине (Rosa и сар., 2007). Исти аутори су показали да арзанол успешно спречава оксидативну модификацију липидних компонента у људском липопротеину ниске густине (LDL) изазвану дејством Cu^{2+} јона, као и редукцију нивоа полинезасићених масних киселина (Rosa и сар., 2011). Значајно антиоксидантно дејство, тестирано помоћу DPPH-теста, показали су и ацетофенони, изоловани из метанолног екстракта смиља, у раду Sala и сар.

(2003a). Исти аутори су показали да флавоноид гнафалин поседује снажно инхибиторно дејство на неензимску пероксидацију липида (Sala и сар., 2002). Schinella и сар. (2007) су применом *in vitro* модела показали да флавоноиди гнафалин и тилирозид, из метанолног екстракта смиља, ефикасно спречавају Cu^{2+} јонима индуковану оксидацију људског LDL-а и разблажене крвне плазме. Исти аутори су показали да екстракт смиља добијен помоћу метанола успешно спречава ензимску и неензимску пероксидацију липида, као и да спречава стварање супероксид-радикала (Schinella и сар., 2002a). Терпени α -терпинолен, *trans*-кариофилен и нерил ацетат, изоловани из метанолног екстракта смиља, показали су антиоксидантно дејство, испитано у систему β -каротен/линолеинска киселина/Tween 40 и помоћу DPPH теста у раду Tundis и сар. (2005). Флавоноиди апигенин, лутеолин и нарингенин, са својим дериватима, изоловани из етанолног екстракта смиља поседују способност да ефикасно спрече пероксидацију липида у микрозомима јетре пацова, индуковану дејством система аденозин трифосфат/ Fe^{2+} , никотинамид аденидинуклеотид фосфата (NADPH) и угљен-тертахлорида (CCl_4) (Facino и сар., 1990). Етанолни екстракт смиља поседује и ефикасно дејство за сузбијање DPPH- (Kladar и сар., 2015; Molnar и сар., 2017) и $\cdot\text{OH}$ -радикала (Kladar и сар., 2015). Јако антиоксидантно дејство, и то у сузбијању стварања реактивних кисеоничних компонената у епителним ћелијама рожњаче човека (НСЕС ћелијама), поседује и 12-ацетокситреметон, изолован из етанолног екстракта смиља (Rigano и сар., 2014). Molnar и сар. (2017) су у свом раду показали да и хексански екстракт смиља поседује способност за сузбијање DPPH-радикала. Значајно антиоксидантно дејство, испитано помоћу DPPH-, FRAP- и 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска) киселина (ABTS)-тестова, поседује и водени екстракт смиља (Kazazic и сар., 2016).

Антиупално дејство изолата смиља се, према подацима доступним у литератури, везује искључиво за екстракте добијене помоћу органских растварача и њихове појединачне компоненте. Тестирања су вршена како *in vitro*, тако и *in vivo*. Арзанол, као активна компонента ацетонског екстракта смиља, поседује способност спречавања активације нуклеарног фактора κB , индуковане дејством луциферазе, и отпуштања проинфламаторних медијума – интерлеукина-6, интерлеукина-1, фактора некрозе тумора- α и простагландина E_2 , у

липополисахарид-стимулисаним моноцитима, изолованих из људске крви (Apprendino и сар., 2007). Такође, арзанол је показао склоност ка инхибицији активности 5-липоксигеназе и формирања леукотриена у неутрофилима, као и активност циклооксигеназе-1 и формирања простагландина E_2 , *in vitro*. Показао је и дејство против запаљења плућне марамице пацова, индукованог дејством карагенана (Baueг и сар., 2011). Активне компоненте метанолног екстракта смиља, 4-хидрокси-3-(2-хидрокси-3-изопентенил)ацетофенон и бензо- γ -пирон глукозид, показале су јако антиупално дејство у тестирању 12-*O*-тетрадеканоилфорбол 13-ацетатом (ТРА) (Sala и сар., 2001), фосфолипазом A_2 и карагенаном (Sala и сар., 2003а) индукованог едема мишје шапе. Флавоноид пиноцембрин, такође изолован из метанолног екстракта смиља, показао је антиупално дејство током индуковане хиперсензитивне реакције у црвеним крвним зрнцима овце (Sala и сар., 2003b). *In vivo* су показана дејства флавоноида апигенина, лутеолина, нарингенина и њихових деривата, из етанолног екстракта смиља, против еритема (црвенила), у испитивањима спроведеним на кожи гвинејских свиња (Facino и сар., 1988), као и интестинално антиспазмодично дејство 12-ацетокситреметона и [2,3-дихидро-2-[1-(хидроксиметил)етенил]-5-бензофуранил]-етанона, такође изолованих из етанолног екстракта смиља, у испитивањима упалних процеса у илеуму миша и током мерења продукције нитрита у макрофагима, третираним липополисахаридом (Rigano и сар., 2013, 2014).

Изолати смиља поседују и друга дејства, за која постоји мањи број података у литератури. Етарско уље смиља је, према подацима доступним у литератури, ефикасно средство против инсеката, посебно комараца типа *Aedes albopictus* (Conti и сар., 2010) и *A. aegypti* (Drapeau и сар., 2009), затим инсеката *Sitophylus zeamais* (Bertoli и сар., 2012), ларви комараца (Amer и Mehlhorn, 2006а, 2006b, 2006c) и инсеката *Limantria dispar* (Moretti и сар., 2002). У литератури је забележена и умерена активност метанолног екстракта смиља против инсекта *Trypanosoma cruzi* (Schinella и сар., 2002b). Етарско уље смиља показало је и антимутагенско дејство, испитивано на крилима инсеката *Drosophila melanogaster* третираних уретаном (Idaomar и сар., 2002). Етарско уље смиља је у раду Cristofari и сар. (2012) показало способност спречавања корозије комадића челика потопљених у хлороводоничну киселину.

2.2.4. Токсичност изолата смиља и њихових компонената

У погледу цитотоксичности, етарско уље смиља је показало јаку инхибиторну активност тестирану на А375 ћелијама (ћелијама људског малигног меланом). Концентрација довољна да инхибира раст ћелија за 50% (IC₅₀) износила је 16 µg/mL (Ornato и сар., 2015). Bakkali и сар. (2005) су у свом раду показали да етарско уље смиља поседује минималну цитотоксичност, тестирану на квасцима типа *S. crevisiae*, у погледу изазивања оштећења гена типа RNR3 и RAD51, задужених за метаболизам и репарацију дезоксирибонуклеинске киселине (DNA). Rosa и сар. (2007) су испитивали цитотоксичност арзанола применом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ)-теста и мерењем отпуштања лактат дехидрогеназе (LDH) у VERO ћелијама, и установили да арзанол није показао токсичност. Такође, није показао токсичност ни у експерименту са Сасо-2 ћелијама (Rosa и сар., 2011). Цитотоксичност нису показали ни 12-ацетокситреметон и [2,3-дихидро-2-[1-(хидроксиметил)етенил]-5-бензофуранил]-етанон из етанолног екстракта смиља при испитивању на НСЕС ћелијама (Rigano и сар., 2014).

Mancini и сар. (2011) су у свом раду, испитујући фитотоксично дејство етарског уља смиља, показали да оно у концентрацијама од 0,25-2,5 µg/mL зауставља клијање и елонгацију корена ротквице и зелене салате.

Према подацима доступним у литератури, етарско уље смиља се одликује изванредним степеном толеранције међу пацијентима, чак и након дуже употребе (Viegas и сар., 2014). У литератури је забележен само један случај дерматитиса, као алергијске реакције на присуство хидрофилне и липофилне фракције етарског уља смиља у крему за третман ксерозе (Foti и сар., 2013). Такође, због потенцијалне неуротоксичности, препоручује се топикална употреба раствора етарског уља (Viegas и сар., 2014). Поред наведеног изузетка, треба поменути и то да су De la Garza и сар. (2013) у свом раду установили, примењујући дијетални модел тестирања отпорности на дејство инсулина у пацовима, да метанолни екстракт смиља поспешује хиперинсулинемију и смањење нивоа глукозе у крви, пре и после оброка (постпрандијално). У литератури је забележен и један покушај

тестирања дејства етарског уља смиља на дужину теломера, чије се скраћење одражава на старење људи. Тестирање је извршено на људским К562 ћелијама, у присуству и одсуству водоник-пероксида, међутим етарско уље смиља није показало значајније резултате (Plant, 2016).

Наведени подаци указују на безбедност употребе изолата смиља. Међутим, због њихове малобројности, као и у литератури забележених случајева негативног утицаја на људски лимфни систем и тровања животиња од стране других врста из рода *Helichrysum* (*H. sanguinum*, *H. pampylicum*, *H. orientale*, *H. noeanum*, *H. blandoksianum*, *H. argyrosphareum*) (Viegas и сар., 2014), оралну употребу изолата смиља потребно је спроводити опрезно.

2.3. НОСАЧИ ЗА ИМПРЕГНАЦИЈУ ЕКСТРАКТОМ СМИЉА

Литературни подаци о фармаколошком дејству смиља и његових изолата, са појединачним активним компонентама, који се највише односе на топикалну примену и третман упалних процеса у дигестивном систему, имали су пресудан утицај на избор носача за импрегнацију екстрактом смиља применом интегрисаног НКЕ-НКИ процеса.

Данас су на светском тржишту веома тражени материјали на бази биоразградивих и биокомпатибилних полимера као и медицински текстилни материјали за топикалну употребу, као што су средства за третман рана или средства са антибактеријским дејством. У општем случају, трансдермални системи погодни за наношење биоактивних супстанци како на површинске, тако и у поткожне слојеве, од великог су значаја са терапеутског и/или козметичког становишта, у погледу ефикасности у третману различитих кожних оштећења. Ефикасан материјал за топикалну употребу треба да задовољи следеће критеријуме:

- флексибилност;
- контролисано приањање на оштећено ткиво;
- могућност пропуштања гасова;
- трајност и биодеградабилност;

- могућност истовременог апсорбовања течности која излази из оштећеног дела коже и контролисање губитка влаге (Dias и сар., 2011).

Када су у питању полимерни материјали за третман рана, настоји се да се при њиховом избору води рачуна о биокомпатибилности, нетоксичности, нешкодљивости и лакоћи и безбедности примене (Dias и сар., 2011). Као медицински текстилни материјали који би потенцијално могли да испуне наведене захтеве, када је у питању средство за третман иритиране коже, са екстрактом смиља као активном супстанцом, одабрани су памучна газа и поли(пропилен)ска тканина.

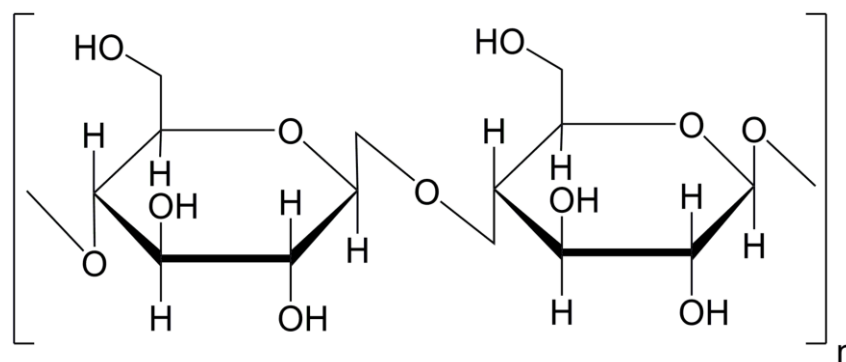
Са друге стране, формулације за оралну употребу на бази биокомпатибилних и биодеградабилних полимера импрегнираних активним компонентама, привлаче значајну пажњу научника током последњих деценија. Као носачи за активне супстанце посебно су се истакли полисахариди због своје доступности, нетоксичности и стабилности током складиштења. Задовољавајући нивои биодеградабилности и биокомпатибилности, заједно са могућношћу хемијске модификације чине их још подеснијим за синтезу формулација за контролисано отпуштање активних супстанци (García-Gonzalez и сар., 2011). Када је у питању синтеза формулација за потенцијалну оралну употребу, са екстрактом смиља као активном компонентом, у овој дисертацији искоришћени су ксерогелови скроба као носачи.

Детаљније о сваком од поменутих носача биће речено у наставку.

2.3.1. Носачи за топикалну употребу

2.3.1.1. Памучна газа

Памучна газа представља познато медицинско средство за третман рана и других оштећења на кожи. Широку примену омогућавају јој мекоћа, висока хигроскопност и способност задржавања топлоте (Katayama и сар., 2012). Главну компоненту памучних влакана представља целулоза (88-96%) (Слика 14).



Слика 14. Структурна формула целулозе

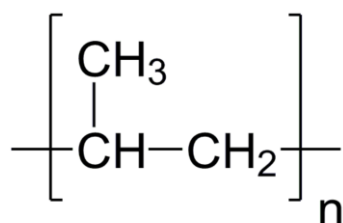
Иако је памучна газа широко распрострањено медицинско средство, њена употреба као носача за импрегнацију активним супстанцама у наткритичним условима је недовољно истражена у литератури. Milovanović и сар. (2013) су у свом раду извели НКИ памучне газе тимолом у статичким условима, на притиску од 15,5 МРа и температури од 35°C, током 2 и 24 h. Након 2 h импрегнације, остварен је принос тимола од 11%, док је исти након 24 h износио 19,6%. Оба импрегнирана узорка су показала јако антибактеријско дејство против тестираних сојева. Памучна газa је послужила и као носач за импрегнацију екстрактом тимијана, применом интегрисаног НКЕ-НКИ процеса у раду Ivanović и сар. (2014). Подаци о експерименталним условима и оствареном приносу дати су у Табели 4.

2.3.1.2. Поли(пропилен)ска тканина

Поли(пропилен)ска тканина представља материјал високе порозности и велике специфичне површине. Често је у употреби као медицински текстил. Због хидрофобности, у неким случајевима је пожељно додатно модификовати њену површину (Marković и сар., 2015).

Примена поли(пропилен)ске тканине (Слика 15) као носача за НКИ активним компонентама такође је недовољно истражена у литератури. Marković и сар. (2015) су у свом раду искористили поли(пропилен)ску тканину у свом изворном и корона-модификованом облику за НКИ тимолом на притиску од 15,5 МРа и температури од 35°C, током 4 h. Вредности приноса импрегнације за немодификовану и модификовану поли(пропилен)ску тканину износиле су 7,41%

и 6,69% респективно. Оба узорка су показала снажно антимикуробно дејство против тестираних сојева бактерија и гљивица. Поли(пропилен)ска тканина је послужила и као носач за импрегнацију екстрактом тимидјана, у раду Ivanović и сар. (2014), и екстрактом хмеља, у раду Zizović и сар. (2014), применом интегрисаног НКЕ-НКИ процеса. Подаци о експерименталним условима и оствареним приносима дати су у Табели 4.

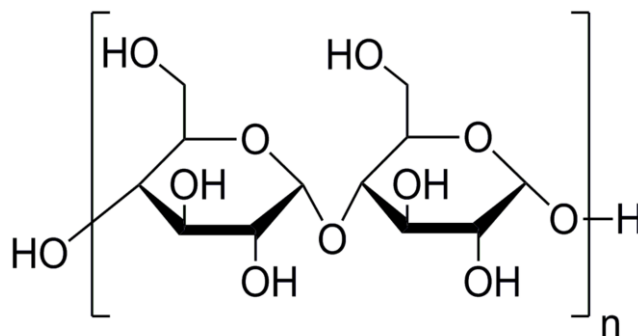


Слика 15. Хемијска формула поли(пропилена)

Поли(пропилен) је у облику филмова послужио и као носач за импрегнацију 4-(хексадециламино)-7-нитробенз-2-окса-1,3-диазолом (NBD) у присуству hкCO_2 у статичким условима, на притиску од 16 МПа и температури од 60°C, током 3 h, у циљу модификације полимера (Wang и сар., 2002). Показане су значајне предности овог поступка у односу на две конвенционалне методе, у погледу дистрибуције активне компоненте у структури полимера.

2.3.2. Скроб

Скроб представља природни полисахарид, који је по својој структури смеша два полисахарида – амилозе и амилопектина (Слика 16). Највише је заступљен у житарицама и кртоластим биљкама, а примену као носач активних компонената има у разним дијететским, пољопривредним, фармацеутским, биомедицинским и козметичким формулацијама (Ivanović и сар., 2014). Комерцијални скроб се најчешће јавља у виду гранула, које су хидрофилне и лако бивају хидратисане на вишим температурама. Скроб је такође подесан за физичке и хемијске модификације (Ivanović и сар., 2016).



Слика 16. Структурна формула скроба

За разлику од памучне газе и поли(пропилен)ске тканине, употреба скроба у различитим формама, као носача за НКИ активним супстанцама, интензивно је проучавана у литератури током последње деценије. Литературни преглед НКИ скроба активним супстанцама за различите примене дат је у Табели 10.

У радовима приказаним у Табели 10 употребљен је скроб, изолован из различитих биљних култура: кромпир (Mehling и сар., 2009), кукуруз (Mehling и сар., 2009; Varona и сар., 2011; Comin и сар., 2012a; Garcia-Gonzalez и сар., 2013, 2015; Milovanovic и сар., 2015; De Marco и Reverchon, 2017), шећерна трска и пиринач (Almeida и сар., 2013), грашак (Garcia-Gonzalez и сар., 2013), тапиока (de Souza и сар., 2014, Milovanovic и сар., 2015) и пшеница (Ubeyitogullari и Ciftci, 2016). Скроб је у овим радовима показао велики потенцијал као носач за синтезу формулација за контролисано отпуштање активних компонената. Највеће вредности приноса импрегнације постигнуте су када је скроб коришћен у форми аерогела, имајући у виду његову велику активну површину и високу порозност, које се постижу наткритичним сушењем хидрогелова (Garcia-Gonzalez и сар., 2011).

Табела 10. Литературни подаци о импрегнацији скроба активним супстанцама помоћу наткритичног угљеник(IV)-оксида

Форма скроба	Активна компонента	Притисак (МПа)	Температура (°C)	Време (h)	Принос (%)	Примена	Извор
аерогел	ибупрофен	18	40	70	10-22	контролисано отпуштање лека	Mehling и сар., 2009
микрочестице модификоване п-октенил сукцинатом (OSA)	етарско уље лаванде (<i>Lavandula hybrida</i>)	10-12	40-50	2	2,5-14,7	формулација биоцида	Varona и сар., 2011
гел-прах	олеинска киселина уље лана (<i>Linum usitatissimum</i>)	15-30	40-80	8	4,89-11,86 0,51-6,60	заштита хране	Comin и сар., 2012a
микрочестице	етарско уље оригана (<i>Origanum vulgare</i>)	8-15	40-50	3-24	2,5-15	заштита хране	Almeida и сар., 2013
аерогел	кетопрофен	18	40	1-8	2,1-11,53	контролисано отпуштање лека	Garcia-Gonzalez и сар., 2013
биокомполитни филмови	цинамалдехид	15-25	35	3-15	0,1-0,25	заштита хране	De Souza и сар., 2014
аерогел	кетопрофен	18	40-55	24	12,84 21,54	контролисано отпуштање лека	Garcia-Gonzalez и сар., 2015
ксеро- и аерогелови	бензојева киселина тимол	15,5	35	24	0,58-4,01	фармацеутске и дијететске формулације	Milovanovic и сар., 2015
аерогел	фитостерол	45	70	3	5,5	заштита хране	Ubeyitogullari и Ciftci, 2016
аерогел	витамин Е витамин К ₃	15	40-60	24	19,99 8,76	дијететске формулације	De Marco и Reverchon, 2017

Скроб је у форми ксеро- и аерогелова употребљен као носач за НКИ тимолом у раду *Milovanović и сар. (2015)*. Постигнути експериментални резултати (Табела 10) указали су на једноставну припрему ксерогелова за које је могуће постићи висок принос НКИ.

У свим радовима наведеним у Табели 10 извршен је процес НКИ у статичким условима – носач и активна супстанца су били изложени вишечасовном дејству nkCO_2 , на задатим вредностима притиска и температуре, након чега је вршена декомпресија.

Примена ксерогелова кукурузног скроба, као носача у интегрисаном НКЕ-НКИ процесу публикована је у раду *Ivanović и сар. (2014)*, при чему је као активна супстанца употребљен екстракт тимијана, и у раду *Zizović и сар. (2014)*, у коме је као активна супстанца употребљен екстракт хмеља. Подаци о експерименталним условима и оствареним приносима дати су у Табели 4.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. МАТЕРИЈАЛИ

Цветови смиља (*H. italicum*) и листови жалфије (*Salvia officinalis*) су сакупљани у августу 2013. год. у региону Конавле (Хрватска) и сушени на собној температури без излагања сунчевој светлости. За потребе експеримената су млевени у блендеру око 60 s, а затим просејавани или су само млевени без просејавања (смиље). Средњи пречник честица након мљења и просејавања је био 0.80 mm.

За потребе импрегнације екстрактом смиља коришћени су: стерилна памучна газу густине ткања од 17 нити/cm² и густине влакана од 23,5 g/cm³ (Нива, Србија), поли(пропилен)ска тканина специфичне масе од 40 g/m² и прах кукурузног скроба густине 1,5 g/cm³ (Јабука, Србија).

Као наткритични флуид коришћен је комерцијални CO₂ чистоће 99% (Messer-Техногас, Србија). Од осталих хемикалија у употреби су били: комерцијални ацетон (Зорка фарма – хемија, Србија), 96%-ни етанол (Зорка фарма – хемија, Србија), DPPH, 2,4,6-три(2-пиридил)-s-триазин (TPTZ) и L-аскорбинска киселина (Sigma-Aldrich, Немачка), Folin-Ciocalteu реагенс (Merck, Немачка) и гална киселина (TCI Europe, Белгија).

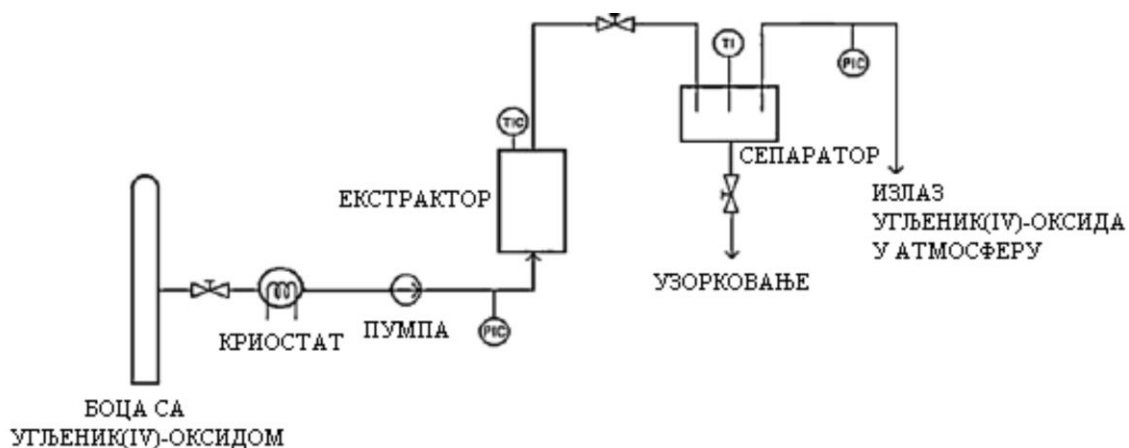
3.2. МЕТОДЕ

3.2.1. Наткритична екстракција

3.2.1.1. Наткритична екстракција на нижем притиску

За овај експериментални сет изабране су вредности притиска и температуре од 15 МПа и 40°C, редом. Као референца за избор наведених вредности притиска и температуре послужио је рад Ivanović и сар. (2011) у коме је показано да је управо при овим вредностима притиска и температуре постигнут

највећи екстракциони принос. НКЕ је извршена у систему за НКЕ Autoclave Engineers SCE Screening System (САД) (Слика 17).



Слика 17. Шема постројења за НКЕ из смиља на нижем притиску

Апаратура приказана на Сlici 17 погодна је за рад на притисцима до 45 МРа и температурама до 238°C. Течни CO₂ из боце са сифоном прво пролази кроз криостат да би се спречило његово испаравање, а затим улази у пумпу високог притиска за течности (Milton Roy, Француска) излазног притиска до 45 МРа са могућношћу подешавања протока у опсегу од 50-500 mL/h. CO₂ се уводи у екстрактор и компримује до жељеног притиска на жељеној температури. Екстрактор радне запремине 150 mL је претходно испуњен биљним материјалом. Након постизања жељених вредности притиска и температуре, почиње континуално протицање CO₂ кроз систем. Растворени екстракт се одваја у сепаратору (епрувета). CO₂ се из система испушта у атмосферу, а његова утрошена маса се мери помоћу ваге на којој је смештена боца.

Овај експериментални сет се састојао из НКЕ из најпре 30 g чистог смиља, а затим из 30 g смиља уз додатак различитих количина етарског уља жалфије као косолвента. Етарско уље жалфије додавано је у количинама које представљају респективно 20, 30, 40 и 60% од приноса наткритичне екстракције из чистог смиља.

Етарско уље жалфије добијено је поступком хидродестилације листова (100 g) по Clevenger-у (1600 mL дестиловане воде), у трајању од 4 h.

НКЕ је реализована скупљањем 5 фракција екстраката са циљем да се испрате промене у хемијском саставу диференцијалних екстраката у току експеримената. Екстракциони приноси су израчунавани након потрошње нкСО_2 од 30 g/g биљног материјала. Средње време трајања екстракција износило је 1,7 h, а средњи масени проток СО_2 је износио 0,53 kg/h.

Екстракциони принос (y) је израчунаван према следећој једначини:

$$y = \frac{m_e}{m_s} \cdot 100\% , \quad (1)$$

при чему је m_e маса издвојеног екстракта, а m_s почетна маса биљног материјала. За НКЕ из смиља уз додаток етарског уља жалфије вршен је прорачун очекиване масе екстракта, под претпоставком да се екстракт смиља из смеше са етарским уљем жалфије издваја са истим приносом као без додатка етарског уља и да је целокупна количина етарског уља, додатог на почетку експеримента, изолована заједно са екстрактом смиља помоћу нкСО_2 . Очекивана маса екстракта (m_{exp}) је израчунавана применом следеће једначине:

$$m_{\text{exp}} = m_{\text{HI}} \cdot y_0 + m_{\text{SO}} , \quad (2)$$

при чему су: m_{HI} -почетна маса смиља, y_0 -принос наткритичне екстракције из чистог смиља и m_{SO} -маса етарског уља жалфије.

За сваки од експеримената са додатком косолвента, израчунавана је разлика између постигнутог и очекиваног екстракционог приноса (додатна маса екстракта), са циљем да се дефинише оптимална количина етарског уља жалфије која ће довести до највећег екстракционог приноса из смиља.

Промене у хемијском саставу екстракта смиља након додатка етарског уља жалфије као косолвента посматране су како са становишта промена састава индивидуалних компонената екстракта, тако и са становишта промене укупног састава група једињења. За праћење промена у саставу група једињења, изолованих са и без додатка етарског уља жалфије, извршено је израчунавање укупног процента компонената (w_c) у екстрактима, након чега су компоненте

разврставане по одговарајућим групама. Укупни проценат компонената је израчунаван пондерацијом – множењем процента површине сваке компоненте у гасном хроматограму фракције екстракта (s) са масеним процентом фракције у екстракту (f), при чему се индекс с односи на компоненту, а n на број фракција, након чега следи сумирање (једначина 3).

$$w_c = \sum_1^n (s \cdot f)_{n,c} \quad (3)$$

Промене у саставу индивидуалних компонената екстракта смиља, у експериментима са додатком етарског уља жалфије као косолвента, праћене су са становишта процентуалног садржаја у делу екстракта који припада само екстракту смиља. Под претпоставком да се у експериментима са косолвентом целокупна количина етарског уља жалфије екстраховала, проценти компонената у делу екстракта који потиче само од смиља, добијеног уз додатак косолвента, су израчунавани одузимањем процента који дата компонента заузима у етарском уљу жалфије од истог који компонента заузима у екстракту. Ово правило применљиво је за компоненте које потичу само из етарског уља жалфије. Проценти компонената које припадају само смиљу, након одузимања дела који припада само етарском уљу жалфије, добијени су новим прерачунавањем процената њихових површина на гасном хроматограму и пондерацијом. Најзначајније од тих промена су узете у даље разматрање.

3.2.1.2. Наткритична екстракција на вишем притиску

НКЕ из смиља на вишем притиску реализована је на 35 МПа и 40°C, са и без додатка етанола као косолвента. Вредност притиска од 35 МПа и етанол као косолвент, одабрани су са циљем да се модификује селективност нкСО₂ према фенолним компонентама, од којих су неке, као нпр. флавоноиди поларне, па је за њихово издвајање било неопходно укључити и косолвент у процес.

Овај експериментални сет реализован је у екстракционом делу постројења за интегрисани НКЕ-НКИ процес НРЕА (High Pressure Extraction Adsorption) 500 представљеном на Слици 18, а које је детаљно описано у поглављу 3.2.3.1.

НКЕ је у постројењу НРЕА 500 изведена у конфигурацији при којој су отворени вентили V-1, V-2, V-3 и V-9 док су остали вентили затворени (слика 18). На тај начин нкСО₂ пролази само кроз екстрактор (не и адсорпциону колону), у коме је претходно смештен биљни материјал, док се на излазу из система врши сепарација екстракта од растварача у стакленој епрувети (сепаратор).

У експериментима је употребљено по 15 g смиља. Након смештања биљног материјала у екстрактор, нкСО₂ је уведен у систем на исти начин као током НКЕ на нижем притиску. Сепарација екстракта од растварача вршена је у стакленој епрувети на излазу из система. Притисак у систему је одржаван помоћу регулатора притиска са повратним током (*back pressure* регулатора).

У експерименту са косоловентом, етанол је додат у количини од 10 мас.% у односу на масу СО₂ утрошеног за екстракцију из смиља без употребе косолвента. Након завршетка експеримента, етанол је уклоњен из смеше са екстрактом смиља помоћу ротационог вакуум упарача.

Екстракциони приноси су израчунавани помоћу једначине (1), након потрошње СО₂ од приближно 66 g/g биљног материјала. Средње време трајања екстракција износило је 5,5 h, а средњи масени проток СО₂ 0,19 kg/h.

Промене у хемијском саставу екстраката такође су праћене са становишта индивидуалних компонената, као и група једињења. Експерименти су изведени три пута.

3.2.2. Синтеза ксерогелова скроба

У циљу синтезе ксерогелова скроба најпре су синтетисани хидрогелови. Кукурузни скроб у праху (10 g) је помешан са дестилованом водом у масеном односу 1:10. Добијени раствор је потом загреван у уљаном купатилу, уз мешање помоћу магнетне мешалице (Age Magnetic Stirrer, VELP Scientifica, Италија), брзином од 250-500 обртаја/min, на температури од 100°C, током 20 min. Добијени хидрогелови су потом изливени у петри шољу, преливени ацетоном (100 mL) и остављени у фрижидер (8°C). Након 5 дана боравка у фрижидеру, добијени ацетогелови дебљине од 4,0±0,5 mm су исечени на мање дискове пречника 1 cm.

Наредних 10 дана ацетогелови су сушени на ваздуху, на собној температури, у циљу уклањања ацетона и добијања ксерогелова.

Ксерогелови су такође добијени и сушењем алкогелова, контролисаном изменом воде у хидрогеловима. Након изливања хидрогелова у петри шољу, извршено је преливање топлим (40°C) 10%-ним етанолом. Након хлађења на собној температури, хидрогелови су остављени у фрижидер да ту остану преко ноћи. Наредног дана, растварач за измену воде је одливен, а хидрогелови преливени 20%-ним етанолом и враћени у фрижидер да остану преко ноћи. Ова процедура је понављана током наредних дана, с тим што су се хидрогелови преливали растворима са сукцесивно већим садржајем етанола (30-96%), у циљу спречавања деструкције пора хидрогелова. Добијени алкогелови дебљине од $4,0 \pm 0,5$ mm су исечени на мање дискове пречника 1 cm. Наредних 10 дана алкогелови су сушени на ваздуху, на собној температури, у циљу уклањања етанола и добијања ксерогелова.

3.2.3. Наткритична импрегнација

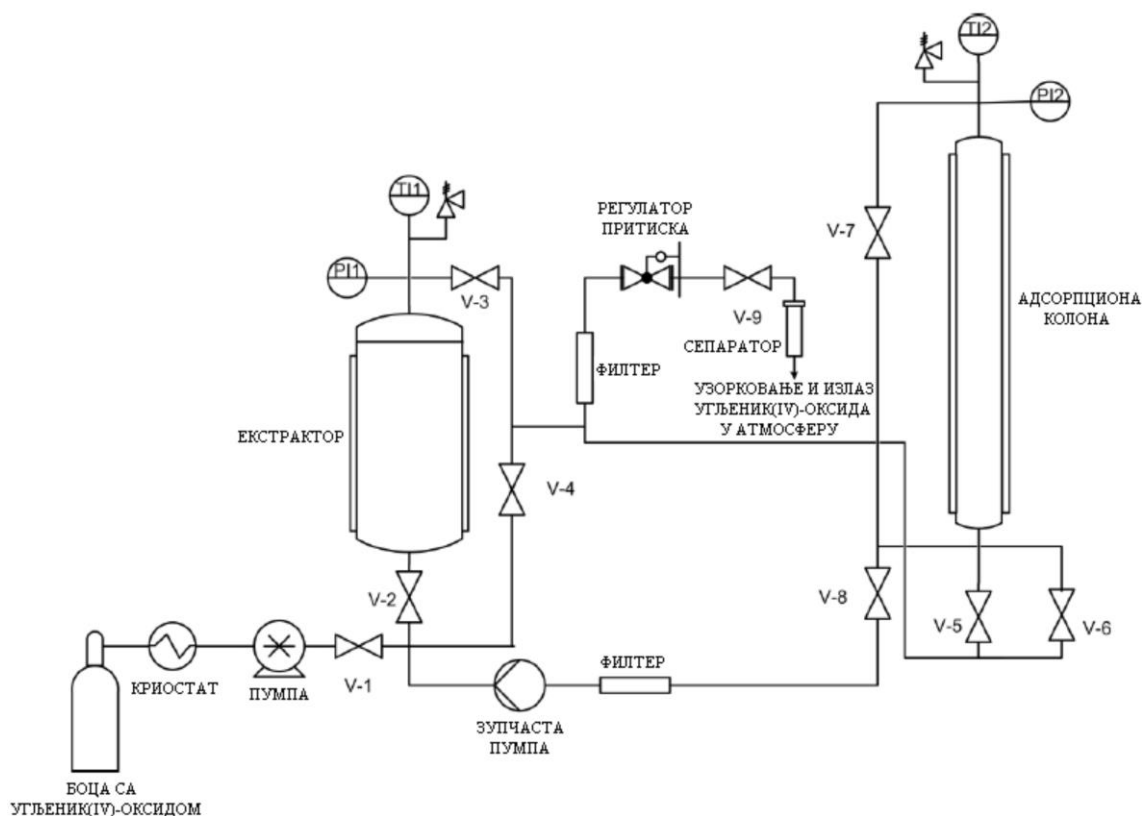
3.2.3.1. Опис постројења за интегрисани процес наткритичне екстракције и наткритичне импрегнације

Шема НРЕА 500 постројења (Eurotechnica GmbH, Немачка) за интегрисани НКЕ-НКИ процес приказана је на Слици 18. Постројење је пројектовано за рад на притисцима максималне вредности од 50 МПа и температурама максималне вредности од 100°C. Главни делови постројења су екстрактор, адсорпциона колона, регулатор притиска и зупчаста пумпа.

Екстрактор је израђен од нерђајућег челика и пројектован за максималне вредности притиска и температуре од 55 МПа и 120°C, редом. Његова унутрашња запремина износи 280 mL. Адсорпциона колона, такође израђена од нерђајућег челика, пројектована је за максималне вредности притиска и температуре од 69 МПа и 250°C респективно. Њена запремина износи 100 mL. Зупчаста пумпа обезбеђује циркулацију nkCO_2 унутар постројења и пројектована је за максималне вредности притиска и температуре од 50 МПа и 100°C респективно. Регулатор притиска одржава притисак система константним, са осцилацијама од ± 0.5 МПа.

У овој дисертацији интегрисани НКЕ-НКИ процес је вршен шаржно уз циркулацију наткритичног флуида кроз екстрактор и адсорпциону колону, без додатка нових количина свежег CO₂ у систем. На почетку процеса, у претходно напуњене биљним материјалом са или без косолвента екстрактор и носачем за импрегнацију адсорпциону колону, увођен је CO₂, преко криостата и пумпе до постизања жељених услова.

Након достизања оперативних вредности притиска и температуре, обезбеђена је циркулација нкCO₂ кроз постројење, пуштањем у рад зупчасте пумпе и затварањем вентила V-1. Након истека задатог времена циркулације (времена импрегнације), вршена је декомпресија система.



Слика 18. Шема постројења за наткритичну екстракцију на вишем притиску и интегрисани процес наткритичне екстракције и наткритичне импрегнације

Принос импрегнације (I) израчунаван је према следећој једначини:

$$I = \frac{m_i - m}{m_i} \cdot 100\% , \quad (4)$$

при чему је m_i маса импрегнираног носача на крају експеримента, док је m_0 почетна маса носача.

3.2.3.2. Наткритична импрегнација памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом смиља

Интегрисани процес НКЕ из смиља и НКИ памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом изведен је помоћу чистог ncSO_2 и уз употребу етанола као косолвента, у истој количини у којој је употребљен за НКЕ из смиља на вишем притиску. Вредности притиска и температуре износиле су 35 МПа и 40°C, респективно. Почетна маса биљног материјала у екстрактору износила је $20,8 \pm 0,4$ g. Однос маса биљног материјала и носача је у свим експериментима износио 10. Време импрегнације у свим експериментима износило је 5 h. Брзина декомпресије износила је 3,5 МПа/min. Експериментални услови су одабрани на основу резултата прелиминарних и претходних истраживања у којима је примењен овај процес за импрегнацију памучне газе екстрактом тимијана (Ivanović и сар., 2014).

3.2.3.3. Наткритична импрегнација ксерогелова скроба екстрактом смиља

Када је у питању интегрисани процес НКЕ из смиља и НКИ ксерогелова скроба екстрактом, примењене су претходно наведене вредности притиска и температуре (35 МПа и 40°C), док су остали параметри варирани са циљем да се испита утицај сваког од њих на принос импрегнације, тј. да се дефинише комбинација параметара при којој се постиже највећи принос импрегнације. Тако су вредности односа маса биљног материјала и носача у експериментима износиле 10 и 20, док су испитане вредности времена импрегнације од 5 h и 8 h. Коришћен је такође етанол као косолвент, у количини у којој је употребљен за импрегнацију памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом смиља. Почетна маса биљног материјала износила је $26,6 \pm 0,3$ g, док је брзина декомпресије имала константну вредност од 3,5 МПа/min. Сви експерименти урађени су по два пута.

3.2.4. Методе анализе

3.2.4.1. Гасна хроматографија (GC-FID)

Анализа узорака гасном хроматографијом изведена је на HP-5890 Series II GC апаратури, са пламено-јонизујућим детектором (FID), опремљеној са инјектором и аутоматским семплером, прикљученим на HP-5 колону (25 m x 0.32 mm, 0.52 μ m дебљине филма). Проток носећег гаса (H_2) износио је 1 mL/min, однос раздељивања 1:30, температура инјектора 250°C, температура детектора 300°C, док је температура колоне линеарно програмирана од 40 до 260°C (брзина раста 4 °C/min), а затим изотермно одржавана на 260°C у току 10 min. Раствори узорака у смеси хлороформ-метанол (7:3) су сукцесивно инјектовани у запремини од 1 μ L. Проенти површине, које компоненте заузимају на површини хроматограма, коришћени су као основа за квантитативну анализу.

3.2.4.2. Гасна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом (GC-MS)

Слични услови су примењени и у GC-MS анализи. Анализа је вршена у колони HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m дебљине филма), уз употребу HP G 1800C Series II GCD система. Као носећи гас коришћен је хелијум. Систем је радио на температури од 260°C. Масени спектар је добијен у EI облику (70 eV), у m/z опсегу 40-450. Инјектоване су запремине од 0,2 μ L раствора узорка у смеси хлороформ-метанол (7:3). Компоненте екстраката су идентификоване поређењем њихових спектра са литературним из база података Wiley 275 и NIST/NBS. Експерименталне вредности ретенционих (Kovatz-евих) индекса одређиване су употребом Amdis ver. 2.1 софтвера и поређене са литературним из Adams базе података.

3.2.4.3. Одређивање укупног садржаја фенола

Одређивање укупног садржаја фенола је извршено у екстрактима добијеним на 350 bar и 40°C, са и без додатка косолвента. За то је примењена

модификована Folin-Ciocalteu метода (Singleton и Rossi, 1956). Узорци екстраката су најпре растворени у метанолу до постизања концентрације од 1 mg/mL. Затим је по 0.1 mL сваког од екстраката мешано са 0,5 mL Folin-Ciocalteu реагенса и 6 mL дестиловане воде, у трајању од једног минута. Након мешања, у смешу је додато 1,5 mL 20%-ног натријум карбоната, након чега је смеша поново мешана 30 секунди. На крају, у смешу је додата дестилована вода док запремина није износила 10 mL. Након 2 h мировања смеше на собној температури и на тамном месту, мерена је апсорбанција на 750 nm на UV-Vis спектрофотометру HP 8453 (Agilent Technologies, САД). Као стандардна крива коришћена је крива галне киселине (од 1-1,5 µg/mL), а укупан садржај фенола је изражен у mg еквивалената галне киселине (GAE)/g сувог екстракта.

3.2.4.4. Одређивање укупног садржаја флавоноида

Одређивање укупног садржаја флавоноида извршено је применом колориметријске методе са алуминијум хлоридом (Zhishen и сар., 1999), такође у екстрактима добијеним на 35 МПа и 40°C, са и без додатка косолвента. Аликвоти (1 mL) концентрације 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 и 0,10 mg/mL раствора катехина и екстраката у метанолу смештани су у волуметријске бочице запремине 10 mL, у којима се налазило 4 mL воде. Затим је у бочице додато 0,3 mL 5%-ног натријум нитрита, а након 5 минута додато је 0,3 mL 10%-ног алуминијум хлорида. Током шестог минута у смешу је додато 2 mL 1M раствора натријум хидроксида, а затим је смеша допуњена водом до постизања запремине од 10 mL. Апсорбанција је мерена на 510 nm на UV-Vis спектрофотометру HP 8453 (Agilent Technologies, САД). Укупан садржај флавоноида је изражен у mg еквивалената катехина (CE)/g сувог екстракта.

3.2.4.5. Карактеризација ксерогелова

Морфологија ксерогелова скроба, добијених сушењем ацето- и алкогелова, испитана је помоћу скенирајуће електронске микроскопије емисијом електрона/применом поља (FE-SEM) (Mira 3 XMU TESCAN a.s., Чешка

Република), оперативној при напону убрзања од 10 kV. Узорци ксерогелова су претходно напарени танким Au/Pd (85:15) слојем у одговарајућем напаравачу (POLARON SC502, Fisons Instruments, Велика Британија).

Густина и порозност ксерогелова скроба одређени су помоћу методе засноване на употреби пикнометра. Густина узорака ксерогелова (ρ_x) израчунавана је помоћу једначине (5), на основу претходно дефинисане процедуре (Xu и сар., 2004):

$$\rho_x = \frac{\rho_{H_2O} \times m_1}{m_1 + m_2 - m_3}, \quad (5)$$

при чему је m_1 маса узорка, m_2 маса пикнометра са водом, а m_3 маса пикнометра са водом и узорком. Густина воде (ρ_{H_2O}) употребљене за израчунавање густине ксерогела добијеног сушењем ацетогела износила је $996,0 \pm 0,1 \text{ kg/m}^3$ (температура $28,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$), док је њена вредност за израчунавање густине ксерогела добијеног сушењем алкогела износила $996,3 \pm 0,1 \text{ kg/m}^3$ (температура $27,8 \pm 0,2^\circ\text{C}$). Мерења су вршена три пута. Порозност ксерогелова (ϵ) израчунавана је помоћу следеће једначине (Salerno и сар., 2011):

$$\epsilon(\%) = \left(1 - \frac{\rho_x}{\rho_s}\right) \times 100, \quad (6)$$

при чему је ρ_s густина сировог скроба ($1,5 \text{ g/cm}^3$ – податак добијен од произвођача).

3.2.5. Одређивање антиоксидантног дејства екстраката

Испитивање антиоксидантног дејства екстраката смиља, добијених у процесу НКЕ на 35 МПа и 40°C , са и без додатка косолвента, извршено је применом DPPH и FRAP тестова.

Способност инхибиције DPPH-радикала од стране екстраката је тестирана помоћу методе коју је развио Espin (2000). На почетку је $80 \mu\text{L}$ екстракта

растворено у метанола у циљу постизања најмање 4 различите концентрације (0,2-1 mg биљног материјала/mL). Затим су узорци помешани са 2,92 mL метанола и 1 ml свежег раствора DPPH-а у метанола, концентрације 90 $\mu\text{mol/L}$, уз снажно мућкање, након чега је смеша остављена да мирује на собној температури током 30 минута. Апсорбанција је мерена на 517 nm, уз чист метанол као слепу пробу. Процент инхибиције (PI) DPPH-радикала израчунаван је према следећој једначини:

$$PI = \frac{A_c - A_s}{A_c} \cdot 100\% , \quad (7)$$

при чему је A_c апсорбанција контролног једињења, а A_s апсорбанција узорка. Као контролно једињење употребљена је синтетичка *L*-аскорбинска киселина.

FRAP метода се заснива на испитивању способности редукције жутог комплекса Fe^{3+} -2,4,6-трипиридил-*s*-триазин (TPTZ) до плавог комплекса Fe^{2+} -TPTZ тестираних узорака, у киселој средини. Редукција је праћена мерењем промена апсорбанције на 539 nm. За испитивање антиоксидантног дејства екстракта смиља, добијених на 35 MPa и 40°C, са и без додатка косолвента, употребљена је FRAP-метода коју су предложили Benzie и Strain (1996). FRAP реагенс је припремљен мешањем 10 јединица запремине 300 mmol ацетатног пуфера (pH 3,6), који садржи 6,4 mL 2 mol натријум ацетата и 93,6 mL 2 mol сирћетне киселине, растворених у волуметријској боци (1 L), са једном јединицом запремине 10 mmol TPTZ-а, раствореног у 40 mmol хлороводоничне киселине, и једне јединице запремине 20 mmol гвожђе хлорида. За стандардну калибрациону криву искоришћен је водени раствор $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ у различитим концентрацијама (0,1-1 mmol). За одређивање антиоксидантног дејства, 100 μL раствора екстракта у метанола, концентрације 1 mg сувог екстракта/ml, помешано је са 3 mL FRAP реагенса. Мерење апсорбанције започето је након 10 минута на 593 nm, уз чист метанол као слепу пробу (100 μL). FRAP вредности су изражене у mmol Fe (II) еквивалената/g екстракта, на основу стандардне калибрационе криве.

3.2.6. *In vivo* тестирање дејства импрегнираних материјала на иритирану кожу

Импрегнирани текстилни материјали су *in vivo* тестирани у третману вештачки иритиране коже подлактице, при једночасовној оклузији. За ту сврху је ангажовано 14 здравих добровољаца старости између 23 и 25 година. Параметри безбедности топикалне примене који су испитивани након иритације били су: трансепидермални губитак влаге (TEWL – Transepidermal Water Loss), еритема индекс (EI – Erythema Index) и pH коже. Са друге стране, ефикасност топикалних препарата посматрана је кроз промене у хидратацији слоја *stratum corneum* (највишег слоја покожице који је у непосредном додиру са спољашњом средином), односно кроз промене електричне капацитивности (EC – Electrical Capacitance). Наведени параметри су мерени пре почетка (базалне вредности) и 30 минута након завршетка оклузије. Импрегнираним текстилним материјалима третирана је предња (флексорна) страна подлактице испитаника, при чему је за мерење коришћен прецизно градуисан и означен картонски лењир, са отворима у облику правоугаоника, површине 16 cm². Дефинисана су и два додатна места – једно нетретирано контролно место оклузије и једно за прорачун базалних вредности горепомнутих параметара. Након оклузије, третирана места на подлактицама су заштићена Parafilm®-ом и памучним лепљивим тракама.

In vivo испитивања су вршена у складу са Хелсиншком декларацијом, при чему су испитаници изразили писмену сагласност за учешће у експерименту. Претходно им је скренута пажња на то да не користе никаква хигијенска или козметичка средства на местима подлактице предвиђеним за тестирање недељу дана пре, као и током самих испитивања. Извођење ових испитивања одобрено је од стране надлежног Етичког комитета (број одобрења 12-6316-2/8, од 16. 06. 2016. год.). Кожа свих испитаника је у тренутку испитивања била здрава, без алергијских реакција на састојке импрегнираних текстилних материјала. Пре почетка испитивања вршена је получасовна аклиматизација испитаника на амбијенталне услове (температура од 21±1°C и релативна влажност ваздуха од 50±5%).

Измерене вредности параметара TEWL, pH, EI и EC за све текстилне материјале, као и за нетретирано контролно место оклузије изражени су у виду апсолутних промена у односу на базалне вредности (Δ вредности) и поређене коришћењем једнофакторске анализе варијансе и Tuckey-овог post hoc теста. Разлике вредности измерених параметара и базалних вредности су сматране статистички значајним за вредности нивоа значајности (p-вредности) мање од 0,05.

3.2.6.1. Мерење трансепидермалног губитка влаге (TEWL)

Мерење трансепидермалног губитка влаге представља мерење садржаја влаге која испарава са површине коже. То је важан параметар за евалуацију баријерне функције коже, односно њеног слоја *stratum corneum*. Одређена количина влаге испарава са површине коже као продукт нормалног метаболизма коже. Када је баријерна функција оштећена губитак влаге се повећава, чак и при оштећењима која нису видљива голим оком.

Мерење параметра TEWL је извршено помоћу уређаја Tewameter[®]TM 210 (Courage + Khazaka, Немачка). Мерење је засновано на одређивању градијента густине влаге која испарава са површине коже, помоћу сензора за температуру и релативну влажност, смештених унутар шупљег цилиндра. Овом методом је могуће вршити мерења без утицаја на микрооколину тестираног места на кожи.

3.2.6.2. Мерење еритема индекса (EI)

Мерење еритема индекса извршено је помоћу уређаја Mexameter[®]MX 18 (Courage + Khazaka, Немачка). Рад овог уређаја заснован је на принципу апсорпције светлости различитих таласних дужина и познате количине, коју шаље емитер од стране површине коже. Количина светлости коју површина коже рефлектује мери се помоћу рисивера. Емитер и рисивер су постављени тако да се могу вршити мерења искључиво дифузионе светлости. Испитивања апсорпционог капацитета коже се обично врше коришћењем светлости двеју различитих таласних дужина. Једна од њих је таласна дужина апсорпционог спектра

хемоглобина, док се друга подешава за поништавање утицаја других боја (нпр. билирубин). Уређај је веома осетљив и може да измери широк спектар вредности еритема индекса (0-999), чак и при најмањим променама боје коже.

3.2.6.3. Мерење рН коже

рН вредност здраве коже варира између 5,0 и 6,0, док у највећем броју патолошких промена расте. Уређај који је искоришћен за мерење рН коже у овој дисертацији био је Skin-pH-Meter® PH905 (Courage + Khazaka, Немачка). Принцип рада овог уређаја заснован је на мерењу разлике потенцијала између две средине – пуферне референтне електроде (најчешће стаклене) и коже, раздвојених стакленом преградом. Електрични напон је у линеарној зависности од разлике концентрација водоникових јона у медијумима. Тачност мерења овог уређаја износи 0,1 рН јединица.

3.2.6.4. Мерење електричне капацитивности (ЕС) коже

Мерење електричне капацитивности коже извршено је помоћу уређаја Corneometer®СМ 825(Courage + Khazaka, Немачка). Овај уређај врши мерења капацитивности коже као диелектричног медијума. Помоћу њега је могуће детектовати и најмање промене диелектричне константе тестираног материјала, које настају на површини коже као резултат хидратације, имајући у виду да вода поседује велику вредност диелектричне константе. Мерења се врше помоћу електроде притиска од 1,5 N/m², који је контролисан помоћу уграђене опруге. Садржај воде је одређен у малим дубинама слоја *stratum corneum* (10-20 µm), елиминишући притом утицај дубљих слојева коже на исход мерења. Промене укупне електричне капацитивности изражене су у релативним корнеометријским јединицама (RCU), у рангу од 0-120.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. НАТКРИТИЧНА ЕКСТРАКЦИЈА ИЗ СМИЉА НА НИЖЕМ ПРИТИСКУ

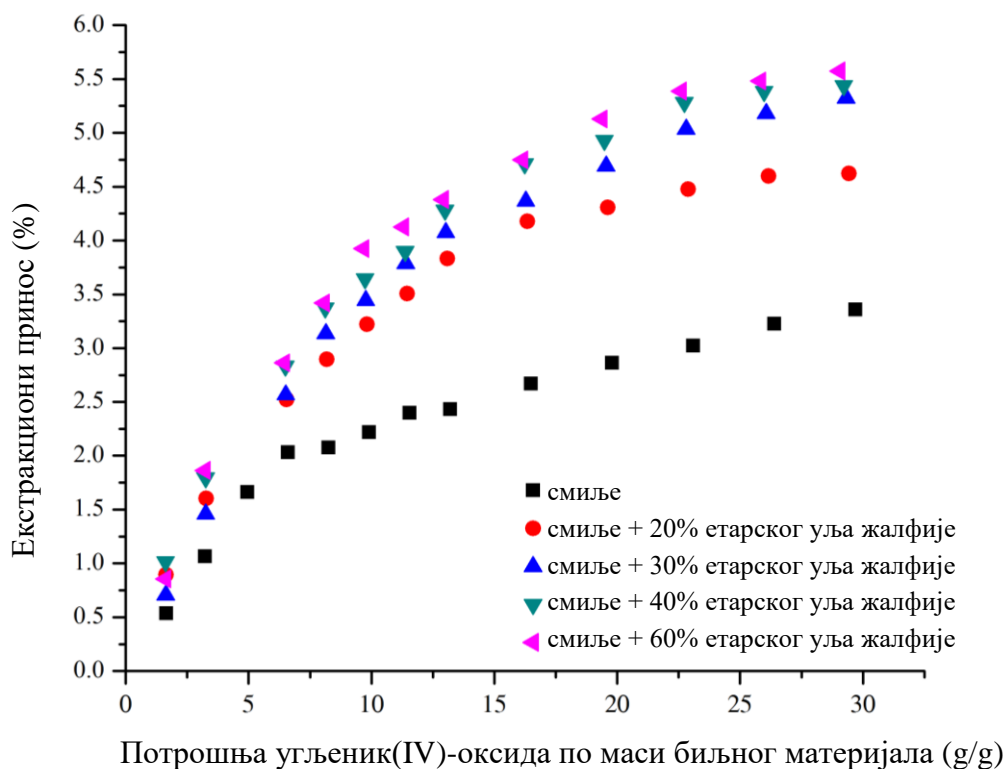
4.1.1. Принос наткритичне екстракције и утицај косолвента

Сет експеримената НКЕ на нижем притиску састојао се од 5 експеримената. Сви експерименти су изведени на притиску од 15 МРа и температури од 40°C, најпре помоћу чистог CO₂, а затим са додатком 4 различите количине етарског уља жалфије, добијеног поступком хидродестилације, као косолвента. Добијени су светложути, смоласти екстракти. Етарско уље жалфије је додато у количини од 20, 30, 40 и 60 масених процената од екстракционог приноса из смиља добијеног без употребе косолвента. Као што је описано у делу 3.2.1.1., за сваки од експеримената реализованих уз додаток косолвента, израчунавана је разлика између постигнутог и очекиваног екстракционог приноса (додатна маса екстракта), са циљем да се дефинише оптимална количина етарског уља жалфије која ће довести до највећег екстракционог приноса. Експериментални резултати су приказани у Табели 11.

Табела 11. Подаци за НКЕ из смиља на нижем притиску

Маса смиља (g)	Маса етарског уља жалфије (g)	Принос (%)	Маса екстракта (g)	Очекивана маса екстракта (g)	Додатна маса екстракта (g)
30,31	-	3,36	1,02	-	-
30,34	0,23 (20%)	4,62	1,41	1,25	0,17
30,35	0,35 (30%)	5,32	1,63	1,37	0,26
30,34	0,45 (40%)	5,44	1,68	1,47	0,20
30,34	0,64 (60%)	5,58	1,73	1,66	0,07

Екстракционе криве, на којима је приказана зависност екстракционих приноса од потрошње nkCO_2 , дате су на Слици 19. На основу приложеног, може се видети да је етарско уље жалфије као косолвент значајно допринело повећању брзине екстракције у првој фази процеса која је лимитирана растворљивошћу секундарних метаболита у наткритичној фази. Такође се може претпоставити да се комплетно етарско уље жалфије екстрахује из система у прве 2-3 фракције. Са друге стране, посматрајући податке из Табеле 11, вредности додатне масе екстракта указују да оптимална количина етарског уља жалфије, која је условила највећу додатну масу екстракта, износи 30% од приноса екстракције из смиља без додатка косолвента. Присуство оптималне количине додатог етарског уља жалфије повећало је екстракциони принос за скоро 20% и може бити доказ да се растварачка моћ и селективност nkCO_2 заиста мењају када се као косолвент за НКЕ из смиља користе секундарни метаболити присутни у жалфији.



Слика 19. Криве НКЕ из смиља на ниском притиску

4.1.2. Хемијски састав екстраката и утицај косолвента

Одређивање хемијског профила екстраката смиља и етарског уља жалфије извршено је помоћу GC-FID и GC-MS метода, а резултати идентификације и квантификације компонената су дати у Табели П1 (Прилог). За експерименте у којима је коришћен косолвент, у Табели П1 дати су и подаци о масеним процентима идентификованих компонената како у екстракту, укључујући и етарско уље жалфије, тако и у делу екстракта који припада само смиљу. Расподела састава група једињења – монотерпена, сесквитерпена, дитерпена, воскова и осталих једињења такође је приказана у погледу њихових укупних масених процената у екстрактима. Подаци потребни за пондерацију су дати у Табели П2 (Прилог).

НКЕ из смиља са и без додатка различитих количина етарског уља жалфије резултовала је изолацијом:

- из смиља – 2 монотерпена, 43 сесквитерпена, 8 дитерпена, 10 воскова и једног једињења из групе осталих једињења (*n*-хексадеканол);
- из смиља са додатком етарског уља жалфије – 19 монотерпена, 38-45 сесквитерпена, 9 дитерпена, 10 воскова и једног једињења из групе осталих једињења (*n*-хексадеканол).

Расподела састава карактеристичних група једињења дата је на Слици 20.

Приметно је да је додаток етарског уља жалфије као косолвента изазвао значајан пораст масеног процента монотерпена у екстрактима смиља. Тај пораст је бивао израженији са повећањем масе додатог етарског уља, док се са друге стране одвијало сукцесивно снижавање укупног масеног процента осталих група једињења са повећањем масе додатог етарског уља жалфије.

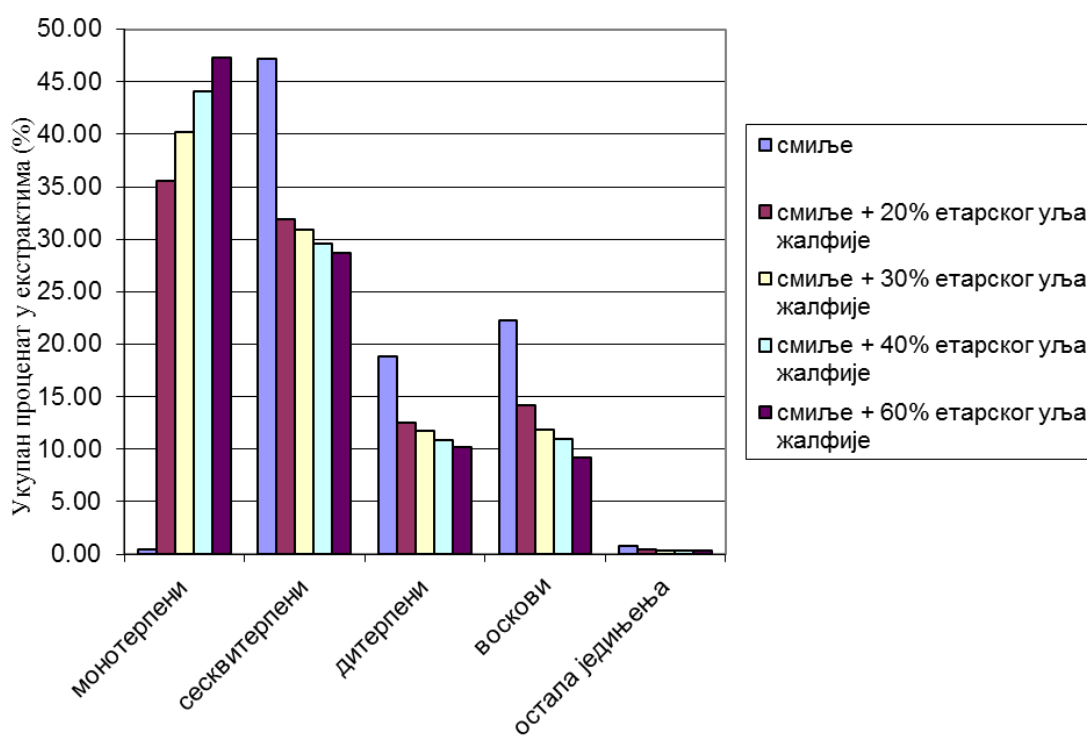
Најзначајније промене процената појединачних компонената у екстрактима смиља дате су у Табели 13. Вредности процената се, за све случајеве НКЕ, односе на делове екстраката који потичу само од смиља.

Када су у питању појединачни монотерпени, екстракција из смиља помоћу nkCO_2 без додатка етарског уља жалфије резултовала је издвајањем једино *a*-пинена, као карактеристичног представника монотерпена, имајући у виду

литературне податке о монотерпенима заступљеним у наткритичним екстрактима смиља, док су монотерпени из смиља попут камфена, 1,8-цинеола, *p*-цимена, линалола и лимонена детектовани у занемарљивим траговима. Додатак етарског уља жалфије не само да је поспешио екстракцију појединих монотерпена карактеристичних за смиље (камфен и 1,8-цинеол), већ је изазвао у великој мери и екстракцију монотерпена карактеристичних за етарско уље жалфије (*cis*- и *trans*-тујона, камфора, борнеола и борнил ацетата). Са друге стране, проценат сесквитерпена и на појединачном плану махом опада са додатком етарског уља жалфије, при чему су најосетливији падови забележени код канелала и α -сантонина. Међутим, код виридифлорола, који је заједнички сесквитерпен за екстракт смиља и етарско уље жалфије, забележен је значајан правилан пораст процента у екстракту са порастом количине додатог етарског уља. Манол, који је дитерпен карактеристичан само за етарско уље жалфије, издвојен је у растућем проценту као део екстракта смиља када је коришћен косолвент. Са друге стране, састав дитерпена детектованих у наткритичном екстракту из смиља без додатка косолвента се сукцесивно смањивао, при чему је најзначајнија негативна промена забележена код цембренола. Негативне промене процената са додатком косолвента су забележене и код свих воскова, међу којима предњаче 1-циклохексилеикозан и октакозан.

Подаци из Табела П1 и 13 показују да додатак етарског уља жалфије поспешује екстракцију монотерпена из смиља, како оних који су карактеристични само за екстракт смиља, тако и оних који потичу из етарског уља жалфије, повећавајући њихову растворљивост у нкСО_2 . Тај ефекат је изазвао промену читавог хемијског профила наткритичног екстракта смиља. Такође је показано да додатак етарског уља жалфије изазива промену селективности нкСО_2 . Селективност нкСО_2 према монотерпенима значајно је повећана на рачун смањења селективности према сесквитерпенима, дитерпенима, восковима и осталим једињењима.

Треба напоменути да је у овом случају могуће говорити и о значајним променама процента појединачних компонената које не припадају групи монотерпена.



Слика 20. Профил састава екстраката смиља и смеша смиља и различитих количина етарског уља жалфије

На крају, за компоненте као што су монотерпени *cis*- и *trans*-тујон, камфор, борнеол и борнил ацетат и дитерпен манол, може се претпоставити да су присутне у унутрашњој структури цветова смиља, али их је немогуће изоловати употребом чистог nkCO_2 . У сваком случају, постигнути резултати захтевају даља детаљнија испитивања растворљивости различитих једињења присутних у цветовима смиља уколико се етарско уље жалфије, или нека од његових кључних компонената, користи као косолвент у процесу екстракције помоћу nkCO_2 .

Табела 13. Значајне промене процента појединачних компонената током НКЕ из смиља на нижем притиску

Компоненте	RI ^a	Укупан проценат (%)				
		Смиље	Смиље + 20% етарског уља жалфије	Смиље + 30% етарског уља жалфије	Смиље + 40% етарског уља жалфије	Смиље + 60% етарског уља жалфије
Монотерпени						
<i>α</i> -пинен	932	0,36	1,55	1,67	0,76	-
камфен	946	-	1,41	1,55	0,87	0,29
1,8-цинеол	1026	-	5,28	5,86	5,99	6,09
<i>cis</i> -тујон	1101	-	11,07	12,57	14,64	16,19
<i>trans</i> -тујон	1112	-	2,68	3,00	3,51	3,87
камфор	1141	-	8,55	9,79	11,70	13,30
борнеол	1165	-	1,77	2,06	2,62	3,26
борнил ацетат	1287	-	1,00	1,18	1,44	1,64
Сесквитерпени						
<i>trans-α</i> -бергамотен	1432	1,46	0,81	0,70	0,73	0,69
<i>α</i> -хумулен	1452	0,11	0,61	0,70	0,86	1,01
<i>γ</i> -куркумен	1481	2,16	1,13	0,95	0,94	0,88
<i>β</i> -селинен	1489	1,30	0,69	0,56	0,56	0,53
карофилен оксид	1582	2,58	1,88	1,44	1,35	1,16
виридифлорол	1592	0,35	2,93	3,51	3,94	4,68
гвајол	1600	2,10	1,24	1,10	0,60	0,52
ледол	1602	1,32	0,30	0,30	0,31	0,30
селин-11-ен-4- <i>α</i> -ол	1658	1,52	0,81	0,70	0,64	0,64
<i>epi-β</i> -бисаболол	1670	3,68	2,09	1,84	1,56	1,54
<i>γ</i> -бициклохомофарнезал	1784	1,67	1,04	0,92	0,87	0,80
канелал	2045	10,44	5,90	6,19	5,40	5,22
<i>α</i> -сантонин	2203	8,09	4,73	4,73	4,26	3,89

Табела 13. Наставак

Компоненте	RI	Укупан проценат (%)				
		Смиље	Смиље + 20% етарског уља жалфије	Смиље + 30% етарског уља жалфије	Смиље + 40% етарског уља жалфије	Смиље + 60% етарског уља жалфије
<i>Дитерпени</i>						
манол	2056	-	0,79	0,85	1,00	1,30
лауренан-2-он	2115	2,17	1,69	1,23	1,19	0,85
цембренол	2131	9,16	5,48	5,26	4,72	4,55
инцензол	2158	1,26	0,75	0,70	0,67	0,58
лабда-8(7),14-диен-6,13-диол	2248	1,96	1,17	1,10	1,00	0,95
торулозол	2360	1,37	0,80	0,78	0,69	0,62
<i>Воскови</i>						
1-циклохексилеикозан*	n/a ^b	4,17	2,32	2,25	2,02	1,88
пентакозан	2500	1,84	0,97	0,81	0,81	0,72
хептакозан	2700	2,68	1,52	1,19	1,20	1,15
октакозан	2800	10,21	7,16	5,81	5,25	3,10

*тентативна идентификација; ^aретенциони (Kovatsz) индекс; ^bn/a-недоступно

4.2. НАТКРИТИЧНА ЕКСТРАКЦИЈА ИЗ СМИЉА НА ВИШЕМ ПРИТИСКУ

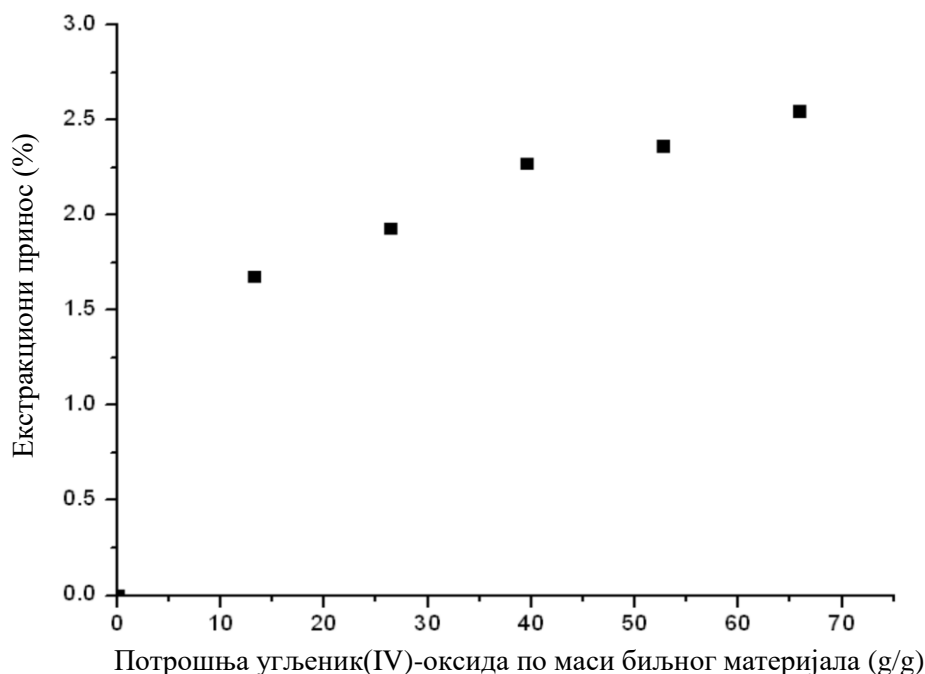
4.2.1. Принос наткритичне екстракције и утицај косолвента

Овај експериментални сет састојао се од екстракције из смиља на притиску од 35 МПа и температуре од 40°C, најпре помоћу чистог нкСО₂, а затим уз додатак етанола као косолвента, у количини од 10 мас.% у односу на количину чистог нкСО₂ употребљеног у првом експерименту. Експериментални подаци са резултатима приказани су у Табели 14. Кинетика екстракције из смиља помоћу чистог нкСО₂ приказана је на Слици 21. Екстракциону криву за случај НКЕ из смиља уз употребу косолвента није било могуће приказати због паралелног издвајања етанола са екстрактом.

Табела 14. Подаци за НКЕ из смиља на вишем притиску

Експеримент	Маса смиља (g)	Маса косолвента (g)	Маса екстракта (g)	Принос (%)
НКЕ без косолвента	15,2±0,2	-	0,5±0,01	2,7±0,5
НКЕ са косолвентом	15,2±0,1	100	1,0±0,02	5,9±0,7

Екстракцијом из смиља помоћу чистог нкСО₂ на притиску од 35 МПа и температуре од 40°C остварен је принос од 2,7±0,5%. Додатак етанола као косолвента допринео је постизању екстракционог приноса од 5,9±0,7%. Дупло виши екстракциони принос постигнут додатком етанола указује на снажан утицај истог на моћ растварања нкСО₂ када је у питању НКЕ из смиља на примењеном притиску и температури екстракције.



Слика 21. Крива НКЕ из смиља на вишем притиску без додатка косолвента

4.2.2. Хемијски састав екстракта и утицај косолвента

4.2.2.1. Резултати GC-FID и GC-MS аналитичких метода

Анализа екстракта смиља добијених у процесу НКЕ на вишем притиску, помоћу метода GC-FID и GC-MS, резултовала је идентификацијом 58 компонената (97,1% у укупном екстракту), за екстракт добијен помоћу чистог nkCO_2 , односно 52 компоненте (93,9% у укупном екстракту), за екстракт добијен уз употребу косолвента. Процентни садржај компонената, као и појединих група једињења у екстрактима, приказан је у Табели ПЗ (Прилог). Процентуални садржаји најважнијих представника сваке од група једињења у оба екстракта дати су у Табели 15.

На основу података из Табеле ПЗ, у погледу промена састава група једињења када је етанол коришћен као косолвент за НКЕ из смиља, примећује се да је етанол као косолвент модификовао и селективност nkCO_2 .

Када је етанол коришћен као косолвент, укупан садржај терпена значајно је повећан, као и садржај деривата аморфена и кумарина и угљоводоника са восковима, на рачун значајног смањења укупног садржаја масних киселина, естара, алдехида и алкохола (око 4 пута). Значајном повећању садржаја терпена са

додатком косолвента (око 1,5 пут) доприноси повећање садржаја једињења из групе сесквитерпена, док је састав монотерпена незнатно смањен.

Табела 15. Процентни садржај најважнијих представника група једињења у екстрактима смиља, добијеним у процесу НКЕ на вишем притиску

Група једињења	НКЕ без косолвента (%)	НКЕ са косолвентом (%)	Екстракт добијен након реекстракције из импрегнираног ксерогела типа 2 (%)
<i>Монотерпени</i>	лимонен (1,4), камфен хидрат (2,7), нерил ацетат (1,5), 1,8-цинеол (1,1)	лимонен (1,0), нерил ацетат (2,0), хидроксицитронелал (1,4)	-
<i>Сесквитерпени</i>	<i>ar</i> -куркумен (4,1), β -селинен (4,6), ксанторизол (2,1), селин-11-ен-4- α -ол (1,0)	<i>ar</i> -куркумен (6,4), β -селинен (4,9), селин-11-ен-4- α -ол (1,8)	<i>ar</i> -куркумен (5,6), β -селинен (1,8), δ -кадинен (2,2)
<i>Масне киселине, естри, алдехиди и алкохоли</i>	метил каприлат (9,2), метил мирилат (4,1), метил палмитат (5,0)	метил естар 2-метил-3-оксвалеринске киселине (5,2), циклохексил естар палмитинске киселине (3,2)	метил миристолеат (6,9), метил мирилат (4,0), олеинска киселина (6,1)
<i>Уљоводоници са восковима</i>	нонакозан (3,0), унтриаконтан (2,7)	нонакозан (5,9), унтриаконтан (7,4)	пентакозан (4,3), наонакозан (3,5), унтриаконтан (4,0)
<i>Деривати кумарина и аморфена</i>	3,4-дихидро-4,4,5,7,8-пентаметил кумарин-6-ол (5,9), дихидрокостунолид (2,2)	2 α -ацетокси-11-метокси-аморфа-4,7-диен (дериват) (7,0), 2 α -ацетокси-аморфа-4,7(11)-диен-8-он (дериват) (4,6), 3,4-дихидро-4,4,5,7,8-пентаметил кумарин-6-ол (6,4)	3,4-дихидро-4,4,5,7,8-пентаметил кумарин-6-ол (4,1)
<i>Остала једињења</i>	1,1-диметокси-декан-капроалдехид диметил ацетал (1,1)	-	-

Када су у питању промене састава појединачних компонената, додаток етанола као косолвента у процесу НКЕ из смиља, допринео је како детекцији нових компонената које је било немогуће издвојити помоћу чистог nkCO_2 , тако и одсуству компонената које су идентификоване у екстракту смиља добијеном помоћу чистог nkCO_2 . Анализирајући Табелу П2, закључак је да је наведена

појава изражена међу компонентама претежно из групе масних киселина, естара, алдехида и алкохола, при чему је преовладао негативан ефекат, имајући у виду смањење укупног садржаја наведених група једињења са додатком етанола као косолвента. Овоме треба додати и појаву значајних количина деривата 2 α -ацетокси-11-метокси-аморфа-4,7-диена и 2 α -ацетокси-аморфа-4,7(11)-диен-8-она, из групе деривата кумарина и аморфена, у наткритичном екстракту смиља добијеном уз додатак косолвента. Када су у питању остале групе једињења, промени њиховог квалитативног и квантитативног састава при додатку косолвента у већој мери допринела су повећања и/или смањења садржаја одговарајућих појединачних компонената. Тако су код монотерпена 1,8-цинеола и камфен хидрата и сесквитерпена ксанторизола забележена значајна смањења процента у екстракту након додатка етанола, док су код монотерпена нерил ацетата, сесквитерпена *trans*- β -кариофилена, α -бисаболена и изомера куркумена и селинена, 3,4-дихидро-4,4,5,7,8-пентаметил кумарин-6-ола и воскова нонакозана и унтриаконтана забележена значајна повећања процента у екстракту, када је коришћен косолвент.

4.2.2.2. Укупни садржаји фенола и флавоноида у екстрактима

За одређивање укупних садржаја фенола и флавоноида у екстрактима смиља употребљене су модификована Folin-Ciocalteu метода, односно колориметријска метода са алуминијум хлоридом. Резултати примењених метода приказани су у Табели 16.

Постигнути резултати показују да додатак етанола као косолвента изазива значајно смањење укупног садржаја фенола у екстракту смиља. Поред тога, укупан садржај фенола у наткритичном екстракту смиља, добијеном без употребе косолвента, значајно је већи у поређењу са укупним садржајем фенола у наткритичном екстракту, добијеном на притиску од 30 МПа и температури од 40 °C у раду Molnar и сар. (2017) (65,3 \pm 0,5 mg GAE/g сувог екстракта). Ова вредност је значајно већа и од укупног садржаја фенола у етарском уљу смиља (74 \pm 1,642 mg GAE/g узорка (Wang и сар., 2008), хексанском (67,4 \pm 3,1 mg GAE/g сувог екстракта (Molnar и сар., 2017)) и воденом екстракту (15,69 \pm 0,17 mg GAE/g сувог

екстракта (Kazazić и сар., 2016)), а блиска или већа од укупног садржаја фенола у етанолном екстракту ($31,97 \pm 1,42$ mg GAE/g сувог екстракта (Kladar и сар., 2015), $104,8 \pm 6,0$ mg GAE/g сувог екстракта (50%-ни етанол) и ($132,1 \pm 3,8$ mg GAE/g сувог екстракта (96%-ни етанол) (Molnar и сар., 2017)).

Табела 16. Укупни садржаји фенола и флавоноида у екстрактима смиља добијених у процесу НКЕ на високом притиску

Узорак	Укупан садржај фенола (mg GAE/g сувог екстракта)	Укупан садржај флавоноида (mg CE/g сувог екстракта)
Екстракт добијен без употребе косолвента	$130,27 \pm 1,14$	$40,67 \pm 0,53$
Екстракт добијен са употребом косолвента	$57,77 \pm 1,01$	$48,02 \pm 0,31$

Са друге стране, према подацима из Табеле 16, додаток етанола као косолвента изазвао је повећање укупног садржаја флавоноида у екстракту смиља за око 20%. Добијене вредности укупног садржаја флавоноида у наткритичним екстрактима смиља значајно су веће у поређењу са вредношћу укупног садржаја флавоноида, одређеном у етанолном екстракту смиља, у раду Kladar и сар. (2015) ($20,68 \pm 0,66$ mg QE/g сувог екстракта, QE-еквиваленти кверцетина).

На основу резултата приказаних у Табели 16, може се закључити да додаток етанола као косолвента доприноси модификацији селективности nkCO_2 и са становишта промене састава фенолних компонената у екстрактима смиља.

4.2.3. Антиоксидантно дејство екстраката смиља

За испитивање антиоксидантног дејства екстраката смиља употребљени су DPPH и FRAP тест. Резултати примењених тестова дати су у Табели 17. Показано је да наткритични екстракти смиља поседују умерено антиоксидантно дејство, што је у сагласности са литературним подацима (Costa и сар., 2015; Poli и сар., 2003; Molnar и сар., 2017).

Са друге стране, према подацима из Табеле 17, додаток етанола као косолвента допринео је благом порасту антиоксидантне активности наткритичног екстракта смиља, применом оба теста.

Табела 17. Резултати испитивања антиоксидантног дејства екстраката смиља

Узорак	Процент инхибиције DPPH радикала (%)	mmol Fe ²⁺ /g сувог екстракта
Екстракт добијен без употребе косолвента	11,50±0,10	0,32±0,04
Екстракт добијен са употребом косолвента	12,84±0,76	0,34±0,02

Имајући у виду да је укупан садржај терпена у екстракту смиља, добијеном уз употребу косолвента, око 1,5 пута већи од укупног садржаја терпена у екстракту добијеном помоћу чистог нкСО₂, док са друге стране, екстракт добијен помоћу чистог нкСО₂ поседује око 4 пута већи садржај масних киселина, естара, алдехида и алкохола и скоро 2 пута већи укупан садржај фенола у односу на екстракт добијен уз употребу косолвента, може се закључити да све наведене групе једињења, заступљене у екстрактима смиља, подједнако утичу на њихово антиоксидантно дејство.

4.3. НАТКРИТИЧНА ИМПРЕГНАЦИЈА ПАМУЧНЕ ГАЗЕ И ПОЛИ(ПРОПИЛЕН)СКЕ ТКАНИНЕ ЕКСТРАКТОМ СМИЉА

4.3.1. Принос импрегнације и утицај косолвента

Интегрисани процес НКЕ из смиља и НКИ памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом извршен је при истим вредностима притиска и температуре (35 МПа и 40°C), као и уз исту количину додатог косолвента (10 мас.%), примењеним у процесу НКЕ на вишем притиску, како би се могао применити шаржни режим комбинованог процеса у описаном постројењу, а са циљем импрегнације компонената веће молекулске масе. Константан однос маса биљног материјала и носача за импрегнацију од приближно 10, као и константна вредност брзине декомпресије од 3,5 МПа/min, одабрани су на основу резултата претходних и прелиминарних истраживања, са простором за евентуалну даљу оптимизацију. Сви експериментални подаци са резултатима дати су у Табели 18.

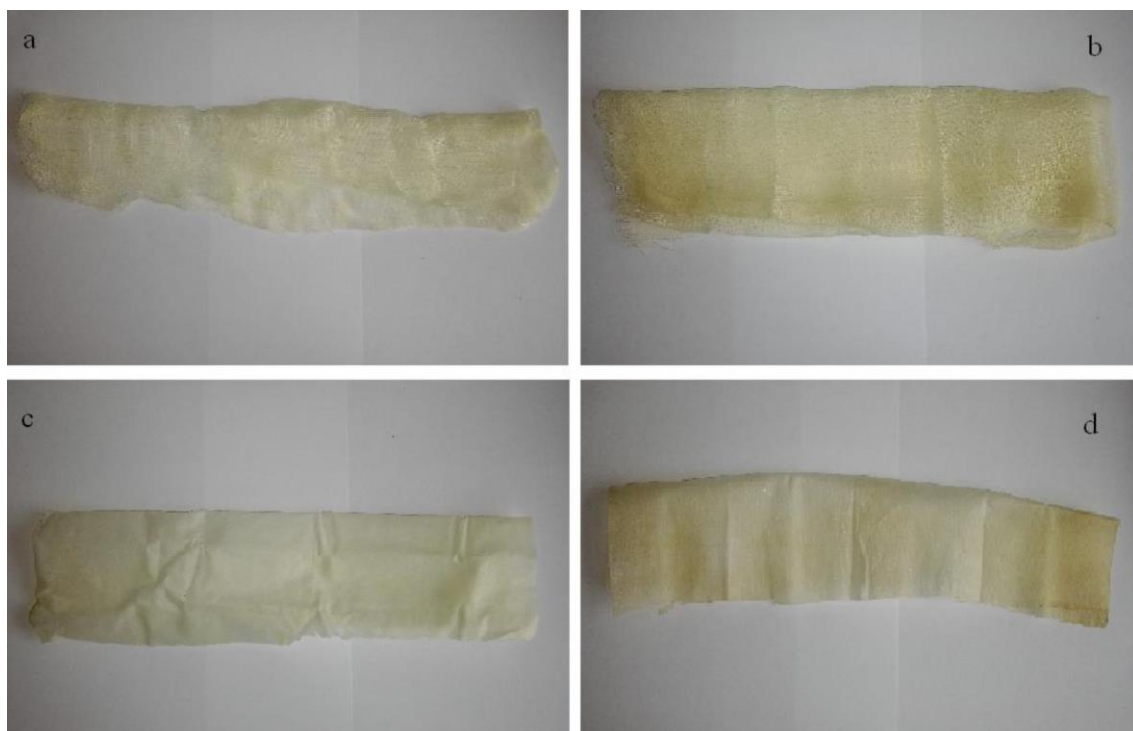
Табела 18. Резултати интегрисаног процеса НКЕ из смиља и НКИ памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом

Носач	Маса СО ₂ (g)	Маса смиља (g)	Маса косолвента (g)	Маса носача (g)	Принос импрегнације (%)
Памучна газа	450	21,10	-	2,26	2,62
	400	21,08	45	2,49	4,75
Поли(пропилен)ска тканина	450	20,56	-	1,95	3,99
	400	20,38	45	2,27	2,26

Подаци из Табеле 18 указују на то да је могуће импрегнирати памучну газу и поли(пропилен)ску тканину екстрактом смиља, применом интегрисаног НКЕ-НКИ процеса у шаржном режиму рада. Интегрисани процес је резултовао значајним променама импрегнационог приноса када је коришћен етанол као косолвент. У случају импрегнације памучне газе постигнут је значајно већи принос импрегнације уз додатак етанола као косолвента, док је у случају импрегнације поли(пропилен)ске тканине додатак косолвента резултовао

смањењем приноса импрегнације. Иако је током екстракције из смиља на вишем притиску екстракт показао значајно већу растворљивост у смеши nkCO_2 и етанола, него у чистом nkCO_2 , током интегрисаног НКЕ-НКИ процеса је овај екстракт показао значајно већи афинитет према памучној газу него према поли(пропилен)ској тканини, када је коришћен косолвент. Овакав ефекат може објаснити хидрофобношћу поли(пропилена).

Интегрисани процес НКЕ из смиља и НКИ памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом у процесу са косолвентом резултовао је добијањем материјала интензивније жуте боје (Слика 22 b, d) у поређењу са истим добијеним без додатка косолвента (Слика 22 a, c).



Слика 22. Памучна газу (a, b) и поли(пропилен)ска тканина (c, d) импрегнирани екстрактом смиља без (a, c) и са додатком косолвента (b, d)

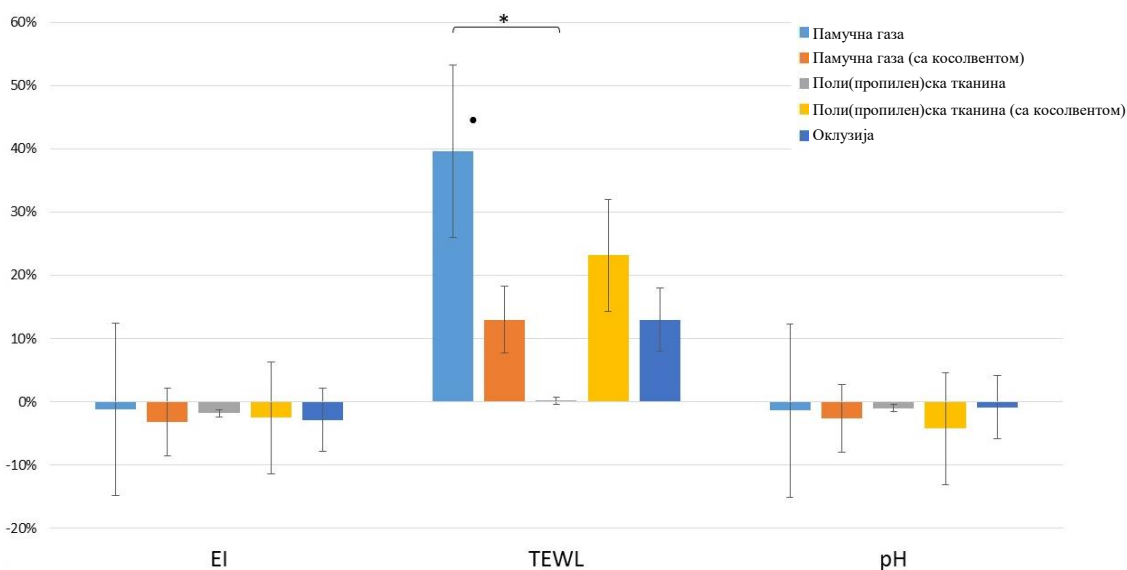
На основу података из Табеле ПЗ, GC-FID и GC-MS аналитичке методе су показале да је хемијски састав екстраката смиља добијених у процесу НКЕ на притиску од 35 МРа, са и без додатка косолвента, сличан у погледу садржаја индивидуалних терпена и деривата кумарина и аморфена, као активних супстанци. Међутим, разлике у обојености импрегнираних материјала, постигнуте додатком етанола као косолвента, које се могу уочити на Слици 22, указују на

могуће присуство додатних фенолних компонената, које је било немогуће изоловати из смиља помоћу чистог H_2CO_3 . Стога је потребно извршити додатну анализу екстраката смиља применом других аналитичких метода, како би се створила јаснија слика о њиховом хемијском саставу.

4.3.2. Резултати *in vivo* тестирања дејства импрегнираних текстилних материјала на иритирану кожу

Топикална примена памучне газе и поли(пропилен)ске тканине, импрегнираних екстрактом смиља, тестирана је на вештачки иритираној кожи здравих испитаника, у погледу испитивања безбедности и ефикасности.

Параметри безбедности топикалне примене који су испитивани пре (базалне вредности) и 30 min након иритације били су: трансепидермални губитак влаге (TEWL), еритема индекс (EI) и рН коже. На Слици 23 приказане су процентуалне промене ових параметара у односу на базалне вредности. Ефекти различитих импрегнираних материјала на иритирану кожу поређени су међусобно, као и са нетретираним местом (контролна оклузија). Значајне разлике у вредностима обележене су знаком *, док су значајне разлике у вредностима параметара након 1 h оклузије и базалних вредности обележене знаком ●.



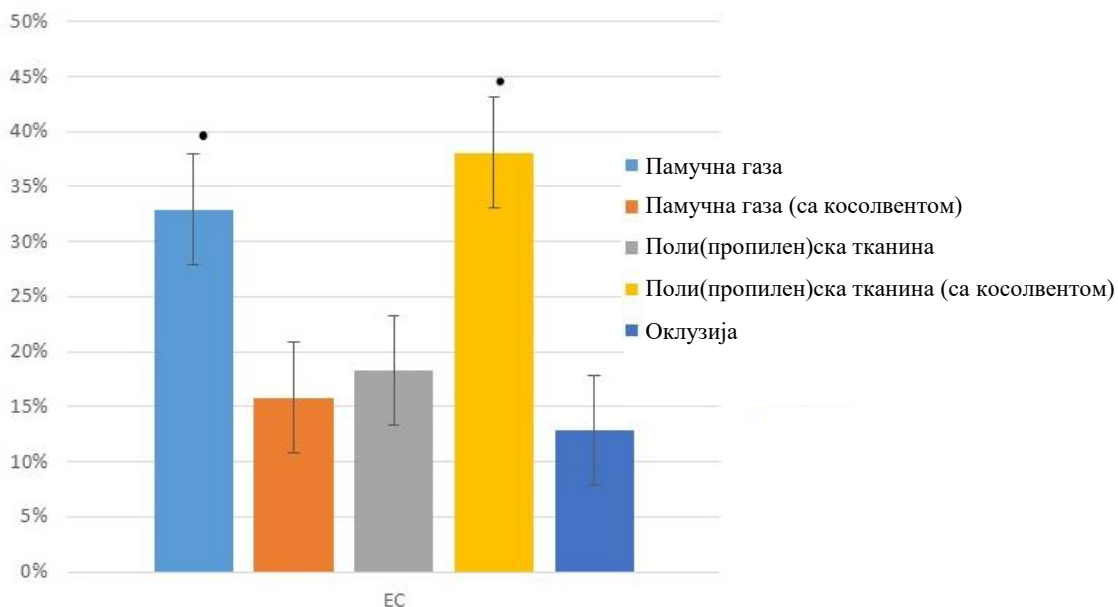
Слика 23. Процентуалне промене вредности параметара безбедности топикалне примене импрегнираних текстилних материјала у односу на базалне вредности

Када је у питању трансепидермални губитак влаге, памучна газа, импрегнирана екстрактом смиља без додатка косолвента, изазвала је највећи раст параметра TEWL у односу на базалну вредност, при чему је разлика у односу на ефекат који је изазвала поли(пропилен)ска тканина, импрегнирана без додатка косолвента, такође значајна. Евидентно је да су у овом случају до изражаја дошле разлике у хидрофилности/хидрофобности двају текстилних материјала, чему у прилог иде и чињеница да је поли(пропилен)ска тканина, импрегнирана без додатка косолвента, изазвала најмањи, готово занемарљив, процентуални раст параметра TEWL. Са друге стране, памучна газа, импрегнирана екстрактом смиља са употребом косолвента, изазвала је мањи процентуални раст трансепидермалног губитка влаге, у поређењу са другом памучном газом. Међутим, код памучне газе, импрегниране уз додаток косолвента, забележен је већи принос импрегнације него у експерименту без додатка косолвента. Имајући у виду да је у случају поли(пропилен)ске тканине, импрегниране са додатком косолвента, код које је постигнут мањи принос импрегнације у односу на узорак импрегниран без додатка косолвента, забележен већи процентуални раст параметра TEWL, у односу на други узорак поли(пропилен)ске тканине, јасно је да и пораст количине везаног екстракта у текстилним материјалима утиче на смањење процентуалног раста параметра TEWL.

Са друге стране, ниједан од тестираних импрегнираних текстилних материјала није показао статистички значајну промену вредности еритема индекса и рН коже, што указује на чињеницу да тестирани импрегнирани материјали нису изазвали никакву додатну иритацију коже након једночасовне оклузије.

Ефикасност топикалне примене импрегнираних текстилних материјала посматрана је кроз промене у хидратацији слоја *stratum corneum*, односно кроз промене електричне капацитивности (ЕС). На Слици 24 приказане су процентуалне промене овог параметра у односу на базалне вредности. Ефекти различитих импрегнираних материјала на иритирану кожу такође су поређени међусобно, као и са нетретираним местом за контролу оклузије. Значајне разлике у вредностима параметара након 1 h оклузије и базалних вредности обележене су знаком ●.

На основу података приказаних на Слици 24, уочава се да је значајан пораст електричне капацитивности (хидратације коже) забележен након примене импрегнираних памучне газе, без додатка косолвента, и поли(пропилен)ске тканине са додатком косолвента, при чему је други од њих изазвао највећи раст електричне капацитивности.



Слика 24. Процентуалне промене вредности електричне капацитивности у односу на базалне вредности

Имајући у виду да су поменута два текстилна материјала изазвала највећи процентуални раст трансепидермалног губитка влаге и да су код њих забележене најмање вредности приноса импрегнације, а да притом ниједна од процентуалних промена електричне капацитивности, приказаних на Слици 24, не може бити занемарљива, може се закључити да у овом случају количина екстракта, инкорпорисаног у материјалу, поседује доминантнији утицај на електричну капацитивност (хидратацију коже), у односу на хидрофилност/хидрофобност материјала носача.

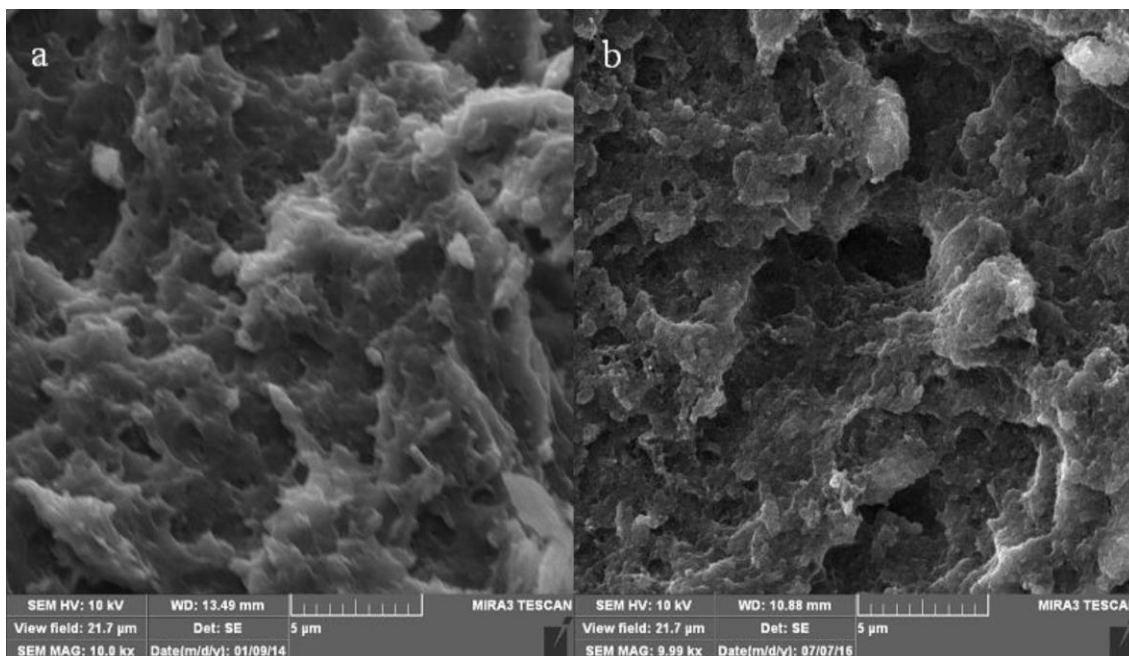
У сваком случају, резултати *in vivo* тестирања дејства на иритирану кожу, указују на могућност примене памучне газе и поли(пропилен)ске тканине, импрегнираних естрактом смиља, као топикалних средстава, при чему се, приликом избора оптималне комбинације, акценат мора ставити на хидрофилност/хидрофобност материјала носача и количину екстракта (принос

импрегнације), као фактора са најважнијим утицајем на параметре безбедности и ефикасности топикалне примене. Добијени резултати су показали да је примена оваквих средстава безбедна.

4.4. НАТКРИТИЧНА ИМПРЕГНАЦИЈА КСЕРОГЕЛОВА СКРОБА ЕКСТРАКТОМ СМИЉА

4.4.1. Карактеризација ксерогелова

На Слици 25 приказан је SEM снимак структуре ксерогелова скроба добијених сушењем ацето- (а) и алкогелова (b). Са слике се може приметити да оба типа ксерогела поседују компактну и порозну структуру, што се може приписати комплетној гелатинизацији, реализованој на одговарајућој температури.



Слика 25. SEM снимак ксерогелова скроба добијених сушењем ацетогелова (а) и алкогелова (b)

Израчунате вредности густине узорка ксерогелова добијених сушењем ацето- и алкогелова износиле су $1285,3 \pm 3,2 \text{ kg/m}^3$ и $1213,9 \pm 6,8 \text{ kg/m}^3$,

респективно, док су вредности порозности износиле $14,3\pm 0,2\%$ за ксерогел типа 1 и $19,13\pm 0,5\%$ за ксерогел типа 2.

4.4.2. Принос импрегнације и утицај процесних параметара

Интегрисани процес НКЕ из смиља и НКИ ксерогелова скроба екстрактом изведен је такође на притиску и температури од 35 МПа и 40°C респективно, са циљем да се развију формулације за потенцијални орални унос активних компонената смиља намењених третману дигестивних поремећаја. У сврху тестирања изводљивости једног оваквог процеса, што је био примаран циљ истраживања, параметри попут односа маса биљног материјала и носача и времена импрегнације су варирани у циљу постизања што већег приноса импрегнације. Такође, тестиран је и утицај додатка етанола као косолвента на принос импрегнације. Као носачи за импрегнацију екстрактом смиља, употребљени су ксерогелови кукурузног скроба добијени сушењем ацето- (тип 1) и алкогела (тип 2). Добијени експериментални резултати приказани су у Табели 19.

Табела 19. Резултати интегрисаног процеса НКЕ из смиља и НКИ ксерогелова скроба екстрактом

Носач	Време (h)	Маса CO ₂ (g)	Маса косолвента (g)	Маса носача (g)	Однос маса смиља и носача	Принос импрегнације (%)
Ксерогел типа 1	5	450	-	2,66	10	0,99±0,06
(добијен од ацетогела)	5	400	45	2,69	10	0,54±0,13
	8	450	-	2,66	10	0,83±0,05
	5	450	-	1,34	20	0,88±0,01
Ксерогел типа 2	5	450	-	2,69	10	1,26±0,22
(добијен од алкогела)	5	450	-	1,34	20	0,71±0,12

Према подацима приказаним у Табели 19, вредности приноса импрегнације ксерогелова скроба екстрактом смиља применом интегрисаног НКЕ-НКИ процеса

у шаржном режиму рада, указују на то да је овакав процес изводљив, уз могућност евентуалне даље оптимизације.

У случају импрегнације ксерогела добијеног сушењем алкогела (тип 1) тестиран је утицај свих горепомнутих параметара. Додатком етанола као косолвента, у количини од 10 мас.% у односу на масу нкСО_2 постигнут је 2,5 пута мањи принос импрегнације (смањење са $0,99 \pm 0,06$ на $0,54 \pm 0,13\%$), без обзира на то што је показано да је растворљивост екстракта смиља знатно већа у смеси нкСО_2 и етанола, него у чистом нкСО_2 . Екстракт смиља је у случају додатка етанола показао већи афинитет према смеси нкСО_2 и косолвента него према ксерогелу. Повећање времена импрегнације са 5 на 8 h, такође је негативно утицало на принос импрегнације (смањење са $0,99 \pm 0,06$ на $0,83 \pm 0,05\%$). Може се претпоставити да импрегнација ксерогела скроба екстрактом смиља у једном тренутку достиже свој максимум, након којег следи десорпција екстракта. Повећање односа маса смиља и носача са 10 на 20, довело је такође до смањења приноса импрегнације са $0,99 \pm 0,06$ на $0,88 \pm 0,01\%$. На основу приказаних резултата испоставило се да су, у случају импрегнације ксерогела типа 1 екстрактом смиља, време трајања импрегнације од 5 h, однос маса смиља и носача од 10 и одсуство косолвента резултовали постизањем највећег приноса.

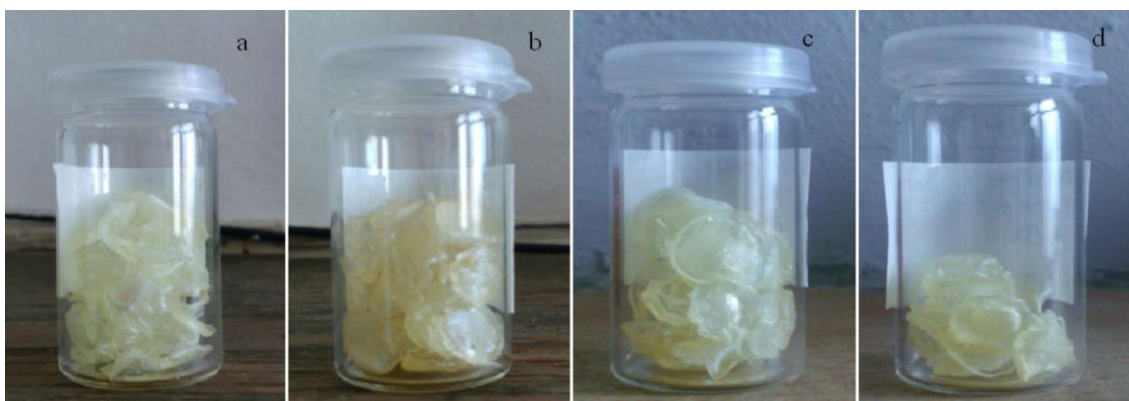
У складу са претходним резултатима, импрегнација ксерогела скроба добијеног сушењем алкогела (тип 2), извршена је без додатка косолвента, током 5 h и уз варирање односа маса биљног материјала и носача (10 и 20). Повећање односа маса смиља и носача је и у овом случају имало негативан утицај на принос импрегнације. Са друге стране, принос импрегнације од $1,26 \pm 0,22\%$, постигнут при односу маса смиља и носача од 10, значајно је већи од приноса импрегнације (око 27%) ксерогела типа 1, постигнутог при истим експерименталним условима (без косолвента, током 5 h и уз однос маса биљног материјала и носача од 10). Могући разлог за овакав резултат може бити позитиван утицај контролисане измене растварача (уклањања воде из хидрогела) током припреме алкогела, на принос импрегнације. Са друге стране, посматрајући SEM снимак ксерогелова скроба, може се закључити и да је контролисана измена растварача, током припреме алкогела, позитивно утицала и на порозност алкогела (Слика 25). На

крају, израчунате вредности порозности оба типа ксерогелова потврђују наведену претпоставку.

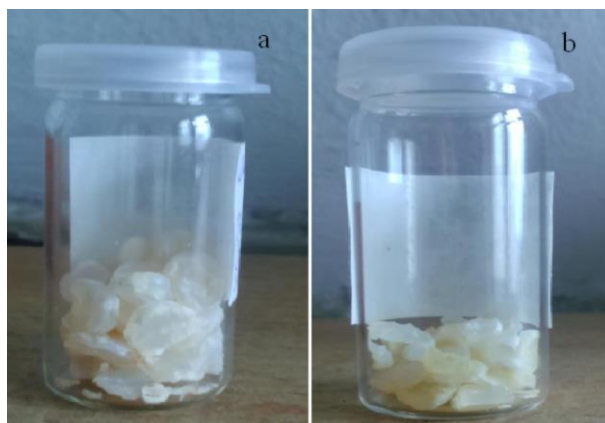
Интегрисани НКЕ-НКИ процес је, као и у случају импрегнације памучне газе и поли(пропилен)ске тканине, резултовао добијањем импрегнираног материјала интензивније жуте боје, када је коришћен етанол као косолвент (Слика 26 b) у поређењу са истим добијеним без додатка косолвента (Слика 26 a, c, d и Слика 27).

Применом GC-FID и GC-MS метода, у екстракту смиља добијеним растварањем узорка импрегнираног ксерогела типа 2 у смеси хлороформ-метанол (7:3), идентификована је 51 компонента, чији је укупан садржај у екстракту 93,7%. Детаљан приказ заступљених компонената, са њиховим процентима у добијеном екстракту, као и процентима различитих група једињења, дат је у Табели ПЗ (Прилог). Показано је да носач поседује већи афинитет према масним киселинама, естрима, алдехидима и алкохолима, на рачун смањења садржаја терпена и деривата кумарина и аморфена. Проенти најважнијих представника сваке од група једињења дати су у Табели 15.

Вредности постигнутих приноса импрегнације указале су на изводљивост интегрисаног процеса НКЕ из смиља и НКИ ксерогелова кукурузног скроба екстрактом.



Слика 26. Ксерогелови типа 1 импрегнирани екстрактом смиља: a – при почетним (оптималним) експерименталним условима; b – уз додаток косолвента; c – при повећању времена импрегнације; d – при повећању односа маса смиља и носача



Слика 27. Ксерогелови типа 2 импрегнирани екстрактом смиља: а – при односу маса смиља и носача од 10; б – при односу маса смиља и носача од 20

Ако се добијене вредности приноса импрегнације посматрају са становишта обезбеђивања довољне дневне дозе потенцијалног дијететског суплемента, имајући у виду да у литератури једино постоји податак о Flamin таблетама са антиупалним дејством, у којима фигуришу флавоноиди из екстракта врсте смиља *H. arenarium* у терапијској дози од 50 mg (Shikov и сар., 2014), употреба екстракта смиља у виду капсуле од 500 mg, која садржи импрегнирани ксерогел типа 2 са највећим приносом (1,47%), обезбедила би дијететску дневну дозу екстракта од 12-24% терапијске, што је у складу са одредбама Правилника о здравственој исправности дијететских производа (Службени гласник РС, бр. 45/2010, 27/2011, 50/2012, 21/2015 и 75/2015).

5. ЗАКЉУЧАК

Резултати наткритичне екстракције из смиља на условима притиска од 15 МРа и 35 МРа и температуре од 40°C, као и интегрисаног процеса наткритичне екстракције из смиља и наткритичне импрегнације памучне газе, поли(пропилен)ске тканине и ксерогелова скроба екстрактом, реализованих у овој дисертацији, показали су значајне карактеристике екстраката смиља, као и потенцијал за примену у различите сврхе. На основу приказаних резултата изведени су закључци приказани у наставку.

5.1. Наткритична екстракција из смиља на нижем притиску

- НКЕ из смиља, реализована на притиску од 15 МРа и температури од 40°C, уз присуство етарског уља жалфије као косолвента у количинама од 20, 30, 40 и 60% у односу на принос НКЕ из смиља без додатка косолвента, резултовала је променом моћи растварања и селективности нкСО₂, коју је изазвао додаток косолвента; количина етарског уља жалфије од 30% од приноса екстракције из смиља без додатка косолвента, представља оптималну количину за постизање највеће додатне масе екстракта.
- Додатак етарског уља жалфије изазвао је пораст брзине екстракције у првом периоду НКЕ у којем је процес зависан од растворљивости лако доступних секундарних биљних метаболита.
- Показано је и да додатком етарског уља жалфије селективност нкСО₂ према монотерпенима сукцесивно расте са порастом масе додатог етарског уља, док иста према сесквитерпенима, дитерпенима и восковима сукцесивно опада.
- Показано је да додаток етарског уља жалфије као косолвента резултује присуством одређеног броја монотерпена, карактеристичних за етарско уље жалфије, у екстракту смиља (*cis*- и *trans*-тујон, 1,8-цинеол, камфор и борнеол), као и дитерпена манола; ове компоненте није било могуће изоловати помоћу чистог нкСО₂; забележене су и значајне позитивне и негативне промене процената неких појединачних компонената из других

група једињења – виридифлорола, канелала, α -сантонина, цембренола, 1-циклохексилеикозана и октакозана.

5.2. Наткритична екстракција из смиља на вишем притиску

- НКЕ из смиља на притиску од 35 МПа и температури од 40°C, реализована је са циљем да се изолују екстракти са активним компонентама веће молекулске масе, првенствено терпени и фенолна једињења; додаток етанола као косолвента, у количини од 10% мас. у односу на масу нкСО₂ употребљеног за екстракцију из смиља без додатка косолвента, изазвао је такође промену и моћи растварања и селективности нкСО₂; екстракциони принос је био дупло већи када је употребљен косолвент; са друге стране, GC-FID и GC-MS аналитичке методе, као и методе за одређивање укупних садржаја фенола и флавоноида у екстрактима, показале су да је додаток етанола као косолвента утицао на значајан пораст укупног садржаја сесквитерпена и деривата кумарина и аморфена, као и флавоноида, на рачун смањења укупног садржаја масних киселина, естара, алдехида и алкохола, као и укупног садржаја фенола.
- Оба екстракта, добијена у процесу НКЕ из смиља на 35 МПа и температури од 40°C показала су умерено антиоксидантно дејство, без обзира на значајне разлике у хемијском саставу.

5.3. Наткритична импрегнација памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом смиља

- Интегрисани НКЕ-НКИ процес на притиску од 35 МПа и температури од 40°C, уз фиксне вредности осталих процесних параметара (односа маса биљног материјала и носача од 10, времена импрегнације од 5 h, количине етанола као косолвента од 10 мас.% у односу на масу СО₂ из експеримента без косолвента и брзине декомпресије од 3,5 МПа/min), успешно је

примењен за импрегнацију памучне газе и поли(пропилен)ске тканине екстрактом смиља, уз могућност евентуалне даље оптимизације.

- Највећи принос импрегнације (4,75%) постигнут је када је као носач коришћена памучна газа, са додатком косолвента; већи афинитет екстракта према памучној газу у односу на поли(пропилен)ску тканину, када је коришћен етанол као косолвент и обрнута ситуација када је интегрисани процес изведен без додатка косолвента, последице су хидрофобности поли(пропилен)ске тканине.
- Импрегнирани текстилни материјали су показали значајан потенцијал за топикалну примену, на основу резултата *in vivo* тестова на вештачки иритираној кожи; испитивања су се односила на праћење процентуалних промена параметара безбедности топикалне примене (трансепидермалног губитка влаге, еритема индекса и рН коже), као и електричне капацитивности, као параметра ефикасности; показано је да памучна газа и поли(пропилен)ска тканина, импрегнирани екстрактом смиља, не изазивају додатне иритације коже, имајући у виду да су изазвали занемарљиво мале промене у вредностима еритема индекса и рН коже; са друге стране хидрофобност материјала носача и количина везаног екстракта су се показали као фактори чије повећање изазива смањење трансепидермалног губитка влаге, док смањење количине везаног екстракта изазива повећање хидратације слоја *stratum corneum*, односно електричне капацитивности коже; наведени резултати указују на то да се, приликом избора оптималног топикалног средства, акценат мора ставити на хидрофилност/хидрофобност материјала носача и количину екстракта (приноса импрегнације).

5.4. Наткритична импрегнација ксерогелова скроба екстрактом смиља

- Применом интегрисаног НКЕ-НКИ процеса на притиску од 35 МПа и температури од 40°C, могуће је успешно импрегнирати ксерогелове кукурузног скроба екстрактом смиља у циљу развоја формулација за

потенцијални орални унос активних компонената смиља и третман дигестивних поремећаја.

- Када је као носач коришћен ксерогел скроба, добијен сушењем ацетогела, у интегрисаном НКЕ-НКИ процесу, највећи принос импрегнације ($0,99\pm 0,06\%$) постигнут је без употребе косолвента, при односу маса смиља и носача од 10 и током 5 h; смањење приноса импрегнације када је коришћен етанол као косолвент, последица је већег афинитета екстракта смиља према смеси H_2CO_3 и етанола него према ксерогелу; повећања времена импрегнације са 5 h на 8 h и односа маса смиља и носача са 10 на 20, резултовала су такође смањењем приноса импрегнације.
- Када је, у интегрисаном НКЕ-НКИ процесу, као носач коришћен ксерогел скроба, добијен сушењем алкогела, забележен је значајно већи принос импрегнације ($1,26\pm 0,22\%$) у односу на ксерогел добијен од ацетогела, при истим експерименталним условима који су се показали оптималним у случају импрегнације ксерогела добијеног од ацетогела; могући разлог за овакав резултат се може видети у позитивном утицају контролисане измене растварача, током припреме алкогела, која је проузроковала и морфолошке разлике између два типа ксерогела (већу порозност ксерогела типа 2); повећање односа маса смиља и носача са 10 на 20, такође је негативно утицало на принос импрегнације;
- Дијететска дневна доза од 12 до 24% терапијске дозе коју би обезбедила потенцијална орална формулација са ксерогелом скроба импрегнираним екстрактом смиља, у складу је са Правилником о здравственој исправности дијететских производа, што даје могућност за евентуалну даљу оптимизацију интегрисаног процеса НКЕ из смиља и НКИ ксерогелова скроба екстрактом.

ЛИТЕРАТУРА

- Adschiri, T., Supercritical fluid technology, The expanding world of chemical engineering, Ed. Shintaro Furusaki, John Garside & L. S. Fan, Taylor & Francis, New York, USA (2002) 105-123.
- Almeida, A. P., Rodríguez-Rojo, S., Serra, A. T., Vila-Real, H., Simplicio, A. L., Delgadilho, I., da Costa, S. B., da Costa, L. B., Nogueira, I. D., Duarte, C. M. M., Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20 (2013) 140-145.
- Amer, A., Mehlhorn, H., Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (*Diptera*, *Culicidae*), *Parasitology Research* 99 (2006a) 466-472.
- Amer, A., Mehlhorn, H., Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions, *Parasitology Research* 99 (2006b) 473-477.
- Amer, A., Mehlhorn, H., Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes, *Parasitology Research* 99 (2006c) 478-490.
- Angioni, A., Barra, A., Arlorio, M., Coisson, J. D., Russo, M. T., Pirisi, F. M., Satta, M., Cabras, P., Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don subsp. *microphyllum* (Willd) Nym, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 1030-1034.
- Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., Sterner, O., Fiebich, B. L., Munoz, E., Arzanol, an anti-inflammatory and anti-Hiv-1 phloroglucinol α -pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*, *Journal of Natural Products* 70 (2007) 608-612.
- Askin, R., Goto, M., Sasaki, M., Supercritical fluid extraction in food analysis, *Handbook of food analysis instruments*, Ed. Semih Otles, CRC Press, Boca Raton, USA (2009) 25-55.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Idaomar, M., Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research* 585 (2005) 1-13.

- Bauer, J., Koeberle, A., Dehm, F., Pollastro, F., Appendino, G., Northoff, H., Rossi, A., Sautebin, L., Werz, O., Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinyln pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy *in vivo*, *Biochemical Pharmacology* 81 (2011) 259-268.
- Belhadj-Ahmed, F., Badens, E., Llewellyn, P., Denoyel, R., Charbit, G., Impregnation of vitamin E acetate on silica mesoporous phases using supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 51 (2009) 278–286.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry* 239 (1996) 70-76.
- Bertoli, A., Conti, B., Mazzoni, V., Meini, L., Pistelli, L., Volatile chemical composition and bioactivity of six essential oils against the stored food insect *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera Dryophthoridae), *Natural Products Research* 26 (22) (2012) 2063-2071.
- Bezic, N., Vuko, E., Ruscic, M., Dunkic, V., *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don – essential oil composition and activity on tobacco mosaic virus infection, *Journal of Plant Physiology & Pathology* (2016), doi:10.4172/2329-955X.1000144
- Bianchini, A., Santoni, F., Paolini, J., Bernardini, A. F., Mouillot, D., Costa, J., Partitioning the relative contributions of inorganic plant composition and soil characteristics to the quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don Fil. essential oil, *Chemistry & Biodiversity* 6 (2009) 1014-1033.
- Bianchini, A., Tomi, F., Richomme, P., Bernardini, A. F., Casanova, J., Eudesm-5-en-11-ol in *Helichrysum italicum* essential oil, *Magnetic Resonance in Chemistry* 42 (2004) 983-984.
- Bianchini, A., Tomi, P., Bernardini, A. F., Morelli, I., Flamini, G., Cioni, P. L., Usai, M., Marchetti, M., A comparative study of volatile constituents of two *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. Don Fil subspecies growing in Corsica (France), Tuscany and Sardinia (Italy), *Flavour and Fragrance Journal* 18 (2003) 487-491.
- Bianchini, A., Tomi, P., Costa, J., Bernardini, A. F., Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* essential oil from Corsica (France), *Flavour and Fragrance Journal* 16 (2001) 30-34.

- Bielinski, A., Numerical simulation of CO₂ sequestration in geological formations, Dissertation, Institut fur Wasserbrau, Universitat Stuttgart, 2007.
- Brunner, G., Supercritical fluids: technology and application to food processing, *Journal of Food Engineering* 67 (1-2) (2005) 21-33.
- Chao, S., Young, G., Oberg, C., Nakaoka, K., Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils, *Flavour and Fragrance Journal* 23 (2008) 444-449.
- Charles, D. J., Simon, J. E., Volatile compounds of the curry plant, *HortScience* 26 (1) (1991) 69-70.
- Comin, L. M., Temelli, F., Saldana, M. D. A., Barley β -glucan aerogels as a carrier for flax oil via supercritical CO₂, *Journal of Food Engineering* 111 (2012b) 625-631.
- 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 (2012a) 221-228.
- Conti, B., Canale, A., Bertoli, A., Gozzini, F., Pistelli, L., Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), *Parasitology Research* 107 (2010) 1455-1461.
- Costa, P., Loureiro, J. M., Teixeira, M. A., Rodrigues, A. E., Extraction of aromatic volatiles by hydrodistillation and supercritical fluid extraction with CO₂ from *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* growing in Portugal, *Industrial Crops and Products* 77 (2015) 680-683.
- Cristofari, G., Znini, M., Majidi, L., Costa, J., Hammouti, B., Paolini, J., *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* essential oil as environmentally friendly inhibitor on the corrosion of mil steel in hydrochlorid acid, *International Journal of Electrochemical Science* 7 (2012) 9024-9041.
- Cui, H., Li, W., Li, C., Lin., L., Synergistic effect between *Helichrysum italicum* essential oil and cold nitrogen plasma against *Staphylococcus aureus* biofilms on different food-contact surfaces, *International Journal of Food Science & Technology* 51 (11) (2016) 2493-2501.
- Cui, H., Zhao, C., Lin, L., Antibacterial activity of *Helichrysum italicum* oil on vegetables and its mechanism of action, *Journal of Food Processing and Preservation*, 39 (2015) 2663-2672.

- D'Abrosca, B., Buommino, E., Caputo, P., Scognamiglio, M., Chambery, A., Donnarumma, G., Fiorentino, A., Phytochemical study of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Spectroscopic elucidation of unusual amino-phloroglucinols and antimicrobial assessment of secondary metabolites from medium-polar extract, *Phytochemistry* 132 (2016) 86-94.
- D'Abrosca, B., Buommino, E., D'Angelo, G., Coretti, L., Scognamiglio, M., Severino, V., Pacifico, S., Donnarumma, G., Fiorentino, A., Spectroscopic identification and anti-biofilm properties of polar metabolites from the medicinal plant *Helichrysum italicum* against *Pseudomonas aeruginosa*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (2013) 7038-7046.
- Da Silva, C. V., Pereira, V. J., Rosa, P. T. V., Cabral-Albuquerque, E. C. M., Vieira de Melo, S. A. B., Costa, G. M. N., Dias, A. M. A., de Sousa, H. C., Braga, M. E. M., Effect of scCO₂ sorption capacity on the total amount of borage oil loaded by scCO₂ impregnation/deposition into a polyurethane-based wound dressing, *Journal of Supercritical Fluids* 115 (2016) 1-9.
- Da Silva, M. V., Supercritical fluids and its applications, Recent progress in chemical engineering, Ed. J. M. P. Q. Delgado, Studium Press LLC, Houston, USA (2010) 293-312.
- De la Garza, A. L., Etxeberria, U., Lostao, M. P., Roman, B. S., Barrenetxe, J., Martinez, J. A., Milagro, F. I., *Helichrysum* and grapefruit extracts inhibit carbohydrate digestion and absorption, improving postprandial glucose levels and hyperinsulinemia in rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013) 12012-12019.
- De Marco, I., Reverchon, E., Starch aerogel loaded with poorly water-soluble vitamins through supercritical CO₂ adsorption, *Chemical Engineering Research and Design* 119 (2017) 221-230.
- 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.
- Dias, A. M. A., Braga, M. E. M., Seabra, I. J., Ferreira, P., Gil, M. H., De Sousa, H. C., Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive

compounds and using supercritical carbon dioxide, *International Journal of Pharmaceutics* 408 (1-2) (2011) 9-19.

- Dias, A. M. A., Rey-Rico, A., Oliveira, R. A., Marceneiro, S., Alvarez Lorenzo, C., Concheiro, A., Júnior, R. N. C., Braga, M. E. M., de Sousa, H. C., Wound dressings loaded with an anti inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology, *Journal of Supercritical Fluids* 74 (2013) 34–45.
- Djihane, B., Wafa, N., Elkhamssa, S., Pedro, D. H. J., Maria, A. E., Mihoub, Z. M., Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*, *Saudi Pharmaceutical Journal* (2016), <http://dx.doi.org/10.2016/j.jsps.2016.11.001>.
- Drapeau, J., Frohler, C., Touraud, D., Krockel, U., Geiger, M., Rose, A., Kunz, W., Repellent studies with *Aedes aegypti* mosquitoes and human olfactory tests on 19 essential oils from Corsica, France, *Flavour and Fragrance Journal* 24 (2009) 160-169.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J., Characterization of total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48 (2000) 648-656.
- Facino, R. M., Carini, M., Franzoi, L., Pirola, O., Bosisio, E., Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae), *Pharmacological Research* 22 (6) (1990) 709-721.
- Facino, R. M., Carini, M., Mariani, M., Cipriani, C., Anti-erythematous and photoprotective activities in guinea pigs and in man of topically applied flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don. *Acta Therapeutica*, 14 (1988) 323-345.
- Fanovich, M. A., Ivanovic, J., Misic, D., Alvarez, M. V., Jaeger, P., Zizovic, I., Eggers, R., 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., Ivanovic, J., Zizovic, I., Misic, D., Jaeger, P., Functionalization of polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds with *Usnea lethariiformis* extract by using supercritical CO₂, *Materials Science and Engineering C* 58 (2016) 204-212.

- Fornari, T., Vicente, G., Vazquez, E., Garcia-Risco, M. R., Reglero, G., Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction, *Journal of Chromatography A* 1250 (2012) 34-48.
- Foti, C., Guida, S., Antelmi, A., Romita, P., Corazza, M., Allergic contact dermatitis caused by *Helichrysum italicum* contained in an emollient cream, *Contact Dermatitis* 69 (2013) 53-63.
- Galbany-Casalas, M., Blanco-Moreno, J. M., Garcia-Jacas, N., Breitwieser, I., Smissen, R. D., Genetic variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): do disjunct populations of subsp. *microphyllum* have a common origin?, *Plant Biology* 13 (2011) 678-687.
- Garcia-Gonzales, G. A., Jin., M., Gerth, J., Alvarez-Lorenzo, C., Smirnova, I., Polysaccharide-based aerogel microspheres for oral drug delivery, *Carbohydrate Polymers* 117 (2015) 797-806.
- Garcia-Gonzalez, C. A., Alnaief, M., Smirnova, I., Polysaccharide-based aerogels – promising biodegradable carriers for drug delivery systems, *Carbohydrate Polymers* 86 (4) (2011) 1425-1438.
- Garcia-Gonzalez, G. A., Smirnova, I., Use of supercritical fluid technology for the production of tailor-made aerogel particles for delivery systems, *Journal of Supercritical Fluids* 79 (2013) 152-158.
- Gruner-Richter, S., Otto, F., Weidner, E., Impregnation of oil containing fruits, *Journal of Supercritical Fluids* 66 (2012) 321–327.
- Idaomar, M., El Hamss, R., Bakkali, F., Mezzoug, N., Zhiri, A., Baudoux, D., Munoz-Serrano, A., Liemans, V., Alonso-Moraga, A., Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*, *Mutation Research* 513 (2002) 61-68.
- Ivanovic, J., Milovanovic, S., Stamenic, M., Fanovich, M. A., Jaeger, P., Zizovic, I., Application of an integrated supercritical extraction and impregnation process for incorporation of thyme extracts into different carriers, *Handbook on supercritical fluids: fundamentals, properties and applications*, Ed. Jane Osborne, Nova Science Publishers, New York, USA (2014) 257-280.

- Ivanovic, J., Milovanovic, S., Zizovic, I., Utilization of supercritical CO₂ as a processing aid in setting functionality of starch-based materials, *Starch* 68 (2016) 821-833.
- Ivanovic, J., Ristic, M., Skala, D., Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: influence of CO₂ density and moisture content of plant material, *Journal of Supercritical Fluids* 57 (2011) 129-136.
- Jerkovic, I., Rajic, M., Marijanovic, Z., Bilic, M., Jokic, S., Optimization of supercritical CO₂ extraction of dried *Helichrysum italicum* flowers by response surface methodology: GC-MS profiles of the extracts and essential oil, *Separation Science and Technology* 51 (18) (2016) 2925-2931.
- Jokic, S., Rajic, M., Bilic, B., Molnar, M., Supercritical extraction of scopoletin from *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don flowers, *Phytochemical Analysis* 27 (2016) 290-295.
- Karasartov, B. S., Kurkin, V. A., Zapesochnaya, G. G., Coumarins and flavonoids of the flowers of *Helichrysum italicum*, *Chemistry of Natural Compounds* 28 (5) (1992) 504-505.
- 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 (1) (2000) 78-101.
- Kazazic, M., Djapo, M., Ademovic, E., Antioxidant activity of water extracts of some medicinal plants from Herzegovina region, *International Journal of Pure & Applied Bioscience* 4 (2) (2016) 85-90.
- Kikic, I., Vecchione, F., Supercritical impregnation of polymers, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7 (2003) 399-405.
- Kladar, N. V., Anackov, G. T., Rat, M. M., Srdjenovic, B. U., Grujic, N. N., Sefer, E. I., Bozin, B. N., Biochemical characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: phytochemical screening, chemotaxonomy and antioxidant properties, *Chemistry & Biodiversity* 12 (2015) 419-431.

- Leonardi, M., Ambryszewska, K. E., Melai, B., Flamini, G., Cioni, P. L., Parri, F., Pistelli, L., Essential-oil composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy), *Chemistry & Biodiversity* 10 (2013) 343-355.
- Lorenzi, V., Muselli, A., Bernardini, A. F., Berti, L., Pages, J., Amaral, L., Bolla, J., Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (5) (2009) 2209-2211.
- Maggio, A., Bruno, M., Guarino, R., Senatore, F., Hardi, V., Contribution to a taxonomic revision of the Sicilian *Helichrysum* taxa by PCA analysis of their essential-oil composition, *Chemistry & Biodiversity* 13 (2016) 151-159.
- Mancini, E., De Martino, L., Marandino, A., Scognamiglio, M. R., De Feo, V., Chemical composition and possible *in vitro* phytotoxic activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*, *Molecules* 16 (2011) 7725-7735.
- Mari, A., Napolitano, A., Masullo, M., Pizza, C., Piacente, S., Identification and quantitative determination of the polar constituents in *Helichrysum italicum* flowers and derived food supplements, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 96 (2014) 249-255.
- Markovic, D., Milovanovic, S., Radetic, M., Jokic, B., Zizovic, I., Impregnation of corona modified polypropylene non-woven material with thymol in supercritical carbon dioxide for antimicrobial application, *Journal of Supercritical Fluids* 101 (2015) 215-221.
- Marongiu, B., Piras, A., Desogus, E., Porcedda, S., Analysis of the volatile concentrate of the leaves and flowers of *Helichrysum italicum* G. Don subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman (*Asteraceae*) by supercritical fluid extraction and their essential oils, *Journal of Essential Oil Research* 15 (2003) 120-126.
- Marostica Junior, M. R., Leite, A. V., Dragano, N. R. V., Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources – review (supercritical extraction and stabilization of phenolic compounds), *Open Chemical Engineering Journal* 4 (2010) 51-60.

- Martinez, J. L., Vance, C. W., Extraction plants, equipment, process and costs, Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds, Ed. Jose L. Martinez, CRC Press, Boca Raton, USA (2008) 25-48.
- Mastelic, J., Politeo, O., Jerkovic, I., Contribution to the analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. – determination of ester bonded acids and phenols, *Molecules* 13 (2008) 795-803.
- Mastelic, J., Politeo, O., Jerkovic, I., Radosevic, N., Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and Terpenoid fractions, *Chemistry of Natural Compounds* 41 (1) (2005) 35-40.
- Mc Hugh, M., Krukonic, V., Supercritical fluid extraction: principles and practice, Butterworth-Heinemann, Stoneham, USA (1994).
- 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.
- Melito, S., Petretto, G. L., Podani, J., Foddai, M., Maldini, M., Chessa, M., Pintore, G., Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* essential oils composition, *Industrial Crops and Products* 80 (2016) 242-250.
- Melito, S., Sias, A., Petretto, G. L., Chessa, M., Pintore, G., Porceddu, A., Genetic and metabolite diversity of Sardinian populations of *Helichrysum italicum*, *Public Library of Science One* 8 (11) (2013) 1-11.
- Micic, V., Jotanovic, M., Lepojevic, Z., Aleksic, V., Pejovic, B., Pressure influence to extraction system *Helichrysum italicum* – supercritical carbon dioxide, *Journal of Engineering & Processing Management* 1 (2) (2009) 26-31.
- Milovanovic, S., Jankovic-Castvan, I., Ivanovic, J., Zizovic, I., Effect of starch xero- and aerogels preparation on the supercritical CO₂ impregnation with thymol, *Starch* 67 (2015) 174-182.
- Milovanovic, S., Stamenic, M., Markovic, D., Radetic, M., Zizovic, I., Solubility of thymol in supercritical carbon dioxide and its impregnation on cotton gauze, *Journal of Supercritical Fluids* 84 (2013) 173-181.
- Molnar, M., Jerkovic, I., Suknovic, D., Rajs, B. B., Aladic, K., Subaric, D., Jokic, S., Screening of six medicinal plant extracts obtained by two conventional methods and supercritical CO₂ extraction targeted on coumarin content, 2,2-diphenyl-1-

- picrylhydrazyl radical scavenging capacity and total phenolic content, *Molecules* 22 (3) (2017) 348.
- Moretti, M. D. L., Sanna-Passino, G., Demontis, S., Bazzoni, E., Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control, *AAPS PharmSciTech.* 3 (2) (2002) 2-11.
- Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabetta, W., Blanco, A., Lorusso, E., Avato, P., Essential oils, genetic relationships and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm, *Industrial Crops and Products* 32 (2010) 639-649.
- Mukhopadhyay, M., Natural extracts using supercritical carbon dioxide, CRC Press, Boca Raton, USA (2000).
- Mustapa, A. N., Martin, A., Sanz-Moral, L. M., Rueda, M., Cocero, M. J., Impregnation of medicinal plant phytochemical compounds into silica and alginate aerogels, *Journal of Supercritical fluids* 116 (2016) 251-263.
- Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, M. A., Crisafi, G., Germano, M. P., Alonzo, V., Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Antimicrobial Agents* 17 (2001) 517-520.
- Nostro, A., Cannatelli, M. A., Crisafi, G., Musolino, A. D., Procopio, F., Alonzo, V., Modifications of hydrophobicity, *in vitro* adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract, *Letters in Applied Microbiology* 38 (2004) 423-427.
- Nostro, A., Cannatelli, M. A., Musolino, A. D., Procopio, F., Alonzo, V., *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*, *Letters in Applied Microbiology* 35 (2002) 181-184.
- Nostro, A., Germano, M. P., D'Angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M. A., Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity, *Letters in Applied Microbiology* 30 (2000) 379-384.
- Nostro, A., Germano, M. P., D'Angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M. A., Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity, *Letters in Applied Microbiology* 30 (2000) 379-384.

- Oliveira, D. A., Mezzomo, N., Gomes, C., Ferreira, S. R. S., Encapsulation of passion fruit seed oil by means of supercritical antisolvent process, *Journal of Supercritical fluids* (2017), <http://dx.doi.org/10.2016/j.supflu.2017.02.011>.
- Orchard, A., Sandasi, M., Kamatou, G., Viljoen, A., van Vuuren, S., The *in vitro* antimicrobial activity and chemometric modelling of 59 commercial essential oils against pathogens of dermatological relevance, *Chemistry & Biodiversity* 14 (1) (2017) 1-18.
- Ornano, L., Venditti, A., Sanna, C., Ballero, M., Maggi, F., Lupidi, G., Bramucci, M., Quassinti, L., Bianco, A., Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. ssp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo e Giusso growing in La Maddalena Archipelago, Sardinia, *Journal of Oleo Science* 64 (1) (2015) 19-26.
- Paolini, J., Desjobert, J. M., Costa, J., Bernardini, A. F., Castellini, C. B., Cioni, P. L., Flamini, G., Morelli, I., Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* from Tuscan archipelago islands, *Flavour and Fragrance Journal* 21 (2006) 805-808.
- Pascoal, D. R. C., Cabral-Albuquerque E. C. M., Velozo, E. S., de Souza, H. C., Vieira de Melo, S. A. B., Braga, M. E. M., Copaiba oil-loaded commercial wound dressings using supercritical CO₂: A potential alternative topical antileishmanial treatment, *Journal of Supercritical Fluids* (2017), <http://dx.doi.org/10.2016/j.supflu.2017.02.012>.
- Pereda, S., Bottini, S. B., Brignole, E. A., Fundamentals of supercritical fluid technology, *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*, Ed. Jose L. Martinez, CRC Press, Boca Raton, USA (2008) 1-23.
- Pereira, C. G., Meireles, M. A. A., Supercritical extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives, *Food and Bioprocess Technology* 3 (2010) 340-372.
- Perrini, R., Morone-Fortunato, I., Lorusso, E., Avato, P., Glands, essential oils and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman, *Industrial Crops and Products* 29 (2009) 395-403.

- Pietta, R., Mauri, P., Facino, R. M., Carini, M., Analysis of flavonoids by MECC with ultraviolet diode array detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 10 (1992) 1041-1045.
- Pietta, R., Mauri, P., Gardana, C., Facino, R. M., Carini, M., High-performance liquid chromatographic determination of flavonoid glucosides from *Helichrysum italicum*, *Journal of Chromatography* 537 (1991) 449-452.
- Plant, J., Effects of essential oils on telomere length in human cells, *Medicinal & Aromatic Plants*, 5 (2) (2016) 1-6.
- Poli, F., Muzzoli, M., Sacchetti, G., Tassinato, G., Lazzarin, R., Bruni, A., Antioxidant activity of supercritical CO₂ extracts of *Helichrysum italicum*, *Pharmaceutical Biology* 41 (5) (2003) 379-383.
- Politeo, O., Jukic, M., Milos, M., Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants, *Croatica Chemica Acta* 79 (4) (2006) 545-552.
- Reverchon, E., De Marco, I., Supercritical extraction and fractionation of natural matter, *Journal of Supercritical Fluids* 38 (2006) 146-166.
- Rigano, D., Formisano, C., Pagano, E., Senatore, F., Piacente, S., Masullo, M., Capasso, R., Izzo, A. A., Borelli, F., A new acetophenone derivative from flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*, *Fitoterapia* 99 (2014) 198-203.
- Rigano, D., Formisano, C., Senatore, F., Piacente, S., Pagano, E., Capasso, R., Borelli, F., Izzo, A. A., Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients, *Journal of Ethnopharmacology* 150 (3) (2013) 901-906.
- Rosa, A., Deiana, M., Atzeri, A., Corona, G., Incani, A., Melis, M. P., Appendino, G., Dessi, M. A., Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated α -pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*, *Chemico-Biological Interactions* 165 (2007) 117-126.
- Rosa, A., Pollastro, F., Atzeri, A., Appendino, G., Melis, M. P., Deiana, M., Incani, A., Loru, D., Dessi, M. A., Protective role of arzanol against lipid peroxidation in biological systems, *Chemistry and Physics of Lipids* 164 (2011) 24-32.

- Rossi, P. G., Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J., Muselli, A., Antibacterial action of essential oils from Corsica, *Journal of Essential Oil Research* 19 (2007) 176-182.
- Roussis, V., Tsoukatou, M., Petrakis, P. V., Chinou, I., Skoula, M., Harborne, J. B., Volatile constituents of four *Helichrysum* species growing in Greece, *Biochemical Systematics and Ecology* 28 (2000) 163-175.
- Sala, A., Carmen Recio, M., Giner, R. M., Manez, S., Rios, J. L., New acetophenone glucosides isolated from extracts of *Helichrysum italicum* with anti-inflammatory activity, *Journal of Natural Products* 64 (2001) 1360-1362.
- Sala, A., Carmen Recio, M., Giner, R. M., Manez, S., Tournier, H., Schinella, G., Rios, J. L., Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54 (2002) 365-371.
- Sala, A., Carmen Recio, M., Schinella, G. R., Manez, S., Giner, R. M., Rios, J. L., A new dual inhibitor of arachidonate metabolism isolated from *Helichrysum italicum*, *European Journal of Pharmacology* 460 (2003a) 219-226.
- Sala, A., Carmen Recio, M., Schinella, G. R., Manez, S., Giner, R. M., Cerda-Nicolas, M., Rios, J. L., Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenging activity of tiliroside, *European Journal of Pharmacology* 461 (2003b) 53-61.
- Sala, A., Carmen Recio, M., Schinella, G. R., Manez, S., Giner, R. M., Cerda-Nicolas, M., Rios, J. L., Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenging activity of tiliroside, *European Journal of Pharmacology* 461 (2003b) 53-61.
- Salerno, A., Di Maio, E., Iannace, S., Netti, P. A., Solid-state supercritical CO₂ foaming of PCL and PCL-HA nano-composite: Effect of composition, thermal history and foaming process on foam pore structure, *Journal of Supercritical Fluids* 58 (2011) 158-167.
- Satta, M., Tuberoso, C. I. G., Angioni, A., Pirisi, F. M., Cabras, P., Analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Wild) Nym, *Journal of Essential Oil Research* 11 (1999) 711-715.
- Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S., Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, *Hemijska industrija* 56 (5) (2002) 179-190.

- Schinella, G. R., Tournier, H. A., Manez, S., De Buschiazzo, P. M., Carmen Recio, M., Rios, J. L., Tiliroside and gnaphaliin inhibit human low density lipoprotein oxidation, *Fitoterapia* 78 (2007) 1-6.
- Schinella, G. R., Tournier, H. A., Prieto, J. M., De Buschiazzo, P. M., Rios, J. L., Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts, *Life Sciences* 70 (2002a.) 1023-1033.
- Schinella, G. R., Tournier, H. A., Prieto, J. M., Rios, J. L., De Buschiazzo, P. M., Zaidenberg, A, Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts, *Fitoterapia* 73 (2002b) 569-575.
- Schipilliti, L., Bonnaccorsi, I. L., Ragusa, S., Cotroneo, A., Dugo, P., *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* oil analysis by gas chromatography – carbon isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS): a rapid method of genotype differentiation?, *Journal of Essential Oil Research* 28 (3) (2016) 193-201.
- Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., Wagner, H., Verpoorte, R., Heinrich, M., Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications, *Journal of Ethnopharmacology* 154 (2014) 481-536.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagent, *American Journal of Enology and Viticulture* 16 (1956) 144-158.
- Stupar, M., Ljajevic Grbic, M., Dzamic, A., Unkovic, N., Ristic, M., Vukojevic, J., Antifungal activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (Asteraceae) essential oil against fungi isolated from cultural heritage objects, *Archives of Biological Sciences* 66 (4) (2014) 1539-1545.
- Tagliatela-Scafati, O., Pollastro, F., Chianese, G., Minassi, A., Gibbons, S., Arunotayanun, W., Mabebie, B., Ballero, M., Appendino, G., Antimicrobial phenolics and unusual glycerides from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*, *Journal of Natural Products* 76 (2013) 346-353.
- Tomas-Barberan, F., Iniesta-Sanmartin, E., Tomas-Lorente, F., Rumbero, A., Antimicrobial phenolic compounds from three spanish *Helichrysum* species, *Phytochemistry* 29 (4) (1990) 1093-1095.

- Tsoukatou, M., Roussis, V., Chinou, I., Petrakis, P. V., Ortiz, A., Chemical composition of the essential oils and headspace samples of two *Helichrysum* species occurring in Spain, *Journal of Essential Oil Research* 11 (1999) 511-516.
- Tsutsumi, C., Hara, T., Ueno, Y., Nakayama, Y., Shiono, T., Supercritical fluid impregnation of essential bark oil in copolymers of L-lactide with 7-membered cyclic compounds, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 5 (2014) 159-172.
- Tucker, A. O., Maciarelo, M. J., Charles, D. J., Simon, J. E., Volatile Leaf Oil of the curry plant [*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum*] and dwarf curry plant [subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman] in the North American herb trade, *Journal of Essential Oil Research* 9 (1997) 583-585.
- Tundis, R., Statti, G. A., Conforti, F., Bianchi, A., Agrimonti, C., Sacchetti, G., Muzzoli, M., Ballero, M., Menichini, F., Poli, F., Influence of environmental factors on composition of volatile constituents and biological activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don (Asteraceae), *Natural Product Research* 19 (4) (2005) 379-387.
- Ubeyitogullari, A., Ciftci, O. N., Phytosterol nanoparticles with reduced crystallinity generated using nanoporous starch aerogels, *RSC Advances* 6 (2016) 108319-108327.
- Usai, M., Foddai, M., Bernardini, A. F., Musselli, A., Costa, J., Marchetti, M., Chemical composition and variation of the essential oil of wild sardinian *Helichrysum italicum* G. Don subsp. *microphyllum* (Willd.) Nym from vegetative period to post-blooming, *Journal of Essential Oil Research* 22 (2010) 373-380.
- Varona, S., Rodríguez-Rojo, S., Martín, A., Cocero, M. J., Duarte, C. M. M., Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch, *Journal of Supercritical Fluids* 58 (2011) 313–319.
- Venditti, A., Lattanzi, C., Ornano, L., Maggi, F., Sanna, C., Ballero, M., Alvino, A., Serafini, M., Bianco, A., A new glucosidic phtalide from *Helichrysum microphyllum* subsp. *tyrrhenicum* from La Maddalena Island (Sardinia, Italy), *Natural Product Research* 30 (7) (2016) 789-795.
- Verreck, G., Decorte, A., Heymans, K., Adriaensen, J., Liu, D., Tomasko, D. L., Arien, A., Peeters, J., Rombaut, P., Van den Mooter, G., Brewster, M. E., The effect of

- supercritical CO₂ as a reversible plasticizer and foaming agent on the hot stage extrusion of itraconazole with EC 20 cps, *Journal of Supercritical Fluids* 40 (2007) 153-162.
- Viegas, D. A., Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro L., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, R., *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data, *Journal of Ethnopharmacology* 151 (2014) 54-65.
- Vyas, N., Khan, M. Y., Panchal, S., Butani, A., Kumar, V., Supercritical fluid technology – an unlimited frontier in herbal research, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 1 (2009) 303-308.
- Wang, H. F., Wang, Y. K., Yih, K. H., DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five kinds of essential oils, *Journal of Cosmetic Science* 59 (2008) 509-522.
- Wang, Y., Yang, C., Tomasko, D., Confocal microscopy analysis of supercritical fluid impregnation of polypropylene, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 41 (2002) 1780-1786.
- Weidner, E., Impregnation via supercritical fluids: principles and applications, *Proceedings of the 10th International Symposium on Supercritical Fluids (ISSF)*, San Francisco, USA (2012) 1-8.
- Wollenweber, E., Christ, M., Dunstan, R. H., Roitman, J. N., Stevens, J. F., Exudate flavonoids in some Gnaphalieae and Inuleae (Asteraceae), *Zeitschrift fur Naturforschung* 60c (2005) 671-678.
- Xu, Q., Ren, X., Chang, Y., Wang, J., Yu, L., dean, K., Generation of microcellular biodegradable polycaprolactone foams in supercritical carbon dioxide, *Journal of Applied Polymer Science* 94 (2) (2004) 593-597.
- Zapesochnaya, G. G., Dzyadevich, T. V., Karasartov, B. S., Phenolic compounds of *Helichrysum italicum*, *Khimiya Prirodnikh Soyedinenii* 409 (3) (1990) 342-343.
- Zapesochnaya, G. G., Kurkin, V. A., Kudryavtseva, T. V., Karasartov, B. S., Cholponbaev, K. S., Tyukavkina, N. A., Ruchkin, V. E., Dicafeoylquinic acids from *Helichrysum italicum* and *Achilea cartilaginea*, *Khimiya Prirodnikh Soyedinenii* 50 (1) (1992) 40-44.

- Zeljko, S. C., Solic, M. E., Maksimovic, M., Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia, *Natural Products Research* 29 (19) (2015) 1874-1877.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry* 64 (1999) 555–559.
- Zizovic, I., Ivanovic, J., Milovanovic, S., Stamenic, M., Impregnations using supercritical carbon dioxide, *Supercritical CO₂ extraction and its applications*, Ed. Edward Roj, OIC Poland, Lublin, Poland (2014) 23-34.

ПРИЛОГ

Табела П1. Резултати GC-FID и GC-MS анализе етарског уља жалфије и екстраката смиља, добијених у процесу НКЕ на нижем притиску

Компоненте	RI ^a	Проценти у екстрактима (%)									
		Етарско уље жалфије	Смиље	Смиље + 20% етарског уља жалфије		Смиље + 30% етарског уља жалфије		Смиље + 40% етарског уља жалфије		Смиље + 60% етарског уља жалфије	
				Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу
трициклен	921	0,28	-	0,02	-	0,06	-	0,07	-	0,06	-
α -пинен	932	8,90	0,36	2,74	1,55	3,24	1,67	2,96	0,76	3,25	-
камфен	946	7,73	-	2,43	1,41	2,89	1,55	2,73	0,87	3,05	0,29
β -пинен	974	0,90	-	0,29	0,17	0,34	0,19	0,34	0,13	0,39	0,09
мирцен	988	0,94	-	0,34	0,22	0,40	0,25	0,41	0,22	0,46	0,19
α -терпинен	1014	0,18	-	0,02	-	0,05	0,02	0,07	0,03	0,06	-
<i>p</i> -цимен	1020	0,96	-	0,41	0,30	0,47	0,34	0,51	0,34	0,57	0,34
лимонен	1024	1,82	-	1,07	0,92	1,22	1,05	1,24	1,03	1,35	1,08
1,8-цинеол	1026	15,32	-	6,91	5,28	7,91	5,86	8,52	5,99	9,52	6,09
γ -терпинен	1054	0,17	-	0,07	0,05	0,07	0,05	0,08	0,04	0,09	0,04
терпинолен	1086	0,21	-	0,12	0,10	0,12	0,10	0,14	0,12	0,14	0,10
<i>cis</i> -тујон	1101	24,78	-	13,29	11,07	15,22	12,57	17,39	14,64	19,38	16,19
<i>trans</i> -тујон	1112	6,33	-	3,27	2,68	3,72	3,00	4,28	3,51	4,78	3,87
камфор	1141	18,47	-	10,16	8,55	11,67	9,79	13,54	11,70	15,22	13,30
борнеол	1165	3,49	-	2,05	1,77	2,37	2,06	2,85	2,62	3,35	3,26
терпинен-4-ол	1174	0,45	-	0,28	0,24	0,32	0,28	0,38	0,35	0,43	0,41
α -терпинеол	1186	0,18	-	0,11	0,10	0,14	0,13	0,16	0,15	0,18	0,18
борнил ацетат	1287	1,92	-	1,15	1,00	1,34	1,18	1,57	1,44	1,74	1,64
<i>trans</i> -сабинил ацетат	1289	0,21	-	0,13	0,12	0,16	0,15	0,18	0,17	0,20	0,19

Табела П1. Наставак

Компоненте	RI	Проценти у екстрактима (%)									
		Етарско уље жалфије	Смиље	Смиље + 20%		Смиље + 30%		Смиље + 40%		Смиље + 60%	
				етарског уља жалфије		етарског уља жалфије		етарског уља жалфије		етарског уља жалфије	
				Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу
циклосативен	1369		0,25	0,15	0,18	0,14	0,18	0,14	0,19	0,12	0,18
линалол изобутират	1373	-	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-
α -копаен	1374	-	0,11	0,05	0,06	0,06	0,08	0,05	0,07	0,02	0,03
италицен	1405	-	0,28	0,13	0,15	0,10	0,12	0,08	0,12	0,06	0,10
<i>E</i> -кариофилен	1417	0,59	0,72	0,72	0,75	0,76	0,81	0,79	0,86	0,78	0,89
<i>trans</i> - α -бергамотен	1432	-	1,46	0,68	0,81	0,55	0,70	0,53	0,73	0,44	0,69
бисаболан*	n/a ^b	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-
α -хумулен	1452	0,99	0,11	0,67	0,61	0,76	0,70	0,89	0,86	1,00	1,01
γ -мууролен	1478	-	0,82	0,39	0,46	0,34	0,44	0,31	0,42	0,23	0,37
γ -куркумен	1481	-	2,16	0,94	1,13	0,75	0,95	0,69	0,94	0,55	0,88
β -селинен	1489	-	1,30	0,58	0,69	0,44	0,56	0,41	0,56	0,33	0,53
α -селинен	1498	-	0,64	0,30	0,36	0,24	0,31	0,26	0,35	0,19	0,30
α -мууролен	1500	-	0,28	0,16	0,19	0,14	0,18	0,15	0,21	0,13	0,21
γ -кадинен	1513	-	0,24	0,11	0,13	0,10	0,13	0,08	0,10	-	-
δ -кадинен	1522	-	0,09	0,06	0,08	0,04	0,06	0,03	0,05	-	-
α -калакорен	1544	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E</i> -неролидол	1566	-	0,20	0,12	0,14	0,02	0,03	0,01	0,01	-	-
кариофиленил											
алкохол	1570	-	0,24	0,15	0,17	0,12	0,16	0,11	0,15	0,06	0,09
кариофилен оксид	1582	0,12	2,58	1,60	1,88	1,16	1,44	1,01	1,35	0,77	1,16
глобулол	1589	-	0,54	0,35	0,42	0,46	0,59	0,44	0,61	0,35	0,55
виридифлорол	1592	3,18	0,35	2,97	2,93	3,44	3,51	3,73	3,94	4,12	4,68
видрол	1599	0,17	-	0,25	0,27	0,34	0,39	0,67	0,86	0,57	0,81
гвајол	1600	-	2,10	1,04	1,24	0,86	1,10	0,43	0,60	0,33	0,52
ледол	1602	-	1,32	0,25	0,30	0,23	0,30	0,22	0,31	0,19	0,30

Табела П1. Наставак

Компоненте	RI	Проценти у екстрактима (%)									
		Етарско уље жалфије	Смиље	Смиље + 20% етарског уља жалфије		Смиље + 30% етарског уља жалфије		Смиље + 40% етарског уља жалфије		Смиље + 60% етарског уља жалфије	
			Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	
<i>5-epi-7-epi-α-</i> еудезмол	1607	-	0,48	0,75	0,89	0,68	0,87	0,70	0,96	0,62	0,99
хумулен епоксид II	1608	0,43	-	0,21	0,17	0,18	0,11	0,19	0,10	0,15	-
јуненол	1618	-	0,21	0,09	0,10	0,03	0,04	-	-	-	-
муурола-4,10(14)- диен-1-β-ол	1630	-	0,32	0,11	0,14	0,10	0,12	0,09	0,12	0,11	0,17
<i>cis</i> -кадин-4-ен-7-ол	1635	-	0,24	0,31	0,37	0,33	0,42	0,34	0,46	0,41	0,65
алоаромадендрен епоксид	1639	0,43	-	0,18	0,13	0,14	0,06	0,13	0,02	0,14	-
селин-11-ен-4-α-ол	1658	-	1,52	0,68	0,81	0,55	0,70	0,46	0,64	0,40	0,64
14-хидрокси-9- <i>epi-E</i> - кариофилен	1668	0,11	-	0,03	0,02	0,05	0,03	0,07	0,05	0,09	0,08
селина-4(15),11-диен- 8-ол	1670	-	0,40	0,14	0,17	0,10	0,13	0,03	0,04	-	-
<i>epi-β</i> -бисаболол	1670	-	3,68	1,75	2,09	1,44	1,84	1,13	1,56	0,97	1,54
<i>epi-α</i> -бисаболол	1683	-	0,27	0,15	0,18	0,16	0,21	0,17	0,23	0,09	0,14
фарнезол (изомер)	1694	-	0,12	0,01	0,01	0,03	0,04	0,01	0,01	-	-
еудезма-4(15),7(11)- диен-8-он	1713	-	0,38	0,17	0,20	0,16	0,20	0,12	0,16	0,06	0,10
γ- <i>Z</i> -куркумен-12-ол	1728	-	0,47	0,23	0,27	0,19	0,24	0,14	0,19	0,15	0,24
2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -фарнезол	1742	-	0,31	0,11	0,14	0,09	0,11	-	-	0,03	0,05
β-хербертенол	1751	-	0,27	0,14	0,16	0,11	0,14	0,08	0,11	0,04	0,07
куркуфенол	1763	-	0,31	0,16	0,19	0,13	0,16	0,10	0,14	0,06	0,09
<i>Z</i> -γ-куркумил ацетат	1767	-	0,35	0,16	0,19	0,06	0,08	0,09	0,13	0,05	0,07

Табела П1. Наставак

Компоненте	RI	Проценти у екстрактима (%)									
		Етарско уље жалфије	Смиље	Смиље + 20% етарског уља жалфије		Смиље + 30% етарског уља жалфије		Смиље + 40% етарског уља жалфије		Смиље + 60% етарског уља жалфије	
				Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу
γ -бициклохомо- фарнезал	1784	-	1,67	0,87	1,04	0,72	0,92	0,63	0,87	0,50	0,80
α -бисаболол ацетат	1798	-	0,78	0,41	0,49	0,33	0,42	0,28	0,39	0,23	0,36
акорон	1819		0,19	0,11	0,13	0,01	0,02	0,02	0,02	-	-
хексахидрофарнезил ацетон	1845	-	0,67	0,36	0,42	0,31	0,40	0,28	0,38	0,22	0,35
<i>n</i> -хексадеканол	1874	-	0,82	0,38	0,46	0,31	0,40	0,26	0,36	0,22	0,35
канелал	2045	-	10,44	4,94	5,90	4,85	6,19	3,93	5,40	3,28	5,22
манол	2056	0,78	-	0,79	0,79	0,83	0,85	0,94	1,00	1,11	1,30
хенеикозан	2100	-	1,11	0,69	0,82	0,41	0,52	0,38	0,52	0,33	0,53
лауренан-2-он	2115	-	2,17	1,42	1,69	0,96	1,23	0,87	1,19	0,53	0,85
цембренол	2131	-	9,16	4,59	5,48	4,12	5,26	3,44	4,72	2,86	4,55
инцензол	2158	-	1,26	0,63	0,75	0,55	0,70	0,49	0,67	0,37	0,58
α -сантонин	2203	-	8,09	3,96	4,73	3,70	4,73	3,11	4,26	2,45	3,89
лабда-8(7),14-диен- 6,13-диол	2248	-	1,96	0,98	1,17	0,86	1,10	0,73	1,00	0,59	0,95
лариксол	2265	-	1,95	1,02	1,22	0,97	1,24	0,80	1,10	0,64	1,02
трикозан	2300	-	0,55	0,26	0,31	0,18	0,24	0,16	0,22	0,13	0,21
<i>trans</i> -тотарол	2314	-	0,72	0,37	0,44	0,31	0,39	0,26	0,36	0,20	0,31
метил даниелат	2331	-	0,25	0,17	0,20	0,12	0,16	0,10	0,14	0,04	0,06
торулозол	2360	-	1,37	0,67	0,80	0,61	0,78	0,50	0,69	0,39	0,62
тетракозан	2400		0,36	0,20	0,24	0,19	0,25	0,15	0,20	0,09	0,15
1-циклохексил еикозан*	n/a ^b	-	4,17	1,94	2,32	1,76	2,25	1,47	2,02	1,18	1,88
пентакозан	2500	-	1,84	0,82	0,97	0,63	0,81	0,59	0,81	0,46	0,72

Табела П1. Наставак

Компоненте	RI	Проценти у екстрактима (%)									
		Етарско уље жалфије	Смиље	Смиље + 20% етарског уља жалфије		Смиље + 30% етарског уља жалфије		Смиље + 40% етарског уља жалфије		Смиље + 60% етарског уља жалфије	
				Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу	Укупно	Само у смиљу
хексакозан	2600	-	0,23	0,14	0,17	0,12	0,15	0,10	0,14	0,71	1,13
хептакозан	2700	-	2,68	1,27	1,52	0,93	1,19	0,87	1,20	0,72	1,15
октакозан	2800	-	10,21	6,00	7,16	4,55	5,81	3,83	5,25	1,95	3,10
нонакозан	2900	-	0,70	0,36	0,43	0,31	0,39	0,27	0,38	0,13	0,21
триаконтан	3000	-	0,45	0,19	0,23	0,20	0,26	0,16	0,21	0,11	0,18
Монотерпени		93,21	0,46	44,86	35,55	51,70	40,23	57,34	44,11	64,21	47,25
Сесквитерпени		6,01	47,15	27,69	31,89	25,52	30,91	23,15	29,53	20,27	28,74
Дитерпени		0,78	18,87	10,63	12,53	9,34	11,71	8,13	10,86	6,73	10,24
Воскови		-	22,31	11,86	14,16	9,3	11,87	7,98	10,95	5,81	9,25
Остала једињења		-	0,82	0,38	0,46	0,31	0,40	0,26	0,36	0,22	0,35
Укупно		100,00	89,61	95,43	94,59	96,17	95,12	96,94	95,81	97,25	95,83
Број идентификованих компонената		28	64	84		84		82		77	

*тентативна идентификација; ^aретенциони (Kovatz) индекс; ^bнедоступно

Табела П2. Масе фракција екстраката смиље и њихови масени проценти у екстрактурама добијеним у процесу НКЕ на нижем притиску

	Смиље		Смиље + 20% етарског уља жалфије		Смиље + 30% етарског уља жалфије	
	Маса фракције (g)	Масени процент фракције (%)	Маса фракције (g)	Масени процент фракције (%)	Маса фракције (g)	Масени процент фракције (%)
Фракција 1	0,163	16,01	0,273	19,31	0,217	13,28
Фракција 2	0,453	44,50	0,498	35,27	0,571	34,94
Фракција 3	0,111	10,90	0,301	21,30	0,375	22,95
Фракција 4	0,141	13,85	0,245	17,34	0,277	16,95
Фракција 5	0,150	14,74	0,096	6,78	0,194	11,88
Укупно	1,018	100,00	1,413	100,00	1,634	100,00

Табела П2. Наставак

	Смиље + 40% етарског уља жалфије		Смиље + 60% етарског уља жалфије	
	Маса фракције (g)	Масени процент фракције (%)	Маса фракције (g)	Масени процент фракције (%)
Фракција 1	0,312	18,63	0,265	15,34
Фракција 2	0,561	33,49	0,622	36,02
Фракција 3	0,328	19,58	0,391	22,64
Фракција 4	0,317	18,93	0,311	18,01
Фракција 5	0,157	9,37	0,138	7,99
Укупно	1,675	100,00	1,727	100,00

Табела ПЗ. Резултати GC-FID и GC-MS анализе екстракта смиља, добијених у процесу НКЕ на вишем притиску

Компоненте	Проценти у екстрактима (%)			
	RI ^a	НКЕ без косолвента	НКЕ са косолвентом	Екстракт добијен након реекстракције из импрегнираног ксерогела типа 2
капроалдехид	929	0,4	-	0,2
камфен	946	0,5	0,4	-
мирцен	988	-	0,3	-
метил естар 2-метил-3- оксвалеринске киселине	956	3,1	5,2	1,2
<i>p</i> -цимен	1020	0,4	-	-
лимонен	1025	1,4	1,0	-
1,8-цинеол	1026	1,1	-	-
изопентил бутаноат	1052	-	-	0,6
етил естар 2-метил-3-оксвалеринске киселине	1056	0,2	0,3	0,2
метил естар 2,4-диметил-3- оксвалеринске киселине	1056	-	1,7	-
метил каприлат	1083	9,2	-	1,8
линалол	1095	0,6	0,4	-
метил бутил изовалерат	1100	2,0	-	1,1
диметил естар 2-хидрокси-3-метил- бутан-1,4-дионске киселине	1111	-	0,8	-
камфен хидрат	1145	2,7	-	1,2
нерол	1227	0,3	0,3	-
хидроксицитронелал	1286	0,4	1,4	-
тимол	1289	2,0	1,9	0,4
карвакрол	1298	0,2	-	-
метил деканоат	1323	0,2	-	-
нерил ацетат	1359	1,5	2,0	-
1,1-диметокси-декан-капроалдехид	1375	1,1	-	-
диметил ацетал				
изоиталицен	1401	1,3	0,7	-
италицен	1405	1,3	1,9	0,2
<i>cis</i> - α -бергамотен	1411	-	0,4	-
<i>trans</i> - β -кариофилен	1417	0,5	2,1	0,1
α -хумулен	1454	-	0,2	-
α -бисаболен	1464	0,2	2,1	0,1
нерил пропаноат	1475	0,2	0,5	0,8
γ -куркумен	1481	-	2,4	-
<i>ar</i> -куркумен	1484	4,1	6,4	5,6
β -селинен	1489	4,6	4,9	1,8
α -селинен	1498	1,5	2,8	0,4
β -куркумен	1514	-	0,4	-
δ -кадинен	1522	-	0,3	2,2
метил лаурат	1524	2,2	0,3	2,6
10- <i>epi</i> -италицен етар	1536	0,3	0,6	-
(<i>E</i>)-неролидол	1564	-	0,2	-
1-хексадекан	1588	-	1,3	-
видрол	1599	-	0,7	-
розифолиол	1600	-	0,4	-
метил тридеканоат	1622	1,4	-	1,5
β -еудезмол	1649	-	0,8	-

Табела ПЗ. Наставак

Компоненте	Проценти у екстрактима (%)			
	RI	НКЕ без косолвента	НКЕ са косолвентом	Екстракт добијен након реекстракције из импрегнираног ксерогела типа 2
селин-11-ен-4- α -ол	1658	1,1	1,8	-
β -бисаболол	1674	-	0,4	-
метил естар 12-метил тридеканске киселине	1682	-	-	0,6
метил миристолеат	1683	1,1	-	6,9
γ -(Z)-атлантон	1694	-	0,8	-
неролидол ацетат	1713	-	0,8	-
метил миристат	1722	4,1	-	4,0
(E)-9-метил-8-тридецен-2-ол	1735	0,1	-	1,1
ксанторизол	1751	2,1	0,8	0,8
метил естар 12-метил тетрадеканске киселине	1771	1,6	-	0,7
пентадеканол	1775	0,3	-	0,6
еудезм-11-ен-4- α -диоол	1808	-	0,7	-
метил естар пентадеканске киселине	1813	0,4	-	0,6
метил естар 14-метил пентадеканске киселине	1814	0,3	-	0,7
2 α -ацетокси-11-метокси-аморфа-4,7- диен	1861	-	0,9	-
метил естар (Z)-11-хексадеканске киселине	1885	0,8	-	1,5
метил естар (Z)-7-хексадеканске киселине	1886	0,8	-	1,1
метил палмитат	1922	5,0	0,6	2,9
палмитинска киселина	1959	0,2	-	2,9
метил естар 14-метил палмитинске киселине	1983	-	-	1,2
3,4-дихидро-4,4,5,7,8-пентаметил кумарин-6-ол	2087	5,9	6,4	4,1
метил линолеат	2095	2,0	0,3	2,6
олеинска киселина	2097	4,1	-	6,1
метил олеат	2101	-	0,4	0,4
9,7-(Z)-октадекадиенал	2118	4,5	-	0,4
дихидрокостунолид	2131	2,2	-	0,4
линолеинска киселина	2132	0,5	-	1,0
2 α -ацетокси-11-метокси-аморфа-4,7- диен (дериват)	2146	-	7,0	-
2 α -ацетокси-аморфа-4,7(11)-диен-8- он (дериват)	2155	-	4,6	-
етил линолеат	2155	0,6	-	0,7
2,2-диметил-7,8-диметоксихроманон	2206	-	2,0	-
2-(9-октадеценил-окси)-(Z)-етанол	2336	0,3	0,5	0,8
циклохексил естар палмитинске киселине	2439	2,1	3,2	7,8
9-октил-хептадекан	2446	0,8	-	-
метил бехенат	2459	2,0	-	1,2
пентакозан	2500	-	1,5	4,3

Табела ПЗ. Наставак

Компоненте	Проценти у екстрактима (%)			
	RI	НКЕ без косолвента	НКЕ са косолвентом	Екстракт добijen након реекстракције из импрегнираног ксерогела типа 2
3-октил- <i>cis</i> -оксирандодеканска киселина	2617	1,2	-	1,2
2,2-трикосеинска киселина	2654	-	-	0,7
еикозил циклохексан	2669	1,3	2,8	-
хептакозан	2700	1,1	-	2,4
нонакозан	2900	3,0	5,9	3,5
унтриаконтан	3100	2,7	7,4	4,0
тритриаконтан	3300	-	-	3,9
Монотерпени		11,3	10,0	2,4
Сесквитерпени		17,0	31,8	11,9
Масне киселине, естри, алдехиди и алкохоли		50,3	13,3	56,6
Угљоводоници са восковима		8,9	18,9	18,1
Деривати кумарина и аморфена		8,1	20,9	4,5
Остала једињења		1,5	0,0	0,2
Укупно		97,1	93,9	93,7
Број идентификованих компонената		58	52	51

^aRI – ретенциони (Kovatz) индекс

Биографија аутора

Светолик Максимовић је рођен 27.11.1987. године у Ужицу, где је завршио основну школу и гимназију. Дипломирао је 2010. године на Катедри за органску хемијску технологију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду. Завршни рад на тему “Хомогено катализована синтеза биодизела на повишеним притисцима и температурама” под руководством ментора проф. др Дејана Скале, одбранио је са оценом 10. На истој катедри је 2011. године одбранио са оценом 10 мастер рад на тему “Примена наткритичних флуида код добијања материјала специфичних својстава (микро- и наночестице)”, такође под руководством ментора проф. др Дејана Скале. Исте године уписао је докторске студије на Технолошко-металуршком факултету, студијско подручје Хемијско инжењерство. Од октобра 2011. године ангажован је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије Ш45001 под називом “Наноструктурни функционални и композитни материјали у каталитичким и сорпционим процесима”. Први део своје докторске тезе реализовао је под менторством проф. др Дејана Скале. Завршни испит на тему “Наткритична екстракција из смиља, жалфије и њихове смеше и могућности импрегнације добијених екстраката на различитим материјалима” одбранио је 2013. године са оценом 10, под руководством ментора проф. др Ирене Жижовић. Запослен је као истраживач сарадник на Катедри за органску хемијску технологију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Светолик Максимовић

број индекса 4054/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ЕКСТРАКЦИЈА ИЗ СМИЉА (*HELICHRYSUM ITALICUM*) И ИМПРЕГНАЦИЈА ЧВРСТИХ НОСАЧА ЕКСТРАКТОМ ПРИМЕНОМ НАТКРИТИЧНОГ УГЉЕНИК(IV)-ОКСИДА

- 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 кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 20.11.2017.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Светолик Максимовић

Број индекса 4054/2011

Студијски програм хемијско инжењерство

Наслов рада Екстракција из смиља (*Helichrysum italicum*) и импрегнација чврстих носача екстрактом применом наткритичног угљеник(IV)-оксида

Ментор проф. др Ирена Жижовић

Потписани Светолик Максимовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао 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, 20.11.2017.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ЕКСТРАКЦИЈА ИЗ СМИЉА (*HELICHRYSUM ITALICUM*) И ИМПРЕГНАЦИЈА
ЧВРСТИХ НОСАЧА ЕКСТРАКТОМ ПРИМЕНОМ НАТКРИТИЧНОГ УГЉЕНИК(IV)-
ОКСИДА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао 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 одлучио.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 20.11.2017.

C. Mamicinobito

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.