



**ISKORIŠĆENJE SPOREDNOG PROIZVODA UVE
(*ARCTOSTAPHYLOS UVA URSI L.*) U CILJU DOBIJANJA
NOVIH BILJNIH EKSTRAKATA SAVREMENIM
TEHNIKAMA EKSTRAKCIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA



Abdulahkim Naffati



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

**ISKORIŠĆENJE SPOREDNOG PROIZVODA UVE
(*ARCTOSTAPHYLOS UVA URSI L.*) U CILJU DOBIJANJA
NOVIH BILJNIH EKSTRAKATA SAVREMENIM
TEHNIKAMA EKSTRAKCIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Senka Vidović

Kandidat:

Abdulahakim Naffati, master inženjer

Novi Sad, 2018.

Univerzitet u Novom Sadu

Tehnološki fakultet

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Abdulhakim Naffati
Mentor (titular, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Senka Vidović, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Iskorišćenje sporednog proizvoda uve (<i>Arctostaphylos uva ursi</i> L.) u cilju dobijanja novih biljnih ekstrakata savremenim tehnikama ekstrakcije
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski/engleski

Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Fizički opis rada: FO	(7 poglavlja/ 136 stranica/ 22 slike/ 25 tabela/ 281 referenca
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Farmaceutsko inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Arctostaphylos uva ursi</i> , savremene ekstrakcione tehnike, polifenoli, ekstrakcija subkritičnom vodom, ultrazvučna ekstrakcija, <i>spray drying</i> , antioksidativna aktivnost
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	U okviru ove doktorske disertacije ispitana je mogućnost ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz biljne prašine <i>A. uva-ursi</i> , koja nastaje kao sporedni

	<p>proizvod u fabrici filter čaja. Za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja primenjene su različite tehnike ekstrakcije (klasična ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija subkritičnom vodom), kao i različiti ekstragensi: voda na sobnoj temperaturi, 30-70% etanol i subkritična voda. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u ekstraktima ispitan je primenom odgovarajućih spektrofotometrijskih metoda i HPLC metode. U ekstrakciji biljne prašine <i>A. uva-ursi</i> detaljno je matematički analiziran uticaj procesnih parametara na ekstrakciju subkritičnom vodom bioaktivnih jedinjenja iz materijala ovog tipa i u tom smislu je posmatran uticaj temperature, vremena i dodatka kiseline, a takođe su određeni uslovi pri kojima je, primenom ove tehnike, moguće ostvariti maksimalnu ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja od značaja. Pored toga prikazana je i mogućnost primene spray drying tehnike za sušenje tečnih i proizvodnju suvih ekstrakta <i>A. uva-ursi</i> u formi praha. Na kraju, na osnovu koncentracije bioaktivnih jedinjenja i njihovog delovanja, dat je predlog nekoliko novih preparata na bazi ekstrakata <i>A. uva-ursi</i>, u tečnoj i čvrstoj formi.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>07.12.2017.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: KO</p>	<p>predsednik: Prof. dr Zoran Zeković, redovni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu član: Prof. dr Senka Vidović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu član: dr Milica Aćimović, naučni saradnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad</p>

University of Novi Sad

Faculty of Technology

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monographic documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Abdulhakim Naffati
Mentor: MN	Prof. Dr Senka Vidović
Title: TI	Utilization of uva (<i>Arctostaphylos uva ursi</i> L.) byproduct in order to obtain new herbal extracts by modern extraction techniques
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English

Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	(7 chapters/ 136 pages/ 22 figures/ 25 tabels/ 281 references
Scientific field: SF	Technological engineering
Scientific discipline: SD	Pharmaceutical engineering
Subject, Key words: SKW	<i>Arctostaphylos uva ursi</i> , modern extraction techniques, polyphenols, subcritical water extraction, ultrasound assisted extraction, <i>spray drying</i> , antioxidant activity
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	None
Abstract: AB	This dissertation investigated the possibility to extract bioactive compounds from <i>A. uva-ursi</i> herbal dust, which occurs as a by-product at the filter-tea

	<p>factory. Various extraction techniques (classical extraction, ultrasound assisted extraction and subcritical water extraction), were applied for the extraction of bioactive compounds, as well as different solvents: water at room temperature, 30-70% ethanol and subcritical water. The content of bioactive compounds in the extracts was investigated using appropriate spectrophotometric methods and the HPLC method. In the extraction of <i>A. uva-ursi</i> herbal dust a detailed mathematical analysis of the influence of process parameters on subcritical water extraction of bioactive compounds from this type of material was conducted. In this regard the influence of temperature, time and acid addition was observed and the conditions under which it is possible to achieve maximum extraction of significant bioactive compounds, by applying this technique, were determined. In addition, the possibility of applying the <i>spray drying</i> technique for drying the liquid and producing dry <i>A. uva-ursi</i> extracts in the form of powder is also presented. Eventually, based on the concentration of the bioactive compounds and their activity, a proposal for a several new preparations in liquid and solid form, based on <i>A. uva-ursi</i> extracts is given.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>7th December 2017</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: Prof. dr Zoran Zeković, Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad</p> <p>member: Prof. dr Senka Vidović, Associate Professor, Faculty of Technology, Novi Sad</p> <p>member: dr Milica Aćimović, Research Associate, Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad</p>

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> , opis biljke, rasprostranjenost, upotreba i delovanje	3
1.2. Hemijski sastav <i>A. uva-ursi</i>	5
1.3. Tradicionalna upotreba <i>A. uva-ursi</i>	11
1.4. Farmakološka aktivnost <i>A. uva-ursi</i>	11
1.5. Karakteristike apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije (ADME) arbutina	14
1.6. <i>A. uva-ursi</i> biljni proizvodi na tržištu EU i Srbije	16
2. UVOD U MODERNE EKSTRAKCIONE TEHNOLOGIJE	21
2.1. Ultrazvučna ekstrakcija (UAE)	22
2.2. Voda kao ekstragens	25
2.3. Osnove ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju (SWE)	28
2.4. Primena SWE	34
2.4.1. Primena SWE za ekstrakciju fenolnih jedinjenja (ukupni fenoli, flavonoidi, antocijanini)	34
2.4.2. Primena SWE za ekstrakciju šećera	38
2.4.3. Primena SWE za ekstrakciju etarskih ulja i aromatičnih jedinjenja	40
2.5. Uticaj procesnih parametara u SWE na ekstrakciju fenolnih jedinjenja	41
3. OSNOVI TEHNOLOGIJE SUŠENJA SA RASPRŠIVANJEM (<i>Spray drying</i>)	45
3.1. Princip <i>spray drying</i> procesa	46
3.2. Izazovi u <i>spray drying</i> sušenju i primena maltodekstrina	49
4. EKSPERIMENTALNI DEO	51
4.1. Biljni materijal	51
4.2. Hemikalije	51
4.3. Određivanje sadržaja vlage biljnog materijala	51
4.4. Određivanje veličine čestica biljnog materijala	52
4.5. Konvencionalna ekstrakcija	52
4.6. Ultrazvučna ekstrakcija	53
4.7. Ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE)	53
4.8. Sušenje tečnog ekstrakta primenom <i>spray drying</i> tehnologije	54
4.9. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	55
4.10. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	56
4.11. HPLC analiza dobijenih ekstrakata	56
4.12. Određivanje antioksidativne aktivnosti-DPPH test	57
4.13. Analiza reduktivnog kapaciteta	57

4.14. Analiza sadržaja vlage u suvom ekstraktu-prahu	58
4.15. Analiza higroskopnosti suvog ekstrakta	58
4.16. Analiza indeksa rastvorljivosti u vodi i indeksa apsorpcije vode	58
4.17. Određivanje nasipne zapremine suvih ekstrakata	59
4.18. Analiza rehidracije suvih ekstrakata	59
4.19. Formulacija i priprema granulata koji sadrži <i>A. uva-ursi</i>	59
4.20. Analiza higroskopnosti i rastvorljivosti u vodi granulata sa suvim ekstraktom <i>A. uva-ursi</i>	61
4.21. Metoda odzivne površine (<i>response surface methodology</i> , RSM)	61
5. REZULTATI I DISKUSIJA	63
5.1. Konvencionalna ekstrakcija (CE) herbalnog praha <i>A. uva-ursi</i> i hemijska analiza dominantnih bioaktivnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima.....	64
5.2. Ultrazvučna ekstrakcija (UAE) biljnog praha <i>A. uva-ursi</i> i hemijska analiza dominantnih bioaktivnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima.....	71
5.3. SWE biljnog praha <i>A. uva-ursi</i> i hemijska analiza dominantnih bioaktivnih jedinjenja dobijenih ekstrakata	79
5.3.1. Fitovanje modela.....	81
5.3.2. Uticaji parametara SWE na ekstrakciju UF iz biljnog praha <i>A. uva-ursi</i>	82
5.3.3. Uticaji parametara SWE na prinos UFI iz biljnog praha <i>A. uva-ursi</i>	86
5.3.4. Uticaji parametara SWE na antioksidativnu aktivnost ekstrakata dobijenih iz biljnog praha <i>A. uva-ursi</i>	88
5.3.5. Optimizacija procesa UAE.....	91
5.3.6. HPLC analiza ekstrakata <i>A. uva-ursi</i> dobijenih SWE.....	92
5.4. <i>Spray drying</i> ekstrakata <i>A. uva ursi</i> dobijenih pri optimalnim procesnim uslovima SWE.....	94
5.5. Predlog novih proizvoda na bazi ekstrakata od biljne prašine <i>A. uva-ursi</i>	100
5.5.1. Priprema i analiza granulata koji sadrži suvi ekstrakt <i>A. uva-ursi</i> u formi praha	101
6. ZAKLJUČCI.....	106
7. LITERATURA	109

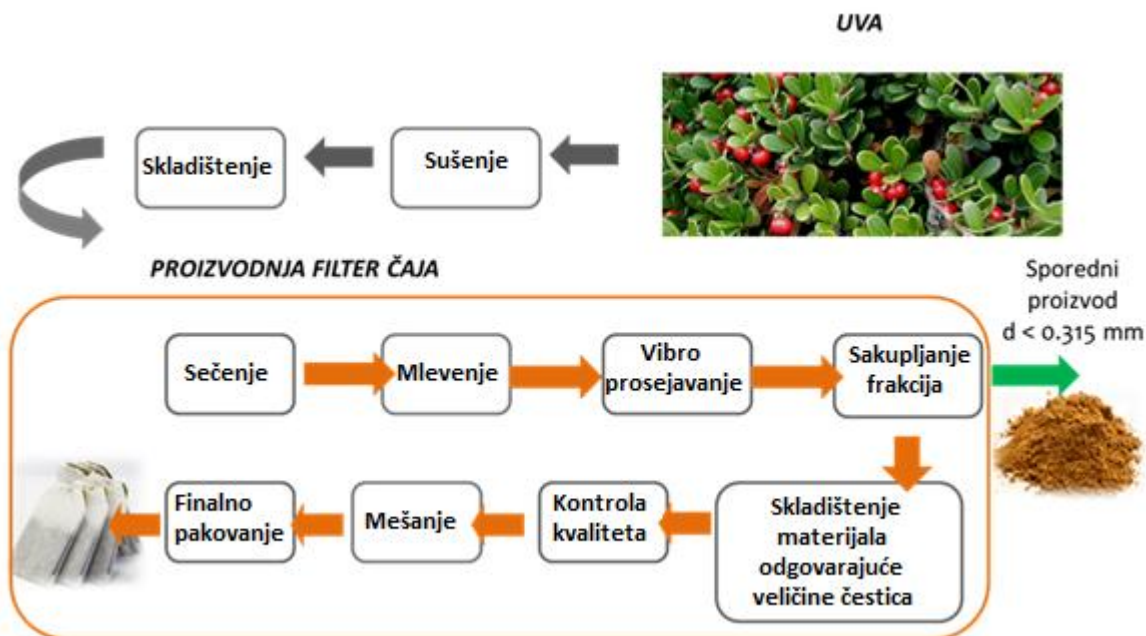
1. UVOD

Na teritoriji Srbije sakuplja se veliki broj biljnih vrsta koje se koriste kako u zvaničnoj tako i u narodnoj medicini, u farmaceutskoj industriji za proizvodnju različitih biljnih preparta, ali i u prehrambenoj industriji, kao začini ili funkcionalni dodaci koji unapređuju kvalitet proizvoda. Teritorija Srbije prepoznata je kao teritorija sa veoma bogatom florom, posebno raznovrsnim lekovitim biljem. Neke od lekovitih biljnih vrsta koje se mogu naći na teritoriji Srbije su: hajdučka trava (*Achillea millefolium L.*), kopriva (*Urtica dioica L.*), smilje (*Antennaria dioica L.*), čičak (*Articum lappa L.*), rusa (*Chelidonium majus L.*), dren (*Cornus mas L.*), kamilica (*Matricaria chamomilla*), nana (*Mentha piperita*), šipak (*Rosa canina*), matičnjak (*Melissa officinalis L.*), zova (*Sambucus nigra*), itd. (Jančić, 1988).

S obzirom na to da se lekovito bilje na tržištu danas najčešće nalazi u obliku biljnog čaja, proizvodnja biljnih filter čajeva dobija sve više na značaju i predstavlja jednu od unosnih proizvodnih grana. U Srbiji postoji veliki broj malih proizvođača biljnog čaja, koji proizvode biljni čaj uglavnom u rinfuznoj formi, ali postoje i veće kompanije koje se bave proizvodnjom biljnih proizvoda i u rinfuznoj i u filter formi, kako za domaće tako i za inostrano tržište. Neke od njih su: „Fructus” iz Bačke Palanke, „Adonis” iz Sokobanje, „Macval” iz Novog Sada, “Bilje Borča”, Beograd, i Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” iz Beograda.

U proizvodnji biljnog čaja u filter formi primenjuju se različite tehnološke operacije kao što su: sušenje, sečenje, mlevenje, prosejavanje. Šema ovog tehnološkog procesa prikazana je na slici 1. Osnovni cilj prerade lekovitog bilja prikazanim operacijama jeste proizvodnje „fino usitnjenog“ biljnog materijala, tzv. *fine cut* frakcije, čija je veličina čestica od 0,315 do 2,0 mm. Frakcija navedene veličine čestica jeste frakcija koja se pakuje u filter kesice i koristi za proizvodnju finalnog proizvoda - biljnog filter čaja. Zbog nemogućnosti potpune kontrole nad procesom usitnjavanja biljnog materijala, koji se odvija u mlinovima čekićarima, nakon frakcionisanja dobija se određena količina biljnog materijala veličine čestica ispod 0,315 mm. Biljni materijal koji se sastoji od čestica prečnika manjeg od 0,315 mm ne može se koristiti u daljoj proizvodnji filter čaja,

zbog toga što je veličina tih čestica manja od veličine pora na filter kesici. Iz tog razloga ovakav biljni materijal (obično poznat pod nazivom „herbalna prašina“ ili „biljna prašina“) se izbacuje iz proizvodnje kao sporedni proizvod ili otpad (Ramić i sar., 2015).



Slika 1. Šema proizvodnje čaja u filter vrećicama

Količina generisane herbalne prašine iznosi od oko 10 do oko 40%, u odnosu na količinu ulazne sirovine, i najviše zavisi od tipa biljne sirovine koja se prerađuje. Tokom proizvodnje jednokomponentnog filter čaja uve ili čajnih mešavina u filter vrećicama koje sadrže uvu, proizvede se od 10 do 20% sporednog proizvoda, odnosno „herbalne prašine“ uve. Upotrebna vrednost ovog sporednog proizvoda do danas nije definisana, i u fabrici čaja on se obično odbacuje kao otpad iz proizvodnje. Zbog visokog sadržaja farmakološki aktivnih jedinjenja u nativnom materijalu uve i prečnika čestica ovakve biljne frakcije (koji je relativno mali, čime se smanjuje ograničenje za prenos mase iz čvrste u tečnu fazu) pretpostavka je da bi se herbalna prašina uve mogla iskoristiti kao polazna sirovina za proizvodnju novih biljnih preparata-ekstrakata odgovarajućim čvrsto-tečnim tehnikama ekstrakcije.

1.1. *Arctostaphylos uva-ursi*, opis biljke, rasprostranjenost, upotreba i delovanje

A.uva-ursi (*Arctostaphylos uva-ursi*) je u narodu poznata kao uva, medveđe grožđe, medveđe uši i medvetka (Tucakov, 1984). Ovo je višegodišnja, zimzelena biljka, koja se u prirodi nalazi u formi veoma razgranatog niskog žbunića poleglog po zemlji. Cvetovi *A.uva-ursi* su sitni i zvonasti, ružičaste ili bele boje. Plod je okrugla, mnogosemena, crvena bobica (slika 2). Lišće je debelo, golo, sjajno, sitno i tamno zelenog lica, svetlijeg naličja, uglavnom dužine 7-30 mm i širine 5-12 mm (Tucakov, 1984; EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1.). Celokupan list je ovalnog oblika sa glatkim ivicama, donekle okrenut nadole, sužavajući se u osnovi u kratku peteljku. List je pri vrhu tup ili obao. Mreža žilica jasno je vidljiva na obe površine. Gornja površina je obeležena utisnutim žilicama, što joj daje karakterističan zrnast izgled. Samo mladi list ima cilijarne ivice. Stari listovi su glatki (*Ph. Eur.* 6th; EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1).



Slika 2. *Arctostaphylos uva-ursi*

Taksonomija *A. uva-ursi* je data u tabeli 1.

Tabela 1. Taksonomija *A. uva-ursi*

Taksonomija	
carstvo:	<i>Plantae</i>
razred:	<i>Magnoliophyta</i>
klasa:	<i>Magnoliopsida</i>
red:	<i>Ericales</i>
porodica:	<i>Ericaceae</i>
rod:	<i>Arctostaphylos</i>
vrsta:	<i>Arctostaphylos</i> <i>uva-ursi</i>

Postoji nekoliko podvrsta u okviru vrste *A. uva-ursi*. To su (www.itis.gov):

- *Arctostaphylos uva-ursi* ssp. *adenotricha* (Fernald i Calder i Roy Taylor),
- *Arctostaphylos uva-ursi* ssp. *coactilis* (Fernald i A. Löve i D. Löve i Kapoor),
- *Arctostaphylos uva-ursi* ssp. *longipilosa* Packer i Denford,
- *Arctostaphylos uva-ursi* ssp. *monoensis* Roof,
- *Arctostaphylos uva-ursi* ssp. *stipitata* Packer i Denford,
- *Arctostaphylos uva-ursi* var. *adenotricha* Fernald i Macbr.,
- *Arctostaphylos uva-ursi* var. *coactilis* Fernald i Macbr.,
- *Arctostaphylos uva-ursi* var. *monoensis* Roof,
- *Arctostaphylos uva-ursi* var. *leobreweri* Roof,
- *Arctostaphylos uva-ursi* var. *marinensis* Roof,
- *Arctostaphylos uva-ursi* var. *pacifica* Hultén,
- *Arctostaphylos uva-ursi* var. *stipitata* (Packer i Denford),
- *Arctostaphylos uva-ursi* var. *suborbiculata* Knight.

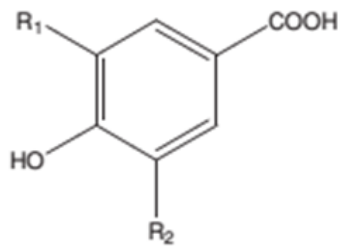
A. uva-ursi je jedna od retkih vrsta *Ericaceae* koja nije karakteristična za kisela staništa. Ona je autohtona vrsta na području od Labradora do Aljaske, južno od Virdžinije, Ilinoisa i Nebraske i u planinama severno od Novog Meksika preko Kalifornije do Aljaske (Voss i Reznicek, 2012), Azije i Evrope (Pegg i sar., 2008). Ova dugogodišnja biljna vrsta izuzetno je tolerantna na hladnoću i preferira gruba, dobro do prekomerno isušena zemljišta šuma, peščanih i neplodnih područja. Iako *A. uva-ursi* najčešće raste na peščanim predelima gde sunca ima u izobilju, ona se takođe dobro razvija i u delimičnoj hladovini šuma (USDA, 2012).

1.2. Hemijski sastav *A. uva-ursi*

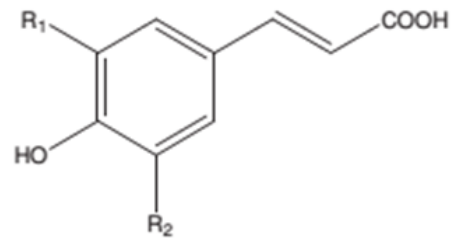
Hemijski sastav *A. uva-ursi* uključuje brojna jedinjenja, ali prema Khonkarn i sar., *A. uva-ursi* je poznata kao lekovita biljka sa visokom koncentracijom pre svega fenolnih jedinjenja (Khonkarn i sar., 2010). Fenoli obavljaju niz funkcija u biljnim organizmima i zbog toga imaju veliki uticaj na fiziologiju biljaka. Deluju kao antioksidanti, antimikrobni agensi, fotoreceptori, vizuelni atraktanti za insekte značajne za oprašivanje cveća, kao repelenti herbivora, ili kao zaštitnici biljnih tkiva od prekomernog UV zračenja (Pietta 2000; Fang i sar., 2002; Heim i sar., 2002). Fenoli su jedinjenja koja poseduju jedan ili više aromatičnih prstenova koji nose jednu ili više hidroksilnih grupa sa više od 8000 strukturnih varijanti (Fresco i sar., 2006). Oni se formiraju na mnogo različitih načina, ali najvažniji je ciklus šikimske kiseline (Ćetković, 2009). Fenoli se generalno dele na fenolne kiseline (fenolkarboksilne kiseline) i analogne, flavonoide, tanine, stilbene, kurkuminoide, kumarine, lignane i druge, na osnovu broja fenolnih prstenova i strukturnih elemenata koji povezuju ove prstenove (Fresco i sar., 2006).

Fenolne kiseline su značajna vrsta fenolnih jedinjenja, i široko su rasprostranjene u biljnom carstvu (Cai i sar., 2004). Fenolne kiseline su fenoli koji u strukturi sadrže fenolni prsten i bar jednu funkciju organske karbonske kiseline. U zavisnosti od jedinica ugljenika u bočnom lancu na fenolnom prstenu, fenolne kiseline se mogu podeliti na C6-C3, C6-C2 i C6-C1 jedinjenja, a najvažnije su C6-C3 (izvedena iz hidroksicinamične kiseline) i C6-C1 (jedinjenja sa hidroksibenzoovom strukturom) (Goleniowski i sar., 2013). Kao što je prikazano na slici 3, predominantne fenolne kiseline uključuju hidroksibenzoove kiseline (npr., galnu kiselinu, *p*-

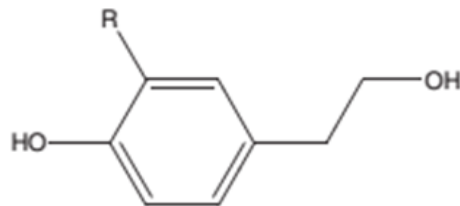
hidroksibenzoevu kiselinu, protokatehuidnu kiselinu, vanilinsku kiselinu i siringičnu kiselinu). Zbog strukturne sličnosti, nekoliko drugih polifenola smatraju se analognim fenolnim kiselinama, a to su kapsaicin, ruzmarinska kiselina, gingerol, gosipol, paradol, tirozol, hidroksitirozol, elaginska kiselina, cinarin i salvianolna kiselina B (Fresco i sar., 2006; Han i sar., 2007). Fenolne kiseline su predmet velikog broja hemijskih, bioloških, poljoprivrednih i medicinskih istraživanja (Verpoorte i sar., 2002).



R₁=H, R₂=H: *p*-hidroksibenzoeva kiselina
 R₂=OH: protokatehuidna kiselina
 R₂=OH: galna kiselina
 R₁=OCH₃, R₂=H: vanilinska kiselina
 R₁=OCH₃, R₂=OCH₃: siringična kiselina



R₁=H, R₂=H: *p*-kumarinska kiselina
 R₁=H, R₂=OH: kofeinska kiselina
 R₁=OH, R₂=OCH₃: ferulična kiselina
 R₁=OCH₃, R₂=OCH₃: sinapična kiselina



R=H: tirozol
 R=OH: hidroksitirozol

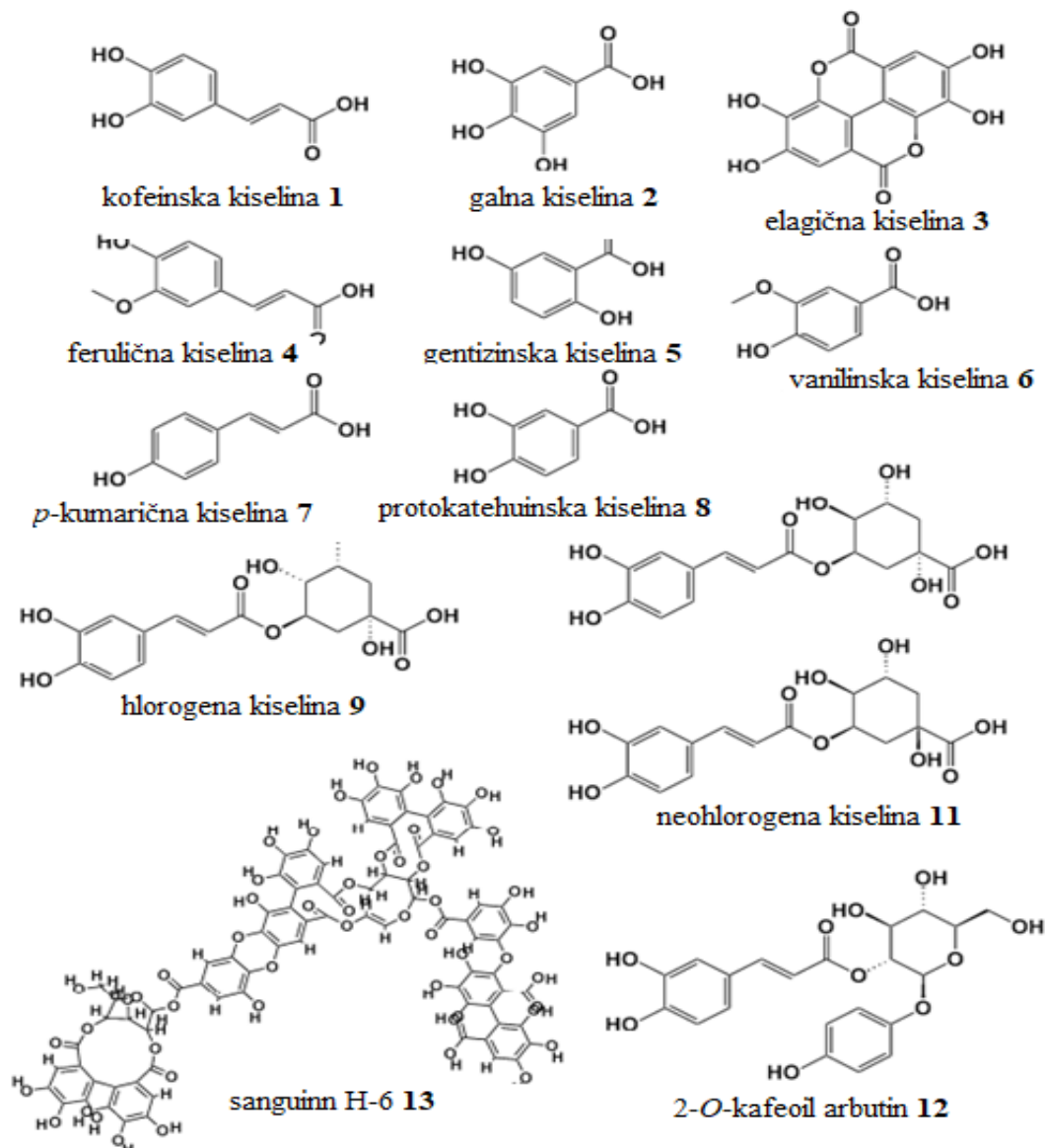
Slika 3. Hemijske strukture fenolnih kiselina (Huang i sar., 2009)

Nekoliko grupa fenolnih jedinjenja je prisutno u *A. uva ursi*: fenolne kiseline, hidrohinon, flavonoidi, antocijanini, tanini. Tako, prema izvoru EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1, *A. uva-ursi* sadrži:

- **Tanine**, 10 – 20%, uključujući: galotanin (penta-*O*-galoil- β -D-glukoza i heksa-*O*-galoil- β -D-glukoza), elagitanin korilagin (1-*O*-galoil-3.6-di-*O*-heksahidroksidifenoil- β -D-glukoza),
- **Derivate hidrohinona** (arbutin i metilarbutin). *A. uva-ursi* sadrži 5-16% arbutina, ali je zabeležen i sadržaj od preko 17% u listovima. Sadržaj arbutina je sezonski promenljiv. Sadržaj drugog dominantnog derivata hidrohinona – metil arbutina je do 4%. Pored toga, zabeleženo je i prisustvo galoil derivata arbutina u koncentraciji od 0,05% (*O*-galoil hidrohinon-*O*- β -D-glukozid, 2''*O*-galoil arbutin, 6''*O*-galoil arbutin) i slobodnog hidrohinona u koncentraciji obično manjoj od 0,3%. Struktura ovih jedinjenja prikazana je na slici 4.
- **Derivate antocijanidina**, uključujući cijanidin i delphinidin.
- **Flavonoide**: hiperozid (0,8–1,5%), kvercitrin-3- β -D-*O*-6''galoil galaktozid, kvercitrin, izokvercitrin, miricitrin, miricetin-3-*O*- β -D-galaktozid, 2 izomerna kvercetin arabinozida, aglikone ovih jedinjenja, katehin i kaemferol.
- **Fenolne kiseline**, približno 0,25% u slobodnom obliku, uglavnom galna, *p*-kumarinska i siringična kiselina, ali takođe i salicilna kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, ferulična kiselina, kofeinska kiselina i litospermična kiselina (dimerna kofeinska kiselina). Strukture nekih od ovih kiselina prikazane su na slici 4.
- **Triterpene**: 0,4 – 0,8%, uključujući ursoličnu kiselinu, uvaol, α -amirin, α -amirin acetat, β -amirin, lupeol, mešavinu derivata mono- i di-ketonskog α -amirina. Struktura nekih od ovih jedinjenja je prikazana na slici 7.
- **Etarsko ulje (u tragovima) i vosak**.

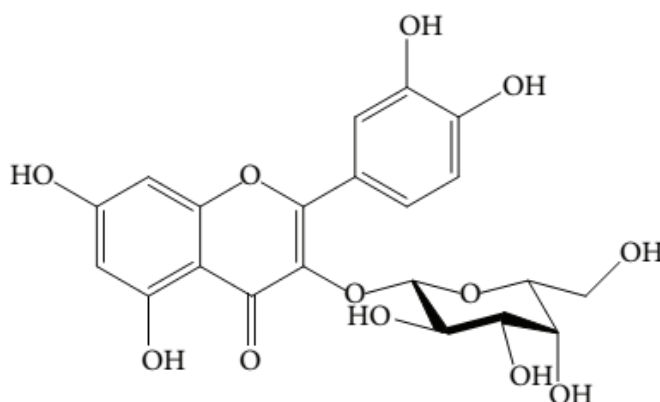
Prema Ferlemiju i Lamariju (2016), *A. uva-ursi* sadrži različite fenolne kiseline (Slika 4). Oni navode da *A. uva-ursi* sadrži kofeinsku, galnu, elagičnu, feruličnu, vanilinsku, *p*-kumarinsku kiselinu i mnoge druge (slika 4). Među fenolnim kiselinama **galna kiselina** je jedna od najznačajnijih. *A. uva-ursi* sadrži galnu kiselinu (između 634 i 980 $\mu\text{g/mL}$ u sveže pripremljenim vodenim ekstraktima), a takođe i u obliku galoil arbutina (Monografije SZO; Pegg i sar., 2008;

Chauhan i sar., 2007). Galna kiselina kao prirodni antioksidant ima značajne inhibitorne efekte na proliferaciju ćelija, indukuje apoptozu u nizu ćelijskih linija karcinoma i pokazuje selektivnu citotoksičnost na tumorske ćelije sa većom osetljivošću u odnosu na normalne ćelije i hidrokisicinamične kiseline (Faried i sar., 2007). Takođe se navodi da jedna važna grupa *A. uva-ursi* jedinjenja, galotanini nastaju od galne kiseline (Monografije SZO; Pegg i sar., 2008; Chauhan i sar., 2007).



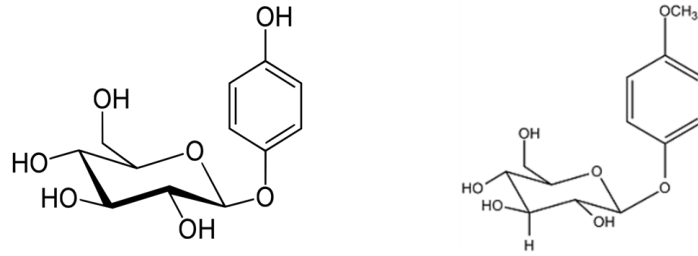
Slika 4. Strukture najčešćih fenolnih kiselina i derivata kiselina u *A.uva-ursi* (Ferlemi i Lamari, 2016)

Hiperozid, kvercetin-3-*O*- β -*D*-galaktozid, je flavonolni glikozid koji je rasprostranjen u mnogim tradicionalnim lekovitim biljkama, kao što su *Semen cuscutae* (Ye i sar., 2002), *kantarion* (Pietta i sar., 2001; Sloley i sar., 2000), *glog* (Zhang i sar., 2001), *Balbisia calycina* (Mino i sar., 2002) i *Alchornea cordifolia* (Manga i sar., 2004). Prema EMA, hiperozid je jedno od jedinjenja koje je u ekstraktima uve prisutno u većoj koncentraciji (EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1). Utvrđeno je da hiperozid, kao značajno bioaktivno jedinjenje, poseduje antivirusno dejstvo (Shahat i sar., 2001; Shi i sar., 2001), antiinflamatorno (Lee i sar., 1992), kardioprotektivno (Zhang i sar., 2001; Li i sar., 2002; Wang, 1996), hepatoprotektivno delovanje (Xiong i sar., 2000; Ito, 1990), kao i zaštitno delovanje u pogledu želudačne sluzokože (Zhao i sar., 1999; Song i sar., 1995).



Slika 5. Hiperozid

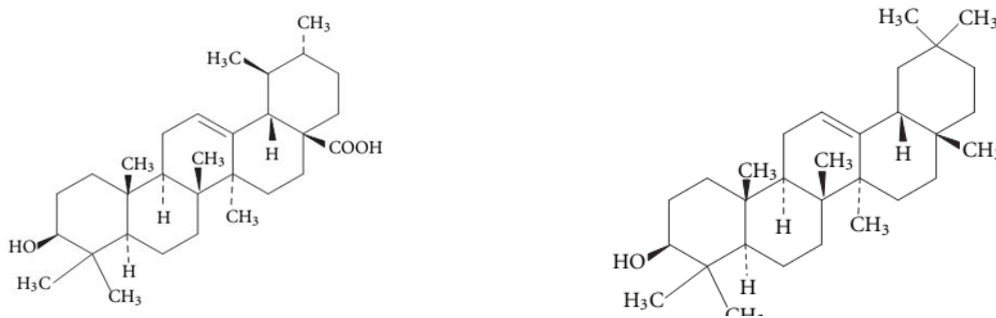
Najveći deo fenolnih jedinjenja prisutnih u *A. uva-ursi* čine derivati hidrohinona: arbutin i metilarbutin (slika 6). I arbutin (4-hidroksifenol β -*D*-glukopiranozid) i metilarbutin (*O*-metilhidrohinon-*O*- β -*D*-glukozid) su derivati hidrohinona i pripadaju grupi prostih fenola. Oba derivata su u obliku glikozida, tj. glukoza je vezana za aglikonsku komponentu glikozidnom vezom. Hidrohinon se dobija hidrolizom ovih glikozida, ispoljavajući antiseptičko i diuretičko dejstvo (EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1).



Slika 6. Arbutin (levo) i metilarbutin (desno)

Arbutin se javlja i u nekim drugim biljkama, te je tako u većim količinama pronađen u biljnim porodicama kao što su *Lamiaceae*, *Ericaceae*, *Saxifragaceae* i *Rosaceae*.

Sadržaj arbutina u biljnim ekstraktima analiziran je primenom različitih metoda: spektrofotometrijom (Pavlović i sar., 2009), elektroforezom kapilarne zone (Glöckl i sar., 2001), denzitometrijom (Pyka i sar., 2007), GC/MS (Lamien-Meda i sar., 2009). Ipak, najprikladnijom metodom za analizu ovog jedinjenja smatra se HPLC na obrnutoj fazi (Asaaf i sar, 1986; Parejo i sar., 2001; Pavlović i sar., 2009).



Slika 7. Ursolična kiselina (levo) i β -amirin (desno) (Adotey i sar., 2012)

1.3. Tradicionalna upotreba *A. uva-ursi*

U severnoj Evropi, gde se *A. uva-ursi* može pronaći u izobilju, ova biljka se već dugo koristi kao lek u različitim poremećajima humanog organizma. Već vekovima je koriste i Indijanci i Kinezi, za infekcije urinarnog trakta i polno prenosive bolesti koje utiču na uriniranje (Bartleby, 2006). Prema Tucakovu ona je već 120 godina registrovana kao lek u farmakopejama širom sveta (Tucakov, Who 1984). Generalno, u narodnoj medicini opisuje se kao lekovita biljka koja se primenjuje kao diuretik, za stimulisanje kontrakcija uterusa i za lečenje dijabetesa, kod slabog vida, bubrežnog ili urinarnog kamenja, reumatizma i veneričnih bolesti, i lokalno za depigmentaciju kože (SZO, Knjiga 2, 2002).

Prema podacima E Monografija Nemačke Komisije i Monografija SZO o odabranom lekovitom bilju, *A. uva-ursi*, kako je opisano u farmakopejama i tradicionalnim sistemima medicine, se koristi za lečenje zapaljenskih poremećaja urinarnog trakta (Blumenthal i sar., 1998). Takođe, koristi se i kao blagi urinarni antiseptik za umerena zapaljenska stanja urinarnog trakta i bešike, kao što su uretritis, dizurija, cistitis i akutni cistitis sa bakteriurijom bez faktora rizika i kod simptomatske bakteriurije koja ne zahteva nužno lečenje antibiotikom (Schindler i sar., 2002; ESCOP Monografije, 2003).

1.4. Farmakološka aktivnost *A. uva-ursi*

Naučna istraživanja pokazuju da aktivna jedinjenja iz lišća *A. uva-ursi* ispoljavaju snažne antibakterijske (Schindler i sar., 2002), anti-inflamatorne (Shanmugam i sar., 2008), antioksidativne (Amarowicz i sar., 1999) i diuretičke efekte (Beaux i sar., 1999).

Antimikrobni efekat ekstrakta listova *A. uva-ursi* uočen je još 1883. godine i pripisan je hidrohionu, koji se, kako je prethodno objašnjeno, dobija iz arbutina preko glikozida pomoću enzimske hidrolize. Teoriju antibakterijskih svojstava arbutina formulisao je Levin već 1883. godine (Dingermann i sar., 2004; Evropska Farmakopeja, 2008; Evans, 2009; Hänsel i sar., 1999; Nycz i sar., 2010; Poljska Farmakopeja, 2002, 2008; Wichtl, 2004; Rychlinska i Nowak, 2012). U jednoj studiji uzorci humanog urina sakupljeni su i analizirani nakon primene 0,1 ili 1 g **arbutina**

sa ili bez dodatne upotrebe 0,250 g Diuramid®-a (acetazolamida) radi dobijanja alkalnog urina, i testirani su na antibakterijsku aktivnost na 74 vrsta bakterija uključujući *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus rettegeri*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphilococcus aureus*. Rezultati studije su upoređeni sa rezultatima drugih 20 antimikrobnih jedinjenja. Samo su arbutin (prisutan u uzorcima urina koji su sakupljeni posle primene 1 g arbutina), gentamicin i nalidiksična kiselina bili aktivni u odnosu na sve testirane sojeve bakterija. Antimikrobni efekat je bio očigledan čak i nakon primene 0,1 g arbutina. Dejstvo arbutina bilo je veće u alkalnom urinu u poređenju sa urinom pH 6 (Kedzia i sar., 1974). U drugoj studiji na temu antimikrobne aktivnosti arbutina, utvrđeno je da antimikrobna aktivnost arbutina prema bakterijama koje dovode do infekcije urinarnog trakta direktno zavisi od aktivnosti β -glukozidaze infektivnog organizma. Najveću enzimsku aktivnost pokazali su *Streptococcus faecalis*, *Klebsiella*, *Enterobacter genera* i *Proteus vulgaris*, a najmanju *Escherichia coli*. Rezultati ove studije pokazuju da je minimalna inhibitorna koncentracija arbutina od 0,4 do 0,8% u zavisnosti od mikroorganizma (Jahodář i sar., 1985). Pretpostavlja se da postoji direktna veza između antibakterijskog dejstva arbutina i stepena enzimske aktivnosti mikroorganizma (EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1). Inhibitorni efekti ekstrakata *A. uva ursi* su potvrđeni u odnosu na *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* i *A. Skirrowii* (Cervenka i sar., 2006). Takođe, pronađeno je da sirovi ekstrakt *A. uva-ursi* efikasnije ispoljava svoja adstringentna i antiseptička dejstva od izolovanog arbutina. Ovo se može objasniti prisustvom drugih derivata hidrohina koji se nalaze u sirovom ekstraktu. Zaključeno je da prisustvo galne kiseline u sirovim ekstraktima može sprečiti uticaje β -glukozidaze na hidrolizu arbutina u gastrointestinalnom traktu (GIT) pre apsorpcije, čime se povećava količina hidrohina koja se oslobađa tokom izlučivanja bubrega (Herbal Medicines, 2008).

Diuretička svojstva ekstrakta *A. uva-ursi* analizirana su u studiji Beaux-a i sar. (1999). Istraživanje je rađeno sa 10 mužjaka pacova, kojima je intraperitonealno (i.p.) dat vodeni ekstrakt lišća *A. uva-ursi* u pojedinačnoj dozi od 50 mg / kg telesne težine; kontrolna grupa od 10 pacova dobila je hipotoničan fiziološki rastvor, a druga grupa od 10 pacova dobila je diuretičko jedinjenje hidrohlorotiazid u dozi od 10 mg/kg telesne težine. Zapremina urina pacova tretiranih ekstraktom bila je značajno veća ($p < 0.001$ od 4. do 8. sata nakon primene, $p < 0.05$ tokom 24-časovnog perioda) nego kod kontrolnih pacova i uporediva je sa zapreminom nakon tretmana

hidrohlorotiazidom. Nije primećeno povećanje u izlučivanju natrijuma i kalijuma nakon primene ekstrakta *A. uva-ursi* (Beaux i sar., 1999).

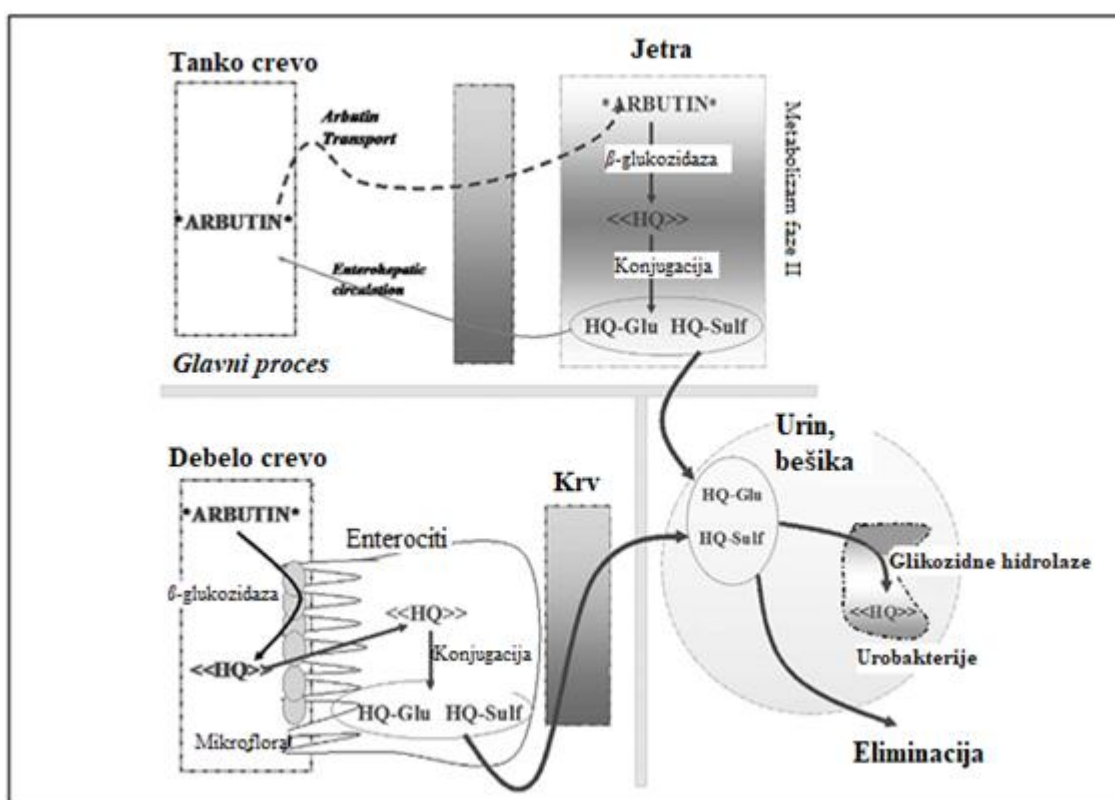
A. uva-ursi ima **antiinflamatorno dejstvo** koje je utvrđeno u odnosu na različite hemijske induktore kao što su karagenin, histamin i prostaglandini (Herbal Medicines, 2008). Dejstvo 50% metanolnog ekstrakta iz *A. uva-ursi* na imuno-inflamatorni odgovor je analiziran u slučaju kontaktnog dermatitisa izazvanog pikril hloridom kod miševa. Kada se ovakav ekstrakt primenjuje oralno, neposredno pre i 16 sati nakon primene pikril hlorida, primećeno je njegovo inhibitorno dejstvo na otok. Značajno terapeutsko dejstvo utvrđeno je 24 časa nakon primene i to u dozi od 100 mg/kg ili više (Kubo i sar., 1990; MA/HMPC/573462/2009 Rev.1). Vodeni ekstrakt lišća *A. uva-ursi* (pripremljen od jednog dela biljne supstance i 10 delova vode) pokazao je **antivirusno dejstvo in vitro** u slučaju *Herpes simplex* virusa tipa 2, virusa influence A2 (Mannheim 57) i virusa vakcinije u koncentraciji od 10% (May i Willuhn, 1978; WHO, 2002).

Arbutin u dozi od 50 mg/kg telesne mase (i.p. i p.o. (per os, oralno)) izazvao je statistički značajno smanjenje broja, intenziteta i učestalosti **kašlja**. Slični rezultati su zabeleženi i u pogledu doze od 100 mg/kg telesne mase i.p. i p.o.; kod ove doze nije primećeno povećanje antitusivnog dejstva (Strapkova i sar., 1991).

Alojein (antiinflamatorni lek) i arbutin sinergistički inhibiraju delovanje tirozinaze. U studiji o njihovim dejstvima na **pigmentaciju** indukovanu UV zračenjem na ljudskoj koži *in vivo*, uporedni tretman sa obe hemikalije (po 100 mg/g svaka) proizveo je dodatni efekat, 63,3% suzbijanja pigmentacije naspram 34% samo sa alojeinom i 43,5% samo sa arbutinom (Choi i sar., 2002). Pored toga, arbutin je inhibirao i aktivaciju nuklearnog faktora-kappa B indukovanog UV-om u ljudskim keratinocitima (Ahn i sar., 2003; EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1). Arbutin takođe poseduje svojstvo suzbijanja biosinteze melanina u ljudskoj koži i zbog toga se koristi u lečenju kožnih diskoloracija, kao što su melasma, pege, hiperpigmentacija ili drugi poremećaji, kao i u kozmetičkoj industriji (Hu i sar., 2009).

1.5. Karakteristike apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije (ADME) arbutina

Arbutin se u ljudskom organizmu brzo **apsorbuje** u tankom crevu i kasnije **metaboliše** u jetri (slika 8). Tako, arbutin prvo biva deglikozilovan u jetri i odmah se metaboliše spajanjem sa glukuronskom kiselinom ili sulfatom. Svi metaboliti arbutina (slobodni hidrohinon HQ ili konjugovani HQ) **eliminiraju** se preko bubrega i urina (Paper i sar., 1993; Blaut i sar., 2006). Do 85% arbutina se eliminiše u urinu kao metabolit (HQ) (HQ glukuronid i HQ sulfat), a samo do 0,6% doze se eliminiše kao slobodni HQ (de Arriba i sar., 2013). Hidroliza u hidrohinon se javlja tokom bubrežnog izlučivanja, ispoljavajući antiseptička i adstringentna dejstva na sluzokoži urinarnog trakta (Frohne, 1970).



Slika 8. Šematski prikaz farmakokinetičkog profila za arbutin i hidrohinon (HQ). HQ-Glu označava HQ glukuronid; HQ-Sulf je HQ sulfat. Oba HQ-konjugata su pronađena u visokoj koncentraciji u urinu, a slobodni HQ u vrlo maloj koncentraciji ili u tragovima (de Arriba i sar., 2010).

U studijama na životinjama pronađeno je da arbutin i njegov aglikon imaju hepatotoksične, nefrotoksične, mutagene i kancerogene efekte. Arbutin je prolek relativno toksičnog hidrohina. Stoga je upotrebu proizvoda koji sadrže glikozide hidrohina od strane pacijenata potrebno strogo kontrolisati. Prema Komisiji E, preparate koji sadrže arbutin ne treba uzimati duže od jedne nedelje, a najviše 5 puta godišnje, i to samo uz saglasnost lekara. Preparati se ne preporučuju za trudnice i dojilje (Dingermann i sar., 2004; Hänsel i sar., 1999). Prisustvo arbutina u biljnim materijalima za ljudsku ishranu smatra se nepoželjnim. Međutim, u kontekstu da je arbutin čest u našoj svakodnevnoj ishrani (kruške, žitarice, začini, itd.), unos arbutina je potrebno pratiti i ograničiti (Lukas i sar., 2010). Komisija E, SZO i ESCOP monografije zastupaju stav o dnevnoj dozi arbutina u rasponu od 400 do 800 mg arbutina dnevno, podeljenoj u 2, 3 ili 4 doze tokom maksimalnog perioda terapije od 1 ili 2 nedelje (WHO, 2004; Commission E: Monograph.109). Monografija SZO se takođe slaže sa ovom dozom, iako ne specifikuje trajanje terapije. Ne postoje dokumentovane interakcije između lekova i ekstrakata *A. uva-ursi* (Herbal Medicines, 2008). Međutim, primećeno je da umanjuje dejstvo tiazida i diuretika Henleove petlje (Gruenwald i sar., 2004).

1.6. *A. uva-ursi* biljni proizvodi na tržištu EU i Srbije

A. uva-ursi je zvanično klasifikovana kao fitolek u nekoliko delova Evrope (Pegg i sar., 2007). Prema EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1, biljni materijal koji se koristi za proizvodnju biljnih proizvoda sastoji se od celog ili isečenog, suvog lista (*folium*) *A. uva-ursi*. Izgled biljnog materijala prikazan je na slici 9. Prema istom izveštaju ovaj biljni materijal treba da sadrži ne manje od 7% arbutina.



Slika 9. *A. uva-ursi* folium

U EU postoji nekoliko preparata *A. uva-ursi* koji su kao zvanični biljni proizvodi prisutni na tržištu. To su:

- a) Usitnjeni biljni materijal kao biljni čaj;
- b) Praškasti biljni materijal;
- c) Suvi ekstrakt (DER 3.5 – 5.5:1), dobijen primenom 60% (V/V) etanola, koji sadrži 23.5 – 29.3% derivata hidrohina izraženog kao arbutin i suvi ekstrakt (DER 2.5 – 4.5:1), dobijen primenom vode, koji sadrži 20 – 28% derivata hidrohina izraženog kao arbutin;
- e) Tečni ekstrakt (DER 1:1), ekstrakcioni rastvarač etanol 25% (V/V).

Prema EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1, u biljnim čajevima, *A. uva-ursi* se uglavnom kombinuje sa drugim lekovitim biljem. Neke od kombinacija su:

- *Species anticystiticae*, sadrži: *Betulae folium* 25 g, *Liquiritiae radix* 30 g, *A. uva-ursi* 45 g (Pharmacopoeia Helvetica, VII, 1993);
- *Species urologicae*, sadrži: *A. uva-ursi* 35 delova, *Herniariae herba* 35 delova, *Betulae folium* 30 delova (Österreichisches Arzneibuch 9, 1960), i u sledećoj kombinaciji: *Betulae folium* 30 g, *A. uva-ursi* 30 g, *Herniariae herba* 5 g, *Menthae piperitae herba* 15 g, *Ononidis radix* 10 g, *Petroselinis radix* 10 g (Slovenský farmaceutický kódex 1, 1997);
- Blasen- und Nierentee II, čaj za bešiku i bubrege i lečenje infekcija urinarnog trakta, sadrži: *A. uva-ursi* 35 – 50%, *Betulae folium* 10 – 20%, *Phaseoli fructus sine semine* 10 – 20%, *Equiseti herba* 10 – 30% (Standard Zulassungen, 1996);
- Blasen- und Nierentee V, čajna mešavina za lečenje zapaljenja urinarnog trakta, sadrži: *A. uva-ursi* 35 – 50%, *Phaseoli fructus sine semine* 10 – 20%, *Solidaginis or Solidaginis virgaureae herba* 10 – 25%, *Orthosiphonis folium* 15 – 30% (Standard Zulassungen, 1996).

Ekstrakt *A.uva-ursi* se takođe često kombinuje sa ekstraktima drugih biljaka. U izveštaju EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1, o *A. uva-ursi* navodi se nekoliko kombinacija i preparata:

- *A. uva-ursi folii extractum* 5:1, *Taraxaci radice cum herba extractum* 5:1, u obliku tableta (Danska, Norveška);
- *A. uva-ursi extractum*, *Solidaginis giganteae herbae extractum*, *Orthosiphonis folii extractum* u obliku tableta (Danska);
- Ekstrakt *Solidaginis herba*, *Betulae folium*, *Cerasi stipites*, *Equiseti herba*, *A. uva-ursi*, ekstrakcioni rastvarač etanol 45% (v/v), u obliku tečnosti za oralnu primenu (Mađarska);
- Ekstrakt *Urticae radix*, *Salviae folium*, *A. uva-ursi*, *Cucurbitae semen*, *Betulae folium*, *Salicis cortex*, *Millefolii herba*, *Urticae folium*, u obliku tečnosti za oralnu primenu (Mađarska);
- Ekstrakt *A. uva-ursi*, *Millefolii herba*, *Agrimoniae herba*, *Urticae folium*, *Equiseti herba*, *Betulae folium*, u obliku tinkture (Mađarska).

Na tržištu medicinskih i biljnih proizvoda koji sadrže *A. uva ursi* (biljnu sirovinu-drogu ili ekstrakte) u Republici Srbiji proizvodi od *A. uva ursi* prisutni su uglavnom u obliku biljnih čajeva, ali takođe i u obliku kapsula i tableta sa ekstraktima *A. uva ursi*, biljnih kapi i tinktura. Neki od njih prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Preparati u Republici Srbiji koji sadrže *A.uva-ursi*

Naziv leka/ preparata	Sadržaj <i>A. uva ursi</i> izražena u % ili mg	Druge supstance koje lek/preparat sadrži (prema proizvođačkoj specifikaciji)	Stanja u kojima se lek/ preparat preporučuje i primenjuje
Uvin čaj (čaj br. 14) (forma-biljni čaj)	30% biljni materijal	- <i>Herniariae herba</i> 20% - <i>Equiseti herba</i> 10% - <i>Betulae folium</i> 15% - <i>Ononidis radix</i> 20% - <i>Petroselini folium</i> 5%	Urinarne infekcije
Prosta-metto capsule (forma-kapsule)	5 mg suvi ekstrakt	-ekstrakt <i>Serenoa repens</i> , 80 mg -ulje semena bundeve (<i>Cucurbita pepo</i>), 40 mg	Uvećana prostata Učestalo i otežano mokrenje
Rensept (forma-tablete)	25 mg biljni materijal	-Sladić (koren), 13 mg -Kukuruzna svila, 25 mg -Kalijum hlorid, 25 mg -Kleka (plod), 25 mg -Maslačak (koren), 37,5 mg -Peršun (list), 25 mg -Mahovica (ekstrakt), 50 mg -Lubenica (seme), 25 mg -Brusnica (list), 25 mg -Vitamin C 50 mg	Cistitis Zapaljenje bubrega Kamen u mokraćnim kanalima i bubrezima
Fitoren (forma-tablete)	50 mg biljni materijal	-Brusnica (list), 80 mg -Vitamin C, 20 mg -Detelina, 15 mg -Kalijum hlorid, 25 mg -L-arginin, 12,5 mg -Magnezijum oksid, 10 mg -Maslačak (koren), 15 mg -Peršun (list), 25 mg -Rastavić, 35 mg -Sladić (ekstrakt korena), 35 mg -Cink oksid, 4,3 mg	Prevenција i lečenje kamena i peska u bubrezima i mokraćnim putevima Akutna i hronična upala bešike i mokraćnih puteva

Nastavak table 2			
Lifeline Prostat capsule (forma-kapsule)	5 mg ekstrakta lista	-Ekstrakt bobica testeraste palme, 160 mg -Ekstrakt semena bundeve, 40 mg -Ekstrakt kore afričkog drveta, 10 mg -Cink, 15 mg -Vitamin B6, 5 mg	Problemi učestalog, otežanog i nepotpunog mokrenja Uroantiseptik
Fitourosept sirup (forma-sirup)	3% tečni ekstrakt lista (1:4)	-Tečni ekstrakt lista i ploda brusnice (1:4), 3% -Tečni ekstrakt rastavića (1:4), 3% -Tečni ekstrakt lista breze (1:4), 3% -Tečni ekstrakt herbe sitnice (1:4), 2%	Infekcije urinarnog sistema
Uvenol čaj (čaj br. 46) (forma-biljni čaj)	40 % biljni materijal-list	-List breze, 20% -Herba sitnice, 10% -Koren zečijeg trna, 10% -Herba vranilove trave, 20%	Upale mokraćnih kanala Upale prostate Upale bešike Bakterije u mokraći
Mešavina čaja br. 6 za ublažavanje tegoba kod upale prostate (forma-biljni čaj)	30 % biljni materijal-list	-List breze, 20% - Herba rastavića, 10% - Rizom pirevine, 5% -Koren koprive, 25% -Seme lana, 10%	Upala prostate Otežano mokrenje Česti nagoni za mokrenjem
Mešavina čaja br. 84 kod bakterija u mokraći za odrasle (forma-biljni čaj)	25 % biljni materijal-list	-Herba vranilove trave, 25% -Herba ždraljike, 20% -Herba rastavića, 20% -List peršuna, 5% -List breze, 5%	Za ublažavanje tegoba kod bakterijskih infekcije mokraćne bešike i mokraćnih kanala
Mešavina čaja za ublažavanje tegoba kod kamena u bubregu (forma-biljni čaj)	10 % biljni materijal-list	-Plod mirođije, 5% -List breze, 15% -Plod šipurka, 15% -Herba rastavića, 15% -Plod kleke, 10% -Koren zečjeg trna, 15 % -List peršuna, 15%	Kamen u bubregu Upala bubrega Smanjena funkcija bubrega

Nastavak table 2			
Cranberry cyst tablete (forma-tablete)	100 mg suvi ekstrakt lista, standardizovan na 20% arbutina	-Koncentrovani ekstrakt ploda brusnice, 350 mg -Suvi ekstrakt semena grejpfruta, 50 mg -Suvi ekstrakt lista javanskog čaja, 50 mg -Suvi ekstrakt herbe evropske zlatnice, 50 mg	Cistitis Česte upale i infekcije mokraćnih kanala
Cydonia krema protiv fleka i pega (forma-krema)	ekstrakt lista	-Ekstrakt korena belog duda -Etarsko ulje Combava limuna -Cink oksid -Titan dioksid	Hiperpigmentacija
Biljne kapi Uve Deverra (forma-biljne kapi)	tečni ekstrakt	-	Za normalno funkcionisanje urinarnog trakta
Prostat (forma-kapsule)	5 mg, ekstrakt	-Vitamin B6, 5 mg -Cink, 15 mg -Suvi ekstrakt ploda testeraste palme, 160 mg -Uljani ekstrakt semena bundeve, 40 mg -Suvi ekstrakt afričkog drveta, 5 mg	Za normalno funkcionisanje prostate i organa urinarnog trakta

2. UVOD U MODERNE EKSTRAKCIONE TEHNOLOGIJE

Poslednjih godina interesovanje za zelenim ekstrakcionim tehnologijama raste, pre svega zbog potrebe da se u procesu ekstrakcije smanji upotreba organskih rastvarača, koji zbog svoje toksičnosti mogu imati neželjene efekte na životnu sredinu i na kvalitet i bezbednost hrane i drugih proizvoda u čijoj formulaciji se nalaze biljni ekstrakti. Iz tog razloga intenzivno se istražuju mogućnosti novih ekstrakcionih tehnika za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz lekovitog bilja. Neke od ovih tehnika su: mikrotalasna ekstrakcija (Microwave assisted extraction, MAE), ekstrakcija superkričnim fluidima (Supercritical fluid extraction SFE), ultrazvučna ekstrakcija (Ultrasound assisted extraction, UAE), ubrzana ekstrakcija rastvaračima (Accelerated solvent extraction, ASE) ili tečna ekstrakcija pod pritiskom (Pressurized liquid extraction, PLE) i ekstrakcija subkričnom vodom (Subcritical water extraction, SWE), takođe poznata i kao ekstrakcija pregrejanom vodom ili ekstrakcija toplom vodom pod pritiskom (pressurized hot water extraction, PHWE) (Huie i sar., 2002; Ong i sar., 2004). Moderni ekstrakcioni procesi pomoću kojih se izoluju bioaktivna jedinjenja razvijeni su takođe i za dobijanje visoko prečišćenih proizvoda, čineći ih dostupnim za širi krug primene. Zbog toga, ove tehnologije predstavljaju inovativni pristup poboljšanju proizvodnih procesa (Joana Gil-Chavez i sar., 2013).

U svim procesima ekstrakcije, uključujući i moderne, na efikasnost ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja utiče nekoliko faktora. Prema Azmiru i sar., izbor odgovarajućeg ekstrakcionog rastvarača zajedno sa odabirom odgovarajućih procesnih parametara su izuzetno važni za postizanje najboljih rezultata u podešenim postupcima ekstrakcije (Azmir i sar., 2013). Takođe, pored ekstrakcionog rastvarača i procesnih parametara, prema Zakaria i sar., i karakteristike materijala koji se ekstrahuje mogu značajno uticati na sastav i osobine dobijenih ekstrakata (Zakaria i sar., 2016). Stoga, u cilju efikasne ekstrakcije, potrebno je raditi sa materijalom odgovarajućeg kvaliteta, koji je adekvatno pripremljen za proces ekstrakcije, a gde se u samom procesu kao ekstragens primenjuje rastvarač optimalnih karakteristiika na optimalno podešenim procesnim parametrima.

2.1. Ultrazvučna ekstrakcija (UAE)

UAE je ekološki prihvatljiva ekstrakciona tehnika koja se uklapa u koncept "zelene hemije", kada se kao ekstrakcioni rastvarači koriste voda, etanol ili jestiva ulja. Ona se danas koristi za ekstrakciju raznih bioaktivnih jedinjenja, iz različitih biljnih matriksa. Može se smatrati jeftinom, jednostavnom i efikasnijom tehnikom u poređenju sa drugim tehnikama ekstrakcije. Nekoliko autora ukazuju na to da, u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije, UAE može da generiše visoke prinose ekstrakcije za kratko vreme, jednostavna je za izvođenje, proces može da se izvodi na nižim temperaturama, zahteva manju potrošnju rastvarača i niži utrošak energije (Wang i Weller, 2006; Klen i Vodopivec, 2012). Mnoge studije bavile su se analizom prednosti UAE u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije. Prema Wu i sar., ginseng saponini se približno 3 puta brže ekstrahuju iz korena ginsenga primenom UAE u odnosu na tradicionalnu metodu ekstrakcije (Soxhlet). Osim benefita kraćeg vremena, isti ekstrakcioni prinos dobijen je i na nižim temperaturama koje su pogodnije za ekstrakciju temperaturno nestabilnih jedinjenja (Wu i sar., 2001). Slični rezultati dobijeni su i prilikom analize UAE karvona i limonena iz semena kima. Ova ekstrakcija je rezultovala dvostruko uvećanom ekstrakcijom ciljanih bioaktivnih jedinjenja u odnosu na one dobijene konvencionalnim metodama ekstrakcije (Chemat i sar., 2004).

Povećanje prinosa ekstrakcije prilikom UAE se uglavnom pripisuje uticaju akustičnih kavitacija proizvedenih u rastvaraču prilikom prolaska ultrazvučnog talasa (Ghafoor i sar., 2009), a može se pripisati i efektima kao što su formiranje mikromlazeva i akustične struje (*acoustic streaming*) (Sivakumar i sar., 2009). Prema Dash i sar., intenzitet ultrazvuka koji se prenosi kroz medijum je direktno povezan sa vibracionom amplitudom sonifikacije, stvarajući veći broj kavitacionih mehurića i stoga povećanu efikasnost ekstrakcije (Dash i sar., 2005). Ultrazvuk takođe vrši i mehanički uticaj, omogućavajući bolji prodor rastvarača u tkivo matrijala koje se ekstrahuje, i povećanje kontaktne površine između čvrste i tečne faze. Kao rezultat, rastvorna supstanca brzo difunduje iz čvrste faze u rastvarač (Rostagno i sar., 2003). Rezultat UAE je i brza fragmentacija sirovine. Nekoliko autora u svojim istraživanjima uočilo je fragmentaciju krhkih čvrstih materija, koja nastaje kao rezultat ultrazvučne kavitacije (Suslick i Price 1999; Kusters i sar., 1993). Chemat i sar. su demonstrirali brzu fragmentaciju listova spanaća u prvim minutima

sonifikacije, dok ova pojava nije uočena tokom primene konvencionalne ekstrakcije (maceracije). Fragmentacija se može dogoditi usled sudara čestica i usled šok talasa nastalih pucanjem kavitacionih mehurića u tečnosti. Neposredna posledica smanjenja veličine čestica usled ultrazvučnog delovanja je povećanje površine čvrste materije što dovodi do veće brzine prenosa mase i povećane stope prinosa ekstrakcije (Chemat i sar., 2017).

Parametri koji utiču na prinos u postupku UAE su vreme ekstrakcije, procesna temperatura, ekstrakcioni rastvarač, snaga ultrazvuka, frekvencija ultrazvuka i odnos rastvarača i biljnog materijala koji se ekstrahuje. Vreme ekstrakcije je jedan od važnih faktora u UAE. Mnogi autori su se bavili analizom uticaja vremena u UAE na prinos ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja. Lou i sar. (2010) su ispitali uticaj ultrazvučnih talasa i vremena ekstrakcije na izdvajanje ulja iz leblebija. Naveli su da se prinos značajno povećavao tokom prvih 20 min ekstrakcije, nakon čega povećanje prinosa nije bilo toliko intenzivno. Dent i sar. (2015) su uočili značajan rast prinosa fenola nakon 10 i 20 minuta ekstrakcije, dok produženje vremena UAE na 30 minuta nije dalo značajno povećanje prinosa ovih bioaktivnih jedinjenja. Čak, konstatuje se da produženo vreme ekstrakcije, pored povećanja energetske troškova, može dovesti i do degradacije bioaktivnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima.

U UAE veoma je važno odabrati odgovarajuću temperaturu ekstrakcije i to prema ciljnom jedinjenju (Zhang i sar., 2009). Povećanje temperature ekstrakcije dovodi do povećanog prinosa ekstrakcije, ali u nekim slučajevima povećanje temperature utiče i negativno zbog degradacije termolabilnih jedinjenja. Nekoliko autora analiziralo je uticaj procesne temperature u UAE na ekstrakciju fenolnih jedinjenja. Rostagno i sar. su utvrdili da je u UAE postepeno povećanje temperature ekstrakcije do 45 °C dovelo do povećane ekstrakcije izoflavona, dok se na višim temperaturama (60 °C) dobijaju manje koncentracije istih bioaktivnih jedinjenja. Zou i sar. su utvrdili da se uticaj temperature na ekstrakcioni prinos antocijanina značajno povećava kada temperatura ekstrakcije raste sa 20 na 40 °C, nakon čega sledi pad prinosa, najverovatnije prouzrokovan degradacijom antocijanina. Takođe, prema Kapelou, u UAE porast pritiska pare, usled povećane temperature, uzrokuje da isparenja rastvarača ispunjavaju šupljinu kavitacionih mehurića, koji će se raspršiti manje nasilno i time smanjiti efekte sonifikacije (Capelo, 2009).

Slično su zaključili Zhang i sar., prema kojima se prenos mase smanjuje na povišenoj temperaturi, zbog činjenice da kavitacioni mehurići mogu lako pući (Zhang i sar., 2008).

Izbor rastvarača za ekstrakciju je prvi ključni korak u postavljanju bilo kog procesa ekstrakcije. Polarni rastvarači se često koriste za dobijanje polifenolnih jedinjenja iz biljnih matriksa. Prema Dai i Mumperu (2010), najprikladniji rastvarači za ekstrakciju ove vrste bioaktivnih jedinjenja su vodene smeše koje sadrže etanol, metanol, aceton i etil acetat. Etanol je prepoznat kao dobar rastvarač za ekstrakciju polifenola, a njegova prednost u odnosu na ostale je i činjenica da je bezbedan za ljudsku upotrebu. Metanol se generalno smatra efikasnijim u ekstrakciji polifenola manjih molekulskih masa, dok je vodeni aceton dobar za ekstrakciju flavanola sa većom molekulskom masom (Dai i Mumper, 2010). Mnoge studije su istraživale uticaj rastvarača na prinos ekstrakcije u UAE. Do i sar. (2014) su ispitali uticaj različitih koncentracija vodenog rastvora metanola, etanola i acetona (50%, 75% i 100%) na UAE fenolnih jedinjenja iz *Limnophila aromatica*. Njihovi rezultati pokazuju da se povećanjem koncentracije vode u rastvaraču povećava prinos ekstrakcije fenolnih jedinjenja, što znači da se prinos ekstrakcije povećava sa povećanjem polarnosti primenjenog rastvarača (Do i sar., 2014). Charpe i Rathod (2014) su istraživali uticaj koncentracije vodenog rastvora etanola na UAE glicirizinske kiseline iz sladića. Utvrđeno je da se prinos ekstrakcije povećava sa povećanjem koncentracije etanola u rastvaraču do 50%, ne menja se dalje primenom ekstragenta koncentracije do 70%, nakon čega opada. Značajno smanjen prinos ekstrakcije ostvaren je primenom 100% etanola kao ekstragenta. Prema istim autorima dodatni pozitivni efekat vode u slučaju UAE je činjenica da voda dovodi do kvašenja i bubrenja ćelijskog materijala, tako da se propusnost ćelijskih zidova povećava i oni se mogu lako razoriti nakon tretiranja ultrazvukom. Kod primene 100% etanola, ovaj efekat nije prisutan, te je i prinos ekstrakcije značajno manji (Charpe i Rathod, 2014).

Snaga i primenjena frekvencija ultrazvuka su važni parametri u UAE. Uticaj ova dva parametra istraživali su mnogi autori. Charpe i Rathod (2014) su ispitali uticaj različitih ulaznih snaga, od 120 W do 200 W, na ekstrakciju glicirizinske kiseline iz sladića. Oni su ustanovili da se prinos ekstrakcije povećava sa povećanjem ulazne snage, te je za vreme ekstrakcije u dužini od 30 minuta primenom talasa snage 120 W dobijeno 75% prinosa ekstrakcije u odnosu na prinos ostvaren za kraće vreme ekstrakcije, 10 minuta, kada je primenjena veća snaga talasa, 200 W (Charpe i Rathod, 2014). Sličan uticaj povećanja snage, zabeležen je i u slučaju ekstrakcije

salvijanolne kiseline B iz korena *Salvia miltiorrhiza*, kada su u UAE primenjeni ultrazvučni talasi frekvencije do 45 kHz (Dong i sar., 2010).

2.2. Voda kao ekstragens

Zbog tendencije za implementacijom "zelenih" procesa u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, voda kao rastvarač je privukla veliku pažnju, te se pored etanola, ugljen-dioksida i jonskih tečnosti njen kapacitet za primenu u formi ekstragensa intenzivno istražuje u brojnim naučnim studijama (Do i sar., 2014; Naffati i sar., 2016). Postoji nekoliko generalnih prednosti vode u odnosu na druge rastvarače koji se koriste za ekstrakciju različitih bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. Naime, voda je lako dostupna, bezbedna, jeftina, netoksična, nezapaljiva i ekološki prihvatljiva, što dovodi do zaključka da njena primena u procesima ekstrakcije može doprineti proizvodnji bezbednih ekstrakata (bez tragova toksičnih rastvarača), može smanjiti troškove procesa proizvodnje ekstrakata i može doprineti zaštiti životne sredine, jer se izbegava faza odlaganja toksičnih rezidua primenjenog ekstragensa. Prema Plaza i Turner-u (2013), nedostatak vode kao ekstragensa u ekstrakcionim procesima ogleda se u većoj potrošnji energije u fazi koja podrazumeva njeno uklanjanje iz ekstrakata, u slučajevima kada je to potrebno (Plaza i Turner, 2013). Uopšteno, kao rastvarač voda se može koristiti kako kod konvencionalnih, tako i kod savremenih metoda ekstrakcije, kao što su ekstrakcije pod pritiskom, ultrazvučna ekstrakcija i mikrotalasna ekstrakcija, a moguće je primeniti je u različitim oblicima: kao vodu na sobnoj temperaturi, kao toplu vodu, kao toplu vodu pod pritiskom, i pregrejanu ili superkritičnu vodu.

Prilikom odabira ekstragensa za ekstrakciju određenih bioaktivnih jedinjenja potrebno je voditi računa o sledećim parametarima:

- Polaritetu/dielektričnoj konstanti,
- Gustini,
- Permitivnosti,
- Viskozitetu,
- Površinskom naponu i
- pH vrednosti.

Glavne karakteristike vode, uključujući i one od značaja za kvalifikaciju vode kao ekstragensa, rezimirane su u tabeli 3.

Tabela 3. Karakteristike vode (Brunner, 2014)

Molekularna formula	H ₂ O	
Molarna masa	18,015268 g/mol	
Tačka topljenja na 1013 mbar	273,15 K (0 °C)	
Tačka ključanja na 1013 mbar	373,13 K (99,98 °C)	
Trojna tačka	273,16 K (0,01 °C) (611,657 ± 0,010) Pa	
Gustina	Na 273,15 K (0 °C) (led) 916,8 kg m ⁻³	277,15 K (4 °C) 999,97495 kg m ⁻³
	273,15 K (0 °C) (voda) 999,818 kg m ⁻³	293,15 K (20 °C) 0,998.231 kg m ⁻³
Indeks prelamanja	1,33434	
Kritični pritisak	P_c	22,064 MPa
Kritična temperatura	T_c	373,946 °C
Kritična gustina	ρ	322 kg m ⁻³
Entalpija fuzije	285,89 kJ mol ⁻¹	
Entalpija topljenja	Na 0 °C	6,010 kJ mol ⁻¹
Entalpija ključanja	Na 100 °C	40,651 kJ mol ⁻¹
Dinamički viskozitet (tečn.)	25 °C	889,7351x10 ⁻⁶ Pa s
Površinski napon	25 °C	71,98 mN m ⁻¹
Električna provodljivost	25 °C	0,055 μS cm ⁻¹
Dielektrična konstanta	80	
Polarizabilnost	1,494(7) x 10 ⁻³⁰ m ³	
Specifična gasna konstanta R	0,46151805 K	

Prema Jessop-u i sar. (2012) osobine rastvarača mogu biti eksperimentalno okarakterisane i "kvantifikovane" primenom tri solvatohromska parametra po Kamlet-Taft-u:

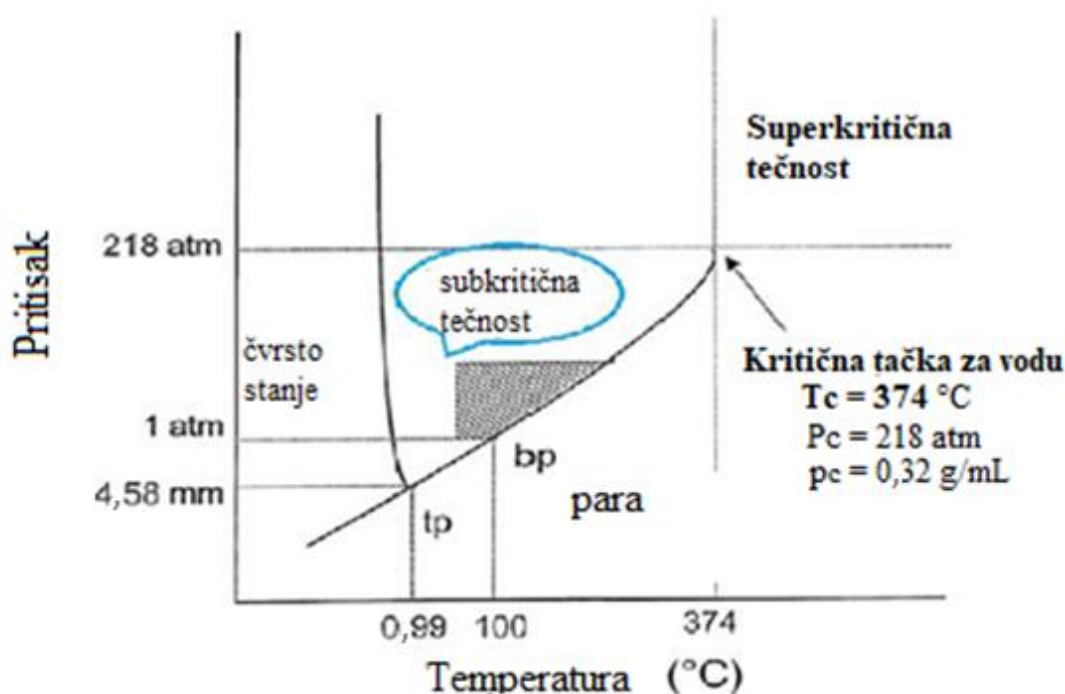
- Sposobnost doniranja vodoničnih veza (kiselost, α);
- Sposobnost prihvatanja vodoničnih veza (bazičnost, β); i
- Polarizabilnost/polaritet (π^*) (Jessop i sar., 2012).

Jedan od najznačajnijih parametara za karakterizaciju ekstragensa jeste polaritet rastvarača, ili dielektrična konstanta. Voda je visoko polarni rastvarač. Njen polaritet, na sobnoj temperaturi i pod atmosferskim pritiskom karakteriše visoka dielektrična konstanta (ϵ) zbog prisustva ekstenzivne strukture vodoničnih veza. Naime, voda stvara elektrostatičke veze sa drugim

molekulima, čime se smanjuje ili eliminiše međumolekularna interakcija između okolnih jona (Plaza i Turner, 2015). Štaviše, vodonične veze u vodi su samo-udružive, pa se jačina jedne vodonične veze reguliše prisustvom drugih vodoničnih veza koje su grupisane oko nje (Nezbeda i Pavliček, 1996). U ambijentalnim uslovima dielektrična konstanta vode je približno 80, što je čini izuzetno polarnim rastvaračem, efikasnim za ekstrakciju visoko polarnih jedinjenja (Teo i sar., 2010). U istim uslovima dielektrična konstanta dva najčešće korišćena rastvarača za ekstrakciju polarnih i jedinjenja umerenog polariteta, metanola i etanola iznosi 33 i 24. Promene u jačini vodoničnih veza vode odražavaju se na dielektričnu konstantu i na vrednosti toplote isparavanja (Fernandez, 1991). Stoga, pri nižim temperaturama, vodonične veze su jače i vrednost dielektrične konstante je veća (Nakahara i sar., 2001). Ali, kako temperatura vode raste, povećana termička agitacija smanjuje jačinu svake vodonične veze i dovodi do pojačane redukcije vrednosti dielektrične konstante (Caffarena i Grigera, 2004). Slabljenje jačine vodoničnih veza unutar molekula vode i smanjenje polariteta vode generalno dovodi do povećanja rastvorljivosti hidrofobnih organskih jedinjenja u vodi (Carr i sar., 2011). Stoga, prema Miller i Hawthorne-u (2000), polarnija jedinjenja sa visokom rastvorljivošću u vodi se najefikasnije ekstrahuju na nižim temperaturama, dok umereno polarna i nepolarna jedinjenja zahtevaju manje polarni medijum indukovani povećanjem temperature (Miller i Hawthorne, 2000). Dakle, tradicionalno, u ambijentalnim uslovima, voda se primenjuje za ekstrakciju samo polarnih jedinjenja iz različitih izvora: flavonoida iz vinarskog otpada (Aliakbarian i sar., 2012), flavonoida iz otpada svile (Prommuak i sar., 2008), kvercetina iz ljuske crnog luka (Ko i sar., 2011), fenolnih jedinjenja iz *Momordica charantia* (Budrat i Shotipruk, 2009), fenolnih jedinjenja iz ljuske krompira (Singh i Saldaña, 2011), itd.

2.3. Osnove ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju (SWE)

SWE je ekološki prihvatljiva tehnika ekstrakcije zasnovana na upotrebi vode kao ekstragensa na temperaturama između 100 °C i 374 °C i pri pritisku koji je dovoljno visok da održi vodu u tečnom stanju (Ramos i sar., 2002). Iznad temperature od 374 °C i pritiska od 220 bara (kritična tačka vode) smatra se da je voda u superkritičnom stanju, odnosno u stanju fluida (slika 10).



Slika 10. Fazni dijagram vode u funkciji pritiska i temperature (Asl i Khajenoori, 2013)

SWE se zasniva na promenama svojstava vode (polariteta, odnosno dielektrične konstante, površinskog napona, viskoziteta, gustine i pH) koja nastaju najviše usled povećanja temperature procesa u subkritičnom području. Naime, prema Zakaria i sar., povećanje temperature vode iznad tačke ključanja, a na pritisku dovoljno visokom da održi vodu u tečnom stanju, temperatura koja se primenjuje ima veliki uticaj na efikasnost i selektivnost ekstrakcije, kao i na fizičke i hemijske osobine vode kao rastvarača (Zakaria i sar., 2016). Prema Brunner-u, u tom slučaju elektrohemijaska svojstva vode značajno variraju (Brunner, 2014). U tabeli 4 prikazane su neke osobine vode i to vode blizu kritične tačke, superkritične vode i vode na ambijentalnim uslovima.

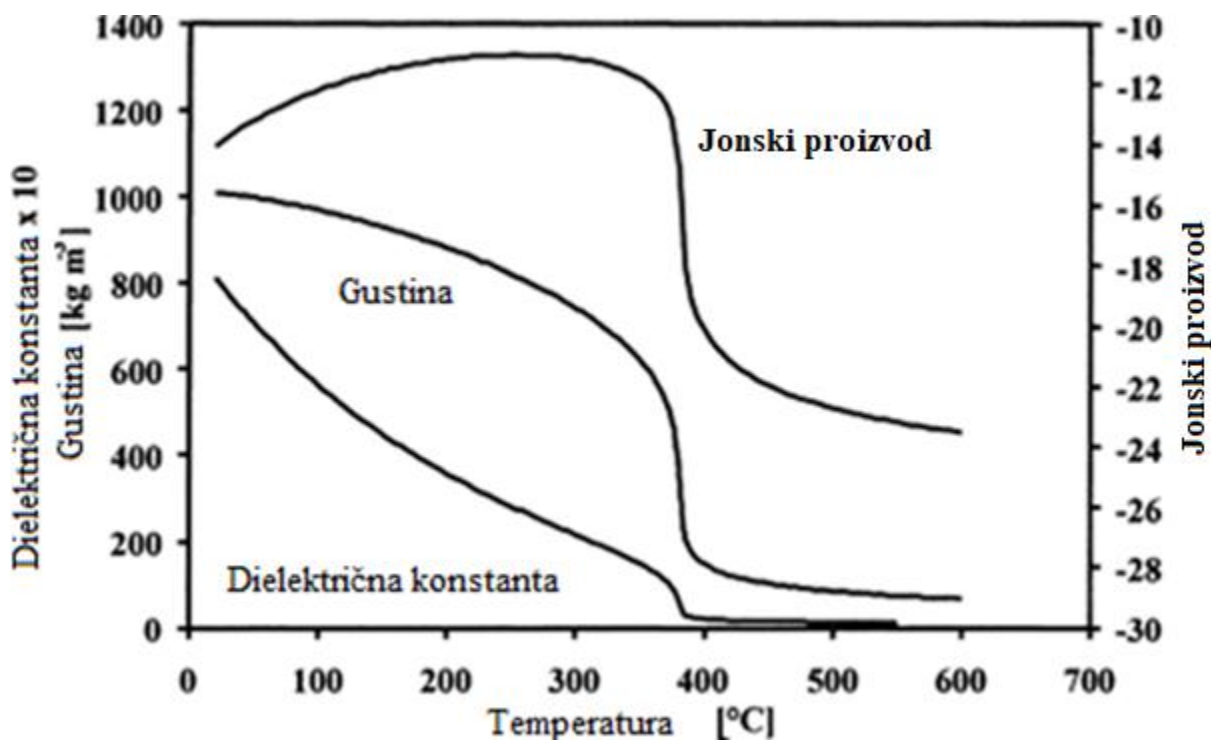
Prema Cacace i Mazza, zbog smanjenog polariteta, površinskog napona i konstante disocijacije, pri porastu temperature u subkritičnoj oblasti, voda se ponaša slično organskim rastvaračima (Cacace i Mazza, 2017).

Tabela 4. Osobine vode u različitim uslovima (Brunner, 2014)

Osobina	Voda u normalnim uslovima	Voda blizu kritične tačke	Superkritična voda
T (°C)	25	350	400
P (bar)	1	250	500
ρ (kg m ⁻³)	997,45	625,45	577,79
ε (-)	78,5	14,86	12,16
pK_w (-)	14,0	11,5	11,5

Promena **dielektrične konstante**, tokom SWE, može se smatrati jednom od najvažnijih promena. Kao što je već pomenuto, na ambijentalnim uslovima (25 °C), dielektrična konstanta vode je oko 80, dok se u subkritičnoj oblasti vrednost dielektrične konstante smanjuje na oko 33 na temperaturi od 200 °C. Ova vrednost je slična vrednosti dielektrične konstante nekih organskih rastvarača, npr. etanola ili metanola (Ibanez i sar., 2012). Pri višoj temperaturi, 250 °C i na pritisku od 50 bara dielektrična konstanta vode i dalje opada i to do 27. Sa povećanjem temperature na 300 °C (blizu kritične tačke) dielektrična konstanta vode se smanjuje na 14,3. Na 400 °C i 500 bara (superkritična voda) vrednost dielektrične konstante je još niža, 12,16. Povećanje temperature vode u subkritičnom stanju dovodi do opadanja vrednosti dielektrične konstante i na taj način povećava se mogućnost primene vode za ekstrakciju nepolarnih jedinjenja. Dakle, tokom SWE voda menja svoj karakter, te iz rastvarača za jonske vrste prelazi u rastvarač za nejonske vrste (Brunner, 2014). Zbog toga, prema Rovio i sar., promenom temperature, osobine rastvorljivosti vode se mogu podesiti tako da više odgovaraju polaritetu ciljanih jedinjenja (Rovio i sar., 1999). Prema Teo i sar. to je razlog zašto se topla voda pod pritiskom, pri određenom pritisku i temperaturi, može smatrati vrlo efikasnim rastvaračem za ekstrakciju slabo polarnih i nepolarnih jedinjenja (Teo i sar., 2010).

Pored dielektrične konstante, u ovoj oblasti menjaju se i neke druge osobine vode kao rastvarača. Promene nekih osobina vode usled promene temperature u subkritičnoj oblasti, a pri konstantnom pritisku prikazane su na slici 11. Kao što se može videti na dijagramu, pri konstantnom pritisku, vrednosti gustine i dielektrične konstante subkritične vode opadaju kada se temperatura povećava, dok linija koja predstavlja jonski proizvod pokazuje dramatičnu promenu za ovaj parametar pri temperaturi koja je blizu kritične (Kritzer i sar., 1999).

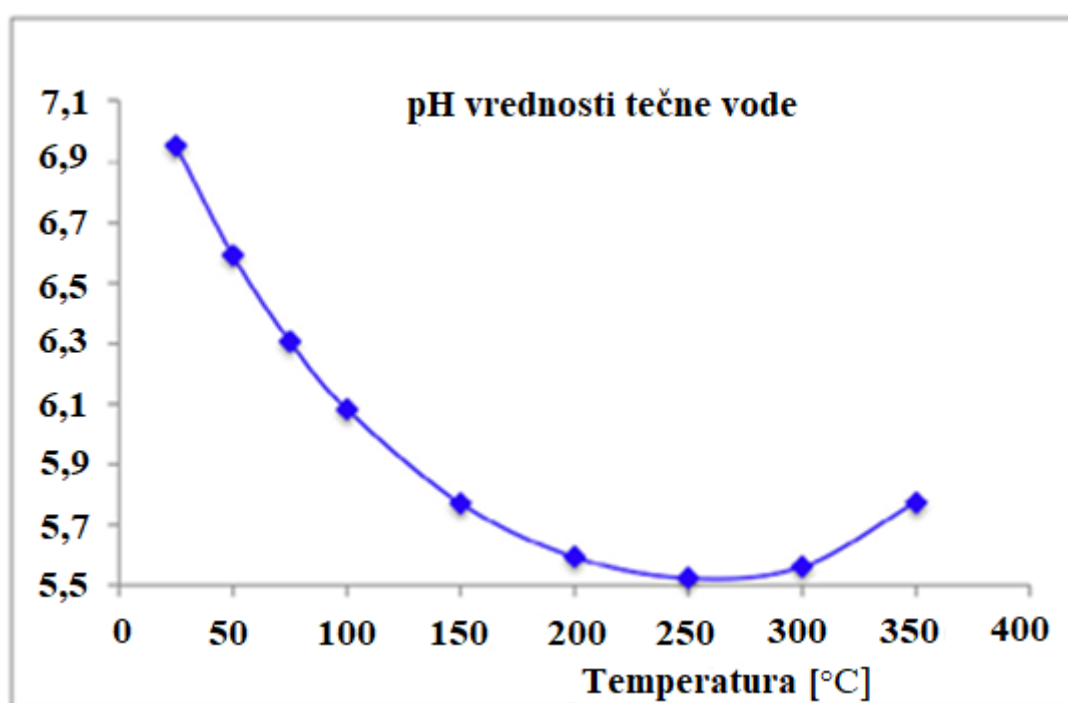


Slika 11. Promena jonskog proizvoda, gustine i dielektrične konstante vode u zavisnosti od temperature, pri pritisku od 240 bara (Kritzer i sar., 1999).

Prema Teo i sar., topla voda pod pritiskom pokazuje nižu viskoznost, ali veću difuzivnost od vode na sobnoj temperaturi i kao takva favorizuje difuziju u biljni matriks i oslobađanje jedinjenja (Teo i sar., 2010). Masovni transfer subkritične vode pod dovoljno velikim pritiskom je poboljšan, jer su difuzioni koeficijenti supstanci koje se rastvaraju veći nego u vodi pri standardnoj temperaturi i pritisku (Kronholm i sar., 2007).

Prema Bruneru (2014) i Plaza i Turneru (2015) pH vrednost vode u tečnom stanju smanjuje se za tri jedinice (sa oko 7.0 na 5.5) kada se temperatura poveća na oko 250 °C i tako se stvara mnogo više H_3^+ jona za reakcije katalizovanja kiselinama (Slika 12). Tik ispod kritične temperature

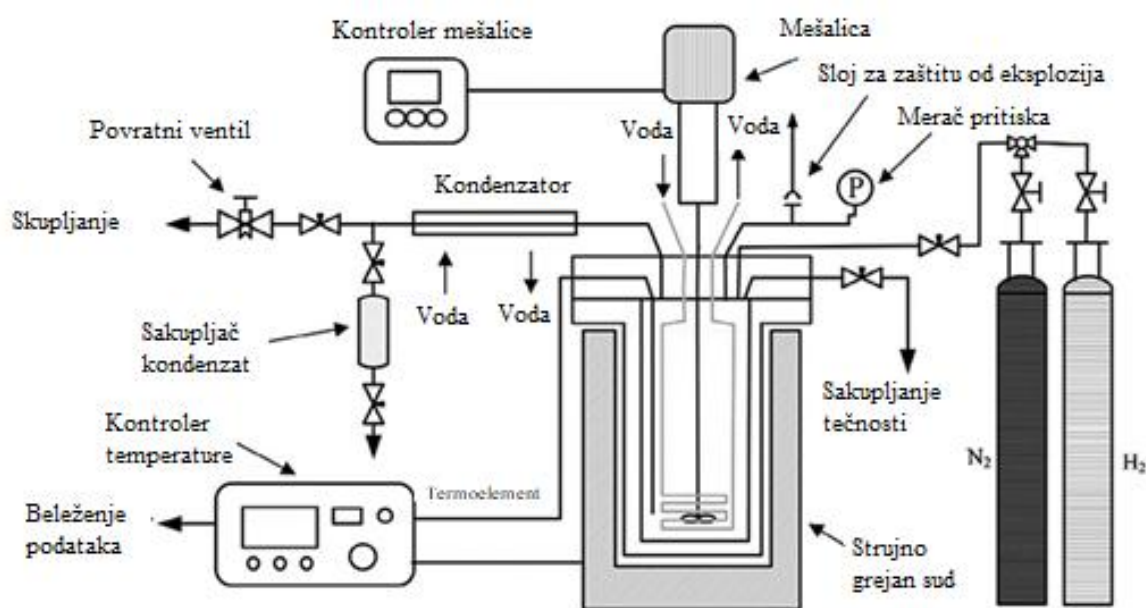
jonski proizvod vode se značajno menja, čineći superkritičnu i vodu koja je blizu kritične mnogo slabije jonizovanim jedinjenjem nego pri ambijentalnim uslovima (Brunner, 2014). Ove promene mogu uticati na SWE na nekoliko načina. Kao prvo, pri povišenim temperaturama rizik pojave neželjenih reakcija poput hidrolize se povećava, pošto je snaga jona veća, a pH vrednost niža. Ovde hidronijum joni deluju kao katalizatori u reakcijama (Chandler i sar., 1997). Osim toga, ravnoteža nekih analita može biti promenjena prema drugim naelektrisanim oblicima (npr., antocijanini se mogu pojaviti u pet različitih oblika zavisno od pH vrednosti) (Andersen i Markham, 2005).



Slika 12. Vrednosti pH kao funkcije temperature, na 25 MPa (Plaza i Turner, 2015).

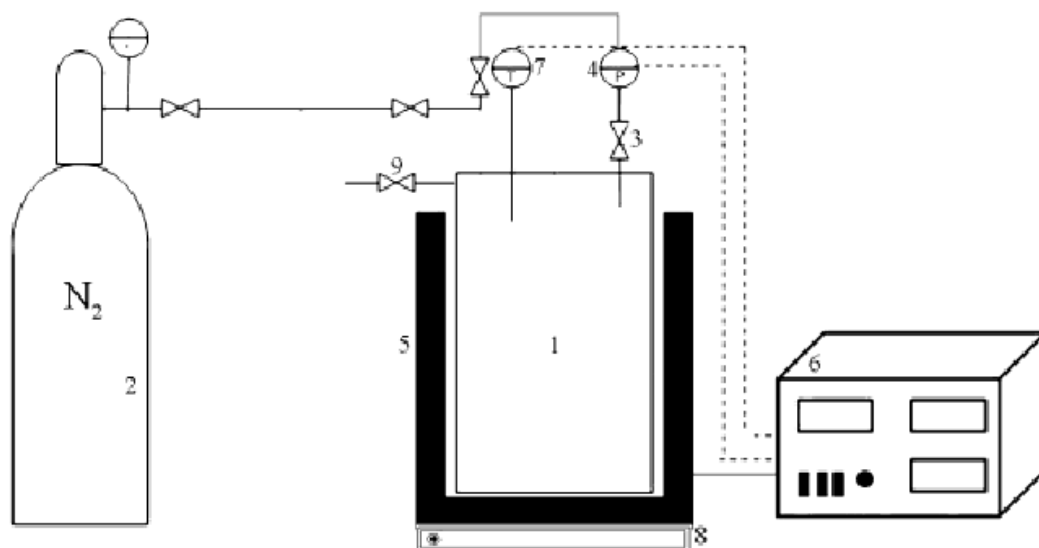
SWE ima nekoliko važnih prednosti u odnosu na druge tehnike: kvalitet ekstrakata, brzina procesa, smanjena količina rastvarača koji se primenjuje i upotreba jeftinijeg ekstragenta u odnosu na organske rastvarače (Zakaria i Kamal, 2016).

Aparatura za SWE je relativno jednostavna (Slike 13 i 14).



Slika 13. Šematski prikaz tipičnog šaržnog SWE procesa (Li i sar., 2014)

Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju, na laboratorijskom nivou se radi u diskontinualnom ekstraktoru pod visokim pritiskom. Zapremina ekstraktora varira. Maksimalni radni pritisak najčešće je 200 bara, dok je maksimalna radna temperatura najčešće 350 °C. Šematski prikaz aparature proizvođača Parr Instruments je dat na slici 14 (Zeković i sar., 2014). Sistem prikazan na slici ima zapreminu ekstraktora od 450 mL, maksimalan radni pritisak i maksimalna radna temperatura su kao prethodno navedene. Prema Vladić (2017), odgovarajući radni pritisak u ekstraktoru ovog sistema postiže se oslobađanjem (uvođenjem u ekstraktor) azota iz gasnog cilindra (2) kroz ulazni ventil (3). Električna grejna obloga (5) zagreva ekstraktor, a temperatura se meri i kontroliše regulatorom (6) priključenim na temperaturnu sondu (7). Magnetna mešalica (8) (brzina rotacije 750 o/min) primenjuje se za mešanje u cilju povećanja prenosa mase i toplote, kao i za sprečavanje lokalnog pregrevanja materijala na unutrašnjim zidovima ekstraktora. Nakon ekstrakcije u ovakvom sistemu, ekstraktor se vadi i brzo hladi u ledenom kupatilu. Azot se ispušta otvaranjem izlaznog ventila (9).



Slika 14. Šematski prikaz aparature za ekstrakciju vodom u subkričnom stanju: (1) ekstraktor; (2) boca sa azotom; (3) ulazni ventil za gas; (4) manometar; (5) električna grejna obloga; (6) digitalni kontroler; (7) temperaturna sonda; (8) magnetna mešalica; (9) izlazni ventil za gas

2.4. Primena SWE

Voda u subkritičnom stanju se primenjuje za ekstrakciju raznih materijala: biljnih sirovina, raznih poljoprivrednih sporednih proizvoda i sporednih proizvoda prehrambene industrije, mikroalgi, gljiva, itd.

SWE se najčešće primenjuje za ekstrakciju fenolnih jedinjenja, šećera, aromatičnih jedinjenja i drugih jedinjenja.

2.4.1. Primena SWE za ekstrakciju fenolnih jedinjenja (ukupni fenoli, flavonoidi, antocijanini)

Mnoge studije novijeg datuma su dokazale da je SWE mnogo efikasnija tehnika ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz kore, ljuske, semena voća i drugih prehrambenih matriksa u poređenju sa ostalim tehnikama ekstrakcije. SWE fenolnih jedinjenja iz ovakvih matriksa ocenjuje se kao visoko efikasna (Shitu i sar., 2015). Studija koju su sprovedi Singh i Saldaña (2011) ukazuje na efikasnost SWE u slučaju izolovanja fenolnih jedinjenja iz ljuske krompira. U ovom istraživanju, za ukupno vreme ekstrakcije od 30 minuta i na temperaturi of 180 °C, izolovano je ukupno 81.83 mg/g u poređenju sa 46.59 mg/g koliko je izolovano u konvencionalnoj ekstrakciji sa metanolom za vreme ekstrakcije od ukupno 3 sata. U sličnom istraživanju Tunchaiyaphum i sar. (2013) su analizirali ekstrakciju fenola iz kore manga primenom SWE. U ovom istraživanju najviši sadržaj fenola, 50.25 mg/g, detektovan je u ekstraktu koji je dobijen na 180 °C u ekstrakciji koja je trajala 90 minuta. Prema Rangsrivong i sar. (2009) fenolna jedinjenja su ekstrahovana iz ploda *Terminutesalia chebula* Retz, takođe primenom SWE. U ovoj studiji urađena je komparacija efikasnosti dve ekstrakcione tehnike, SWE i Soxhlet ekstrakcije. Rezultati su pokazali da je kod SWE bilo potrebno samo 37,5 minuta za dobijanje vrlo značajne količine fenolnih jedinjenja, dok je Soxhlet ekstrakcija zahtevala više od 2 sata vremena ekstrakcije da bi se dostigao približan prinos fenolnih jedinjenja. U istraživanju Pavlića i sar. (2016) slični rezultati su dobijeni u slučaju ekstrakcije ukupnih fenola iz sporednog proizvoda *Salvia officinalis* L. Prema istim autorima na temperaturi od 201,5 °C, za ekstrakciono vreme od 15,8 minuta i primenom čiste vode kao

rastvarača postignuti su najveći prinosi ciljnih jedinjenja i najveća antioksidativna aktivnost (Pavlić i sar., 2016).

SWE je primenjena i za ekstrakciju najaktivnijih antioksidativnih jedinjenja iz ruzmarina kao što su karnozol, rosmanol, karnozna kiselina, metil karnozat i flavonoidi, kao što su cirsimaritin i genkvanin (Ibanez i sar., 2003). Takođe, Zeković i sar. su primenili SWE u cilju dobijanja ekstrakata koji su bogati antioksidantima iz semena korijandera. Uočeno je značajno poboljšanje ekstrakcije antioksidanata u poređenju sa rezultatima dobijenim u konvencionalnim čvrsto-tečnim ekstrakcijama i modernim tehnikama ekstrakcije, kao što su ultrazvučna i mikrotalasna ekstrakcija (Zeković i sar., 2014). Plaza i sar. (2013) su analizirali uticaj temperature u dve ekstrakcione tehnike (SWE i ultrazvučne ekstrakcije (UAE, Ultrasound-Assisted Extraction)) na prinos ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja, pre svega antioksidanata, iz zelene alge *Chlorella vulgaris*. U ovom radu primećeno je da su ekstrakcioni prinosi veći kod SWE u poređenju sa UAE, što je pripisano povećanom prenosu mase prilikom SWE. Štaviše, najveći prinos i maksimalna antioksidativna aktivnost su zabeleženi na najvećoj ispitivanoj temperaturi (200 °C).

Nedavno su Monrad i sar. istraživali primenu subkritične vode za ekstrakciju antocijana iz komine crnog grožđa (Monrad i sar., 2010). Ova istraživačka grupa je došla do zaključka da je dodavanje etanola u vodu i dalja subkritična ekstrakcija mnogo efikasniji metod ekstrakcije antocijana iz komine crnog grožđa u poređenju sa ekstrakcijom subkritičnom vodom (Monrad i sar., 2010). Ekstrakciju antocijana iz bobičastog voća ispitivali su King i sar. (2003), pri čemu su pokazali da je SWE dala jednak ili bolji rezultat od onog koji je dobijen u ekstrakciji etanolom. Prema rezultatima ovog istraživanja SWE se na temperaturama između 100 °C i 150 °C pokazala kao optimalna za dobijanje maksimalne količine antocijana iz bobica. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je SWE veoma efikasna metoda za izolovanje antocijana iz bobica (King i sar., 2003). S druge strane, neke studije izveštavaju i o suprotnom, odnosno da je SWE neadekvatna ekstrakciona tehnika za ekstrakciju jedinjenja ovog tipa. Tokom ekstrakcije antocijana iz ploda žutike (šimširika, žuti šipak, *Berberis vulgaris*) utvrđeno je da se povećanjem temperature i vremena ekstrakcije značajno redukuje efikasnost ekstrakcije antocijana (Sharifi i sar., 2013). Ovo se objašnjava ekstremno visokom temperaturom procesa pri kojoj dolazi do degradacije ili promenom strukture antocijana, pa je njihova redukcija očekivana (Sharifi i sar.,

2013). Pored temperature, prema Chumsri i sar., na degradaciju antocijana u procesu ekstrakcije mogu uticati i parametri kao što su pH vrednost, intermolekularna kopigmentacija, prisustvo askorbinske kiseline ili prisustvo kiseonika (Chumsri i sar., 2008).

U tabeli 5 su dati podaci o primeni SWE za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz različitih materijala.

Tabela 5. Studije koje su se bavile ekstrakcijom fenolnih jedinjenja primenom SWE i odabrani rezultati (Zakaria i Kamal, 2016)

Jedinjenje	Sirovina	Operativni uslovi	Moguća upotreba	Reference
Fenoli	Lišće manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	100 °C, 4 MPa	Farmaceutska i nutraceutska industrijska jedinjenja	Feránndez-Ponce i sar., 2102
	Nar (<i>Punica granatum</i> L.)	80–280 °C, 6 MPa	Funkcionalna hrana, nutraceutici i antioksidant	He i sar., 2102
	Mekinje pirinča	200 °C	Prehrambeni aditivi	Wataniyakul i sar., 2012
	Kora krompira	100–240 °C, 6 MPa	Farmaceutska i biogorivo	Singh i Saldaña., 2011
	Kora cimeta (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	150–200 °C, 6 MPa	Sastojci za dodavanje ukusa, antioksidativni agens	Khuwijitjaru i sar., 2012
	Komine citrusa	25–250 °C 0,1–5,0 MPa	Antioksidativni agens	Kim i sar., 2009
	Pečurka zlatna bukovača	50–300 °C, 0.002–5 MPa	Antihiperглиkemijski, antihipertenzivni i antioksidativni agens	Jo i sar., 2013
	Pasji trn/Vučji trn (<i>Hippophae rhamnoides</i> L.)	80–180 °C, 6 MPa	Nutraceutici i prehrambeni materijali	Gong i sar., 2015
	Origano	25–200 °C, 10,3 MPa	Antioksidativni, antibakterijalni i antifungalni agens	Rodri' guez-Meizoso i sar., 2006
	Cvet nevena	80–260 °C, 0.5 MPa	Antioksidativni agens	Xu i sar., 2015

Nastavak tabele 5.				
Flavonoidi	Crni čaj, celer i list Žen Šena	110–200 °C, 10 MPa	Antioksidativni agens	Cheigh i sar., 2015
	Kora mandarine (<i>Citrus unshiu</i>)	110–200 °C, 10,1 MPa	Antioksidativno, antikancerano, antiinflamatorno i kardiovaskularno zaštitno dejstvo	Cheigh i sar., 2012
	Ljuska crnog luka, <i>Saururus chinensis</i> , lišće vučjeg trna, peršun, šargarepa i kora limuna, narandže i grejpfruta	110–200 °C, 10 MPa	Antioksidanti i redukcija oštećenja kao što su kancer i kardiovaskularne bolesti	Ko i sar., 2014
	Otpad crnog luka	40–120 °C, 5 MPa	Antioksidativni agens	Turner i sar., 2006
	Ljuska crnog luka	100–190 °C, 9–13 MPa	Antioksidativni i nutritivni suplement nutraceuticima	Ko i sar., 2011
	<i>Polygonum hydropiper</i>	100–250 °C, 12,1 MPa	Medicinske svrhe	Lekar i sar., 2013

2.4.2. Primena SWE za ekstrakciju šećera

Istraživanja pokazuju da je SWE efikasna tehnika za ekstrakciju celuloze i hemiceluloze iz kore *Citrus junos*-a i lišća uljane palme (Hanim i sar., 2012; Tanaka i sar., 2012; Khuwijitjaru i sar., 2014). Prema studiji Tanaka i sar. (2012) najveći prinos ekstrakcije celuloze, 80%, dobija se iz kore *Citrus junos*-a na temperaturi od 200 °C, dok se iz uljane palme maksimalni prinos hemiceluloze, od 69.60 %, postiže na temperaturi od 190 °C (Hanim i sar., 2012).

Rezultati pokazuju da monosaharidi i oligosaharidi mogu biti ekstrahovani primenom tehnike SWE iz lišća uljane palme (Norsyabilah i sar., 2013) i kokosa (Khuwijitjaru i sar., 2014). Iz uljane palme, najveći prinos ekstrakcije monosaharida ostvaren je u SWE na temperaturi od 190 °C za vreme ekstrakcije od 10 minuta, dok je najveći prinos mono- i oligosaharida iz kokosa dobijen na temperaturi od 250 °C za 10 minuta.

Ghoreishi i sar. su primenili SWE za ekstrakciju manitola iz lišća masline. Utvrđeno je da se povećanjem temperature sa 60 na 100 °C povećava prinos ekstrakcije manitola iz lišća masline sa 48.75 na 76.75% (m/m). Međutim, u poređenju sa prethodnim rezultatima dobijenim u konvencionalnoj ekstrakciji, ekstrakcijom na povećanim temperaturama, primenom temperatura od 100 do 150 °C u subkritičnoj oblasti, primećena je redukcija ekstrakcionog prinosa sa 76.75 na 64.68% (m/m). Autori zaključuju da bi visoka temperatura mogla da dovede do degradacije i raskidanja vodoničnih veza u slučaju manitola (Ghoreishi i sar., 2008). U tabeli 6 dat je pregled nekih istraživanja koja su se bavila ekstrakcijom jedinjenja ovog tipa primenom SWE.

Tabela 6. Nedavna istraživanja ekstrakciji šećera iz biljnih sirovina primenom SWE (Zakaria i Kamal, 2016)

Jedinjenje	Sirovina	Operativni uslovi	Moguća upotreba	Reference
Monosaharid	Lišće uljane palme	170–200 °C 3,4–5,5 MPa	Prehrambeni aditiv	Norsyabilah i sar., 2013
Polisaharid	<i>Lycium barbarum</i> L.	110°C, 5 MPa	Antioksidativni, antitumorni i agens protiv starenja	Chao i sar., 2013
	<i>Ganoderma lucidum</i>	99.85–89.85 °C, 4 MPa	Hemijska, prehrambena i farmaceutska industrija	Matsunaga i sar., 2014
	Kora <i>Citrus junos</i> -a	160–320 °C, 20 MPa	Dijetetska vlakna	Tanaka i sar., 2012
	Uljana palma	170–200 °C, 3,4–5,5 MPa	Hemijska, farmaceutska i prehrambena industrija	Hanim i sar., 2012
Oligosaharid	Kokos	100–300 °C	Prehrambeni sastojak za obezbeđenje dijetetskih vlakana u hrani	Khuwijitjaru i sar., 2014
Pektin (polisaharidi)	Komina jabuke i kora citrusa	100–170 °C	Antioksidativni i antitumorni agens	Wang i sar., 2014
	Pulpa šećerne repe	10–130 °C, 8–12 MPa	Stabilizator u prehrambenoj industriji	Chen i sar., 2015
	Kora <i>Citrus junos</i> -a	60–320 °C, 20 MPa	Dijetetska vlakna	Tanaka i sar., 2012
	Suncokret	60–160 °C, 3 MPa	Antioksidativni agens	Ravber i sar., 2015
Redukujući šećeri	Kokos, koštice grožđa i vlakna palme	08–257 °C, 20 MPa	Fermentabilni šećeri	Prado i sar., 2014
	Kora <i>Carya cathayensis</i> Sarg.	130–280 °C, 8 MPa	Redukujući šećer i antioksidativni agens	Shimanouchi i sar., 2014
Manitol	Lišće masline	49,85–149,85 °C, 3–11 MPa	Antioksidativni agens, nemetabolizirani zaslađivač i prehrambeni proizvodi za diabetičare	Ghoreishi i Shahrestani., 2009

2.4.3. Primena SWE za ekstrakciju etarskih ulja i aromatičnih jedinjenja

Gámiz i Luquede (2000) su primenili SWE za ekstrakciju etarskog ulja iz komorača (*Foeniculum vulgare*), a optimalni uslovi ekstrakcije su bili temperatura od 150 °C i pritisak od 60 bara. SWE je nedavno upotrebljena za ekstrakciju etarskog ulja iz lišća *Thymbra spicata*. Na osnovu rezultata istraživanja zaključeno je da je ekstrakcija bila najefikasnija na temperaturi od 150 °C i pri pritisku od 60 bara za minimalno vreme ekstrakcije od 20 minuta (Ozel i sar., 2003). Saim i sar. su primenili vodu u subkritičnom stanju za ekstrakciju etarskog ulja iz semena korijandera. Ekstrakcija je izvedena primenom vode na temperaturi od 65 do 150 °C, vreme ekstrakcije je bilo 15 minuta, a pritisak u opsegu 46,5 bara i 68,9 bara. Opseg dobijenih prinosa je iznosio od 0,6-0,8%, što je mnogo više u odnosu na prinose dobijene hidrodestilacijom (0,06-0,1%) (Saim i sar., 2008). Analiza ekstrakcije Širaz origana (*Zataria multiflora* Boiss), primenom SWE, pokazuje da se najveći prinos etarskog ulja iz ove sirovine dobija na temperaturi od 150 °C, pritisku od 20 bara, za vreme ekstrakcije od 150 minuta. Isti autori ukazuju na dobijen bolji kvalitet etarskog ulja, u poređenju sa kvalitetom ulja koje je dobijeno drugim tehnikama (Khajenoori i sar., 2009).

SWE se primenjuje za određivanje organskih zagađivača u zemljištu, klizištima i sedimentima, ali se takođe koristi i za ekstrakciju isparljivih supstanci iz različitih biljnih materijala (Rovio i sar., 1999). Luthje i sar. su dokazali da je SWE primenljiva tehnika za ekstrakciju hemijskih kontaminata iz kože grožđa (na 120 °C, za 40 minuta), kao i herbicida iz pšeničnog brašna i njegovih proizvoda (na 120 °C, za 15 minuta) (Luthje i sar., 2005). Prema Ong i sar. dielektrična konstanta subkritične vode na 250 °C i 50 bara dozvoljava joj da bude primenjena za kvantitativnu ekstrakciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz zemljišta i čestica urbanog vazduha (Ong i sar., 2006). Prema Rovio i sar. temperature 200-350 °C su obično dovoljne za ekstrakciju alifatičnih ugljovodonika, polihloriranih bifenila (PCBs), polihloriranih dibenzoturana (PCDFs) i polihloriranih naftalena (PCNs) (Rovio i sar., 1999). U tabeli 7 dat je pregled nekih istraživanja u polju SWE raznih jedinjenja, bioaktivnih, ali i nekih drugih.

Tabela 7. Nedavna istraživanja o jedinjenjima ekstrahovanim iz biljnih sirovina primenom SWE (Zakaria i Kamal, 2016)

Jedinjenje	Sirovina	Operativni uslovi	Moguća primena	Reference
Azijska kiselina	<i>Centella asiatica</i>	100–250 °C, 10–40 MPa		Kim i sar., 2009
Mangiferin	Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>)	49,85–149,85 °C, 0,7–4 MPa	Antidijabetik, antiHIV, antikanceri, antioksidativni agens	Kim i sar., 2010.
Karotenoidi	Palmino ulje	149,85–359,85 °C, 15–25 MPa	Bioaktivna jedinjenja za hranu, aditivi u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji	Cardenas-Toro i sar., 2014.
Ulje	Soja	66–234 °C, 0,03–3,86 MPa	Protein za ishranu stoke i za biljna ulja za snabdevanje prehrambenog sektora i sektora goriva	Ndlela i sar., 2012.
Rezorcinol i kavibetol	Lišće Betelovog bibera	50–250 °C, 2 MPa	Lekovi i nutraceutici	Musa i sar., 2014.

2.5. Uticaj procesnih parametara u SWE na ekstrakciju fenolnih jedinjenja

Jedan od najznačajnijih parametara koji utiče na efikasnost SWE jeste temperatura ekstrakcije. Optimalna temperatura za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja u velikoj meri zavisi od prirode i strukture jedinjenja koje se ekstrahuje (Plaza i Turner, 2015). Porast temperature vode i samim tim opadanje dielektrične konstante dovodi do povećane ekstrakcije nepolarnih jedinjenja. Prema Rovio i sar. promenom temperature karakteristike rastvorljivosti vode se mogu podešavati tako da više odgovaraju polaritetu ciljanih jedinjenja (Rovio i sar., 1999). Kada je povećana temperatura vode, smanjena je njena permitivnost, viskozitet i površinski napon, ali je povećana difuzivnost (Teo i sar., 2010). U većini slučajeva povećanje temperature prilikom SWE je poželjno, jer dovodi do povećanja prinosa ekstrakcije sve do određene temperaturne tačke. Kod ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz kore manga prinos ekstrakcije ukupnih fenola (UF) se povećava porastom ekstrakcione temperature sa 160 na 180 °C (Tunchaiyaphum i sar., 2013). Izuzetno labilni polifenoli (npr. antocijanini), čija stabilnost zavisi od pH vrednosti, zahtevaju nižu temperaturu ekstrakcije (Plaza i Turner, 2015).

Međutim, povećanje temperature smanjuje selektivnost ekstrakcije, zbog povećane rastvorljivosti drugih jedinjenja matriksa, što se može smatrati negativnim uticajem ovog procesnog parametra. Pored toga, termolabilna jedinjenja na povišenoj temperature SWE mogu biti degradirana, a u matriksu se mogu pojaviti i druge hemijske reakcije, na primer karamelizacija i Maillard-ove reakcije (Plaza i Turner, 2013; Herrero, 2012). Ove hemijske reakcije nisu uvek poželjne, jer su njihov rezultat toksična jedinjenja.

Singh i Saldana (2011) su ispitali uticaj temperature na ekstrakciju kore krompira i utvrdili da su veći prinosi fenolnih jedinjenja dobijeni na temperaturama od 140 do 180 °C. Međutim, daljim rastom temperature, od 180 do 240 °C, smanjuje se prinos ekstrakcije fenolnih jedinjenja. Prema autorima Budrat i Shotipruk (2009) najveći prinos ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja (54,94 mg/g DW) iz *Momordica charantia* ostvaruje se na temperaturi od 200 °C, za ukupno vreme ekstrakcije od 60 min, a kada se temperatura poveća na 230 °C, prinos ekstrahovanih fenolnih jedinjenja smanjuje se na 32,626 mg/g DW, najverovatnije zbog degradacije uzrokovane visokom temperaturom. Slični rezultati su dobijeni i prilikom ekstrakcije flavonoida iz semena nara (*Punica granatum* L.), gde je najveći prinos ekstrakcije ovih jedinjenja dobijen na temperaturi od 220 °C za vreme ekstrakcije od 30 minuta; daljim povećanjem temperature prinos ekstrakcije opada (He i sar., 2012). Ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz kore manga primenom SWE analizirana je u temperaturnom opsegu od 160 do 220 °C, a utvrđeno je da se prinos ekstrakcije povećava sa porastom temperature od 160 do 180 °C, nakon čega se smanjuje (Tunchaiyaphum i sar., 2013). Kubatova i sar. su analizirali stabilnost dominantnih jedinjenja u *Satureja hortensis* i *Mentha piperita* u uslovima SWE, pri temperaturama od 100 do 175 °C. Dobijeni rezultati pokazuju da su na 175 °C borneol, timol, karvakrol, mentol, menton, pulegon i metil acetat, ekstrahovani iz *M. piperita*, stabilni (efikasnost ekstrakcije blizu 100%), dok su pri istim temperaturnim uslovima linaool i γ -terpinen kompletno degradirani. U slučaju *S. hortensis* na 150 °C sva jedinjenja su bila stabilna, izuzev γ -terpinena, koji se delimično degradirao do *p*-cimena (Kubatova i sar., 2001). Dakle, na osnovu prethodno navedenog može se zaključiti da je u slučaju SWE izuzetno važno analizirati i pažljivo odabrati temperaturu ekstrakcije kako bi se iskoristile sve prednosti ove ekstrakcione tehnike, povećana rastvorljivost i poboljšani prenos mase, a smanjili negativni efekti poput degradacije nestabilnih i/ili nastanka toksičnih jedinjenja.

Dodatak kiseline tokom SWE može uticati na efikasnost ekstrakcije, kao i na kvalitet dobijenih ekstrakata. Jake kiseline, kao što je HCl (Ju i Howard, 2003), u kombinaciji sa visokim temperaturama (80–120 °C), primenjuju se za hidrolizu polifenolnih konjugata u komini grožđa (Monrad i sar., 2010). U grožđu, a i drugom voću i povrću, kiseline se primenjuju za oslobađanje određenih polifenola koji su vezani u kompleksima (Harbourne i sar., 2013). Takođe, jake kiseline degradiraju ćelijske membrane u komini grožđa i time poboljšavaju ekstrakciju polifenola. Preporučuje se da koncentracija kiselina ovog tipa u slučaju SWE bude niska (manje od 1%) zbog stvaranja neželjenih jedinjenja pri većim koncentracijama (Kammerer i sar., 2005; Srinivas i sar., 2011). Putnik i sar. (2016) su analizirali uticaj dodatka kiseline na ekstrakciju flavonoida u SWE i u svom istraživanju najveći prinos ekstrahovanih flavonoida detektovali pri dodatku HCl u opsegu od 0,5–1%. Prinos flavonoida u slučaju dodatka kiseline bio je čak četiri puta veći u poređenju sa uzorcima koji su ekstrahovani bez dodatka kiseline, a takođe je ustanovljeno i da je povećana koncentracija kiseline pozitivno uticala na antioksidativni kapacitet dobijenih ekstrakata.

Tečnosti su izuzetno nestišljive u subkritičnoj oblasti, te gustina tečnosti trpi blago povećanje sa porastom pritiska na konstantnoj temperaturi. Ove blage varijacije fizičkih osobina čine da pritisak igra sekundarnu ulogu u postupku SWE (Teo i sar., 2010). Štaviše, imajući u vidu da pritisak nije dominantan za postupak ekstrakcije subkritičnom vodom, nije preporučljivo povećavati ga mnogo, jer što je pritisak veći to je čvrsti matriks zbijeniji što otežava ekstrakciju (Kronholm i sar., 2007). Zbog toga je tokom SWE potrebno primeniti umerene pritiske, tek da bi se zadržala kondenzovana faza vode (na primer 15 bar na 200 °C ili 85 bar na 300 °C). Ako se pritisak smanji ispod tačke ključanja, pri bilo kom pritisku nastaće pregrejana vodena para (Teo i sar., 2010).

Vreme je jedan od parametara koji utiče na SWE fenolnih jedinjenja. Međutim, reakciona temperatura i priroda uzorka imaju veći uticaj na ekstrakciju (Wiboonsirikul i Adachi, 2008). He i sar. (2012) su ispitali uticaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju fenola iz koštica nara (*Punica granatum* L.) na 140 °C, pri odnosu čvrsta materija-voda 1:40. U ovom istraživanju za 30 min ekstrakcije dobijeno je 1510,0 mg fenolnih jedinjenja/100 g, a kada je vreme ekstrakcije povećano na 120 minuta, prinos ekstrakcije je povećan na 1890,0 mg/100 g. Sa druge strane, povećana temperatura smanjila je vreme tretmana potrebnog za obnavljanje (oporavak) materijala (Wiboonsirikul i Adachi, 2008). Prema Sharifi i sar. (2013) statistička analiza pomoću metode

odzivne površine (response surface methodology, RSM) je pokazala da se antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih iz *Berberis vulgaris* povećala kada je temperatura povećana sa 110 na 170 °C. Međutim, antioksidativna aktivnost se povećala u ekstraktu i kada je vreme ekstrakcije produženo sa 10 na oko 40 minuta, i posle je ostala nepromenjena. Tunchaiyaphum i sar. su u svojim istraživanjima utvrdili da je povećanje vremena ekstrakcije sa 30 na 90 min poboljšalo ukupan prinos ekstrakcije fenolnih jedinjenja sa 13,78 na 35,96 mg EGK/g DW. Dalje povećanje ekstrakcionog vremena sa 90 na 120 min rezultovalo je smanjenjem prinosa fenolnih jedinjenja (Tunchaiyaphum i sar., 2013).

Pored temperature, vremena ekstrakcije i dodatka kiseline, na efikasnost SWE može da utiče i veličina čestica materijala koji se ekstrahuje. Veličina čestica uzorka utiče na kinetiku ekstrakcije, jer manja veličina čestica dovodi do povećanja kontaktne površine između uzorka i ekstragensa. Veličina čestica mora biti odgovarajuća kako bi se dobila maksimalna kontaktna površina, a istovremeno izbegao efekat kanalisanja (tj. aglomeracija čestica). Agitacija se takođe može koristiti za izbegavanje stvaranja aglomerata (Plaza i Turner, 2015).

3. OSNOVI TEHNOLOGIJE SUŠENJA SA RASPRŠIVANJEM (*Spray drying*)

Nakon proizvodnje tečni biljni ekstrakti mogu se transformisati u stabilniju, kvalitetniju i jednostavniju formu - suvi ekstrakt primenom različitih metoda sušenja. Ekonomske prednosti suvih ekstrakata nad tečnim su brojne: redukcija zapremine i mase ekstrakata, olakšano rukovanje/manipulacija, prevoz i skladištenje, značajno duži rok trajanja, kao i mogućnost rekonstituisanja ovog oblika u tečni, dodavanjem odgovarajuće tečnosti (Vladić, 2017). Sušenje raspršivanjem (*spray drying*) je jedna od najefikasnijih i najjednostavnijih metoda koja se u tom smislu primenjuje. Ovo je jednostepeni postupak uklanjanja tečnosti (rastvarača), u kojem se tokom postupka tečna napojna smeša raspršuje u struji gasovitog medijuma za sušenje i gotovo odmah se dobija suvi ekstrakt u formi praha. Zbog mogućnosti dobijanja konačnog proizvoda standardizovanog kvaliteta i karakteristika, u pogledu sadržaja aktivnih jedinjenja, sadržaja vlage, nasipne zapremine, veličine čestica i drugih fizičkih i hemijskih svojstava praha, *spray drying* je tehnologija koja je prisutna u nekoliko industrijskih oblasti, uključujući prehrambenu, farmaceutsku, biotehnošku i hemijsku industriju (Vladić, 2017). Tako se danas *spray drying* primenjuje za proizvodnju praškova iz materijala sa različitim funkcionalnim osobinama: mleko, kafa, voćni sokovi i pulpa, biljni ekstrakti, enzimi, etarska ulja, aromatične komponente i različiti farmaceutski proizvodi (Filkova i sar., 2006; Angel i sar., 2009; Jayasundera i sar., 2010; Haque i sar., 2015). Ova tehnologija je prikladna za procesuiranje različitih tipova materijala: rastvora, emulzija, suspenzija i pasta. U zavisnosti od napojne smeše, ali i procesnih parametara, finalne čestice mogu biti nano veličina (210-280 nm), mikro veličina (10-50 μm), ili u obliku aglomerata (i do 3 mm) (Gharsallaoui i sar., 2007; Jafari i sar., 2008; Haque i sar., 2015).

Prednosti *spray draying* tehnike u odnosu na druge načine sušenja su (Vladić, 2017; Haque i sar., 2015):

1. Sušenje je skoro trenutno i tom prilikom se stvaraju čestice koje su manje-više jednake i sferične, od nano do mikronske veličine, uz mogućnost kontrolisanja veličine i morfologije čestica;
2. Kapacitet proizvodnje može da varira od nekoliko grama do preko 100 tona po satu;

3. Postupak je veoma brz i veći deo isparavanja se dešava u manje od par sekundi. Zbog toga su termalna degradacija, denaturacija i gubitak nutrijenata minimalni;
4. Postupak je kontinualan i moguća je potpuna automatska kontrola procesa;
5. Kontrola osobina dobijenog praha je skoro u potpunosti ostvariva;
6. Postupak je umereno ekonomičan. U poređenju sa postupkom liofilizacije, *spray drying* postupak je 4 do 7 puta ekonomičniji (Chavez i Ledebouer, 2007).

Uprkos brojnim prednostima, ova tehnologija ima i neke nedostatke, a to su:

1. Industrijski uređaji novijeg datuma zahtevaju velika inicijalna ulaganja kapitala;
2. Toplotna efikasnost postupka je relativno mala, osim kada je razlika između ulazne i izlazne temperature velika (Masters, 1997; Bankar i sar., 2014);
3. U nekim slučajevima, sakupljanje dobijenog praha je teže i dovodi do smanjenog prinosa zbog izbacivanja finih čestica sa primenjenim medijumom za sušenje-vazduhom i/ili zbog značajnog zaostajanja proizvoda na zidovima komore;
4. *Spray drying* zahteva posebno obučeno osoblje za upravljanje postupkom i za održavanje.

3.1. Princip *spray drying* procesa

Spray drying je konvektivni proces sušenja i sastoji se iz četiri osnovne faze:

- 1) *Atomizacija* ili raspršivanje je prvi korak. Efikasan postupak atomizacije se definiše kao transformacija tečne napojne smeše u fine kapljice identične veličine. Cilj ove faze je kreiranje maksimalne površine za prenos toplote između vrelog vazduha i napojne smeše, u cilju optimizacije transfera mase i toplote. Na ovaj način postiže se efikasno sušenje napojne smeše za veoma kratko vreme. Vлага se uklanja bez narušavanja integriteta materijala koji se suši (Vladić, 2017; Gharsallaoui i sar., 2007; Murugesan i Orsat, 2012).

Atomizacija se postiže atomizerima koji se mogu klasifikovati na osnovu vrste energije koja deluje na napojnu smešu tokom atomizacije. Što se veća energija koristi za atomizaciju, to su dobijene čestice manje (Vladić, 2017; Gharsallaoui i sar., 2007). Komercijalno najrasprostranjeniji su rotacioni (centrifugalni) i mlazni raspršivači, sa jednim i dva fluida, kao i ultrazvučni dispenzeri (Filkova i sar., 2007; Murugesan i Orsat,

2012; Haque i sar., 2015). Atomizer se bira prema osobinama napojne smeše (npr. koncentracija i viskozitet), kao i prema željenim karakteristikama finalnih proizvoda (Masters, 1997). Atomizacija je ključni korak za dobijanje proizvoda visokog kvaliteta.

- 2) *Kontakt i mešanje kapljica napojne smeše i medijuma za sušenje.* U većini slučajeva kao medijum za sušenje tečne napojne smeše koristi se atmosferski vazduh. Učinak i efikasnost procesa sušenja zavise od temperature, ali i vlažnosti medijuma za sušenje-vazduha. U toku postupka, atmosferski vazduh se uvodi preko sistema za filtraciju, a temperatura se reguliše prema unapred definisanim procesnim parametrima. Mešanje raspršenih kapljica sa strujom vrellog vazduha olakšava evaporaciju rastvarača i nastanak suvog praha.

Kontakt između raspršenih čestica i vrellog gasovitog medijuma može se ostvariti na nekoliko načina, pa u zavisnosti od toga postoji istostrujni, suprotnostrujni i mešoviti tok (Haque i sar., 2015). U istostrujnim dizajnim, smer kretanja napojne smeše i vazduha je isti. Ova vrsta sušenja je prioritet za sušenje termosenzitivnih materijala, jer vlažni materijal dolazi u kontakt sa najsuvljim medijumom za sušenje (onim koji sadrži najmanje vlage), dok osušeni prah dolazi u kontakt sa medijumom za sušenje koji se postepeno hladi (Vladić, 2017). Kod ove metode sušenja, visok stepen evaporacije vlage omogućava da temperatura praha bude značajno niža od temperature vazduha koji napušta komoru. Tečne kapi stupaju u kontakt sa ulaznim vazduhom temperature 150-220 °C, izazivajući gotovo trenutnu evaporaciju rastvarača, tako da temperatura vazduha opada do umerene (obično 50-80 °C), sprečavajući degradaciju uzrokovanu temperaturom (Gharsallaoui i sar., 2007; Vladić, 2017). U suprotnostrujnim dizajnim, raspršene kapi i medijum za sušenje se kreću u suprotnim smerovima. U ovom postupku se ostvaruje kontakt između najtoplijeg vazduha i čestica praha, što može izazvati nepovratno toplotno oštećenje proizvoda (Masters, 1997). Međutim, ovi dizajni su superiorni u pogledu toplotne i energetske efikasnosti. Mešoviti tok, kao kombinacija istostrujne i suprotnostrujne metode, razvijen je u cilju iskorišćavanja pogodnosti oba procesa, tj. radi obezbeđenja odgovarajućeg kvaliteta uz ekonomične troškove (Haque i sar., 2015).

- 3) *Evaporacija rastvarača iz kapi.* Kada kapi napojne smeše dođu u kontakt sa vrelim vazduhom dolazi do evaporacije rastvarača i nastanka suvih čestica praha. U toku evaporacije gradijent temperature i pritiska pare između kapi i gasovitog medijuma je ustanovljen na takav način da se transfer toplote odvija od medijuma za sušenje ka kapima,

dok se transfer mase odvija iz kapi ka medijumu za sušenje. Kada medijum za sušenje i kapi stupe u međusobni kontakt, prenos toplote izaziva rast temperature kapi dok se ne dostigne konstantna vrednost, gde najveći deo rastvarača isparava iz kapi. U ovom stanju, brzina difuzije rastvarača iz unutrašnjosti ka površini kapi postaje skoro konstantna i jednaka površinskoj brzini isparavanja. Konačno, kada čvrsti sadržaj u kapima/česticama poraste do određene vrednosti (koja odgovara kritičnom sadržaju vlage), efektivna difuzija vlage značajno opada. Brzina sušenja se naglo smanjuje kako se granica sušenja postepeno pomera prema unutrašnjosti čestica. Efektivna difuzija vlage i brzina sušenja postaju funkcija prirode i koncentracije čvrstog dela. Kada čvrste čestice napuste komoru za sušenje, njihova temperatura je slična izlaznoj temperaturi vazduha. U praksi, čim vreo vazduh stupi u kontakt sa kapima napojne smeše, sušenje se odigrava gotovo trenutno i dolazi do brze evaporacije sa površine svake kapi (Haque i sar., 2015). Ova rapidna evaporacija održava kapi hladnim dok se ne postigne suvo stanje. Obično, vreme sušenja je 5-100 s (Corrigan, 1995). Međutim, u dobro dizajniranim sistemima uobičajeno vreme za prolazak čestica kroz zonu sušenja je 15-30 s (Fogler i Kleinschmidt, 1938; Gharsallaoui i sar., 2007).

- 4) *Separacija i sakupljanje praha.* Završni korak u *spray drying* procesu je sakupljanje praha. To uključuje separaciju suvih čestica od medijuma za sušenje, što se najčešće postiže upotrebom ciklona i vrećastog filtera, postavljenog van komore za sušenje. Razdvajanje čestica od medijuma za sušenje zavisi od gustine, veličine čestica i njihove brzine taloženja unutar ciklona (Haque i sar., 2015).

3.2. Izazovi u *spray drying* sušenju i primena maltodekstrina

Uprkos ogromnom napretku koji je ostvaren u implementaciji *spray drying* tehnologije u uobičajenu industrijsku proizvodnu praksu, često se javljaju problemi kao što su: nemogućnost sušenja, nedovoljna efikasnost i neadekvatan kvalitet proizvoda (visok sadržaj vlage, niska koncentracija marker komponenti, itd.). Najčešći razlog ograničene upotrebe *spray drying* tehnike je lepljivost koja se može javiti u toku sušenja, ali i tokom skladištenja suvih prahova. Lepljivost praha je uglavnom uzrokovana prisustvom komponenti male molekularne mase, kao što su šećeri (glukoza, fruktoza, saharoza) i organske kiseline, koje imaju nisku temperaturu staklavosti (*glass transition temperature*, Tg) (Vladić, 2017). Osobine i Tg nekih niskomolekularnih šećera dati su u tabeli 8.

Tabela 8. Tg, fizičke karakteristike i osobine lepljivosti niskomolekularnih šećera (Bhandari i sar., 1997a; Mani i sar., 2002).

Materijal	Molekulska masa (g/mol)	Tg (°C)	Relativna higroskopnost	Relativna lepljivost
Fruktoza	180	5	veoma visoka	veoma visoka
Glukoza	180	31	visoka	visoka
Saharoza	342	62	umerena	umerena
Laktoza	342	101	niska	niska

Tg se može definisati kao temperatura na kojoj dolazi do promene amorfnog sistema od staklastog ka gumenastom stanju i može se izmeriti pomoću diferencijalnog kalorimetra (Mani i sar., 2002). Kada temperatura čestica postane veća od temperature lepljivosti, dolazi do promene amorfnog materijala iz staklastog stanja u gumenasto (poput tečnosti) i on postaje lepljiv. Ovo gumenasto stanje uzrokuje lepljenje materijala na površinu uređaja. Temperatura površine čestica za vreme sušenja ne bi trebalo da bude veća od 10 - 20 °C iznad Tg (Roos i Karel, 1991b; Bhandari i sar., 1997a; Mani i sar., 2002). Pored toga, neadekvatan i povišen sadržaj vode u suvim ekstraktima-prahovima takođe dovodi do pojave lepljivosti, obzirom na to da je voda prisutna u materijalu dominantan depresant Tg, jer ima veoma nisku vrednost Tg (-135 °C) (Johari i sar., 1987; Mani i sar., 2002).

Problemi lepljivosti i zaostataka praha na zidovima *spray drying* sistema mogu se eliminisati/redukovati, sa istovremenim povećanjem stabilnosti proizvoda, ako se napojnoj smeši dodaju komponente koje imaju visoku Tg (Mani i sar., 2002). Na ovaj način povećava se Tg cele smeše. U ovom smislu najčešće se primenjuju nosači poput maltodekstrina. Njihova osnovna uloga je povećanje Tg napojne smeše, što za posledicu ima smanjenje lepljivosti, smanjenje zaostataka na zidovima i smanjenje aglomeracije tokom sušenja i skladištenja, što sveukupno vodi proizvodnji stabilnijeg proizvoda (Roos i Karel, 1991; Bhandari i sar., 1993; Truong i sar., 2005b; Oliveira i sar., 2010). Molekulska masa i Tg nekih maltodekstrina dati su u tabeli 9.

Tabela 9. Molekulska masa i Tg nosača u sušenju

Nosači	Molekulska masa (g/mol)	Tg (°C)
Maltodekstrin	DE 36	100
	DE 25	121
	DE 20	141
	DE 10	160
	DE 5	188
Skrob		243

Maltodekstrini su polimeri koji se dobijaju kiselom ili enzimskom hidrolizom skroba i sastoje se od jedinica D-glukoze koje su primarno povezane α -1,4 vezama. Ovi proizvodi se obično klasifikuju prema svom dekstroznom ekvivalentu (DE). Dekstrozni ekvivalent je mera stepena hidrolize skroba i obrnuto je proporcionalan molekulskoj masi. Tg maltodekstrina raste u obrnutoj proporciji sa DE, pa se kreće od 100 °C za maltodekstrine sa DE 36, do 188 °C za maltodekstrine sa DE 5. Zato se maltodekstrini sa nižim DE uglavnom koriste kao dodaci za sušenje kod *spray drying*-a (Oliveira i sar., 2010).

Maltodekstrin je samostalno, ili u kombinaciji, pogodan za proizvodnju praha iz raznih vrsta materijala: riblje ulje, ulje mandarine, biljni ekstrakti, proteinski hidrolizat pilećeg mesa, voćna pulpa, itd. Koristi se takođe i za optimizaciju tehnoloških, funkcionalnih i organoleptičkih karakteristika praha. Razlozi njegove rasprostranjene upotrebe su: niska higroskopnost i viskoznost, veoma dobra rastvorljivost u vodi, kao i niska cena i dostupnost. Nema ni ukus, ni miris (Vladić, 2017).

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Biljni materijal

Biljni prah *A. uva-ursi* je dobijen nakon proizvodnje biljnog čaja *A. uva-ursi* u fabrici filter čaja Fructus (Bačka Palanka, Srbija). *A. uva-ursi* korišćena u ovom radu poreklom je sa teritorije BJR Makedonije. Godinea sakupljanja biljne sirovina je 2015. Sadržaj vlage u ovom materijalu iznosio je 8,56%.

4.2. Hemikalije

Folin-Ciocalteu reagens, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH), ferihlorid, galna kiselina, katehin, maltodekstrin (Sigma Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka); etanol (Centrohem, Šabac, Srbija); metanol (J. T. Baker, Deventer, Holandija); komercijalni azot (Messer, Zaprešić, Hrvatska); standardni arbutina, galne kiseline, rutina, hiperozida i izokvercitrina (Extrasynthese Cedex, Francuska). Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu su bili stepena analitičke čistoće.

4.3. Određivanje sadržaja vlage biljnog materijala

Sadržaj vlage biljnog materijala je određen gravimetrijskom metodom koju propisuje *Ph. Jug. V*, a na osnovu gubitka sušenjem na 105 °C do konstante mase. Analiza je rađena u tri ponavljanja.

4.4. Određivanje veličine čestica biljnog materijala

U cilju određivanja veličine čestica polaznog materijala, ispitivani biljni materijal (100 g) prosejava se kroz set sita. Masa droge koja je zaostala na svakom situ nakon prosejavanja se meri i izražava u procentima (%). Srednji prečnik čestica (d) računa se prema sledećoj jednačini:

$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i} \quad (1)$$

Gde je: m_i – maseni procenat i -te frakcije, a d_i - srednji prečnik i -te frakcije.

4.5. Konvencionalna ekstrakcija

Proces konvencionalne ekstrakcije (CE) podrazumeva postupak maceracije herbalnog praha *A. uva-ursi* sa četiri različita rastvarača: vodom i tri različita rastvora etanola (30%, 50% i 70%). U ovom postupku ekstrakcije odnos droga : rastvarač iznosio je 1:5 (m/v). Ekstrakcija je rađena na 25 °C tokom 24 h, na šejkeru sa kontrolom temperature (KS 4000i, IKA, Nemačka) na 150 o/m. Nakon ekstrakcije ekstrakti su filtrirani kroz filter papir pod vakuumom (V-700, Büchi, Švajcarska), sakupljeni u staklene bočice i skladišteni na 4 °C do daljih analiza. Ekstrakti dobijeni primenom vode obeleženi su kao EV, dok su ekstrakti dobijeni primenom rastvora etanola obeleženi kao E30 (dobijen primenom 30% etanola), E50 (dobijen primenom 50% etanola) i E70 (dobijen primenom 70% etanola). Ukupan prinos ekstrakcije (EY), koji predstavlja meru efikasnosti procesa ekstrakcije, izražen je kao g ukupno ekstrahovanih jedinjenja po 100 g ispitivanog materijala (g/100 g, %) i kao mg ukupno ekstrahovanih jedinjenja po mL tečnog ekstrakta (mg/mL).

4.6. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija (*Ultrasound assisted extraction*, UAE) je rađena je prema metodi koju su opisali Ramić i sar. (Ramić i sar., 2015). U svim eksperimentima, 10,0 g *A. uva-ursi* je ekstrahovano sa 100 mL 70% etanola u erlenmajeru od 250 mL. UAE je rađena u ultrazvučnom kupatilu (EUP540A, EUinstruments, Francuska) sa konstantnom frekvencijom od 40 KHz. Primenjena ultrazvučna snaga bila je u opsegu od 72 do 216 W, temperatura ekstrakcije u opsegu od 40 do 80 °C, a vreme ekstrakcije od 40 do 80 min. Snaga ultrazvuka, temperatura i vreme ekstrakcije su kontrolisani preko kontrolne table uređaja. Erlenmajeri su postavljeni tako da uvek budu na istoj udaljenosti od transduktora. Dodatno mešanje tokom ekstrakcije nije primenjeno. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom. Ekstrakti su sakupljeni u staklene bočice i čuvani na temperaturi od 4 °C do analize. Ukupni prinos ekstrakcije (EY) izražen je kao g ukupno ekstrahovanih jedinjenja po 100 g ispitivanog materijala (g/100 g, %) i kao mg ukupno ekstrahovanih jedinjenja po mL tečnog ekstrakta (mg/mL).

4.7. Ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE)

Subkritični ekstrakti biljnog praha *A. uva-ursi* su dobijeni ekstrakcijom 10,0 g ispitivanog materijala sa 100 mL rastvarača-vode na konstantnom pritisku od 30 bar. U ovoj metodi ekstrakcije primenjeno je mešanje pomoću magnetne mešalice (1000 obrtaja u minuti), za povećanje prenosa mase i toplote i za sprečavanje lokalnog pregrevanja na unutrašnjim zidovima ekstraktora. SWE je izvedena u šaržnom visoko-pritisnom ekstraktoru (Parr Instrument Company, SAD) sa unutrašnjom zapreminom od 450 mL, maksimalnim radnim pritiskom od 200 bar i maksimalnom radnom temperaturom od 350 °C. Za regulisanje temperature primenjen je regulator temperature (4838, Parr Instrument Company, SAD). Temperatura (120–220 °C), vreme ekstrakcije (10–30 min) i koncentracija HCl (0–1,5%) su ispitane kao nezavisne promenljive, dok su svi ostali parametri bili konstantni. Faza hlađenja od približno 10 min u ledenom kupatilu bila je ista za sve eksperimente. Ekstrakt je filtriran kroz filter papir pod vakuumom, sakupljen u staklenu bočicu i čuvan na temperaturi od 4 °C do analize. Prinos ekstrakcije izražen je kao g ukupnih ekstrahovanih

jedinjenja po 100 g ispitivanog materijala (g/100 g, %) i kao mg ukupnih ekstrahovanih jedinjenja po mL dobijenog tečnog ekstrakta (mg/mL).

4.8. Sušenje tečnog ekstrakta primenom *spray drying* tehnologije

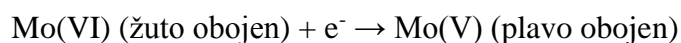
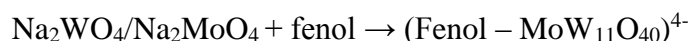
Za proizvodnju suvih praškastih ekstrakata pripremljene su tri različite tečne napojne smeše:

- ✓ Prva tečna napojna smeša je bio čist ekstrakt;
- ✓ Druga napojna smeša dobijena je dodavanjem maltodekstrina (MD) (DE 19,6) u tečni ekstrakt u koncentraciji od 20%;
- ✓ Treća i četvrta napojna smeša bile su iste i dobijene su dodavanjem MD u tečni ekstrakt u koncentraciji od 40%.

Pripremljena tečna napojna smeša je osušena u postupku *spray drying*-a upotrebom Anhydro laboratorijskog spray dryer-a (APV Anhydro AS, Danska). Za upumpavanje napojne smeše u uređaj korišćena je peristaltička pumpa. Ulazna temperatura procesa se kretala između 120 °C i 140 °C. Izlazna temperatura je bila u rasponu od 75 do 80 °C. Tokom proizvodnje suvog ekstrakta u formi praha brzina atomizera iznosila je od 20.000 do 21.000 o/min. Proizvedeni prah je odvojen od medijuma za sušenje ciklonom. Efikasnost procesa sušenja određena je gravimetrijski, na osnovu mase ukupnih čvrstih materija izmerenih u napojnoj smeši i mase praha dobijenog na kraju procesa, i izražena je u procentima (%).

4.9. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (UF) u ekstraktima *A. uva-ursi* određen je primenom Folin-Ciocalteu metode (Singleton i Rossi, 1965; Kähkönen i sar., 1999). Ova metoda se zasniva na merenju redukcionog kapaciteta polifenolnih jedinjenja. Disocijacijom polifenola dobija se proton i fenoksidni anjon. Nastali fenoksidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona, kao što je prikazano u sledećim hemijskim reakcijama:



0,1 mL tečnog uzorka je pomešano sa 7,9 mL destilovane vode, 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 mL 20% Na_2CO_3 . U pripremi slepe probe, umesto 0,1 mL uzorka, dodato je 0,1 mL destilovane vode ili odgovarajuće smeše etanol-voda. Reakciona smeša je inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi, a merenje absorbance uzorka je na talasnoj dužini 750 nm. Na osnovu jednačine izračunat je sadržaj fenolnih jedinjenja i izražen kao g EGK (ekvivalent galne kiseline) na 100 g ispitivanog materijala, i kao mg EGK/mL tečnog ekstrakta. Svi eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja.

4.10. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida (UFI) je određen primenom aluminijum-hlorida i kolorimetrijskom analizom prema Harbornu (1984). Metoda je zasnovana na sposobnosti flavonoida da formiraju metalo-organske komplekse sa metalima.

Reakciona test smeša je pripremljena mešanjem 1 mL uzorka sa 4 mL destilovane vode i 0,3 mL 5% NaNO_2 . Smeša je potom inkubirana na sobnoj temperaturi 6 minuta, nakon čega je u nju dodato 0,3 mL $\text{AlCl}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ 10% ,a 5 minuta kasnije 2 mL 1 M NaOH. Dobijena smeša je dopunjena destilovanom vodom (3,4 mL) do ukupne zapremine 10 mL. Kao slepa proba primenjena je test smeša u koju je umesto 1 mL uzorka dodat 1 mL rastvarača (destilovana voda ili odgovarajuća smeša etanol-voda). Apsorbanca uzorka je merena na talasnoj dužini od 510 nm. Sadržaj ukupnih flavonoida izražen je kao g EK (ekivalent katehina) na 100 g ispitivanog materijala i kao mg EK/mL tečnog ekstrakta.

4.11. HPLC analiza dobijenih ekstrakata

Hemijska analiza ispitivanih uzoraka urađena je primenom HPLC instrumenta Agilent serije 1200 RR sa DAD detektorom i Lichrospher RP-18 (Agilent) analitičke kolone (250 x 4 mm i.d., veličine čestica 5 μm). Mobilna faza se sastojala od rastvarača A (1% mravlja kiselina u vodi) i rastvarača B (acetonitril). Razdvajanje komponenti je urađeno primenom gradijentne elucije prema sledećoj šemi: 5-15% B, 0-5 min; 15-20% B, 5-8 min; 20% B, 8-12 min; 20-30% B, 12-15 min; 30% B, 15-17 min; 30-35% B, 17-20 min; 35% B, 20-22 min; 35-100% B, 22-25 min.

Kolona je termostatorana na 25 °C. Injektovano je 30 μL uzorka, prethodno filtriranog kroz membranski filter (0,45 μm). Protok je podešen na 1 mL/min, a talasne dužine detekcije su iznosile 280, 320, 350 i 520 nm. Identifikacija je bila moguća praćenjem polifenola na odabranim talasnim dužinama i upoređivanjem njihovih spektara i retencionih vremena sa vrednostima komercijalnih standardnih supstanci. Standardi arbutina, galne kiseline, rutina, hiperozida i izokvercitrina nabavljeni su od Extrasynthese (Cedex, Francuska). Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta i rezultati su izraženi kao mg/mL i mg/g uzorka.

4.12. Određivanje antioksidativne aktivnosti-DPPH test

Analiza antioksidativnog delovanja ekstrakata *A. uva-ursi* urađena je primenom DPPH testa, tj. primenom spektrofotometrijske metode koju su opisali Espin i sar. (2000). Različita zapremina analiziranih uzoraka je pomešana sa metanolom (95%) i 90 μM 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-om (DPPH) u cilju dobijanja preciznih i različitih finalnih koncentracija ekstrakata u reakcionoj test smeši. Nakon 60 min inkubacije na sobnoj temperaturi apsorbance analiziranih uzoraka je merena na 517 nm. Kapacitet “hvatanja” radikala (*radical scavenging capacity*, RSC (%)) izračunat prema jednačini (2). Antioksidativna aktivnost je izražena kao IC_{50} vrednost koja predstavlja koncentraciju rastvora ekstrakta neophodnu za dobijanje 50% kapaciteta “hvatanja” radikala.

$$\%RSC = 100 - \frac{A_{uzorka}}{A_{slepe\ probe}} \times 100 \quad (2)$$

gde je A_{uzorka} apsorbance rastvora uzorka, a $A_{slepe\ probe}$ apsorbance slepe probe (kontrola). Svi eksperimenti su izvedeni tri puta, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti.

4.13. Analiza reduktivnog kapaciteta

Reduktivni kapacitet ekstrakata *A. uva-ursi* je određena primenom testa koji je zasnovan na redukciji Fe^{3+} primenom polifenolnih antioksidanata metodom po Oyaizu (1986). Različite koncentracije ekstrakata su pomešane sa fosfatnim puferom (2,5 mL, 0,2 M, pH 6,6) i 2,5 mL 1% kalijum fericijanida ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). Smeša je inkubirana 20 min na 50 °C. Nakon inkubacije, 2,5 mL 10% rastvora trihlorsirćetne kiseline je dodato test smeši, koja je potom centrifugirana 10 min (3000 o/m). Supernatant (2,5 mL) je pomešan sa bidestilovanom vodom (2,5 mL) i 0,1% rastvorom FeCl_3 (0,5 mL). Apsorbance je merena na 700 nm. Veća apsorbance ukazuje na veći reduktivni kapacitet i veću antioksidativnu aktivnost. EC_{50} je izražena kao g biljnog praha *A. uva-ursi* po mL test rastvora neophodnog za dostizanje apsorbance 0,5 i kao mL dobijenog ekstrakta potrebnog za dostizanje apsorbance 0,5. Svi eksperimenti su izvedeni tri puta, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti.

4.14. Analiza sadržaja vlage u suvom ekstraktu-prahu

Sadržaj vlage u dobijenim suvim ekstraktima u formi praha analiziran je primenom standardne procedure, prema *Ph. Jug. V*, sušenjem uzorka na 105 °C do konstantne mase. Merenje analiza sadržaja vlage izvršeno je odmah nakon *spray drying*-a. Svi eksperimenti su izvedeni tri puta, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti.

4.15. Analiza higroskopnosti suvog ekstrakta

Higroskopnost suvih ekstrakata u formi praha određena je prema metodi koju su predložili Cai i Corke (2000) i Goula i Adamopoulos (2010) sa nekim modifikacijama. Uzorci svakog praha (približno 1 g, precizno izmeren na analitičkoj vagi) su smešteni na 25 °C u hermetički zatvoreni kontejner ili u desikatore napunjene zasićenim rastvorom NaCl (70% RH). Higroskopnost je praćena u periodu od 48 h. Higroskopnost je izražena kao g apsorbovane vode na 100 g praha. Svi eksperimenti su izvedeni tri puta, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti.

4.16. Analiza indeksa rastvorljivosti u vodi i indeksa apsorpcije vode

Indeks rastvorljivosti u vodi (*Water solubility index*, WSI) i indeks apsorpcije vode (*Water absorption index*, WAI) su određeni prema metodi koju su u svojoj studiji opisali Phoungchandang i Sertwasana (2010).

1,5 g suvog ekstrakta u formi praha *A. uva-ursi* i 15 mL vode su bili snažno pomešani u kivetu za centrifugiranje od 50 mL; smeša je inkubirana u vodenom kupatilu na 30 °C tokom 30 min i centrifugirana 15 min na 3000 o/m. Supernatant je odliven u prethodno tariranu Petrijevu posudu, a masa taloga je izmerena nakon sušenja u sušnici na 105 °C preko noći. Udeo čvrstih materija u osušenom supernatantu u odnosu na masu u prvobitnom uzorku (1,5 g) bila je pokazatelj WSI i izražena je u procentima. WAI je izračunat kao odnos mase čvrstih čestica preostalih nakon centrifugiranja i mase analiziranog suvog uzorka. Svi eksperimenti su izvedeni tri puta, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti.

4.17. Određivanje nasipne zapremine suvih ekstrakata

Nasipna zapremina suvih ekstrakata je određena merenjem zapremine određene mase praha. 20 g praha *A. uva-ursi* je preneto u menzuru zapremine 100 mL. Menzura je izložena vibracijama na vibracionoj ploči, u ukupnom trajanju od 5 min. Nakon toga, nasipna zapremina je izračunata iz očitane zapremine i iz razlike između mase menzure sa prahom i mase prazne menzure. Nasipna zapremina je izražena kao mg suvog ekstrakta u formi praha po 1 mL (Vladić i sar., 2016).

4.18. Analiza rehidracije suvih ekstrakata

Rehidracija suvih ekstrakata u formi praha određena je analizom brzine rastvaranja 2 g uzorka u 100 mL destilovane vode na sobnoj temperaturi, uz primenu mešanja na magnetnoj mešalici (brzinom od 890 o/m, magnet dimenzija 2x7 mm) (Goula i Adamopoulos, 2005b; Goula i Adamopoulos, 2008b).

4.19. Formulacija i priprema granulata koji sadrži *A. uva-ursi*

Za pripremu granulata koji sadrži *A. uva-ursi* suvi ekstrakt u formi praha korišćeni su različiti ekscipijensi, u različitim koncentracijama (tabela 10). Suvi ekstrakt *A. uva-ursi* u formulacije je dodat u koncentraciji od 10 ili 20%. Mešavine pripremljene prema podacima iz tabele 10 su homogenizovane mešanjem u pvc kesama u ukupnom vremenu od 30 min. Pripremljeno je ukupno šest različitih formulacija. Nakon homogenizacije dobijeni su granulati primenom metode vlažne granulacije. Na homogenizovane smeše dodato je vezivno sredstvo (vodotopivi i kukuruzni skrob u vodi). Ukupna zapremina dodatog vezivnog sredstva iznosila je 2 mL na 25 g smeše. Dobijeno farmaceustko „testo” je nakon toga protisnuto kroz odgovarajuće sito (otvor sita 2 nm), nakon čega je 3 dana sušeno na sobnoj temperaturi i pakovano u plastične posude.

Tabela 10. Sastav formulacija za pripremu granulata koji sadrže *A. uva-ursi* suvi ekstrakt u formi praha

Sastav	Formulacija I (g)	Formulacija II (g)	Formulacija III (g)	Formulacija IV (g)	Formulacija V (g)	Formulacija VI (g)
Laktoza	-	-	16,25	13,75	8,13	6,87
Dekstroza	16,25	13,75	-	-	8,13	6,87
Kukuruzni skrob	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
Ekstrakt uve	2,5	5	2,5	5	2,5	5
Vodeni rastvor skroba						
Vodotopivi skrob	3,065	3,065	3,065	3,065	3,065	3,065
Kukuruzni skrob	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65
Voda mL	2	2	2	2	2	2

4.20. Analiza higroskopnosti i rastvorljivosti u vodi granulata sa suvim ekstraktom *A. uva-ursi*

Granulati su analizirani u pogledu nekoliko fizičkih karakteristika koje su važne za njihovu primenu u obliku finalnog proizvoda “instant čaja”. Stoga su u dobijenim granulatom analizirani sadržaj vlage, higroskopnost, nasipna zapremina i rehidracija. Sadržaj vlage, higroskopnost i zapreminska masa su određeni prema prethodno opisanim procedurama. Rehidracija je određena merenjem vremena koje je bilo potrebno da 1 g granulata bude potpuno rastvoren u 100 mL vode na sobnoj temperaturi. Rehidracija je izražena u s.

4.21. Metoda odzivne površine (*response surface methodology, RSM*)

RSM je primenjena da bi se procenio uticaj parametara ekstrakcije u slučaju UAE i SWE, radi optimizacije uslova za različite odzive. U tom smislu primenjen je Box-Behnken eksperimentalni dizajn sa tri numerička faktora na tri nivoa. Svaka promenljiva je kodirana tako da varira od -1 do 1 . Promenljive su kodirane prema sledećoj jednačini

$$x = (x_1 - x_2)/\Delta x \quad (3)$$

gde je x kodirana vrednost, x_i odgovarajuća stvarna vrednost, x_0 je stvarna vrednost u centru domena, a Δx je inkrement x_i koji odgovara promeni x za jednu jedinicu.

Ispitivane promenljive su fitovane prema sledećem polinomnom modelu drugog reda kojim se može opisati veza između ispitivanih i nezavisno promenljivih:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 < j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (4)$$

U jednačini (4) y je zavisna promenljiva (odziv), x_i i x_j su nezavisne promenljive, a β_i , β_{ii} , i β_{ij} su regresioni koeficijenti za srednju vrednost linearne, kvadratne i interakcijske članove.

U UAE analiziran je uticaj tri procesna parametra (ultrazvučne snage, temperature ekstrakcije i vremena ekstrakcije) na ciljane odzive ispitivanog postupka. Uticaj snage ultrazvuka je ispitivan u opsegu od 72 do 216 W, temperature u rasponu od 40 do 80 °C i vremena ekstrakcije

u rasponu od 40 do 80 min, na ciljane odzive (UF, UFI, IC₅₀ i EC₅₀). Parametri analize su dati u tabeli 11.

Tabela 11. Eksperimentalni domen sa prirodnim i kodiranim vrednostima nezavisno promenljivih primenjenih dizajnu eksperimenta za UAE

Nezavisna promenljiva	Nivoi faktora		
	-1	0	1
Temperatura (°C), x ₁	40	60	80
Vreme (min), x ₂	40	60	80
Snaga ultrazvuka (W), x ₃	72	144	216

U SWE analizirani su uticaji tri procesna parametra (temperature, vremena ekstrakcije i koncentracije HCl) na ispitivane odzive (UF, UFI, IC₅₀ i EC₅₀). Dizajn se sastojao od petnaest eksperimenata sa tri ponavljanja u centralnoj tački. Temperatura (120–220 °C), vreme ekstrakcije (10–30 min) i koncentracija HCl (0–1,5%) su bile nezavisne promenljive. Vrednosti primenjenog dizajna su dati u tabeli 12.

Tabela 12. Eksperimentalni domen sa prirodnim i kodiranim vrednostima nezavisno promenljivih primenjenih u dizajnu za SWE

Nezavisna promenljiva	Nivoi faktora		
	-1	0	1
Temperatura (°C), x ₁	120	170	220
Vreme (min), x ₂	10	20	30
HCl (%), x ₃	0	0,75	1,5

5. REZULTATI I DISKUSIJA

U naučnoj literaturi veoma je malo informacija o ekstraktima i ekstrakciji biljne sirovine *A. uva-ursi* i njenih bioaktivnih jedinjenja. Svega nekoliko naučnih studija bavilo se istraživanjem uticaja tehnika ekstrakcije i parametara ekstrakcije, uključujući i rastvarača, na proizvodnju i kvalitet ekstrakata *A. uva-ursi*. Na primer, za proizvodnju ekstrakata *A. uva-ursi* Vučić i sar. (2013) su primenili maceraciju, gde su kao ekstragense koristili vodu, etanol i etil-acetat. Gribova i sar. su primenili ultrazvuk (60 kHz) za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz lišća *A. uva-ursi* uz upotrebu sistema voda:etanol (1:1) kao ekstragensa (Gribova i sar., 2008). Zbog toga je u ovoj doktorskoj disertaciji za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz sporednog proizvoda/otpada ove lekovite biljne vrste primenjeno i analizirano nekoliko tehnika ekstrakcije: konvencionalna ekstrakcija (CE), ultrazvučna ekstrakcija (UAE) i ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE). Sve analizirane tehnike okvalifikovane su kao “zelene tehnologije ekstrakcije”.

Uticaj rastvarača na proces ekstrakcije i kvalitet dobijenog ekstrakta se može smatrati jednim od najvažnijih uticaja. Selektivnost rastvarača zavisi od njegovog polariteta, stoga on direktno utiče na ekstrakciju ciljanih i pratećih jedinjenja, kao i na troškove i bezbednost procesa (Naffati i sar., 2017). Prema Naczki i Shahidi (2006), što je veći polaritet primenjenog rastvarača, bolja je rastvorljivost fenolnih jedinjenja. Zbog toga se rastvarači, kao što su metanol, etanol, aceton, propanol i etil-acetat, najčešće primenjuju za ekstrakciju fenola iz različitih matriksa (Alothman, Rajeev i Karim, 2009; Durling i sar., 2007). Međutim, neki od njih, kao na primer metanol, su toksični i kao takvi ne odgovaraju konceptu “zelene hemije” i konceptu koji podrazumeva proizvodnju bezbedne hrane (Naffati i sar., 2017). Zbog toga su sistemi poput sistema voda/etanol možda najprikladniji u svojstvu ekstragensa za ekstrakciju fenola, zbog različitih polariteta bioaktivnih sastojaka i njihove prihvatljivosti za dalju humanu upotrebu (Dent i sar., 2013). Dodavanjem vode etanolu povećava se polaritet rastvarača, što ga čini pogodnim za ekstrakciju srednje polarnih i polarnih bioaktivnih jedinjenja. Međutim, ukoliko je sadržaj vode previsok, dolazi do povećane ekstrakcije pratećih jedinjenja, čime se smanjuju koncentracije fenola u ekstraktima i sama efikasnost ekstrakcije (Spigno, Tramelli i De Faveri, 2007). Zbog toga je za efikasan i selektivan proces neophodno izabrati odgovarajući rastvarač-ekstragens. Nakon

odabira odgovarajućeg ekstragensa, analiziraju se i podešavaju ostali parametri ekstrakcije koji su karakteristični za svaku pojedinačnu tehniku ekstrakcije.

5.1. Konvencionalna ekstrakcija (CE) herbalnog praha *A. uva-ursi* i hemijska analiza dominantnih bioaktivnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima

Nekoliko naučnih studija bavilo se pitanjem ekstrakcije jedinjenja koja su zdravstveno korisna (uglavnom fenolnih), a koja potiču iz *A. uva-ursi* (Azman i sar., 2016; Vučić i sar., 2013). Najveći sadržaj UF (300,23 mg EGK/g ekstrakta), u slučaju kada su ekstrakti lišća *A. uva-ursi* dobijeni tehnikom konvencionalne ekstrakcije, postignut je primenom etanola kao ekstragensa (Vučić i sar., 2013). U studiji Azmana i sar. (2016) ekstrakt dobijen primenom sistema etanol:voda koji je dalje sušen zamrzavanjem imao je 102,11 mg EGK/g. Pegg i sar. (2008) su primenom 95% etanola dobili ekstrakt *A. uva-ursi* sa sadržajem UF od 312 mg EGK/g.

Kada se primenjuje konvencionalna metoda ekstrakcije (CE), izbor odgovarajućeg rastvarača je, pored vremena i temperature, najvažniji faktor u uspostavljanju odgovarajućeg procesa ekstrakcije. Zbog toga je u ovom istraživanju posmatran uticaj četiri različita rastvarača (vode, 30%, 50% i 70% etanola) na proces ekstrakcije biljnog praha *A. uva-ursi* i na karakteristike dobijenih ekstrakata. Primenjena je klasična tehnika maceracije na sobnoj temperaturi u trajanju od ukupno 24 h. Nakon ekstrakcije izvršena je filtracija u cilju dobijanja tečnih ekstrakata.

Primećeno je da je u slučaju ekstrakata dobijenih primenom vode i 30% etanola, najverovatnije usled povećane ekstrakcije pratećih jedinjenja, koja je posledica manje selektivnosti ekstragensa, filtracija tekla veoma sporo, što je bio jedan od kritičnih i limitirajućih koraka u procesu proizvodnje tečnog ekstrakta. Ova zapažanja ukazuju na moguću pojavu poteškoća (povećana potrošnja energije i produženo vreme filtracije), ukoliko bi se proizvodnja odvijala na ovaj način. Međutim, ukoliko bi u tehnološkom procesu bilo predviđeno frakcionisanje, odnosno prečišćavanje, na taj način bilo bi moguće podizanje proizvodnje na poluindustrijski ili industrijski nivo.

Rezultati dobijeni u eksperimentu primenom tehnike ekstrakcije CE su dati u tabeli 13. Prema dobijenim rezultatima, prinos ovog tipa ekstrakcije (EY) nalazi se u opsegu od 21,76 do 29,35%, a najveći prinos postignut je u slučaju kada je voda, na ambijentalnim uslovima, primenjena kao ekstragens. Ovo je bilo očekivano, obzirom na to da među primenjenim rastvaračima voda ima najmanju selektivnost. Prinos ekstrahovanih UF, u ekstraktima dobijenim na ovaj način, kretao se u opsegu od 4,205 do 7,287 g EGK/100 g, gde je najveći prinos ekstrakcije UF dobijen primenom 30% etanola kao ekstragensa. Prinos ekstrahovanih UFI je bio znatno niži u odnosu na prinos UF i kretao se od 0,762 do 1,267 g EK/100 g. Za razliku od UF, najveća vrednost UFI dobijena je u eksperimentu u kome je 70% etanol primenjen kao ekstragens. Činjenica da je najveći prinos ekstrakcije flavonoidnih jedinjenja ostvaren primenom rastvarača najnižeg polariteta (70% etanol) je očekivana, obzirom na to da prema rezultatima više naučnih istraživanja *A. uva-ursi* ima visok sadržaj flavonoidnih glikozida, kao što su kvercitrin i miricitrin, a najefikasnija ekstrakcija ove vrste flavonoidnih jedinjenja, prema Keinanenu (1993), se postiže primenom metanola koji je rastvarač sličnog polariteta kao 70% etanol.

Nekoliko naučnih studija bavilo se analizom antioksidativne aktivnosti ekstrakata *A. uva-ursi* (Vučić i sar., 2013; Azman i sar., 2016). Azman i sar. (2016) su primenili nekoliko antioksidativnih testova (uključujući TEAC test, EPR merenje i nekoliko prehrambenih modela) kako bi procenili antioksidativnu aktivnost ekstrakta *A. uva-ursi* dobijenog maceracijom primenom 50% etanola kao ekstragensa. U ovoj disertaciji za procenu antioksidativne aktivnosti ekstrakata *A. uva-ursi* su primenjena dva testa, DPPH i test redukcionog kapaciteta. DPPH test je zasnovan na sposobnosti antioksidanata da uklanjaju (“hvataju”) slobodne radikale (u ovom slučaju DPPH radikal), dok je test redukcionog kapaciteta zasnovan na kapacitetu antioksidanata da redukuju gvožđe (III) jone na gvožđe (II) jone. Najveća antioksidativna aktivnost, odnosno najniža IC₅₀ vrednost je detektovana u ekstraktu koji je dobijen primenom 30% etanola kao ekstragensa. Ovo je u skladu sa prethodno određenom koncentracijom UF u ovom ekstraktu, i u skladu je sa podacima iz literature, gde se navodi da su UF direktno povezani sa antioksidativnom aktivnošću (Awika i sar., 2003; Amarowicz i sar., 2004).

Tabela 13. Vrednosti EY, UF, UFI, IC₅₀ i EC₅₀ ekstrakata *A. uva-ursi* dobijene primenom CE

Ekstrakt <i>A. uva-ursi</i>	EW	E30	E50	E70
EY (%)	29,35	24,45	22,48	21,76
UF (g EGK/100 g)	4,205	7,287	6,703	6,701
UF (mg EGK/mL)	4,205	7,287	6,703	6,701
UFI (g EK/100 g)	0,762	1,229	1,182	1,267
UFI (mg EK/mL)	0,762	1,229	1,182	1,267
IC ₅₀ (µg/mL)	13,422	9,34	11,150	10,781
EC ₅₀ (µg/mL)	52,823	43,149	50,017	48,730
UFI %	18,121	16,865	17,633	18,907

Prema jednofaktorijskom ANOVA testu sa post-hoc Tukey HSD testom, rezultati su pokazali da postoji značajna razlika u EY između EW i E30, E50 i E70, jer je p-vrednost bila manja od 0,01. U slučaju UF postoji značajna razlika između EW sa jedne strane i E30, E50 i E70 sa druge strane ($p < 0,01$). Sadržaj UF u slučaju E30 i E50 se, takođe, značajno razlikovao, p-vrednost je bila $p < 0,05$, dok su neznatne razlike postojale između UF za E50 i E70. U slučaju UFI razlika je bila značajna u sva tri slučaja kada je EW bio upoređivan sa E30, E50 i E70 ($p < 0,05$), dok je u svim drugim serijama, kada su E30, E50 i E70 poređeni jedni sa drugima, razlika bila beznačajna. U slučaju IC₅₀ bilo je značajne razlike između svih ispitivanih uzoraka ($p < 0,01$). U slučaju EC₅₀ bilo je značajnih razlika između EW u odnosu na E30, E50 i E70, kao i između E30 i E50, odnosno E30 i E70 ($p < 0,01$), dok je između E50 i E70 p-vrednost bila $p < 0,05$.

Tabela 14. HPLC analiza ekstrakata *A. uva-ursi* dobijenih primenom CE

Ekstrakt A. <i>Uva-ursi</i>	Arbutin ($\mu\text{g/mL}$)	Galna kiselina ($\mu\text{g/mL}$)	Rutin ($\mu\text{g/mL}$)	Hiperozid ($\mu\text{g/mL}$)	Izokvercitrin ($\mu\text{g/mL}$)
EW	772,05	5.145,07	2,55	3.102,97	16,12
E30	987,23	3231,82	35,85	5.586,90	39,35
E50	1.529,36	558,94	89,09	7.692,63	76,41
E70	1.746,54	308,39	57,58	7.166,85	34,31

Prema rezultatima HPLC analize tečnih ekstrakata *A. uva-ursi* dobijenih CE (tabela 14), najveći detektovani sadržaj **arbutina**, dominantnog fenolnog bioaktivnog jedinjenja *A. uva-ursi*, iznosi 1.746,54 $\mu\text{g/mL}$, u tečnom ekstraktu koji je dobijen primenom 70% etanola kao ekstragensa. Najniža zabeležena koncentracija je bila 772,05 $\mu\text{g/mL}$ u ekstraktu koji je dobijen primenom vode na ambijentalnim uslovima. Primećeno je da se sa povećanjem koncentracije etanola u ekstragensu i koncentracija arbutina u tečnim ekstraktima takođe povećava. Stoga, može se zaključiti da je za proizvodnju ekstrakata *A. uva-ursi* sa visokim sadržajem arbutina potrebno primeniti veće koncentracije etanola.

Rychlinska i Nowak (2012) su ispitali sadržaj bioaktivnih jedinjenja u lišću dve lekovite biljke, *Bergenia crassifolia* i *A. uva-ursi*, obe prepoznate kao biljke sa visokom koncentracijom arbutina. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je najveći sadržaj arbutina izmeren u ekstraktu dobijenom primenom vode iz lišća *Bergenia crassifolia* (122,29 mg/g), dok je u ekstraktu lišća *A. uva-ursi* sadržaj arbutina varirao od 1,98 do 90,48 mg/g. U drugom istraživanju na ovu temu Parejo i sar. (2011) su primenili vodu kao ekstragens za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz *A. uva-ursi* i u dobijenim tečnim ekstraktima su detektovali sadržaj arbutina u opsegu od 2,03 do 253,81 mg/mL. Koncentracija arbutina u ovim studijama bila je mnogo niža od koncentracija arbutina u tečnim ekstraktima dobijenim iz sporednog proizvoda *A. uva-ursi*. Ova razlika može biti uzrokovana razlikama u primenjenim tehnikama ekstrakcije i ekstragensima, kao i razlikom u hemijskom sastavu početne/inicijalne sirovine.

Za razliku od arbutina, u tečnim ekstraktima *A. uva-ursi*, koji su dobijeni primenom CE, najveća koncentracija **galne kiseline** (5.145,07 $\mu\text{g/mL}$), detektovana je u vodenom ekstraktu, dok je najmanja koncentracija (308,39 $\mu\text{g/mL}$) dobijena primenom 70% etanola kao ekstragensa. Primećeno je da se sa povećanjem koncentracije etanola koncentracija galne kiseline smanjuje. Galna kiselina je bila dominantno fenolno jedinjenje u slučaju ekstrakta *A. uva-ursi* koji je dobijen primenom vode, i u ovom ekstraktu njena koncentracija je bila oko 10 do 15 puta veća nego u slučaju ekstrakata dobijenih primenom 50% i 70% etanola.

Nekoliko naučnih studija bavilo se analizom sadržaja galne kiseline u sirovinama ili ekstraktima biljaka koje su prepoznate kao dobar izvor ovog fenolnog jedinjenja. U svojoj studiji Karamac i sar. (2006) su ispitali sadržaj galne kiseline u ekstraktima divljeg lešnika, žutog noćurka i koštica grožđa, koji su dobijeni primenom 80% (v/v) acetona. Izmerena koncentracija galne kiseline u ekstraktu lešnika iznosila je 1 mg/g ekstrakta, u ekstraktu žutog noćurka 15 mg/g ekstrakta, a u ekstraktu koštica grožđa 2 mg/g ekstrakta. U istraživanju Kong-a i sar. lišće *Barringtonia racemosa* je ekstrahovano vodom, a pronađeno je da ekstrakti dobijeni na ovaj način sadrže galnu kiselinu u koncentraciji od 727 $\mu\text{g/g}$ (Kong i sar., 2014). Karamac i sar. (2006) su na ovu temu analizirali i sadržaj galne kiseline u *A. uva-ursi* pri čemu je utvrđeno da se koncentracija galne kiseline u ovoj sirovini kreće u opsegu od 1 do 2 mg/g ekstrakta, dok je ovaj raspon za zeleni čaj (*Camellia sinensis* L.) bio od 3 do 5 mg/g ekstrakta, gde su oba ekstrakta bila dobijena sa 95% etanolom kao ekstragensom. Prema Phansawan i Pongsabangpho (2014), koncentracije galne kiseline u ekstraktima *Cassia alata* koji su dobijeni primenom etanola, metanola i sirćetne kiseline (99%) iznosile su 366, 410, i 258 mg/g sirovog ekstrakta. Koncentracija galne kiseline detektovane u ekstraktima *Andrographis paniculata*, koji su dobijeni primenom etanola, metanola i sirćetne kiseline iznosili su 309,4, 351,2, i 309,1 mg/g sirovog ekstrakta. Na osnovu dobijenih rezultata i rezultata objavljenih u naučnoj literaturi, može se zaključiti da se ekstrakt herbalnog praha *A. uva-ursi* dobijen klasičnom ekstrakcijom primenom vode kao ekstragensa i 30% etanola kao ekstragensa može smatrati bogatim izvorom ovog veoma važnog fenolnog jedinjenja.

Prema rezultatima iz tabele 14, može se zaključiti da je hiperozid bio najdominantije bioaktivno jedinjenje u analiziranim ekstraktima *A. uva-ursi* dobijenim primenom CE. Sadržaj hiperozida varirao je od 3.102,97 do 7.692,63 $\mu\text{g/mL}$, gde je najveća koncentracija hiperozida

(7.692,63 $\mu\text{g/mL}$) dobijena u ekstraktu 50% etanola. Najmanja izmerena koncentracija ovog jedinjenja je iznosila 3.102,97 $\mu\text{g/mL}$, a dobijena je u vodenom ekstraktu.

Nekoliko naučnih grupa istraživalo je prisustvo i sadržaj hiperozida u biljnim sirovinama ili ekstraktima. *Crataegus monogyna* je lekovita biljka, prepoznata kao dobar izvor hiperozida. Prema izveštaju EMA (EMA/HMPC/159076/2014) sadržaj flavonoida u *C. monogyni* i njenim ekstraktima izražen je preko koncentracije hiperozida. Prema istom izveštaju EMA, *C. monogyna* bi trebalo da sadrži najmanje 1,5% ukupnih flavonoida sračunatih na hiperozid, tečni ekstrakti dobijeni primenom 30-70% etanola najmanje 0,8 do 3% ukupnih flavonoida sračunatih na hiperozid, dok bi suvi ekstrakt nakon ekstrakcije vodom trebalo da sadrži min. 2,5% (EMA/HMPC/159076/2014). Ferlemi i Lamari (2016) ukazuju na to da je ovo bioaktivno jedinjenje prisutno i u ekstraktima lišća *Vaccinium vitis-idaea*, dobijenim primenom metanola kao ekstragensa, i to u koncentraciji od 6,30%. Na osnovu ovoga može se zaključiti da se biljni prah *A. uva ursi* može kvalifikovati i kao bogat izvor ovog fenolnog jedinjenja i u tom smislu mogao bi se koristiti u farmaceutskoj industriji, a ne samo kao dobar izvor arbutina i galne kiseline.

Rutin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukozid) je flavonolni glikozid, takođe detektovan u dobijenim ekstraktima, ali u značajno manjoj koncentraciji u odnosu na prethodno navedena jedinjenja. Njegova glavna funkcija u telu je jačanje arterija i vena (Baumgertel i sar., 2003; Danila i sar., 2007), kao i jačanje kostiju i zuba (Horcajada i sar., 2000). Može se pronaći u mnogim biljkama, voću i povrću (Kreft i sar., 2002; Wu i sar., 2007). Studije su pokazale da rutin zaustavlja venski edem, što je rani znak hronične venske bolesti nogu (Vachirapatama i sar., 2011). Postoje indicije da rutin može da spreči neka kancerозна i prekancerозна stanja (Vachirapatama i sar., 2011). Pored toga, rutin može sprečiti nagomilavanje trombocita, razređujući krv i poboljšavajući cirkulaciju (Vachirapatama i sar., 2011). Ima jaka antioksidativna svojstva (Vachirapatama i sar., 2011).

Najveća koncentracija rutina, drugog po redu detektovanog dominantnog flavonoidnog jedinjenja u ispitivanim tečnim ekstraktima, bila je 89,09 $\mu\text{g/mL}$, a dobijena je primenom 50% etanola kao ekstragensa, dok je najmanja detektovana koncentracija iznosila 2,55 $\mu\text{g/mL}$, a dobijena je primenom vode kao ekstragensa.

Sofić i sar. su ispitali koncentraciju rutina kao bioaktivnog jedinjenja u *Ruta graveolens* i *Chamomilla chamomilla*. Utvrdili su da je koncentracija ovog flavonoidnog jedinjenja u *Ruta*

graveolens 186,6 mg/g, a u *Chamomilla chamomilla* 10,0 mg/g. Koncentracija rutina otkrivenog u tečnim ekstraktima dobijenim iz cvetova heljde, primenom vode kao rastvarača, iznosila je 53,5 mg/g (Sofić i sar., 2010). Koncentracije rutina u ekstraktima *Cassia alata*, koji su dobijeni primenom etanola, metanola i sirćetne kiseline iznosile su 194,4, 193,6 i 120,0 mg/g sirovog ekstrakta (Phansawan i Pongsabangpho, 2014). Sagledavajući vrednosti koncentracije rutina koje su detektovane u raznim biljnim sirovinama i ekstraktima, kao i koncentracije rutina u ekstraktima *A. uva-ursi*, može se zaključiti da se *A. uva-ursi* ne može smatrati biljnom sirovinom prvog izbora za ekstrakciju ovog bioaktivnog jedinjenja.

Poslednje flavonoidno jedinjenje detektovano u ispitivanim ekstraktima *A. uva-ursi*, koje je dobijeno primenom CE, bio je izokvercitrin. Koncentracija izokvercitrina je bila najveća u slučaju ekstrakta koji je dobijen primenom 50% etanola, (76,41 mg/mL), dok je najmanja zabeležena koncentracija, 16,12 mg/mL, izmerena u vodenom ekstraktu.

Na osnovu rezultata HPLC analize ekstrakata *A. uva ursi* koji su dobijeni primenom CE, može se zaključiti da se tri fenolna jedinjenja u ekstraktima *A. uva-ursi* mogu smatrati dominantnim: arbutin, galna kiselina i hiperozid. Arbutin je bio dominantan u ekstraktu koji je dobijen primenom 70% etanola, galna kiselina u ekstraktu dobijenim primenom vode, a hiperozid u ekstraktu dobijenom primenom 50% etanola kao rastvarača. Takođe, sva tri flavonoidna jedinjenja (rutin, hiperozid i izokvercitrin) su najefikasnije ekstrahovana primenom 50% etanola kao rastvarača. U slučaju arbutina, primećena je povećana efikasnost ekstrakcije sa povećanom koncentracijom etanola u rastvaraču, dok kod galne kiseline ekstrakcija zahteva smanjenje etanola u primenjenom rastvaraču. U slučaju primene vode kao rastvarača kod CE *A. uva-ursi* može se zaključiti da to nije rastvarač prvog izbora, pre svega zbog najmanje efikasnosti ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja kao što su UF i UFI, a potom i zbog najmanje antioksidativne aktivnosti i primećenih tehničkih poteškoća tokom procesa filtracije. Međutim, voda jeste rastvarač prvog izbora za ekstrakciju galne kiseline, stoga bi je, uz dodatnu proceduru prečišćavanja vodenog ekstrakta, trebalo primenjivati za proizvodnju ekstrakta sa visokim sadržajem ovog fenolnog jedinjenja. Na osnovu rezultata UF i UFI 30% etanol je pokazao dobre karakteristike za izolaciju bioaktivnih jedinjenja, ali i u slučaju ovog rastvarača primećene tehničke poteškoće mogu biti značajan nedostatak ukoliko bi se proces proizvodnje podigao na industrijski nivo (*scale-up*). Osim toga, on nije rastvarač prvog izbora za tri dominantna fenolna jedinjenja ekstrakata *A. uva-ursi*.

70% etanol je pokazao dobre karakteristike za ekstrakciju UF i UFI, bez značajne razlike u poređenju sa 50% etanolom. Pored toga, ovo je i rastvarač prvog izbora za ekstrakciju arbutina, najvažnijeg bioaktivnog jedinjenja u *A. uva-ursi*. Takođe, nije bilo ni poteškoća tokom filtracije tečnog ekstrakta dobijenog ovim rastvaračem. Zbog toga se 70% etanol može izabrati kao najpogodniji rastvarač za dobijanje ekstrakata *A. uva-ursi* sa relativno velikom koncentracijom fenolnih jedinjenja, naročito arbutina.

5.2. Ultrazvučna ekstrakcija (UAE) biljnog praha *A. uva-ursi* i hemijska analiza dominantnih bioaktivnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima

Nakon odabira odgovarajućeg rastvarača, primenom naprednih tehnologija ekstrakcije može se postići povećana ekstrakcija ciljanih bioaktivnih jedinjenja, u ovom slučaju arbutina, iz biljnog praha *A. uva-ursi*. Jedna od ovih tehnologija je i ultrazvučna ekstrakcija (UAE).

UAE je do sada primenjivana za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz nekoliko dobro poznatih prirodnih izvora. Yue i sar. (2012) su primenili UAE za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz nezrele jabuke. Sadržaj ekstrahovanih UF u ovoj studiji varirao je od 8,81-12,53 mg EGK/g, a dobijen je primenom 50-70% etanola kao ekstragensa i pri uslovima procesa koji su podrazumevali primenu ultrazvuka u opsegu od 420 do 560 W, vremena od 20 do 30 min i temperature od 50 do 70 °C. U istraživanju mogućnosti ekstrakcije UF iz voćnog praha divlje jabuke, primenom UAE, primenjeni opseg procesnih parametara bio je sledeći: temperatura od 40 do 80 °C, vreme od 40 do 80 min, snaga od 72 do 216 W. Najveći prinos ekstrakcije UF u ovom istraživanju (57,49 mg EGK/g) je dobijen primenom ultrazvučne snage od 144 W tokom 60 min ekstrakcije, dok je temperatura ekstrakcije bila podešena na 60 °C. Najniži prinos (25,55 mg EGK/g) je dobijen podešavanjem parametara ekstrakcije na 40 °C, 40 minuta vreme ekstrakcije i 144 W za ultrazvučnu snagu, pri čemu je kao ekstragens primenjen 70% etanol (Naffati i sar., 2017). Na osnovu prethodnih rezultata, zaključeno je da je UAE uspešnija metoda ekstrakcije fenola od CE. U svom istraživanju Dent i sar. (2015) utvrdili su da je UAE bila efikasnija u poređenju sa CE u ekstrakciji UF iz *Salvia officinalis*. U rezultatima je istaknuto da je najveći prinos UF, 67,75 mg/g, ekstrahovan iz *S. officinalis*, dobijen pri sledećim parametrima ekstrakcije: ekstragens 30% etanol, vreme ekstrakcije 11 minuta i snaga ultrazvuka od 400 W. Slično je primećeno i u studiji koja se bavila

ekstrakcijom Deda de Moča paprike (*Capsicum baccatum* L.). UF su ekstrahovani iz ove biljne sirovine primenom UAE i etanola kao ekstragensa. Najveći detektovani sadržaj ekstrahovanih UF iznosio je 7,89 mg EGK/g, a dobijen je na temperaturi ekstrakcije od 50 °C i primenom ultrazvuka snage od 300 W (Dias i sar., 2017).

Kako se prema mnogim naučnim studijama UAE pokazala efikasnijom od CE, da bi se poboljšala efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja, UAE je primenjena za proizvodnju etanolnih ekstrakata *A. uva-ursi*. Na osnovu rezultata koji su prethodno dobijeni primenom CE, 70% etanol je izabran kao ekstragens za potrebe daljih ispitivanja.

U slučaju UAE, neki autori izveštavaju o povoljnom uticaju porasta temperature, sa 20 °C na 70 °C, u slučaju ekstrakcije fenolnih jedinjenja, u poređenju sa ekstrakcijom bez primene sonifikacije (Shirsath i sar., 2012). Ovaj uticaj se opravdava povećanjem broja kavitacionih mehurića i većom kontaktnom površinom između čvrste materije i rastvarača, poboljšanjem difuzivnosti rastvarača sa posledičnim povećanjem desorpcije i rastvorljivosti prisutnih jedinjenja (Chemat i sar., 2017). Zbog toga je odabrano da opseg procesne temperature koja se primenjuje za UAE biljnog praha *A. uva-ursi* bude od 40 do 80 °C. Uticaj snage ultrazvuka je ispitivan u rasponu od 72 do 216 W.

Da bi se ispitala mogućnost optimizacije procesa UAE biljnog praha *A. uva-ursi* primenom 70% etanola, kao i da bi se istražio uticaj i efekat procesnih parametra na ekstrakciju bioaktivnih materija iz ove vrste biljnog materijala, primenjena je metoda odzivne površine (RSM). Eksperimentalni dizajn se sastojao od petnaest eksperimenata sa tri ponavljanja u centralnoj tački. Primenjeni procesni parametri, kao i rezultati dobijenih odziva (EY, UF, UFI, IC₅₀ i EC₅₀), dati su u tabeli 15.

Tabela 15. Vrednosti EY, UF, UFI, IC₅₀ i EC₅₀ ekstrakata *A. uva-ursi* dobijene primenom UAE i 70% etanola kao ekstragensa

Ekstrakt	T (°C)	t (min)	Snaga ultrazvuka (W)	EY (g /100 g)	EY (mg/mL)	UF (g EGK/100 g)	UF (mg GK/mL)	UFI (g EK/100 g)	UFI (mg EK/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)
1	(60)	(40)	(216)	40,6	40,6	14,02	14,02	2,59	2,59	9,36	32,98
2	(40)	(60)	(72)	38,3	38,3	14,65	14,65	2,78	2,78	5,59	31,14
3	(40)	(40)	(144)	38,7	38,7	14,95	14,95	2,55	2,55	9,15	33,13
4	(60)	(60)	(144)	41,0	41,0	14,13	14,13	2,73	2,73	6,62	31,73
5	(60)	(60)	(144)	40,3	40,3	14,11	14,11	2,53	2,53	7,55	32,23
6	(80)	(40)	(144)	39,3	39,3	14,56	14,56	2,70	2,70	8,19	31,60
7	(80)	(80)	(144)	39,6	39,6	15,37	15,37	2,52	2,52	7,55	31,22
8	(60)	(60)	(144)	40,0	40,0	13,96	13,96	2,58	2,58	8,59	32,69
9	(80)	(60)	(72)	40,1	40,1	14,81	14,81	2,82	2,82	6,83	31,80
10	(80)	(60)	(216)	39,9	39,9	13,64	13,64	2,59	2,59	8,17	31,13
11	(60)	(80)	(72)	40,8	40,8	15,04	15,04	2,78	2,78	6,44	32,42
12	(60)	(40)	(72)	39,7	39,7	14,63	14,63	2,73	2,73	5,22	32,79
13	(40)	(60)	(216)	38,3	38,3	13,69	13,69	2,64	2,64	7,35	31,74
14	(60)	(80)	(216)	38,8	38,8	14,56	14,56	2,75	2,75	10,07	32,58
15	(40)	(40)	(216)	38,1	38,1	13,06	13,06	2,61	2,61	9,13	32,56

U UAE analizirani su uticaji tri procesna parametra (temperatura, vreme ekstrakcije i snaga ultrazvuka) na nekoliko parametara kvaliteta ekstrakta *A. uva-ursi* (UF, UFl, IC₅₀, EC₅₀). Dizajn je uključivao petnaest eksperimenata sa tri ponavljanja u centralnoj tački. Temperatura (T, 40-80 °C), vreme ekstrakcije (t, 40-80 min) i ultrazvučna snaga (W, 72-216) su bile nezavisne promenljive. Detalji o primenjenom dizajnu su prikazani u tabeli 11.

Primena UAE je za rezultat imala gotovo udvostručeni prinos ekstrakcije (EY) u poređenju sa rezultatima dobijenim za CE, gde je 70% etanol primenjen kao rastvarač. U ovom tipu ekstrakcije ekstrakcioni prinos (EY) varira od 38,1 mg/mL (dobijen na temperaturi od 40 °C za vreme ekstrakcije od 40 min i primenom snage ultrazvuka od 216 W) do 41,0 mg/mL (dobijen na temperaturi od 60 °C za vreme ekstrakcije od 60 min i primenom snage ultrazvuka od 144 W). Na osnovu dobijenih rezultata, najveća vrednost EY za pet eksperimenata može biti prikazana sledećim redosledom počev od najveće vrednosti: ekstrakt 4 > ekstrakt 11 > ekstrakt 1 > ekstrakt 5 > ekstrakt 9.

Ekstrahovani UF bili su u opsegu od 13,06 do 15,37 mg EGK/mL. Najveći prinos ekstrakcije je ostvaren primenom ultrazvuka snage od 144 W tokom 80 min ekstrakcije na temperaturi od 80 °C. Najmanji prinos je dobijen podešavanjem parametara ekstrakcije na 40 °C, 40 minuta i 216 W za snagu ultrazvuka, primenom istog rastvarača (70% etanola). Prema dobijenim rezultatima, najveći sadržaj UF za pet eksperimenata se može prikazati po sledećem redosledu, počev od najveće vrednosti: ekstrakt 7 > ekstrakt 11 > ekstrakt 3 > ekstrakt 9 > ekstrakt 2.

Dobijeni rezultati pokazuju da je metod UAE efikasniji od CE, pri primeni istog ekstragensa (70% etanol), za ekstrakciju UF iz *A. uva-ursi*, obzirom na to da je prinos ekstrakcije ovih jedinjenja bio veći oko dva puta u poređenju sa prinosom koji je dobijen primenom maceracije na sobnoj temperaturi tokom 24 sata.

U nekoliko istraživanja UAE je primenjena za ekstrakciju UFl iz različitih izvora. Kod UAE *Sparganii rhizome* Wang i sar. (2012) su ustanovili da se primenom 53,62% etanola kao rastvarača, vremena ekstrakcije od 29,41 min i snage ultrazvuka od 300 W može dobiti 6,38 mg/g ukupnih ekstrahovanih flavonoida. Prakash i sar. (2013) su ispitali sadržaj UFl u tečnim ekstraktima dobijenim UAE iz *Nephelium lappaceum* L. i utvrdili da je najveća vrednost, 104 mg/100 g, dobijena pri sledećim optimalnim uslovima ekstrakcije: temperatura 50 °C, snaga

ultrazvuka od 200 W za 20 minuta ekstrakcije. Prema Naffati i sar. kod ekstrakcije UFl iz voćnog praha divlje jabuke, najveća vrednost ekstrakcije UFl (40,13 mg CE/g) postignuta je na temperaturi od 80 °C tokom 60 min i primenom snage ultrazvuka od 72 W (Naffati i sar., 2017). U svim slučajevima autori su zaključili da je UAE bila efikasnija tehnika ekstrakcije od CE.

Rezultati iz tabele 15 pokazuju da je sadržaj UFl u ispitivanim ekstraktima *A. uva-ursi* bio vrlo sličan bez obzira na vrednosti procesnih uslova. Najveći sadržaj UFl (2,82 mg EK/mL) je postignut na temperaturi od 80 °C i primenom ultrazvuka snage od 72 W tokom 60 min ekstrakcije. Najmanji sadržaj UFl (2,52 mg EK/mL) je dobijen na temperaturi 80 °C, primenom ultrazvuka snage od 144 W tokom 80 min ekstrakcije. Prema dobijenim rezultatima, najveći sadržaj UFl za pet eksperimenata se može prikazati sledećim redosledom, počev od najvećeg: ekstrakt 9 > ekstrakt 2 > ekstrakt 11 > ekstrakt 14 > ekstrakt 12 i 4.

Rezultati dobijeni UAE ukazuju na to da se primenom ove tehnike ekstrakcije može ostvariti prinos ekstrakcije UFl gotovo dvostruko veći u poređenju sa prinosom koji se ostvaruje primenom CE na sobnoj temperaturi tokom 24 sata. Prema Zhang i sar. to bi moglo biti objašnjeno činjenicom da se flavonoidi nalaze u citoplazmi ćelija i da će primena ultrazvuka dovesti do neke vrste permeabilizacije tkiva putem poremećaja važnih ćelijskih struktura, kao što su ćelijski zidovi i ćelijske membrane koje su od velikog značaja za prenos mase (Zhang i sar., 2011).

Rezultati iz tabele 15 prikazuju antioksidativnu aktivnost ekstrakata *A. uva-ursi* dobijenih na različitim procesnim parametarima, primenom UAE. Antioksidativna aktivnost (IC₅₀) dobijenih ekstrakata bila je u opsegu od 5,22 do 10,07 mg/mL. Najveća antioksidativna aktivnost (najniža vrednost IC₅₀) postignuta je u ekstraktu dobijenom na temperaturi od 60 °C, primenom ultrazvuka snage od 72 W tokom 40 min. Najmanja aktivnost, najveća IC₅₀ vrednost, izmerena je u ekstraktu dobijenom na temperaturi od 60 °C, primenom ultrazvuka snage od 216 W tokom 80 min ekstrakcije. U studiji u kojoj je analiziran uticaj procesnih parametara na UAE praha divlje jabuke, antioksidativna aktivnost ekstrakata pod sličnim procesnim uslovima varirala je od 0,0211 do 0,0279 mg/mL. Najveća antioksidativna aktivnost je detektovana u ekstraktima dobijenim na temperaturi od 80 °C, tokom 60 min ekstrakcije i primenom ultrazvuka snage od 72 W (Naffati i sar., 2017). U poređenju sa rezultatima dobijenim za ekstrakte divlje jabuke, ekstrakti *A. uva ursi* su pokazali nekoliko puta veću antioksidativnu aktivnost.

Prema dobijenim rezultatima, rangiranje kvaliteta *A. uva-ursi* za pet ekstrakata sa najvećim vrednostima može se prikazati u sledećem redosledu, počevši od onog sa najvećom antioksidativnom aktivnošću: ekstrakt 12> ekstrakt 2> ekstrakt 11> ekstrakt 9> ekstrakt 13.

Vrednosti redukcionog kapaciteta dobijenih ekstrakata *A. uva-ursi* su bile veoma slične, bez obzira na primenjene procesne parametre. Najniža vrednost EC_{50} (31,13 $\mu\text{g/mL}$) je detektovana u ekstraktu *A. uva-ursi* dobijenom na temperaturi od 80 °C, za 60 min ekstrakcije primenom ultrazvuka snage od 216 W. Najveća vrednost EC_{50} (33,13 $\mu\text{g/mL}$) je izmerena u ekstraktu koji je dobijen na temperaturi od 40 °C, tokom 40 min ekstrakcije primenom ultrazvuka snage od 144 W.

Prema dobijenim rezultatima, rangiranje kvaliteta *A. uva-ursi* za pet eksperimenata sa najvećim vrednostima može se predstaviti u sledećem redosledu, počevši od onog koji poseduje najveću redukcionu moć: ekstrakt 10> ekstrakt 2> ekstrakt 7> ekstrakt 6> ekstrakt 4.

Iako je nekoliko studija (Wang i sar., 2012; Prakash i sar., 2013; Tomšik i sar., 2016) pokazalo da se ultrazvučna ekstrakcija UF i UFI može opisati polinomnim modelom drugog reda i metodom odzivne površine, rezultati dobijeni UAE iz biljnog praha *A. uva-ursi* se ne uklapaju u ovaj model, pa se zbog toga za opisivanje uticaja procesnih parametara, metoda odzivne površine u ovom slučaju ne može primeniti.

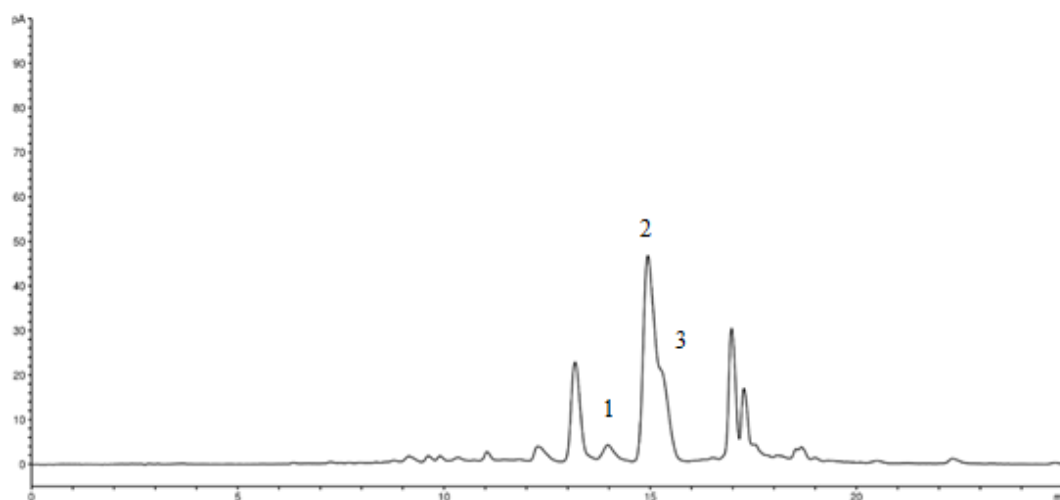
Nekoliko ekstrakta koji su dobijeni primenom UAE izabrano je za dalju HPLC analizu pojedinačnih fenolnih jedinjenja. Ekstrakti označeni kao ekstrakt 7, 9, 12 i 3 su odabrani zbog toga što je u njima detektovan najveći sadržaj UF i UFI, kao i najveća antioksidativna aktivnost i reduktivni kapacitet. Pored toga, ekstrakti označeni 2 i 11 su takođe analizirani, jer su bili najzastupljeniji prilikom rangiranja prvih pet ekstrakata najboljeg kvaliteta.

Tabela 16. Rezultati HPLC analize odabranih ekstrakata *A. uva-ursi* dobijenih UAE primenom 70% etanola kao ekstragensa

Ekstrakt	T (°C)	t (min)	Snaga ultrazvuka (W)	Arbutin (µg/mL)	Galna kiselina (µg/mL)	Rutin (µg/mL)	Hiperozid (µg/mL)	Izokvercetin (µg/mL)
2	(60)	(40)	(216)	1947,84	299,36	131,04	13928,00	49,63
3	(80)	(40)	(144)	2030,72	326,57	137,72	14800,68	51,52
7	(80)	(60)	(216)	1882,45	336,95	127,23	13516,25	55,09
9	(40)	(60)	(216)	1134,79	290,46	123,38	13119,41	49,41
11	(60)	(40)	(72)	1915,43	305,82	130,87	14435,16	48,39
12	(80)	(60)	(72)	1920,18	307,29	129,77	13388,48	53,30

Uticaj procesnih parametara na ekstrakciju arbutina u UAE istraživali su u svom radu Sahin i Bulduk. Oni su ispitali ekstrakciju arbutina iz *Pyrus Communis* L. primenom metanola kao rastvarača i otkrili su da se najveći prinos ekstrakcije arbutina može postići na temperaturi od 45 °C za vreme ekstrakcije od 45 min i na frekvenciji od 50 KHz (Sahin i Bulduk, 2016). Prema rezultatima u tabeli 16, u nekoliko slučajeva UAE iz biljnog praha *A. uva-ursi* je pokazala blago povećanje ekstrakcije arbutina, u poređenju sa CE, primenom 70% etanola kao rastvarača. Uticaj ultrazvuka na ekstrakciju galne kiseline, na osnovu rezultata HPLC analize odabranih ekstrakta, nije bio značajan. Međutim, u slučaju hiperozida i rutina, primena ultrazvuka u kombinaciji sa većom temperaturom rezultirala je efikasnijom ekstrakcijom, obzirom na to da je koncentracija ovih jedinjenja u ekstraktima bila približno udvostručena. Ovo se takođe može objasniti tvrdnjom Zhang i sar., da je ekstrakcija ovih jedinjenja ultrazvukom mnogo efikasnija zbog lokacije flavonoida u citoplazmi ćelija (Zhang i sar., 2011). Na osnovu dobijenih rezultata, ukoliko je cilj proizvodnja ekstrakata *A. uva-ursi* sa povećanom koncentracijom hiperozida, primena ultrazvuka u kombinaciji sa povećanom temperaturom može se smatrati potpuno opravdanom.

Može se zaključiti da je UAE biljnog praha *A. uva-ursi* bila efikasnija metoda u poređenju sa CE. Korišćenjem istog rastvarača (70% etanol), ekstrakcioni prinosi svih ispitivanih fenolnih jedinjenja su u poređenju sa onima dobijenim primenom maceracije na sobnoj temperaturi tokom 24 sata bili slični ili mnogo veći (u slučaju hiperozida i rutina). Međutim, pored koncentracije pojedinačnih fenolnih jedinjenja, treba istaći da je slična ili veća koncentracija ekstrahovanih jedinjenja postignuta za mnogo kraće vreme primenom UAE (40 do 80 minuta) u poređenju sa CE (24 sata), stoga skraćeno vreme ekstrakcije može biti istaknuto kao značajna prednost ove tehnike ekstrakcije u poređenju sa CE.



Slika 15. HPLC hromatogram uzorka 2 na 350 nm: 1 – rutin, 2 – hiperozid, 3 – izokvercitrin.

5.3. SWE biljnog praha *A. uva-ursi* i hemijska analiza dominantnih bioaktivnih jedinjenja dobijenih ekstrakata

Rezultati EY, UF, UFI, antioksidativne aktivnosti i reduktivnog kapaciteta, dobijeni prema eksperimentalnom dizajnu za SWE, dati su u tabeli 17. Kod SWE EY je varirao od 23,40 g/100 g (koliko je dobijeno na temperaturi od 220 °C za vreme ekstrakcije od 20 min bez dodavanja HCl) do 42,04 g/100 g (koliko je dobijeno na temperaturi od 120 °C za vreme ekstrakcije od 20 min uz dodavanje 1,5% HCl). Generalno, prinos koji je ostvaren primenom SWE u ekstrakciji *A. uva-ursi* bio je veći (u određenim slučajevima i do dva puta veći) od prinosa koji su dobijeni primenom CE. U poređenju sa UAE dobijeni su slični rezultati. Takođe, kao i u slučaju UAE, u SWE veći prinosi su postignuti za mnogo kraće vreme ekstrakcije u poređenju sa CE (30 min prema 24 sata), što je prilično očekivano obzirom na to da SWE omogućava mnogo bržu difuziju svih rastvornih supstanci iz čvrstog biljnog matriksa.

Tabela 17. Rezultati EY, UF, UFI, IC₅₀ i EC₅₀ ekstrakata *A. uva-ursi* dobijeni primenom SWE

Eksperiment	T	t	c HCl	EY	EY	UF	UF	UFI	UFI	IC ₅₀	EC ₅₀
	(°C)	(min)	(%)	(g/100 g)	(mg/mL)	(g EGK/100 g)	(mg EGK/mL)	(g EK/100 g)	(mg EK/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
1	(170)	(10)	(1,5)	37,46	37,46	10,11	10,11	1,78	1,78	5,03	28,21
2	(120)	(20)	(0)	29,80	29,80	8,43	8,43	1,17	1,17	4,61	29,94
3	(120)	(30)	(0,75)	37,54	37,54	7,96	7,96	1,59	1,59	5,18	18,13
4	(170)	(20)	(0,75)	37,54	37,54	9,73	9,73	1,62	1,62	5,32	35,93
5	(170)	(20)	(0,75)	38,12	38,12	10,53	10,53	1,60	1,60	4,75	40,22
6	(220)	(10)	(0,75)	29,76	29,76	9,13	9,13	1,84	1,84	5,63	46,27
7	(220)	(30)	(0,75)	27,12	27,12	7,33	7,33	1,54	1,54	6,36	44,93
8	(170)	(20)	(0,75)	36,96	36,96	10,34	10,34	1,56	1,56	4,82	35,74
9	(220)	(20)	(0)	23,40	23,40	8,88	8,88	1,33	1,33	4,82	40,85
10	(220)	(20)	(1,5)	30,06	30,06	7,72	7,72	1,78	1,78	5,37	46,83
11	(170)	(30)	(0)	35,46	35,46	10,26	10,26	1,15	1,15	5,27	37,76
12	(170)	(10)	(0)	38,40	38,40	10,64	10,64	1,03	1,03	4,69	35,56
13	(120)	(20)	(1,5)	42,04	42,04	7,31	7,31	1,70	1,70	4,60	37,03
14	(170)	(30)	(1,5)	33,44	33,44	9,48	9,48	1,86	1,86	5,39	41,82
15	(120)	(30)	(0,75)	39,94	39,94	7,96	7,96	1,62	1,62	5,15	35,93

Primenom SWE ostvaruje se veći prinos ekstrakcije UF (od 7,31 do 10,64 g EGK/100 g) u poređenju sa CE. Slični rezultati su dobijeni i u studiji o ekstrakciji UF iz sporednog proizvoda *Salvia officinalis* L. (Pavlič i sar., 2016). Primenom SWE ostvaruje se i veći prinos UFl (od 1,03 do 1,86 g EK/100g) u poređenju sa CE. Prema dobijenim rezultatima, ekstrakcija UFl iz biljnog praha *A. uva-ursi*, u poređenju sa rezultatima dobijenim u CE, povećana je za oko 30% primenom postupka SWE. Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih SWE takođe je bila veća od aktivnosti ekstrakata dobijenih CE, a to je i u skladu sa povećanom ekstrakcijom antioksidativnih jedinjenja (fenoli i flavonoidi) iz herbalnog praha *A. uva-ursi*, ostvarene tokom SWE.

Prema rezultatima iz tabele 13, voda u ambijentalnim uslovima (temperatura od 25°C) je pokazala najmanji kapacitet za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja, kao što su fenoli i flavonoidi, iz *A. uva-ursi*. U CE dodatak etanola vodi, pri ambijentalnim uslovima, poboljšava ekstrakcione moći ekstragensa za ekstrakciju ovih bioaktivnih jedinjenja. U SWE primenom povećanog pritiska i temperature dolazi do transformacije vode u subkrično stanje u kome voda postaje efikasniji ekstragens ove grupe bioaktivnih jedinjenja čak i u poređenju sa vodenim rastvorom etanola koji je primenjen u CE i koji je dao najbolje rezultate u pogledu ovih karakteristika. U poređenju sa UAE, kada je primenjen 70% etanol kao rastvarač, SWE je pokazala manju efikasnost za ekstrakciju UF i UFl. Ovo se može objasniti mogućom degradacijom određenih jedinjenja, indukovanom vrlo visokim temperaturama ekstrakcije primenjenim u procesu SWE.

5.3.1. Fitovanje modela

Za proizvodnju ekstrakta najadekvatnijih karakteristika potrebno je posmatrati i analizirati uticaj procesnih parametara na ciljane odzive. Zbog povećanih mogućnosti ekstrakcije u poređenju sa CE ekstrakcija primenom SWE je detaljno analizirana, pre svega u pogledu uticaja procesnih parametara. Eksperimentalni rezultati SWE (UF, UFl, IC_{50} i EC_{50}), prikazani u tabeli 17, su fitovani polinomnim modelom drugog reda (jedn. (4)), dok je metoda najmanjih kvadrata (*method of least square, MLS*) primenjena za generisanje koeficijenata regresije za linearne, interakcijske i kvadratne članove. Analiza varijanse (ANOVA) primenjena je za analizu njihovog značaja i adekvatnosti modela. Pogodnost modela određena je Fišerovim testom (F -test) za model i nedostatak prilagođavanja, dok su deskriptivni statistički parametri, kao što je koeficijent

višestruke determinacije (R^2), pružili dodatne informacije o slaganju modela. Za sva četiri ispitana odziva kvadratni polinomni model predstavlja dobru aproksimaciju zbog statistički značajnih p -vrednosti (0,0021 za UF, 0,0148 za UFI, 0,0318 za IC_{50} i 0,0478 za EC_{50}). Deskriptivna statistika, koja je u skladu sa ANOVA, ukazuje na mali procenat varijacija koje modeli ne objašnjavaju, obzirom na to da su vrednosti R^2 za UF, UFI, IC_{50} i EC_{50} iznosile 0,9727, 0,9388, 0,9147 i 0,8978. Međutim, p -vrednosti za nedostatak prilagođavanja za sva četiri ispitana odziva bile su beznačajne, što potvrđuje opravdanost primenjenih modela. Ponovljivost modela je bila dobra za UF, UFI i IC_{50} , jer je koeficijent varijacije (CV) bio manji od 7% (3,66, 6,94 i 4,43%). Disperzija podataka bila je nešto veća za EC_{50} (CV je bio iznad 10% (10,81%)). Slični statistički parametri su dobijeni i u studiji gde je RSM primenjena za optimizaciju SWE polifenola iz *S. officinalis* (Pavlić i sar., 2016).

5.3.2. Uticaji parametara SWE na ekstrakciju UF iz biljnog praha *A. uva-ursi*

SWE je pokazala povećanje prinosa UF za približno 10 do 30% u poređenju sa prinosom UF koji je dobijen u CE. Najveći prinos UF (10,64 g EGK/100 g) je dobijen primenom SWE na temperaturi od 170 °C, za vreme ekstrakcije od 10 min, bez dodavanja HCl. Najmanji prinos UF (7,31 g EGK/100 g) dobijen je na najnižoj ispitivanoj temperaturi ekstrakcije (120 °C), tokom 20 min ekstrakcije, uz dodatak 1,5% HCl. Povećanje temperature sa 120 °C na 170 °C dovodi do povećanja ekstrakcije UF iz biljnog praha *A. uva-ursi*. Smanjenje prinosa ekstrakcije UF je detektovano na temperaturi od 220 °C. Ovaj trend su primetili i Singh i Saldana koji su ispitali SWE kore krompira, gde je zaključeno da su veći prinosi fenolnih jedinjenja dobijeni na temperaturi u opsegu od 140 do 180 °C, dok je dodatno povećanje temperature od 180 do 240 °C rezultovalo smanjenjem prinosa ekstrahovanih fenola (Singh i Saldaña, 2011). Dobijeni rezultati ukazuju na značajan uticaj temperature na ekstrakciju fenolnih jedinjenja u ekstrakciji SWE, što je u skladu sa mnogim naučnim opažanjima o uticaju temperature na sam proces SWE. Naime, kako temperatura raste, permitivnost opada, kao i viskozitet i površinski napon, dok se stepen difuzije povećava, što omogućava duboku penetraciju rastvarača u matriks (Zakaria i sar., 2016). Uticaj temperature na proces SWE varira za različite materijale i zavisi od prirode i koncentracije bioaktivnih jedinjenja prisutnih u proizvodu (Singh i Saldaña, 2011). Temperatura uzrokuje i poremećaje u okviru sirovog materijala koji se ekstrahuje. Povećanje temperature ekstrakcije

preko određene vrednosti može dovesti i do degradacije određenih esencijalnih jedinjenja (Shitu i sar., 2015). Ali isto tako, povećanje temperature u SWE može dovesti do formiranja i nekih novih jedinjenja. Na primer, prema nekoliko autora, *p*-hidroksibenzoeva kiselina nastaje tokom SWE hidrolizom estara *p*-hidroksibenzoeve kiseline koji postoje u molekulima lignina (Khajavi i sar., 2006; Khuwijitjaru i sar., 2004). Međutim, tokom SWE mogu nastati i nepoželjna jedinjenja, kao što je 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF), proizvod Millard-ove reakcije, koji se može javiti pri visokim temperaturama ekstrakcije. Zbog toga je veoma važno i neophodno analizirati uticaj temperature na proces ekstrakcije i na kvalitet dobijenih ekstrakata, u smislu koncentracije bioaktivnih jedinjenja od interesa, ali i nepoželjnih jedinjenja, i nakon analize difinirati optimalnu temperaturu procesa koja daje proizvod odgovarajućeg-optimalnog kvaliteta.

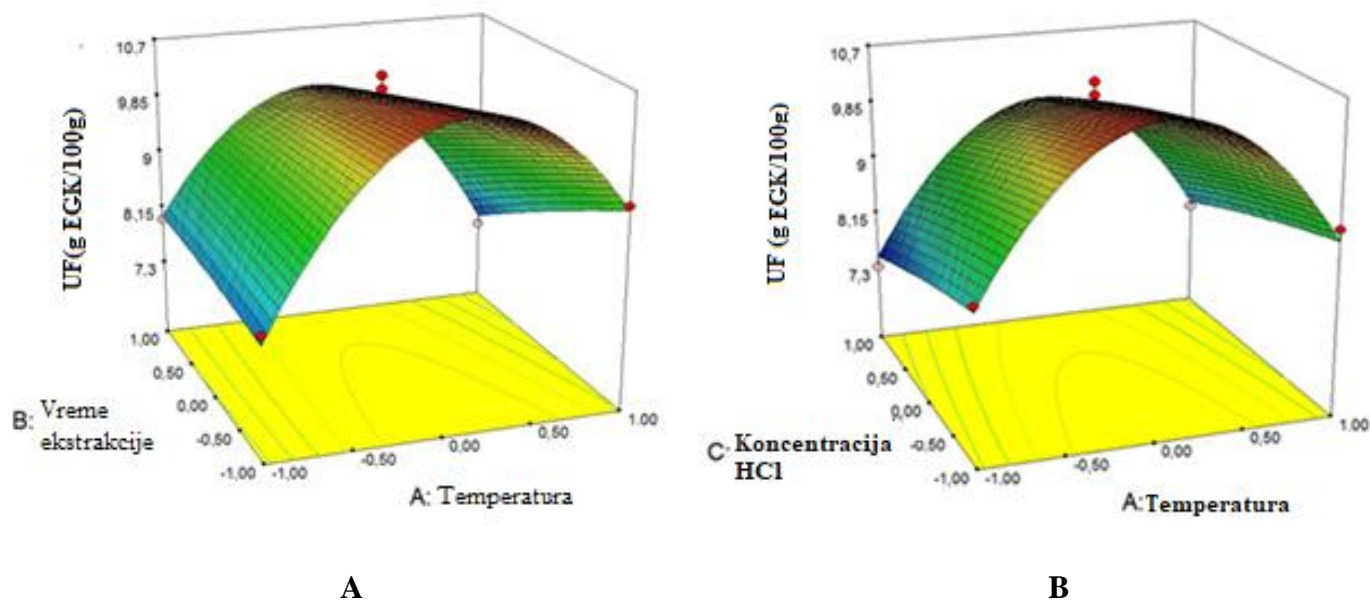
Dominantni uticaj temperature na ekstrakciju UF iz biljnog praha *A. uva-ursi* potvrđen je matematičkom analizom eksperimentalnih rezultata (tabela 18), na osnovu kojih je dobijena sledeća jednačina:

$$y = 10,20 - 0,35 x_2 - 0,45 x_3 - 0,44 x_1 x_2 - 2,07 x_1^2 \quad (5)$$

Prema matematičkoj analizi, najdominantniji i najznačajniji faktor koji utiče na ekstrakciju UF iz biljnog praha *A. uva-ursi* je kvadratni član temperature ($p = 0,0001$). Ovaj faktor utiče negativno na prinos ekstrakcije UF. Takođe, interakcija temperatura-vreme utiče negativno na prinos ekstrakcije UF, i ovaj efekat je značajan ($0,01 \leq p \leq 0,05$). To znači da nakon što se dostigne određena tačka temperature ekstrakcije, od oko približno 180 °C (3D slika odzivne površine, slika 16), prinos ekstrakcije UF iz biljnog praha *A. uva-ursi* se smanjuje. Povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja u ekstraktima (u prvom delu ispitivanog temperaturnog opsega, do 170°C) može se objasniti povećanom ekstrakcijom i rastvorljivošću određenih fenolnih jedinjenja na početku SWE procesa i/ili stvaranjem novih fenola tokom SWE. Pretpostavka je da se smanjenje ekstrakcije UF (u drugom delu ispitivanog temperaturnog opsega, od 170 do 220 °C) iz biljnog praha *A. uva-ursi* može pripisati degradaciji termosenzitivnih fenola, prisutnih u ispitivanom materijalu.

U slučaju biljnog praha *A. uva-ursi*, najveći prinos ekstrakcije UF postiže se primenom kraćeg vremena ekstrakcije (10 min), a na temperaturi od 170 °C. Podaci u tabeli 18 pokazuju da linearni član vremena ekstrakcije ima značajan i negativan uticaj na ekstrakciju UF, što znači da se produženjem vremena ekstrakcije prinos UF smanjuje. Takođe, prema jednačini (5), produženo izlaganje većim temperaturama uzrokuje veće smanjenje prinosa UF. Stoga se može zaključiti da

je pri temperaturi do oko približno 180 °C kraće vreme ekstrakcije pogodnije za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz ispitivanog biljnog materijala.



Slika 16. Odzivna površina koja prikazuje kombinovane uticaje vremena i temperature ekstrakcije (A) i dodavanja kiseline i temperature (B) na prinos ekstrakcije UF iz biljnog praha *A. uva-ursi*

Plaza i Turner (2015) su ukazali na to da se dodavanjem nekih organskih i neorganskih modifikatora, površinski aktivnih materija (PAM) i nosača može povećati rastvorljivost analita i uticati na fizičke osobine matriksa koji se ekstrahuje, kao i na desorpciju analita. Monrad i sar. (2010) su tako utvrdili da dodatak HCl u kombinaciji sa visokom temperaturom (80-120 °C) utiče na povećanje ekstrakcije UF iz komine grožđa, jer dovodi do hidrolize polifenolnih konjugata. Prema Arapitsas i Turner-u (2008) dodavanje 1% mravlje kiseline u vodu pogodovalo je ekstrakciji antocijanina iz crvenog kupusa. Međutim, to nije uvek slučaj. Naime, različite grupe fenolnih jedinjenja reaguju različito na dodavanje kiseline tokom ekstrakcije. Prema studiji Srinivas-a i sar. (2011) dodatak bilo koje kiseline u tečnost pod pritiskom smanjuje efikasnost ekstrakcije flavonola iz komine grožđa. Negativan uticaj dodatka kiseline u slučaju flavonolnih glikozida može se objasniti uticajem pH na toplotnu degradaciju flavonola (Srinivas i sar., 2011). Prema Buchner-u i sar. (2006) kvercetin i rutin, u vodenom zakišljenom rastvoru, pri pH=5 (dodata HCl), pokazuju

prekomernu toplotnu degradaciju koja dovodi do gubitka od oko 75% prvobitne koncentracije ovih jedinjenja, nakon 5 h ekstrakcije na 100 °C.

Slično ovim istraživanjima, u slučaju SWE biljnog praha *A. uva-ursi*, primećeno je smanjenje prinosa ekstrakcije UF sa povećanim dodavanjem kiseline. U ovom slučaju, najveći prinos ekstrakcije UF je ostvaren u eksperimentu koji je rađen bez dodatka HCl. Prema rezultatima matematičke analize, linearni član koncentracije HCl (0-1,5%) ima značajan i negativan uticaj na ekstrakciju UF iz biljnog praha *A. uva-ursi*. Sličan uticaj je primećen u studiji Pavlića i sar. (2016). Smanjenje prinosa ekstrakcije UF sa povećanim dodavanjem HCl i povećanjem temperature je takođe vidljivo na slici 16B.

Tabela 18. Koeficijenti fitovanog polinomnog modela drugog reda za UF, UFI, IC₅₀ i EC₅₀

Član	Regresioni koeficijent			
	UF	UFI	IC ₅₀	EC ₅₀
β_0	10,2024	1,5943	4,96333	37,29667
Linearni				
β_1	0,17	0,05	0,33*	7,23125*
β_2	-0,35**	-0,007	0,205***	4,03375**
β_3	-0,45**	0,30*	0,125	1,2225
Interakcijski				
β_{12}	-0,44**	0,08	0,19	-4,785***
β_{13}	-0,01	0,02	0,14	-0,2775
β_{23}	-0,06	-0,008	-0,055	2,8525
Kvadratni				
	-2,07*	0,043	0,185	0,92166
β_{22}	-0,03	0,008	0,430**	-1,90333
β_{33}	0,04	-0,14**	-0,299***	0,444167
R ^{2a}	0,972	0,938	0,914727	0,897791
CV ^b	3,666	6,946	4,435	1,814
p_m -Vrednost ^c	0,0021	0,0148	0,0318	0,0478
p_{if} -Vrednost ^d	0,7741	0,0514	0,8720	0,2305

Nastavak tabele 18.

*p<0,01	a koeficijent višestruke determinacije
**0,01≤p<0,05	b koeficijent varijanse [%]
***0,05≤p<0,1	c verovatnoća F vrednosti za model
	d verovatnoća F vrednosti za nedostatak prilagođavanja

5.3.3. Uticaji parametara SWE na prinos UFl iz biljnog praha *A. uva-ursi*

Prinosi ekstrakcije UFl iz biljnog praha *A. uva-ursi*, koji su dobijeni primenom SWE, su dati u tabeli 17. Najveći prinos UFl (1,86 g/100 g) je dobijen na temperaturi od 170 °C, za vreme ekstrakcije od 30 min i sa dodatkom 1,5% HCl. Najmanji prinos UFl (1,03 g/100 g) je dobijen pri istim uslovima temperature i vremena ekstrakcije, ali bez dodatka HCl. Najmanji prinos UFl, dobijen u odsustvu HCl može dovesti do pretpostavke da dodavanje kiseline (suprotno slučaju UF) može dovesti do povećane ekstrakcije ovih jedinjenja iz biljnog praha *A. uva-ursi*.

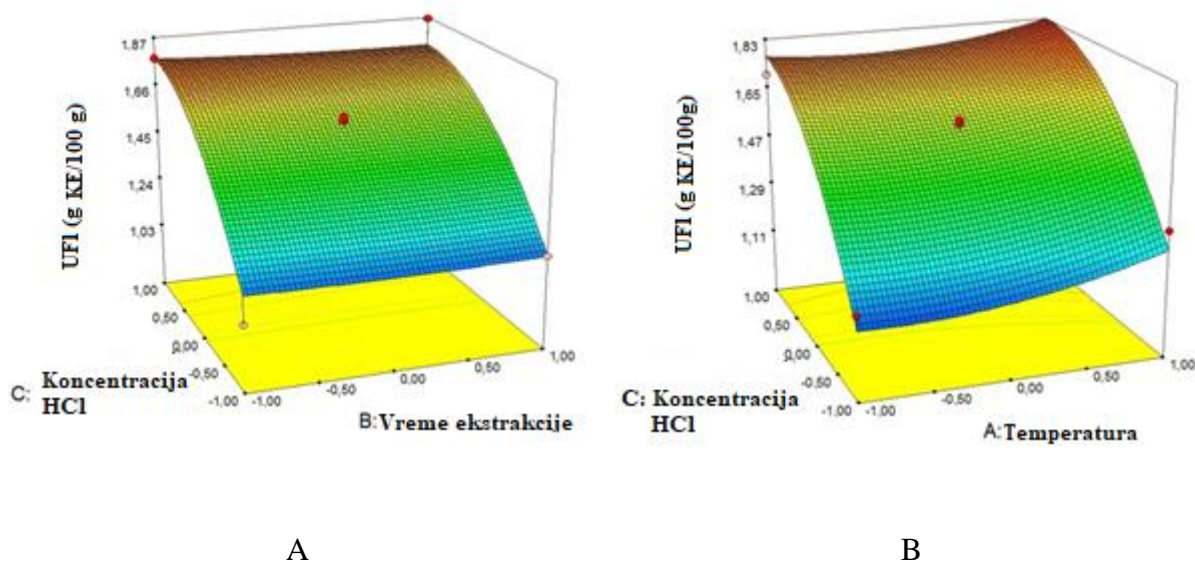
Na osnovu rezultata matematičke analize, *p*-vrednosti i tabele 18, konačna jednačina koja objašnjava uticaj parametara ekstrakcije na efikasnost ekstrakcije UFl iz biljnog praha *A. uva-ursi* je sledeća:

$$y = 1,59 + 0,305 x_3 - 0,14 x_3^2 \quad (6)$$

Nasuprot dominantnom efektu temperature u slučaju ekstrakcije UF, dominantan procesni parametar koji utiče na prinos ekstrakcije UFl iz biljnog praha *A. uva-ursi* je dodatak kiseline. Oba člana koja opisuju uticaj dodatka HCl na prinos ekstrakcije UFl (linearni i kvadratni) su od značaja. Kako jednačina (6) i rezultati ANOVA analize (tabela 18) pokazuju, linearni član koncentracije HCl je najuticajniji parametar SWE ($p < 0,0005$) i on pozitivno utiče na prinos ekstrakcije UFl iz biljnog praha *A. uva-ursi*. Uticaj kvadratnog člana dodatka HCl je takođe značajan, ali negativan ($p = 0,0484$). Ovo je u skladu sa studijom Jackmana i sar. (1987), koji su primetili da dodatak kiseline u procesu ekstrakcije dovodi do denaturacije ćelijske membrane materijala, čime se olakšava ekstrakcija flavonoida. Još jedna prednost dodatka kiseline u procesu SWE je navedena u radu Bleve i sar. (2008), koji su naveli da su flavonoidi ekstrahovani iz komine grožđa, primenom

rastvarača voda-etanol koji je zakišljen sa 0,2% trifluorosirćetne kiseline, bili lako dostupni za dalje prečišćavanje u poređenju sa onima koji su ekstrahovani u odsustvu kiseline. Povećana stabilnost ekstrahovanih flavonoidnih jedinjenja može biti objašnjenje njihove visoke koncentracije detektovane pri povećanom dodatku kiseline i smanjenoj pH vrednosti ekstrakcionog sistema.

Prema slikama koje prikazuju odzivne površine i uticaj vremena ekstrakcije i dodatka kiseline (slika 17, A i B), očigledno je da se povećanjem koncentracije HCl do tzv. “sedlaste tačke” (što je blizu najvećem dodatku HCl od 1,5%) povećava prinos ekstrakcije UFL iz biljnog praha *A. uva-ursi*. Nakon dostizanja te tačke, ekstrakcija UFL počinje da se smanjuje. Prema tome, najveći prinos UFL treba očekivati u blizini najveće koncentracije HCl (1,5%). U slučaju UFL, uticaji svih ostalih procesnih parametara na ekstrakciju su bili zanemarljivi ($p > 0,10$).



Slika 17. Odzivna površina koja prikazuje kombinovane uticaje vremena ekstrakcije i dodatka kiseline (A) i temperature ekstrakcije i dodatka kiseline (B) na prinos ekstrakcije UFL iz biljnog praha *A. uva-ursi*

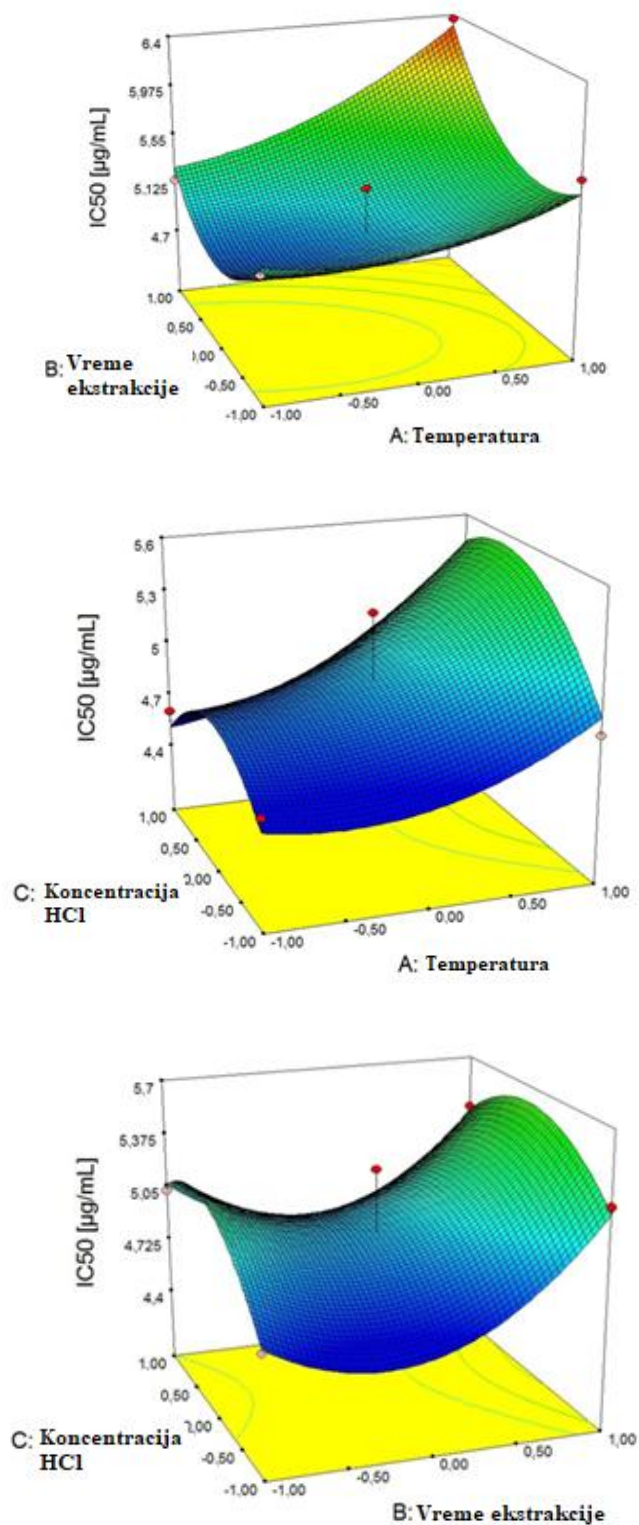
5.3.4. Uticaji parametara SWE na antioksidativnu aktivnost ekstrakata dobijenih iz biljnog praha *A. uva-ursi*

Prema tabeli 17, najveća vrednost antioksidativne aktivnosti, tj. najniža IC₅₀ vrednost, izmerena je u ekstraktu koji je dobijen na temperaturi od 120 °C, uz dodatak 1,5% HCl, za ukupno vreme ekstrakcije od 20 min. Najmanja antioksidativna aktivnost (najveća IC₅₀ vrednost) dobijena je za ekstrakt proizveden na temperaturi od 220 °C tokom 30 min ekstrakcije uz dodatak 0,75% HCl. Antioksidativna aktivnost subkritičnih ekstrakata biljnog praha *A. uva-ursi* bila je nekoliko puta veća od antioksidativne aktivnosti ekstrakata žalfije, koji su dobijeni takođe primenom SWE i analizirani u studiji Pavlića i sar. (2016). Konačna jednačina koja opisuje uticaje procesnih parametara na antioksidativnu aktivnost ispitivanih ekstrakata, određenu primenom DPPH testa, je sledeća:

$$y = 4,96 + 0,33 x_1 + 0,21 x_2 + 0,43 x_2^2 - 0,30 x_3^2 \quad (7)$$

Dominantan uticaj na antioksidativnu aktivnost ekstrakata dobijenih primenom SWE pokazuje linearni član temperature. Ovaj uticaj je bio veoma značajan ($p=0,0094$) i pozitivan. Efekat linearnog člana vremena je takođe pozitivan, ali umereno značajan ($p=0,0514$). Uticaj kvadratnog člana je značajan i pozitivan. To znači da se povećanjem vremena ekstrakcije smanjuje antioksidativna aktivnost ekstrakata *A. uva-ursi*. Stoga, ukoliko se temperatura ekstrakcije povećava uz produženje samog procesa ekstrakcije, antioksidativna aktivnost ekstrakata će se smanjiti. Ovo je u skladu sa prethodno posmatranim uticajem temperature na prinos UF, gde je primećeno da povećanje temperature kao funkcije vremena smanjuje prinos UF, verovatno zbog degradacije određenih termosenzitivnih jedinjenja koja nastaje nakon dostizanja određene temperature procesa. Kvadratni član koncentracije HCl je pokazao negativan i umeren uticaj na vrednost IC₅₀. Stoga, prema tabeli 18 i jednačini (7), kako bi se povećala antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata *A. uva-ursi*, koji se dobijaju primenom SWE, potrebno je primeniti kraće vreme ekstrakcije i nižu temperaturu procesa.

Odzivne površine koje opisuju uticaj parametara SWE na IC₅₀ vrednost ekstrakata biljnog praha *A. uva-ursi* prikazane su na slici 18.



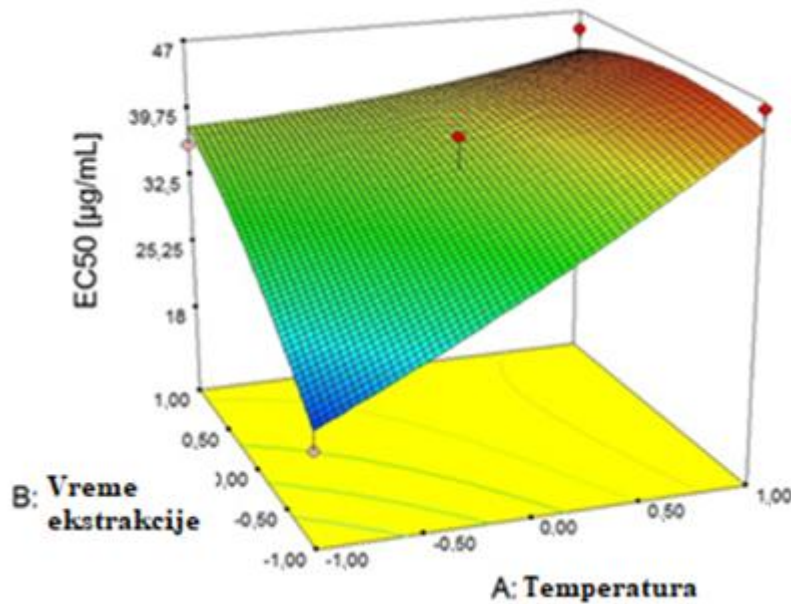
Slika 18. Odzivna površina koja prikazuje uticaje parametara ekstrakcije (vremena, temperature i dodatka kiseline) na antioksidativnu aktivnost ekstrakata biljnog praha *A. uva-ursi*

Eksperimentalni podaci dobijeni za reduktivni kapacitet ekstrakata biljnog praha *A. uva-ursi*, odnosno vrednosti EC_{50} , dati su u tabeli 17. Najveći reduktivni kapacitet, opisan najnižom EC_{50} vrednošću (18,13 $\mu\text{g/mL}$), određen je za ekstrakt dobijen na temperaturi od 120 °C, uz dodatak 0,75% HCl, za ukupno vreme ekstrakcije od 30 min. Najmanji reduktivni kapacitet, opisan najvećom EC_{50} vrednošću (46,83 $\mu\text{g/mL}$), dobijen je za ekstrakt koji je ekstrahovan na temperaturi od 220 °C, uz dodatak 1,5% HCl, a za ukupno vreme ekstrakcije od 20 min. Reduktivni kapacitet subkritičnih ekstrakata *A. uva-ursi* bio je sličan kapacitetu ekstrakata žalfije dobijenih u istraživanju Pavlića i sar. (2016).

Sledeća jednačina opisuje uticaj parametara SWE na reduktivni kapacitet ekstrakata dobijenih iz biljnog praha *A. uva-ursi*:

$$y = 37,30 + 7,23 x_1 + 4,03 x_2 - 4,78 x_1 x_2 \quad (8)$$

Uticaj temperature na reduktivni kapacitet dobijenih ekstrakata je veoma značajan ($p=0,0037$) i pozitivan. Ovaj uticaj se može videti na slici 19. Takođe, primećen je pozitivan i značajan uticaj linearnog člana vremena ($p=0,0358$) na EC_{50} . To znači da se sa povećanjem temperature ili vremena povećava i EC_{50} , što znači da se smanjuje reduktivna sposobnost ekstrakata. Uticaj interakcije između temperature i vremena bio je umeren i negativan. To znači da se sa povećanjem temperature ili vremena ekstrakcije povećava i EC_{50} , što dovodi do smanjenja reduktivnih sposobnosti ekstrakata. Ova zapažanja su u skladu sa opažanjima kod ekstrakcije UF primenom SWE. Kombinovani uticaj parametara ekstrakcije na reduktivni kapacitet ekstrakata biljnog praha *A. uva-ursi* dobijenih primenom SWE prikazan je na slici 19.



Slika 19. Odzivna površina koja prikazuje uticaje parametara ekstrakcije na reduktivni kapacitet ekstrakata dobijenih primenom SWE iz biljnog praha *A. uva-ursi*

5.3.5. Optimizacija procesa UAE

Osnovni cilj ovog dela istraživanja je bio optimizacija procesa SWE bioaktivnih jedinjenja, UF i UFl, iz biljnog praha *A. uva-ursi*, koja omogućuje takvo podešavanje procesnih parametara koje bi obezbedilo najbolju moguću vrednost za sve ciljane odzive (UF, UFl, IC₅₀ i EC₅₀). Najpovoljnija vrednost svih ciljanih odziva znači da će UF i UFl biti istovremeno maksimizirani, dok će vrednosti IC₅₀ i EC₅₀ biti minimizirane. Primenom RSM i optimizacije višestrukih odziva, u ispitivanom eksperimentalnom domenu, utvrđeni su optimalni procesni parametri za SWE biljnog praha *A. uva-ursi*: temperatura od 151,2 °C, vreme ekstrakcije od 10 min i dodatak 1,5% HCl. Predviđene vrednosti ciljanih odziva pri ovim uslovima bile su: 9,8431 g EGK/100 g, 1,7558 g EK/100 g, 5,02 µg/mL i 27,60 µg/mL za UF, UFl, IC₅₀ i EC₅₀. Pored toga, urađena je i

optimizacija procesa u cilju pronalaženja procesnih parametara koji bi rezultovali maksimalnom ekstrakcijom UF. Parametri procesa u SWE koji obezbeđuju najbolju moguću ekstrakciju UF iz biljnog praha *A. uva-ursi* su: temperatura 178,5 °C, vreme 12 min i dodatak kiseline u koncentraciji od 0,05%. Predviđena vrednost maksimalnog prinosa UF pri ovoj postavci parametara procesa je 10,8243 mg EGK/mL. Sve dobijene predviđene vrednosti su eksperimentalne vrednosti.

Predviđeni procesni parametri za maksimalni prinos UF i optimalna sva četiri odziva (UF, UFI, IC₅₀ i EC₅₀) su različiti i treba ih izabrati na osnovu željenih osobina ekstrakta koji će se proizvoditi. Ako su cilj SWE ekstrakcija arbutina i galne kiseline, onda bi trebalo odabrati procesne parametre određene za maksimalnu ekstrakciju UF. Sve dobijene predviđene vrednosti su eksperimentalne vrednosti.

5.3.6. HPLC analiza ekstrakata *A. uva-ursi* dobijenih SWE

Tri ekstrakta dobijena procesom SWE su odabrana za dalju HPLC analizu pojedinačnih fenolnih jedinjenja. To su ekstrakt dobijen pri optimalnim uslovima (optimalna ekstrakcija UF (A), ekstrakt dobijen pri optimalnim uslovima za sva tri odziva (B) i ekstrakt dobijen u centralnoj tački (C)). Dobijeni rezultati su dati u tabeli 19.

Tabela 19. HPLC analiza pojedinačnih fenolnih jedinjenja u odabranim ekstraktima biljnog praha *A. uva-ursi* koji su dobijeni primenom SWE

Ekstrakt	Procesni parametri SWE	Arbutin (µg /mL)	Galna kiselina (µg /mL)	Rutin (µg /mL)	Hiperozid (µg /mL)	Izokvercetin (µg /mL)
A	178,5 °C 12 min 0,05% HCl	1.171,04	4.122,24	8,02	360,07	4,73
B	151 °C 10 min 1,5% HCl	1.910,40	4.119,30	tr*	tr	tr
C	170 °C 20 min 0,75% HCl	1.364,74	4.555,83	tr	tr	tr

*tr-tragovi

Rezultati HPLC analize dovode do nekoliko zaključaka. Naime, očigledno je da su rutin, hiperozid i izokvercetin osjetljivi na ekstremne uslove koji se primenjuju u SWE, pre svega na visoku temperature procesa, zbog čega su uglavnom degradirani i prisutni su u veoma malim količinama ili tragovima u analiziranim ekstraktima. Očigledno, degradacija je povećana sa povećanom koncentracijom dodate kiseline, jer su se ova jedinjenja mogla detektovati samo u ekstraktu gde je dodata kiselina u najmanjoj koncentraciji. Zbog toga bi ovu tehniku ekstrakcije trebalo izbegavati ukoliko su ciljana jedinjenja ekstrakcije flavonoidi. U ekstraktima dobijenim primenom SWE, u poređenju sa ekstraktima dobijenim CE primenom vode, koncentracija arbutina

je približno 1,5 do 3 puta veća, dok je koncentracija galne kiseline 10 do 20% manja. U poređenju sa UAE gde je primenjen 70% etanol kao rastvarač, SWE je rezultirala proizvodnjom ekstrakata sa uporedivom koncentracijom arbutina, ali sa više od 10 puta većom koncentracijom galne kiseline. Dakle, može se zaključiti da je SWE tehnika koju treba primeniti za proizvodnju ekstrakata *A. uva-ursi* sa visokom koncentracijom arbutina i visokom koncentracijom galne kiseline. Primenom CE ili UAE nije bilo moguće postići ovako visoku koncentraciju oba jedinjenja (arbutina i galne kiseline) u jednom ekstraktu, stoga se ovo može smatrati velikom prednošću ove tehnike ekstrakcije u procesu prerade *A. uva-ursi*.

5.4. *Spray drying* ekstrakata *A. uva ursi* dobijenih pri optimalnim procesnim uslovima SWE

Za proizvodnju *A. uva-ursi* suvog ekstrakta (praha) korišćen je optimalni tečni ekstrakt dobijen primenom SWE. Kao agens za sušenje primenjen je MD 19,6 DE u različitim koncentracijama (od 0 do 40%). Kako bi se odredila koncentracija MD koja daje najbolje rezultate ulazna temperatura sušenja je podešena na 120 °C. Svi ekstrakti dobijeni na ovaj način prikazani su na slici 20. Fizičke karakteristike ovako dobijenih suvih ekstrakata date su u tabeli 20.



Suvi ekstrakt dobijen bez
dodatka MD



Suvi ekstrakt dobijen
dodatkom MD u
koncentraciji 20%



Suvi ekstrakt dobijen
dodatkom MD u
koncentraciji 40%

Slika 20. Suvi ekstrakti biljnog praha *A. uva-ursi* dobijeni primenom *spray drying*-a (ulazna temperatura 120°C)

Nakon odabira koncentracije MD koju je neophodno dodati tečnom ekstraktu *A. uva-ursi* radi proizvodnje suvog ekstrakta najboljih karakteristika, ulazna temperatura je povećana na 140 °C, sa ciljem proizvodnje praha sa smanjenim sadržajem vlage.

Efikasnost sušenja je u svim slučajevima bila veća od 60%, zbog čega se svi procesi sušenja mogu smatrati veoma efikasnim.

Tabela 20. Fizičke karakteristike suvih ekstrakata (u formi praha) dobijenih iz tečnog ekstrakta biljnog praha *A. uva-ursi*

Karakteristike ispitivanih suvih ekstrakata	Prah proizveden bez MD na 120 °C	Prah proizveden uz dodavanje 20%MD na 120 °C	Prah proizveden uz dodavanje 40%MD na 120 °C	Prah proizveden uz dodavanje 40% MD na 140 °C
Sadržaj vlage (%)	9,355	9,466	7,177	5,514
Higroskopnost nakon 48 h (%)	11,376	10,882	8,729	12,243
WAI (%)	4,098	3,112	3,577	2,195
WSI (%)	88,484	89,091	90,360	77,943
Nasipna zapremina (g/mL)	0,186	0,232	0,232	0,281
Rehidratacija (sekunde)	20	14	18	35

Sadržaj vlage je glavni faktor koji utiče na stabilnost i fizičke i reološke osobine suvih ekstrakata u formi praha, s obzirom da je malo povećanje sadržaja vode u stanju da smanji Tg sasvim dovoljno da se poveća mobilnost matriksa tokom skladištenja (Bhandari i Hartel, 2005) i da na taj način utiče negativno na osnovna svojstva praha. Sadržaj vlage u dobijenim suvim ekstraktima *A. uva-ursi*, na ulaznoj temperaturi sušenja od 120°C, bio je u opsegu od 7,177 do 9,466%. Prema važećem Pravilniku o kvalitetu čaja, biljnog čaja i njihovih proizvoda, sadržaj vlage u instant čaju bi trebalo da bude manji od 8% (m/m), stoga suvi ekstrakti dobijeni bez dodavanja MD i uz dodavanje MD u koncentraciji od 20% na ulaznoj temperaturi od 120°C (ekstrakt sa najvećim sadržajem vlage), mogu se smatrati proizvodima neadekvatnih svojstava. Značajna razlika u sadržaju vlage u ova dva suva ekstrakta nije postojala, zbog čega se može zaključiti da dodatak MD do koncentracije od 20% nema značajan uticaj na sadržaj vlage suvog ekstrakta, ukoliko je ulazna temperatura podešena na 120 °C, u slučaju ovog tečnog ekstrakta. Sa dodatkom MD u koncentraciji od 40%, na ulaznoj temperaturi sušenja od 120 °C, poboljšane su karakteristike suvog ekstrakta, s obzirom na to da je sadržaj vlage smanjen na 7,177%. Prema Phisut-u, sadržaj vlage u suvom ekstraktu u formi praha može se smanjiti povećanjem temperature

sušenja, zbog većeg temperaturnog gradijenta i bržeg prenosa toplote između proizvoda i vazduha za sušenje (Phisut, 2012). Zbog toga je postavljen još jedan eksperiment sa povišenom ulaznom temperaturom, od 140 °C, i njegov rezultat je bio suvi ekstrakt sa smanjenim sadržajem vlage (5,514%). Rezultati ukazuju na to da povećana ulazna temperatura i povećana koncentracija MD omogućavaju proizvodnju suvog ekstrakta sa smanjenim sadržajem vlage, odnosno utiču pozitivno na glavnu odliku kvaliteta ovakve forme proizvoda.

Higroskopnost se može definisati kao sposobnost hrane da apsorbuje vlagu iz okruženja visoke relativne vlažnosti. Biljni ekstrakti u formi praha, sušeni *spray drying*-om, su uglavnom higroskopni (Vladić i sar., 2016). Visoka higroskopnost biljnih ekstrakata pripisuje se prisustvu značajnih količina hidrofilnih jedinjenja, uključujući ugljene hidrate, glikozide, organske kiseline, fenole, amino kiseline, proteine, itd. (Chang i sar., 2014). Prema Vidović i sar. (2014), fizičke promene u suvim ekstraktima u formi praha, uključujući higroskopnost, pripisuju se Tg, stoga, što je veća Tg praha, niža je njegova higroskopnost. Higroskopnost ispitivanih suvih ekstrakata *A. uva-ursi* kretala se od 8,729 do 12,243%, pri čemu je najmanja higroskopnost detektovana u slučaju praha koji je dobijen primenom 40% MD. Uočeno je smanjenje higroskopnosti sa povećanjem koncentracije MD. Međutim, najveća dobijena higroskopnost izmerena je za prah proizveden sa 40% MD na temperaturi od 140 °C, što ukazuje na to da u kombinaciji povećana temperatura i povećani sadržaj MD mogu da utiču i obrnuto, dakle da dovedu do povećanja higroskopnosti praha.

Indeks rastvorljivosti vode (WSI) je važan parametar u karakterizaciji ekstrakata u formi praha, jer pokazuje sposobnost praha da se rastvori u vodi. Visoke vrednosti WSI su poželjne. Ovo je posebno važno ukoliko se suvi ekstrakti u formi praha koristi kao instant čaj ili kao sastojak instant čaja. Suprotno WSI, indeks apsorpcije vode (WAI) pokazuje sposobnost praha da apsorbuje vodu. U slučaju WAI, poželjne su niže vrednosti. U ispitivanim prahovima *A. uva-ursi* WAI je bio nizak za sve uzorke, najveća vrednost, 4,098%, je dobijena za prah proizveden bez dodavanja MD sa ulaznom temperaturom 120 °C, a najmanja, 2,195%, je izmerena u prahu dobijenim dodavanjem 40% MD sa ulaznom temperaturom od 140 °C. WSI je bio veliki za sve ispitivane uzorke. Najveća vrednost WSI, 90,360%, izmerena je za prah dobijen dodavanjem 40% MD sa ulaznom temperaturom od 120 °C, dok je najmanja, 77,943%, detektovana u prahu proizvedenom sa istom

koncentracijom MD, a na temperaturi 140 °C, baš kao što je to primećeno i u slučaju higroskopnosti.

Prema rezultatima iz tabele 20, rehidratacija *A. uva ursi* suvog ekstrakta u formi praha bila je brza, u rasponu od 14 do 35 sekundi. Ovo je posebno važno u slučaju ukoliko postoji namera da se prahovi koriste kao instant čaj ili kao komponenta u formulaciji instant čaja. Prah dobijen dodatkom MD u koncentraciji od 40%, proizveden na većoj ulaznoj temperaturi (140 °C), pokazao je sporu rehidrataciju, što bi moglo biti povezano sa najnižom WSI vrednošću koja je detektovana prethodno u ovom uzorku.

Nasipna zapremina je izražena kao g praha po 1 mL, i kretala se u opsegu od 0,186 g/mL do 0,281 mg/mL. Najveća, 0,281 g/mL, izmerena je u suvom ekstraktu u formi praha koji je dobijen dodatkom MD u koncentraciji od 40% sa ulaznom temperaturom od 140 °C. Najmanja (0,186 g/mL) je izmerena u prahu dobijenom sa ulaznom temperaturom od 120 °C, bez dodavanja MD.

Tabela 21. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja, antioksidativna aktivnost i reduktivni kapacitet suvih ekstrakata *A. uva-ursi* dobijenih primenom *spray drying* tehnike

Suvi ekstrakt u formi praha	UF (mg EGK/g)	UFI (mg EK/g)	IC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)
Proizveden bez MD na 120 °C	240,77	20,75	3,50	26,98
Proizveden uz dodatak 20% MD na 120 °C	171,52	15,24	4,02	32,68
Proizveden uz dodatak 40% MD na 120 °C	119,11	10,43	6,44	41,82
Proizveden uz dodatak 40% MD na 140 °C	168,09	16,49	3,72	42,00

Sadržaj bioaktivnih jedinjenja, UF i UFI, u dobijenim *A. uva-ursi* suvim ekstraktima u formi praha je određen primenom standardnih spektrofotometrijskih metoda. Sadržaj UF je izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline po 1 g praha, dok je sadržaj UFI izražen kao mg ekvivalenta katehina po g praha (tabela 21). Najveći sadržaj UF, 240,77 mg/g, izmeren je u suvom ekstraktu u formi praha koji je dobijen bez dodatka MD (ulazna temperatura 120°C). Slično tome, najveći

sadržaj UFI detektovan je u prahu koji je proizveden pri istim procesnim uslovima. Najmanji sadržaj UF i UFI je izmeren u suvom ekstraktu u formi praha koji je proizveden uz dodatak 40% MD, sa ulaznom temperaturom od 120 °C. Može se pretpostaviti da je u slučaju sušenja na temperaturi od 120 °C uzrok ovome najveća koncentracije MD primenjena za proizvodnju ekstrakta. Slični rezultati su dobijeni i u studiji o proizvodnji suvih ekstrakata u formi praha iz tečnog ekstrakta *A. millefolium* (Vladić i sar., 2016). Činjenica da je pri istoj koncentraciji MD, ali pri povišenoj ulaznoj temperaturi (140 °C) dobijen veći sadržaj UF i UFI, ukazuje na veću efikasnost sušenja na ovoj temperaturi procesa, odnosno na brže formiranje zaštitnog omotača oko bioaktivnih jedinjenja, što sprečava termalnu degradaciju osetljivih fenola i flavonoida.

Antioksidativna svojstva dobijenih *A. uva-ursi* ekstrakata u formi praha su analizirana primenom DPPH testa i vrednosti IC₅₀. Svi prahovi su pokazali veoma visok antioksidativni kapacitet, obzirom na to da je vrednost IC₅₀ bila u rasponu od 3,50 do 6,44 µg/mL (tabela 21). Najveća antioksidativna aktivnost detektovana je u suvom ekstraktu koji je dobijen bez dodatka MD, što je u skladu sa najvećim sadržajem UF i UFI detektovanim u ovom prahu. Najmanja antioksidativna aktivnost je izmerena u suvom ekstraktu koji je proizveden uz dodatak MD u koncentraciji od 40% i ulaznoj temperaturi od 120 °C, što je u skladu sa najmanjom koncentracijom UF i UFI u ovom prahu.

Rezultati koji se odnose na reduktivni kapacitet (tabela 21), izraženu kao vrednost EC₅₀, u suvom ekstraktu *A. uva-ursi* u formi praha, pokazali su da je najniža EC₅₀ vrednost, odnosno najveća redukciona moć, 26,98 mg/mL, dobijena u slučaju praha koji je proizveden bez dodatka MD na ulaznoj temperaturi od 120 °C. Ovo je očekivano, obzirom na to da je u istom prahu izmeren najveći sadržaj UF i UFI, a isti prah je pokazao i najveću antioksidativnu aktivnost u DPPH testu.

5.5. Predlog novih proizvoda na bazi ekstrakata od biljne prašine *A. uva-ursi*

Ekstrakti dobijeni različitim tehnikama ekstrakcije iz biljne prašine *A. uva-ursi* mogu se primeniti, u zavisnosti od koncentracije dominantnih bioaktivnih jedinjenja, za proizvodnju novih ili unapređenih dijetetskih suplemenata i/ili funkcionalnih proizvoda, u tečnoj ili čvrstoj formi.

Tečni biljni ekstrakti jesu preparati dobijeni iz lekovitog bilja primenom odgovarajuće ekstrakcione tehnike, odnosno postupka ekstrakcije, i odgovarajućeg rastvarača, odnosno ekstragensa. Prema Pravilniku o zdravstvenoj bezbednosti dijetetskih proizvoda tečni biljni ekstrakti mogu biti komponente, odnosno nosioci hranljivog ili fiziološkog dejstva određenog dijetetskog suplementa. Tečni biljni ekstrakti danas su najčešće komponente dijetetskih suplemenata koji se na tržište plasiraju pod nazivom biljne kapi, tinkture i sirupi (Vidović i Vladić, 2017).

Tečni ekstrakt biljne prašine *A. uva-ursi* koji je dobijen primenom CE i 70% etanola kao ekstragensa, ili UAE i 70% etanola kao ekstragensa, s obzirom na visoku koncentraciju arbutina i potvrđeno antibakterijsko delovanje ovog hidrohina, može se primeniti kao komponenta tinkture ili biljnih kapi koje bi imale primenu za održavanje normalnog funkcionisanja urinarnog trakta.

Tečni ekstrakt biljne prašine *A. uva-ursi* koji je dobijen primenom SWE na uslovima optimalnim prema svim posmatranim odzivima, može se primeniti kao tinktura ili komponenta biljnih kapi koje bi imale primenu za održavanje normalnog funkcionisanja urinarnog trakta, ali i kao prirodan antioksidant, obzirom na visoku koncentraciju i arbutina i galne kiseline. Prema već prethodno navedenom, galna kiselina, kao prirodni antioksidant, pokazuje značajne inhibitorne efekte na proliferaciju ćelija, indukuje apoptozu u nizu ćelijskih linija karcinoma i pokazuje selektivnu citotoksičnost na tumorske ćelije sa većom osetljivošću u odnosu na normalne ćelije (Faried i sar., 2007).

Za proizvodnju biljnih kapi ili tinkture koji bi se primenili za normalno funkcionisanje kardiovaskularnog sistema, normalno funkcionisanje urinarnog trakta, ali i kao preparati sa visokom koncentracijom prirodnih antioksidanata, mogli bi se primeniti tečni ekstrakti biljne

prašine *A. uva-ursi* koji su dobijeni primenom UAE i 70% etanola kao ekstragensa, obzirom na visoku koncentraciju hiperozida i arbutina. Kao što je prethodno navedeno, hiperozid, kao značajno bioaktivno jedinjenje, poseduje između ostalog antivirusno, antiinflamatorno, kardioprotektivno i hepatoprotektivno delovanje.

5.5.1. Priprema i analiza granulata koji sadrži suvi ekstrakt *A. uva-ursi* u formi praha

Suvi ekstrakt biljne prašine *A. uva-ursi* može se primeniti kao takav za proizvodnju instant čaja koji bi imao primenu za normalno funkcionisanje urinarnog trakta. Međutim, najčešće je, s obzirom na neodgovarajući ukus suvog ekstrakta u formi praha i potrebnu korekciju određenih fizičkih karakteristika, ipak potrebno proizvesti granulat na bazi suvog ekstrakta i takav proizvod dalje koristiti u formi instant čaja.

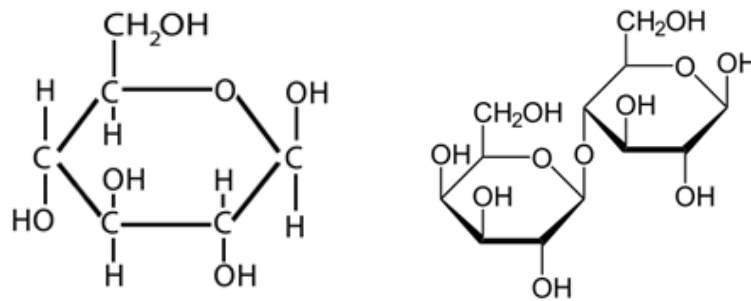
Ukus je jedna od najbitnijih karakteristika gotovih proizvoda poput instant čaja. Instant čaj mora biti prijatnog ukusa kako bi bio prihvatljiv od strane krajnjeg korisnika-potrošača. S obzirom na to da su biljni ekstrakti, koji predstavljaju osnovu instant čaja, veoma često neprijatnog ukusa, korekcija ukusa, između ostalog, može se postići odabirom odgovarajućeg šećera, koji u instant čaju može imati ulogu punioca (eng. *filler*), ali i zaslađivača. Međutim, kako su fizičke karakteristike svake pojedinačne pomoćne komponente (ekscipijenta) različite, udeo svake od njih u konačnoj formulaciji značajno će uticati na fizičke karakteristike kreiranog novog proizvoda. Upravo iz ovog razloga ispitana je prihvatljivost 6 različitih formulacija granulata sa suvim ekstraktom *A. uva-ursi*, gde su formulacije pripremljene sa dva različita šećera (dekstroza i laktoza) u funkciji punioca i zaslađivača, u različitim koncentracijama.

Granulati su pripremljeni prema formulacijama datim u tabeli 10, u Eksperimentalnom delu. Pripremljeni su postupkom vlažne granulacije u kome je rastvor skroba primenjen kao vezivno sredstvo. Zapremina rastvora vezivnog sredstva dodata na 25 g mešavine komponenti formulacije iznosila je 2 mL. Eksperimentalno je potvrđeno da je ovo maksimalna zapremina rastvora vezivnog sredstva koja može biti primenjena u ovakvoj formulaciji. Izgled smeše nakon dodatka vezivnog sredstva i nakon granuliranja prikazani su na slici 21.



Slika 21. Izgled smeše nakon dodatka vezivnog sredstva i nakon granuliranja

Dva šećera primenjena u formulacijama razlikuju se po svojim senzornim i fizičkim karakteristikama. Dekstroza je šećer koji se dobija hidrolizom skroba. „Slatkoća“ dekstroze iznosi 70% saharoze. Ona je na tržištu dostupna kao anhidrat (koji je higroskopne prirode) i kao monohidrat. Laktoza je monosaharid proizveden iz surutke. Slatkoća laktoze je mnogo manja od dekstroze i iznosi 15% saharoze, zbog čega se ona češće primenjuje u kombinaciji sa drugim šećerima ili zaslađivačima (Vidović i Vladić, 2017; Jyoti Dahiya i sar., 2015). Strukturne formule ova dva šećera prikazane su na slici 22.



Dekstroza

Laktoza

Slika 22. Strukturne formule dekstroze i laktoze

Fizičke karakteristike koje mogu uticati na primenu granulata za proizvodnju instant čaja su:

- Zapreminska masa, jer utiče na pojedinačno punjenje kesice/pojedinačnu dozu instant čaja;
- Sadržaj vlage, koji mora biti u odgovarajućem opsegu da bi proizvod bio stabilan;
- Higroskopnost, koja mora biti niska. Povećana higroskopnost dovodi do povećanja sadržaja vlage u proizvodu, gubitka strukture proizvoda i smanjene stabilnosti;
- Rehidracija, koja treba da bude što kraća, obzirom da instant čaj treba da bude proizvod koji je brzo rastvorljiv u vodi.

Nasipna zapremina je utvrđena za prah, ekscipijente i pripremljene formulacije. Prema dobijenim rezultatima najveća nasipna zapremina je dobijena za dekstrozu (645,1 mg/mL), dok je najmanja bila nasipna zapremina suvog ekstrakta u formi praha *A. uva-ursi* (250,0 mg/mL). Za pripremljene formulacije nasipna zapremina je bila u opsegu od 401 do 443,5 mg/mL. S obzirom na to da se instant čajevi u pojedinačnim dozama plasiraju na tržište uglavnom u formi od oko 2,5 g instant čaja po jednoj kesici, minimalna zapremina kesice u koju bi se mogli pakovati dobijeni granulati iznosila bi 5,64 mL (za formulaciju zapreminske mase od 437 mg/mL), odnosno 6,23 mL (za formulaciju zapreminske mase od 401 mg/mL).

Tabela 22. Nasipna zapremina praškova, ekscipijenata i pripremljenih formulacija

Naziv komponente/formulacije	Zapreminska masa (mg/mL)
Suvi ekstrakt uve	250,0
Laktoza	592,0
Dekstroza	645,1
Kukuruzni skrob	538,0
Formulacija I	402,5
Formulacija II	414,2
Formulacija III	424,3
Formulacija IV	401,0
Formulacija V	416,0
Formulacija VI	443,5

Prema Pravilniku o kvalitetu čaja, biljnog čaja i njihovih proizvoda, član 13, sadržaj vlage u instant čaju ne sme da bude veći od 8%. Ovo je kriterijum koji se može primeniti i za granulate koji će biti upotrebljeni za proizvodnju instant čaja. Prema rezultatima koji su predstavljeni u tabeli 23, sadržaj vlage u pripremljenim granulatima kretao se od 3,95 do 11,45%. Na osnovu uslova u Pravilniku o kvalitetu čaja, biljnog čaja i njihovih proizvoda, može se smatrati da su samo 3 formulacije adekvatnog kvaliteta (granulati pripremljeni prema formulacijama III, IV i V). Za sve ostale sadržaj vlage je bio veći od 8%. Pored toga, može se uočiti da su oba granulata pripremljena prema formulaciji gde je laktoza primenjena kao jedini šećer (sredstvo za dopunjavanje i zaslađivač) imala mali sadržaj vlage, te se može smatrati da su najboljeg kvaliteta što se tiče ovog fizičkog parametra.

Tabela 23. Sadržaj vlage u dobijenim granulatima

Naziv formulacije	Sadržaj vlage (%)
Formulacija I	10,55
Formulacija II	11,45
Formulacija III	3,95
Formulacija IV	5,23
Formulacija V	7,41
Formulacija VI	9,01

Higroskopnost predstavlja procenat absorbovane vode od strane određenog proizvoda, u određenom vremenskom periodu. Manja higroskopnost implicira veću stabilnost analiziranog proizvoda. Higroskopnost dobijenih granulata je merena nakon 7 dana. Bila je mala za sve analizirane uzorke (tabela 24). Mala higroskopnost se zahteva za sve proizvode ove vrste, stoga se, što se tiče ove fizičke karakteristike, može zaključiti da se svih šest formulacija mogu primeniti u proizvodnji instant čaja. Prema dobijenim rezultatima, higroskopnost se kretala od 2,06%, detektovane u granulatu koji je pripremljen prema formulaciji III, do 6,37%, detektovane u granulatu pripremljenom prema formulaciji VI. Pored toga, primećeno je da sa povećanom

koncentracijom *A. uva-ursi* praha u formulaciji granulata, raste i higroskopsnost. Zbog toga se može pretpostaviti da *A. uva-ursi* prah dominantno utiče na higroskopsnost formulacije.

Tabela 24. Higroskopsnost granulata

Naziv formulacije	Higroskopsnost nakon 7 dana (%)
Formulacija I	2,87
Formulacija II	6,17
Formulacija III	2,06
Formulacija IV	3,78
Formulacija V	2,90
Formulacija VI	6,37

Tabela 25. Rehidracija granulata

Naziv formulacije	Vreme rehidracije (s)
Formulacija I	15,20
Formulacija II	14,45
Formulacija III	14,84
Formulacija IV	12,31
Formulacija V	11,67
Formulacija VI	19,90

Rehidracija je bila brza u slučaju svih dobijenih granulata (tabela 25), stoga, što se tiče ove fizičke karakteristike, svi ispitivani granulati mogu biti primenjeni za proizvodnju instant čajeva kod kojih se zahteva brza rehidracija. Prema rezultatima, rehidracija je bila ispod 20 s i kretala se od 11,64 s, kod granulata koji je pripremljen prema formulaciji V, do 19,90 s, izmerene kod granulata koji je pripremljen prema formulaciji VI.

6. ZAKLJUČCI

Biljna prašina *A. uva-ursi*, generisana kao sporedni proizvod fabrike filter čaja, predstavlja vrednu sirovinu koja može biti osnova za izolovanje vrednih bioaktivnih jedinjenja ili za proizvodnju novih biljnih preparata ili funkcionalnih proizvoda.

U tečnim ekstraktima dobijenim primenom vode i smeše etanola i vode kao ekstragensa dominantna bioaktivna jedinjenja su fenoli. Tri najznačajnija jedinjenja ovog tipa, prisutna u gotovo svim tečnim ekstraktima dobijenim različitim tehnikama ekstrakcije i različitim ekstragensima, su arbutin, galna kiselina i hiperozid.

U ekstraktima dobijenim iz biljnog praha *A. uva-ursi* primenom klasične ekstrakcije, arbutin je bio dominantan u ekstraktu koji je dobijen primenom 70% etanola, galna kiselina u ekstraktu dobijenom primenom vode, a hiperozid u ekstraktu dobijenom primenom 50% etanola kao rastvarača. Takođe, sva tri flavonoidna jedinjenja (rutin, hiperozid i izokvercitrin) su najefikasnije ekstrahovana primenom 50% etanola kao rastvarača. U slučaju arbutina, primećena je povećana efikasnost ekstrakcije sa povećanom koncentracijom etanola u rastvaraču, dok kod galne kiseline povećana ekstrakcija zahteva smanjenje udela etanola u rastvaraču.

U procesu CE 70% etanol je pokazao dobre karakteristike za ekstrakciju UF i UFI, bez značajne razlike u poređenju sa 50% etanolom. Pored toga, ovo je i rastvarač prvog izbora za ekstrakciju arbutina, najvažnijeg bioaktivnog jedinjenja *A. uva-ursi*. Zbog toga se 70% etanol može izabrati kao najpogodniji rastvarač za proizvodnju ekstrakata *A. uva-ursi* sa visokom koncentracijom fenolnih jedinjenja, naročito arbutina.

Primena UAE je za rezultat imala gotovo udvostručeni prinos ekstrakcije u poređenju sa rezultatima dobijenim primenom CE, gde je 70% etanol korišćen kao rastvarač. Rezultati dobijeni primenom UAE ukazuju na to da se primenom ove tehnike ekstrakcije može ostvariti prinos ekstrakcije UFI gotovo dvostruko veći u poređenju sa prinosom koji se ostvaruje primenom CE na sobnoj temperaturi tokom 24 sata.

U slučaju hiperozida i rutina, primena ultrazvuka u kombinaciji sa većom temperaturom rezultirala je efikasnijom ekstrakcijom, u poređenju sa CE na sobnoj temperaturi, obzirom na to da je koncentracija ovih jedinjenja u ekstraktima bila približno udvostručena.

Tečni ekstrakt biljne prašine *A. uva-ursi* koji je dobijen primenom CE i 70% etanola kao ekstragensa, ili UAE i 70% etanola kao ekstragensa, s obzirom na visoku koncentraciju arbutina i potvrđeno antibakterijsko delovanje ovog hidrohina, može se primeniti kao komponenta tinkture ili biljnih kapi koje bi imale primenu za održavanje normalnog funkcionisanja urinarnog trakta.

U SWE primenom povećanog pritiska i temperature dolazi do transformacije vode u subkritično stanje u kome voda postaje efikasniji ekstragens fenolnih jedinjenja čak i u poređenju sa vodenim rastvorom etanola koji je primenjen u CE, i koji je dao najbolje rezultate u pogledu ovih karakteristika. U poređenju sa UAE, kada je primenjen 70% etanol kao rastvarač, SWE je pokazala manju efikasnost za ekstrakciju UF i UFl jedinjenja, što se može objasniti mogućom degradacijom određenih jedinjenja, indukovanom visokim temperaturama ekstrakcije primenjenim u procesu SWE.

Dominantni uticaj temperature na ekstrakciju UF iz biljnog praha *A. uva-ursi* potvrđen je matematičkom analizom eksperimentalnih rezultata. Povećanje prinosa ekstrakcije UF uočeno je do temperature od oko 170 °C. Najveći prinos ekstrakcije UF postiže se primenom kraćeg vremena ekstrakcije (10 min), na temperaturi od 170 °C. Pretpostavka je da se smanjenje ekstrakcije UF na temperaturama većim od 170 °C može pripisati degradaciji drugih termosenzitivnih fenola, prisutnih u ispitivanom materijalu. Nasuprot dominantnom efektu temperature u slučaju ekstrakcije UF, dominantan procesni parametar koji utiče na prinos ekstrakcije UFl iz biljnog praha *A. uva-ursi* je dodatak kiseline.

Primenom RSM i optimizacije višestrukih odziva, u ispitivanom eksperimentalnom domenu, utvrđeni su optimalni procesni parametri za SWE biljnog praha *A. uva-ursi*: temperatura od 151,2 °C, vreme ekstrakcije od 10 min i dodatak 1,5% HCl.

Rezultati HPLC analize kvantitativnog sadržaja ukazuju da su rutin, hiperozid i izokvercetin osetljivi na ekstremne uslove, pre svega temperature, koji se primenjuju u SWE,

zbog čega dolazi do njihove degradacije ukoliko se primeni ova tehnika ekstrakcije za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz biljne prašine *A. uva-ursi*.

U poređenju sa UAE gde je primenjen 70% etanol kao rastvarač, SWE je rezultirala proizvodnjom ekstrakata sa uporedivom koncentracijom arbutina, ali sa više od 10 puta većom koncentracijom galne kiseline. Dakle, može se zaključiti da je SWE tehnika koju treba primeniti za proizvodnju ekstrakata *A. uva-ursi* sa visokom koncentracijom arbutina i visokom koncentracijom galne kiseline. Primenom CE ili UAE procesa, proizvodnju ekstrakta sa ovako visokom koncentracijom oba fenolna jedinjenja nije bilo moguće postići.

U tečnoj formi, tečni ekstrakt biljne prašine *A. uva-ursi* koji je dobijen primenom SWE na uslovima optimalnim prema svim posmatranim odzivima, može se primeniti kao tinktura ili komponenta biljnih kapi koje bi imale primenu za održavanje normalnog funkcionisanja urinarnog trakta, ali i kao prirodni antioksidant, s obzirom na visoku koncentraciju i arbutina i galne kiseline.

Primenom *spray drying* tehnike tečni ekstrakt biljne prašine *A. uva-ursi* uspešno je transformisan u suvi ekstrakt praškaste forme, i kao takav primenjen za proizvodnju granulata koji može biti primenjen u formi instant čaja, čija bi upotreba bila za normalno funkcionisanje urinarnog trakata, ali i kao prirodnog izvora antioksidanata.

7. LITERATURA

Adotey, J. P. K., Adukpo, G. E., Opoku Boahen, Y., & Armah, F. A. (2012). A review of the ethnobotany and pharmacological importance of *Alstonia boonei* De Wild (Apocynaceae). *ISRN pharmacology*, 2012, 587160-587160.

Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., Dehghani, F. (2012). Extraction of antioxidants from winery using subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 65: 18-24.

Alothman, M., Bhat, R., & Karim, A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785-788.

Alsaif, M. A. (2009). Beneficial effects of rutin and vitamin C coadministration in a streptozotocin-induced diabetes rat model of kidney nephrotoxicity. *Pak. J. Nutr*, 8(6), 745-754.

Amarowicz, R., Barl, B., & Pegg, R. B. (1999). Potential natural antioxidants from Saskatchewan indigenous plants. *Journal of Food Lipids*, 6(4), 317-329.

Andersen, O. M., & Markham, K. R. (Eds.). (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC press.

Angel R.C.M., Espinosa-Muñoz L.C., Aviles-Aviles C., González-García R., Moscosa-Santillán M., Grajales-Lagunes A., Abud-Archila M. (2009). Spray-drying of passion fruit juice using lactose maltodextrin blends as the support material. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 1011-1018.

Anurukvorakun, O. (2012). Subcritical Water for the Extraction of Flavonoids. วารสาร วิจัย ราชภัฏ พระนคร สาขา วิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยี (PHRANAKHON RAJABHAT RESEARCH JOURNAL SCIENCE AND TECHNOLOGY), 7(1), 1-9.

Arapitsas, P., & Turner, C. (2008). Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. *Talanta*, 74(5), 1218-1223.

Asl, A. H., & Khajenoori, M. (2013). Subcritical water extraction. In *Mass Transfer-Advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling*. InTech.

Assaf, M. H., Ali, A. A., Makboul, M. A., Beck, J. P., & Anton, R. (1986). Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum majorana*, quantitative estimation of arbutin; cytotoxic activity of hydroquinone. *Planta medica*, 53(04), 343-345.

Avato, P., Bucci, R., Tava, A., Vitali, C., Rosato, A., Bialy, Z., & Jurzysta, M. (2006). Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure-activity relationship. *Phytotherapy Research*, 20(6), 454-457.

Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(23), 6657-6662.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul. M. H. A., Ghafoor. K, Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.

Baker, C. G. (Ed.). (1997). Industrial drying of foods. *Springer Science & Business Media*.

Bankar S.K., Chaudhari A.V., Mahale N.B. Chaudhari S.R. (2014) A review on orodispersible tablets prepared using spray dried sustained release microparticles. *Journal of Advanced Drug Delivery*, 1, 82-95.

Baumgertel, A., Grimm, R., Eisenbeiß, W., & Kreis, W. (2003). Purification and characterization of a flavonol 3-O- β -heterodisaccharidase from the dried herb of *Fagopyrum esculentum* Moench. *Phytochemistry*, 64(2), 411-418.

Beaux, D., Fleurentin, J., & Mortier, F. (1999). Effect of extracts of *Orthosiphon stamineus* benth, *Hieracium pilosella* L., *Sambucus nigra* L. and *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) spreng. in rats. *Phytotherapy Research*, 13(3), 222-225.

- Bhandari B. R., Datta N., Crooks R., Howes T., Rigby S. (1997b). A semi-empirical approach to optimise the quantity of drying aids required to spray dry sugar-rich foods. *Drying Technology*, 15, 2509-2525.
- Bhandari B. R., Datta N., Howes T. (1997a). Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying Technology*, 15, 671-684.
- Bhandari B. R., Hartel R. W. (2005). Phase transitions during food powder production and powder stability. in: C. Onwulata (Ed.), *Encapsulated and powdered foods*, Taylor and Francis, Boca Raton, USA, 261–292.
- Bhandari B. R., Howes T. (1999). Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, 40, 71-79.
- Bhandari B. R., Senoussi A., Dumoulin E. D., Lebert A. (1993). Spray drying of concentrated fruit juices. *Drying Technology*, 11, 1081-1092.
- Blaut, M., Braune, A., Wunderlich, S., Sauer, P., Schneider, H., & Glatt, H. (2006). Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. *Food and chemical toxicology*, 44(11), 1940-1947.
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longo, L., Rescio, L. Trifone, S. & Vasapollo, G. (2008). An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*, 64(2), 192-197.
- Broadhead J., Edmond Rouan S. K., Rhodes C. T. (1992) The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18, 1169-1206.
- Brunner, G. (2014). *Hydrothermal and supercritical water processes* (Vol. 5). Elsevier.
- Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S., & Kroh, L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(21), 3229-3235.
- Budrat, P. & Shotipruk, A. (2009). Enhanced recovery of phenolic compounds from bitter melon (*Momordica charantia*) by subcritical water extraction. *Separation and Purification Technology*, 66(1), 125-129.

- Bulduk, I., Sahin, M. D. & Sanli, S. (2016). Arbutin analysis in leaves, fruit and branches of *Pyrus anatolica*, method optimization. *Eurasian J. Anal. Chem.*, 11, 233-244.
- Cacace J. E. & Mazza G. Pressurized low polarity water extraction of biologically active compounds from plant products. In *Functional Food Ingredient and Nutraceuticals: Processing Technologies*; Shi J. ed; Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, 135-155, 2007.
- Caffarena, E. R., & Grigera, J. R. (2004). On the hydrogen bond structure of water at different densities. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 342(1-2), 34-39.
- Cai, Y. Z., & Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments. *Journal of food science*, 65(7), 1248-1252.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17), 2157-2184.
- Cal K., Sollohub K. (2010). Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 575-586.
- Caliskan G., Dirim S.N. (2016). The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder Technology*, 287, 308-314.
- Capelo-Martinez, J. L. (2009). *Ultrasound in chemistry: analytical applications*. John Wiley & Sons.
- Cardenas-Toro, F. P., Forster-Carneiro, T., Rostagno, M. A., Petenate, A. J., Maugeri Filho, F., & Meireles, M. A. A. (2014). Integrated supercritical fluid extraction and subcritical water hydrolysis for the recovery of bioactive compounds from pressed palm fiber. *The Journal of Supercritical Fluids*, 93, 42-48.
- Carr, A. G., Mammucari, R., & Foster, N. R. (2011). A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 172(1), 1-17.

Cervenka, L., Peskova, I., Foltynova, E., Pejchalova, M., Brozkova, I., & Vytrasova, J. (2006). Inhibitory effects of some spice and herb extracts against *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, and *A. skirrowii*. *Current microbiology*, 53(5), 435-439.

Ćetković G. (2009). Hemija prirodnih proizvoda, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.

Chandler, K., Deng, F., Dillow, A. K., Liotta, C. L., & Eckert, C. A. (1997). Alkylation reactions in near-critical water in the absence of acid catalysts. *Industrial & engineering chemistry research*, 36(12), 5175-5179.

Chang, Y. X., Yang, J. J., Pan, R. L., Chang, Q., & Liao, Y. H. (2014). Anti-hygroscopic effect of leucine on spray-dried herbal extract powders. *Powder Technology*, 266, 388-395.

Chao, Z., Ri-fu, Y., & Tai-qiu, Q. (2013). Ultrasound-enhanced subcritical water extraction of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. *Separation and Purification Technology*, 120, 141-147.

Charpe, T. W., & Rathod, V. K. (2014). Effect of Ethanol Concentration in Ultrasound Assisted Extraction of Glycyrrhizic Acid from Licorice Root. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 11(4), 21-30.

Chauhan, B., Yu, C., Krantis, A., Scott, I., Arnason, J. T., Marles, R. J., & Foster, B. C. (2007). *In vitro* activity of uva-ursi against cytochrome P450 isoenzymes and P-glycoprotein. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 85(11), 1099-1107.

Chavez B. E., Ledebor A. M. (2007). Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*, 25 , 1193–1201.

Cheigh, C. I., Chung, E. Y., & Chung, M. S. (2012). Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 472-477.

Cheigh, C. I., Yoo, S. Y., Ko, M. J., Chang, P. S., & Chung, M. S. (2015). Extraction characteristics of subcritical water depending on the number of hydroxyl group in flavonols. *Food chemistry*, 168, 21-26.

- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540-560.
- Chemat, S., Lagha, A., AitAmar, H., Bartels, P. V., & Chemat, F. (2004). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, *19*(3), 188-195.
- Chen, H. M., Fu, X., & Luo, Z. G. (2015). Properties and extraction of pectin-enriched materials from sugar beet pulp by ultrasonic-assisted treatment combined with subcritical water. *Food chemistry*, *168*, 302-310.
- Chen, Z. W., Ma, C. G., & Xu, S. Y. (1989). Mechanism of analgesic action of hyperin. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*, *24*(5), 326-330.
- Cheuyglintase K. (2009). Spray drying of fruit juice with vegetable fibre as a carrier. University of Canterbury, Christchurch, New Zealand, URL: <http://hdl.handle.net/10092/3101>.
- Chumsri, P., Sirichote, A., & Itharat, A. (2008). Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *30*(1), 133-9.
- Commission E: Monograph. *A. uva-ursi*. German Federal Gazette (Bundesanzeiger) Nr. 109, Cologne 15.06.1994.
- Corrigan O. I. (1995). Thermal analysis of spray dried products. *Thermochimica Acta*, *248*, 245-258.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, *15*(10), 7313-7352.
- Danila, A. M., Kotani, A., Hakamata, H., & Kusu, F. (2007). Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moench by micro-high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(4), 1139-1143.

- Dash, K., Thangavel, S., Krishnamurthy, N. V., Rao, S. V., Karunasagar, D., & Arunachalam, J. (2005). Ultrasound-assisted analyte extraction for the determination of sulfate and elemental sulfur in zinc sulfide by different liquid chromatography techniques. *Analyst*, 130(4), 498-501.
- de Arriba, S. G., Naser, B., & Nolte, K. U. (2013). Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos Uva-ursi* folium herbal preparations. *International journal of toxicology*, 32(6), 442-453.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Elez Garofulić, I., Bosiljkov, T., Ježek, D., & Brnčić, M. (2015). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 29(3), 475-484.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnić, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51, 84–91.
- Dias, A. L. B., Sergio, C. S. A., Santos, P., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2017). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L.): Effects on the vegetable matrix and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 198, 36-44.
- Dingermann T. Hiller K. Zündorf I. Schneider G. (2004). *Arzneidrogen* 5. Auflage. Elsevier Spekt Akadem Verlag
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.
- Dong, J., Liu, Y., Liang, Z., & Wang, W. (2010). Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), 61-65.

Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., & Perry, N. B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry*, *101*(4), 1417-1424.

EMA/HMPC/159076/2014. Assessment report on *Crataegus spp.*, folium cum flore, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2014.

EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1. Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2012.

Espín, J. C., Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(3), 648-656.

European Pharmacopoeia. 6th ed., 2008.

Evans, W. (2009). Pharmacognosy 16th Edition. Saunders Elsevier, Edinburg, London, NY, St Louis, Sidney, Toronto.

Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, *18*(10), 872-879.

Fariied, A., Kurnia, D., Fariied, L. S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., & Kuwano, H. (2007). Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *International journal of oncology*, *30*(3), 605-613.

Ferlemi, A. V., & Lamari, F. N. (2016). Berry leaves: an alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants*, *5*(2), 17.

Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., & de la Ossa, E. M. (2012). Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green technologies. *The Journal of Supercritical Fluids*, *72*, 168-175.

Fernandez-Prini, R. (1991). High-temperature aqueous solutions: thermodynamic properties. CRC Press.

Filkova I., Huang L.X., Mujumdar A.S. (2006). Industrial spray drying systems. In A. S. Mujumdar(Ed.), Handbook of Industrial Drying, 3rd ed. CRC Press, pp. 215-256.

- Fogler B.B., Kleninschmidt R.V. (1938). Spray drying. *Industrial & Engineering Chemistry*, 30,1372-1384.
- Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., & Marques, M. P. M. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal research reviews*, 26(6), 747-766.
- Frohne, D. V. (1970). UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE DER HARNDDESINFIZIERENDEN WIRKUNGEN VON BÄRENTAUBENBLATT-EXTRAKTEN1. *Planta Medica*, 18(01), 1-25.
- Gamiz-Gracia, L., & De Castro, M. L. (2000). Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*, 51(6), 1179-1185.
- de Arriba, S. G., Stammwitz, U., Pickartz, S., Goclik, V., Bodinet, C., & Nolte, K. U. (2010). Änderungen des Urin-pH-Werts haben keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von *Uvae ursi folium*. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 31(02), 95-97.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988-4994
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- Ghoreishi, S. M., & Shahrestani, R. G. (2009). Subcritical water extraction of mannitol from olive leaves. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 474-481.
- Ghoreishi, S. M., Shahrestani, R. G., & Ghaziaskar, S. H. (2008). Subcritical water extraction of mannitol from olive leaves. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*, 2(7), 74-84.
- Glöckl, I., Blaschke, G., & Veit, M. (2001). Validated methods for direct determination of hydroquinone glucuronide and sulfate in human urine after oral intake of bearberry leaf extract by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 761(2), 261-266.

- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., & Palazón, J. (2013). Phenolic acids. In *Natural Products* (pp. 1951-1973). Springer Berlin Heidelberg.
- Gong, Y., Zhang, X., He, L., Yan, Q., Yuan, F., & Gao, Y. (2015). Optimization of subcritical water extraction parameters of antioxidant polyphenols from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) seed residue. *Journal of food science and technology*, 52(3), 1534-1542.
- Goula A.M., Adamopoulos K.G. (2003). Influence of spray drying conditions on tomato powder moisture. In: *Proceedings of the third international symposium of food rheology and structure, Zurich, Switzerland*.
- Goula A.M., Adamopoulos K.G. (2008). Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. Powder properties. *Drying Technology*, 26, 726-737.
- Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2005). Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. *Journal of Food Engineering*, 66(1), 35-42.
- Goula, A.M., Adamopoulos, K.G., 2010. A new technique for spray drying orange juice concentrate. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 342–351.
- Gribova, N. Y., Filippenko, T. A., Nikolaevskii, A. N., Khizhan, E. I., & Bobyleva, O. V. (2008). Effects of ultrasound on the extraction of antioxidants from bearberry (*Arctostaphylos adans*) leaves. *Pharmaceutical chemistry journal*, 42(10), 593-595.
- Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C, editors (2004). PDR for herbal medicines. 3rd ed. *Arctostaphylos uva-ursi*. Thomson PDR, Montvale.
- Haghighat Khajavi, S., Ota, S., Kimura, Y., & Adachi, S. (2006). Kinetics of maltooligosaccharide hydrolysis in subcritical water. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(10), 3663-3667.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950-988.
- Hanim, S. S., Norsyabilah, R., Suhaila, M. N., Noraishah, A., & Kartina, A. S. (2012). Effects of temperature, time and pressure on the hemicelluloses yield extracted using subcritical water extraction. *Procedia Engineering*, 42, 562-565.

Hänsel, R. Sticher, O. Steinegger, E. (1999). *Pharmakognosie-Phytopharmazie*. Springer Verlag Berlin.

Haque M.A., Timilsena Y.P., Adhikari B. (2015). Spray Drying. *Drying Technologies for Foods: Fundamentals & Applications*. Nema PK, Kaur, BP & Mujumdar, AS (Eds) New India Publishing Agency, India, 374.

Harborne, J.B. (1984). *Methods of Plant Analysis*, Springer, Netherlands, pp.1–36.

Harbourne, N., Marete, E., Christophe, J.J. & O’Riordan, D. (2013). Conventional extraction techniques for phytochemicals. *In Handbook of Plant Food Phytochemicals Sources, Stability and Extraction*.

He, L., Zhang, X., Xu, H., Xu, C., Yuan, F., Knez, Ž., Novak, Z., & Gao, Y. (2012). Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS+ assay. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 215-223.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.

Herbal Medicines. (2008). Uva-ursi. Pharmaceutical Press [electronic version]. Available at: www.medicinescomplete.com/mc/herbals/current/1000738619.htm.

Herrero, M., Castro-Puyana, M., Rocamora-Reverte, L., Ferragut, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2012). Formation and relevance of 5-hydroxymethylfurfural in bioactive subcritical water extracts from olive leaves. *Food research international*, 47(1), 31-37.

Horcajada-Molteni, M. N., Crespy, V., Coxam, V., Davicco, M. J., Rémésy, C., & Barlet, J. P. (2000). Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(11), 2251-2258.

Hu, Z. M., Zhou, Q., Lei, T. C., Ding, S. F., & Xu, S. Z. (2009). Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. *Journal of Dermatological Science*, 55(3), 179-184.

- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., & Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 62(1), 1-20.
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373(1-2), 23-30.
- I Ré, M. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying technology*, 16(6), 1195-1236.
- Ibanez, E., Kubátová, A., Señoráns, F. J., Cavero, S., Reglero, G., & Hawthorne, S. B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(2), 375-382.
- Ito, M., Shimura, H., Watanabe, N., Tamai, M., Hanada, K., Takahashi, A., Anaka, Y., Arai, I., Zhang, P.L., Rao, C. & Chen, W. M. (1990). Hepatorotective Compounds from *Canarium album* and *Euphorbia nematocypha*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 38(8), 2201-2203.
- Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A., & Speers, R. A. (1987). Anthocyanins as food colorants-a review. *Journal of food biochemistry*, 11(3), 201-247.
- Jafari S.M., Assadpoor E., Bhandari B., He Y. (2008). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International*, 41, 172-183.
- Jahodář, L., Jilek, P., Paktova, M., & Dvorakova, V. (1985). Antimikrobiální působení arbutinu a extraktu z listu medvědice léčive in vitro. *Ceskoslovenska Farmacie*, 34, 174-178.
- Jayasundera M., Adhikari B.P., Adhikari R., & Aldred P. (2010). The effect of food-grade lowmolecular-weight surfactants and sodium caseinate on spray drying of sugar-rich foods. *Food Biophysics*, 5, 128–137.
- Jeong, Y. J., Choi, Y. J., Kwon, H. M., Kang, S. W., Park, H. S., Lee, M., & Kang, Y. H. (2005). Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids. *British Journal of Nutrition*, 93(5), 581-591.
- Jessop, P. G., Jessop, D. A., Fu, D., & Phan, L. (2012). Solvatochromic parameters for solvents of interest in green chemistry. *Green Chemistry*, 14(5), 1245-1259.

Jo, E. K., Heo, D. J., Kim, J. H., Lee, Y. H., Ju, Y. C., & Lee, S. C. (2013). The effects of subcritical water treatment on antioxidant activity of golden oyster mushroom. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2555-2561.

Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5-23.

Johari, G. P., Hallbrucker, A., & Mayer, E. (1987). The glass-liquid transition of hyperquenched water. *Nature*, 330(6148), 552-553.

Ju, Z. Y., & Howard, L. R. (2003). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5207-5213.

Jyoti Dahiya, R., Jalwal, P. & Singh, B. (2015). "Chewable Tablets: A Comprehensive Review." *PharmaInnov J* 4: 100-105.

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.

Kammerer, D., Claus, A., Schieber, A., & Carle, R. (2005). A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science*, 70(2), C157-C163.

Karamac, M., Kosińska, A., & Pegg, R. B. (2006). Content of gallic acid in selected plant extracts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 15(1), 55-58.

Kedzia, B., Wrociński, T., Mrugasiewicz, K., Gorecki, P., & Grzewińska, H. (1975). Antibacterial action of urine containing products of arbutin metabolism. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, 27(3), 305-314.

Keinanen, M. (1993). Comparison of methods for the extraction of flavonoids from birch leaves (*Betula pendula* Roth.) carried out using high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 41(11), 1986-1990.

- Khajenoori, M., Asl, A. H., Hormozi, F., Eikani, M. H., & Bidgoli, H. N. (2009). Subcritical water extraction of essential oils from *Zataria multiflora* Boiss. *Journal of food process engineering*, 32(6), 804-816.
- Khonkarn, R., Okonogi, S., Ampasavate, C., & Anuchapreeda, S. (2010). Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2122-2129.
- Khuwijitjaru, P., Pokpong, A., Klinchongkon, K., & Adachi, S. (2014). Production of oligosaccharides from coconut meal by subcritical water treatment. *International journal of food science & technology*, 49(8), 1946-1952.
- Kim, J. W., Nagaoka, T., Ishida, Y., Hasegawa, T., Kitagawa, K., & Lee, S. C. (2009). Subcritical water extraction of nutraceutical compounds from citrus pomaces. *Separation Science and Technology*, 44(11), 2598-2608.
- Kim, W. J., Kim, J., Veriansyah, B., Kim, J. D., Lee, Y. W., Oh, S. G., & Tjandrawinata, R. R. (2009). Extraction of bioactive components from *Centella asiatica* using subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 48(3), 211-216.
- Kim, W. J., Veriansyah, B., Lee, Y. W., Kim, J., & Kim, J. D. (2010). Extraction of mangiferin from Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) using subcritical water. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16(3), 425-430.
- King, J. W., Grabiell, R. D., & Wightman, J. D. (2003, April). Subcritical water extraction of anthocyanins from fruit berry substrates. In Proceedings of the 6th Int. Symposium on Supercritical Fluids (Vol. 1, pp. 28-30).
- Klen, T. J., & Vodopivec, B. M. (2012). Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication. *Food chemistry*, 134(4), 2481-2488.
- Ko, M. J., Cheigh, C. I., & Chung, M. S. (2014). Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food chemistry*, 143, 147-155.
- Ko, M. J., Cheigh, C. I., Cho, S. W., & Chung, M. S. (2011). Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *Journal of Food Engineering*, 102(4), 327-333.

- Koehler, J., & Franz, G. (1993). Bioavailability of drug preparations containing a leaf extract of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengl. (*Uvae ursi folium*). *Pharmaceutical and pharmacological letters*, 3, 63-66.
- Kong, K. W., Mat-Junit, S., Ismail, A., Aminudin, N., & Abdul-Aziz, A. (2014). Polyphenols in *Barringtonia racemosa* and their protection against oxidation of LDL, serum and haemoglobin. *Food chemistry*, 146, 85-93.
- Kreft, S., Štrukelj, B., Gabersčik, A., & Kreft, I. (2002). Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1801-1804.
- Kritzer, P., Boukis, N., & Dinjus, E. (1999). Factors controlling corrosion in high-temperature aqueous solutions: a contribution to the dissociation and solubility data influencing corrosion processes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 15(3), 205-227.
- Kronholm, J., Hartonen, K., & Riekkola, M. L. (2007). Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 396-412.
- Kubátová, A., Lagadec, A. J., Miller, D. J., & Hawthorne, S. B. (2001). Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(1), 64-73.
- Kusters, K. A., Pratsinis, S. E., Thoma, S. G., & Smith, D. M. (1993). Ultrasonic fragmentation of agglomerate powders. *Chemical engineering science*, 48(24), 4119-4127.
- Lamien-Meda, A., Lukas, B., Schmiderer, C., Franz, C., & Novak, J. (2009). Validation of a quantitative assay of arbutin using gas chromatography in *Origanum majorana* and *Arctostaphylos uva-ursi* extracts. *Phytochemical analysis*, 20(5), 416-420.
- Lee, S. J., Son, K. H., Chang, H. W., Do, J. C., Jung, K. Y., Kang, S. S., & Kim, H. P. (1993). Antiinflammatory activity of naturally occurring flavone and flavonol glycosides. *Archives of Pharmacal Research*, 16(1), 25.
- Lekar, A., Borisenko, S., Filonova, O., Vetrova, E., Sushkova, S., & Borisenko, N. (2013). Subcritical water extraction of quercetin from *Polygonum hydropiper* L. *Middle East J Sci Res*, 17, 252-255.

- Li, H., Hu, J., Zhang, Z., Wang, H., Ping, F., Zheng, C., Zhang, H. . & He, Q. (2014). Insight into the effect of hydrogenation on efficiency of hydrothermal liquefaction and physico-chemical properties of biocrude oil. *Bioresource technology*, 163, 143-151.
- Lou, Z., Wang, H., Zhang, M., & Wang, Z. (2010). Improved extraction of oil from chickpea under ultrasound in a dynamic system. *Journal of Food Engineering*, 98(1), 13-18.
- Lukas, B., Schmiderer, C., Mitteregger, U., & Novak, J. (2010). Arbutin in marjoram and oregano. *Food Chemistry*, 121(1), 185-190.
- Lüthje, K., Hyötyläinen, T., Rautiainen-Rämä, M., & Riekkola, M. L. (2005). Pressurised hot water extraction–microporous membrane liquid–liquid extraction coupled on-line with gas chromatography–mass spectrometry in the analysis of pesticides in grapes. *Analyst*, 130(1), 52-58.
- Manga, H. M., Brkic, D., Marie, D. E. P., & Quetin-Leclercq, J. (2004). *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 92(2-3), 209-214.
- Mani S., Jaya S., Das H. (2002, September) Sticky issues on spray drying of fruit juices. In ASAE/CSAE North-Central Intersectional *Meeting Presentation*, Paper No: MBSK 02-201, 1–18.
- Maran, J. P., Manikandan, S., Nivetha, C. V., & Dinesh, R. (2017). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arabian journal of chemistry*, 10, S1145-S1157.
- Martinelli L., Gabas A.L., Telis-Romero J. (2007). Thermodynamic and quality properties of lemon juice powder as affected by maltodextrin and arabic gum. *Drying Technology*, 25, 2035-2045.
- Martino, E., Collina, S., Rossi, D., Bazzoni, D., Gaggeri, R., Bracco, F., & Azzolina, O. (2008). Influence of the extraction mode on the yield of hyperoside, vitexin and vitexin-2''-O-rhamnoside from *Crataegus monogyna* Jacq. (hawthorn). *Phytochemical analysis*, 19(6), 534-540.
- Masters K. (1997) Spray Dryers. In C. G. J. Baker (Ed.), *Industrial drying of foods*. London, UK: Blackie Academic and Professional

- Matsunaga, Y., Machmudah, S., Wahyudiono, K. H., Sasaki, M., & Goto, M. (2014). Subcritical water extraction and direct formation of microparticulate polysaccharide powders from *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Technol*, 1, 40-50.
- May, G., & Willuhn, G. (1978). Antiviral effect of aqueous plant extracts in tissue culture. *Arzneimittel-Forschung*, 28(1), 1-7.
- Miliauskas, G., van Beek, T. A., Venskutonis, P. R., Linssen, J. P., de Waard, P., & Sudhölter, E. J. (2004). Antioxidant activity of *Potentilla fruticosa*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(15), 1997-2009.
- Miller, D. J., & Hawthorne, S. B. (2000). Solubility of liquid organics of environmental interest in subcritical (hot/liquid) water from 298 K to 473 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 45(1), 78-81.
- Mino, J., Acevedo, C., Moscatelli, V., Ferraro, G., & Hnatyszyn, O. (2002). Antinociceptive effect of the aqueous extract of *Balbisia calycina*. *Journal of ethnopharmacology*, 79(2), 179-182.
- Mohd Azman, N. A., Gallego, M. G., Segovia, F., Abdullah, S., Shaarani, S. M., & Almajano Pablos, M. P. (2016). Study of the properties of bearberry leaf extract as a natural antioxidant in model foods. *Antioxidants*, 5(2), 11.
- Monrad, J. K., Howard, L. R., King, J. W., Srinivas, K., & Mauromoustakos, A. (2010). Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(5), 2862-2868.
- Murugesan R., Orsat V. (2012). Spray drying for the production of nutraceutical ingredients-a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 3-14.
- Musa, T. A., Sanagi, M. M., Ibrahim, W. A. W., Ahmad, F., & Aboul-Enein, H. Y. (2014). Determination of 4-allyl resorcinol and chavibetol from Piper betle leaves by subcritical water extraction combined with high-performance liquid chromatography. *Food analytical methods*, 7(4), 893-901.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1523-1542.

- Nadeem H.S., Torun M., Özdemir F. (2011). Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1626-1635.
- Naffati, A., Vladić, J., Pavlić, B., & Vidović, S. (2016). Biorefining of filter tea factory by products: Classical and ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild apple fruit dust. *Journal of Food Process Engineering*. 40(6), e12572
- Naffati, A., Vladić, J., Pavlić, B., Radosavljević, R., Gavarić, A., & Vidović, S. (2017). Recycling of filter tea industry by-products: Application of subcritical water extraction for recovery of bioactive compounds from *A. uva-ursi* herbal dust. *The Journal of Supercritical Fluids*, 121, 1-9.
- Nakahara, M., Matubayasi, N., Wakai, C., & Tsujino, Y. (2001). Structure and dynamics of water: from ambient to supercritical. *Journal of Molecular Liquids*, 90(1-3), 75-83.
- Ndlela, S. C., De Moura, J. M. L. N., Olson, N. K., & Johnson, L. A. (2012). Aqueous extraction of oil and protein from soybeans with subcritical water. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(6), 1145-1153.
- Nezbeda, I., & Pavlíček, J. (1996). Application of primitive models of association: A simple theoretical equation of state of water. *Fluid phase equilibria*, 116(1-2), 530-536.
- Norsyabilah, R., Hanim, S., Norsuhaila, M., Noraishah, A., Kartina, S., (2013). Subcritical water extraction of monosaccharides from oil palm fronds hemicelluloses. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 17:272–275
- Nycz, J. E., Malecki, G., Morag, M., Nowak, G., Ponikiewski, L., Kusz, J., & Switlicka, A. (2010). Arbutin: Isolation, X-ray structure and computational studies. *Journal of Molecular Structure*, 980(1), 13-17.
- Oliveira W.P., Souza C.R.F., Kurozawa L.E., Park K.J. (2010). Spray drying of food and herbal products. *Spray Drying Technology*, 5, 113-156.
- Ong, E. S. (2004). Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Journal of Chromatography B*, 812(1), 23-33.

Ong, E. S., Cheong, J. S. H., & Goh, D. (2006). Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 92-102.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.

Ozel, M. Z., Gogus, F., & Lewis, A. C. (2003). Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry*, 82(3), 381-386.

Paper DH, Koehler J, Franz G. Bioavailability of drug preparations containing a leaf extract of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) sprengl. (*Uvae ursi folium*). *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1993,(3):63-66.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. (2001). A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical analysis*, 12(5), 336-339.

Patel R.P., Patel M.P., Suthar A.M. (2009). Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*, 2, 44-47.

Pavlić, B., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cindrić, M., & Zeković, Z. (2016). Subcritical water extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by-products-Process optimization by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 116, 36-45.

Pavlović, R. D., Lakušić, B., Došlov-Kokoruš, Z., & Kovačević, N. (2009). Arbutin content and antioxidant activity of some *Ericaceae* species. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(10), 656-659.

Pegg, R. B., Rybarczyk, A., & Amarowicz, R. (2008). Chromatographic separation of tannin fractions from a bearberry-leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) extract by SE-HPLC-a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58, 485-490.

Phansawan, B., & Pongsabangpho, S. (2014). Determination of gallic acid and rutin in extracts *Cassia alata* and *Andrographis paniculata*. *Science Asia*, 40, 414-419.

Pharmacopoeia Helvetica VII (1993).

Phisut, N., 2012. Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product. *Int. Food Res. J.* 19, 1297–1306.

Phoungchandang, S., & Sertwasana, A. (2010). Spray-drying of ginger juice and physicochemical properties of ginger powders. *Science Asia*, 36, 40-45.

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.

Plaza, M., & Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 39-54.

Plaza, M., Abrahamsson, V., & Turner, C. (2013). Extraction and neoformation of antioxidant compounds by pressurized hot water extraction from apple byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(23), 5500-5510.

Polish Pharmacopeia 6th Ed. *Polish Pharmaceutical Society* (Eds.) Warsaw 2002-2008.

Prado, J. M., Forster-Carneiro, T., Rostagno, M. A., Follegatti-Romero, L. A., Maugeri Filho, F., & Meireles, M. A. A. (2014). Obtaining sugars from coconut husk, defatted grape seed, and pressed palm fiber by hydrolysis with subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 89, 89-98.

Pramote, K., Nucha, S., Suched, S., Parinda, P., Prasong, S., & Shuji, A. (2012). Subcritical water extraction of flavoring and phenolic compounds from cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum*). *Journal of oleo science*, 61(6), 349-355.

Prommuak, C., De-Eknamkul, W., Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. *Separation and Purification Technology*, 62: 444-448.

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., & Dragović-Uzelac, V. (2016). Optimizing acidity and extraction time for polyphenolic recovery and antioxidant capacity in grape pomace skin extracts with response surface methodology approach. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(6), 1256-1263.

Pyka, A., Bober, A., & Stolarczyk, A., (2007). Densitometric determination of arbutin in cowberry leaves (*Vaccinium vitis idaeae*). *Acta poloniae pharmaceutica*, 64(5), 395-400.

- Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejin, A., & Pavlić, B. (2015). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics sonochemistry*, 23, 360-368.
- Ramos, L., Kristenson, E. M., & Brinkman, U. T. (2002). Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 3-29.
- Rangsriwong, P., Rangkadilok, N., Satayavivad, J., Goto, M., & Shotipruk, A. (2009). Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. fruits. *Separation and Purification Technology*, 66(1), 51-56.
- Ravber, M., Knez, Ž., & Škerget, M. (2015). Simultaneous extraction of oil-and water-soluble phase from sunflower seeds with subcritical water. *Food chemistry*, 166, 316-323.
- Rodríguez-Meizoso I, Marin FR, Herrero M, Sen orans FJ, Reglero G, Cifuentes A, Ibanez E. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41:1560–1565
- Roos Y., Karel M. (1991). Applying state diagrams to food processing and development. *Food Technology*, 45(12), 66-68.
- Roos Y., Karel M. (1991a). Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnology Progress*, 7, 49-53.
- Roos Y., Karel M. (1991b). Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. *Journal of Food Science*, 56, 38-43.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119-128.
- Rovio, S., Hartonen, K., Holm, Y., Hiltunen, R., & Riekkola, M. L. (1999). Extraction of clove using pressurized hot water. *Flavour and fragrance journal*, 14(6), 399-404.

- Rychlinska, I., & Nowak, S. (2012). Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in different plant materials by HPLC. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(2), 109-113.
- Saim N., Osman R., Hirimi Md Yasin WA, Dol Hamid R. Subcritical water extraction of essential oil from coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* Vol. 12, No. 1, 22-24, 2008.
- Sansone F., Mencherini T., Picerno P., d'Amore M., Aquino R.P., &, Lauro M.R. (2011). Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *Journal of Food Engineering*, 105, 468-476.
- Schindler, G., Patzak, U., Brinkhaus, B., Nieciecki, A., Wittig, J., Krämer, N., Glöckl, I., & Veit, M. (2002). Urinary Excretion and Metabolism of Arbutin after Oral Administration of *Arctostaphylos uva-ursi* Extract as Film-Coated Tablets and Aqueous Solution in Healthy Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(8), 920-927.
- Shahat, A. A., Pieters, L., Apers, S., Nazeif, N. M., Abdel-Azim, N. S., Berghe, D. V., & Vlietinck, A. J. (2001). Chemical and biological investigations on *Zizyphus spina-christi* L. *Phytotherapy Research*, 15(7), 593-597.
- Shanmugam, K., Holmquist, L., Steele, M., Stuchbury, G., Berbaum, K., Schulz, O., Benavente García, O., Castillo, J., Burnell, J., Garcia Rivas, V., & Dobson, G. (2008). Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. *Molecular nutrition & food research*, 52(4), 427-438.
- Sharifi, A., Mortazavi, S. A., Maskooki, A., Niakousari, M., & Elhamirad, A. H. (2013). Optimization of subcritical water extraction of bioactive compounds from barberry fruit (*Berberis vulgaris*) by using response surface methodology. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6(2), 89.
- Shi, Y., Shi, R. B., Liu, B., & Lu, Y. R. (2001). Studies on antiviral flavonoids in yinqiaosan powder. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 26(5), 320-323.

- Shimanouchi, T., Ueno, S., Yang, W., & Kimura, Y. (2014). Extraction of reducing sugar with anti-oxidative scavengers from peels of *Carya cathayensis* Sarg.: Use of subcritical water. *Environmental Engineering Research*, 19(1), 41-45.
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10-23.
- Shitu, A., Izhar, S., & Tahir, T. M. (2015). Sub-critical water as a green solvent for production of valuable materials from agricultural waste biomass: a review of recent work. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 1(3), 255-264.
- Singh S., Dixit D. (2014). A review on spray drying: emerging technology in food industry. *International Journal of Applied Engineering and Technology*, 4, 1-8.
- Singh, P. P., & Saldaña, M. D. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International*, 44(8), 2452-2458.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sivakumar, V., Anna, J. L., Vijayeeswarri, J., & Swaminathan, G. (2009). Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(6), 782-789.
- Sloley, B. D., Urichuk, L. J., Morley, P., Durkin, J., Shan, J. J., Pang, P. K. T., & Coutts, R. T. (2000). Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of *Ginkgo biloba* leaves. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 52(4), 451-459.
- Snyder H.E., Lechuga-Ballesteros D. (2008) Spray drying: theory and pharmaceutical applications. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, 1, 227-260.
- Sofic, E., Copra-Janicijevic, A., Salihovic, M., Tahirovic, I., & Kroyer, G. (2010). *Screening of medicinal plant extracts for quercetin-3-rutinoside (rutin) in Bosnia and Herzegovina*, 2(2), 97-102.

- Song, B. W., Chen, Z. W., & Ma, C. G. (1995). The cell protective effect of hyperin on gastric mucosal injury in rats. *Chin. Pharmacol. Bull.*, 11, 46-8.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1), 200-208.
- Srinivas, K., King, J. W., Monrad, J. K., Howard, L. R., & Zhang, D. (2011). Pressurized solvent extraction of flavonoids from grape pomace utilizing organic acid additives. *Italian Journal of Food Science*, 23(1), 90-105.
- Strapkova, A., Jahodar, L., & Nosal'ova, G. (1991). Antitussive effect of arbutin. *Die Pharmazie*, 46(8), 611.
- Suslick, K. S., & Price, G. J. (1999). Applications of ultrasound to materials chemistry. *Annual Review of Materials Science*, 29(1), 295-326.
- Tanaka, M., Takamizu, A., Hoshino, M., Sasaki, M., & Goto, M. (2012). Extraction of dietary fiber from *Citrus junos* peel with subcritical water. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 180-186.
- Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S., & Ong, E. S. (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2484-2494.
- Thiruvankadam, S., Izhar, S., Yoshida, H., Danquah, M. K., & Harun, R. (2015). Process Application of Subcritical Water Extraction (SWE) for algal bio-products and biofuels production. *Applied energy*, 154, 815-828.
- Tomšik, A., Pavlič, B., Vladić, J., Ramić, M., Brindza, J., & Vidović, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics sonochemistry*, 29, 502-511.
- Tonon R.V., Freitas S.S., Hubinger M.D. (2011). Spray drying of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) juice: Effect of inlet air temperature and type of carrier agent. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35, 691-700.

Truong V., Bhandari B.R., Howes T. (2005a). Optimization of cocurrent spray drying process for sugar-rich foods. Part II-Optimization of spray drying process based on glass transition concept. *Journal of Food Engineering*, 71, 66-72.

Truong V., Bhandari B.R., Howes T. (2005b). Optimization of co-current spray drying process of sugar-rich foods. Part I—Moisture and glass transition temperature profile during drying. *Journal of Food Engineering*, 71, 55-65.

Tucakov J. (1984), Lečenje biljem, Rad, Beograd.

Tunchaiyaphum, S., Eshtiaghi, M. N., & Yoswathana, N. (2013). Extraction of bioactive compounds from mango peels using green technology. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 4(4), 194.

Turner, C., Turner, P., Jacobson, G., Almgren, K., Waldebäck, M., Sjöberg, P., Karlsson, E.N., & Markides, K. E. (2006). Subcritical water extraction and β -glucosidase-catalyzed hydrolysis of quercetin glycosides in onion waste. *Green Chemistry*, 8(11), 949-959.

United States Department of Agriculture (USDA). "PLANTS Profile for *Arctostaphylos Uva-ursi* (kinnikinnick) | USDA PLANTS." PLANTS Profile for *Arctostaphylos Uva-ursi* (kinnikinnick) | USDA PLANTS. USDA Natural Resources Conservation Service. Web. 07 June 2012.

Vachirapatama, N., Chamnankid, B., & Kachonpadungkitti, Y. (2011). Determination of Rutin in Buckwheat Tea and *Fagopyrum tataricum* Seeds by High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Journal of Food & Drug Analysis*, 19(4), 463-469.

Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 1(1), 13-25.

Vidović S, Vladić J. Hemija i tehnologija dijetetskih suplemenata-praktikum, Tehnoloski fakultet Novi Sad, 2017.

Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P., & Popović, L. M. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technology*, 258, 209-215.

Vladić Jelena (2017). Contemporary methods of extraction of winter savory (*Satureja montana* L.), chemical composition and biological activity of obtained extracts (PhD). University of Novi Sad.

Vladić, J., Ambrus, R., Szabó-Révész, P., Vasić, A., Cvejic, A., Pavlić, B., & Vidović, S. (2016). Recycling of filter tea industry by-products: production of *A. millefolium* powder using spray drying technique. *Industrial Crops and Products*, 80, 197-206.

Voss, E. G., and Reznicek, A. A. (2012). Field Manual of Michigan Flora. University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan, USA.

Vučić, D. M., Petković, M. R., Rodić-Grabovac, B. B., Vasić, S. M., & Čomić, L. R. (2013). *In vitro* efficacy of extracts of *Arctostaphylos uva-ursi* L. on clinical isolated *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* strains. *Kragujevac Journal of Science*, (35), 107-113.

Wang S., Langrish T. (2009). A review of process simulations and the use of additives in spray drying. *Food Research International*, 42, 13-25.

Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.

Wang, W. Q., Ma, C. G., & Xu, S. Y. (1996). Protective effect of hyperin against myocardial ischemia and reperfusion injury. *Zhongguo yao li xue bao= Acta pharmacologica Sinica*, 17(4), 341-344.

Wang, X., Chen, Q., & Lü, X. (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*, 38, 129-137.

Wang, X., Wu, Q., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., & Liang, Q. (2012). Response surface optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Sparganii rhizoma* and evaluation of their *in vitro* antioxidant activities. *Molecules*, 17(6), 6769-6783.

Wataniyakul, P., Pavasant, P., Goto, M., & Shotipruk, A. (2012). Microwave pretreatment of defatted rice bran for enhanced recovery of total phenolic compounds extracted by subcritical water. *Bioresource technology*, 124, 18-22.

Weizhong, Z., Zhiwu, C., & Biwei, S. (1999). The protective effect of hyperin on gastric mucosal injury in mice and its mechanism [J]. *Chinese Traditional Patent*, 7.

WHO Monographs on Selected Medicinal Plants-Volume 2 (2004) - Folium Uvae Ursi.

WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. (2002). Volume 2. Folium Uvae ursi. World Health Organization, Geneva.

WHO. Folium Uva ursi Monograph. 2004; vol. 2: 342-351. Accessed December 21, 2011. <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4927e/s4927e.pdf>.

Wiboonsirikul, J., & Adachi, S. (2008). Extraction of functional substances from agricultural products or by-products by subcritical water treatment. *Food science and technology research*, 14(4), 319-319.

Wichtl, M. (Ed.). (2004). *Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis*. CRC press.

Wu, J., Lin, L., & Chau, F. T. (2001). Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(4), 347-352.

Wu, T., Guan, Y., & Ye, J. (2007). Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, 100(4), 1573-1579.

Xiong, Q., Fan, W., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Stampoulis, P., Hattori, M., Namba, T. & Kadota, S. (2000). Hepatoprotective effect of *Apocynum venetum* and its active constituents. *Planta medica*, 66(02), 127-133.

Xu, H., Wang, W., Jiang, J., Yuan, F., & Gao, Y. (2015). Subcritical water extraction and antioxidant activity evaluation with on-line HPLC-ABTS·+ assay of phenolic compounds from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower residues. *Journal of food science and technology*, 52(6), 3803-3811.

Yue, T., Shao, D., Yuan, Y., Wang, Z., & Qiang, C. (2012). Ultrasound-assisted extraction, HPLC analysis, and antioxidant activity of polyphenols from unripe apple. *Journal of separation science*, 35(16), 2138-2145.

Zakaria, K.S. M., & Kamal, S. M. M. (2016). Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Engineering Reviews*, 8(1), 23-34.

Zeković, Z., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cvejin, A., Elgndi, M. A., & Pavlić, B. (2014). Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 560-566.

Zhang, G., He, L., & Hu, M. (2011). Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. *Innovative food science & emerging technologies*, 12(1), 18-25.

Zhang, H. F., Yang, X. H., Zhao, L. D., & Wang, Y. (2009). Ultrasonic-assisted extraction of epimedin C from fresh leaves of *Epimedium* and extraction mechanism. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(1), 54-60.

Zhang, J. S., Chen, Z. W., Wang, Y., Song, B. W., Dong, L. Y., & Cen, D. Y. (1998). Mechanism of analgesic action of hyperin on spinal cord. *Anhui Med*, 19, 3-5.

Zhang, Z. S., Wang, L. J., Li, D., Jiao, S. S., Chen, X. D., & Mao, Z. H. (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 62(1), 192-198.

Zhang, Z., Chang, Q., Zhu, M., Huang, Y., Ho, W. K., & Chen, Z. Y. (2001). Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. *The Journal of nutritional biochemistry*, 12(3), 144-152.

Zou, T. B., Wang, M., Gan, R. Y., & Ling, W. H. (2011). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology. *International journal of molecular sciences*, 12(5), 3006-3017

<https://www.itis.gov>