

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Mila Č. Lazović

**RAZVOJ METODOLOGIJE ZA ZELENU  
EKSTRAKCIJU BIOAKTIVNIH  
KOMPONENATA IZ PRIRODNIH PROIZVODA  
PRIMENOM PRIRODNIH EUTEKTIČKIH  
SMEŠA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Mila Č. Lazović

**DEVELOPMENT OF METHODOLOGY FOR  
GREEN EXTRACTION OF BIOACTIVE  
COMPONENTS FROM NATURAL PRODUCTS  
USING NATURAL EUTECTIC SOLVENTS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024

Mentor:

**dr Jelena Trifković**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Članovi komisije:

**Dr Petar Ristivojević**, docent  
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

**Dr Ilija Cvijetić**, docent  
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

**Dr Ivica Dimkić**, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane:

U Beogradu, \_\_\_\_\_2024.

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, pod mentorstvom dr Jelene Trifković, redovnog profesora Univerziteta Beogradu – Hemijskog fakulteta. Ovom prilikom joj se najiskrenije zahvaljujem na ukazanoj prilici, poverenju, strpljenju i razumevanju, kao i na pomoći i zalaganju u svim fazama izrade i pisanja ove doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Petru Ristivojeviću, docentu Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta na produktivnoj saradnji i učestvovanju u osmišljavanju oglada, kao i na pomoći tokom pisanja i koncipiranja publikacija.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Iliji Cvijetiću, docentu Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, na pomoći tokom realizacije, pisanja i tumačenja rezultata molekuskog modelovanja, koji čine značajan deo ove doktorske disertacije,*

*Srdačno se zahvaljujem dr Ivici Dimkiću, višem naučnom saradniku Univerziteta u Beogradu – Biološkog fakulteta, na stručnoj pomoći i korisnim sugestijama.*

*Hvala svim dragim prijateljima i kolegama sa Katedre za analitičku hemiju na podršci, razumevanju i lepoj saradnji, kao i na svim divnim trenucima koje smo delili tokom godina.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima i sestri, kojima sam neizmerno zahvalna na ljubavi, podršci i razumevanju.*

---

## RAZVOJ METODOLOGIJE ZA ZELENU EKSTRAKCIJU BIOAKTIVNIH KOMPONENATA IZ PRIRODNIH PROIZVODA PRIMENOM PRIRODNIH EUTEKTIČKIH SMEŠA

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije jeste razvoj ekološki prihvatljive analitičke metodologije za analizu bioaktivnih komponenata iz prirodnih proizvoda. Ova metodologija ima za cilj sistematsku evaluaciju značajnog broja prirodnih eutektičkih smeša različitih fizičko–hemijskih svojstava i optimizaciju postupaka ekstrakcije, pri čemu bi predloženi postupak predstavljao zelenu alternativu konvencionalnoj metodi ekstrakcije organskim rastvaračima.

Razvijene su nove i modifikovane u literaturi opisane prirodne eutektičke smeše koje su se koristile kao rastvarači za ekstrakciju fenolnih jedinjenja, kao najzastupljenijih sekundarnih metabolita u model sistemima (lekovito bilje, propolis i voće). Primenjeno je molekulsko modelovanje i hemometrijska analiza za obradu podataka u cilju odabira eutektičkih smeša sa najvećim potencijalom. Određen je sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antocijana i kvantifikovana su pojedinačna fenolna jedinjenja u zelenim ekstraktima i rezultati upoređena sa konvencionalnim ekstraktima. Urađeno je *in vitro* ispitivanje antioksidativne i antimikrobne aktivnosti ekstrakata. Procenjena je ekološka prihvatljivost metode ekstrakcije i visoko–efikasne tankoslojne hromatografije pomoću Nacionalnog indeksa uticaja metode (NEMI piktogram) i analitičke Eko–skale.

Rezultati su ukazali na prednost eutektičkih smeša kao ekstrakcionog sredstva u pogledu prinosa, ekološke prihvatljivosti i ciljane ekstrakcije jedinjenja. Primena hemometrijske analize u kombinaciji sa neciljanim hemijskim profilisanjem je dala bolji uvid u uticaj strukture komponenata eutektičkih smeša na sastav ekstrakta. Molekulsko modelovanje je pružilo dublje razumevanje interakcija između eutektičkih smeša i ciljanih jedinjenja i omogućilo predviđanje efikasnosti ekstrakcije.

**Ključne reči:** Prirodne eutektičke smeše, prirodni proizvodi, efikasnost ekstrakcije, fenolna jedinjenja, HPTLC, LC–MS, multivarijantna analiza, zelena hemija, molekulsko modelovanje.

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Analitička hemija

---

## DEVELOPMENT OF METHODOLOGY FOR GREEN EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPONENTS FROM NATURAL PRODUCTS USING NATURAL EUTECTIC SOLVENTS

The subject of this doctoral dissertation is the development of an environmentally friendly analytical methodology for the analysis of bioactive compounds from natural products. This methodology aims to systematically evaluate a significant number of natural eutectic solvents and to optimize the extraction procedure, as a green alternative to conventional methods.

New and modified natural eutectic solvents were developed and then applied as solvents for the extraction of phenolic compounds, the most abundant secondary metabolites in the studied model systems (medicinal herbs, propolis, and berries). Molecular modeling and chemometric analysis were used for data processing to select the eutectic mixtures with the highest potential. The content of total phenols, flavonoids, and anthocyanins was determined, and individual phenolic compounds were quantified in green extracts and compared with conventional ones. An *in vitro* study to evaluate the biological activity of the extracts was performed. The greenness assessment for the extraction method and high-performance thin-layer chromatography was evaluated using the National Environmental Methods Index (NEMI pictogram) and analytical Eco-Scale.

The results indicated the advantages of eutectic mixtures as an extraction medium compared to conventional methods in terms of yield, environmental acceptability, and targeted extraction. The application of chemometric analysis in combination with non-targeted chemical profiling provided a better understanding of the influence of the structure of eutectic components on extract composition. Molecular modeling offered a deeper understanding of the interactions between eutectic mixtures and target compounds and allowed for the prediction of extraction efficiency.

**Key words:** Natural Deep Eutectic Solvents, natural products, extraction efficiency, phenolic compounds, HPTLC, LC-MS, multivariate analysis, green chemistry, molecular modeling.

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific subfield:** Analytical Chemistry

## Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Opšti deo .....	2
2.1. Zelena hemija .....	2
2.2. Zelena analitička hemija .....	2
2.3. „Bela“ analitička hemija .....	3
2.4. Zeleni rastvarači .....	5
2.4.1. Jonske tečnosti .....	6
2.4.2. Eutektičke smeše .....	7
2.4.3. Prirodne eutektičke smeše .....	9
2.4.4. Fizičko–hemijska svojstva eutektičkih smeša .....	10
2.4.5. Primena eutektičkih smeša u analitičkoj hemiji .....	13
2.5. Prirodni proizvodi .....	14
2.5.1. Lekovite biljke .....	14
2.5.2. Propolis .....	14
2.5.3. Bobičasto voće .....	15
2.6. Bioaktivne komponente .....	15
2.6.1. Fenolna jedinjenja .....	16
2.7. Ekstrakcione tehnike .....	18
2.8. Analitičke metode za ispitivanje ekstrakata .....	20
2.8.1. Hromatografske tehnike .....	20
2.8.2. Spektrofotometrijska određivanja .....	21
2.9. Biološke metode za ispitivanje ekstrakata .....	22
2.9.1. Bioautografija .....	22
2.9.2. Difuziona metoda .....	23
2.9.3. Diluciona metoda .....	23
2.10. Molekulsko modelovanje primenom COSMO–RS softvera .....	23
2.10.1. $\sigma$ –profili .....	24
2.10.2. Koeficijenti aktivnosti pri beskonačnom razblaženju .....	25
2.11. Procena ekološke prihvatljivosti analitičke metode .....	25
2.11.1. Eko–skala .....	25
2.11.2. Nacionalni indeks uticaja metode (NEMI) .....	26
2.11.3. Indeks zelenosti analitičkih postupaka (GAPI) .....	27
2.11.4. Analitički kalkulator zelenila (AGREE) .....	27
2.12. Hemometrija .....	27

3. Eksperimentalni deo .....	29
3.1. Uzorci.....	29
3.2. Hemikalije i materijali .....	29
3.3. Priprema prirodnih eutektičkih smeša.....	30
3.4. Ekstrakcije bioaktivnih komponenata primenom prirodnih eutektičkih smeša i konvencionalnih rastvarača .....	30
3.5. Metode prečišćavanja ekstrakata .....	31
3.6. Hemijska karakterizacija ekstrakata.....	31
3.6.1. Spektrofotometrijska određivanja .....	31
3.6.2. Visoko–efikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) .....	32
3.6.3. Ultra–efikasna tečna hromatografija (UHPLC) .....	33
3.7. Biološka karakterizacija ekstrakata.....	34
3.7.1. Difuziona metoda u bunarićima.....	34
3.7.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije.....	34
3.7.3. Bioautografija.....	35
3.8. Molekulsko modelovanje primenom COSMO–RS softvera .....	36
3.9. Statistička obrada .....	36
4. Rezultati i diskusija.....	38
4.1. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz lekovitog bilja.....	39
4.1.1. Odabir eutektičkih smeša .....	39
4.1.2. Procena efikasnosti ekstrakcije eutektičkim smešama – Petrovac.....	40
4.1.2.1. HPTLC profili fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti.....	40
4.1.2.2. Procena ekološke prihvatljivosti HPTLC metode.....	43
4.1.2.3. Spektrofotometrijski eseji .....	44
4.1.2.4. UHPLC analiza fenolnih jedinjenja .....	46
4.1.2.5. COSMO–RS predviđanje efikasnosti ekstrakcije .....	50
4.1.2.6. Eksperimentalni rezultati naspram teorijskih podataka .....	54
4.1.3. Procena efikasnosti ekstrakcije eutektičkim smešama – Podubica.....	55
4.1.3.1. HPTLC profili fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti.....	55
4.1.3.2. Procena ekološke prihvatljivosti HPTLC metode.....	58
4.1.3.3. Spektrofotometrijski eseji .....	58
4.1.3.4. UHPLC analiza fenolnih jedinjenja .....	60
4.1.3.5. COSMO-RS predviđanje efikasnosti ekstrakcije.....	64
4.1.3.6. Eksperimentalni rezultati naspram teorijskih podataka .....	69
4.2. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz propolisa .....	70
4.2.1. Odabir eutektičkih smeša .....	70

---

4.2.2.	HPTLC profili fenolnih jedinjenja.....	72
4.2.3.	Spektrofotometrijski eseji .....	74
4.2.4.	UHPLC analiza fenolnih jedinjenja .....	77
4.2.5.	Antimikrobna aktivnost.....	81
4.3.	Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz bobičastog voća .....	83
4.3.1.	Odabir eutektičkih smeša .....	83
4.3.2.	HPTLC profil fenolnih jedinjenja .....	85
4.3.3.	Spektrofotometrijski eseji .....	91
4.3.4.	HPTLC profili antioksidativne aktivnosti.....	97
4.3.5.	UHPLC analiza fenolnih jedinjenja .....	98
4.3.6.	Antimikrobna aktivnost.....	103
4.3.7.	Bioautografija.....	107
4.4.	Poređenje uticaja matriksa na učinak ekstrakcije primenom prirodnih eutektičkih smeša 108	
5.	Zaključci .....	111
6.	Literatura.....	114
7.	Prilog.....	125

## 1. Uvod

Potrošnja velikih količina toksičnih organskih rastvarača u hemijskim procesima negativno utiče na životnu sredinu i zdravlje ljudi. Poslednjih godina, ovaj problem je postao sve značajniji i nekoliko principa zelene analitičke hemije se direktno ili indirektno odnosi na smanjenje ili eliminaciju upotrebe toksičnih rastvarača. Razvoj ekološki prihvatljivih rastvarača koji bi se koristili za ekstrakciju jedinjenja različite polarnosti postao je jedan od najaktuelnijih pravaca zelene hemije. Trenutno je u upotrebi širok spektar različitih ekološki prihvatljivih, odnosno zelenih rastvarača, uključujući jonske tečnosti, eutektičke smeše, rastvarače dobijene iz biomase, superkritični ugljen-dioksid i likvifikovane (tečne) gasove.

Mnoga istraživanja su posvećena analizi fizičko–hemijskih, termičkih i transportnih svojstava, kao i toksičnosti jonskih tečnosti, što olakšava njihov odabir i primenu. S druge strane, eutektičke smeše, naročito prirodne eutektičke smeše, predstavljaju oblast koja se trenutno intenzivno istražuje i sistematizacija njihovih svojstava još uvek nije u potpunosti uspostavljena. Glavna prednost prirodnih eutektičkih smeša je mogućnost pripreme velikog broja rastvarača različitog sastava, jer se za njihovu pripremu koriste primarni metaboliti kao što su šećeri, šećerni alkoholi, organske kiseline, aminokiseline, amidi i kvartarne amonijum soli. S obzirom na to da se fizičko–hemijska svojstva eutektičkih smeša mogu prilagođavati promenom sastava, one pružaju značajnu prednost u ekstrakciji različitih grupa jedinjenja, a takođe su korisne i u drugim oblastima gde se upotrebljavaju organski rastvarači. Njihova povoljna fizičko–hemijska svojstva, poput zanemarljive isparljivosti, tečnog stanja čak i pri temperaturama ispod 0°C, promenljive viskoznosti i širokog opsega polarnosti, doprinela su sve većem interesovanju za ove rastvarače.

Naučni cilj ove disertacije je da se sistematskom analizom značajnog broja pripremljenih prirodnih eutektičkih smeša različitih fizičko–hemijskih svojstava optimizuje postupak ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih proizvoda. Predloženi postupak predstavljao bi zelenu alternativu konvencionalnoj metodi ekstrakcije organskim rastvaračima. Male količine rastvarača koje bi se koristile za ekstrakciju takođe bi doprinele ekološkoj prihvatljivosti metode. Dodatno, u okviru disertacije će se ispitati mogućnost primene molekuskog modelovanja i hemometrijskih metoda za obradu podataka u cilju odabira prirodnih eutektičkih smeša sa najvećim potencijalom za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz prirodnih proizvoda, čime bi se u značajnoj meri skratilo vreme i potrošnja reagenasa potrebnih za ekstrakciju.

## 2. Opšti deo

### 2.1. Zelena hemija

Zelena hemija je naučna oblast čiji je prioritet da se smanji ili eliminiše upotreba i stvaranje opasnih supstanci kroz dizajn hemijskih procesa i proizvoda.<sup>1</sup> Cilj zelene hemije je da se hemijske supstance i procesi dizajniraju na način koji bi smanjio rizik po ljudsko zdravlje i životnu sredinu.<sup>1-3</sup> Jedan od najvažnijih aspekata zelene hemije je koncept dizajna, koji se zasniva na sistematskom planiranju i uključivanju inovacija kako bi se postigao cilj održivosti.<sup>1,4</sup> Pol Anastas i Džon Vornier (eng. *Paul Anastas* i *John Warner*) su postulirali 12 principa zelene hemije u svojoj knjizi „Zelena hemija: teorija i praksa“ (eng. *Green Chemistry: Theory and Practice*), objavljenoj 1998. godine. Ovih dvanaest principa se nazivaju i „pravilima dizajna“ jer se fokusiraju na dizajn i planiranje kao ključne komponente za postizanje ciljeva zelene hemije.<sup>5</sup>

Dvanaest principa zelene hemije predloženih od strane Anastasa i Vorniera su sledeći<sup>1</sup>:

1. **Prevenција stvaranja otpada** – Bolje je sprečiti stvaranje otpada, nego ga kasnije tretirati i uklanjati;
2. **Atomska ekonomičnost** – Sinteze bi trebalo da budu dizajnirane tako da se maksimalno iskoriste reagensi pri formiranju konačnog proizvoda, čime se smanjuje stvaranje otpada;
3. **Manje opasna hemijska sinteza** – Metode sinteze treba da budu osmišljene tako da koriste i proizvode supstance sa niskom ili nikakvom toksičnošću za rad i životnu sredinu;
4. **Proizvodnja bezbednih hemikalija** – Hemikalije bi trebalo dizajnirati tako da ispunjavaju svoju funkciju, ali i da imaju najmanju moguću toksičnost;
5. **Bezbedni rastvarači i pomoćne supstance** – Izbegavati upotrebu rastvarača i drugih reagenasa kad god je to moguće. Kada je njihova upotreba neophodna, trebalo bi koristiti one koje su bezbedne za zdravlje i životnu sredinu;
6. **Energetska efikasnost** – Smanjiti energetske zahteve hemijskih procesa. Kada je to moguće, hemijske reakcije treba izvoditi na sobnoj temperaturi i pritisku;
7. **Korišćenje obnovljivih izvora** – Koristiti obnovljive sirovine kad god je to moguće;
8. **Smanjenje derivatizacije** – Izbegavati nepotrebne derivatizacije, jer zahtevaju dodatne reagense i mogu generisati otpad;
9. **Kataliza** – Upotreba katalizatora (što je moguće selektivnijih) je bolja od upotrebe stehiometrijskih količina reagensa;
10. **Dizajn degradacije** – Hemijski proizvodi treba da budu dizajnirani tako da se kraju svog životnog veka razgrade u bezopasne proizvode;
11. **Analiza u realnom vremenu radi prevencije zagađenja** – Razviti analitičke metode koje omogućavaju praćenje i kontrolu u realnom vremenu tokom procesa, kako bi se sprečilo stvaranje opasnih supstanci;
12. **Bezbedniji hemijski procesi radi sprečavanja akcidenata** – Hemijske supstance i procesi treba da budu odabrani tako da se potencijalne nesreće, uključujući eksplozije, požare i prosipanje toksičnih materijala, spreče.

Prethodno navedenih dvanaest principa ne predstavljaju dvanaest nezavisnih ciljeva, već oni zajedno čine integrisani i sveobuhvatni sistem, jer se samo primenom svih principa može postići održiv proces.<sup>1</sup> Zelena hemija, dakle, ne predstavlja samo hemijski proces u kojem se koriste manje toksične supstance, već je skup akcija, stavova i razmišljanja o celom procesu sa ciljem smanjenja reagenasa, koraka i energije.<sup>4</sup> Samim tim uticaj zelene hemije je višedimenzionalan, jer svaki izbor posledično utiče na krajnji proizvod i okruženje– životnu sredinu, populaciju, analitičare i kompanije.<sup>4</sup>

### 2.2. Zelena analitička hemija

Napredak zelene hemije zajedno sa razvojem analitičkih metoda doveo je do nastanka zelene analitičke hemije (eng. *Green analytical chemistry*– GAC). Primenom novih analitičkih metoda i

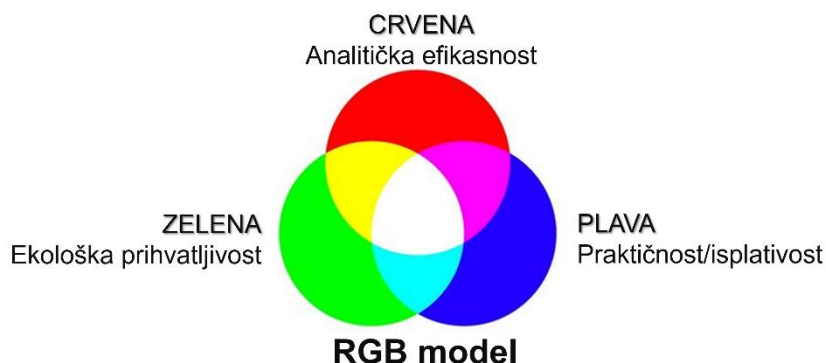
tehnika smanjila se upotreba i stvaranje štetnih supstanci u svim fazama hemijske analize.<sup>4</sup> Dvanaest principa zelene hemije podstaklo je formulisanje glavnih ciljeva i prioriteta zelenih analitičkih metoda, a pre svega eliminisanje, ili barem značajno smanjenje, reagenasa, posebno organskih rastvarača iz analitičkih procedura, smanjenje emisije para i gasova, kao i tečnog i čvrstog otpada proizvedenog u analitičkim laboratorijama, kao i smanjenje potrebnog rada i potrošnje energije u analitičkim procedurama.<sup>6</sup> Principi zelene hemije su pre svega osmišljeni da zadovolje potrebe hemijske sinteze i samo se neki od principa mogu direktno primeniti na analitičke metode, i to su prevencija stvaranja otpada (prvi princip), bezbedni rastvarači i pomoćne supstance (peti princip), energetska efikasnost (šesti princip) i smanjenje derivatizacije (osmi princip), dok su neki principi potpuno neadekvatni za analitičku hemiju (na primer drugi princip – atomska ekonomičnost). Galuška, Migaševski i Namiešnik (polj. *Galuszka, Migaszewski i Namiešnik*) su 2013. godine predložili dvanaest principa koji su skladu sa ciljevima zelene analitičke hemije i uključuju četiri principa koje su definisali Anastas i Vornor i osam novih principa.<sup>7</sup> Dvanaest principa zelene analitičke hemije su sledeći:

1. **Direktne analitičke tehnike** – Primeniti analitičke tehnike koje ne zahtevaju pripremu uzoraka;
2. **Minimalna veličina uzorka i minimalan broj uzoraka** – Smanjiti veličinu uzorka korišćenjem analitičkih tehnika koje zahtevaju malu količinu uzoraka za analizu i smanjiti broj uzoraka primenom eksperimentalnog dizajna;
3. **Sprovođenje analiza *in situ*** – Koristiti metode koje omogućavaju analizu uzoraka direktno na mestu gde se uzorak nalazi;
4. **Integracija analitičkih procesa** – Koristiti analitičke metode koje integrišu korake pripreme uzorka, razdvajanja analita i detekcije čime se smanjuje broj i količina reagensa potrebnih za analizu i šteti energije;
5. **Automatizovane i minijaturizovane metode** – Primeniti analitičke metode koje su automatizovane i minijaturizovane kako bi se smanjila količina upotrebljenih reagensa i generisanog otpada i povećala se bezbednost analitičara;
6. **Smanjenje derivatizacije** – Izbegavati nepotrebne derivatizacije, jer zahtevaju dodatne reagense i mogu generisati otpad;
7. **Smanjenje analitičkog otpada** – Izbegavati stvaranje velikih količina analitičkog otpada i obezbediti pravilno rukovanje istim;
8. **Metode koje analiziraju više analita** – Dati prednost metodama kojima se određuje istovremeno više analita ili više parametara u odnosu na metode koje analiziraju samo jedan analit, odnosno parametar;
9. **Energetska efikasnosti** – Upotrebu energije treba svesti na minimum;
10. **Korišćenje obnovljivih izvora** – Dati prednost reagensima koji su dobijeni iz obnovljivih izvora;
11. **Ukloniti ili zameniti toksične reagense** – Eliminirati ili zameniti toksične i bioakumulativne reagense sa ekološki prihvatljivijim ekvivalentima;
12. **Bezbednost analitičara** – Smanjiti rizik kojem je analitičar izložen upotrebom bezbednih hemikalija, automatizovanih instrumentalnih metoda i minijaturizovanih sistema.<sup>4,7</sup>

### 2.3. „Bela“ analitička hemija

Primena principa zelene analitičke hemije u laboratorijskoj praksi omogućava bezbedan i ekološki prihvatljiv rad koji, međutim, može uticati na pouzdanost metode, njenu tačnost, preciznost i osetljivost, jer podstiče upotrebu minimalnih količina uzorka i minimalnog broja uzoraka, primenu direktnih metoda i minijaturizaciju instrumenata.<sup>7</sup> Kako bi se postigla ravnoteža između ekološke prihvatljivosti metode i njene upotrebljivosti, ekonomičnosti i praktičnosti razvijen je Crveni–Zeleni–Plavi (eng. *Red–Green–Blue– RGB*) model, koji predstavlja proširenje koncepta zelene analitičke hemije na ostale osnovne boje: crvenu i plavu. U ovom modelu svaka boja označava jedan značajan aspekt analitičke metode: crvena boja označava analitičku efikasnost, koja je izražena kroz

validacione parametre, zelena označava principe zelene analitičke hemije, dok plava označava produktivnost, odnosno praktičnu i ekonomsku efikasnost. Na osnovu RGB modela idealna analitička metoda bi bila predstavljena kao „bela“, što ukazuje na visok nivo zasićenosti svake primarne boje, odnosno svakog aspekta analitičke metode (Slika 1.). Međutim, ako metoda nije idealna i ne ispunjava kriterijume ovog modela rezultiraće tamnijom bojom.<sup>8</sup>



Slika 1. Crveni–Zeleni–Plavi (RGB) model za procenu „beline“ analitičke metode.

Na osnovu ovog modela Novak, Viteha–Poslušni i Pavlišin (polj. *Nowak, Wietecha–Posluszny i Pawliszyn*) su 2021. godine predložili 12 principa bele analitičke hemije (eng. *White Analytical Chemistry– WAC*) i termin „belina“ definisali kao sinonim za dobru uravnoteženost analitičke metodologije.<sup>8</sup> Dvanaest principa bele analitičke hemije sastoji se iz 4 crvena (R1–R4), 4 zelena (G1–G4) i 4 plava (B1–B4) principa i oni su sledeći:

- R1. **Oblast primene** – Potrebno je da analitička metoda ima najširu moguću oblast primene u pogledu određivanja analita, opsega linearnosti, kompatibilnosti sa različitim tipovima uzoraka i robusnosti prema prisutnim interferencama;
- R2. **LOD i LOQ** – Potrebno je da analitičke metode imaju najniže moguće granice detekcije i kvantifikacije (eng. *limit of detection– LOD* i *limit of quantification– LOQ*);
- R3. **Preciznost** – Potrebno je da analitička metoda bude što preciznija, odnosno rezultati repetabilni i reproduktivni;
- R4. **Tačnost** – Potrebno je da analitička metoda bude što tačnija, što podrazumeva minimalnu relativnu grešku određivanja i analitički prinos (eng. *recovery*) što bliži 100%;
- G1. **Toksičnost reagenasa** – Potrebno je da se tokom analitičkog određivanja koristi što manje toksičnih reagenasa, a što više biorazgradivih i obnovljivih reagenasa;
- G2. **Broj i količina reagenasa i otpada** – Potrebno je da se tokom određene analitičke metode troši što manje reagenasa i proizvodi što manje otpada;
- G3. **Energija** – Potrebno je da se tokom određene analitičke metode troši što manje energije;
- G4. **Direktni uticaj** – Primena neke analitičke metode ne sme direktno da utiče na ljude, životinje i prirodu;
- B1. **Isplativost** – Potrebno je da analitička metoda bude što je moguće isplativija, a u ukupni trošak treba uračunati cenu instrumenta, materijala i osoblja;
- B2. **Vremenska efikasnost** – Analitičke metode treba da se odlikuju najvećom mogućom vremenskom efikasnošću (najkraće ukupno vreme analize, uključujući razvoj metode i sve faze analitičkog procesa);
- B3. **Zahtevnost** – Analitičke metode ne bi trebalo da budu zahtevne u pogledu količine potrebnog uzorka, pristupa naprednoj opremi, kompetentnosti osoblja i laboratorijske infrastrukture;
- B4. **Operativna jednostavnost** – Analitičke metode treba da se odlikuju najvišim mogućim nivoom minijaturizacije, integracije, automatizacije i prenosivosti (merjenja na licu mesta).

Korišćenjem RGB modela „belina“ metode se može kvantifikovati korišćenjem tabela evaluacije opisanih u radu Novaka i saradnika, pri čemu je potrebno proceniti svaki princip pojedinačno.<sup>8</sup>

## 2.4. Zeleni rastvarači

Sa sve većom primenom zelene hemije u poslednje dve decenije došlo je do razvoja novih, ekološki prihvatljivih rastvarača koji su dobili naziv zeleni rastvarači. Uzimajući u obzir principe zelene analitičke hemije idealan rastvarač bi trebalo da ima nisku toksičnost i nizak uticaj na životnu sredinu, da je jeftin, biorazgradiv, višekратно upotrebljiv i da se može dobiti iz obnovljivih izvora. U slučaju kad se koriste kao ekstrakciono sredstvo, zeleni rastvarači bi trebalo da budu efikasni i selektivni.<sup>9</sup> Primeri zelenih rastvarača najčešće korišćenih u analitičkoj hemiji su: voda, superkritični i subkritični fluidi, tečni gasovi, rastvarači dobijeni iz biomase (eng. *bio-based solvents*), rastvarači promenljive hidrofilitnosti (eng. *switchable-hydrophilicity solvents*– SHSs), amfifilni rastvarači, jonske tečnosti i eutektičke smeše.<sup>9,10</sup>

Superkritični fluidi su supstance koje se nalaze na pritisku i temperaturi iznad kritične tačke i imaju fizičko–hemijska svojstva koja su između svojstava gasova i tečnosti. Gustina im je slična kao kod tečnosti, viskoznost je kao kod gasova, a difuzija je dva reda veličine veća u odnosu na tečnosti. Njihova svojstva se mogu podesiti malim promenama pritiska i temperature, što im daje veliku prednost u odnosu na tradicionalne organske rastvarače. Korišćenjem superkritičnih fluida se skraćuje vreme potrebno za ekstrakciju i povećava efikasnost, a rastvarač se lako može ukloniti po završetku ekstrakcije, pri čemu ne dolazi do stvaranja otpada. Fluid koji se najčešće koristi tokom superkritične ekstrakcije (eng. *supercritical fluid extraction*, SFE) je ugljen–dioksid, jer ima niske vrednosti kritične temperature i kritičnog pritiska ( $T_k=31,1^{\circ}\text{C}$ ,  $p_k=7,38\text{ MPa}$ ) i potpuno ispunjava kriterijume zelene analitičke hemije (nezapaljiv, netoksičan, dostupan i obnovljiv). Međutim primena ekstrakcije sa superkritičnim ugljen–dioksidom je ograničena na nepolarna i umereno polarna jedinjenja.<sup>9,11</sup> Voda je najvažniji rastvarač u prirodi i smatra se idealnim zelenim rastvaračem, zbog svojih ekološki prihvatljivijih svojstava. Najznačajnije prednosti korišćenja vode kao rastvarača su to što je nezapaljiva, netoksična, dostupna, jeftina i može doprineti proizvodnji bezbednih ekstrakata koji nemaju tragove toksičnih rastvarača. Ipak, voda je izuzetno polarni rastvarač, zbog čega se može koristiti uglavnom za ekstrakciju veoma polarnih jedinjenja i u ambijentalnim uslovima nije efikasna za ekstrakciju manje polarnih i nepolarnih sastojaka. Međutim, kada se voda nalazi u superkritičnom stanju, odnosno iznad kritične tačke od  $22,1\text{ MPa}$  i  $374,2^{\circ}\text{C}$ , ima svojstva nepolarnog rastvarača i može rastvarati organska jedinjenja i gasove. Superkritična voda se ne koristi često za ekstrakciju jer je visoko reaktivna i može dovesti do oksidacije, hidrolize, ali i razgradnje jedinjenja. Osim toga postizanje superkritičnih uslova zahteva veoma visoke temperature i pritiske za koje je potrebna specijalizovana oprema, što čini ceo proces neisplativim i rizičnim, jer greške u radu mogu dovesti do opasnih situacija. Subkritična voda je voda koja se nalazi na temperaturi iznad temperature ključanja ( $100^{\circ}\text{C}$ ), ali ispod kritične temperature ( $374^{\circ}\text{C}$ ) i na pritisku dovoljnom velikom da ostane tečna. Fizičko–hemijska svojstva subkritične vode se menjaju sa promenom temperature i pritiska što joj daje prednost u primeni kao rastvarača za ekstrakciju. Sa povećanjem temperature dielektrična konstanta opada i voda počinje da pokazuje svojstva slična organskim rastvaračima. Dielektrična konstanta vode na  $214^{\circ}\text{C}$  je ista kao i metanola na sobnoj temperaturi, dok na  $295^{\circ}\text{C}$  voda ima polarnost sličnu acetonu, zbog čega se može koristiti za ekstrakciju nepolarnih i umereno polarnih jedinjenja. Ekstrakcija sa subkritičnom vodom (eng. *subcritical water extraction*– SWE) koja se naziva još i ekstrakcija pregrejanom vodom ili ekstrakcija vreloom vodom pod pritiskom, je ekološki prihvatljiva metoda koja je manje tehnički i ekonomski izazovna u odnosu superkritičnu ekstrakciju. Međutim glavni nedostatak ove ekstrakcije je uklanjanje vode, odnosno rastvarača iz dobijenog ekstrakta.<sup>9,12,13</sup>

Tečni gasovi nastaju hlađenjem ili kompresijom gasova. Kao zelena alternativa se najčešće primenjuju *n*–butan, *n*–propan, dimetil–etar, *trans*–1,3,3,3–tetrafluoroprop–1–en, i 1,1,2,2–tetrafluoroetan. Ekstrakcija tečnim gasovima se vrši pri niskim pritisecima ( $< 1\text{ MPa}$ ) i sobnoj temperaturi, što predstavlja njihovu prednost, međutim njihova upotreba je potencijalno opasna zbog izuzetno zapaljivih para.<sup>9,14</sup>

Rastvarači dobijeni iz biomase (eng. *bio-based solvents*) se proizvode u procesu transformacije biomase iz različitih obnovljivih izvora, kao što su poljoprivredni usevi (biljke bogate ugljenim hidratima, npr. kukuruz, pšenica i šećerna repa), šume (npr. drvo), vodena biomasa (npr. alge) i otpadni materijal. Različiti rastvarači se mogu dobiti iz ovih izvora, kao što su alkoholi, estri, glicerol, terpeni, furfural i furan. Najčešće korišćene alternative su D–limonen, 2–metiltetrahidrofuran (2–MeTHF) i ciklopentil–metil etar (CPME).<sup>9,13–15</sup> Glavne prednosti ovih rastvarača su niska toksičnost, obnovljivost i biorazgradivost, dok visoka cena predstavlja najveću prepreku široj primeni ovih rastvarača.<sup>11</sup>

Amfifilni rastvarači su specifična klasa rastvarača koje karakteriše prisustvo hidrofobnih i hidrofilnih grupa u njihovim molekulima što im omogućava da se ponašaju kao emulgatori i surfaktanti. Kada se amfifilni rastvarači rastvore u vodi iznad određene koncentracije, mogu formirati strukture koje se nazivaju micelle. U micelama, hidrofobni delovi molekula su usmereni ka unutrašnjosti, dok su hidrofilni delovi okrenuti ka spoljašnjosti što omogućava rastvaranje nepolarnih jedinjenja u vodi. Micelle smanjuju površinski napon vode čime olakšavaju rastvaranje supstanci i mogu dovesti do stabilizacije rastvora i tako sprečiti aglomeraciju ili taloženje hidrofobnih supstanci. U analitičkoj hemiji, amfifilni rastvarači se koriste za ekstrakciju i prečišćavanje jedinjenja iz kompleksnih matrica. Najčešće primenjivane ekstrakcione tehnike su ekstrakcija potpomognuta micelama (eng. *micelle-assisted extraction*– MAE) i ekstrakcija u tački zamućenja (eng. *cloud-point extraction*– CPE). Mnogi amfifilni rastvarači su dizajnirani da budu biorazgradivi i manje toksični, što ih čini ekološki prihvatljivijim od tradicionalnih rastvarača.<sup>10</sup>

Jonske tečnosti i eutektičke smeše kao vrste zelenih rastvarača će u ovom radu biti detaljnije opisani u nastavku.

#### 2.4.1. Jonske tečnosti

Jonske tečnosti su posebna grupa rastvarača koja se sastoji od jonskih (naelektrisanih) komponenti i nalaze se u tečnom agregatnom stanju na sobnoj temperaturi. Sastoje se od glomaznog katjona koji sadrži pozitivno naelektrisani atom azota, fosfora ili sumpora, kao što su različito supstituisani imidazolijum, piridinijum, piperidinijum, oksazolijum, amonijum, sulfonijum i fosfonijum joni i anjona, među kojima se najčešće koriste halidi, nitrati, sulfati, acetati, alkil–sulfati, alkil–sulfonati, tetrafluoroborati, heksafluorofosfati i slični.<sup>10,12</sup>

Na osnovu fizičko–hemijskih svojstava, jonske tečnosti se dele u tri generacije:

- Prva generacija – jonske tečnosti sa jedinstvenim fizičkim svojstvima koja se mogu poboljšati promenom katjona ili anjona;
- Druga generacija – jonske tečnosti sa ciljanim hemijskim svojstvima kombinovane sa odabranim fizičkim svojstvima. Fizičko–hemijska svojstva jonskih tečnosti zavise od prirode katjona i anjona, kao i interakcija između njih. Za hemijska svojstva i reaktivnost najčešće su odgovorne specifične funkcionalne grupe katjona, dok fizička svojstva zavise od anjona;
- Treća generacija – jonske tečnosti sa ciljanim biološkim svojstvima kombinovane sa odabranim fizičkim i hemijskim svojstvima. Ovu generaciju jonskih tečnosti predstavljaju aktivna farmaceutska jedinjenja, koja imaju strukturu sličnu jonskim tečnostima i biološki su aktivna.<sup>16,17</sup>

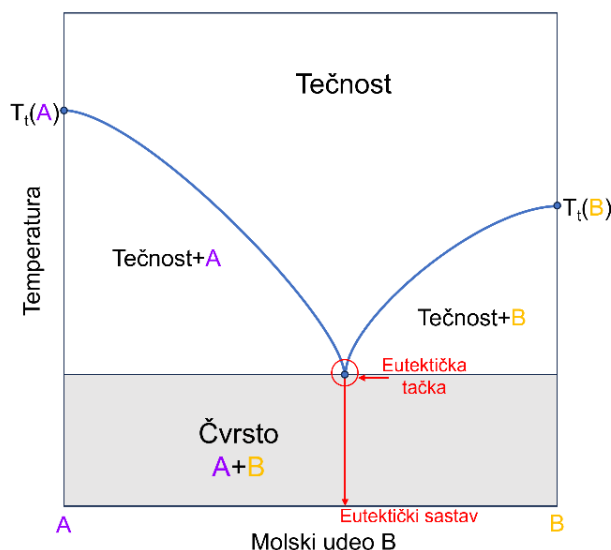
Fizičko–hemijska svojstva jonskih tečnosti mogu biti podešena odabirom supstituisanih grupa kao i dužinom prisutnog alkil lanca u katjonu/anjonu, zbog čega se smatraju „dizajniranim rastvaračima“.<sup>12,18</sup> Iako postoji veliki broj mogućih hemijskih struktura jonskih tečnosti što dovodi do različitih fizičko–hemijskih svojstava, neka svojstva su im zajednička.<sup>19</sup> Niska temperatura topljenja je jedna od ključnih karakteristika, jer jonske tečnosti zapravo predstavljaju rastopljene soli. Osim toga poseduju visoku termičku, hemijsku i elektrohemijsku stabilnost, kao i veoma nisku korozivnost. Velika prednost im je i nizak napon pare na sobnoj temperaturi, što je posledica elektrostatičkih sila koje se javljaju između katjona i anjona, a koje ih čine neisparljivim. Jonske

tečnosti imaju veću viskoznost od organskih rastvarača, a gustina im je uglavnom veća od vode, dok je površinski napon manji od vode, ali veći od ugljovodonika. Ova navedena svojstva (gustina, viskoznost i površinski napon) su od velikog značaja prilikom primene jonskih tečnosti kao ekstrakcionih sredstava, jer utiču na transfer mase i odvajanje. Svrstavaju se u polarne rastvarače, ali se njihova hidrofobnost može povećati promenom strukture, odnosno primenom katjona sa dužim alkil nizom. Jonske tečnosti imaju dosta prednosti u odnosu na organske rastvarače, kao što su niska temperatura topljenja, visoka termička i hemijska stabilnost, nizak napon pare, niska korozivnost, prilagodljiva hemijska i fizička svojstva i mogućnost rastvaranja širokog spektra supstanci, što ih čini univerzalnim i ekološki prihvatljivim rastvaračima.<sup>12,18</sup> Ovi rastvarači imaju široku primenu u različitim oblastima nauke i tehnologije, a u analitičkoj hemiji se najviše koriste kao ekstrakciona sredstva gde zamenjuju kovencionalne rastvarače. Osim toga našle su primenu u hromatografskim tehnikama kao stacionarne faze u tečnoj hromatografiji visokih performansi i gasnoj hromatografiji, kao i matriksa za masenu spektrometriju.<sup>18</sup> Međutim, poslednjih godina njihov zeleni aspekt je doveden u pitanje zbog slabe biokompatibilnosti i biorazgradivosti, kao i zbog cene sinteze, koja je 5 do 20 puta veća od one za organske rastvarače. Kako bi se prevazišli navedeni problemi, eutektičke smeše su počele da se koriste u sve većoj meri kao alternativa jonskim tečnostima.<sup>13</sup>

#### 2.4.2. Eutektičke smeše

Eutektičke smeše, nazivaju se još i eutektički rastvarači, kao i duboki eutektički rastvarači/smeše (eng. *Deep Eutectic Solvents* – DES), predstavljaju novu generaciju rastvarača. Reč eutektik potiče od starogrčkog *εὕτηκτος* ili *eutēktos* što znači lako topljiv. Pripremaju se mešanjem akceptora vodonične veze (eng. *Hydrogen Bond Acceptor* – HBA) i donora vodonične veze (eng. *Hydrogen Bond Donor* – HBD) između kojih se formira vodonična veza, a dobijena smeša ima nižu temperaturu topljenja od svake pojedinačne komponente. Kao HBA najčešće se koriste kvaternarne amonijum i fosfonijum soli, dok se alkoholi, karboksilne kiseline i amini primenjuju kao HBD. Smanjenje tačke topljenja je posledica delokalizacije naelektrisanja koja se dešava kroz interakciju HBD i halidnog jona kvaternarne soli.<sup>11,20</sup> Ovi rastvarači imaju slična svojstva kao i jonske tečnosti – nisu isparljivi i zapaljivi, lako se pripremaju i imaju slične polazne komponente, ali takođe imaju i prilagodljivu polarnost, gustinu i viskoznost. Iz navedenih razloga eutektičke smeše se nekad nazivaju i četvrtom generacijom jonskih tečnosti, iako nisu u potpunosti sastavljene od jona. Međutim, priprema eutektičkih smeša je jeftinija i imaju nižu toksičnost u poređenju sa jonskim tečnostima što ih čini ekološki prihvatljivijim.<sup>10,12</sup>

Eutektičke smeše su privukle pažnju naučne zajednice u poslednje dve decenije nakon rada Abota (eng. *Abbott*) i saradnika<sup>21</sup> koji su primetili neuobičajeno sniženje tačke topljenja prisutno u eutektičkim smešama koje se sastaje od donora i akceptora vodonične veze. Ova pojava je prvo primećena u smeši holin–hlorida (tačka topljenja  $T_t = 302^\circ\text{C}$ ) i uree (tačka topljenja  $T_t = 133^\circ\text{C}$ ) koje pomešane u molskom odnosu 1:2 formiraju smešu koja je tečna na sobnoj temperaturi (temperatura topljenja smeše,  $T_{\text{eutectic}} = 12^\circ\text{C}$ ) (Slika 2.). Abot i saradnici su ove tečnosti na engleskom nazvali *deep eutectic mixture* – DEM (srp. duboka eutektička smeša), a obzirom da su ove smeše najčešće korišćene kao rastvarači, vremenom je usvojen naziv na engleskom *deep eutectic solvents* – DES (srp. duboki eutektički rastvarači).<sup>22</sup>



Slika 2. Fazni dijagram eutektičke smeše koja se sastoji od supstanci A i B.

Eutektičke smeše se mogu lako pripremiti na više načina, pri čemu je odabir metode za pripremu određen pre svega raspoloživom opremom ili ličnim preferencijama. Najčešća metoda pripreme je zagrevanje i mešanje komponenata eutektičke smeše dok se ne formira homogena tečnost. Temperatura zagrevanja je uglavnom između 50 – 100°C, pri čemu je potrebno biti obazriv prema degradaciji komponenata eutektičke smeše zbog sporednih reakcija (npr. esterifikacija kod karboksilnih kiselina). Drugi način pripreme podrazumeva da se svaka od komponenata rastvori u vodi, a potom se smeša uparava kako bi se voda uklonila, uglavnom na 50°C. Osim toga moguće je smešu pripremiti homogenizacijom komponenata u avanu dok ne dođe do formiranja homogene tečnosti. Eutektičke smeše se mogu pripremiti i procesom liofilizacije, tako što se prvo svaka komponenta rastvori u maloj količini vode, a potom se vodeni rastvori pomešaju i voda se uklanja zamrzavanjem na niskoj temperaturi. U skorije vreme razvijene su i novi, zeleniji načini pripreme eutektičkih smeša, koji zahtevaju manje vremena i energije, kao što su metode potpomognute ultrazvukom ili mikrotalasima.<sup>20,22,23</sup>

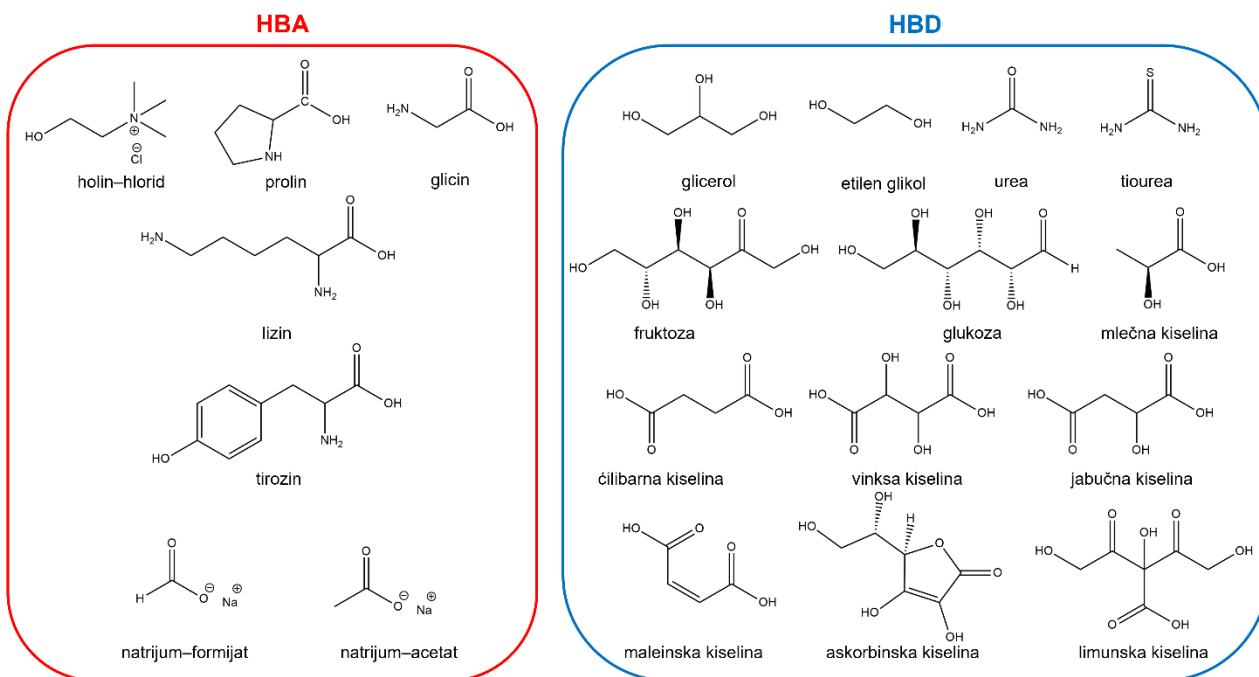
Eutektičke smeše su klasifikovane u četiri tipa na osnovu opšte formule  $Cat^+ X^- zY$ , gde je  $Cat^+$  amonijum, fosfonijum ili sulfonijum jon, dok  $X^-$  predstavlja Luisovu (eng. *Lewis*) bazu koja je uglavnom halidni anjon, a  $Y$  je Luisova ili Brenštedova (eng. *Brønsted*) kiselina i  $z$  je broj molekula  $Y$  koji interaguje sa odgovarajućim anjonom:<sup>20,23</sup>

- Tip I –  $Y$  je metalna so  $MCl_x$ , dok su mogući metali  $M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In$ ;
- Tip II –  $Y$  je hidratizana metalna so  $MCl_x \cdot x H_2O$ , pri čemu je  $M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe$ ;
- Tip III –  $Y$  je donator vodonične veze  $RZ$ , pri čemu je  $Z = CONH_2, COOH, OH$ . Ovaj tip eutektičkih smeša je najčešće proučavan u literaturi i većinom se bazira na holin–hloridu u kombinaciji sa različitim donatorima vodonične veze, kao što su amidi, alkoholi i karboksilne kiseline;
- Tip IV – katjon ( $Cat^+$ ) je zamenjen sa metalnom soli, kao što je  $ZnCl_2$  i  $Y$  je HBD.

U skorije vreme su se pojavile eutektičke smeše u kojima je jedna od komponenata nepolarno jedinjenje, kao što su terpeni (mentol, timol i sl.), masne kiseline i alkoholi dugog niza. Ove smeše su dobile naziv hidrofobne eutektičke smeše, zbog interakcija koje se javljaju između komponenata i neki autori za ovu klasu predlažu da bi mogla biti svrstana kao V tip eutektičkih smeša.<sup>23</sup> Osim toga eutektičke smeše se mogu napraviti i od aktivnih farmaceutskih sastojaka (eng. *active pharmaceutical ingredients*– API), kao što su ibuprofen, lidokain ili fenilacetatna kiselina.<sup>20</sup>

### 2.4.3. Prirodne eutektičke smeše

Prirodne (duboke) eutektičke smeše (eng. *Natural deep eutectic solvents*– NADES) predstavljaju smeše koje su nastale mešanjem primarnih metabolita biljaka u različitim odnosima, pri čemu jedna od komponenata ovakvih sistema može biti i voda.<sup>24</sup> Strukture nekih HBD i HBA često korišćenih za pripremu prirodnih eutektičkih smeša su prikazane na Slici 3. Čoi (kor. *Choi*) i saradnici su u svom radu<sup>25</sup> iz 2011. godine prvi predložili naziv prirodne duboke eutektičke smeše (NADES) za smeše koje su sastavljene od glavnih ćelijskih komponenata, kao što su šećeri, aminokiseline, holin i neke organske kiseline kao na primer jabučna, limunska, mlečna i ćilibarna. Oni su pretpostavili da metaboliti koji su prisutni u velikim količinama u ćelijama mogu formirati treću fazu tečnosti u živim organizama, pored dve uobičajeno prisutne faze– vode i lipida. Ovi autori su pretpostavili da do formiranja NADES okruženja dolazi tako što pozitivno naelektrisani holinijum katjon, prisutan kao deo membranskih lipida, vezuje za sebe organske kiseline ili aminokiseline, koje dalje mogu da privuku šećere, kiseline ili baze i formiraju dinamički sloj NADES okruženja oko membrana unutar i izvan ćelija i vakuola. U ovom sloju NADES–a oko membrana može doći do koncentrisanja antioksidanasa (kao što su askorbat, glutation, flavonoidi i antocijani) koji štite membranu od oksidacije ili svetlosti. Svoju pretpostavku o ulozi NADES–a kao treće faze prisutne u ćelijama su pokazali kroz dva koncepta: rastvorljivosti srednje polarnih jedinjenja i preživljavanje biljaka u uslovima suše. Naime, ovi autori navode da se u ćelijama nalazi veliki broj srednje polarnih jedinjenja u visokim koncentracijama koji ne mogu biti rastvoreni u lipidima ili u vodi. Kao primere ovakvog ponašanja navode veću rastvorljivost flavonoida rutina u različitim NADES sistemima u odnosu na vodu (između 50–100 puta), kao i prisustvo antocijana u ćelijama u višim koncentracijama nego što je njihova rastvorljivost u vodi, što je objašnjeno pretpostavkom da antocijanoplastidi sadrže sloj NADES–a. Dodatno, autori predlažu da se biosinteze polimera nerastvornih u vodi, kao što su celuloza, amiloza i lignin potencijalno odigravaju u NADES okruženju. Drugi primer moguće uloge eutektičkih smeša u živim sistemima je ponašanje biljaka u uslovima stresa, prilikom izlaganja visokim ili niskim temperaturama. U takvim uslovima, usled gubitka vode dolazi do formiranja NADES okruženja u kojem se rastvaraju enzimi i drugi metaboliti koji ostaju stabilni, odnosno zadržavaju svoju funkciju.



Slika 3. Strukture jedinjenja, donora i akceptora vodoničnih veza, koji se koriste za pripremu prirodnih eutektičkih smeša.

Iako se prirodne eutektičke smeše smatraju tipom III eutektičkih smeša, ta podela nije obuhvatila sve moguće kombinacije, te je zato predložena i klasifikacija prirodnih eutektičkih smeša u pet glavnih grupa:

- Prva grupa – jonske smeše, sastavljene od kiseline i baze;
- Druga grupa – neutralne smeše, sastavljene samo od šećera ili od šećera i polihidroksilnih alkohola;
- Treća grupa – neutralne smeše sa kiselinom, sastavljene od šećera ili polihidroksilnih alkohola i organske kiseline;
- Četvrta grupa – neutralne smeše sa bazom, sastavljene od šećera ili polihidroksilnih alkohola i organske baze;
- Peta grupa – smeše sastavljene od aminokiseline i šećera ili organskih kiselina.<sup>20</sup>

#### 2.4.4. Fizičko–hemijska svojstva eutektičkih smeša

**Fazno ponašanje** – S obzirom da se javila potreba za definisanjem razlike između eutektičkih smeša i dubokih eutektičkih smeša, odnosno jasnijom definicijom termina dubok (eng. *deep*) u nazivu *Deep eutectic solvent*, Martins (por. *Martins*) i saradnici su u svom radu predložili osnovne karakteristike potrebne da bi se određena smeša zaista mogla smatrati dubokom.<sup>26</sup> Jedno od glavnih svojstava eutektičkih sistema jeste pojava sniženja tačke topljenja. Na faznom dijagramu eutektičke smeše (Slika 4.), sastav smeše pri kojem je postignuta minimalna tačka topljenja  $T_E$  naziva se eutektička tačka. Međutim, postojanje eutektičke tačke u smeši nije dovoljan razlog da bi se smeša definisala kao duboka. Duboke eutektičke smeše se često definišu i preko prisustva vodoničnih veza između komponenata smeša, ali postojanje ove mreže vodoničnih veza takođe nije dovoljan dokaz da je eutektička smeša duboka. Termin duboka prema Martinsu bi trebalo da se koristi samo za eutektičke smeše koje imaju eutektičku temperaturu (tačku topljenja smeše) ispod one koja bi se očekivala za idealnu smešu, odnosno treba da označava samo one smeše koje odstupaju od idealnog faznog ponašanja. Pojava sniženja tačke topljenja ne treba biti definisana kao razlika između linearne kombinacije tački topljena čistih komponenata i realne eutektičke tačke ( $\Delta T_1$ ), već kao razlika između idealne eutektičke temperature i realne ( $T_E$ ), što je na Slici 4. označeno kao  $\Delta T_2$ . Tačan razlog i mehanizam odstupanja eutektičkih smeša od idealnog ponašanja je nepoznat, ali pretpostavka je da je uslovljen interakcijama između HBA i HBD, odnosno da se osim vodoničnih veza javljaju i slabe anjonske i katjonske interakcije. Po ovim kriterijumima, da bi se neka eutektička smeša definisala kao duboka potrebno je poznavati fazni dijagram i na njemu uporediti eksperimentalno određeno sniženje tačke topljenja sa sniženjem koje je određeno računski pomoću termodinamičkih jednačina i toplotnog kapaciteta.<sup>20,22,26</sup> Uzimajući u obzir ove kriterijume Abraš i Koutinjo (por. *Abranches i Coutinho*) su u svom radu<sup>27</sup> definisali eutektičke i duboke eutektičke smeše na sledeći način:

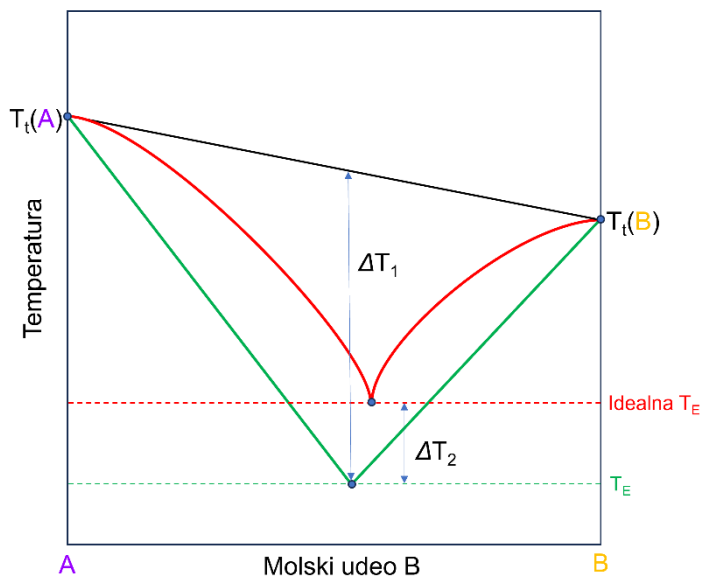
- Eutektičke smeše predstavljaju sistem koji je tečan na datoj temperaturi i kog su formirale dve ili više komponenata, od kojih je barem jedna bila čvrsta.
- Duboke eutektičke smeše su podgrupa eutektičkih smeša koja negativno odstupaju od idealnog termodinamičkog ponašanja, a koje nastaje kao posledica entalpije topljenja.

Teorijsko određivanje faznog dijagrama je moguće uraditi pomoću sledeće jednačine koja opisuje čvrsto–tečnu ravnotežu:

$$\ln(x_i \gamma_i) = \frac{\Delta_m H}{R} \left( \frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right)$$

gde je  $x_i$  molski udeo komponente  $i$ ,  $\gamma_i$  je koeficijent aktiviteta u tečnoj fazi,  $\Delta_m H$  je entalpija topljenja,  $T_m$  [K] je temperatura topljenja,  $R$  je univerzalna gasna konstanta ( $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) i  $T$  [K] je apsolutna temperatura sistema, pri čemu je u datoj jednačini zanemarena vrednost molarnog toplotnog kapaciteta, jer je njegov uticaj manji u poređenju sa ostalim parametrima. Eutektičke smeše koje pokazuju idealno ponašanje imaju koeficijent aktiviteta jednak jedinici ( $\gamma_i = 1$ ), a duboke eutektičke

smeše mogu imati samo negativno odstupanje od idealnosti i njihov koeficijent aktiviteta je manji od 1 ( $\gamma_i < 1$ ). Prilikom teorijskog određivanja faznog dijagrama koeficijent aktiviteta  $\gamma_i$  ima vrednost 1 i apsolutna temperatura sistema  $T$  se računa za niz vrednosti molskog udela  $x_i$  od 0 do 1 dobija se kriva topljenja za svaku komponentu smeše. Na osnovu teorijskog proračuna konstruiše se fazni dijagram idealnog ponašanja, koji se onda poredi sa faznim dijagramom koji je eksperimentalno dobijen. Ako je eksperimentalno određena tačka topljenja smeše ( $T_E$ ) niža od one koja je predviđena u idealnom faznom dijagramu, onda je ispitivana smeša duboka.<sup>26-30</sup>



Slika 4. Fazni dijagram koji prikazuje idealnu eutektičku smešu (crvena linija) i duboku eutektičku smešu (zeleno linija).  $\Delta T_2$  predstavlja sniženje tačke topljenja. (Slika preuzeta iz rada Martinsa i saradnika<sup>26</sup> i prilagođena tekstu)

**Viskoznost** – Viskoznost predstavlja otpor fluida prema deformaciji.<sup>22</sup> Većinu eutektičkih smeša karakteriše velika viskoznost na sobnoj temperaturi ( $\eta > 100$  mPa·s,  $\eta_{\text{voda}} = 1$  mPa·s, na 20°C), pri čemu sastav smeše (odabrane komponente, molski odnos komponentata i udeo vode) ima primarni uticaj na viskoznost. S obzirom da sastav eutektičkih smeša može biti raznolik, one imaju širok opseg viskoznosti. Velika viskoznost je posledica značajnog broja vodoničnih veza između HBA i HBD, ali i prisutnih elektrostatičkih i Van der Valsovih interakcija.<sup>11,20</sup> Viskoznost eutektičkih smeša opada sa povećanjem temperature, jer se povećava transfer mase komponentata u rastvaraču. Međutim, termički labilna jedinjenja se mogu razgraditi na višim temperaturama.<sup>11</sup>

Dva najčešća modela koja se koriste za opisivanje viskoznog ponašanja eutektičkih smeša jesu Arenijusov (eng. *Arrhenius*) i VFT model (eng. *Vogel–Fulcher–Tammann*):

- Arenijusova jednačina se koristi kad se viskoznost meri u uskom rasponu temperatura:

$$\eta_{\text{Arrhenius}} = Ae^{E/RT}$$

gde je:  $E$  [kJ mol<sup>-1</sup>] – energija aktivacije,  $A$  – predeksponencijalni faktor,  $R$  – univerzalna gasna konstanta i  $T$  [K] – apsolutna temperatura.

- VFT jednačina se koristi kod merenja viskoznosti tečnosti u širokom rasponu temperatura:

$$\eta_{\text{VFT}} = A'e^{B/(T-T_0)}$$

gde je:  $A'$  [Pa·s] – predeksponencijalni faktor, koji definiše viskoznost pri beskonačnoj temperaturi,  $B$  [K] – konstanta koja pokazuje koliko brzo viskoznost raste kako se temperatura smanjuje,  $T$  [K] – apsolutna temperatura i  $T_0$  [K] – temperatura transformacije stakla.<sup>22</sup>

**Gustina** – Gustina je još jedan važan parametar u eutektičkim smešama koji može pružiti informaciju o međumolekulskim interakcijama unutar smeša. Uglavnom eutektičke smeše imaju gustinu veću od vode. Sastav i molarni odnos HBA i HBD utiču na gustinu eutektičke smeše tako što povećanjem

molarnog udela HBD dolazi do povećanja gustine, jer dolazi do povećanja asocijacije među molekulima HBD. Na gustinu takođe utiče temperatura, pri čemu gustina opada sa povećanjem temperature.<sup>20,22</sup>

**pH** – pH vrednost eutektičkih smeša zavisi od relativne kiselosti komponenata korišćenih za pripremu i predstavlja važan faktor prilikom njihove primene, posebno u procesima ekstrakcije. Sa povećanjem temperature dolazi do neznatnog linearnog pada pH vrednosti.<sup>22</sup>

**Polarnost** – Polarnost predstavlja ključno svojstvo eutektičkih smeša u pogledu solvacionih sposobnosti rastvarača. Polarnost pre svega zavisi od polarnosti komponenata koje grade smešu, ali i od njihovog molskog odnosa. Osim toga dodatak vode, kao polarnog molekula, ima veliki uticaj na polarnost.<sup>20</sup>

**Provodljivost** – Većina eutektičkih smeša imaju nisku provodljivost na sobnoj temperaturi ( $\kappa < 2 \text{ mS cm}^{-1}$ ). Na njihovu provodljivost utiče sastav, veličina jona, molski odnos HBA i HBD, sadržaj vode i viskoznost. Povećanjem temperature dolazi do opadanja viskoznosti i disocijacije jonskih vrsta što dovodi do povećanja provodljivosti.<sup>11,20,22</sup>

**Površinski napon** – Površinski napon predstavlja energiju potrebnu da se poveća površina materijala, i povezano je sa tendencijom supstance da zauzme što je moguće manju površinu. Njegov efekat je najviše uslovljen jačinom međumolekulskih interakcija u smeši.<sup>22</sup> Na površinski napon eutektičkih smeša osim sastava utiče i temperatura, čije povećanje dovodi do linearnog pada površinskog napona.<sup>20</sup>

**Napon pare** – Napon pare predstavlja pritisak pare koja se nalazi u ravnoteži iznad tečnosti. Eutektičke smeše poseduju nizak napon pare, koji je niži u poređenju sa organskim rastvaračima, ali viši u odnosu na jonske tečnosti.<sup>22</sup>

**Indeks prelamanja** – Indeks prelamanja predstavlja odnos brzine svetlosti u nekom medijumu i u vakuumu. Malo radova se bavi merenjem indeksa refrakcije u eutektičkom smešama, iako bi ovaj parametar dao korisne informacije o elektronskim svojstvima eutektičke smeše i prisustvu vodoničnih veza.<sup>22</sup>

**Vodonična veza** – Vodonična veza je glavna međumolekulska interakcija u eutektičkim smešama. Ona predstavlja ključni faktor, zajedno sa sternim efektima i jonskim uticajem, u stabilizaciji strukture i sniženju tačke topljenja prilikom formiranja eutektičke smeše. Eutektičke smeše poseduju ekstenzivnu i organizovanu mrežu vodoničnog vezivanja koja predstavlja supramolekulsko uređenje zbog čega se eutektičke smeše mogu smatrati tečnim kristalima.<sup>22,24,31</sup>

**Rastvorljivost i stabilizacija** – Dve teorije objašnjavaju kako međumolekulske interakcije i supramolekulsko uređenje omogućavaju dobru rastvorljivost jedinjenja i njihovu stabilizaciju unutar eutektičkih smeša. Prva teorija se naziva teorija šupljina ili teorija tečnih kristala i ona objašnjava da se u eutektičkoj smeši formira struktura nalik polimeru ili tečnom kristalu koja poseduje šupljine u kojima se molekuli rastvorene supstance mogu smestiti. Menjanjem sastava eutektičke smeše i odnosa HBA i HBD komponenti dolazi do promene u unutrašnjem rasporedu molekula, a samim tim i do promene veličine i oblika šupljina. Druga teorija se naziva teorija vezivanja i ona sugerise da molekuli rastvorene supstance postaju delovi supramolekulske strukture tako što grade međumolekulske interakcije sa molekulima eutektika.<sup>32</sup>

**Uticaj vode na fizičko–hemijska svojstva eutektika** – Dodavanje vode u eutektičke smeše ima kompleksan uticaj na fizičko–hemijska svojstva jer ne deluje jednako na svaki parametar. Dodavanje vode dovodi do postepenog slabljenja vodoničnih veza prisutnih između komponenata, što za posledicu ima eksponencijalno opadanje viskoznosti sa razblaženjem, i linearno opadanje gustine. Kad se doda 25% (w/w) vode u eutektičku smešu viskoznost opada na vrednosti bliske viskoznosti vode. Dalji dodatak vode između 25 i 50% (w/w) ima mali uticaj na promenu viskoznosti, međutim dolazi do progresivnog raskidanja vodoničnih veza i kad je udeo vode 75% (w/w) dolazi do potpunog nestanka mreže vodoničnih veza između HBA i HBD, pri čemu nastaje vodeni rastvor komponenata.

Kako bi se zadržalo supramolekulska uređenje u eutektičkoj smeši potrebno je da udeo vode bude manji od 50% (w/w). Provodljivost eutektičkih smeša početno raste sa porastom udela vode, do maksimalne vrednosti, a potom opada. Ovakav trend se objašnjava disocijacijom molekula na jone do koje dolazi pri dodatku malih količina vode, dok do kasnijeg pada vrednosti dolazi kao posledica razblaživanja rastvora elektrolita. Površinski napon ima obrnuti trend u odnosu na provodljivost i povećanjem sadržaja vode dolazi do pada površinskog napona do najniže vrednosti, nakon čega dolazi do rasta.<sup>20,31</sup> Eutektičke smeše imaju širok spektar polarnosti i dodatak vode dovodi do porasta polarnosti smeša, što kod manje polarnih smeša rezultuje time da imaju polarnost sličnu vodi.<sup>31</sup> Kada se eutektičke smeše koriste kao rastvarači za ekstrakciju, promena udela vode utiče na prinos ekstrakcije, ali i na sastav ekstrahovanih jedinjenja, zbog čega je proučavanje uticaja dodatka vode od velike važnosti.<sup>20</sup> Dodatak vode smanjuje viskoznost i površinski napon eutektičkih smeša, a samim tim povećava prinos ekstrakcije. Međutim, prevelik udeo vode slabi vodonične veze i povećava polarnost što može dovesti do smanjenja prinosa ekstrakcije.<sup>11,20,31</sup> Mogućnost finog podešavanja (eng. *fine-tuning*) fizičko–hemijskih svojstava sa promenom udela vode, zajedno sa kombinovanjem različitih jedinjenja kao gradivnih komponenata, čine eutektičke smeše dizajniranim rastvaračima.<sup>31</sup>

#### 2.4.5. Primena eutektičkih smeša u analitičkoj hemiji

S obzirom da eutektičke smeše predstavljaju jednu od najperspektivnijih alternativa organskim rastvaračima, kako zbog netoksičnosti i ekološke prihvatljivosti, tako i zbog mogućnosti da se njihova fizičko–hemijska svojstva podešavaju, sve je češća njihova primena u analitičkoj hemiji. Najčešće se koriste za pripremu uzoraka, ali su našle primenu i u analitičkim tehnikama, kao što su hromatografske i elektrohemijske tehnike.<sup>23</sup>

U pripremi uzoraka eutektičke smeše se primenjuju kao ekstrakciona sredstva tokom klasičnih čvrsto–tečnih i tečno–tečnih ekstrakcija, kao i savremenih mikro i disperzivnih ekstrakcija, tehnika potpomognutih ultrazvukom, mikrotalasima ili vorteksom. Budući da eutektičke smeše imaju fizičko–hemijska svojstva koja se mogu podešavati, one se mogu koristiti za ekstrakciju jedinjenja različite polarnosti iz različitih matriksa, kao što su uzorci životne sredine, hrana i biološki uzorci. Eutektičke smeše se mogu primeniti za izolovanje biomolekula, prirodnih proizvoda, organskih jedinjenja i zagađujućih supstanci, ali i neorganskih analita i metalnih jona.<sup>23,33</sup> Prema istraživanju Rentea (por. *Rente*) i saradnika<sup>34</sup> tokom kojeg su analizirali radove u kojima su korišćene eutektičke smeše kao ekstrakciono sredstvo, najveći deo publikacija (oko 50%) se bavio ekstrakcijom fenolnih jedinjenja, a sledili su metali, pesticidi, proteini i lignocelulozni materijali. Osim primene kao tečne faze u ekstrakcijama, eutektičke smeše se zbog svoje velike hemijske raznovrsnosti i malog uticaja na životnu sredinu mogu koristiti i za pripremu čvrstih sorbenata kod različitih čvrsto–tečnih ekstrakcionih tehnika, međutim radovi na ovu temu su manje zastupljeni. Najčešća primena sorbenata na bazi eutektičkih smeša je za ekstrakciju organskih zagađujućih supstanci, metalnih jona i proteina iz uzoraka životne sredine, hrane i bioloških matriksa.<sup>23,35,36</sup>

U dosta manjoj meri eutektičke smeše se primenjuju u različitim oblastima hromatografije i to kao rastvarači za pripremu stacionarnih faza, kao modifikatori stacionarnih faza ili kao komponente mobilnih faza u tečnoj hromatografiji.<sup>23,33</sup> Upotreba eutektičkih smeša kao alternativnih rastvarača za pripremu stacionarnih faza ili kao njihovih modifikatora pokazala se kao veoma korisna, dok je njihova upotreba kao komponenata mobilnih faza upitna. Viskoznost eutektičkih smeša predstavlja najveće ograničenje u njihovoj primeni kao komponenata mobilne faze, jer dovodi do problema sa pumpama i protokom u slučaju hromatografije na koloni, dok u slučaju planarne hromatografije značajno produžava vreme analize. Osim toga, komponente eutektičke smeše mogu da interaguju sa stacionarnim fazama, što dovodi do smanjenja efikasnosti razdvajanja i širenja zona/pikova i skraćanja životnog veka kolone. Takođe je uočen njihov negativan uticaj na detektore, posebno masene spektrometre.<sup>23,37</sup>

U slučaju elektrohemijskih tehnika eutektičke smeše se najčešće koriste za proizvodnju polimernih filmova na površini elektroda, za pravljenje metalnih nanokompozita, kao aditivi u puferima kod kapilarne elektroforeze ili kao pomoćni elektroliti u elektrohemijskoj ćeliji.<sup>23,33</sup> Upotreba elektroda sa modifikovanim površinama na bazi eutektičkih smeša našla je primenu u određivanju organskih molekula i metala u različitim matriksima. Ovako modifikovane elektrode su pokazale bolji elektrokatalitički efekat, bolju osetljivost i nižu granicu detekcije.<sup>33</sup>

## 2.5. Prirodni proizvodi

### 2.5.1. Lekovite biljke

Lekovite biljke vekovima služe kao izvor biološki aktivnih jedinjenja i predstavljaju prve farmakološke preparate koji su korišćeni još u antičko doba. Pod terminom lekovite biljke ili bilje se smatraju one biljke koje se koriste u zvaničnoj i tradicionalnoj medicini za lečenje. Mogu se koristiti u različitim oblicima: cele, mlevene, kao ekstrakti ili eterična ulja u farmaceutskoj industriji, ali i kao arome, antimikrobna ili antioksidativna sredstva u prehrambenoj industriji i kozmetici.<sup>38,39</sup> U nastavku će detaljnije biti opisane biljke podubica i petrovac koje su u radu korišćene kao model sistemi.

Podubica (*Teucrium chamaedrys* L.) je višegodišnja biljka iz roda *Teucrium*, porodice *Lamiaceae*, koja je rasprostranjena na prostoru Balkana, Mediterana, severne Afrike i Bliskog istoka. Uglavnom raste na krečnjacima i stenovitim predelima, planinskim livadama, pašnjacima, kao i u šumama do 1000 m nadmorske visine.<sup>40,41</sup> Podubica je žbunastog oblika, visine do 30 cm i ima granasto deblo, ovalne listove sa mekim izbočenim rubovima i sitne cvetove na vrhovima grana.<sup>40</sup> U porodicu *Lamiaceae*–a pored podubice, spadaju i ruzmarin, žalfija, origano i timijan. Biljke iz reda *Teucrium* (*Lamiaceae*) su bogate sekundarnim metabolitima, pre svega fenolnim jedinjenjima i ispoljavaju izraženu biološku aktivnost, kao što su antioksidativna, antivirusna, antiinflamatorna, antimikrobna i antitumorska.<sup>41</sup> U tradicionalnoj medicini, nadzemni delovi podubice su korišćeni za ublažavanje digestivnih problema, lečenje rana zbog svojih antiseptičkih svojstava, kao i za smanjenje upala i poboljšanje apetita. Takođe, biljka je poznata po svojim potencijalnim antimikrobnim svojstvima i blago laksativnom delovanju.<sup>42</sup>

Petrovac (*Agrimonia eupatoria* L.) je zeljasta biljka koja pripada familiji *Rosaceae*–a, redu *Agrimonia* i rasprostranjena je u severnoj i centralnoj Evropi, delovima Azije sa umerenom klimom i u Severnoj Americi. Raste na livadama, pašnjacima i nizijama, kao i planinama do 1500 m nadmorske visine i često se nalazi na svim tipovima zemljišta, posebno u glini. Petrovac je uspravna višegodišnja zeljasta biljka, visine između 50 cm i 150 cm, sa nekoliko grana i cilindričnim dlakavim stablom, dok su listovi perasti, nazubljeni i prekriveni mekim dlačicama, a cvetovi hermafroditi sa pet žutih latica. Cveti od juna do septembra, a plod raste nadole, okružen sa nekoliko redova mekih čekinja u obliku kuke.<sup>43</sup> U narodnoj medicini, petrovac se koristi za lečenje različitih stanja, uključujući probavne smetnje, upalne bolesti kože, infekcije urinarnog trakta i dijareju. Takođe, poznata je po svojim antimikrobnim i protivupalnim svojstvima zbog čega se koristi za smanjenje simptoma prehlade i gripa.<sup>44,45</sup>

### 2.5.2. Propolis

Propolis je viskozna, lepljiva smeša koju proizvode pčele i koriste ga kao lepak za zatvaranje otvora na košnici. Prema biljnom poreklu i glavnim sastojcima razlikuje se sedam vrsta propolisa: topola, breza, zeleni brazilski, crveni brazilski, kluzija (eng. *clusia*), pacifički i mediteranski.<sup>46</sup> Propolis ima veoma bogat i složen hemijski sastav, koji varira u zavisnosti od nekoliko parametara, kao što su biljno i geografsko poreklo, godišnje doba, klimatski uslovi i vrsta pčela. Više od 300 različitih jedinjenja je izolovano i identifikovano iz ovog prirodnog proizvoda.<sup>47,48</sup> Glavne komponente u propolisu su sledeće: biljne smole (45–55%), voskovi (8–35%), eterična ulja i aromatične supstance (5–10%), masne kiseline (5%), polen (5%) i organske i mineralne supstance (5%).<sup>46</sup> Takođe su u

propolisu identifikovane i druge komponente u manjima koncentracijama kao što su fenolne kiseline, estri, fenolni estri, flavonoidi, terpeni,  $\beta$ -steroidi, aromatični aldehidi i alkoholi, seskviterpeni i naftaleni.<sup>48</sup> Istraživanja su potvrdila da propolis ima izražena antimikrobna i antioksidativna svojstva i jača imunitet.<sup>47</sup> Antioksidativna aktivnost propolisa se uglavnom pripisuje visokom sadržaju fenolnih jedinjenja. Propolis pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv širokog spektra mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice, virusi, kvasci i paraziti. Većina studija sugerise da propolis ima jaku aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama, ali samo ograničenu aktivnost prema gram-negativnim bakterijama. Antibakterijska aktivnost propolisa se uglavnom pripisuje flavonoidima, fenolnim kiselinama, aldehydima, ketonima i terpenima.<sup>46</sup> Osim antioksidativne i antimikrobne aktivnosti, studije sugerisu da propolis ima i antiinflamatornu i antitumorsku aktivnost.<sup>48</sup> Propolis se zbog svoje značajne biološke aktivnosti, koristi u humanoj i životinjskoj medicini, kozmetičkim proizvodima i konzerviranju hrane i predstavlja visoko cenjeni proizvod.<sup>48</sup>

### 2.5.3. Bobičasto voće

Bobičasto voće predstavlja važan izvor bioaktivnih jedinjenja u ljudskoj ishrani, i to fenolnih jedinjenja, vitamina, minerala i vlakana. Konzumira se u svežem, ali i u prerađenom obliku, zbog privlačne boje, ukusa i arome. Kupina, borovnica, crna ribizla, aronija, brusnica, malina i jagoda su neka od najčešće konzumiranog bobičastog voća.<sup>49</sup>

Aronija (*Aronia melanocarpa*) je žbun iz porodice *Rosacea* koji je poreklom iz Severne Amerike, ali je u 20. veku prenet u Evropu, gde je postala popularna u istočnoevropskim zemljama i Rusiji. Jestivi delovi aronije su uglavnom sitne, tamne bobice koje se u svežem i neprerađenom obliku retko konzumiraju zbog gorkog ukusa. Poslednjih godina je porastao interes za istraživanje aronije, zbog uočenih zdravstvenih benefita. Biološka aktivnost aronije je posledica prisustva fenolnih jedinjenja, uključujući antocijane, flavonole, flavanole, proantocijanidine i fenolne kiseline.<sup>50,51</sup>

Godži je biljka poreklom iz Kine koja pripada porodici *Solanaceae*, rodu *Licium*. Poznate su dve vrste: *Licium barbarum*– crveni godži i *Licium ruthenicum*– crni godži, značajno drugačijeg hemijskog sastava. Crvene godži bobice imaju veću količinu karotenoida, dok crne godži bobice imaju veći sadržaj ukupnih fenola, a posebno tanina i monomernih antocijana, zbog čega pokazuju izraženiju antioksidativnu, antiinflamatornu, imunološku i antitumorsku aktivnost.<sup>52,53</sup> Osim što se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini, poslednjih godina crni godži i njegovi proizvodi sve više su zastupljeni u komercijalnoj prehrambenoj industriji.<sup>52,53</sup>

Borovnica je vrsta žbunaste biljke poreklom sa severne hemisfere, koja pripada rodu *Vaccinium* i porodici *Ericaceae*. Plod borovnice je bogat fenolnim jedinjenjima, pre svega antocijanima, koja imaju antioksidativna svojstva i pomažu u prevenciji degenerativnih bolesti, zbog čega je poznata kao „voće dugovečnosti“. Osim toga borovnica poseduje i druge zdravstvene benefite među kojima su: održavanje nivoa šećera u krvi, smanjenje oksidativnog stresa, antiinflamatorno, antimikrobno i antitumorno dejstvo, prevencija kardiovaskularnih bolesti.<sup>54,55</sup> Borovnica se najčešće konzumira sveža, ali se koristi i u prehrambenoj industriji za proizvodnju sokova i drugih proizvoda.<sup>54,55</sup>

## 2.6. Bioaktivne komponente

Bioaktivne komponente se mogu definisati kao metaboliti koji izazivaju farmakološke ili toksikološke efekte kod ljudi i životinja, a mogu se naći u različitim prirodnim izvorima kao što su biljke, hrana, alge i biootpad.<sup>39</sup> Metaboliti su hemijska jedinjenja koja predstavljaju međuproizvode ili proizvode metabolizma i dele se na primarne i sekundarne metabolite koji se razlikuju po strukturi, biohemiji i funkciji koju obavljaju. Iako ne postoji jasna diferencijacija između primarnih i sekundarnih metabolita, jer se mnogi međuproizvodi u primarnom metabolizmu preklapaju sa intermedijerima sekundarnih metabolita, karakteristično je to da su primarni metaboliti prisutni u svakoj živoj ćeliji sposobnoj da se deli, dok to nije slučaj sa sekundarnim metabolitima.<sup>56</sup> Primarni metaboliti se mogu definisati kao esencijalna jedinjenja koja su direktno uključena u rast, razvoj i

reprodukciju organizama. U primarne metabolite spadaju ćelijske komponente (npr. ugljeni hidrati, aminokiseline, lipidi) i proizvodi fermentacije (etanol, sirćetna, limunska i mlečna kiselina).<sup>39</sup> Sekundarni metaboliti se uglavnom sintetišu nakon faze rasta i to od primarnih metabolita u reakcijama modifikacije, kao što su metilacija, glikozilacija i hidroksilacija. Sekundarni metaboliti su složenije strukture u poređenju sa primarnim i uglavnom su specifični za neki organizam ili grupu organizama.<sup>57</sup> Sekundarni metaboliti se karakterišu strukturnom raznolikošću i izraženom biološkom aktivnošću kao što su antioksidativna, antikancerogena, antivirusna, antimikrobna, antiinflamatorna.<sup>39</sup>

Klasifikacija sekundarnih metabolita može se izvršiti na različite načine. Biljni sekundarni metaboliti se na osnovu biosintetskog porekla dele na<sup>57</sup>:

- Fenolna jedinjenja – koja karakteriše prisustvo jednog ili više aromatičnog prstena, sa jednom ili više slobodnom ili modifikovanom (etarski, estarski ili glikozidno) hidroksilnom grupom;
- Terpeni i steroidi – koji se sastoje uglavnom od ugljenika i vodonika;
- Jedinjenja koja sadrže azot – u ovu grupu spadaju alkaloidi, cijanogeni glikozidi i neproteinske aminokiseline.

### 2.6.1. Fenolna jedinjenja

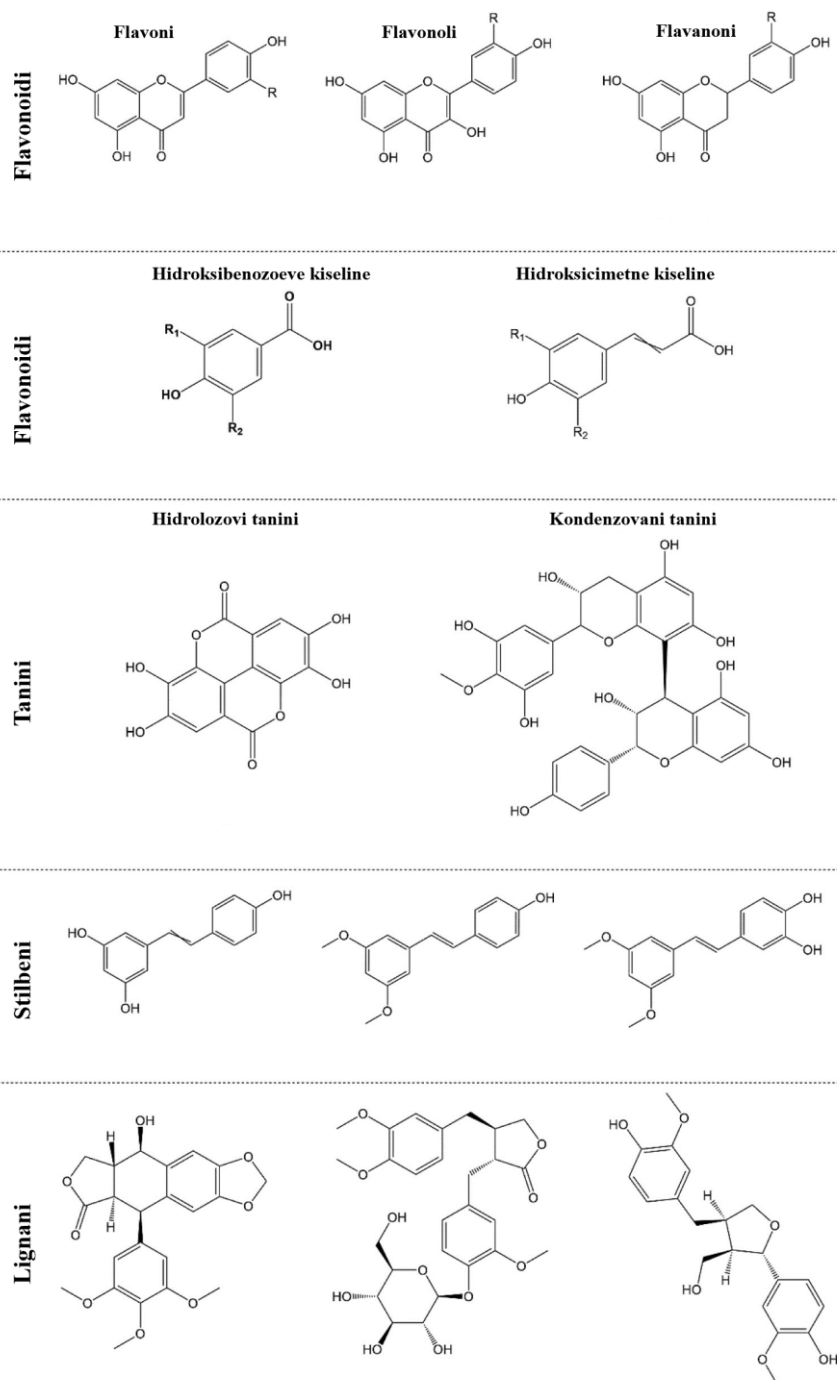
Fenolna jedinjenja (fenoli) obuhvataju veliku i strukturno raznoliku grupu sekundarnih metabolita koja sadrže najmanje jednu hidroksilnu grupu vezanu direktno za aromatični prsten i prisutni su u povrću, voću, lekovitom i aromatičnom bilju, žitaricama, mahunarkama i orašastim plodovima. Fenolna jedinjenja imaju važnu ulogu u različitim fiziološkim procesima biljke i uključuju sledeće:

- Zaštita od stresa – Fenolna jedinjenja pomažu biljkama da se nose sa različitim vrstama stresa, uključujući biotski stres (infekcije patogenima i napada biljojeda) i abiotski stres (UV zračenje, suša, ekstremne temperature). Njihova antioksidativna svojstva omogućavaju neutralizaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta koje se stvaraju pod stresnim uslovima;
- Boja i izgled – Fenolna jedinjenja, posebno flavonoidi kao što su antocijanini, odgovorna su za boje u cvetovima i voću, koje je važne za privlačenje insekata koji ih oprašuju;
- Ukus i aroma – Fenolna jedinjenja doprinose ukusu i aromi biljaka. Na primer, određene fenolne kiseline i tanini daju opori ukus voću i povrću.
- Interakcija sa okolinom – Fenolna jedinjenja učestvuju u interakcijama biljaka sa mikroorganizmima, uključujući stvaranje simbiotskih odnosa, zaštitu od patogena i inhibiranje rasta konkurentskih biljaka;
- Regulacija rasta – Neka fenolna jedinjenja utiču na regulaciju rasta biljaka, uključujući procese kao što su klijanje semena, rast korena i tkiva.<sup>58,59</sup>

Istraživanja pokazuju da fenolna jedinjenja ispoljavaju raznovrsnu biološku aktivnost<sup>59</sup>, uključujući antioksidativnu, antimikrobnu, antikancerogenu i antiinflamatornu aktivnost, kao i prevenciju kardiovaskularnih bolesti, karcinoma, dijabetesa i bolesti povezanih sa oksidativnim stresom. Fenolna jedinjenja imaju sposobnost da neutralizuju slobodne radikale, što pomaže u sprečavanju oksidativnog stresa, koji je povezan sa starenjem i razvojem hroničnih bolesti. Osim toga mogu inhibirati rast bakterija, gljivica i virusa i smanjiti upalu tako što inhibiraju enzime i citokine uključene u inflamatorne procese. Fenolna jedinjenja doprinose zdravlju kardiovaskularnog sistema jer smanjuju nivo lošeg holesterola i mogu poboljšati metabolizam glukoze i povećati osetljivost na insulin, što pomaže u kontroli nivoa šećera u krvi. Pored navedenih aktivnosti, mogu modulisati imunološki odgovor, odnosno mogu ili pojačati ili smanjiti aktivnost imunološkog sistema.<sup>59</sup>

Fenolna jedinjenja u biljkama nastaju putem dva ključna metabolička puta: šikimatskog i acetat–malonatnog puta. Metabolički put šikimske kiseline se odvija preko proizvodnje fenilpropanoida i njime se sintetišu flavonoidi, stilbeni i tanini, dok acetat–malonatni put uključuje sintezu poliketida i njime se dobijaju lignani, antrakvinoni i kondenzovani tanini. Na osnovu razlika u broju i položaju funkcionalnih grupa fenolna jedinjenja se dele na (Slika 5.):

- **Jednostavna fenolna jedinjenja** (C6 struktura) – Ova grupa obuhvata benzohinone koji sadrže benzenov prsten sa jednom ili više keto grupa.
- **Fenolne kiseline:**
  - **Hidroksibenzojeve kiseline** (C6–C1 struktura) – Ova grupa jedinjenja sadrži benzenov prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa i jednom karboksilnom grupom i u nju spadaju *p*-hidroksibenzojeva kiselina, protokatehuinska kiselina i vanilinska kiselina.
  - **Hidroksicimetne kiseline** (C6–C3 struktura) – Ova grupa jedinjenja sadrži benzenov prsten sa bočnim lancem od tri ugljenika i karboksilnom grupom i u nju spadaju kofeinska kiselina, ferulinska kiselina i sinapinska kiselina.
- **Flavonoidi** (C6–C3–C6 struktura) – Ova grupa fenolnih jedinjenja se sastoji od difenilpropanskog skeleta i predstavlja najmnogobrojniju grupu i u nju spadaju:
  - **Flavoni:** Fenolna jedinjenja sa dva benzenova prstena koja su povezana C3 ugljovodnoničnim mostom. Primeri su apigenin i luteolin.
  - **Flavonoli:** Imaju sličnu strukturu flavonima, ali sa dodatnim hidroksilnim grupama na benzenovim prstenovima. Primeri su kvercetin i kempferol.
  - **Flavanoni:** Fenolna jedinjenja sa sličnom strukturom kao flavoni, ali sa različitim funkcionalnim grupama. Primer je hesperidin.
  - **Antocijanidini:** Fenolna jedinjenja koja se rastvaraju u vodi, jer u strukturi sadrže flavonijum jon. Primeri su cijanidin, delphinidin i pelargonidin. Antocijanidini su aglikoni koji kada vežu šećere formiraju antocijane.
- **Tanini** ((C6—C3—C6)<sub>n</sub> struktura):
  - **Hidrolizirajući tanini:** Tanini koji mogu hidrolizovati u prisustvu vode ili kiseline. Primer je taninska kiselina.
  - **Kondenzovani tanini:** Tanini koji su polimeri flavonoidnih jedinica i ne mogu hidrolizovati u vodi. Mogu biti prisutni u velikim količinama u drvenastim biljkama. Primer su proantocijanidini.
- **Stilbeni** (C6—C2—C6 struktura) – Najznačajniji predstavnik ove klase fenolnih jedinjenja je resveratrol.
- **Lignani** ((C6—C3)<sub>n</sub> struktura):
  - **Hidrolizirajući lignani:** Polimeri koji se mogu hidrolizovati i primer je sesamin.
  - **Kondenzovani lignani:** Polimeri sa složenim strukturnim jedinicama, kao što je pinoresinol.<sup>59</sup>



Slika 5. Klase fenolnih jedinjenja. (Slika preuzeta iz rada Džang (*Zhang*) i saradnika<sup>59</sup> i prilagođena tekstu)

## 2.7. Ekstrakcione tehnike

Priprema uzorka predstavlja jedan od najvećih izazova u zelenoj analitičkoj hemiji jer uključuje ekstrakciju, za koju je uglavnom potrebna velika količina rastvarača.<sup>1</sup> Osim toga priprema uzorka smatra se korakom koji oduzima najviše vremena u analitičkom postupku, ali i jednim od ključnih koraka za dobijanje pouzdanih rezultata. Priprema uzorka nije jednostavno rastvaranje ciljanih jedinjenja u rastvaraču, već uključuje nekoliko koraka kao što su uzorkovanje, homogenizacija, ekstrakcija, prečišćavanje i koncentrovanje.<sup>14</sup> Dva pristupa se najčešće primenjuju kako bi se poboljšala ekološka prihvatljivost ovog koraka hemijske analize, jedan je miniaturizacija postupka pripreme, dok drugi podrazumeva primenu zelenih rastvarača.<sup>9</sup> Idealna metoda za pripremu uzorka u analitičkoj hemiji je ona koja ne koristi rastvarač, međutim problem je što se kod većeg broja

analitičkih tehnika analiza vrši iz rastvora. Ekstrakcija rastvaračima, stoga, predstavlja glavni pristup u pripremi uzorka, ali i najveći problem zbog toksičnosti, isparljivosti i zapaljivosti rastvarača. Osim toga, višak rastvarača nakon analize predstavlja otpad. Zbog negativnih aspekata korišćenja konvencionalnih rastvarača javila se potreba za korišćenjem alternativnih, zelenih rastvarača koji bi se koristili za ekstrakciju komponenata od interesa iz prirodnih proizvoda, odnosno potreba za inovativnim, bezbednim procedurama za pripremu uzoraka i bezbednim proizvodima.<sup>14</sup> Osim upotrebe ekstrakcije bez rastvarača i primene alternativnih rastvarača, poboljšanje postupka pripreme koji je u skladu sa principima zelene analitičke hemije uključuje i korišćenje zelenih tehnika ekstrakcije. Zelene tehnike za pripremu uzoraka uključuju: ekstrakciju na čvrstoj fazi, membransku ekstrakciju i potpomognute ekstrakcije (mikrotalasima i ultrazvukom).<sup>6</sup> Prednosti navedenih tehnika ekstrakcije u odnosu na konvencionalne ekstrakcione tehnike u pogledu ekološke prihvatljivosti su mala potrošnja energije i rastvarača, kao i kratko vreme ekstrakcije.<sup>11</sup>

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *solid phase extraction*, SPE) se koristi za koncentrovanje analita ili za odvajanje analita iz kompleksne smeše, ali i za prečišćavanje ekstrakta. SPE tehnika se sastoji od četiri koraka: kondicioniranje čvrste faze, nanošenje uzorka (podrazumeva zadržavanje analita na čvrstoj fazi), ispiranje kolone od nečistoća i eluiranje analita sa čvrste faze korišćenjem odgovarajućeg rastvarača. Najčešći dizajn kolone za SPE ekstrakciju (eng. *cartridge*, kertridž) se sastoji od polipropilenskog šprica, veličine od 1 mL do 6 mL, u koji je smeštena čvrsta faza, čija veličina može da varira. Alternativa SPE tehnici je QuEChERS tehnika ekstrakcije (eng. *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*, QuEChERS), koja se sastoji od tri koraka. Prvi korak je ekstrakcija analita iz uzorka korišćenjem organskog rastvarača, nakon čega se dodaju soli (uglavnom natrijum–hlorid i magnezijum–sulfat) kako bi došlo do lakšeg razdvajanja organskog i vodenog sloja, nakon čega sledi prečišćavanje organskog sloja upotrebom disperzivne SPE (dSPE) tehnike. QuEChERS tehnika se primenjuje za analizu ostataka pesticida i kontaminenata u hrani, vodi i zemljištu, a njene prednosti uključuju brzinu, jednostavnost, ekonomičnost, efikasnost, robusnost i smanjenu upotrebu toksičnih hemikalija. Sa razvojem mikroekstrakcionih tehnika došlo je do razvoja mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (eng. *solid–phase microextraction*, SPME). Kod ove tehnike ekstrakcije koristi se mala količina sorbenta koja je fiksirana na vrhu vlaknastog nosača, koji je izrađen od silicijum–dioksida ili metala. Ova tehnika omogućava simultano ekstrahovanje i koncentraciju analita iz tečnih ili gasovitih uzoraka bez upotrebe rastvarača. Nakon ekstrakcije, analit se eluira sa sorbenta korišćenjem odgovarajućeg rastvarača i dalje analizira primenom tačne hromatografije ili se procesom termalne desorpcije oslobađa na visokoj temperaturi direktno u analitički instrument, kao što je slučaj kod gasne hromatografije. SPME se primenjuje za analizu tečnih i gasovitih uzoraka, a njene prednosti uključuju ekstrakciju bez upotrebe rastvarača, brzinu i jednostavnost, visoku osetljivost i minimalnu količinu uzorka.<sup>60</sup>

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. *ultrasound–assisted extraction*, UAE) koristi ultrazvučne talase visokih frekvencija (20 kHz – 100 kHz) i generiše mehaničke vibracije koje stvaraju kavitacione mehuriće u tečnosti. Kavitacioni mehurići implodiraju i stvaraju lokalizovano visoku temperaturu i pritisak. Ovi uslovi dovode do oštećenja i pucanja ćelijskih zidova, olakšavajući oslobađanje intracelularnih molekula, uključujući bioaktivne komponente u okolni rastvor, čime se poboljšava efikasnost ekstrakcije. Osim toga UAE poboljšava difuziju rastvarača unutar ćelija, čime se povećava brzina ekstrakcije. Glavne prednosti ove metode su kraće vreme ekstrakcije, povećanje prinosa i smanjenje upotrebe rastvarača.<sup>11,61</sup> Kod ekstrakcije potpomognute mikrotalasima (eng. *microwave–assisted extraction*, MAE) polarni molekuli unutar uzorka apsorbuju energiju mikrotalasa i počinju da osciluju, što dovodi do trenja između molekula i rezultira brzim zagrevanjem uzorka. Unutrašnje zagrevanje stvara pritisak unutar ćelija, što dovodi do pucanja ćelijskih zidova i oslobađanja bioaktivnih komponenti u rastvor, što čini ovu metodu ekstrakcije bržom i efikasnijom u poređenju sa tradicionalnim metodama.<sup>11,61</sup>

## 2.8. Analitičke metode za ispitivanje ekstrakata

### 2.8.1. Hromatografske tehnike

Tankoslojna hromatografija (eng. *Thin layer chromatography*– TLC) je vrsta tečne hromatografije kod koje je stacionarna faza smeštena na ravnu površinu. TLC je jednostavna, brza, osetljiva i ekonomična analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje, za kvalitativnu i kvantitativnu analizu različitih organskih i neorganskih supstanci.<sup>62–64</sup> Svaki TLC sistem se sastoji od tri glavna elementa: stacionarne faze– sorbenta, mobilne faze– rastvarača i razdvajane supstance– analita. TLC sorbenti su čvrsti, porozni materijali sa relativno visokom specifičnom površinom, koji su u obliku tankog sloja naneti na ravnu površinu (obično staklena, metalna ili plastična ploča). Najčešće korišćeni sorbent u tankoslojnoj hromatografiji je silika gel, ali se koriste i drugi materijali kao što su aluminijum–oksid, poliamid, celuloza i hemijski modifikovani sorbenti (cijanopropil, aminopropil, diol i alkil modifikovani silika gelovi). Mobilna faza u TLC–u predstavlja smešu organskih rastvarača i u slučaju normalno faznog sistema koriste se rastvarači manje polarnosti od stacionarne faze kao što su heksan, benzen, toluen, etil–acetat, dietil–etar, hloroform, aceton, mravlja i sirćetna kiselina, dok se u slučaju reverzno faznog sistema koriste mobilne faze sastavljene od vode i organskog rastvarača, kao što su metanol, etanol i acetonitril. Na razdvajanje supstanci, odnosno analita, deluju dve suprotne sile: eluciona sila mobilne faze i privlačenje stacionarne faze, odnosno sposobnost sorbenta da zadrži odvojene supstance na svojim površinskim aktivnim centrima. Retencija analita u tankoslojnoj hromatografiji se najčešće opisuje retardacionim faktorom  $R_F$ , koji se definiše kao odnos pređenog puta analita (a) i pređenog puta mobilne faze (b)<sup>62–64</sup>:

$$R_F = \frac{a}{b}$$

$R_F$  može imati vrednost između 0 i 1 i predstavlja konstantu pod strogo određenim eksperimentalnim uslovima, zbog čega se može koristiti za identifikaciju analita. Za opisivanje retencije analita se koristi i vrednost  $hR_F$  koja predstavlja retardacioni faktor pomnožen sa 100 ( $h$ – hekto,  $10^2$ ).

Visoko–efikasna tankoslojna hromatografija (eng. *High–performance thin layer chromatography*– HPTLC) je instrumentalna tehnika koja obezbeđuje brza i efikasna odvajanja i kvantitativnu analizu. HPTLC analiza uključuje upotrebu sorbenata visokih performansi, koji imaju manju veličinu čestica i debljinu sloja u odnosu na TLC sorbente, kao i unifromnu površinu, što omogućava efikasnije razdvajanje i bolju rezoluciju. Ova tehnika je po tačnosti i preciznosti uporediva sa gasnom i tečnom hromatografijom visokih performansi, ali u odnosu na pomenute tehnike ima izvesne prednosti u pogledu ekološke prihvatljivosti. Neke od prednosti HPTLC su sledeće:

- Koriste se male zapremine organskih rastvarača i uzoraka za analizu, što smanjuje količinu proizvedenog otpada;
- Mogućnost paralelnog razdvajanja velikog broja uzoraka, što skraćuje vreme i energiju utrošenu za analizu;
- Sistem je jednostavan, relativno jeftin i lak za rukovanje;
- Mogućnost multidimenzionalnog razdvajanja.<sup>63</sup>

Osim navedenih prednosti, HPTLC se može koristiti kao skrining metoda (eng. *screening*–sistemski pregled, proveravanje) koja može da pruži kvalitativnu, ili semikvantitativnu informaciju uz minimalnu pripremu uzorka, što je u skladu sa ciljevima zelene analitičke hemije.<sup>3</sup>

Visoko–efikasna tečna hromatografija (eng. *High–Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je analitička tehnika kod koje je stacionarna faza smeštena u koloni. HPLC je jedna od najtačnijih analitičkih metoda koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenti u smeši. Princip razdvajanja u HPLC–u zasniva se na tome da se uzorak rastvara u tečnoj fazi (mobilna faza) i prolazi kroz kolonu ispunjenu čvrstim adsorbentom (stacionarna faza). Komponente uzorka se odvajaju na osnovu njihove interakcije sa stacionarnom fazom i brzine kojom prolaze kroz kolonu.

Prednosti HPLC–a uključuju visoku rezoluciju i efikasnost razdvajanja, kao i mogućnost kvantifikacije komponenti u vrlo malim koncentracijama. Osim toga, tokom rada sa HPLC uređajem moguće je precizno kontrolisati hromatografske uslove, poput brzine protoka mobilne faze, temperature i sastava rastvarača, što omogućava optimizaciju metode za određivanje specifičnih analita. Takođe, HPLC odlikuje dobra ponovljivost i sposobnost analize širokog spektra analita, od malih organskih molekula do velikih biomolekula.<sup>65–67</sup>

Ultra–efikasna tečna hromatografija (eng. *Ultra High–Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) je vrsta tečne hromatografije u koloni. Ona predstavlja unapređenu tehniku konvencionalne visoko–efikasne tečne hromatografije (HPLC) u pogledu veličine čestica stacionarne faze i instrumentalizacije, što za posledicu ima bolje razdvajanje i rezoluciju. Razvoj visoko–efikasnih materijala za stacionarne faze sa znatno manjim česticama, doveo je do povećanja površine dostupne za interakcije sa analitom, što je omogućilo smanjenje dužine kolone. Znatno kraće kolone koje se koriste u UHPLC analizama doprinele su bržem protoku, kraćem vremenu analize i smanjenju zapremine mobilne faze za najmanje 80% u poređenju sa HPLC–om. Dodatno, visoka osetljivost i dobra rezolucija razdvajanja daje ovoj metodi značajnu prednost u analizi složenih matriksa.<sup>65–67</sup> UHPLC se najčešće uparuje sa masenim spektrometrima (eng. *mass spectrometry*, MS) kao detektorima da bi se postigla što veća osetljivost, selektivnost, kao i mogućnost određivanja analita pri niskim koncentracijama. Glavni tipovi MS analizatora koji se koriste u kombinaciji sa UHPLC–om su kvadrupol (eng. *quadrupole*) i TOF (eng. *time of flight*, TOF). Takođe je česta upotreba tandemске MS (MS/MS) pogotovo u slučaju analize biomolekula i lekova, skriningu ili u metabolomici.<sup>65</sup>

### 2.8.2. Spektrofotometrijska određivanja

Ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija (eng. *Ultraviolet–Visible Spectrophotometry*, UV/Vis) je analitička tehnika koja meri apsorpciju svetlosti u ultraljubičastom i vidljivom delu spektra kako bi se odredio sastav i koncentracija hemijskih jedinjenja u uzorku. Lamber–Berov (eng. *Lambert–Beer*) zakon je ključni princip u spektrofotometriji kojim se opisuje odnos između apsorpcije svetlosti i koncentracije rastvora i koristi se za određivanje koncentracija hemijskih jedinjenja u rastvoru.<sup>68,69</sup> Lamber–Berov zakon se izražava formulom:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

gde su  $A$  – apsorpcija svetlosti (bezdimezionalna veličina),  $\varepsilon$  – molarni apsorpcioni koeficijent [ $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ],  $c$  – koncentracija rastvora [ $\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ],  $l$  – Putanja svetlosti kroz rastvor [ $\text{cm}$ ].

Ukupni sadržaj fenola (eng. *Total phenolic content*, TPC) se najčešće određuje primenom Folin–Čikalteu eseja (eng. *Folin–Ciocalteu*, FC). Ovaj esej se zasniva na redukciji FC reagensa u prisustvu fenolnih jedinjenja pri čemu nastaje kompleksno jedinjenje molibdena i volframa, plave boje. Intenzitet dobijenog jedinjenja se meri spektrofotometrijski na 760 nm i linearno raste sa koncentracijom fenolnih jedinjenja u uzorku. Iako nije poznata tačna hemijska priroda reakcije između FC reagensa i fenolnih jedinjenja, kao ni strukture FC reagensa i proizvoda plave boje, pretpostavlja se da dolazi do niza reverzibilnih reakcija redukcije sa jednim ili dva elektrona. Reakcije se odigravaju na pH vrednosti oko 10, koja se postiže dodatkom rastvora natrijum–karbonata, jer je neophodno da fenolna jedinjenja budu u obliku fenolnih anjona. Glavne prednosti ovog eseja su jednostavnost, brzina i visoka ponovljivost. Međutim, ograničenje ove metode je nedovoljna specifičnost FC reagensa, koji osim sa fenolnim jedinjenjima može reagovati i sa drugim jedinjenjima, kao što su askorbinska kiselina, aromatični amini, redukujući šećeri i aromatične aminokiseline.<sup>70,71</sup>

Za određivanje ukupnog sadržaja flavonoida (eng. *Total flavonoid content*, TFC) najčešće se koristi spektrofotometrijski esej sa aluminijum–hloridom, gde se  $\text{Al}^{3+}$  joni koriste kao kompleksirajući agens. Metoda se zasniva na formiranju helatnog kompleksa između  $\text{Al}^{3+}$  jona i karbonilnih i hidroksilnih grupa flavonoida, uglavnom u molskom odnosu 1:1, što zavisi od eksperimentalnih

uslova, uključujući pH vrednost. Originalna metoda je modifikovana uvođenjem natrijum–nitrita, koji selektovano reaguje sa aromatičnim vicinalnim diolima, pri čemu se dobija derivat flavonoid–nitroksil, za koji je karakteristična pojava nove apsorpcione trake na oko 500 nm. Kao standard flavonoida za kalibraciju najčešće se koriste kvercetin, katehin i rutin. Nedostaci ovog eseja proizilaze iz pretpostavke da svi flavonoidi prisutni u uzorku imaju isti molarni apsorpcioni koeficijent i maksimum apsorpcije ( $\lambda_{\max}$ ) kao standard koji se koristi. Dodatno, različiti flavonoidi imaju različite vrednosti apsorpcije pri odabranoj talasnoj dužini, različite  $\lambda_{\max}$  i neki od njih ne grade kompleks sa  $Al^{3+}$ , zbog čega ne budu uzeti u obzir u ovom eseju.<sup>70,72</sup>

Za određivanje ukupnog sadržaja monomernih antocijana (eng. *Total anthocyanin content*, TAC) često se koristi pH–diferencijalna metoda. Metoda se zasniva na reverzibilnoj promeni boje antocijana sa promenom pH vrednosti. Antocijani se na pH vrednosti 1,0 nalaze u obliku crveno obojenog oksonijum jona, dok se na pH vrednosti 4,5 nalaze u obliku hemiketala, koji je bezbojan. Razlika u apsorpciji na 520 nm je proporcionalna koncentraciji antocijana, a rezultat se preračunava i izražava kao ekvivalent cijanidin–3–glukozida. Glavne prednosti ovog eseja su jednostavnost i brzina. Glavni nedostaci ovog eseja jesu degradacija antocijana ili prisustvo drugih pigmenta koje može uticati na tačnost merenja, kao i to da metoda omogućava samo merenje monomernih antocijana.<sup>73,74</sup>

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta (eng. *Radical scavenging activity*, RSA) u literaturi je poznato preko 20 metoda koje se među sobom razlikuju po mehanizmu odigravanja, ali se mogu podeliti u tri glavne grupe: metoda neutralizacije slobodnih radikala, metode zasnovane na transferu elektrona i metode zasnovane na prenosu atoma vodonika.<sup>70</sup> DPPH esej (eng. *(2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl)*, DPPH) je jedna od najčešće korišćenih metoda zbog svoje jednostavnosti, osetljivosti i brzine. Ovaj esej se zasniva na prenosu elektrona sa antioksidanasa kako bi se neutralisao DPPH radikal. Reakcija je praćena promenom boje DPPH iz ljubičaste u žutu, koja se meri spektrofotometrijski na 517 nm.<sup>70,75</sup>

## 2.9. Biološke metode za ispitivanje ekstrakata

### 2.9.1. Bioautografija

Bioautografija je metoda koja se koristi za detekciju biološki aktivnih jedinjenja direktno na hromatogramu koji je dobijen primenom tankoslojne hromatografije. Pod terminom bioautografija se najčešće podrazumeva ispitivanje biološke aktivnosti jedinjenja samo na živim organizmima, kao što su bakterije i gljive. Međutim, bioautografija podrazumeva i ispitivanje biološkog odgovora prema različitim reagensima, hemijskim ili biološkim i u bioautografske eseje spadaju: antioksidativni, enzimski, antiestrogeni, antimutageni, antibakterijski i antifungalni eseji. Bioautografske metode se mogu podeliti prema načinu rada na: direktnu, kontaktnu i *agar overlay*. Direktna bioautografija se najčešće koristi zbog svoje jednostavnosti i zasniva se na uranjanju ili prskanju TLC ploče sa suspenzijom mikroorganizma ili rastvorom reagensa. U slučaju bioautografije sa mikroorganizmima, vizuelizacija zona inhibicije se uglavnom vrši korišćenjem tetrazolijumovih soli, kao što je MTT ([3–(4,5–dimetiltiazol–2–il)–2,5–difeniltetrazolijum bromid]). Dehidrogenaze prisutne u živim mikroorganizmima pretvaraju tetrazolijumove soli u intenzivno obojeni formazan, tako da se zone inhibicije pojavljuju kao trake bele boje na ljubičastoj pozadini. U slučaju antioksidativnih ili enzimskih eseja način vizuelizacije aktivnih zona zavisi od prirode samog eseja. Na primer, u slučaju DPPH eseja jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću pojavljuju se kao žute zone na ljubičastoj pozadini, nakon stajanja u mraku.<sup>76–78</sup> Glavna prednost bioautografije je što omogućava dobijanje pouzdanih informacija o aktivnosti pojedinačnih jedinjenja, za razliku od klasičnih mikrobioloških metoda, kao što su difuzione i dilucione metode, gde se meri aktivnost ukupnog ekstrakata i gde je moguće ispoljavanje antagonističkih i sinergističkih efekata.<sup>76</sup>

### 2.9.2. Difuziona metoda

Difuzni esej na agaru (eng. *agar diffusion assay*) je široko primenjivana metoda za procenu antimikrobne aktivnosti prirodnih proizvoda. Metoda se zasniva na tome da se na odgovarajuću inokulisano podlogu od agara nanese ispitivani uzorak koji radialno difunduje u svim pravcima i inhibira rast mikroorganizma. Veličina zone inhibicije oko nanetog uzorka je srazmerna osetljivosti mikroorganizma na ispitivani uzorak. Ovaj esej se izvodi tako što se hraniljiva podloga inokuliše ispitivanim sojem mikroorganizma, koji se potom razlije u Petrijevu šolju. Potom se na podlogu nanosi uzorak na jedan od dva načina: u bunar, koji je prethodno isečen u agaru ili na papirni disk, koji je prethodno postavljen, na osnovu čega se razlikuju dve metode *disk diffusion* i *well diffusion*. Nakon toga se Petrijeva šolja inkubira u odgovarajućim uslovima (npr. na 37°C u toku 24–48 sati) kako bi se omogućilo da uzorak difunduje u agar i inhibira rast ispitivanog soja mikroba, što rezultira zonom inhibicije rasta oko nanetog uzorka. Ovaj esej je jednostavan, brz i jeftin za izvođenje, ali nije prikladan za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije, jer nije moguće kvantifikovati jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću koja su difundovala u agaru.<sup>79,80</sup>

### 2.9.3. Diluciona metoda

Metoda mikro– ili makro– dilucije (eng. *broth dilution method*) je jedna od osnovnih i najčešćih metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti. Za razliku od prethodno pomenutih metoda, bioautografije i difuzione metode, ova metoda omogućava kvantitativno ispitivanje, kao i određivanje i bakteriostatskih i baktericidnih aktivnosti.<sup>79,80</sup> Procedura najčešće obuhvata dvostruko razblaživanje ispitivanog uzorka (npr. 2, 1, 0,5, 0,25 mg mL<sup>-1</sup>) u tečnom medijumu za rast koristeći mikrotitracione ploče. Zatim se svaki bunar sa uzorkom inokuliše sa ispitivanim sojem mikroorganizma. Nakon dobrog mešanja, inokulisani bunari sa mikrotitracione ploča se inkubiraju pri odgovarajućim uslovima u zavisnosti od testiranog mikroorganizma (uglavnom 24 sata na 30 ili 37°C). Antimikrobna aktivnost nekog uzorka se može okarakterisati sa dve vrednosti: minimalnom inhibitornom koncentracijom (eng. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC), koja predstavlja najnižu koncentraciju koja inhibira rast ispitivanog soja i minimalnom baktericidnom koncentracijom uzorka (eng. *Minimal Bactericidal Concentration*, MBC), koja predstavlja najnižu koncentraciju potrebnu za ubijanje određenog soja. U slučaju dilucionih metoda koriste se tetrazolijumove soli (MTT i XTT) ili resazurin, koji u skladu sa metaboličkim aktivnostima mikroorganizama dovode do konverzije boja, čime se dobija informacija o MIC i MBC vrednostima.<sup>79</sup>

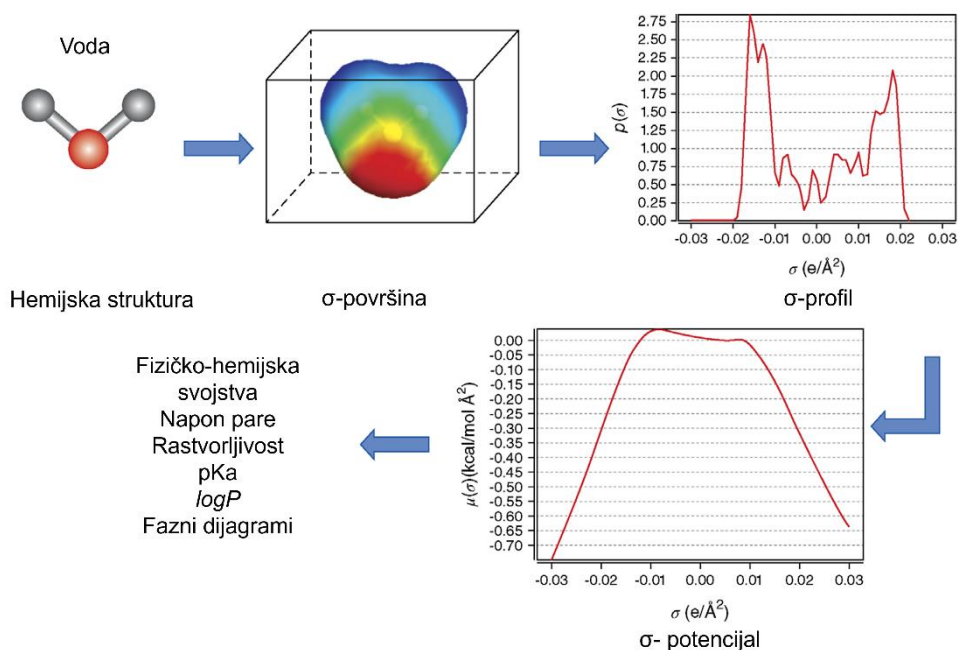
## 2.10. Molekulsko modelovanje primenom COSMO–RS softvera

Gradivne komponente eutektičkih smeša mogu da budu različita jedinjenja i procenjuje se da postoji između 10<sup>6</sup> i 10<sup>8</sup> mogućih kombinacija dvokomponentnih smeša, a osim toga moguća je priprema i trokomponentnih smeša. Uzimajući u obzir ogroman broj kombinacija HBA i HBD, nalaženje optimalne smeše za određenu primenu metodom pokušaja i greške zahteva previše vremena i resursa.<sup>22</sup> Najčešći pristup u istraživanjima koja se bave primenom eutektičkih smeša kao ekstrakcionih sredstava jeste priprema velikog broja smeša i njihova primena za izolovanje jedinjenja od interesa. Ekstrakcija određenog jedinjenja će biti najveća u eutektičkoj smeši koja pokazuje međumolekulske sile slične po jačini samom jedinjenju, odnosno ekstrakcija se zasniva na principu „slično se u sličnom rastvara”. Jedan od glavnih ciljeva trenutnih istraživanja u oblasti eutektičkih smeša jeste razumevanje ponašanja smeša na molekulskom nivou i razvoj prediktivnih modela koji mogu proceniti rastvorljivost.<sup>81</sup>

Najpopularniji modeli za predviđanje i karakterisanje svojstava eutektičkih smeša, kao i faznih ravnoteža su računarske simulacije, modeli viška Gibsove energije (eng. *excess Gibbs energy*, g<sup>E</sup>), jednačine stanja (eng. *equations of state*, EoS) i mašinsko učenje (eng. *machine learning*, ML). Modeli viška Gibsove energije predviđaju koeficijente aktivnosti i najčešće primenjivani su modeli zasnovani na COSMO–u, posebno COSMO–RS (eng. *COnductor–Like Screening MOdel for Real*

*Solvent*) i COSMO–SAC (eng. *C*Onductor–*L*ike *S*creening *M*odel *S*egment *A*ctivity *C*oefficient).<sup>27</sup> COSMO–RS je računarski model koji koristi kvantnu mehaniku i statističku termodinamiku da simulira ponašanje molekula u rastvoru, što mu omogućava da predvidi različite termodinamičke i transportne osobine tečnosti, uključujući i eutektičke smeše.<sup>82</sup>

COSMO–RS model koristi kvantno–hemijski proračun koji se zove teorija funkcionala gustine (eng. *Density functional theory* DFT) kako bi optimizovao strukturu, distribuciju naelektrisanja i pronašao minimalnu energiju sistema. Kao rezultat kvantno–hemijskog proračuna dobija se gustina naelektrisanja na površini (eng. *surface charge density*) koja se naziva  $\sigma$ –površina. Slikovito prikazano, boja  $\sigma$ –površine daje informaciju o gustini naelektrisanja u svakoj tački molekula: zelena zona odgovara nuljoj gustini naelektrisanja, plava označava gustinu pozitivnog naelektrisanja, a crvena boja označava gustinu negativnog naelektrisanja (Slika 6). Odnosno, zelena područja obično odgovaraju ugljeničnom skeletu, crvena kiseonikovim ili azotovim atomima i grupama, a plava atomima vodonika. Model dalje transformiše  $\sigma$ –površine, odnosno dobijenu raspodelu gustine naelektrisanja na površini molekula, u funkciju površinskog sastava, koja se naziva  $\sigma$ –profil. Kako bi se predvidela ponašanja molekula u tečnosti potrebno je izračunati energije interakcija pomoću statističkih termodinamičkih proračuna. Ovi proračuni omogućavaju određivanje termodinamičkih svojstava kao što su slobodna energija i hemijski potencijal. Hemijski potencijal  $\mu_i^S$  dalje omogućava predviđanje skoro svih termodinamičkih osobina jedinjenja ili smeša uključujući i rastvorljivost. Na Slici 6. prikazani su koraci u COSMO–RS proračunu.<sup>83–86</sup>



Slika 6. Koraci u COSMO–RS proračunu. Slika preuzeta iz knjige *Tools for Green Chemistry*<sup>84</sup> i prilagođena tekstu.

### 2.10.1. $\sigma$ –profili

$\sigma$ –profili predstavljaju histograme distribucije naelektrisanja na površini molekula i prikazuju kako je gustina naelektrisanja ( $\sigma$ ) raspoređena po različitim delovima površine molekula. Izgled  $\sigma$ –profila, odnosno prisustvo pikova, kao i njihova visina i širina, zavisi od strukture molekula (rasporeda atoma i funkcionalnih grupa) i njegove geometrije. Interakcije između rastvarača i rastvorene supstance uslovljene su njihovim gustinama naelektrisanja ( $\sigma$  i  $\sigma'$ ), odnosno ako rastvarač i rastvorena supstanca imaju komplementarne  $\sigma$ –profile mogu se očekivati snažne interakcije između segmenata površine koji dovode do povoljnog hemijskog potencijala,  $\mu(\sigma)$ , a samim tim dobre rastvorljivosti.  $\sigma$ –profil je

obično podeljen na tri dela: akceptorski, nepolarni i donorski region vodonične veze, što ga čini korisnim alatom za poređenje polarnosti različitih molekula.<sup>82,87</sup> Određivanje  $\sigma$ -profila igra ključnu ulogu u razumevanju solvacionog ponašanja i termodinamičkih svojstava eutektičkih smeša. Dve najčešće korišćene metode za izračunavanje  $\sigma$ -profila u COSMO-RS su individualni pristup i pseudokomponentni pristup. Individualni pristup uključuje sumiranje  $\sigma$ -profila HBD i HBA konstituenata u određenom molarnom odnosu, dok pseudokomponentni pristup razmatra supramolekulski kompleks između HBD i HBA koji je povezan vodoničnom vezom.<sup>82,82</sup>

### 2.10.2. Koeficijenti aktivnosti pri beskonačnom razblaženju

Na osnovu izračunatih  $\sigma$ -profila, COSMO-RS metoda omogućava određivanje hemijskog potencijala u tečnoj ( $\mu_i^{solv}$ ) i u gasovitoj ( $\mu_i^{gas}$ ) fazi. Pored toga definiše parametar  $\mu_i^{pure}$ , koji karakteriše hemijski potencijal jedinjenja  $i$  unutar rastvora. Koristeći ove parametre, koeficijent aktivnosti jedinjenja  $i$  može se izračunati na sledeći način<sup>82</sup>:

$$\gamma_i = e^{\frac{\mu_i^{pure} - \mu_i^{solv}}{RT}}$$

Koeficijent aktivnosti pri beskonačnom razblaženju ( $\gamma_i^\infty$ ) definisan je kao granični koeficijent aktivnosti  $\gamma_i$  kada se koncentracija rastvorene supstance  $i$  približava nuli<sup>87</sup>:

$$\gamma_i^\infty = \lim_{x_i \rightarrow 0} \gamma_i$$

Kada se izračuna koeficijent aktivnosti pri beskonačnom razblaženju ( $\gamma^\infty$ ), on se može transformisati u parametar afiniteta rastvarač-rastvorena supstanca  $\beta^\infty$  (pri čemu je  $\beta^\infty = 1/\gamma^\infty$ ), koji je proporcionalan rastvorljivosti jedinjenja.<sup>88</sup>

## 2.11. Procena ekološke prihvatljivosti analitičke metode

Dvanaest principa zelene analitičke hemije pruža smernice za postizanje što veće ekološke prihvatljivosti analitičkog procesa. Primena ovih principa je podstakla razvoj novih metoda, koje je potrebno proceniti sa aspekta njihove „zelenosti“, odnosno ekološke prihvatljivosti. Sa razvojem zelenih metoda pojavili su se i brojni metrički alati za procenu stepena usklađenosti metode sa principima zelene analitičke hemije. Ovi alati omogućavaju poređenje novo razvijenih metoda sa postojećim, čime se olakšava odabir najbezbednijih opcija. Neki od najčešće korišćenih alata za procenu ekološke prihvatljivosti analitičkih metoda su sledeći<sup>8,89</sup>:

- Eko-skala (eng. *Eco-scale*);
- Nacionalni indeks uticaja metode (eng. *National Environmental Methods Index*, NEMI);
- Indeks zelenosti analitičkih postupaka (eng. *Green Analytical Procedure Index*, GAPI);
- Analitički kalkulator zelenila metode (eng. *Analytical Greenness Calculator*, AGREE).

### 2.11.1. Eko-skala

Eko-skala je jedan od alata za evaluaciju uticaja analitičkih metoda na životnu sredinu, koja može biti korisna za pronalaženje i poboljšanje najslabijih karika u metodi.<sup>7</sup> Ona predstavlja sistem ocenjivanja na skali bodova u kojem idealna zelena metoda ima inicijalno 100 poena, a svako odstupanje rezultuje dobijanjem kaznenih poena.<sup>8</sup> Kazneni poeni se mogu dodeliti za upotrebu velikih količina hemikalija ili opasnih hemikalija, za veliku potrošnju energije, za opasnost na radu i stvaranje otpada. Način bodovanja i dobijanje kaznenih poena prikazan je u Tabeli 1. Kazneni poeni za svaki reagens se izračunavaju množenjem broja piktograma opasnosti (nalaze se na reagens boci) sa stepenom opasnosti, pri čemu se za „upozorenja“ množi sa 1, a za „opasnosti“ sa 2. Konačni rezultat analitičke procene primenom Eko-skale je broj između 0 i 100 i ako je rezultat veći od 75 procenjena metoda predstavlja odličnu zelenu metodu, ako je između 50 i 75 metoda je prihvatljiva, a ako je manji od 50 metoda je neadekvatna. Prednosti analitičke Eko-skale su: jednostavnost izračunavanja

rezultata, lakoća poređenja analitičkih procedura i uključivanje različitih aspekata uticaja na životnu sredinu u njenu procenu. Međutim konačni rezultat ne daje informacije o razlogu negativnog uticaja analitičkog postupka na životnu sredinu, kao što su upotreba rastvarača, reagenasa, opasnost na radu ili stvaranje otpada. U poređenju sa NEMI piktogramom, analitička Eko–skala pruža informacije o uticaju analitičkih procedura na životnu sredinu na kvantitativni način, uzimajući se u obzir količine reagenasa i otpada, a ne samo prisustvo ili odsustvo opasnosti.<sup>89–91</sup>

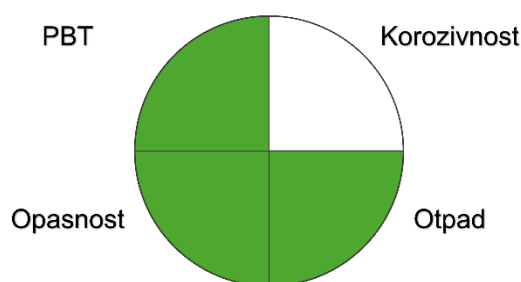
Tabela 1. Način bodovanja i izračunavanje rezultata primenom Eko–skale.

		Međuzbir kaznenih poena	Ukupan broj kaznenih poena
Reagensi			
Količina	<10 mL (<10 g)	1	kazneni poeni za količinu ×
	10–100 mL (10–100 g)	2	
	>100 mL (>100 g)	3	
Opasnost	Nema	0	kazneni poeni za opasnost
	Nizak nivo	1	
	Visok nivo	2	
Instrumenti			
Energija	<0,1 kWh po uzorku		0
	<1,5 kWh po uzorku		1
	>1,5 kWh po uzorku		2
Opasnost na radu	Hermetizacija analitičkog procesa		0
	Emisija para u atmosferu		3
Otpad	Nema		0
	<1 mL (<1 g)		1
	1–10 mL (1–10 g)		3
	>10 mL (>10 g)		5
	Recikliranje		0
	Degradacija		1
	Pasivacija		2
Bez tretmana		3	

### 2.11.2. Nacionalni indeks uticaja metode (NEMI)

Nacionalni indeks uticaja metode (NEMI) predstavlja jedan od najstarijih alata za procenu ekološke prihvatljivosti analitičkih procedura. NEMI piktogram predstavlja krug koji se sastoji od 4 polja i svako polje odražava jedan od aspekata analitičke metodologije. Prvo polje, odnosno prvi uslov koji metoda mora da ispuni jeste da nijedna od upotrebljenih hemikalija nije prisutna na listi otpornih, bioakumulativnih i toksičnih hemikalija (eng. *Persistent, Bioaccumulative and Toxic*– PBT). Drugi uslov je da se nijedna od hemikalija primenjenih u postupku se ne nalazi na listama opasnog otpada. Treći zahtev je da pH vrednost sistema bude u opsegu između 2 i 12, kako bi se izbeglo visoko korozivno okruženje tokom celog analitičkog procesa. Četvrti uslov je da se tokom postupka proizvede manje od 50 g otpada. Glavna prednost NEMI piktograma je što se lako može pročitati, odnosno jednim pogledom na NEMI piktogram možemo dobiti informaciju o uticaju svakog individualnog aspekta analitičke procedure na životnu sredinu. Glavni nedostatak NEMI piktograma je što ne prikazuje da li je svaka pretnja ispod ili iznad određene vrednosti, zbog čega se ne može smatrati semikvantitativnom. Drugi nedostatak je da popunjavanje NEMI piktograma oduzima mnogo vremena, jer je potrebno da se svaka hemikalija proveriti da li je prisutna bar na jednoj od nekoliko lista. Polja na piktogramu mogu biti obojena na skali od dve boje: crvena i zelena, dok je

moguća i upotreba skale sa tri boje crvena, žuta i zelena. Ova modifikacija čini procenu NEMI procedure kvantitativnijom.<sup>8,89-91</sup>



Slika 7. Primer NEMI piktograma.

### 2.11.3. Indeks zelenosti analitičkih postupaka (GAPI)

Uzimajući u obzir prednosti i mane prethodno navedenih alatki za procenu ekološke prihvatljivosti razvijena je nova alatka, nazvan GAPI (eng. *Green Analytical Procedure Index*– Indeks zelenosti analitičkih postupaka). GAPI procenjuje ekološku prihvatljivost čitave analitičke metodologije, od prikupljanja uzoraka do analitičkog određivanja. Kreiran je korišćenjem NEMI piktograma i analitičke Eko–skale i pruža kvalitativne i semikvantitativne informacije.<sup>92,93</sup>

### 2.11.4. Analitički kalkulator zelenila (AGREE)

Analitički kalkulator zelenila (eng. *Analytical Greenness Calculator*, AGREE) je osmišljen sa ciljem da se razvije što je moguće zelenija analitička metodologija, koja će poštovati svaki od 12 principa zelene analitičke hemije. Svaki princip se transformiše u skor u opsegu od 0 do 1, a konačna ocena metode se dobija procenom svih principa. Kao rezultat procene dobija se piktogram nalik satu, gde su konačni skor i odgovarajuća boja prikazani u sredini, a skorovi svakog od 12 principa prikazani su kao segmenti oko središnjeg dela, dok je težina svakog principa predstavljena širinom segmenta. Svaki segment je obojen u skladu sa svojom ekološkom prihvatljivošću na skali boja od tamno zelene do crvene. Na ovaj način se lako može proceniti zelenost metode u pogledu 12 principa zelene analitičke hemije kao i celokupne procedure.<sup>91,94</sup> Obzirom da se priprema uzoraka smatra najmanje zelenim korakom analitičkog procesa, razvijene su alatke koje procenjuju samo ovaj korak. AGREEprep je prva alatka napravljena za procenu ekološke prihvatljivosti analitičke pripreme uzorka i procena pomoću AGREEprep–a je jednostavna za izvođenje i efikasna.<sup>95</sup>

## 2.12. Hemometrija

Hemometrija je hemijska disciplina koja integriše matematičke i statističke metode kako bi razvila i izabrala optimalne procedure tokom hemijske analize, ili kako bi se maksimalno iskoristile hemijske informacije analizom podataka. Statistička analiza podataka obuhvata njihovu obradu, analizu i prezentovanje rezultata, a sastoji se iz više faza koje uključuju deskriptivnu i inferencijalnu (statističko ocenjivanje i testiranje statističkih hipoteza) statistiku, kao i analizu matrice podataka (eksperimentalni dizajn, prepoznavanje obrazaca, klasifikacija i regresija).<sup>96</sup>

Deskriptivna statistika je deo statističke analize koji se koristi za prikupljanje, sistematizovanje, prikazivanje i određivanje parametara neke slučajno promenljive. Ovaj deo statističke analize koristi se za opisivanje (deskripciju) podataka pomoću numeričkih vrednosti prikazanih kroz tablice, grafikone ili određene reprezentativne vrednosti. Njen zadatak je da ilustruje (proceni) karakteristike populacije.<sup>96,97</sup> Inferencijalna statistika je deo statističke analize koji obuhvata statističke metode koje se bave donošenjem zaključaka o vrednostima parametara osnovnog skupa na osnovu informacija dobijenih iz uzorka. Najčešće se izvodi kroz testiranje statističkih hipoteza. Testovi značajnosti mogu

biti parametrijski i neparametrijski i njihova upotreba zavisi od toga da li postoji normalna distribucija podataka, što je slučaj kod parametrijskih testova ili ne, kad se primenjuju neparametrijski testovi.<sup>96,97</sup>

Tehnike analize matrice podataka se koriste za simultanu analizu međusobnog odnosa velikog broja varijabli (više od dve) na bazi određenog modela. Ove tehnike omogućavaju otkrivanje zakonitosti u odnosima promenljivih koje su skrivene ili jedva primetne. Dele se na tehnike zavisnosti i tehnike međuzavisnosti. Kod tehnika zavisnosti identifikuje se uticaj nezavisnih varijabli na zavisne (rezultujuće) varijable. U ovu grupu spadaju klasifikacione i regresione tehnike diskriminantne analize i višestruke regresije. Tehnike međuzavisnosti koriste se za utvrđivanje odnosa između promenljivih u cilju pronalaženja grupa varijabli koje su slične u svojim varijabilitetima a čije grupisanje ima određeni smisao. U ovu grupu spadaju tehnike prepoznavanja obrazaca ponašanja kao što su analiza glavnih komponentata i klusterska analiza. U okviru doktorske disertacije analiza glavnih komponentata biće primenjena na matrice podataka dobijene nakon hemijskih analiza te će u nastavku biti detaljnije objašnjena.

Analiza glavnih komponentata (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) se koristi u cilju vizualizacije podataka, prevođenja visoko-korelisanih varijabli u manji set nekorelisanih varijabli koje se mogu koristiti u daljoj statističkoj analizi i razdvajanja značajnih informacija sadržanih u podacima od onih koje su manje bitne. Ovom metodom se formira novi koordinatni sistem sačinjen od međusobno normalnih latentnih varijabli (komponentata) usmerenih na pravac najvećeg varijabiliteta među podacima.<sup>97,98</sup> Interpretacija rezultata PCA se obično vrši vizuelizacijom dobijenih podataka pomoću grafika skorova (eng. *score plot*) i grafika vektora latentnih varijabli (eng. *loading plot*). Grafika skorova prikazuje linearnu projekciju objekata na glavne komponente i omogućava vizuelizaciju grupisanja objekata (uzoraka) na osnovu sličnosti i razlika, kao i prisustva spoljašnjih vrednosti. Grafik vektora latentnih varijabli prikazuje korelaciju između latentnih varijabli, identifikuje koje varijable imaju najveći doprinos na svaku glavnu komponentu i daje uvid u mehanizam razdvajanja i ponašanje objekata u primenjenim sistemima.<sup>96</sup>

Jedna od strategija zelene analitičke hemije, uz integraciju analitičkih sistema, smanjenu upotrebu reagensa i minijaturizaciju analitičkih metoda, jeste i primena hemometrije radi smanjenja broja uzoraka i broja eksprimenata.<sup>7</sup> Pored toga, korišćenje hemometrijskih metoda, poput klusterske analize i analize glavnih komponentata, omogućava grupisanje promenljivih ili objekata i identifikaciju sličnih uzoraka, što pomaže u pronalaženju zelenijih alternativa u različitim procesima.<sup>99</sup>

### 3. Eksperimentalni deo

#### 3.1. Uzorci

Uzorci lekovitog bilja, odnosno petrovca (latinski naziv: *Agrimonia eupatoria* L.) i podubice (latinski naziv: *Teucrium chamaedrys* L.) kupljeni su u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u obliku osušenih nadzemnih delova biljke. Uzorci su dodatno usitnjeni u prah koristeći mlin za kafu (Bosch, model TSM6A017C) i čuvani u zatvorenim posudama na sobnoj temperaturi do analize.

Uzorak propolisa je sakupljen u Ubu, tokom 2021. godine, metodom struganja sa prednjeg dela košnice i čuvan u staklenoj tegli. Pre same analize uzorak propolisa je usitnjen nožem.

Aronija i borovnica su sakupljene u leto 2021. u Kraljevu i Valjevu, dok je sušena crna godži bobica kupljena u lokalnoj prodavnici u Beogradu, a deklarirana je da je poreklom iz Kine. Sveži uzorci aronije i borovnice su sušeni u struji toplog vazduha tokom 5 dana, na temperaturi od 40°C pomoću dehidratora za hranu (Gorenje, model FDK500GCV). Svi uzorci bobičastog voća su samlevani u prah korišćenjem mlina za kafu i čuvani u zatvorenim posudama na sobnoj temperaturi do analize.

#### 3.2. Hemikalije i materijali

*Hemikalije korišćene za pripremu eutektičkih smeša, ekstrakciju i prečišćavanje:* Holin–hlorid, L–prolin, L–glicin, L–lizin, L–tirozin, limunska kiselina, jabučna kiselina, tiourea i natrijum–acetat su nabavljeni od *Sigma Aldrich–a* (Sent Luis, Misuri, SAD). Mlečna i vinska kiselina su kupljene od *ICN Biomedicals* (Aurora, Ohajo, SAD), dok je maleinska kiselina kupljena od *Acros Organics* (Gel, Belgija). Urea i askorbinska kiselina su kupljene od *Betahema* (Beograda, Srbija). Glukoza i fruktoza su nabavljene od *Centrohema* (Stara Pazova, Srbija). Ćilibarna kiselina je kupljena od *Merck–a* (Darmštat, Nemačka), dok je glicerol kupljen od *Zorka Pharma* (Šabac, Srbija). Oksalna kiselina je kupljena od *Lach–Ner–a* (Neratovice, Češka), dok je etilen glikol kupljen od *Thermo Fisher Scientific–a* (Bremen, Nemačka). Oktadecil kolone (*Cartridge Bond Elut C18*) korišćene za prečišćavanje ekstrakta su kupljene od *Agilent Technologies* (Santa Klara, Kalifornija, SAD).

*Hemikalije korišćene za spektrofotometrijske testove:* Folin–Ćikalteov (eng. *Folin–Ciocalteu*, FC) reagens je kupljen od *Carlo Erba reagents* (Milano, Italija), dok je aluminijum–hlorid kupljen od *Acros Organics* (Gel, Belgija). Natrijum–karbonat, natrijum–nitrit, natrijum–hidroksid, troloks, galna kiselina, kvercetin, 2,2–difetil–1–pikrilhidrazil radikal (DPPH) i metanol su kupljeni od *Sigma Aldrich–a* (Sent Luis, Misuri, SAD).

*Hemikalije korišćene za HPTLC analizu:* Etil–acetat i toulen su kupljeni od *Zorka Pharma* (Šabac, Srbija), dok su hlorovodonična kiselina, sirćetna kiselina, sumporna kiselina i 2–butanon nabavljeni od *Centrohema* (Stara Pazova, Srbija), a mravlja kiselina je kupljena od *Lach–Ner–a* (Neratovice, Češka). Polietilen glikol 400 (PEG) kupljen je od *Merck–a* (Darmštat, Nemačka), dok su 2–aminoetil difetilborinat (Neu–ov reagens), anisaldehyd i metanol kupljeni od *Sigma Aldrich–a* (Sent Luis, Misuri, SAD).

*Hemikalije korišćene za UHPLC analizu:* Standardi fenola: galna kiselina (GA), protokatehuinska kiselina (PCA), siringinska kiselina (SA), hlorogena kiselina (CGA), neohlorogena kiselina (NCGA), *p*–hidroksibenzoeva kiselina (PHBA), eskuletin (AE), kofeinska kiselina (CA), izoorientin (ISO), izoramnetin (ISR), rutin (RUT), viteksin (VIT), izokvercetin (IQUE), *p*–kumarinska kiselina (PCOA), kvercitrin (QR), astragalin (AST), ruzmarinska kiselina (RA), luteolin (LUT), kvercetin (QUE), naringenin (NAR), kampferol (KMP), hispadulin (HPD), pinocembrin (PIN), hrizin (CHR), hesperetin (HES), eriodiktol (ED), dihidrokampferol (DHK), hiperozid (HYP), izorametin–3–O–rutinozid (I3R), izorametin–3–O–glukozid (I3G), epikatehin (EC), kampferol–3–O–glukozid (K3G), miricetin (MYR), galangin (GAL), delfidin–3–O–glukozid (D3G), cijanidin–3–O–soforozid (C3S),

cijanidin-3,5-di-O-glukozid (C3,5-diG), malvidin-3,5-di-O-glukozid (M3,5-diG), cijanidin-3-O-glukozid (C3G), cijanidin-3-O-rutinozid (C3R), cijanidin-3-O-sambubiozid (C3S), cijanidin-3-O-arabinozid (C3A), pelargonidin-3-O-glukozid (P3O), peonidin-3-O-glukozid (P3G) i malvidin-3-O-glukozid (M3G) su nabavljeni od *Sigma-Aldrich*-a (Štajnhajm, Nemačka). Acetonitril HPLC čistoće je takođe kupljen od *Sigma-Aldrich*-a (Štajnhajm, Nemačka).

*Hemikalije korišćene za mikrobiološku analizu:* Kosi hranljivi agar je nabavljen od *Lab M*-a (Buri, UK), dok su tripton LP0042 i ekstrakt kvasca kupljeni od *Oxoid LTD*-a (Bejzingstouk, UK). Triton X-100 je nabavljen od *Sigma-Aldrich*-a (Štajnhajm, Nemačka). BHA hranljiva podloga je nabavljena od *Oxoid Limited*-a (Ujedinjeno Kraljevstvo), TSA i TSB hranljive podloge kupljene su od *Merck*-a (Darmštat, Nemačka), dok je BHI medijum kupljen od *Biomedics*-a (Madrid, Španija). Fosfatni fiziološki pufer (eng. *phosphate saline buffer*, 1 × PBS) je od *Sigma-Aldrich*-a (Štajnhajm, Nemačka).

### 3.3. Priprema prirodnih eutektičkih smeša

Komponente koje grade eutektičku smešu, odnosno donor i akceptor vodonične veze, odmerene su u erlenmajeru u određenom molskom odnosu (1:1, 1:2, 1:3 ili 2:5) i zagrevane su na 80°C uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici tokom 30 minuta. Potom je u formiranu eutektičku smešu dodata voda u određenom masenom udelu (20%, 30%, 40% ili 50%, w/w) i mešanje je nastavljeno još 30 minuta. Tako dobijene smeše su korišćene za ekstrakciju. Pregled pripremljenih eutektičkih smeša, molski odnos komponenata i sadržaj vode, dat je u odeljku Rezultati i diskusija.

### 3.4. Ekstrakcije bioaktivnih komponenata primenom prirodnih eutektičkih smeša i konvencionalnih rastvarača

*Lekovito bilje:* U erlenmajeru je odmereno oko 500 mg uzorka i pomešano je sa 5 mL prethodno pripremljene eutektičke smeše. Ekstrakcija je vršena na 50°C uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici tokom 45 minuta. Po završenoj ekstrakciji, tečna faza je odvojena od biljnog materijala centrifugiranjem na 10 000 obrtaja po minuti tokom 15 minuta (Thermo Scientific SL 16 centrifuge, Voltam, SAD). Supernatant je dalje prečišćen pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi. Kao konvencionalni rastvarač je korišćen metanol, a ekstrakcija je rađena na identičan način kao i sa eutektičkim smešama.

*Propolis:* Oko 500 mg propolisa je odmereno u erlenmajer i dodato je 5 mL prethodno pripremljene eutektičke smeše. Ekstrakcija je vršena tokom 60 minuta konstantnim mešanjem i zagrevanjem na 50°C pomoću magnetne mešalice. Po završenoj ekstrakciji, tečna faza je odvojena od uzorka centrifugiranjem na 10 000 obrtaja po minuti tokom 15 minuta. Supernatant je dalje prečišćen pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi. Kao konvencionalni rastvarači su korišćeni glicerol i 1% (w/v) rastvor limunske kiseline u vodi koji je poznat kao GRAS rastvarač (eng. *generally recognized as safe*, GRAS – opšte priznat kao bezbedan). Ekstrakcija sa konvencionalnim rastvaračima je vršena na identičan način kao i sa eutektičkim smešama.

*Bobičasto voće:* U konusnu kivetu za centrifugu odmereno je oko 200 mg uzorka i dodato je 2 mL prethodno pripremljene eutektičke smeše. Ekstrakcija je vršena na ultrazvučnom kupatilu tokom 30 minuta na 50°C. Po završenoj ekstrakciji, a pre centrifugiranja, dodato je 4 mL vode kako bi se olakšalo razdvajanje faza, a potom je ekstrakciona smeša centrifugirana na 10 000 obrtaja po minuti tokom 15 minuta. Supernatant je dalje prečišćen pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi. Kao konvencionalni rastvarači su korišćeni metanol zakiseljen hlorovodoničnom kiselinom (0,01%, v/v), kao i 1% (w/v) rastvor limunske kiseline u vodi. Ekstrakcija sa konvencionalnim rastvaračima je vršena na identičan način kao i sa eutektičkim smešama.

### 3.5. Metode prečišćavanja ekstrakata

Prečišćavanje supernatanta posle ekstrakcije i uklanjanje komponenata eutektičkih smeša je rađeno pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi. Kao sorbent su korišćene oktadecil kolone od 500 mg. Kondicioniranje sorbenta je urađeno sa 5 mL metanola i 5 mL vode u slučaju ekstrakata lekovitog bilja i propolisa, dok je slučaju ekstrakata bobičastog voća kondicioniranje rađeno sa zakiseljenim metanolom (0,01% v/v hlorovodonična kiselina) i vodom. Nakon nanošenja 3 mL uzorka na kertridž, ispiranje neadsorbovanih jedinjenja i komponenata eutektičkih smeša vršeno je sa 10 mL vode, u slučaju ekstrakata lekovitog bilja i propolisa, odnosno zakiseljene vode (0,01%, v/v hlorovodonična kiselina), u slučaju ekstrakata bobičastog voća. Bioaktivna jedinjenja su eluirana sa 3 mL i 6 mL metanola, u slučaju uzoraka lekovitog bilja i propolisa, redom, odnosno sa 3 mL zakiseljenog metanola (0,01%, v/v hlorovodonična kiselina) kod uzoraka bobičastog voća. Dobijeni metanolni ekstrakti su čuvani u zamrzivaču na  $-20^{\circ}\text{C}$  u tamnim staklenim vijalama do dalje analize.

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata bobičastog voća rastvarač je uparen do suva korišćenjem vakuum uparivača (IKA-Verke HB4 basic, Štaufen, Nemačka). Dobijeni suv ekstrakt je rastvoren u zakiseljenom metanolu (0,01%, v/v hlorovodonična kiselina) kako bi ekstrakti imali konačnu koncentraciju od  $20\text{ mg mL}^{-1}$ .

### 3.6. Hemijska karakterizacija ekstrakata

#### 3.6.1. Spektrofotometrijska određivanja

Svi spektrofotometrijski eseji su izvođeni na GBC UV-Visible Cintra 6 spektrofotometru (Dandenong, Australija) i merenja su rađena u duplikatu. Prethodno pripremljeni ekstrakti su razblaženi odgovarajući broj puta kako bi ušli u kalibracioni opseg (uglavnom 10, 20 ili 50 puta). Rezultati su prikazani sa pripadajućom greškom (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija).

*Određivanje ukupnog sadržaja polifenola:* Ukupan sadržaj polifenola (eng. *Total Phenolic Content*, TPC) u analiziranim ekstraktima je određen korišćenjem FC reagensa, prema postupku opisanom u literaturi.<sup>100</sup> Ispitivani ekstrakti (0,5 mL) su razblaženi destilovanom vodom (0,5 mL) i dodato je 2,5 mL FC reagensa (10% v/v). Posle 5 minuta dodato je 2,0 mL rastvora natrijum-karbonata (7,5% w/v). Dobijeni rastvori su inkubirani tokom 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega je merena apsorbancija na 765 nm. Galna kiselina je korišćena kao standard u opsegu koncentracija od 20 do  $120\text{ mg L}^{-1}$ . Rezultati su izraženi kao TPC vrednosti u gram-ekvivalentima galne kiseline po kilogramu suvog uzorka ( $\text{g GAE kg}^{-1}$ ).

*Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida:* Ukupni sadržaj flavonoida (eng. *Total flavonoid content*, TFC) u analiziranim ekstraktima je određen metodom sa aluminijum-hloridom opisanoj u literaturi.<sup>101</sup> Ispitivani ekstrakti (0,3 mL) su razblaženi sa 3,4 mL 30% (v/v) rastvora metanola, a zatim je dodato 0,15 mL  $0,5\text{ mol L}^{-1}$  rastvora natrijum-nitrita i 0,15 mL  $0,3\text{ mol L}^{-1}$  rastvora aluminijum-hlorida. Nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi, dodato je 1,0 mL  $1\text{ mol L}^{-1}$  rastvora natrijuma-hidroksida. Apsorpcija je merena na 506 nm. Kvercetin je korišćen kao standard u opsegu koncentracija  $10 - 500\text{ mg L}^{-1}$ . Rezultati su izraženi kao TFC vrednosti u gram-ekvivalentima kvercetina po kilogramu suvog uzorka ( $\text{g QUE kg}^{-1}$ ).

*Određivanje ukupnog sadržaja antocijana:* Ukupni sadržaj antocijana (eng. *Total anthocyanin content*, TAC) u analiziranim ekstraktima određen je pH diferencijalnom metodom.<sup>74</sup> Ispitivani ekstrakti (0,3 mL) su razblaženi sa 1,2 mL pufera pH = 1,0 (kalijum-hlorid,  $0,025\text{ mol L}^{-1}$ ) ili 1,2 mL pufera pH = 4,5 (natrijum-acetat,  $0,4\text{ mol L}^{-1}$ ) i rastvor je inkubiran 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorpcija svake probe, jedne razblažene puferom pH = 1,0 i druge razblažene puferom pH = 4,5, merene su na dve talasne dužine, 520 i 700 nm. Ukupni sadržaj antocijana izražen je kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (cyd-3-glu,  $\text{mg L}^{-1}$ ) i izračunat kao:

$$TAC = \frac{A \times MM \times FR \times 10^3}{\varepsilon \times l}$$

gde je:  $A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH=1,0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH=4,5}$

$MM$  (molekulska masa) = 449,2 g mol<sup>-1</sup> za cijanidin-3-glukozid

$FR$  = faktor razblaženja

$l$  = dužina puta (cm)

$\varepsilon$  = 26 900 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, molarni koeficijent apsorpcije za cijanidin-3-glukozid.

Rezultati su izraženi kao TAC vrednosti u gram-ekvivalentima cijanidin-3-glukozida po kilogramu suvog uzorka (g cyd-3-glu kg<sup>-1</sup>).

*Određivanje antioksidativnog kapaciteta:* Određivanje antioksidativnog kapaciteta (eng. *Radical scavenging activity*, RSA) je vršeno primenom eseja sa DPPH radikalom.<sup>102</sup> Ispitivani ekstrakti (0,1 mL) su pomešani sa 4 mL 79 mmol L<sup>-1</sup> metanolnog rastvora DPPH. Posle inkubacije od 1 h na sobnoj temperaturi u mraku, apsorpcija je merena na 517 nm. Troloks je korišćen kao standard u opsegu koncentracija od 100 do 600 mmol L<sup>-1</sup>. Rezultati su izraženi kao milimolovi troloks ekvivalenta (TE) po kilogramu suvog uzorka (mmol TE kg<sup>-1</sup>).

### 3.6.2. Visoko-efikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC)

Za analizu i razdvajanje ekstrahovanih jedinjenja primenom visoko-efikasne tankoslojne hromatografije kao stacionarna faza su korišćene staklene ploče silika gela (HPTLC plate silica gel 60 F254, Merck, Darmštat, Nemačka), dimenzija 20 cm × 10 cm, dok je sastav mobilne faze optimizovan i bio je različit za svaki matriks. Određena zapremina ispitivanih ekstrakata naneta je na HPTLC ploče kao trake od 6 ili 8 mm korišćenjem Linomat-a 5 (CAMAG, Mutenc, Švajcarska) i Hamilton šprica od 100 μL (Bonaduz, Švajcarska). Za razdvajanje je korišćena hromatografska kada sa dva kanala, dimenzija 20 cm × 10 cm (CAMAG, Mutenc, Švajcarska). U svaki kanal je dodato po 6 mL mobilne faze i vreme sićenja kade sa parama rastvarača je bilo 5 minuta. Front rastvarača je bio 80 mm. Nakon razdvajanja pločice su sušene u struji toplog vazduha tokom 5 minuta.

*Lekovito bilje:* Radi što boljeg razdvajanja fenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima lekovitog bilja, rađena je optimizacija sastava mobilne faze. Kao stacionarna faza je korišćen silika gel, dok je sastav ispitivanih mobilnih faza naveden u Tabeli 2. Za razdvajanje ekstrakata petrovca odabrana je mobilna faza koja se sastojala od etil-acetata, vode i mravlje kiseline u zapreminskom odnosu 17/2/2 (v/v/v) (MF 5), dok je u slučaju ekstrakata podubice odabrana smeša etil-acetat/voda/mravlja kiselina (17/2/4, v/v/v) (MF 7). U oba slučaja zapremina nanetih ekstrakta je bila 2 μL.

Tabela 2. Sastav mobilne faze za razdvajanje uzoraka lekovitog bilja.

Redni broj	Sastav mobilne faze	Zapreminski odnos	Literatura
MF 1	Etil-acetat/toluen/mravlja kiselina	10/2/1	103
MF 2	Etil-acetat/voda/mravlja kiselina/sirćetna kiselina	60/26/11/11	104
MF 3	Etil-acetat/voda/mravlja kiselina	17/2/2	—
MF 4	Toluen/etil-acetat/mravlja kiselina	5/4/1	105
MF 5	Etil-acetat/toluen/voda/mravlja kiselina	7/1/1/1	—
MF 6	Etil-acetat/2-butanon/mravlja kiselina/voda	5/3/1/1	106
MF 7	Etil-acetat/voda/mravlja kiselina	17/2/4	—

*Propolis:* U slučaju razdvajanja fenolnih jedinjenja u ekstraktima propolisa korišćena je mobilna faza opisana u literaturi (*n*-heksan/etil-acetat/sirćetna kiselina, 5:3:1, v/v/v).<sup>107</sup> U drugi kanal hromatografske kadice umesto mobilne faze dodata je koncentrovana hlorovodonična kiselina (37%, w/w). Zapremina ekstrakata nanetih na ploču je bila 4 μL.

*Bobičasto voće*: Prilikom optimizacije sastava mobilne faze za razdvajanje fenolnih jedinjenja iz ekstrakata bobičastog voća isprobano je devet mobilnih faza čiji je sastav naveden u Tabeli 3. Odabrana mobilna faza se sastojala od etil–acetata, vode, sirćetne kiseline i mravlje kiseline u odnosu 100/27/11/11 (v/v/v/v). Zapremina ekstrakata nanetih na ploču je bila 15 µL.

Tabela 3. Sastav mobilne faze za razdvajanje uzoraka bobičastog voća.

Redni broj	Sastav mobilne faze	Zapreminski odnos	Literatura
MF 1	Etil–acetat/metanol/sirćetna kiselina/mravlja kiselina/voda	27/2/2/2/2	108
MF 2	Etil–acetat/2–butanon/mravlja kiselina/voda	7/3/1,2/0,8	109
MF 3	Etil–acetat/2–butanon/mravlja kiselina/voda	5/3/2/1	110
MF 4	Etil–acetat/voda/sirćetna kiselina/mravlja kiselina	100/27/11/11	111
MF 5	Etil–acetat/sirćetna kiselina/mravlja kiselina/voda	5/2/2/1	modif. MF 3
MF 6	Etil–acetat/voda/sirćetna kiselina/mravlja kiselina	100/35/11/11	modif. MF 4
MF 7	Etil–acetat/voda/mravlja kiselina	100/30/20	112
MF 8	Toluen/etil–acetat/mravlja kiselina	5/4/1	105
MF 9	Etil–acetat/2–butanon/mravlja kiselina/sirćetna kiselina/voda	5/3/2/2/1	modif. MF 3

U svrhu vizuelizacije fenolnih jedinjenja, pločice su derivatizovane Neu–ovim reagensom (0,5%, w/w rastvor 2–aminoetil–difetilborinata u metanolu) i PEG–om (5%, w/w rastvor polietilenglikola u metanolu). Nakon razvijanja, pločica je zagrevana na 120 °C tokom 10 minuta, a potom uronjena u rastvor Neu–ovog reagensa tokom 1 sekunde koristeći uređaj za uranjanje (CAMAG Chromatogram Immersion Device 3, Mutenc, Švajcarska). Nakon derivatizacije pločica je osušena u struji toplog vazduha tokom 5 minuta. Potom je ista procedura ponovljena prilikom uranjanja pločice u rastvor PEG–a, u cilju poboljšanja intenziteta fluorescencije i stabilizacije zona. Zone koje odgovaraju fenolnim jedinjenjima su vizuelizovane dokumentovanjem na 366 nm pomoću kamere mobilnog telefona (Samsung S21, Samsung Electronics, rezolucija zadnje kamere 64 megapiksela), a fotografije hromatograma su sačuvane u JPEG formatu radi dalje obrade.

Radi dobijanja metaboličkih profila, odnosno vizulizacije različitih klasa jedinjenja na ploči, korišćen je neselektivan reagens anisaldehyd/sumporna kiselina.<sup>113</sup> Reagens je pripremljen tako što je 0,5 mL *p*–anisaldehyda pomešano sa 10 mL glacialne sirćetne kiseline, a zatim je dodato 85 mL metanola i 5 mL koncentrovane sumporne kiseline. Derivatizacija je urađena uranjanjem prethodno zagrejene pločice u rastvor reagensa tokom 1 sekunde koristeći CAMAG uređaj za uranjanje. Nakon toga, pločica je osušena u struji toplog vazduha tokom 5 minuta i potom zagrejana na 110 °C do pojave zona. Zone su dokumentovane na vidljivoj svetlosti, a fotografije hromatograma su sačuvane u JPEG formatu radi dalje obrade.

### 3.6.3. Ultra–efikasna tečna hromatografija (UHPLC)

Kvantifikacija fenola i antocijana u uzorcima je urađena korišćenjem sistema tečne hromatografije ultra visokih performansi (eng. *Ultra High–Performance Liquid Chromatography*– UHPLC) koji se sastojao od kvaternarne *Accela 600* pumpe i *Accela* autosamplera (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka).<sup>114</sup> UHPLC sistem je bio povezan sa masenim spektrometrom, koji poseduje trostruki kvadrupol kao detektor (eng. TSQ Quantum Access Max triple–quadrupole mass spectrometer) i elektrosprej sa temperaturom isparivača od 200°C kao jonski izvor (eng. *heated electrospray ionization*– HESI). Dodatna podešavanja jonskog izvora su bila sledeća: napon raspršivanja 5000 V, pritisak gasa (N<sub>2</sub>) 40 AU, pritisak gasa za čišćenje jona 1 AU i pritisak pomoćnog gasa (N<sub>2</sub>) 8 AU, temperatura kapilara 300°C i pomeranje skimera 0 V. Fenoli su određeni u negativnom, a antocijani u pozitivnom jonizacionom modu masenog spektrometra. Za hromatografsko odvajanje je korišćena

*Synchronis* C18 kolona (dimenzija 100 × 2,1 mm, veličina čestica 1,7 mm), koja je bila zagrejana na 40°C, dok se mobilna faza sastojala od (A) voda + 0,1% v/v mravlja kiselina i (B) acetonitril, a brzina protoka je podešena na 0,25 mL/min. Program linearnog gradijenta je bio sledeći: 0,0 – 1,0 min 5% B, 1,0 – 14,0 min od 5% do 95% (B), 14,0 – 14,1 min od 95% do 5% (B), i 5% (B) tokom 6 min. Injektovana zapremina uzorka je bila 5 µL. Fenoli i antocijani su identifikovani direktnim poređenjem sa komercijalnim standardima. Koncentracije svakog jedinjenja su izračunate integraljenjem površina ispod pikova i izražene kao mg L<sup>-1</sup>.

### 3.7. Biološka karakterizacija ekstrakata

#### 3.7.1. Difuziona metoda u bunarićima

Antimikrobna aktivnost odabranih ekstrakata bobičastog voća određena je difuzionom metodom u bunarićima prema 12 bakterijskih sojeva: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 1177, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, meticilin–rezistentan soj *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enterica* ATCC 13076 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Antimikrobna aktivnost ekstrakata propolisa ispitana je protiv sedam referentnih sojeva uključujući tri gram–pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, meticilin–rezistentan *S. aureus* (MRSA) 33591 i *L. monocytogenes* ATCC 19111; tri gram–negativne bakterije, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i jedan soj gljivica: *Candida albicans* ATCC 10231. Sojevi bakterija su uzgajani u LB medijumu (eng. *Luria broth*, LB) tokom 24 sata na 37°C, osim *L. monocytogenes* koja je uzgajana u BHI gotovom pripremljenom medijumu (eng. *Brain – Heart Infusion*, BHI), dok je *C. albicans* je uzgajana u TSB gotovom pripremljenom medijumu (eng. *Tryptic Soy Broth*, TSB) tokom 24 sata na 37°C. Suspenzije sojeva su pripremljene u PBS–u (eng. *phosphate saline buffer*, PBS– fosfatni fiziološki puferu), do finalne koncentracije od 10<sup>6</sup> CFU/mL (eng. *colony-forming unit*, CFU). LB medijum je pripremljen rastvaranjem 10,0 g triptonu, 5,0 g ekstrakt kvasca i 5,0 g natrijum–hlorida u 1 L destilovane vode.

Sterilni plastični kalupi, prečnika 7 mm, su postavljeni u Petrijeve šolje, gde je prethodno izlivena čvrsta LA podloga (LB medijum sa dodatkom 15 g L<sup>-1</sup> agara). Potom je u Petrijeve šolje izliveno 7 mL soft agara (LB medijum sa dodatkom 7 g L<sup>-1</sup> agara), prethodno inokulisanog sa 7 ili 70 µL odgovarajuće bakterijske suspenzije. U slučaju ispitivanja *L. monocytogenes* korišćena je BHA hranljiva podloga i BHA soft agar, dok su za *C. albicans* korišćeni TSA hranljiva podloga i TSA soft agar. Nakon očvršćavanja soft agara plastični kalupi su uklonjeni i 20 µL odgovarajućih ekstrakata je dodato u formirane bunariće. Kao negativna kontrola korišćen je odgovarajući rastvarač, 20 µL zakiseljenog metanola (0,01% v/v hlorovodonične kiseline) u slučaju ekstrakata bobičastog voća, dok je kod propolisa korišćen čist metanol. Kao pozitivna kontrola korišćen je antibiotik vankomicin kod ispitivanja bobičastog voća, dok su antibiotici vankomicin (VAN), gentamicin (GEN), kanamicin, (KAN) i hemomicin (HEM), i antimikotici nistatin (NIS) i flukonazol (FCZ) korišćeni kod ispitivanja propolisa. Petrijeve šolje su inkubirane na 37°C tokom 24 sata. Aktivnost ekstrakta je procenjena na osnovu pojave zone inhibicije (odsustva) rasta bakterija oko bunara, čiji je prečnik izmeren i izražen u milimetrima.

#### 3.7.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je određena za odabrane ekstrakte bobičastog voća primenom mikrodilucione metode u mikrotitarskim pločama sa 96 mesta. Rađeno je dvostruko serijsko razblaženje polazeći od koncentracije ekstrakta od 2 mg mL<sup>-1</sup> do koncentracije 0,03125 mg mL<sup>-1</sup>, u duplikatu. Pored ispitivanih ekstrakata, postavljene su negativna kontrola u 6 ponavljanja, koja je služila za proveru rasta bakterije i kontrola sterilnosti u 6 ponavljanja. Nakon serijskog razblaživanja uzoraka, u svaki bunar dodato je 20 µL bakterijske suspenzije (osim u kontrolu

sterilnosti) i finalna zapremina u svakom bunaru je bila 200  $\mu\text{L}$ . Priprema bakterijskih suspenzija je opisana u poglavlju 3.7.1. Potom je dodato 22  $\mu\text{L}$  indikatora resazurina (0,675 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), koji je ljubičaste boje i redukuje se u prisustvu bakterija u rezorufin, koji je ružičaste boje. Mikrotitarske ploče su inkubirane 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije praćena je promena boje resazurina i iz svih bunara u kojima nije došlo do promene boje, vršeno je zasejavanje na Petrijeve šolje sa LA medijumom. Nakon inkubacije tokom 24 sata na 37 °C posmatran je rast bakterija. Ukoliko je rast uočen, data koncentracija je proglašavana MIC vrednošću, a ako nije došlo do rasta ta koncentracija je proglašena za minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBC).

### 3.7.3. Bioautografija

*Antimikrobni esej:* Bioautografija je urađena na pet bakterijskih sojeva: dva gram–negativna soja, *E. coli* ATCC 35218 i *K. pneumoniae* ATCC 29665, i tri gram–pozitivna soja, *S. aureus* ATCC 6538, MRSA ATCC i *B. subtilis* ATCC 3369. Standardni bakterijski sojevi gajeni su na kosim hranljivim agarima tokom 24 sata na 37 °C. Svaka izrasla kultura je zatim suspendovana u 5 mL sterilnog fiziološkog rastvora, koristeći vorteks. Nakon toga, 10 mL LB tečne podloge je inokulisano sa 0,1 mL suspenzije bakterijskih ćelija, a zatim su dobijene suspenzije inkubirane 18 sati koristeći *Biosan Orbital Shaker-Incubator ES-20* na 37 °C i 220 rpm. Dobijeni bakterijski inokulum je pomešan sa svežim LB u odnosu 1:1000, a inkubacija je nastavljena kako je prethodno opisano. Rast bakterija je praćen merenjem optičke gustine (OD) suspenzija korišćenjem *Biosan DEN-1B McFarland* denzitometra. Kad je bakterijski rast dostigao OD od 4,30 McF, što odgovara logaritamskoj fazi rasta za testirane sojeve, prethodno pripremljene HPTLC ploče su uronjene tokom nekoliko sekundi. Nakon derivatizacije bakterijskim ćelijama, ploče su inkubirane na 37 °C tokom 90 minuta u plastičnim posudama, koje su iznutra postavljene vlažnim filter papirom. Zone sa antibakterijskom aktivnošću su vizuelizovane uranjanjem ploča u 0,1% w/v rastvor MTT u fosfatnom puferu (0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH = 7,2). U slučaju gram–negativnih sojeva, Triton X–100 je dodat u MTT rastvor u proporciji jedna kap po jednom mL rastvora. Nakon uranjanja ploča u MTT, inkubacija je nastavljena pod istim uslovima sve do pojave aktivnih zona, koje su bile bele boje na ljubičastoj pozadini.

*Priprema rastvora MTT-ija:* 250 mg čvrstog jedinjenja je rastvoreno u 250 mL 0,133 mol  $\text{L}^{-1}$  fosfatnog pufera, čiji je pH = 7,2  $\pm$  0,2. U slučaju gram negativnih sojeva korišćen je rastvor MTT u koji je prethodno dodato 25 kapi Tritona X–100.

Sastav mobilne faze korišćene za antimikrobne bioautografske esej optimizovan je kako bi se postiglo najbolje odvajanje jedinjenja sa antibakterijskom aktivnošću. Ukupno je ispitano osam mobilnih faza, čiji je sastav naveden u Tabeli 4. Najbolje razdvajanje je postignuto upotrebom mobilne faze toluen/etil–acetat/mravlja kiselina, u odnosu 6/4/1 (v/v/v). Pre nanošenja ekstrakata ploče su isprane metanolom i osušene u struji toplog vazduha, i odabrani ekstrakti bobičastog voća (koncentracija 20 mg  $\text{mL}^{-1}$ , zapremina 12  $\mu\text{L}$ ) su naneti kao trake dužine 8 mm.

Tabela 4. Sastav mobilne faze za razdvajanje uzoraka bobičastog voća u bioautografiji.

Redni broj	Sastav mobilne faze	Zapreminski odnos	Literatura
MF 1	Etil–acetat/2–butanon/mravlja kiselina/voda	7/3/1,2/0,8	115,116
MF 2	Etil–acetat/toluen/mravlja kiselina/voda	10/3/1,2/0,8	115,116
MF 3	Etil–acetat/2–butanon/mravlja kiselina/voda	7/3/1/1,5	117
MF 4	Etil–acetat/voda/sirćetna kiselina/mravlja kiselina	100/27/11/11	111
MF 5	Etil–acetat/toluen/mravlja kiselina/voda	16/4/3/2	118
MF 6	Toluen/etil–acetat	7/3	–
MF 7	Toluen/etil–acetat	100/30/20	–
MF 8	Toluen/etil–acetat/mravlja kiselina	6/4/1	–

*HPTLC – FC esej:* Visoko–efikasna tankoslojna hromatografija – Folin–Čikalteu esej je primenjen za analizu odabranih ekstrakata bobičastog voća. Hromatografski uslovi (mobilna i stacionarna faza, zapremina ekstrakta i sl.) korišćeni za ovaj esej su identični onima primenjenim za određivanje fenolog profila i navedeni su u poglavlju 3.6.2. Nakon razvijanja, pločica je zagrejana na 120°C tokom 5 minuta i uronjena je u vodeni rastvor Folin–Čikalteu reagensa (3:2, v/v). Posle derivatizacije, HPTLC pločica je sušena u struji toplog vazduhu tokom 5 minuta. Aktivna jedinjenja su se pojavila kao tamnoplave zone na žutoj pozadini i hromatogram je dokumentovan pod vidljivom svetlošću.

*HPTLC – RSA esej:* Esej je primenjen za analizu odabranih ekstrakata bobičastog voća. Hromatografski uslovi navedeni su u poglavlju 3.6.2. Nakon razvijanja, ploča je uronjena u 0,1% w/v metanolni rastvor DPPH. Hromatogrami su dokumentovani pod vidljivom svetlošću svakih 15 minuta tokom 2 sata. Aktivna jedinjenja su se pojavila kao žute zone na ljubičastoj pozadini.

### 3.8. Molekulsko modelovanje primenom COSMO–RS softvera

Kvantno–hemijski proračuni koeficijenta aktivnosti pri beskonačnom razblaženju su urađeni pomoću COSMO–RS<sup>119</sup> (eng. *COnductor like Screening MOdel for Real Solvents*) metode, koji se nalazi u sklopu programa ADF2022.101 (<https://www.scm.com/product/cosmo-rs/>). Korišćena je baza podataka ADFCRS–2018 sa preko 2500 prethodno izračunatih struktura. Za jedinjenja koja se nisu nalazila u bazi podataka, potrebne strukture za proračune  $\sigma$ –profila su dobijene pomoću izračunavanja u sklopu ADF paketa. Sva jedinjenja korišćena za pripremu eutektičkih smeša su se nalazila u ADFCRS–2018 bazi podataka, osim holin–hlorida. Iako se holinijum–katjon nalazi u pomenutoj bazi, u našim proračunima holin–hlorid je tretiran kao jonski par. Ostale komponente eutektičkih smeša, kao i fenolna jedinjenja iz petrovca, su modelovana u neutralnom obliku i eutektičke smeše su dobijene kombinovanjem HBA i HBD u određenom molskom odnosu. Početne strukture fenolnih jedinjenja u .sdf formatu preuzete su sa *PubChem*–a i njihove geometrije su dalje optimizovane korišćenjem PM7 semiempirijskog kvanto–mehaničkog modela.<sup>120</sup> Dobijene geometrije su reoptimizovane u ADF–u korišćenjem *small core TZP* baznog seta, *Becke–Perdew* (GGA:BP86) funkcionala i relativističke skalarnе ZORA metode za proračune u gasnoj fazi. Površinske gustine naelektrisanja i  $\sigma$ –profili su izračunati iz finalnih struktura.

U slučaju istraživanja eutektičkih smeša za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz podubice optimizovane su strukture koje su uključivale supramolekulski kompleks HBD:HBA:voda. Prvi korak je podrazumevao optimizaciju HBD:HBA kompleksa u određenom molskom odnosu. Strukture pojedinačnih jedinjenja su preuzete sa *PubChem*–a i početna konformacija je dobijena primenom MMFF94s polja sila. Njihove geometrije su reoptimizovane korišćenjem PM7 semiempirijskog kvanto–mehaničkog modela. HBD:HBA kompleksi su optimizovani za svaku eutektičku smešu i geometrije sa najnižom energijom su odabrane za dalju analizu. Nakon toga, molekuli vode su dodati postavljanjem optimizovanog kompleksa molekula u „kutiju” dužine stranice 10 Å koja je sadržala približno 15 molekula vode. Na kraju je zadržano tri molekula vode koji su bili najbliži vodoničnim vezama u HBD:HBA kompleksu. Dalji proračuni su urađeni kao i u slučaju istraživanja petrovca.

### 3.9. Statistička obrada

Izračunavanje parametara deskriptivne statistike i njihovo grafičko prikazivanje je urađeno pomoću programa *Microsoft Office Excel* (verzija *Microsoft 365*). Statistički test za proveru značajnosti (uporedni *t*–test) i regresiona analiza metodom najmanjih kvadrata urađeni su pomoću programskog dodatka *Analysis toolpack* u okviru programa *Microsoft Office Excel*.

Analiza glavnih komponentata (eng. *principal component analysis*, PCA) je urađena korišćenjem *PLS\_Toolbox* statističkog paketa (Eigenvectors Inc. v. 5.7) u okviru programa *MATLAB*, verzija 7.4.0.287 (R2007a) (MathWorks INC, Natick, MA, USA).

Slike hromatograma su obrađene pomoću *ImageJ* programa (<https://imagej.net/>) kao korak pripreme podataka za multivarijantnu analizu. Pomoću funkcije *median filter* sa širinom filtera od 5 piksela

umanjen je efekat pozadine. Slike hromatograma su dodatno obrađene primenom filtera koji propuštaju svetlost određene talasne dužine, crveni (*red*, R), zeleni (*green*, G) i plavi (*blue*, B), u cilju povećanja selektivnosti. Nakon toga su generisani linijski profili za svaki hromatogram, koji predstavljaju grafički prikaz zavisnosti intenziteta zona (izražen u pikselima) u funkciji rastojanja. Na ovaj način primenom softvera za obradu slika dobijena je matrica podataka koja se sastojala od određenog broja objekata, koji predstavljaju ispitivane uzorke i određenog broja varijabli, koje predstavljaju intenzitete boje izražene u pikselima duž linije hromatograma.

Dalja obrada dobijenih podataka je obuhvatila poravnavanje, normiranje i centriranje podataka, za koje su korišćeni algoritmi prisutni u *PLS Toolbox MATLAB* softveru i u nastavku su navedeni:

*Fenolni profil HPTLC za podubicu, plavi kanal*: Variable Alignment (Peaks, slack = 20), Normalize (1-Norm, Area = 1), Median Center;

*Fenolni profil HPTLC za petrovac, plavi kanal*: Variable Alignment (COW– Correlation Optimized Warping, slack = 5), SNV (Standard Normal Variate), Mean Center;

*Fenolni profil HPTLC za propolis, plavi kanal*: Variable Alignment (Peaks, slack = 5), SNV, Mean Center;

*Kvantifikovani fenoli i spektrofotometrijski eseji za propolis*: Autoscale;

*Fenolni profil HPTLC za aroniju, zeleni kanal*: Variable Alignment (COW, slack = 5), SNV, Mean Center;

*Fenolni profil HPTLC za borovnicu, zeleni kanal*: Variable Alignment (COW, slack = 10), SNV, Mean Center;

*Fenolni profil HPTLC za crni godži, plavi kanal*: Variable Alignment (COW, slack = 5), Normalize (1-Norm, Area = 1), Mean Center.

#### 4. Rezultati i diskusija

Ova disertacija je obuhvatila razvoj ekološki prihvatljive metode za ekstrakciju bioaktivnih komponenata, pre svega fenolnih jedinjenja, iz prirodnih proizvoda, primenom prirodnih eutektičkih smeša. Razvoj metode i optimizacija postupka ekstrakcije su urađeni na tri različite grupe uzoraka kako bi se ispitalo i uticaj matriksa na ekstrakciju. Ispitivani su sledeći prirodni proizvodi: lekovito bilje (uzorci petrovca i podubice), propolis i bobičasto voće (uzorci aronije, borovnice i crnog godžija). Sastav eutektičkih smeša je optimizovan za svaki matriks i odabir komponenata za pripremu smeša je prodiskutovan zasebno za svaki prirodni proizvod. Udeo vode u eutektičkim smeša je variran u slučaju lekovitog bilja, gde je proučavan uticaj vode na performanse ekstrakcije, dok je u slučaju ostalih prirodnih proizvoda udeo vode bio konstantan.

Procena efikasnosti ekstrakcije eutektičkim smešama izvršena je primenom sledećih analitičkih metoda:

1. visoko–efikasna tankoslojna hromatografija – HPTLC metoda omogućava brzu, jednostavnu i ekonomičnu analizu kompleksnih matriksa, koja je ekološki prihvatljiva zbog upotrebe malih količina rastvarača i uzoraka. Osim toga, može se primeniti kao skrining metoda i kombinovati sa multivarijantnim statističkim metodama, što omogućava zeleni pristup u analizi prirodnih proizvoda. Složene matrice podataka generisane iz HPTLC fenolnih profila obrađene su metodom analize glavnih komponenata u cilju prepoznavanja mogućih obrazaca ponašanja (uočavanja sličnosti i razlika) u sposobnosti primenjenih eutektičkih smeša da ekstrahuju fenolna jedinjenja. Priprema podataka za multivarijantnu analizu je opisana u Eksperimentalnom delu (poglavlje 3.9.) i bila je prilagođena svakom uzorku.
2. spektrofotometrija – Primenjeni su sledeći eseji: ukupan sadržaj fenola (TPC), ukupan sadržaj flavonoida (TFC) i antioksidativni kapacitet (RSA), a u slučaju uzoraka bobičastog voća određen je i ukupan sadržaj antocijana (TAC). Rezultati spektrofotometrijskih eseja upotrebljeni su za proveru statističke značajnosti efikasnosti ekstrakcije eutektičkih smeša u odnosu na konvencionalne rastvarače primenom uporednog  $t$ -testa. Uporedni  $t$ -test se koristi za ispitivanje značajnosti razlike vrednosti obeležja (TPC, TFC, RSA ili TAC vrednosti) kod dva statistički zavisna uzorka (ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz istog uzorka pomoću dva rastvarača).
3. UHPLC–DAD–MS/MS – Ultra efikasna tečna hromatografija primenjena je za identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima. Kako bi se ustanovilo postojanje statistički značajne razlike u efikasnosti ekstrakcije i sastavu ekstrakta između konvencionalnih rastvarača i eutektičkih smeša takođe je primenjen uporedni  $t$ -testa na rezultate UHPLC analize.

S obzirom na izraženo biološko dejstvo propolisa i bobičastog voća, ispitana je *in vitro* antimikrobna aktivnost u odgovarajućim ekstraktima primenom difuzione metode u bunarićima, mikrodilucione metode ili bioautografije.

U cilju objašnjenja prirode formiranja vodoničnih veze između komponenata eutektičke smeše, kao i stvaranja veza sa ciljanim jedinjenjima, urađena je COSMO–RS studija na eutektičkim sistemima korišćenim za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz lekovitog bilja.

## 4.1. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz lekovitog bilja

### 4.1.1. Odabir eutektičkih smeša

Na efikasnost ekstrakcije i sastav ekstrakta, odnosno vrstu ekstrahovanih jedinjenja, utiče više faktora, ali neki od najznačajnijih su polarnost i viskoznost rastvarača, kao i njegova sposobnost da interaguje sa jedinjenjima od interesa. Odabir odgovarajućeg rastvarača za ekstrakciju je stoga ključan korak u analizi prirodnih proizvoda, naročito kada je glavni zadatak ciljana ekstrakcija određenih jedinjenja. Fizičko–hemijaska svojstva eutektičkih smeša i njihova sposobnost ka ekstrahovanju specifičnih jedinjenja se mogu fino podesiti (eng. *fine-tuning*). Odabir komponenata koje će formirati eutektičku smešu i njihov odnos su presudni faktori koji utiču na prirodu i broj međumolekulskih interakcija koje će se javiti u eutektičkom sistemu, što posledično utiče na efikasnost ekstrakcije.

Za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz petrovca je primenjeno 19 eutektičkih smeša čiji je sastav naveden u Tabeli 5. Na osnovu prethodnih studija<sup>121–123</sup> u kojima je opisana ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz lekovitog bilja odabrane su komponente, odnosno HBA i HBD, za pripremu eutektičkih smeša. Kao akseptori vodonične veze (HBA) korišćeni su holin–hlorid, L–prolin i urea, dok su kao donori vodonične veze (HBD) korišćene vinska, ćilibarna, maleinska, mlečna i askorbinska kiselina, kao i urea ili glicerol. Radi poređenja efikasnosti ekstrakcije eutektičkih rastvarača urađena je i ekstrakcija sa metanolom kao konvencionalnim rastvaračem (K1).

Polarnost rastvarača je karakteristika koja najviše utiče na ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. Fenolna jedinjenja su relativno hidrofilna, i na njihovu polarnost najviše utiče prisustvo jedne ili više hidroksilnih grupa, ali i šećerne komponente. Stoga su za ekstrakciju odabrane eutektičke smeše na bazi holin–hlorida u kombinaciji sa tri organske kiseline. Mlečna, vinska i ćilibarna kiselina su izabrane kao HBD, jer imaju različit broj karboksilnih i hidroksilnih grupa koje rezultiraju različitim intra– i intermolekulskim interakcijama, a pre svega vodoničnim vezama. Osim navedenih HBD komponenata, korišćeni su i urea i glicerol, jer su pristupačna i lako dostupna jedinjenja, koje se često koriste u istraživanjima ovog tipa.

Velika viskoznost eutektičkih smeša, koja je posledica prisustva vodoničnih veza i Van der Valsovih interakcija između HBA i HBD, je glavno ograničenje eutektičkih smeša kao ekstrakcionih medijuma. Viskoznost rastvarača može smanjiti koeficijent difuzije analita, što dovodi do sporog prenosa mase i dugog vremena potrebnog za ekstrakciju. Viskoznost se može smanjiti, a samim tim poboljšati efikasnost ekstrakcije, dodavanjem vode u eutektički sistem i povećanjem temperature. Prethodna istraživanja<sup>31,124</sup> u kojima je ispitivan uticaj dodatka vode na supramolekulske strukture i fizičko–hemijaska svojstva eutektičkih smeša su pokazala da razblaživanje dovodi do raskidanja vodoničnih veza između komponenata eutektičke smeše, što rezultuje značajnim smanjenjem viskoznosti i gustine i povećanjem provodljivosti i aktiviteta. Takođe, razblaživanje vodom ima veliki uticaj na polarnost, što dalje menja rastvorljivost ciljanih jedinjenja. U slučaju jedinjenja srednje polarnosti, dodavanje vode poboljšava njihovu rastvorljivost, što može doprineti većim prinosa ekstrakcije, dok je kod nepolarnijih jedinjenja uticaj složeniji. Mali dodatak vode može doprineti boljoj ekstrakciji, zbog smanjenja viskoznosti, međutim veliki dodatak vode može značajno smanjiti rastvorljivost relativno hidrofobnih molekula. Pošto fenolna jedinjenja imaju širok spektar polarnosti, promena sadržaja vode može uticati ne samo na prinose ekstrakcije, već i na sastav dobijenih ekstrakata.

Uzimajući u obzir sve gore navedeno, u istraživanju ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz lekovitog bilja je pored ispitivanja različitog sastava eutektičkih smeša, odnosno uticaja različitih HBA i HBD, ispitan i uticaj sadržaja vode. Sadržaj vode se kretao od 20% do 50% (*w/w*) i to u sistemima: holin–hlorid: vinska kiselina = 1:1 (*n/n*), holin–hlorid: urea = 1:2 (*n/n*) i holin–hlorid: ćilibarna kiselina = 1:1 (*n/n*). Kako bi se procenio uticaj sastava eutektičke smeše i udela vode na ekstrakciju, svi ekstrakcioni parametri su držani konstantnim, uključujući i temperaturu. Kao što je prethodno

pomenuto, temperatura utiče na viskoznost, a samim tim i na učinak ekstrakcije, zbog čega je odabir temperature na kojoj se vrši ekstrakcija važan korak. Istraživanja<sup>24,125</sup> u kojima je ispitivan uticaj temperature na fizičko–hemijske parametre eutektičkih smeša su pokazala da viskoznost primetno opada sa promenom temperature sa sobne na 50°C. Neki autori su koristili i više temperature<sup>126,127</sup> kako bi pospešili ekstrakciju. Međutim, osim uticaja na viskoznost potrebno je uzeti u obzir da povišene temperature mogu dovesti do degradacije termolabilnih fitohemikalija, čime bi se snizio prinos ekstrakcije. Temperatura ekstrakcije je, zbog svega prethodno navedenog, postavljena na 50°C.

Tabela 5. Sastav eutektičkih smeša primenjenih u ekstrakciji bioaktivnih jedinjenja iz lekovitog bilja – petrovac i podubica.

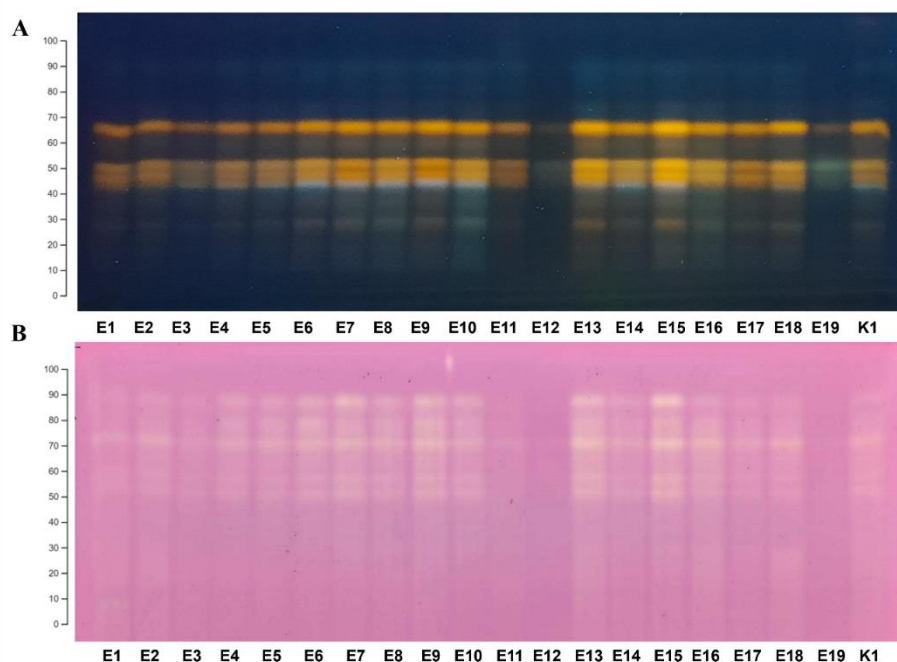
Oznaka ekstrakta	Sastav eutektičkih smeša	Molarni odnos ( <i>n/n</i> )	Udeo vode, % ( <i>w/w</i> )
E1	L–prolin: maleinska kiselina	1:1	20
E2	holin–hlorid: mlečna kiselina	1:1	30
E3	holin–hlorid: vinska kiselina	1:1	20
E4	holin–hlorid: vinska kiselina	1:1	30
E5	holin–hlorid: vinska kiselina	1:1	40
E6	holin–hlorid: vinska kiselina	1:1	50
E7	holin–hlorid: urea	1:2	20
E8	holin–hlorid: urea	1:2	30
E9	holin–hlorid: urea	1:2	40
E10	holin–hlorid: urea	1:2	50
E11	holin–hlorid: ćilibarna kiselina	1:1	20
E12	holin–hlorid: ćilibarna kiselina	1:1	30
E13	holin–hlorid: ćilibarna kiselina	1:1	40
E14	holin–hlorid: ćilibarna kiselina	1:1	50
E15	holin–hlorid: glicerol	1:1	20
E16	glicerol: urea	1:1	20
E17	glicerol: urea	2:1	20
E18	glicerol: mlečna kiselina	1:1	20
E19	glicerol: askorbinska kiselina	1:1	20

#### 4.1.2. Procena efikasnosti ekstrakcije eutektičkim smešama – Petrovac

##### 4.1.2.1. HPTLC profili fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti

HPTLC profili fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata petrovca (Slika 8.A) su pokazali obrazac u kojem dominiraju srednje polarna jedinjenja, koja se pojavljuju kao zone narandžaste boje na  $hR_F$  vrednostima između 40 i 70, kao i nepolarniji flavonoidi (flavonoli, flavanoni i izoflavonoidi) koji se javljaju na većim  $hR_F$  vrednostima kao plave zone. Profili se među sobom razlikuju po sastavu fenolnih jedinjenja, dok se jedinjenja koja su prisutna u svim ekstraktima razlikuju po intenzitetu zona, odnosno količini, u zavisnosti od primenjene eutektičke smeše (vrste HBA i HBD, kao i udela vode). Jedinjenja prisutna u svim hromatogramima ekstrakata E2–E15 potiču od zajedničke komponente eutektičke smeše, holin–hlorida, dok su razlike, koje odgovaraju manje intenzivnim zonama, uslovljene drugom komponentom (urea, glicerol, ćilibarna kiselina, mlečna kiselina ili vinska kiselina). Sličan trend se uočava i kod ekstrakata E15–E19 dobijenih pomoću eutektičkih smeša koje kao zajedničku komponentu sadrže glicerol. Uzimajući u obzir prisustvo intenzivnih narandžastih zona u svim pomenutim ekstraktima može se pretpostaviti da je efikasnost ekstrakcije holin–hlorida i glicerola slična. Potvrda ovakve tvrdnje je profil ekstrakta E15 dobijen primenom sistema holin–hlorid: glicerol kod kojeg su ove zone najintenzivnije. Jedina razlika između profila dobijenih primenom holin–hloridnog i glicerinskog sistema, a koja se može uočiti vizuelnom

procenom, je plava zona na  $hR_F$  vrednosti 40 prisutna samo u holin–hloridnim ekstraktima. Eutektički sistem kojim je dobijen najbogatiji profil fenolnih jedinjenja bio je holin–hlorid: glicerol, dok su najmanje efikasni bili sistemi holin–hlorid: ćilibarna kiselina i glicerol: askorbinska kiselina.

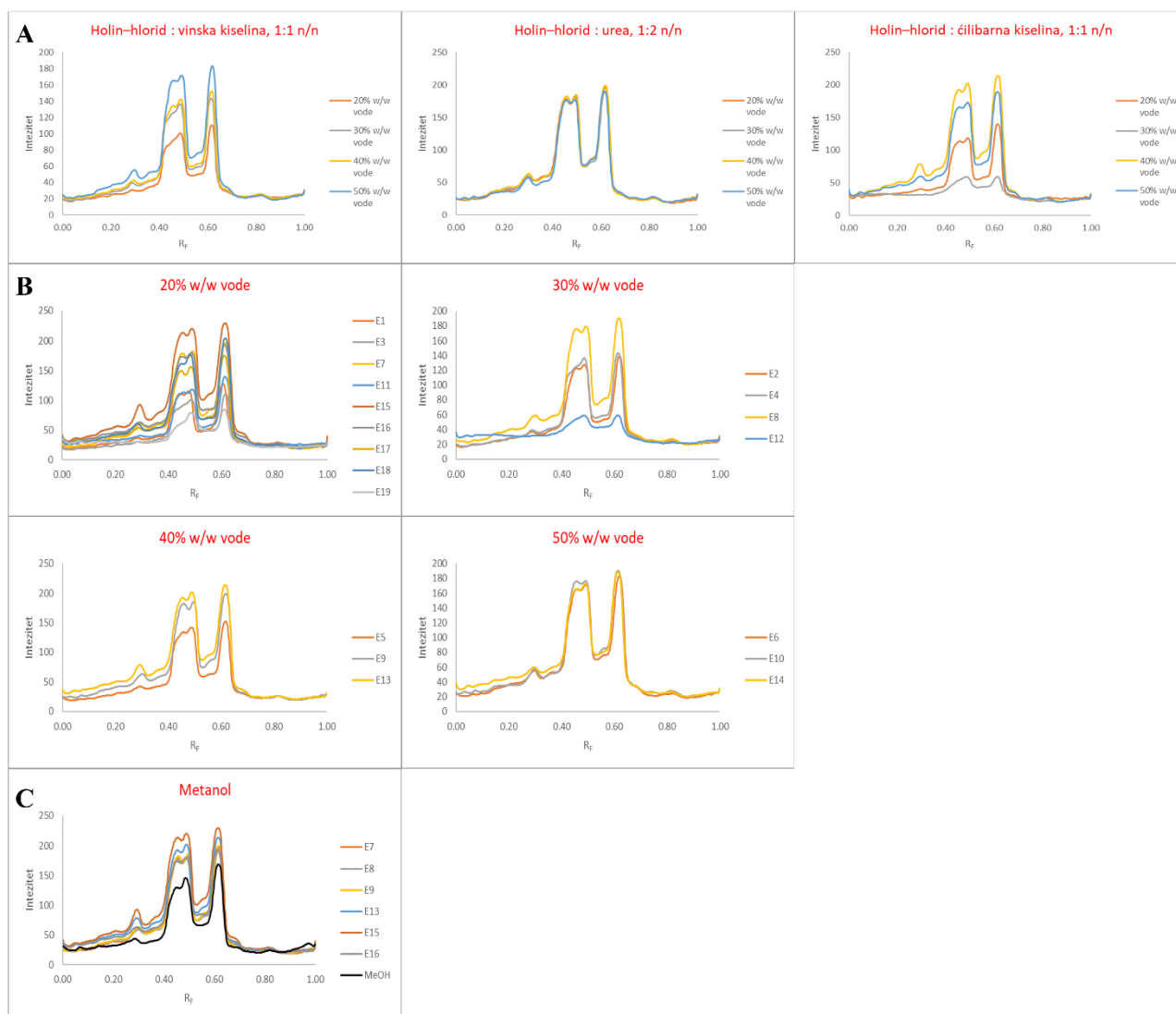


Slika 8. HPTLC profili eutektičkih i metanolnog ekstrakta petrovca: A) profil fenolnih jedinjenja; B) profil antioksidativne aktivnosti.

Na Slici 8.B prikazani su antioksidativni profili ekstrakata petrovca dobijenih primenom eutektičkih smeša i metanola, na kojima se mogu uočiti jedinjenja koja poseduju antioksidativnu aktivnost kao žute zone na ljubičastoj pozadini. Dobijeni hromatogrami potvrđuju da veliki broj fenolnih jedinjenja poseduje izraženu antioksidativnu aktivnost. Osim zona na  $hR_F$  vrednostima između 40 i 70, koje odgovaraju jedinjenjima koja su u ekstraktima prisutna u najvećoj količini, ovim esejom je utvrđeno da i zone na višim  $hR_F$  vrednostima ( $hR_F$  vrednosti između 70 i 90) koje su zastupljene u minimalnoj koncentraciji pokazuju izraženu antioksidativnu aktivnost.

Uticaj sadržaja vode u eutektičkim smešama na efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja je procenjen dodavanjem različitih udela vode (20–50%,  $w/w$ ) u tri različita sistema, holin–hlorid: vinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ), holin–hlorid: urea 1:2 ( $n/n$ ) i holin–hlorid: ćilibarna kiselina 1:1 ( $n/n$ ). Na Slici 9. su prikazani linijski profili navedenih eutektičkih ekstrakata dobijenih obradom slike HPTLC profila. Poređenjem linijskih profila ekstrakata dobijenih korišćenjem eutektičkih smeša istog sastava HBA i HBD, ali sa različitim udelom vode (Slika 9.A), može se uočiti da ne postoji pravilan trend uticaja sadržaja vode na prinos ekstrakcije. U smeši holin–hlorid: vinska kiselina sa porastom udela vode dolazi do porasta količine ekstrahovanih fenolnih jedinjenja, u smeši holin–hlorid: ćilibarna kiselina najveći prinos ekstrakcije postignut je sa 40%, a najmanji sa 30% vode, dok su sistemi holin–hlorid: urea sa različitim udelima vode rezultirali jednakim linijskim profilima. Povećanje sadržaja vode može dovesti do smanjenja viskoznosti eutektičke smeše, što uslovljava efikasniju ekstrakciju i bolji prinos, ali treba uzeti u obzir da nisu sve eutektičke smeše jednako viskozne, te na njih dodatak vode neće uticati u istoj meri. Osim toga dodatak vode može uticati i na polarnost eutektičke smeše, što može objasniti nepravilan trend među ekstraktima. Upoređujući profile ekstrakata dobijenih primenom različitih eutektičkih smeša koje su sadržale isti udeo vode (20, 30, 40 ili 50%  $w/w$ ), uočavaju se značajne razlike u linijskim profilima ekstrakata dobijenih pomoću smeša sa 20% ( $w/w$ ) vode, ali i identični profili dobijeni iz smeša sa 50% ( $w/w$ ) vode (Slika 9. B). Dodatak vode u udelu od 20% ( $w/w$ ), dakle, utiče na viskoznost rastvarača, ali je za ekstrakciju presudan sastav eutektičke smeše (vrsta i odnos HBA i HBD). Međutim, povećanje sadržaja vode u smeši dovodi do izjednačavanja efikasnosti ekstrakcije različitih eutektičkih smeša, što sugerise da voda postaje glavni

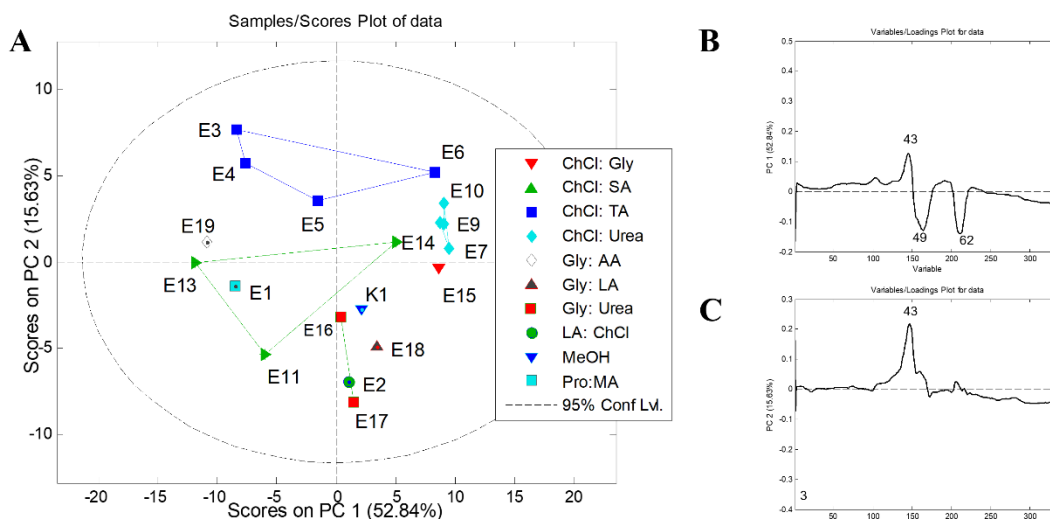
medijum za ekstrakciju i u sistemima sa 50% (w/w) vode postaje jedina komponenta koja vrši ekstrakciju (Slika 9. B). Poređenjem linijskih profila eutektičkih ekstrakata sa metanolnim ekstraktom (K1), može se uočiti da nekoliko eutektičkih ekstrakata (E7–10, E13, E15–E16) ima profile sa intenzivnijim zonama, što ukazuje da su eutektički sistemi korišćeni za njihovo dobijanje efikasniji rastvarači za ekstrakciju fenolnih jedinjenja od metanola (Slika 9.C).



Slika 9. Linijski profili eutektičkih ekstrakata petrovca: A) uticaj sadržaja vode u eutektičkim smešama na profil fenolnih jedinjenja; B) uticaj različitog sastava eutektičkih smeša sa istim sadržajem vode na profil fenolnih jedinjenja; C) poređenje fenolnih profila odabranih eutektičkih ekstrakata sa metanolnim ekstraktima.

Hromatografsko profilisanje je dobar izvor informacija, ali vizuelnom procenom se ne mogu definisati markeri koji utiču na diferencijaciju uzoraka u zavisnosti od primenjenih eutektičkih smeša, zbog čega su hromatogrami dalje korišćeni kao ulazni podaci za hemometrijsku analizu, kojoj je prethodila obrada slike. Matrica podataka za multivarijantnu analizu se sastojala od 20 objekata koji predstavljaju ispitivane ekstrakte i 339 varijabli koje predstavljaju intenzitete sive boje izražene u pikselima duž linije hromatograma. Dobijeni PCA model se sastojao od 4 glavne komponente kojim je objašnjeno 90,62% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1– 52,84%, PC2– 15,63% i PC3– 7,41%). Na osnovu grafika skorova latentnih varijabli (Slika 10. A) je utvrđeno da su se ekstrakti razdvojili na osnovu sastava primenjenih eutektičkih smeša: tri jasno razdvojena klastera odgovaraju sistemima holin–hlorid: vinska kiselina (ekstrakti E3–E6), holin–hlorid: urea (ekstrakti E7–E10) i holin–hlorid: ćilibarna kiselina (ekstrakti E11–E14). Ekstrakti dobijeni korišćenjem sistema koji su sadržali glicerol kao komponentu su rasuti po grafiku, ukazujući na dominantan uticaj druge

komponente eutektičke smeše. Udaljenost klastera koji čine ekstrakti E7–E10 i E16–E17, koji kao zajedničku komponentu sadrže ureu, ukazuje na različitu efikasnost ekstrakcije holin–hlorida i glicerola koja je pretpostavljena na osnovu vizuelne procene hromatograma. Grafik vektora latentnih varijabli (Slika 10. B i C) pokazuje da je glavna zona koja uslovljava pomenute razlike na  $hR_F$  vrednosti 43, dok dodatni uticaj na razdvajanje imaju i jedinjenja na  $hR_F$  vrednostima 49 i 62. Dobijeni PCA model sugerise da hemijski sastav primenjenih eutektičkih smeša ima uticaj na učinak ekstrakcije.

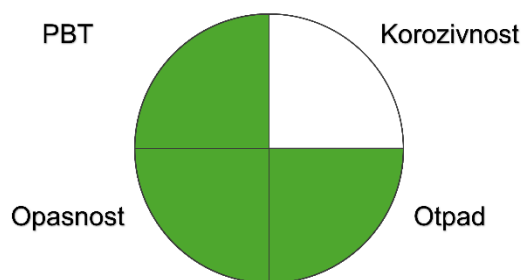


Slika 10. Analiza glavnih komponenta dobijena za profil fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata petrovca: A) grafik skorova latentnih varijabli; B/C) grafik vektora latentnih varijabli.

#### 4.1.2.2. Procena ekološke prihvatljivosti HPTLC metode

Sa porastom brige o zaštiti životne sredine javila se potreba za razvojem metoda koje su usklađene sa principima zelene analitičke hemije i efikasnih načina za procenu uticaja analitičke metode na životnu sredinu i zdravlje. Pored ekološki prihvatljivog postupka ekstrakcije bioaktivnih komponenata, koji obuhvata primenu prirodnih eutektičkih smeša, neophodno je razviti i koristiti metode karakterizacije koje su takođe ekološki prihvatljive i takav pristup u analizi prirodnih proizvoda bi se mogao smatrati zelenim. Kako bi se procenila ekološka prihvatljivost HPTLC metode, koja je korišćena kao prvi korak u karakterizaciji eutektičkih ekstrakata, primenjena su dva alata za procenu: NEMI piktogram i Eko–skala.

Mobilna faza korišćena za razdvajanje fenolnih jedinjenja iz petrovca se može oceniti kao zelena, jer se najvećim delom sastoji od etil–acetata i vode, koji se smatraju zelenim rastvaračima<sup>128</sup>, u poređenju sa ostalim organskim rastvaračima često primenjivanim u tankoslojnoj hromatografiji (alifatični, aromatični i hlorovani ugljovodonici). Osim toga, sva tri rastvarača korišćena za pravljenje mobilne faze (etil–acetat, voda i mravlja kiselina) se ne nalaze na listi otpornih, bioakumulativnih i toksičnih hemikalija (eng. *Persistent, Bioaccumulative and Toxic*– PBT), zbog čega je prvi kvadrant NEMI piktograma obojen zeleno (Slika 11.). Međutim, pH vrednost mobilne faze iznosi 1,13 i niži je od zahteva ovog modela (pH vrednost sistema treba biti između 2 i 12) i drugo polje na NEMI piktogramu, koje se odnosi na korozivnost, je bele boje. Masa generisanog otpada po uzorku bila je manja od 50 g i iznosila je 250  $\mu$ L po uzorku, pa je poslednje polje na piktogramu zelene boje. Iz svih navedenih razloga, NEMI piktogram prikazan na Slici 11, ima tri kvadranta obojena zelenom bojom i jedan belom, zbog čega se korišćena HPTLC metod može smatrati ekološki prihvatljivom, odnosno zelenom metodom. Korozivnost primenjene mobilne faze predstavlja jedini negativni aspekt ove metode, ali i priliku za dalje poboljšanje.



Slika 11. NEMI piktogram za primenjenu HPTLC metodu u analizi ekstrakata lekovitog bilja.

Kako bi se dodatno i kvantitativnije procenila ekološka prihvatljivost primenjene HPTLC metode, izračunat je skor na analitičkoj Eko-skali i rezultat je prikazan u Tabeli 6. Primenjena metoda ima 16 kaznenih poena (KP) zbog upotrebe nekoliko organskih rastvarača, kao što su mravlja kiselina i etil-acetat, ali i proizvodnje otpada, koji nije tretiran i recikliran. Skor na analitičkoj Eko-skali iznosi 84 i obzirom da je rezultat veći od 75, ova metoda se može oceniti kao odlična zelena metoda.

Tabela 6. Analitička Eko-skala za primenjenu HPTLC metodu kod analize ekstrakata lekovitog bilja.

			Međuzbir KP	Ukupan KP
<b>Reagensi</b>				
<b>Etil-acetat</b>	Količina	<10 mL	1	4
	Opasnost	Broj piktograma <b>2</b>	<b>Visok nivo (2KP)</b> 4	
<b>Voda</b>	Količina	<10 mL	1	0
	Opasnost	Broj piktograma <b>0</b>	<b>Nema (0KP)</b> 0	
<b>Mravlja kiselina</b>	Količina	<10 mL	1	6
	Opasnost	Broj piktograma <b>3</b>	<b>Visok nivo (2KP)</b> 6	
			Međuzbir KP	Ukupan KP
<b>Instrumenti</b>				
Energija	UV lampa	<0,1 kWh po uzorku		
Opasnost na radu		Hermetizacija analitičkog procesa		
Otpad	5 mL		3	3
	Bez tretmana			3
<b>Ukupan broj kaznenih poena (KP) =</b>				<b>16</b>
<b>Skor na analitičkoj Eko-Skali = 100-16 =</b>				<b>84</b>

#### 4.1.2.3. Spektrofotometrijski eseji

Efikasnost ekstrakcije primenjenih eutektičkih rastvarača je procenjena na osnovu spektrofotometrijskih eseja: ukupni sadržaj fenola (TPC), ukupni sadržaj flavonoida (TFC) i antioksidativni kapacitet (RSA) (Tabela 7. i Slika 12.).

Tabela 7. Ukupni sadržaj fenola, ukupan sadržaj flavonoida i antioksidativni kapacitet u ekstraktima petrovca dobijenih primenom eutektičkih smeša (E) i konvencionalnog rastvarača (K). (Oznake su navedene u Tabeli 5.)

Ekstrakti	RSA (mmol TE kg <sup>-1</sup> )	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC (g QUE kg <sup>-1</sup> )
E1	263 ± 9	38,8 ± 0,6	55 ± 2
E2	350 ± 6	37 ± 1	59 ± 4
E3	260 ± 2	25,7 ± 0,6	38 ± 2
E4	258 ± 20	27 ± 1	40 ± 5
E5	280 ± 20	26,5 ± 0,9	45,5 ± 0,4
E6	350 ± 20	34 ± 2	51 ± 6
E7	400 ± 20	40,0 ± 0,9	67,8 ± 0,9
E8	380 ± 20	37 ± 1	52 ± 6
E9	440 ± 20	43,0 ± 0,6	51,6 ± 0,3
E10	320 ± 20	32,7 ± 0,6	39 ± 3
E11	197 ± 4	19,6 ± 0,1	22 ± 2
E12	108 ± 9	10,0 ± 0,2	13,5 ± 0,4
E13	480 ± 9	44 ± 1	56 ± 3
E14	330 ± 20	31 ± 2	45,3 ± 0,9
E15	410 ± 40	42 ± 1	57 ± 4
E16	440 ± 40	39,1 ± 0,7	54 ± 2
E17	290 ± 10	24,5 ± 0,1	35 ± 3
E18	270 ± 10	33,2 ± 0,6	45 ± 4
E19	76 ± 4	8,3 ± 0,2	10,7 ± 0,2
K1	416 ± 1	35,7 ± 0,6	60 ± 5

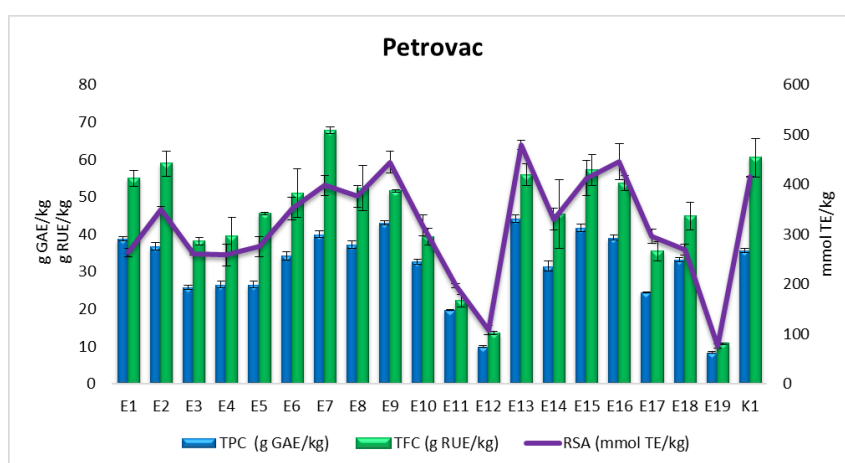
TPC i TFC vrednosti eutektičkih ekstrakata petrovca bile su u rasponu od 8,3 do 43 g GAE kg<sup>-1</sup>, odnosno 10,7 do 67,8 g RUE kg<sup>-1</sup>. Kod osam eutektičkih ekstrakata (E1–E2, E7–E9, E13, E15–E16) je određena viša TPC vrednost u odnosu na konvencionalni ekstrakt. TFC vrednosti nekoliko eutektičkih ekstrakata (E1–E2, E13, E15) su bile bliske konvencionalnom ekstraktu, dok je ekstrakt E7 pokazao veću TFC vrednost. Različite TPC i TFC vrednosti ispitivanih ekstrakata dobijenih korišćenjem sistema sa istim HBA (holin–hlorid ili glicerol), a različitim HBD (urea, glicerol, vinska, čilibarna, mlečna, askorbinska kiselina), ukazuju da promena jedne komponente eutektičke smeše snažno utiče na efikasnost ekstrakcije. Promena molarnog odnosa između HBD i HBA, u slučaju eutektičkih smeša pripremljenih od glicerola i uree, takođe je dovela do različitih vrednosti TPC i TFC kod ekstrakata E16 i E17. Povećanje molskog odnosa glicerola i uree sa 1:1 na 2:1 je smanjilo efikasnost ekstrakcije verovatno zbog promenjene viskoznosti rastvarača. Dodatno, različite vrednosti TPC i TFC ekstrakata dobijenih smešama sa istim HBA i HBD, a različitim udelima vode (20–50%, w/w), ukazuju na značaj ove komponente u eutektičkim sistemima.

Uticaj sadržaja vode je proučavan u tri različita sistema i utvrđeno je da vrednosti TPC–a i TFC–a ne prate isti trend sa porastom udela vode. Naime, kod ekstrakata E3–E5, koji su dobijeni primenom eutektičkih smeša holin–hlorid: vinska kiselina 1:1 (n/n), vrednosti TPC–a i TFC–a su bliske, ali u porastu, sa najvišom vrednošću kod ekstrakta koji je dobijen primenom sistema sa 50% (w/w) vode. Vrednosti TPC–a i TFC–a ekstrakata E11–E14, koji su dobijeni primenom eutektičkih smeša holin–hlorid: čilibarna kiselina 1:1 (n/n), imaju nepravilan trend i najviše su kod ekstrakta koji je dobijen primenom sistema sa 40% w/w vode, a najniže kod sistema sa 30% (w/w) vode. U slučaju primene eutektičkih smeša holin–hlorid: urea 1:2 (n/n), trend u vrednostima TPC–a i TFC–a kod dobijenih ekstrakata (E7–E10) je različit, ali se najbolje pokazala smeša sa 20% (w/w) vode. Povećanje sadržaja vode može dovesti do smanjenja viskoznosti eutektičke smeše što može povoljno uticati da efikasnost ekstrakcije. Međutim rezultati spektrofotometrijskih eseja pokazuju da to nije uvek slučaj, jer voda

može uticati i na polarnost eutektičke smeše, što posledično ima kompleksan uticaj na efikasnost ekstrakcije, zbog različite polarnosti ciljanih jedinjenja.

Vrednosti antioksidativnog kapaciteta su bile u opsegu 76–480 mmol TE kg<sup>-1</sup> i tri eutektička ekstrakta (E9, E13 i E16) su imali veću vrednost RSA od metanalnog ekstrakta. Uočeno je prisustvo trenda u rezultatima spektrofotometrijskih eseja, odnosno ekstrakti koji su bogati polifenolima su imali veću antioksidativnu aktivnost. Ovaj trend je potvrđen visokim vrednostima Pirsonovog (*Pearson*) koeficijenta korelacije između vrednosti RSA i TPC ( $r = 0,926$ ), RSA i TFC ( $r = 0,875$ ), ali i između TPC i TFC ( $r = 0,943$ ). Uporedni *t*-test primenjen na rezultate spektrofotometrijskih eseja (Tabela P 1.) je pokazao da nema statistički značajne razlike u rezultatima između metanola i svih eutektičkih rastvarača, što ukazuje na jednaku efikasnost ekstrakcije.

Rezultati spektrofotometrijskih eseja su u skladu sa rezultatima HPTLC–a i takođe pokazuju da sastav eutektičke smeše, odnos njenih komponenata i udeo vode utiču na efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja, što naglašava potrebu ka dubljem razumevanja prirode formiranja vodoničnih veza između eutektičke smeše i ciljanih komponenata.



Slika 12. Ukupni sadržaj fenola– plavi stub, ukupan sadržaj flavonoida– zeleni stub, i antioksidativni kapacitet– ljubičasta linija u eutektičkim ekstraktima (E) i konvencionalnom ekstraktu (K) u uzorku petrovca. (Oznake ekstrakata su navedene u Tabeli 5.)

#### 4.1.2.4. UHPLC analiza fenolnih jedinjenja

Primenom ultra–efikasne tečne hromatografije (UHPLC–DAD–MS/MS) je određeno i kvantifikovano ukupno osamnaest fenolnih jedinjenja u eutektičkim ekstraktima petrovca (Tabela 8). Najzastupljenija grupa fenolnih jedinjenja bili su flavonol glikozidi, a među njima 3–O–glikozidi kvercetin (kvercitrin, izokvercitrin i rutin) i kempferola (astragalin).

Kvercitrin (kvercetin 3–O–ramnozid) je bio dominantno jedinjenje prisutno u petrovcu, pronađeno u najvišim koncentracijama u svim ekstraktima u opsegu od 304,91 do 936,37 mg kg<sup>-1</sup>. Izokvercitrin (kvercetin 3–O–glukozid) je bio drugi najzastupljeniji flavonoid u svim ekstraktima sa koncentracijama između 189,48–612,03 mg kg<sup>-1</sup>. Astragalin (kempferol 3–O–glukozid) je pronađen u opsegu od 92,79 do 401,29 mg kg<sup>-1</sup> i bio je treći najzastupljeniji flavonoid. Rutin (kvercetin 3–O–ramnoglukozid) je ekstrahovan u opsegu od 32,50 do 198,79 mg kg<sup>-1</sup>.

Rezultati UHPLC analize pokazuju da eutektička smeša holin–hlorid: glicerol 1:1 (*n/n*) sa 20% vode (*w/w*) ima najveću efikasnost ekstrakcije za većinu ispitivanih flavonol glikozida (rutin, izokvercetin, kvercitrin i astragalin) i u proseku je dobijeni ekstrakt (E15) imao 2 puta više koncentracije fenolnih jedinjenja u poređenju sa konvencionalnim ekstraktom (K1). Eutektičke smeše pripremljene od holin–hlorida i uree u odnosu 1:2 (*n/n*), sa različitim sadržajem vode (ekstrakti E7–E10), pokazale su se kao dobri medijumi za ciljanu ekstrakciju fenolnih kiselina (posebno *p*–kumarinske i hlorogene kiseline), pri čemu je ekstrakt E10 sadržao približno 2, odnosno 5, puta veći sadržaj pomenutih

kiselina u odnosu na metanolni ekstrakt. Osim pomenutih sistema, eutektička smeša L–prolin: maleinska kiselina 1:1 (*n/n*) sa 20% vode (*w/w*) (ekstrakt E1) se pokazala kao odličan rastvarač za ekstrakciju fenolnih kiselina i to protokatehuinske i siringinske kiseline, ali i flavonoida, kvercetina, naringenina i kempferola. Ekstrakt E4 je tri prethodno pomenuta flavonoida sadržao u količini koja je bila od 3 do 9 puta veća u odnosu na metanolni ekstrakt, kao i veću količinu kofeinske kiseline.

Sadržaj fenolnih jedinjenja u eutektičkim ekstraktima (za svaki primenjeni sistem pojedinačno) i metanolnom ekstraktu upoređen je uporednim *t*–testom (Tabela P 2.). Statistički značajno veći sadržaj ovih jedinjenja zabeležen je u ekstraktima E7, E13 i E15, što smeše holin–hlorid: urea 1:2 (*n/n*), 20% vode (*w/w*), holin–hlorid: ćilibarna kiselina 1:1 (*n/n*), 40% vode (*w/w*) i holin–hlorid: glicerol 1:1 (*n/n*), 20% vode (*w/w*) čini efikasnijim rastvaračima za ekstrakciju fenolnih jedinjenja u odnosu na metanol. U ostalim slučajevima nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u sadržaju fenolnih jedinjenja u eutektičkom i metanolnom ekstraktu što ukazuje na jednaku efikasnost ekstrakcije. Navedeni rezultati potvrđuju mogućnost korišćenja eutektičkih smeša za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz petrovca, što im usled njihove ekološke prihvatljivosti daje veliku prednost u odnosu na konvencionalne rastvarače..

Tabela 8. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima petrovca.

Ekstrakti	Fenolna jedinjenja (mg kg <sup>-1</sup> )								
	PCA	SA	CGA	PHBA	AE	CA	ISO	RUT	VIT
E1	11 ± 2	48 ± 3	9,3 ± 0,2	24 ± 6	2,3 ± 0,2	2,7 ± 0,1	1,30 ± 0,08	103 ± 9	26 ± 2
E2	7,2 ± 0,3	13 ± 1	8 ± 3	13 ± 3	2,9 ± 0,5	2 ± 0,4	1,0 ± 0,2	105 ± 2	24 ± 2
E3	10 ± 1	12 ± 2	11 ± 1	11 ± 2	1,9 ± 0,1	2,8 ± 0,2	0,75 ± 0,06	65 ± 6	16 ± 1
E4	8,1 ± 0,5	9 ± 1	17 ± 4	18 ± 1	3,3 ± 0,4	5 ± 0,7	1,4 ± 0,6	120 ± 3	24 ± 2
E5	5,9 ± 0,3	8 ± 2	16 ± 2	11 ± 1	3,3 ± 0,5	5 ± 0,4	1,1 ± 0,4	112 ± 3	22,7 ± 0,4
E6	5,8 ± 0,7	7 ± 2	22 ± 3	10 ± 1	4,8 ± 0,6	4 ± 0,6	1,3 ± 0,3	130 ± 3	28 ± 0,7
E7	7 ± 1	15 ± 3	44 ± 3	15 ± 2	–	3,5 ± 0,9	1,5 ± 0,1	150 ± 10	36 ± 3
E8	4,6 ± 0,2	7 ± 2	30 ± 1	19 ± 2	1,7 ± 0,5	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,1	130 ± 9	28 ± 0,8
E9	5,2 ± 0,2	5 ± 2	31 ± 2	23 ± 2	6,7 ± 0,3	6 ± 0,3	2,00 ± 0,08	140 ± 1	31 ± 2
E10	6,6 ± 0,2	12 ± 2	41 ± 1	31 ± 2	7,1 ± 0,5	5,6 ± 0,8	1,53 ± 0,08	130 ± 4	28 ± 3
E11	4,0 ± 0,8	2,5 ± 1	9 ± 1	11 ± 1	1,40 ± 0,09	2,2 ± 0,1	1,1 ± 0,04	54 ± 2	15 ± 2
E12	2,7 ± 0,6	3,7 ± 0,6	2,8 ± 0,8	4 ± 1	1,1 ± 0,6	1,8 ± 0,3	0,25 ± 0,08	23 ± 3	5 ± 2
E13	4,8 ± 0,8	3,1 ± 0,8	18 ± 1	17 ± 2	3,9 ± 0,3	5 ± 0,8	1,74 ± 0,09	160 ± 2	33 ± 2
E14	4,2 ± 0,5	5,4 ± 0,5	17 ± 0,5	26 ± 1	2,7 ± 0,1	3,8 ± 0,1	1,04 ± 0,08	110 ± 4	23 ± 2
E15	4,5 ± 0,9	5,7 ± 0,9	29 ± 2	21 ± 2	–	1,3 ± 0,5	2,2 ± 0,2	200 ± 9	45 ± 2
E16	3,3 ± 0,7	7 ± 0,7	4,9 ± 0,3	18 ± 1	0,57 ± 0,02	0,53 ± 0,07	1,89 ± 0,07	110 ± 9	24 ± 1
E17	2,6 ± 0,9	9 ± 0,4	3,3 ± 0,2	12 ± 1	0,67 ± 0,03	0,54 ± 0,08	1,4 ± 0,1	100 ± 9	21 ± 2
E18	9 ± 1	12 ± 1,6	12 ± 1	27 ± 2	3,5 ± 0,4	2,9 ± 0,2	0,8 ± 0,04	110 ± 9	24 ± 1
E19	2,8 ± 0,8	4,1 ± 0,3	4 ± 0,2	8 ± 1	1,2 ± 0,3	0,93 ± 0,05	0,5 ± 0,02	33 ± 3	9 ± 0,9
K1	6,1 ± 0,9	16 ± 2	8 ± 1	18 ± 2	3,1 ± 0,4	4,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	93 ± 5	25 ± 2

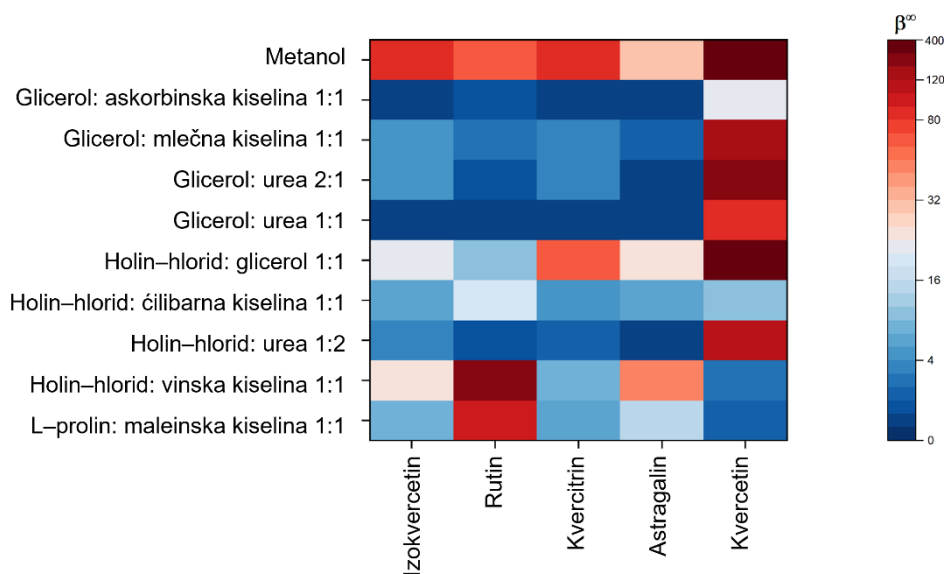
– Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za AE 0,01 mg L<sup>-1</sup>.

Tabela 8. Nastavak

Ekstrakti	Fenolna jedinjenja (mg kg <sup>-1</sup> )								
	IQUE	PCOA	QR	AST	RA	LUT	QUE	NAR	KMP
E1	430 ± 9	5 ± 0,9	660 ± 11	240 ± 4	4,0 ± 0,3	0,85 ± 0,05	190 ± 8	1,7 ± 0,3	7,9 ± 0,3
E2	410 ± 6	5 ± 1,7	620 ± 3	220 ± 6	3,0 ± 0,5	0,6 ± 0,3	67 ± 3	0,93 ± 0,05	3,2 ± 0,4
E3	320 ± 7	4 ± 0,2	460 ± 8	150 ± 3	2,0 ± 0,3	0,44 ± 0,05	171 ± 7	1,6 ± 0,8	5,9 ± 0,3
E4	420 ± 1	5 ± 2	600 ± 3	210 ± 2	3,0 ± 0,6	0,8 ± 0,3	316 ± 7	2,6 ± 0,4	11 ± 0,1
E5	430 ± 7	4 ± 2	620 ± 8	220 ± 7	3,5 ± 0,6	0,7 ± 0,3	63 ± 2	1,03 ± 0,06	3,13 ± 0,05
E6	490 ± 4	4 ± 1	710 ± 3	270 ± 4	4,2 ± 0,5	0,62 ± 0,04	43 ± 2	0,75 ± 0,03	2,4 ± 0,3
E7	520 ± 9	9 ± 1	750 ± 10	310 ± 5	3,7 ± 0,7	0,94 ± 0,09	12 ± 0,9	2,0 ± 0,1	4,56 ± 0,08
E8	500 ± 2	7,0 ± 0,6	690 ± 5	260 ± 6	2,9 ± 0,1	0,86 ± 0,09	16 ± 0,7	1,4 ± 0,3	3,35 ± 0,05
E9	540 ± 2	11 ± 2	760 ± 9	320 ± 9	5 ± 1	1,4 ± 0,2	33 ± 2	1,30 ± 0,09	4,12 ± 0,09
E10	490 ± 4	11,5 ± 0,3	680 ± 8	270 ± 5	4,2 ± 0,6	1,03 ± 0,08	14 ± 0,7	1,4 ± 0,2	3,20 ± 0,07
E11	340 ± 5	2,9 ± 0,1	470 ± 7	160 ± 1	1,27 ± 0,08	0,38 ± 0,02	21 ± 2	0,45 ± 0,08	2,26 ± 0,04
E12	160 ± 4	0,8 ± 0,1	210 ± 4	75 ± 3	0,6 ± 0,3	0,15 ± 0,07	16 ± 1	0,25 ± 0,08	2,12 ± 0,09
E13	550 ± 4	8,6 ± 0,1	850 ± 10	340 ± 5	4,4 ± 0,8	1,06 ± 0,08	68 ± 0,8	1,55 ± 0,06	6,13 ± 0,07
E14	470 ± 6	4,5 ± 0,2	680 ± 5	250 ± 3	2,7 ± 0,3	0,59 ± 0,03	35 ± 0,9	0,85 ± 0,07	2,44 ± 0,09
E15	610 ± 9	6,1 ± 0,9	940 ± 12	400 ± 8	6,9 ± 0,9	1,26 ± 0,03	37 ± 0,9	1,3 ± 0,2	4,1 ± 0,1
E16	500 ± 10	0,8 ± 0,1	710 ± 10	270 ± 5	3,24 ± 0,03	0,9 ± 0,1	31 ± 1	0,81 ± 0,04	4,59 ± 0,09
E17	450 ± 10	0,39 ± 0,02	670 ± 8	250 ± 4	2,31 ± 0,02	0,86 ± 0,03	30 ± 0,9	0,89 ± 0,06	4,11 ± 0,05
E18	430 ± 10	6,3 ± 0,1	700 ± 6	240 ± 3	3,2 ± 0,5	0,45 ± 0,01	58 ± 0,8	0,88 ± 0,08	2,88 ± 0,03
E19	190 ± 8	2,2 ± 0,1	300 ± 6	90 ± 1	0,8 ± 0,1	0,21 ± 0,06	82 ± 2	0,55 ± 0,02	3,03 ± 0,07
K1	460 ± 9	3,7 ± 0,1	690 ± 10	210 ± 4	3,3 ± 0,5	0,64 ± 0,09	35 ± 0,6	0,90 ± 0,04	2,83 ± 0,08

## 4.1.2.5. COSMO–RS predviđanje efikasnosti ekstrakcije

Kako bi se racionalizovao odabir komponenata eutektičkih smeša i poboljšala efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja prisutnih u petrovcu, izračunat je koeficijent aktivnosti pri beskonačnom razblaženju ( $\gamma^\infty$ ) primenom COSMO–RS modela za pet najzastupljenijih jedinjenja (izokvercetin, rutin, kvercitrin, astragalin i kvercetin) u devet eutektičkih rastvarača, metanolu i vodi. Analogno prethodnoj studiji<sup>129</sup>, parametar  $\gamma^\infty$  je preveden u parametar  $\beta^\infty$  ( $\beta^\infty = 1/\gamma^\infty$ ) koji je direktno proporcionalan afinitetu rastvarača prema određenoj rastvorenoj supstanci. Na Slici 13. prikazana je toplotna karta (eng. *heat map*) sa predviđenom efikasnošću ekstrakcije prema pet fenolnih jedinjenja u devet eutektičkih smeša i metanolu kao referentnom rastvaraču, a tačne vrednosti za sve rastvarače, zajedno sa vrednostima rastvorljivosti u vodi, date su u Tabeli 9.



Slika 13. Parametar afiniteta rastvarač– rastvorena supstanca  $\beta^\infty$  za pet najzastupljenijih fenolnih jedinjenja u petrovcu ( $x$ -osa) u deset rastvarača ( $y$ -osa). Veće vrednosti za  $\beta^\infty$  impliciraju bolji međusobni afinitet, odnosno veću mogućnost ekstrakcije.

Sve eutektičke smeše su imale veći afinitet prema fenolnim jedinjenjima u poređenju sa čistom vodom, a relativni afinitet, izračunat kao odnos  $\beta^\infty$  u eutektiku i vodi, iznosi od 100 do preko 1.000.000 (Tabela 10.). Vrednost relativnog afiniteta ( $\beta_{NADES}^\infty/\beta_{voda}^\infty$ ) za rutin pokazuje da se on dobro rastvara u eutektičkim smešama koje sadrže holin–hlorid i organsku kiselinu, a kvercitrin u smešama holin–hlorida i glicerola u poređenju sa vodom. Rezultati prikazani na Slici 13. pokazuju da eutektičke smeše L–prolin: maleinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ) i holin–hlorid: vinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ) imaju veći afinitet prema rutinu od metanola, dok smeša holin–hlorid: vinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ) ima veći afinitet prema astragalinu u poređenju sa metanolom. Na osnovu vrednosti  $\beta^\infty$  primećeno je da većina eutektičkih smeša ima veliki afinitet prema kvercetinu. Iz izračunatih vrednosti  $\log P$  za pet fenolnih jedinjenja, prikazanih u Tabeli 11., može se zaključiti da je od ispitivanih fenolnih jedinjenja kvercetin najlipofilnije. Ovaj rezultat ukazuje na značaj Van der Valsovih i hidrofobnih sila u mehanizmu solubilizacije proučavanih jedinjenja u eutektičkoj smeši.

Kako bi se stekao bolji uvid u mehanizam ekstrakcije, izračunati su  $\sigma$ -profili za odabrane eutektike i pet fenolnih jedinjenja, i posmatrane su njihove sličnosti (Slika 14).  $\sigma$ -profili predstavljaju histograme raspodele gustine naelektrisanja po površini molekula.  $\sigma$ -profil je karakterističan za svaki molekul i predstavlja otisak prsta (eng. *fingerprint*) molekula. Deo profila sa  $\sigma < -0,0082 \text{ e}/\text{Å}^2$  predstavlja HBD (donorski) region; između  $0,0082 \text{ e}/\text{Å}^2 \leq \sigma \leq 0,0082 \text{ e}/\text{Å}^2$  se nalazi nepolarni region, a region iznad  $\sigma > 0,0082 \text{ e}/\text{Å}^2$  odražava HBA (akceptorski) afinitet jedinjenja, zbog čega je moguće uporediti polarnost različitih molekula analizom oblika  $\sigma$ -profila.

Tabela 9. Vrednosti  $\beta^\infty$  za pet najzastupljenijih fenolnih jedinjenja u ekstraktu petrovca u devet eutektičkih smeša, metanolu i vodi.

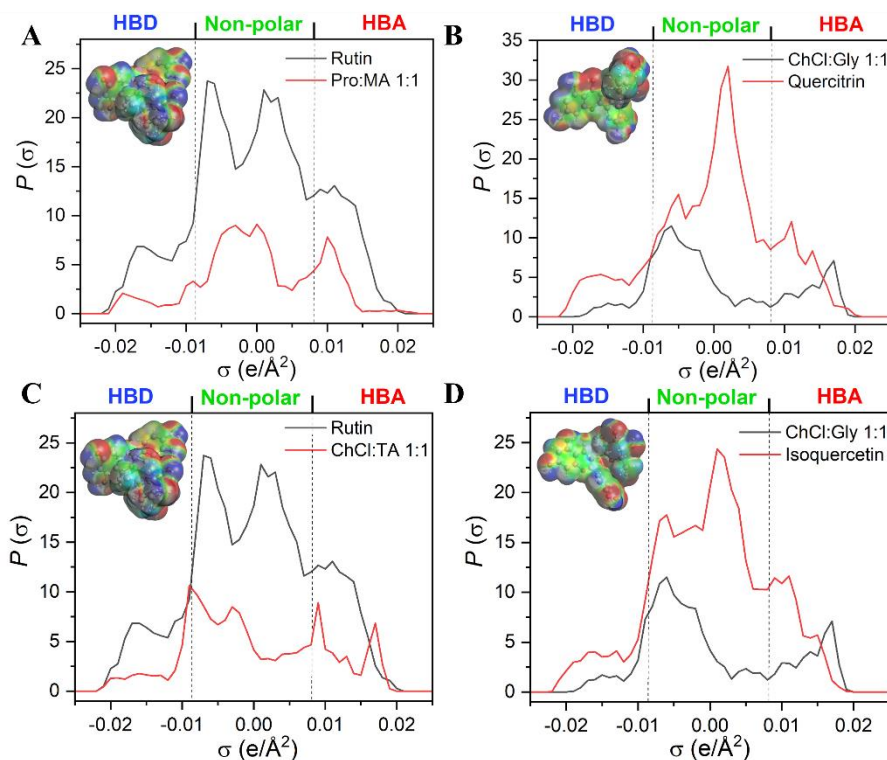
$\beta^\infty$	Izokvercetin	Rutin	Kvercitrin	Astragalin	Kvercetin
L–prolin: maleinska kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	8,9	111	5,4	16	2,4
Holin–hlorid: vinska kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	24	400	9,4	37	2,7
Holin–hlorid: urea 1:2 ( <i>n/n</i> )	3,2	1,6	2,4	1,4	124
Holin–hlorid: ćilibarna kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	5,7	19	4,1	7,3	12
Holin–hlorid: glicerol 1:1 ( <i>n/n</i> )	21	11	55	24	983
Glicerol: urea 1:1 ( <i>n/n</i> )	1,4	0,50	1,0	0,5	83
Glicerol: urea 2:1 ( <i>n/n</i> )	4	1,6	3,2	1,4	298
Glicerol: mlečna kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	4,1	2,5	3,8	2,1	179
Glicerol: askorbinska kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	1,5	1,6	1,3	1,2	21
Metanol	82	51	93	26	7527
Voda ( $\times 10^{-3}$ )	0,96	0,16	0,31	0,39	27

Tabela 10. Vrednosti  $\beta_{NADES}^\infty/\beta_{voda}^\infty$  za pet najzastupljenijih fenolnih jedinjenja u ekstraktu petrovca. Vrednosti pokazuju relativnu mogućnost ekstrakcije rastvorene supstance u eutektičkom rastvaraču u poređenju sa čistom vodom.

$\beta_{NADES}^\infty/\beta_{voda}^\infty$	Izokvercetin	Rutin	Kvercitrin	Astragalin	Kvercetin
L–prolin: maleinska kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	9333	680110	17509	40223	91
Holin–hlorid: vinska kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	25064	2453642	30805	93092	99
Holin–hlorid: urea 1:2 ( <i>n/n</i> )	3370	10084	7754	3648	4623
Holin–hlorid: ćilibarna kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	60101	115244	13388	18655	442
Holin–hlorid: glicerol 1:1 ( <i>n/n</i> )	22015	69056	178288	60960	36721
Glicerol: urea 1:1 ( <i>n/n</i> )	1497	3297	3306	1338	3116
Glicerol: urea 2:1 ( <i>n/n</i> )	4204	9531	10391	3522	11125
Glicerol: mlečna kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	4286	15421	12365	5272	6721
Glicerol: askorbinska kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	1533	9856	4134	2940	778

Tabela 11. Vrednosti  $\log P$  za pet najzastupljenijih fenolnih jedinjenja u ekstraktu petrovca predviđene od strane COSMO-RS.

Jedinjenje	$\log P$
Izokvercetin	1,877
Rutin	1,925
Kvercitrin	2,766
Astragalin	2,108
Kvercetin	3,191



Slika 14. A)  $\sigma$ -profili za eutektičku smešu L-prolin: maleinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ) i rutin; B)  $\sigma$ -profili za eutektičku smešu holin-hlorid: glicerol 1:1 ( $n/n$ ) i kvercitrin; C)  $\sigma$ -profili za eutektičku smešu holin-hlorid: vinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ) i rutin; D)  $\sigma$ -profil za eutektičku smešu holin-hlorid: glicerol 1:1 ( $n/n$ ) i izokvercetin. Površinska gustina naelektrisanja rastvorene supstance prikazana je u gornjem levom delu grafika.

Na grafiku  $\sigma$ -profila za eutektičku smešu L-prolin: maleinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ) i rutina (Slika 14.A) može se videti da su HBD regioni rutina i smeše manje izraženi od HBA regiona, dok nepolarni segmenti zauzimaju najveći deo njihove površine. Najverovatniji mehanizam vodoničnog vezivanja između rutina i ove eutektičke smeše je preko  $-OH$  grupa rutina kao HBD i karbonilnog kiseonika ili amino azota iz maleinske kiseline, odnosno L-prolina, kao HBA. Treba napomenuti da su sve komponente eutektičkih smeša modelovane u svojim neutralnim oblicima, tako da postoji mogućnost da bi cvrterjonski oblici aminokiseline i anjonski oblici organskih kiselina jače interagovali sa HBD grupama rutina. Prethodna studija je pokazala da predviđanja rastvorljivosti rutina u eutektičkim smešama koje se sastoje od aminokiseline i karboksilnih kiselina, zahtevaju tačnu definiciju protonovanih stanja konstituenata eutektičke smeše i uključivanje svih mikrostanja u COSMO-RS model.<sup>86</sup>

Manje polarne supstance kao što je kvercitrin su interagovali sa eutektičkom smešom holin-hlorid: glicerol 1:1 ( $n/n$ ). Iz  $\sigma$ -profila kvercitrina (Slika 14.B) može se videti izraženi pik u nepolarnom regionu površinskog naelektrisanja, što ukazuje na nižu polarnost rastvorene supstance. Osim toga, jak HBA pik na oko  $0,018 \text{ e}/\text{Å}^2$  tipičan je za eutektike na bazi holin-hlorida, tako da se može pretpostaviti da dolazi do formiranja vodonične veze između fenolnih  $-OH$  grupa kvercitrina i holinijum katjona, kao HBA grupe.

$\sigma$ -profili za rutin i eutektičku smešu holin-hlorid: vinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ) (Slika 14.C) ukazuju na jaču HBA sposobnost eutektika, što je povoljno za interakciju sa  $-OH$  grupama rutina kao HBD. Izokvercetin kao najpolarnije jedinjenje u ovoj seriji ( $\log P = 1,877$ , Tabela 11.) povoljno interaguje sa smešom holin-hlorid: glicerol 1:1 ( $n/n$ ) zahvaljujući sličnom obliku nepolarnog regiona na  $\sigma$ -profilu i dobrom poklapanju između HBA dela eutektika i HBD dela rutina (Slika 14.D).

#### 4.1.2.6. Eksperimentalni rezultati naspram teorijskih podataka

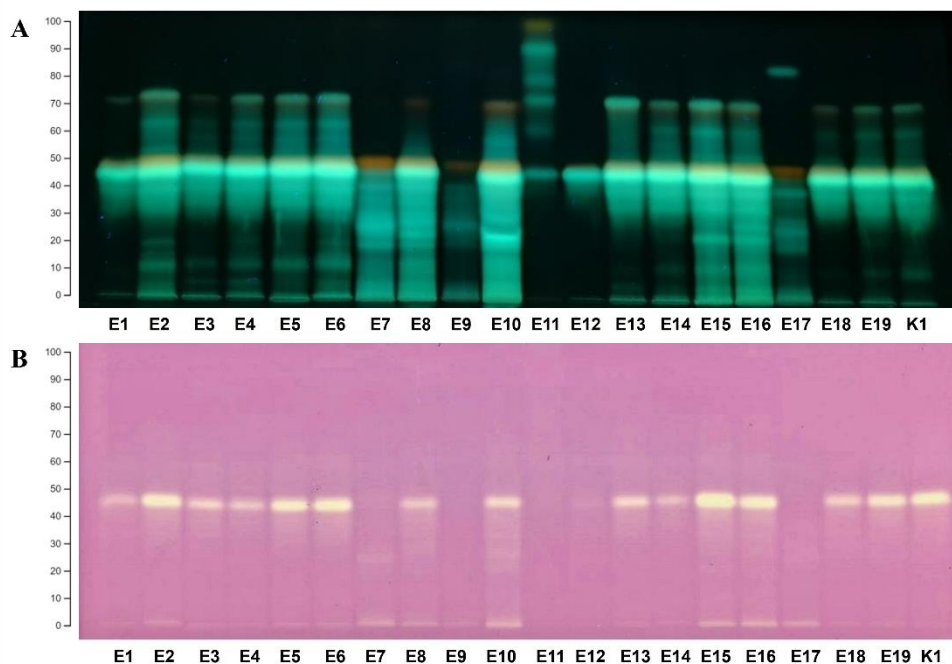
Postoji mnogo mogućih kombinacija HBA i HBD za pripremu eutektičkih smeša koje se mogu koristiti za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih proizvoda. Međutim, eksperimentalna procena efikasnosti ekstrakcije za svaku pripremljenu eutektičku smešu pojedinačno je dugotrajan proces. Pored toga, rastvorljivost jedinjenja u određenom rastvaraču nije moguće nedvosmisleno odrediti na osnovu  $\log P$  vrednosti ili pravilom „slično se u sličnom rastvaraču“, jer ne pruža uvid u svojstva rastvorene supstance i rastvarača. Kako bi se bolje razumele molekulske interakcije između eutektika i ciljanih jedinjenja, i da bi se izbegli dugotrajni eksperimenti, može se inicijalno uraditi skrining rastvarača pomoću termodinamičkog modela zasnovanog na COSMO teoriji. U literaturi se mogu naći dva pristupa u primeni COSMO modela u predviđanju efikasnosti ekstrakcije NADES rastvaračima. Jedan pristup se zasniva na *a priori* proceni uticaja HBA i HBD struktura na efikasnost ekstrakcije, koja se zatim eksperimentalno potvrđuje.<sup>129,130</sup> Prateći takav redosled evaluacije, autori eksperimentalno traže najbolje rastvarače među onima koje su prethodno teorijski odabrali. Drugi pristup je zasnovan na *a posteriori* korišćenju COSMO modela za tumačenje eksperimentalno određene rastvorljivosti jedinjenja. Međutim, rezultati u ovim studijama su pokazali da je teško doneti nedvosmislen zaključak.<sup>129,131</sup> Za kombinacije rastvarač–rastvorena supstanca, gde nepolarne interakcije igraju važnu ulogu, simulirane vrednosti  $\gamma^\infty$  pokazale su suprotan trend u poređenju sa eksperimentalnim rezultatima, odnosno modeli su se pokazali boljim u slučaju polarnijih rastvorenih supstanci.<sup>132</sup> Pored interakcija između rastvarača i rastvorene supstance koje se mogu predvideti pomoću COSMO–RS modela, fizički parametri kao što su viskoznost i temperatura u velikoj meri utiču na efikasnost ekstrakcije. Visoka viskoznost eutektičkih smeša usporava prenos mase između faza i produžava vreme potrebno za uspostavljanje termodinamičke ravnoteže. Osim toga, složeni matriks kao što je biljni materijal može dodatno otežati proces ekstrakcije.

U ovoj studiji, COSMO–RS je predvideo visoku rastvorljivost flavonol glikozida u eutektičkoj smeši holin–hlorid: glicerol 1:1 (*n/n*), 20 % vode (*w/w*), što se slaže sa eksperimentalnim podacima. Međutim, ovaj model nije dobro predvideo rastvorljivost u slučaju ostalih primenjenih eutektičkih smeša, iako su se eksperimentalno pokazale efikasne. Pored analize primenom COSMO–RS softvera, poželjno je eksperimentalno uraditi ekstrakcije sa većim brojem eutektičkih smeša različitih polarnosti. Takođe je potrebno uključiti hidrofobne eutektičke smeše u istraživanja koja se bave ekstrakcijom fenolnih jedinjenja, pošto su hidrofobne i Van der Valsove interakcije identifikovane kao važne za mehanizam solubilizacije/ekstrakcije.<sup>130</sup>

### 4.1.3. Procena efikasnosti ekstrakcije eutektičkim smešama – Podubica

#### 4.1.3.1. HPTLC profili fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti

HPTLC profili fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata podubice (Slika 15. A) su pokazali obrazac u kojem prevladavaju veoma polarna i srednje polarna jedinjenja, koja se javljaju kao zeleno i narandžasto obojene zone na  $hR_F$  vrednostima između 10 i 70, dok su nepolarnija fenolna jedinjenja prisutna na višim  $hR_F$  vrednostima, zastupljena znatno manje. Prisutne su varijacije u HPTLC fenolnim profilima u pogledu sastava fenolnih jedinjenja, kao i intenziteta zona dominantnih jedinjenja u zavisnosti od primenjene eutektičke smeše (vrste HBA i HBD, njihovog odnosa i udela vode). Na hromatogramima ekstrakata E2–E15, koji su dobijeni primenom eutektičkih smeša na bazi holin–hlorida, može se uočiti različit sastav ekstrahovanih fenolnih jedinjenja, koji je uslovljen drugom komponentom eutektika– urea, glicerol, čilibarna kiselina, mlečna kiselina ili vinska kiselina. Ekstrakti E7–E10, dobijeni primenom sistema holin–hlorid: urea, u odnosu na ostale ekstrakte na bazi holin–hlorida ne poseduju zelene zone na  $hR_F$  vrednosti 80, dok je zelena zona na  $hR_F$  vrednosti 50 slabijeg intenziteta. Prisutne su manje razlike u izgledu profila ekstrakta kad su kao HBD korišćene različite organske kiseline i one se ogledaju u intenzitetu zona na  $hR_F$  vrednostima između 10 i 30 (ekstrakti E1–E6, E11–E14, E18–E19). Ekstrakt E11 ima fenolni profil koji se izrazito razlikuje od ostalih ispitivanih ekstrakata i jedini je bogat zonama na  $hR_F$  vrednostima većim od 70. U slučaju ekstrakata koji potiču od eutektičkih smeša na bazi glicerola (E15–E19) može se uočiti sličan trend u izgledu profila kao i kod ekstrakata na bazi holin–hlorida, odnosno veliki uticaj HBD komponente na sastav dobijenih ekstrakata. Poređenjem ekstrakcionih sistema na bazi holin–hlorida i na bazi glicerola može se uočiti prisustvo intenzivnih zelenih zona u svim ekstraktima, što sugerise sličnu efikasnost ekstrakcije ova dva sistema. Eutektički sistem holin–hlorid: glicerol 1:1 ( $n/n$ ) je pokazao najbogatiji profil fenolnih jedinjenja, dok je najmanje efikasan sistem bio holin–hlorid: čilibarna kiselina 1:1 ( $n/n$ ).



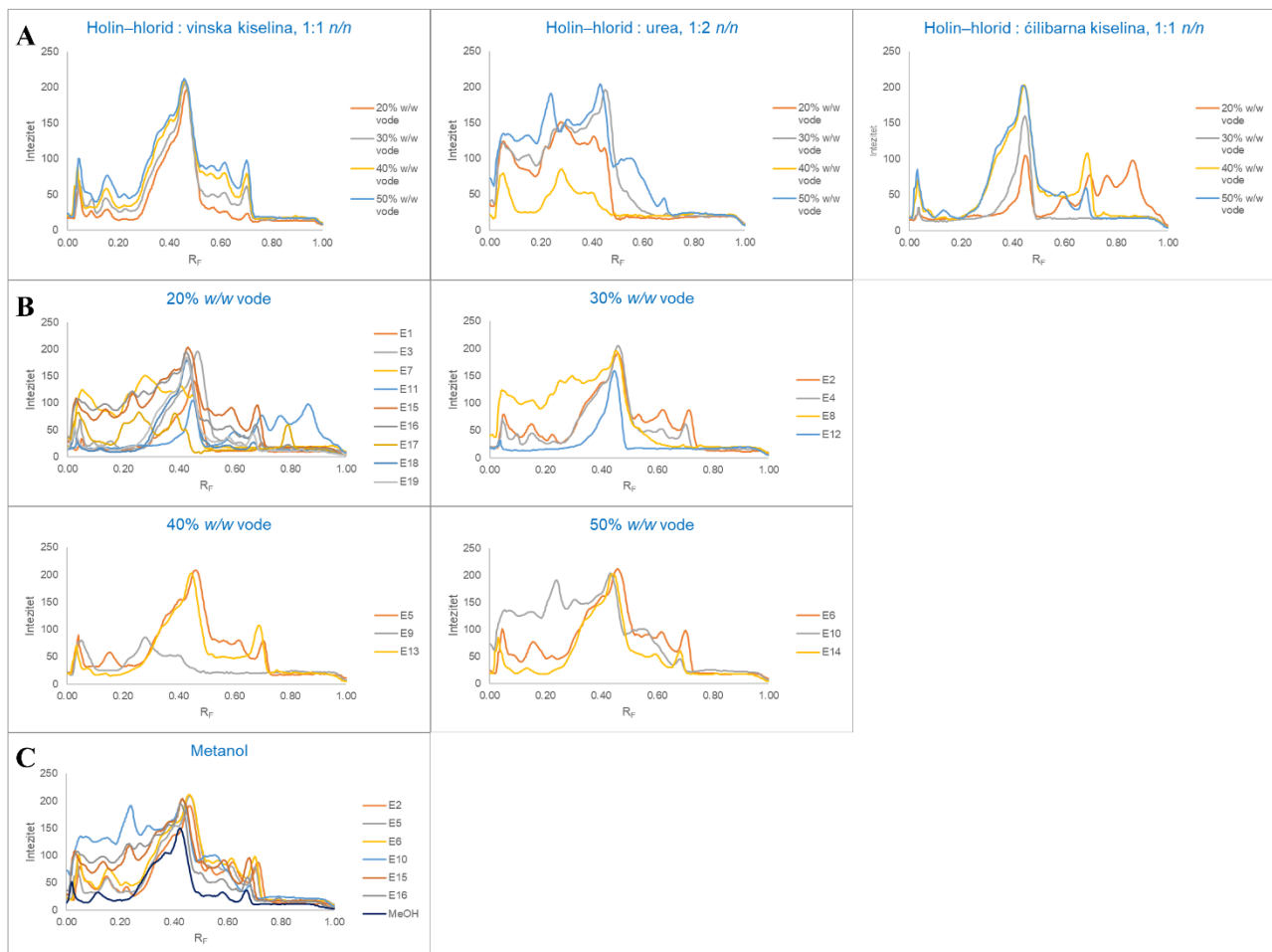
Slika 15. HPTLC profili eutektičkih i metanolnog ekstrakta podubice: A) profil fenolnih jedinjenja; B) profil antioksidativne aktivnosti

Antioksidativni profili ekstrakata podubice su prikazani na Slici 15.B i na njima se mogu uočiti jedinjenja koja imaju antioksidativnu aktivnost kao žuto obojene zone na ljubičastoj pozadini. Većina dobijenih hromatograma pokazuje prisustvo zone velike aktivnosti na  $hR_F$  vrednosti 45, koja odgovara intenzivnoj zelenoj zoni na fenolnom profilu (Slika 15. A). Ovaj esej je pokazao i prisustvo

nekoliko aktivnih jedinjenja na nižim  $hR_F$  vrednostima, između 20 i 30, kod ekstrakata E7, E8, E10, E15 i E16, što je u skladu sa njihovim profilima fenolnih jedinjenja koji su bogati zonama na nižim  $hR_F$  vrednostima.

Uticaj sadržaja vode u eutektičkim smešama na efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja je procenjen dodavanjem različitih količina vode (20–50%,  $w/w$ ) u tri različita sistema– holin–hlorid: vinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ), holin–hlorid: urea 1:2 ( $n/n$ ) i holin–hlorid: ćilibarna kiselina 1:1 ( $n/n$ ). Na Slici 16. su prikazani linijski profili prethodno pomenutih eutektičkih ekstrakata dobijenih obradom slike HPTLC profila. Poređenjem linijskih profila ekstrakata dobijenih korišćenjem eutektičkih smeša istog HBA i HBD sastava, ali sa različitim udelom vode (Slika 16.A) može se uočiti da povećanje sadržaja vode u eutektičkim sistemima dovodi do većeg prinosa ekstrakcije. Pravilan trend uticaja sadržaja vode na prinos ekstrakcije može se primetiti u slučaju kad su korišćeni eutektički sistemi holin–hlorid: vinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ) (ekstrakti E3–E6) i holin–hlorid: ćilibarna kiselina 1:1 ( $n/n$ ) (ekstrakti E11–E14), međutim kada je korišćen sistem holin–hlorida: urea 1:2 ( $n/n$ ) (ekstrakti E7–E10) najveći prinos ekstrakcije postignut je sa 50%, a najmanji sa 40% vode. Poređenjem linijskih profila ekstrakta dobijenih primenom različitih eutektičkih smeša koje su sadržale isti udeo vode (20, 30, 40 ili 50%  $w/w$ ), uočavaju se značajne razlike u profilima ekstrakata dobijenih primenom smeša sa 20% ( $w/w$ ) vode (Slika 16.B). Ove razlike pokazuju da ekstrakcija u najvećoj meri zavisi od sastava smeše (vrste i odnosa HBA i HBD), potvrđujući mogućnost dizajniranja eutektičkih rastvarača sa visokom efikasnošću prema ciljanim analitima. Povećanje sadržaja vode u eutektičkim smešama različitog sastava rezultuje time da profili ekstrakata postaju slični i linijski profili ekstrakta dobijenih sa eutektičkim sistemima koji su sadržali 50% vode najbolje ilustruju ovu pojavu (Slika 16.B). Prisustvo vode dovodi do slabljenja vodoničnih veza između komponenata koja formiraju eutektičku smešu rezultujući time da voda postaje glavni rastvarač za ekstrakciju u takvim sistemima, zbog čega treba izbegavati prekomerno dodavanje vode. Veći sadržaj vode se preporučuje samo u slučajevima kada je smeša previše viskozna da bi se koristila za ekstrakciju, ili kad je matriks kompleksan, što može biti slučaj sa spršenim biljnim materijalom. Nekoliko eutektičkih ekstrakta (E2, E5, E6, E8, E10, E15 i E16) su pokazali profile sa zonama većeg intenziteta u poređenju sa metanolnim ekstraktom, što ukazuje da su korišćeni eutektički sistemi efikasniji rastvarači za ekstrakciju (Slika 16. C).

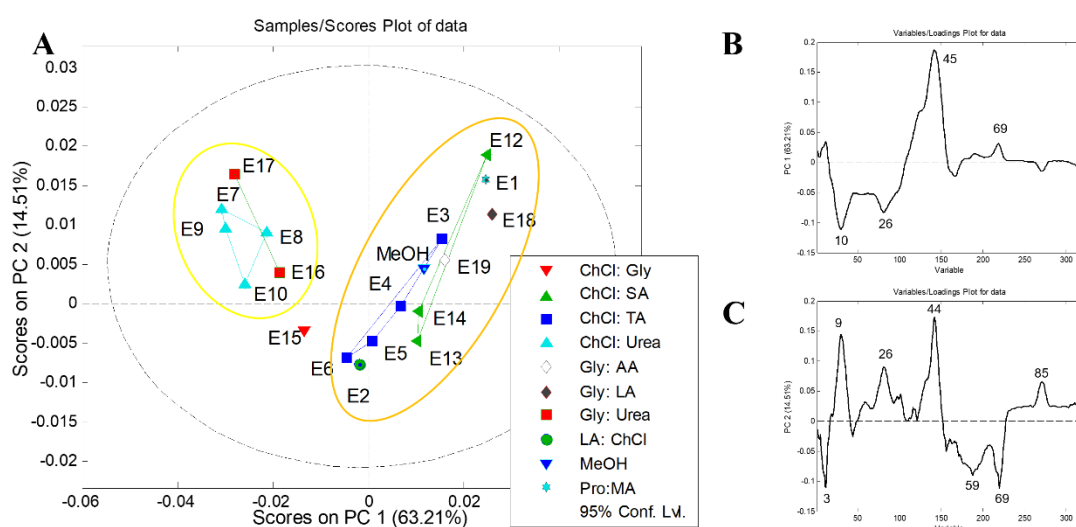
Poređenjem HPTLC profila fenolnih jedinjenja podubice i petrovca može se uočiti velika razlika u izgledu profila, iako su korišćene iste eutektičke smeše. Prisutne su razlike u sastavu i količinama ekstrahovanih jedinjenja, koje se mogu zaključiti na osnovu broja i intenziteta zona na HPTLC profilima. Na jasne razlike u sastavu ekstrahovanih jedinjenjima ukazuju i potpuno različite boje zona prisutnih na profilima. Ovi rezultati sugerišu da je i pored slične vrste uzoraka lekovitog bilja, potrebno optimizovati ekstrakciono sredstvo za svaki matriks.



Slika 16. Linijski profili eutektičkih ekstrakata podubice: A) uticaj sadržaja vode u eutektičkim smešama na profil fenolnih jedinjenja; B) uticaj različitog sastava eutektičkih smeša sa istim sadržajem vode na profil fenolnih jedinjenja; C) poređenje fenolnih profila odabranih eutektičkih ekstrakata sa metanolnim ekstraktima.

Hromatografsko profilisanje pruža korisne informacije o sastavu fenolnih jedinjenja, ali vizuelnom procenom nije moguće utvrditi koja jedinjenja su karakteristična za određeni ekstrakt, u zavisnosti od primenjene eutektičke smeše, zbog čega je primenjena hemometrijska analiza. Priprema podataka za multivarijantnu analizu obuhvatila je obradu slika hromatograma. Matrica podataka za metodu analiza glavnih komponenta se sastojala od 19 objekata koji predstavljaju ispitivane ekstrakte i 320 varijabli koje predstavljaju intenzitete sive boje izražene u pikselima duž linije hromatograma. Ekstrakt E11 je predstavljao spoljašnju vrednost (eng. *outlier*) u inicijalnom PCA modelu, zbog čega je isključen iz dalje multivarijantne analize. Dobijeni PCA model se sastojao od 4 glavne komponente kojim je objašnjeno 90,62% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1– 62,04%, PC2– 15,10% i PC3– 8,29%). Grafik skorova latentnih varijabli (Slika 17. A) je otkrio da su se ekstrakti razdvojili na osnovu sastava primenjenih eutektičkih smeša u dva klastera: prvi kompaktni klaster odgovara ekstraktima dobijenim primenom eutektičkih smeša na bazi uree, dok drugi klaster odgovara ekstraktima koji su dobijeni eutektičkim smešama koje su imale organsku kiselinu kao HBD. Blizina ekstrakata E7–E10 i E16–E17 u prvom klasteru ukazuje na dominantnu ulogu uree na ekstrakciju u odnosu na HBA komponentu eutektičkih smeša (holin–hlorid i glicerol), koja je pretpostavljena i na osnovu vizuelne procene hromatograma. Ekstrakti dobijeni primenom eutektičkih smeša na bazi organskih kiselina (vinska, čilibarna, mlečna, maleinska i askorbinska) formiraju drugi klaster, ali su rasuti duž PC2 ose, što ukazuje da struktura kiseline (broj karboksilnih grupa i hidroksilnih grupa) ima uticaj na ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz podubice. Između dva pomenuta klastera, razdvojena duž PC1 ose, pozicionirao se ekstrakt E15, koji je dobijen primenom smeše holin–hlorida i glicerola. Dobijeni PCA model sugerise veliki uticaj kiselosti eutektičke smeše na ekstrakciju, jer su se

eutektički ekstrakti razdvojili duž PC1 ose na osnovu kiselinsko–baznih svojstava HBD komponente, urea ima bazna, glicerol neutralna i organske kiseline slabo kisela svojstva. Grafik vektora latentnih varijabli (Slika 17.B) pokazuje da se glavna zona koje uslovljava razdvajanje duž PC1 ose nalazi na  $hR_F$  vrednosti 45, dok dodatni uticaj na razdvajanje imaju i jedinjenja na  $hR_F$  vrednostima 10, 26 i 69. Grafik skorova latentnih varijabli je pokazao da su se objekti dodatno razdvojili duž PC2 ose na osnovu udela vode u primenjenoj eutektičkoj smeši: ekstrakti dobijeni primenom rastvarača koji su pripremljeni sa većim udelom vode (40 ili 50% w/w) imali su negativan skor na PC2 osi (E5, E6, E13 i E14), dok su oni dobijeni sa manjim udelom (20% i 30% w/w) imali pozitivan skor (E3, E4 i E12). Grafik vektora latentnih varijabli za PC2 osu (Slika 17.C) je pokazao da su zone na  $hR_F$  9, 44 i 69 imale najveći uticaj na razdvajanje ekstrakta prema uticaju sadržaja vode. Dobijeni PCA model je pokazao da sadržaj vode u eutektičkim smešama utiče na učinak ekstrakcije i na profil fenolnih jedinjenja.



Slika 17. Analiza glavnih komponenta dobijena za fenolni profil eutektičkih ekstrakata podubice: A) grafik skorova latentnih varijabli; B/C) grafik vektora latentnih varijabli.

#### 4.1.3.2. Procena ekološke prihvatljivosti HPTLC metode

Urađena je procena ekološke prihvatljivosti HPTLC metode primenom dva alata za procenu: NEMI piktograma i Eko–skale. Dobijeni rezultati procene ekološke prihvatljivosti su isti kao i u slučaju HPTLC metode primenjene za analizu ekstrakata petrovca, koja je opisana u poglavlju 4.1.2.2. Slaganje u rezultatima je očekivano, jer je sastav mobilne faze bio sličan i postojala je samo razlika u odnosima komponenta. Mobilna faza primenjena za analizu ekstrakata podubice imala je veći udeo mravlje kiseline, što je rezultiralo nižom pH vrednošću koja je iznosila 0,87. Ipak, mala razlika u pH vrednostima nije se odrazila na izgled NEMI piktograma (Slika 11.), kao ni na skor na Eko–skali (Tabela 6.), zbog čega se primenjena HPTLC metoda za analizu ekstrakata podubice može smatrati ekološki prihvatljivom i okarakterisati kao odlična zelena metoda.

#### 4.1.3.3. Spektrofotometrijski eseji

Kako bi se procenila efikasnost ekstrakcije eutektičkih rastvarača u odnosu na konvencionalni rastvarač (metanol) određeni su parametri ukupan sadržaj fenola (TPC), ukupan sadržaj flavonoida (TFC) i antioksidativni kapacitet (RSA) u ekstraktima podubice primenom spektrofotometrijskih eseja i rezultati su prikazani u Tabeli 12. i na Slici 18.

TPC i TFC vrednosti eutektičkih ekstrakata podubice su bile u rasponu 9,2–94 g GAE kg<sup>-1</sup>, odnosno 24,23–180,3 g RUE kg<sup>-1</sup>. Četiri eutektička ekstrakta (E2, E10, E15 i E16) su imali više vrednosti

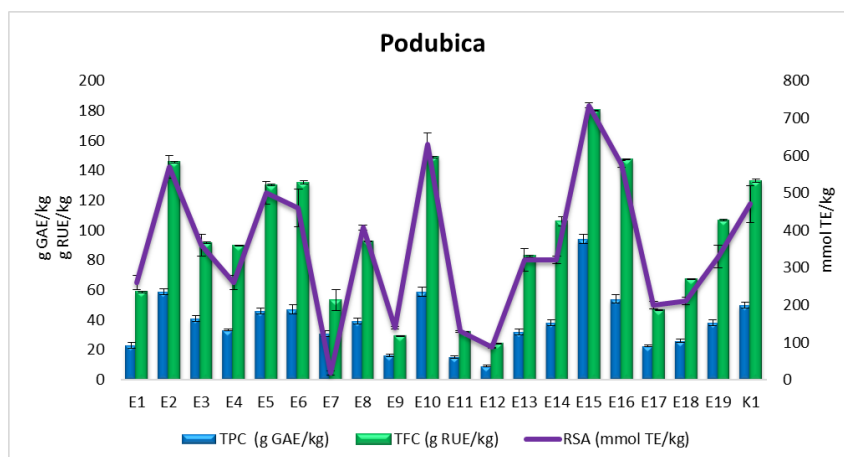
TPC–a i TFC–a u poređenju sa metanolnim ekstraktom, a najveće vrednosti imao je ekstrakt E15, koji je dobijen primenom eutektičke smeše holin–hlorid: glicerol 1:1 (*n/n*) 20% (*w/w*) vode. Ovakav trend u rezultatima TPC–a i TFC–a može se objasniti uticajem viskoznosti eutektičke smeše na efikasnost ekstrakcije. Naime, eutektičke smeše korišćene za ekstrakciju navedenih ekstrakata su imale jednu tečnu komponentu, kao što su mlečna kiselina i glicerol (ekstrakti E2, E15 i E16) ili visok sadržaj vode (ekstrakt E10), što može smanjiti viskoznost rastvarača i povoljno se odraziti na efikasnost ekstrakcije. Vrednosti antioksidativnog kapaciteta su bile u opsegu 18–734 mmol TE kg<sup>-1</sup> i pet eutektičkih ekstrakata je imalo više vrednosti u poređenju sa metanolom (E2, E5, E10, E15 i E16). Antioksidativna aktivnost ekstrakata bila je u korelaciji sa sadržajem fenola što je potvrđeno visokim vrednostima Pirsonovog koeficijenta korelacije između rezultata RSA i TPC ( $r = 0,916$ ), RSA i TFC ( $r = 0,953$ ), i između TPC i TFC ( $r = 0,943$ ).

Tabela 12. Ukupni sadržaj fenola, ukupan sadržaj flavonoida i antioksidativni kapacitet u ekstraktima podubice dobijenih primenom eutektičkih smeša (E) i konvencionalnog rastvarača (K). (Oznake ekstrakata su navedene u Tabeli 5.)

Ekstrakti	RSA (mmol TE kg <sup>-1</sup> )	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC (g QUE kg <sup>-1</sup> )
E1	260 ± 20	23 ± 2	58,6 ± 0,4
E2	570 ± 30	59 ± 2	145,6 ± 0,5
E3	360 ± 30	41 ± 2	91,5 ± 0,5
E4	260 ± 20	33,3 ± 0,6	89,6 ± 0,4
E5	500 ± 30	46 ± 2	130,3 ± 0,5
E6	460 ± 50	47 ± 3	132 ± 1
E7	18 ± 5	31 ± 2	53 ± 7
E8	407 ± 6	39 ± 2	92,5 ± 0,1
E9	139 ± 3	16,0 ± 0,8	29,36 ± 0,05
E10	630 ± 30	59 ± 3	149,0 ± 0,5
E11	129 ± 3	15,1 ± 0,7	32,18 ± 0,06
E12	87,2 ± 0,1	9,2 ± 0,4	24,23 ± 0,01
E13	320 ± 30	32 ± 2	82,7 ± 0,7
E14	320 ± 10	38 ± 2	106 ± 3
E15	734 ± 6	94 ± 3	180,3 ± 0,2
E16	577 ± 9	54 ± 3	147,3 ± 0,2
E17	200 ± 10	22,6 ± 0,5	46,4 ± 0,3
E18	210 ± 10	26 ± 1	67,2 ± 0,2
E19	330 ± 30	38 ± 2	106,7 ± 0,6
K1	470 ± 50	50 ± 2	133 ± 1

Uticaj sadržaja vode je proučavan u tri različita sistema (holin–hlorid: vinska kiselina= 1:1 *n/n*, holin–hlorid: urea= 1:2 *n/n*, i holin–hlorid: ćilibarna kiselina= 1:1, *n/n*), i utvrđeno je da trend rasta vrednosti TPC, TFC i RSA sa porastom udela vode nije ujednačen i isti kod proučavanih sistema, što može ukazivati na činjenicu da je uticaj primenjenih HBD veći. Naime, kada se porede rezultati spektrofotometrijskih eseja ekstrakata koji su dobijeni primenom smeša sa 20% (*w/w*) vode i holin–hloridom kao HBA, ali različitim HBD (mlečna, ćilibarna, vinska kiselina, urea i glicerol), odnosno ekstrakti E2, E3, E11, E7 i E15, može se uočiti veliki uticaj HBD–a na efikasnost ekstrakcije. Rezultati spektrofotometrijskih eseja su pokazali veliki uticaj HBD komponente i sadržaja vode na svojstva eutektičkih smeša i njihov učinak ekstrakcije i skladu su sa rezultatima HPTLC–a. Takođe, ovi rezultati naglašavaju važnost sticanja dubljev razumevanja interakcija između eutektičkih smeša i ciljanih jedinjenja, kao i predviđanje ponašanja sistema.

Uporedni *t*-test primenjen na rezultate spektrofotometrijskih eseja (Tabela P 3) pokazao je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima između metanola i svih eutektičkih rastvarača, što sugeriše da je efikasnost ekstrakcije jednaka.



Slika 18. Ukupan sadržaj fenola– plavi stub, ukupan sadržaj flavonoida– zeleni stub, i antioksidativni kapacitet– ljubičasta linija u eutektičkim ekstraktima (E) i konvencionalnom ekstraktu (K) u uzroku podubice. (Oznake ekstrakata su navedene u Tabeli 5.)

#### 4.1.3.4. UHPLC analiza fenolnih jedinjenja

Ukupno devetnaest fenolnih jedinjenja je određeno i kvantifikovano u eutektičkim ekstraktima podubice primenom UHPLC–DAD–MS/MS metode (Tabela 13). Najzastupljenija grupa fenolnih jedinjenja bile su fenolne kiseline (protokatehinska, siringinska, hlorogena, *p*-hidroksibenzoeva, kofeinska, ruzmarinska i *p*-kumarinska kiselina), flavoni (luteolin, izokvercetin, hispidulin, astragalin), flavonoli (kempferol), flavanoni (naringenin) i glikozidi (kvercitrin i rutin).

Eutektičke smeše pripremljene od holin–hlorida i vinske kiseline (ekstrakti E3–E6) bile su dobri medijumi za ciljanu ekstrakciju eskuletina i kvercetina, pri čemu je koncentracija ova dva jedinjenja bila oko 2, odnosno 4 puta viša u ekstraktu E4 u odnosu na metanolni ekstrakt. Takođe, ovi eutektički sistemi su ekstrahovali hlorogenu, ruzmarinsku i kofeinsku kiselinu u višim koncentracijama u poređenju sa metanolom. Prinos ekstrakcije glavnih fenolnih jedinjenja je poboljšán povećanjem sadržaja vode u ovom eutektičkom sistemu, međutim nije bilo moguće uočiti pravilan trend u rezultatima sa porastom sadržaja vode. Eutektičke smeše pripremljene od holin–hlorida i uree u odnosu 1:2 (*n/n*), sa različitim sadržajem vode (ekstrakti E7–E10), pokazale su različit učinak ekstrakcije u pogledu sastava dobijenih ekstrakata. Eutektikom sa 20% (*w/w*) vode su ekstrahovani *p*-hidroksibenzoeva kiselina, viteksin i hispidulin u većim koncentracijama u poređenju sa metanolom, eutektikom sa 40% (*w/w*) vode ekstrahovani su luteolin i hispidulin u višim prinosima, a eutektikom sa 30% (*w/w*) vode su ciljano ekstrahovani izoorijentin i viteksin. Ovi rezultati pokazuju da sadržaj vode u velikoj meri utiče na svojstva eutektičke smeše i performanse ekstrakcije, naglašavajući potrebu za detaljnijim razumevanjem interakcija u eutektičkim rastvaračima i uključivanje molekula vode u teorijske studije. Eutektički rastvarači pripremljeni od holin–hlorida i ćilibarne kiseline (ekstrakti E11–E14) pokazali su različite performanse ekstrakcije u zavisnosti od sadržaja vode (20–50% *w/w*). Eutekticima sa 20% i 40% (*w/w*) vode ekstrahovane su veće količine eskuletina, kofeinske kiseline, luteolina, kvercetina, kempferola i hispidulina, eutektikom sa 50% (*w/w*) vode ciljano je ekstrahovana hlorogena kiselina, dok se eutektik sa 30% (*w/w*) vode pokazao kao loš rastvarač za ekstrakciju. Eutektičkom smešom sa 20% vode (ekstrakt E11) su ekstrahovane siringinska kiselina i hispidulin u većim prinosima u poređenju sa metanolom, skoro 11 i 75 puta više. Eutektičke smeše pripremljene od glicerola i uree u molarnim odnosima 1:1 i 2:1 su pokazale različitu efikasnost ekstrakcije, sugerišući da odnos komponenata utiče na performanse ekstrakcije i sastav ekstrakata.

Sadržaj fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu i eutektičkim ekstraktima (za svaki primenjeni sistem pojedinačno) upoređen je korišćenjem uporednog  $t$ -testom (Tabela P 4). Statistički značajno različit sadržaj ovih jedinjenja zabeležen je u ekstraktima E1, E8, E12 i E15, što smeše L-prolin: maleinska kiselina 1:1 ( $n/n$ ) sa 20% vode, holin-hlorid: urea 1:2 ( $n/n$ ) sa 30% vode i holin-hlorid: ćilibarna kiselina 1:1 ( $n/n$ ) sa 40% vode čini manje efikasnijim rastvaračima za ekstrakciju fenolnih jedinjenja u odnosu na metanol, dok se smeša holin-hlorid: glicerol 1:1 ( $n/n$ ) sa 20% vode pokazala statistički značajno efikasnija u odnosu na metanol. U ostalim slučajevima nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u sadržaju fenolnih jedinjenja u eutektičkim ekstraktima i metanolnom ekstraktu, što ukazuje na jednaku efikasnost ekstrakcije. Rezultati potvrđuju da se eutektičke smeše mogu koristiti za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz podubice, a njihova ekološka prihvatljivost im daje veliku prednost u odnosu na konvencionalne rastvarače.

Tabela 13. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima podubice.

Ekstrakti	Fenolna jedinjenja (mg kg <sup>-1</sup> )									
	PCA	SA	CGA	PHBA	AE	CA	ISO	RUT	VIT	IQUE
E1	2,7 ± 0,4	11,1 ± 0,2	58,0 ± 1,0	16,4 ± 0,4	7,4 ± 1,8	10,47 ± 0,02	0,21 ± 0,08	6,3 ± 0,1	0,27 ± 0,09	10,42 ± 1,4
E2	3,9 ± 0,2	5,9 ± 1,1	57,82 ± 0,08	27,3 ± 0,6	4,8 ± 0,2	7,5 ± 1,0	0,36 ± 0,08	7,7 ± 0,6	0,35 ± 0,02	16,4 ± 0,2
E3	3,6 ± 0,2	9,6 ± 0,6	120,3 ± 0,9	29,5 ± 1,3	13,7 ± 1,5	17,4 ± 1,0	0,25 ± 0,03	6,5 ± 0,7	0,31 ± 0,04	10,8 ± 1,7
E4	4,82 ± 0,03	13,1 ± 0,6	104,0 ± 0,8	22,1 ± 0,4	21,8 ± 1,5	29,1 ± 0,8	0,28 ± 0,06	6,1 ± 0,8	0,29 ± 0,07	9,2 ± 2,7
E5	3,6 ± 0,7	6,8 ± 0,5	141,1 ± 0,7	43,4 ± 0,6	15,2 ± 0,5	20,7 ± 0,4	0,32 ± 0,02	6,1 ± 0,6	0,31 ± 0,03	12,6 ± 0,9
E6	4,4 ± 0,4	7,0 ± 0,5	141,44 ± 8,82	27,6 ± 0,5	17,1 ± 1,4	22,8 ± 0,5	0,45 ± 0,09	6,8 ± 0,2	0,34 ± 0,07	10,9 ± 0,6
E7	3,2 ± 0,7	10,0 ± 0,3	19,5 ± 1,0	81,8 ± 2,0	7,6 ± 0,2	11,8 ± 1,3	0,24 ± 0,02	10,5 ± 0,2	0,57 ± 0,03	3,2 ± 0,2
E8	2,7 ± 0,3	6,50 ± 0,05	83,7 ± 0,6	23,1 ± 0,9	2,0 ± 0,8	3,7 ± 0,9	0,25 ± 0,04	8,2 ± 1,0	0,37 ± 0,05	10,2 ± 0,2
E9	2,3 ± 0,2	9,8 ± 0,7	5,0 ± 0,8	37,9 ± 0,5	6,59 ± 0,01	6,6 ± 2,2	0,08 ± 0,03	6,2 ± 0,3	0,16 ± 0,09	0,37 ± 0,05
E10	7,4 ± 0,5	9,2 ± 1,0	137,2 ± 1,7	41,1 ± 1,3	5,8 ± 1,1	9,5 ± 0,3	0,4 ± 0,2	9,0 ± 0,2	0,57 ± 0,10	12,3 ± 1,7
E11	3,8 ± 0,3	216,0 ± 2,0	30,9 ± 0,8	32,8 ± 1,4	54,8 ± 0,5	100,1 ± 5,3	0,23 ± 0,08	1,4 ± 0,8	0,073 ± 0,02	0,22 ± 0,06
E12	2,2 ± 0,6	5,4 ± 0,5	39,9 ± 0,9	15,8 ± 0,8	3,3 ± 0,4	5,2 ± 0,6	0,12 ± 0,07	5,3 ± 0,4	0,14 ± 0,05	5,8 ± 0,8
E13	12,8 ± 0,4	20,5 ± 0,7	95,70 ± 0,05	24,1 ± 1,0	45,2 ± 0,3	77,8 ± 0,6	0,41 ± 0,09	8,8 ± 0,4	0,27 ± 0,10	8,6 ± 0,4
E14	2,8 ± 0,6	3,5 ± 0,1	122,1 ± 1,4	35,7 ± 0,5	7,7 ± 0,8	14,8 ± 1,3	0,38 ± 0,07	7,1 ± 0,7	0,33 ± 0,02	13,3 ± 1,2
E15	4,6 ± 0,2	6,3 ± 0,3	72,2 ± 0,5	22,4 ± 0,5	2,1 ± 0,7	3,6 ± 0,4	0,44 ± 0,04	6,1 ± 0,2	0,30 ± 0,04	13,5 ± 0,3
E16	4,0 ± 0,6	3,7 ± 0,2	27,20 ± 0,08	16,1 ± 0,6	1,7 ± 0,6	1,9 ± 0,6	0,38 ± 0,05	7,4 ± 0,6	0,43 ± 0,07	12,4 ± 1,6
E17	3,0 ± 0,7	5,4 ± 0,9	1,34 ± 0,07	36,3 ± 2,0	6,0 ± 0,2	5,6 ± 1,1	0,09 ± 0,07	10,1 ± 0,4	0,14 ± 0,02	0,74 ± 0,08
E18	2,0 ± 0,5	7,8 ± 0,7	37,9 ± 0,4	9,1 ± 0,5	4,1 ± 0,3	6,2 ± 0,9	0,29 ± 0,10	7,6 ± 0,4	0,37 ± 0,04	13,1 ± 2,1
E19	2,7 ± 0,4	2,51 ± 0,08	72,8 ± 1,0	15,7 ± 1,8	6,3 ± 1,0	9,5 ± 0,4	0,35 ± 0,08	7,2 ± 0,2	0,24 ± 0,07	12,4 ± 1,8
K1	5,5 ± 0,7	19,3 ± 0,5	108,3 ± 1,5	40,0 ± 1,5	9,9 ± 0,4	15,4 ± 0,1	0,23 ± 0,09	6,6 ± 0,6	0,29 ± 0,07	11,2 ± 0,7

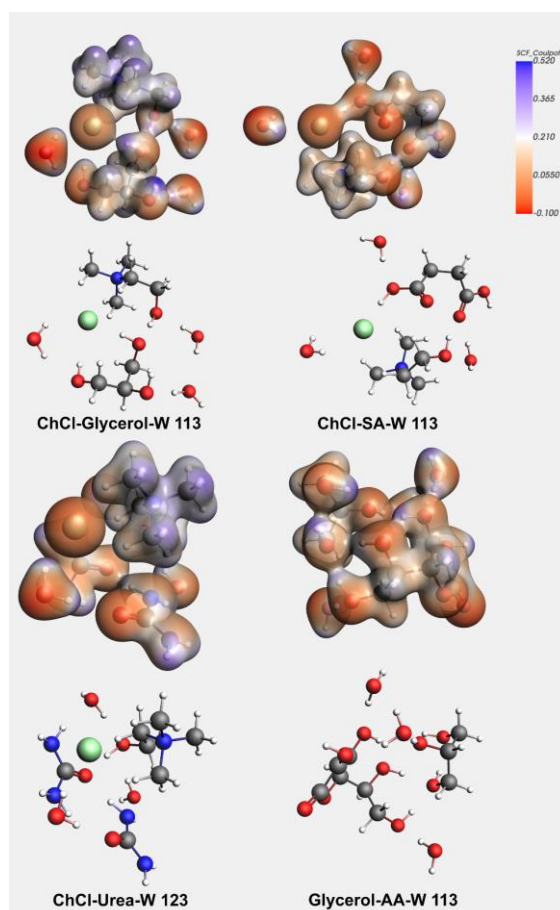
Tabela 13. Nastavak

Ekstrakti	Fenolna jedinjenja (mg kg <sup>-1</sup> )								
	PCOA	QR	AST	RA	LUT	QUE	NAR	KMP	HPD
E1	2,5 ± 0,4	11,8 ± 0,2	5,4 ± 0,3	5,7 ± 0,8	7,2	11,3 ± 0,7	3,8 ± 0,5	2,3 ± 0,6	0,68 ± 0,02
E2	2,3 ± 0,9	27,7 ± 0,6	10,8 ± 1,0	10,1 ± 0,6	9,8 ± 0,1	10,4 ± 0,2	7,9 ± 0,3	2,4 ± 0,9	0,63 ± 0,02
E3	3,0 ± 0,3	15,2 ± 0,5	8,1 ± 0,8	8,7 ± 0,8	4,3 ± 0,2	16,6 ± 0,3	4,3 ± 0,8	2,9 ± 0,2	0,37 ± 0,02
E4	3,4 ± 0,9	11,1 ± 0,3	6,4 ± 0,2	8,8 ± 0,2	4,8 ± 0,3	30,2 ± 0,4	3,9 ± 0,5	2,9 ± 0,3	0,32 ± 0,04
E5	4,06 ± 0,02	16,1 ± 0,7	9,6 ± 0,1	10,0 ± 0,1	4,3 ± 0,8	13,8 ± 0,9	4,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,23 ± 0,08
E6	5,4 ± 0,6	12,9 ± 0,7	8,3 ± 0,5	10,2 ± 0,1	4,0 ± 0,9	16,6 ± 0,5	4,7 ± 0,2	3,3 ± 0,2	0,24 ± 0,05
E7	0,7 ± 0,5	8,2 ± 0,5	4,1 ± 0,6	6,1 ± 0,8	6,6 ± 0,3	6,2 ± 0,6	1,0 ± 0,4	2,4 ± 0,1	7,84 ± 0,01
E8	2,51 ± 0,05	15,4 ± 0,7	7,8 ± 0,5	8,3 ± 0,5	4,7 ± 0,1	6,1 ± 0,3	4,8 ± 0,3	2,5 ± 0,2	0,51 ± 0,05
E9	0,3 ± 0,2	1,1 ± 0,6	0,44 ± 0,07	3,4 ± 0,4	13,9 ± 0,4	6,3 ± 0,8	0,08 ± 0,02	3,7 ± 0,4	34,8 ± 0,2
E10	4,6 ± 0,4	13,1 ± 0,5	5,3 ± 0,2	8,3 ± 0,4	8,4 ± 0,8	6,2 ± 0,7	5,5 ± 0,8	3,5 ± 0,2	1,04 ± 0,09
E11	3,8 ± 0,4	0,50 ± 0,06	0,27 ± 0,05	2,6 ± 0,6	44,5 ± 0,9	36,75 ± 0,09	2,0 ± 0,9	16,3 ± 0,1	113,5 ± 0,4
E12	1,5 ± 0,2	4,9 ± 0,3	2,8 ± 0,1	2,1 ± 0,6	2,0 ± 0,2	7,72 ± 0,03	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,1	0,50 ± 0,03
E13	6,2 ± 0,1	8,6 ± 0,6	5,7 ± 0,4	8,3 ± 0,6	11,8 ± 0,6	33,7 ± 0,6	4,88 ± 0,09	5,3 ± 0,1	3,37 ± 0,05
E14	2,3 ± 0,2	15,1 ± 0,5	8,4 ± 0,4	8,2 ± 0,9	4,10 ± 0,06	8,8 ± 0,3	4,8 ± 0,4	2,956 ± ,3	0,30 ± 0,06
E15	2,0 ± 0,8	19,3 ± 0,8	8,7 ± 0,4	8,0 ± 0,8	7,2 ± 0,1	6,19 ± 0,08	8,7 ± 0,7	3,1 ± 0,2	1,19 ± 0,07
E16	1,3 ± 0,5	16,47 ± 0,08	7,1 ± 1,0	9,5 ± 0,5	8,3 ± 0,3	6,1 ± 0,2	6,7 ± 0,1	2,7 ± 0,6	0,99 ± 0,07
E17	4,1 ± 0,1	2,0 ± 0,5	1,7 ± 0,8	3,1 ± 0,3	1,3 ± 0,4	6,3 ± 0,7	0,20 ± 0,07	1,9 ± 0,1	0,42 ± 0,04
E18	3,1 ± 0,5	16,1 ± 0,3	9,2 ± 0,9	8,8 ± 0,7	8,72 ± 0,08	8,9 ± 0,2	6,3 ± 0,3	2,3 ± 0,4	0,69 ± 0,02
E19	1,6 ± 0,4	19,1 ± 0,3	9,9 ± 0,7	11,5 ± 0,2	5,7 ± 0,8	8,7 ± 0,1	6,2 ± 0,3	2,1 ± 0,2	0,98 ± 0,02
K1	3,12 ± 0,02	21,56 ± 0,01	10,3 ± 0,2	7,6 ± 0,2	6,4 ± 0,2	7,46 ± 0,01	7,9 ± 0,1	3,0 ± 0,7	1,51 ± 0,2

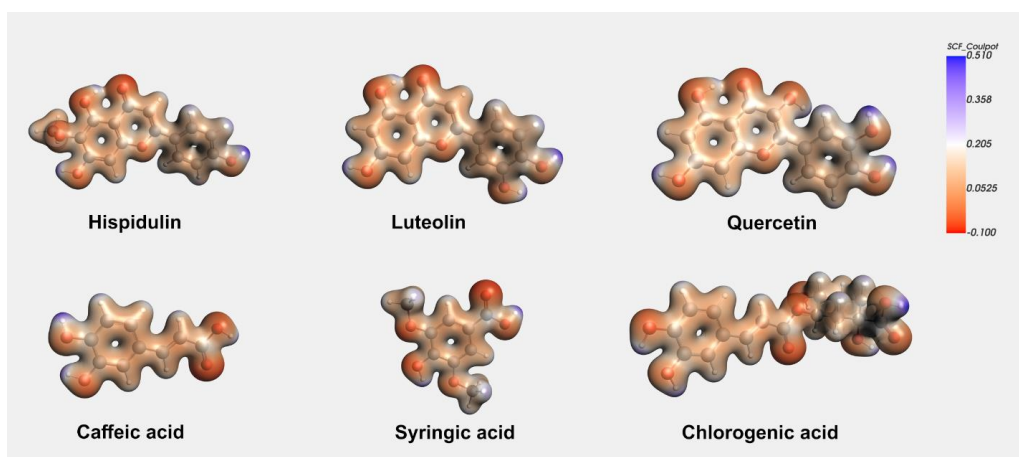
#### 4.1.3.5. COSMO-RS predviđanje efikasnosti ekstrakcije

S obzirom da rezultati hemijske karakterizacije dobijenih ekstrakta ukazuju na to da sadržaj vode u velikoj mjeri utiče na svojstva eutektičke smеше i performanse ekstrakcije, urađena je teorijska studija primenom COSMO–RS–a koja je uključivala molekule vode u teorijsko modelovanje i na taj način omogućila detaljnije razumevanje interakcija u eutektičkim rastvaračima.

Većina prethodnih COSMO–RS studija o efikasnosti ekstrakcije eutektičkih smеša razmatrale su ove rastvarače kao stehiometrijsku mešavinu pojedinačnih komponenata<sup>129,133–135</sup> ili kao pseudo–jedinjenja formirana vodoničnim vezivanjem između HBD i HBA.<sup>136,137</sup> U ovoj studiji, pretpostavili smo da bi  $\sigma$ –profili i  $\sigma$ –potencijali izračunati uz prisustvo eksplicitnih molekula vode mogli pružiti dragocene uvide za realnije modelovanje međumolekulskih interakcija i poboljšana predviđanja efikasnosti ekstrakcije. Optimizovane geometrije i površinske gustine naelektrisanja supramolekulskih kompleksa HBD:HBA:voda prikazane su na Slici 19. Rezultati pokazuju da je vodonična veza između komponenata eutektičke smеše očuvana u prisustvu tri molekula vode, što odgovara masenom sadržaju vode od 20% i sugerišu da takva geometrija predstavlja reprezentativnu strukturu eutektičkih smеša. Regioni sa negativnim površinskim naelektrisanjem se pretežno nalaze u blizini atoma kiseonika iz vode, dok su pozitivno naelektrisani površinski regioni smešteni blizu atoma azota iz holin–hlorida ili uree. Ovi navedeni regioni su kompatibilni sa suprotno naelektrisanim površinskim regionima šest fenolnih jedinjenja prikazanih na Slici 20. i stoga mogu da ostvare privlačne međumolekulske interakcije.



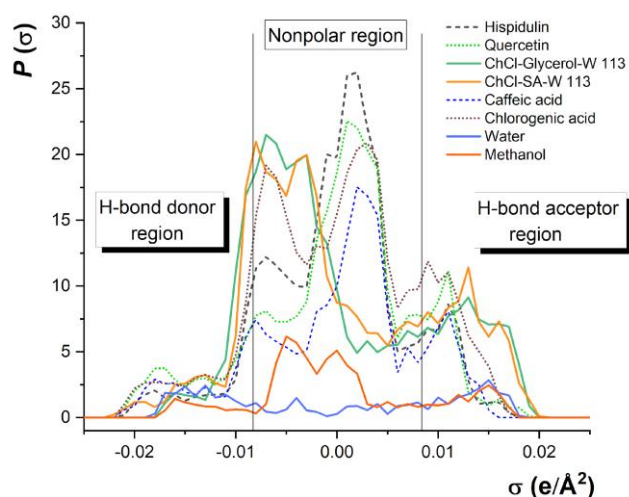
Slika 19. 3D strukture i površinske gustine naelektrisanja izražene u  $e/\text{Å}^2$  za odabrane supramolekulske komplekse eutektičkih smеša. Skraćenice: ChCl-Glycerol-W 113– eutektička smеša holin–hlorid: glicerol: voda 1:1:3 ( $n/n/n$ ), ChCl-SA-W 113– eutektička smеša holin–hlorid: čilibarna kiselina: voda 1:1:3 ( $n/n/n$ ), ChCl-urea-W 123– eutektička smеša holin–hlorid: urea: voda 1:2:3 ( $n/n/n$ ), i ChCl-AA-W 113– eutektička smеša holin–hlorid: askrobinska kiselina: voda 1:1:3 ( $n/n/n$ ).



Slika 20. Gustina naelektrisanja na površini šest najzastupljenijih fenolnih jedinjenja u ekstraktima podubice.

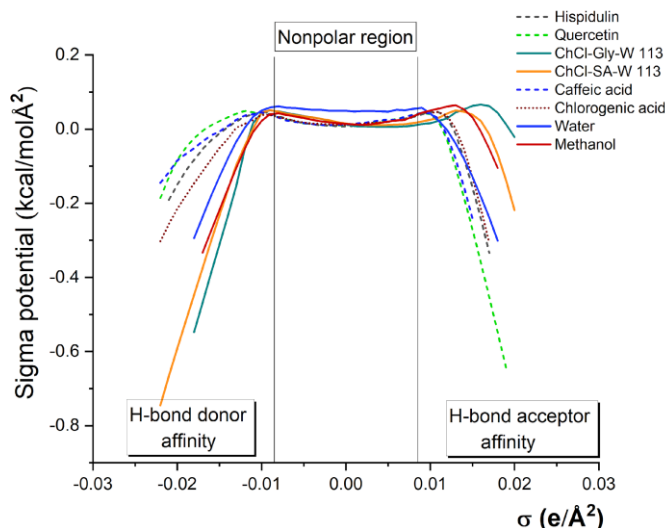
Prema COSMO–RS teoriji, interakcija između rastvarača i rastvorene supstance karakteriše njihove gustine naelektrisanja na površini, odnosno  $\sigma$  i  $\sigma'$ – profile. Ako rastvarač i rastvorena supstancija imaju komplementarne  $\sigma$ –profile, to sugeriše da postoji tendencija ka visokoj rastvorljivosti tih jedinjenja u ispitivanom rastvaraču i mogućnost ekstrakcije u visokom prinosu. Snažne interakcije između interagujućih površinskih regiona rastvarača i rastvorene supstance dovode do povoljnog (negativnog) hemijskog potencijala,  $\mu(\sigma)$ .

Na Slici 21. su prikazani  $\sigma$ – profili odabranih fenolnih jedinjenja, koji pokazuju da značajan deo svoje  $\sigma$ –površine polifenoli imaju u nepolarnom regionu, naglašavajući ključnu ulogu hidrofobnih i Van der Valsovih interakcija u procesu ekstrakcije. Pored toga, imaju izražene pikove u polarnim regionima i posebnu su istaknuti pikovi u HBA regionu.  $\sigma$ – profili dve eutektičke smeše, holin–hlorid: glicerol: voda 1:1:3 (*n/n/n*) i holin–hlorid: čilibarna kiselina: voda 1:1:3 (*n/n/n*) pokazuju pik na oko  $-0,007 e/\text{Å}^2$  koji daje ovim rastvaračima HBD i hidrofobna svojstva. Ovaj pik u HBD regionu eutektičkih smeša je komplementaran sa pikovima koji se nalaze u HBA region fenolnih jedinjenja koja su analizirana.



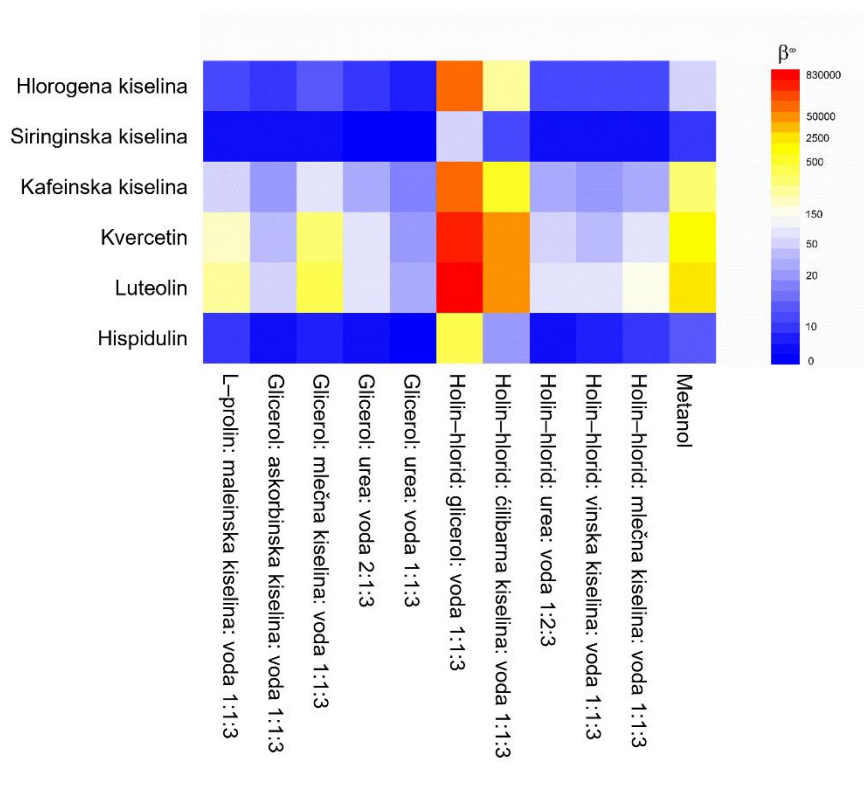
Slika 21.  $\sigma$ –profili četiri rastvarača (dva eutektika holin–hlorid: glicerol: voda 1:1:3 (*n/n/n*) i holin–hlorid: čilibarna kiselina: voda 1:1:3 (*n/n/n*), voda i metanol) i četiri fenolna jedinjenja (hispidulin, kvercetin, kofeinska kiselina i hlorogena kiselina).

Analiza  $\sigma$ -potencijala je izvršena da bi se procenile termodinamičke osobine i uporedila polarnost i sposobnost vodoničnog vezivanja eutektičkih smeša i ciljanih fenola.  $\sigma$ -potencijal (Slika 22.) rastvarača u oblasti elektronske baznosti ukazuje na njegovu snagu kao HBA, dok potencijal u elektronskom regionu kiselosti predstavlja njegovu snagu kao HBD. Snaga HBA i HBD je proporcionalna veličini  $\sigma$ -potencijala, pri čemu niži  $\sigma$ -potencijal ukazuje na jaču sposobnost. Rezultati pokazuju da se visoki HBA afinitet hispidulina, kvercetina, kofeinske i hlorogene kiseline može izbalansirati visoki HBD afinitet dve eutektičke smeše, koji je značajno jači u poređenju sa afinitetom vode i metanola. Stoga, interakcije koje upravljaju mehanizmom ekstrakcije su vodonične veze između polarnih  $-OH$  grupa fenolnih jedinjenja kao HBD i holinijum katjona kao HBA. Međutim, važno je napomenuti da nepolarne interakcije takođe igraju značajnu ulogu u ovom mehanizmu.



Slika 22. Sigma potencijali,  $\mu(\sigma)$ , četiri rastvarača (dva eutektika holin–hlorid: glicerol: voda 1:1:3 ( $n/n/n$ ) i holin–hlorid: ćilibarna kiselina: voda 1:1:3 ( $n/n/n$ ), voda i metanol) i četiri fenolna jedinjenja (hispidulin, kvercetin, kofeinska kiselina i hlorogena kiselina).

COSMO–RS se koristi za predviđanje makroskopskih svojstava kao što su koeficijent aktivnosti, koeficijent distribucije i rastvorljivost. Određivanjem  $\sigma$ -potencijala svih vrsta u rastvoru, koeficijenti aktivnosti se mogu izračunati rešavanjem nelinearne jednačine koja razmatra interakcije između vrsta i uticaj rastvarača. Izračunati koeficijenti aktivnosti pri beskonačnom razblaženju ( $\gamma^\infty$ ) mogu se transformisati u parametar afiniteta rastvarač–rastvorena supstanca  $\beta^\infty$ , koji je proporcionalan rastvorljivosti jedinjenja.<sup>129</sup> Vrednosti  $\beta^\infty$  za šest najzastupljenijih fenola u podubici u 10 eutektičkih smeša i metanolu, kao referentnom rastvaraču je prikazana na toplotnoj mapi na Slici 23. i u Tabeli 14. Rezultati pokazuju da eutektičke smeše holin–hlorid: glicerol: voda 1:1:3 ( $n/n/n$ ) i holin–hlorid: ćilibarna kiselina: voda 1:1:3 ( $n/n/n$ ) imaju veći afinitet od metanola ka svim odabranim fenolnim jedinjenjima. Parametri rastvorljivosti svih eutektičkih smeša su značajno viši u poređenju sa vodom, u rasponu od približno 100 do 1.000.000 puta (Tabela 15).



Slika 23. Parametar afiniteta rastvarač–rastvorena supstanca  $\beta^\infty$ , za šest fenolnih jedinjenja u deset eutektičkih smeša i metanolu. Oznaka na x–osi označava molski odnos HBD, HBA i vode u svakoj eutektičkoj smeši. Više vrednosti za  $\beta^\infty$  predstavljaju bolji međusobni afinitet, a samim tim i veću mogućnost ekstrakcije.

Tabela 14. Vrednosti  $\beta^\infty$  za šest najzastupljenijih fenolnih jedinjenja u ekstraktu podubice u deset eutektičkih smeša, metanolu i vodi.

$\beta^\infty$	Hispidulin	Luteolin	Kvercetin	Luteolin	Siringinska kiselina	Hlorogena kiselina
L–prolin: maleinska kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	3,0	279	207	63	1,6	9,0
holin–hlorid: mlečna kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	4,0	169	92	40	1,9	8,1
holin–hlorid: vinska kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	2,1	97	57	31	1,4	5,0
holin–hlorid: urea: voda 1:2:3 ( <i>n/n/n</i> )	1,4	113	76	45	1,4	6,6
holin–hlorid: ćilibarna kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	24	11482	9206	1653	8,0	262
holin–hlorid: glicerol: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	451	826446	757576	55340	66	19512
glicerol: urea: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	0,5	40	33	20	0,7	2,6
glicerol: urea: voda 2:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	1,1	104	84	39	0,9	4,1
glicerol: mlečna kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	3,0	514	432	120	1,6	13
glicerol: askorbinska kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	1,3	74	57	25	1,0	3,6
Metanol	15	2560	1988	334	3,9	69
Voda ( $\times 10^{-3}$ )	0,09	9,3	13	76	2,4	0,9

 Tabela 15. Vrednosti  $\beta_{NADES}^\infty/\beta_{voda}^\infty$  za šest najzastupljenijih fenolnih jedinjenja u ekstraktu podubice. Vrednosti pokazuju relativnu mogućnost ekstrakcije rastvorene supstance u eutektičkoj smeši u poređenju sa čistom vodom.

$\beta_{NADES}^\infty/\beta_{voda}^\infty$	Hispidulin	Luteolin	Kvercetin	Luteolin	Siringinska kiselina	Hlorogena kiselina
L–prolin: maleinska kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	32288	30102	16301	830	689	10152
holin–hlorid: mlečna kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	42995	18257	7261	524	822	9099
holin–hlorid: vinska kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	22561	10483	4473	411	608	5634
holin–hlorid: urea: voda 1:2:3 ( <i>n/n/n</i> )	15076	12225	6023	594	586	7409
holin–hlorid: ćilibarna kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	255918	1238635	726109	21651	3382	294573
holin–hlorid: glicerol: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	4797771	89151028	59755457	724732	27813	21913976
glicerol: urea: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	5651	4299	2596	260	280	2923
glicerol: urea: voda 2:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	11388	11221	6616	504	395	4654
glicerol: mlečna kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	31869	55450	34079	1567	670	14054
glicerol: askorbinska kiselina: voda 1:1:3 ( <i>n/n/n</i> )	14219	7992	4473	333	440	4009
Metanol	155225	276115	156776	4370	1659	76877
Voda ( $\times 10^{-3}$ )	1	1	1	1	1	1

#### 4.1.3.6. Eksperimentalni rezultati naspram teorijskih podataka

Rezultati COSMO–RS studije pružaju bolji uvid u razumevanje uticaja strukture HBA i HBD na efikasnost ekstrakcije, ali ponekad pokazuju suprotan trend u poređenju sa eksperimentalnim rezultatima. Neslaganje u rezultatima se uglavnom javlja u slučaju kad između rastvarača i rastvorene supstance preovladavaju nepolarne interakcije.<sup>132</sup> Naime, fizički parametri kao što su viskoznost i temperatura u velikoj meri utiču na efikasnost ekstrakcije eutektičkim smešama, pored interakcija između rastvarača i rastvorene supstance koje modeluje COSMO–RS. Međutim, teorijska predviđanja dobijena korišćenjem COSMO–RS–a u ispitivanju efikasnosti ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz podubice su se pokazala izuzetno konzistentnim i dobijene su dobre korelacije sa rezultatima spektrofotometrijskih eseja. Smeša holin–hlorid: glicerol 1:1 (*n/n*), 20% (*w/w*) vode eksperimentalno je pokazala najbolji učinak ekstrakcije, koji se ogleda u maksimalnim RSA, TPC i TFC vrednostima dobijenog ekstrakta (E15) i koji se slaže sa teorijski očekivanim rezultatima na osnovu vrednosti parametara  $\beta^\infty$  za ovu smešu, koji su imali maksimalne vrednosti. Rezultati UHPLC analize su pokazali da su najveće koncentracije pet od šest modelovanih fenolnih jedinjenja (osim hlorogene kiseline) nađene u ekstraktu E11, koji je dobijen primenom eutektičke smeše holin–hlorida: ćilibarne kiseline 1:1 (*n/n*) sa 20% *w/w* vode, što je u skladu sa teorijski dobijenim visokim vrednostima parametra  $\beta^\infty$  za ovu eutektičku smešu. Ovi rezultati potvrđuju korisnost i efikasnost predloženog teorijskog pristupa koji uključuje COSMO–RS modelovanje radi olakšavanja i racionalnog izbora eutektičkih smeša za ciljanu ekstrakciju. Osim toga, primenjeni model zasnovan je na ternarnim kompleksima HBD:HBA:voda, što predstavlja redak primer ispitivanja uticaja vode u COSMO–RS predviđanjima efikasnosti ekstrakcije.

## 4.2. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz propolisa

### 4.2.1. Odabir eutektičkih smeša

Prilikom odabira optimalnog rastvarača za ekstrakciju potrebno je uzeti u obzir fizičko–hemijaska svojstva ciljnih molekula, ali i karakteristike prirodnog proizvoda.<sup>138,139</sup> Propolis se pretežno sastoji od biljnih smola i voskova, što ga čini nepolarnim matriksom, dok su ciljane jedinjenja u ovoj studiji bila fenolna jedinjenja, koja su polarne prirode. Uzimajući u obzir polarnost ciljanih jedinjenja i matriksa za pripremu eutektičkih smeša je korišćeno 18 različitih komponenata koje su polarne. Kao akceptori vodonične veze su korišćeni holin–hlorid, aminokiseline (L–prolin, L–lizin, L–glicin i L–tirozin) i organske soli (kalijum–acetat i natrijum–formijat), dok su kao donori vodonične veze korišćeni urea, tiourea, organske kiseline (mlečna, vinska, limunska, jabučna, maleinska, ćilibarna i askorbinska) i polihidroksilni alkoholi (glicerol i etilen glikol). Osim proučavanja različitih HBA i HBD, ispitan je i različit molarni odnos između komponenata, dok je sadržaj vode u svim eutektičkim smešama bio nepromenljiv i iznosio je 20% (w/w). Ukupno je pripremljeno 38 različitih eutektičkih smeša i njihov sastav je naveden u Tabeli 16. Svi parametri ekstrakcije su držani konstantnim kako bi se ispitivao samo uticaj sastava eutektičkih smeša na prinos ekstrakcije i sastav dobijenih ekstrakata. Efikasnost ekstrakcije primenom eutektičkih smeša je upoređena sa dva konvencionalna rastvarača, koji su ekološki prihvatljivi. Kao konvencionalni rastvarači upotrebljeni su glicerol i 1% (w/v) rastvor limunske kiseline u vodi.

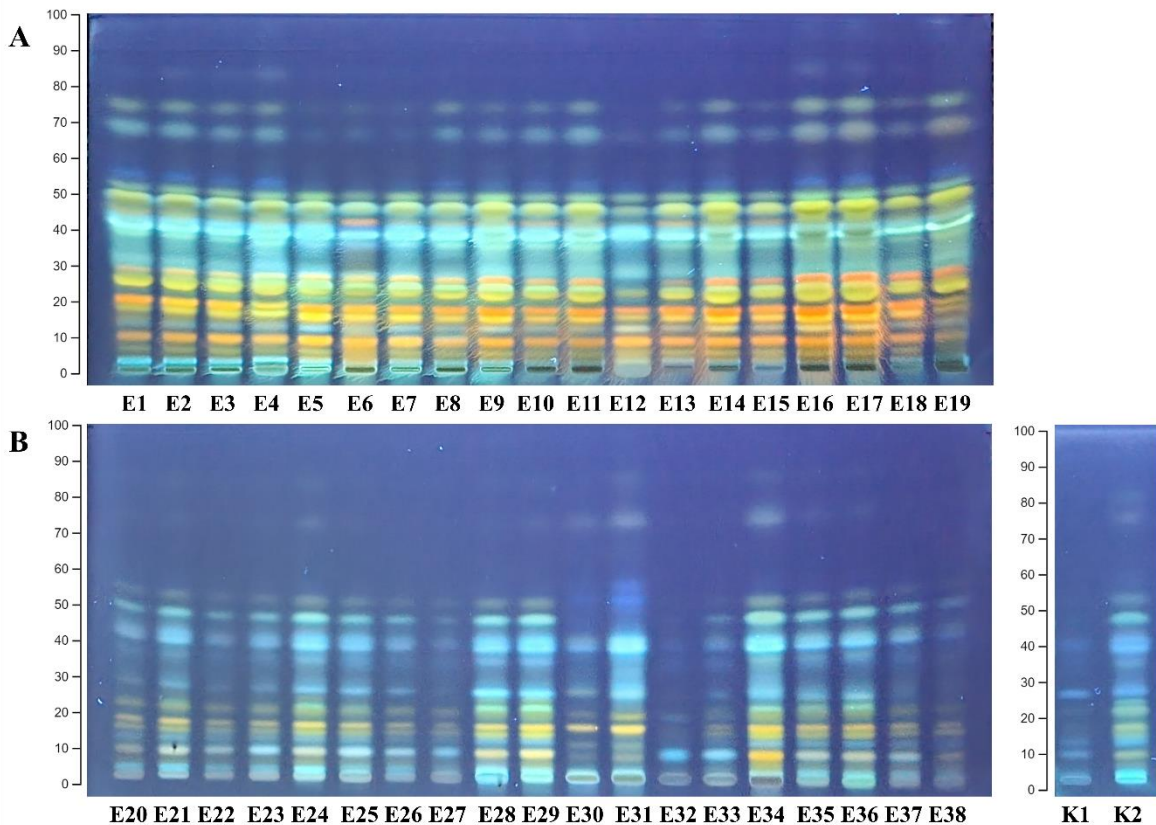
Tabela 16. Sastav eutektičkih smeša primenjenih za ekstrakciji bioaktivnih jedinjenja iz propolisa.

Oznaka ekstrakta	Sastav eutektičkih smeša	Molarni odnos
E1	holin–hlorid: mlečna kiselina	1:1
E2	holin–hlorid: mlečna kiselina	1:2
E3	holin–hlorid: mlečna kiselina	2:1
E4	holin–hlorid: mlečna kiselina	1:3
E5	holin–hlorid: vinska kiselina	2:1
E6	holin–hlorid: limunska kiselina	1:1
E7	holin–hlorid: limunska kiselina	2:1
E8	holin–hlorid: maleinska kiselina	1:1
E9	holin–hlorid: glicerol	1:1
E10	holin–hlorid: etilen glikol	1:2
E11	holin–hlorid: etilen glikol	1:4
E12	holin–hlorid: urea	1:2
E13	holin–hlorid: L–prolin	1:1
E14	glicerol: L–prolin	1:1
E15	glicerol: L–prolin	1:2
E16	glicerol: mlečna kiselina	1:1
E17	L–glicin: mlečna kiselina	1:3
E18	L–lizin: mlečna kiselina	1:2
E19	kalijum–acetat: mlečna kiselina	1:3
E20	glicerol: limunska kiselina	1:1
E21	glicerol: limunska kiselina	2:1
E22	glicerol: jabučna kiselina	1:1
E23	glicerol: jabučna kiselina	2:1
E24	glicerol: ćilibarna kiselina	1:1
E25	glicerol: ćilibarna kiselina	2:1
E26	glicerol: vinska kiselina	1:1
E27	glicerol: vinska kiselina	2:1
E28	glicerol: askorbinska kiselina	1:1
E29	glicerol: askorbinska kiselina	2:1
E30	glicerol: L–lizin	1:1
E31	glicerol: L–lizin	2:1
E32	glicerol: L–tirozin	1:1
E33	glicerol: L–tirozin	2:1
E34	glicerol: urea	1:1
E35	glicerol: urea	2:1
E36	glicerol: tiourea	1:1
E37	glicerol: holin–hlorid	1:2
E38	glicerol: natrijum–formijat	2:1
Oznaka ekstrakta	Konvencionalni rastvarači	
K1	1% (w/v) limunska kiselina u vodi	
K2	glicerol	

#### 4.2.2. HPTLC profili fenolnih jedinjenja

HPTLC profili fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata propolisa (Slika 24.) su pokazali obrazac bogat zonama žute i narandžaste boje na nižim  $hR_F$  vrednostima između 10 i 30, plavim i zelenim zonama srednje polarnosti na  $hR_F$  vrednostima između 30 i 60, dok su nepolarnija fenolna jedinjenja prisutna u manjem broju kao plave zone na  $hR_F$  vrednostima između 70 i 90. Vizuelno poređenje hromatograma ukazuje na razlike u profilima između ekstrakata dobijenih primenom različitih eutektičkih smeša, koje se ogledaju u prisustvu i odsustvu zona i varijabilitetu u intenzitetu signala.

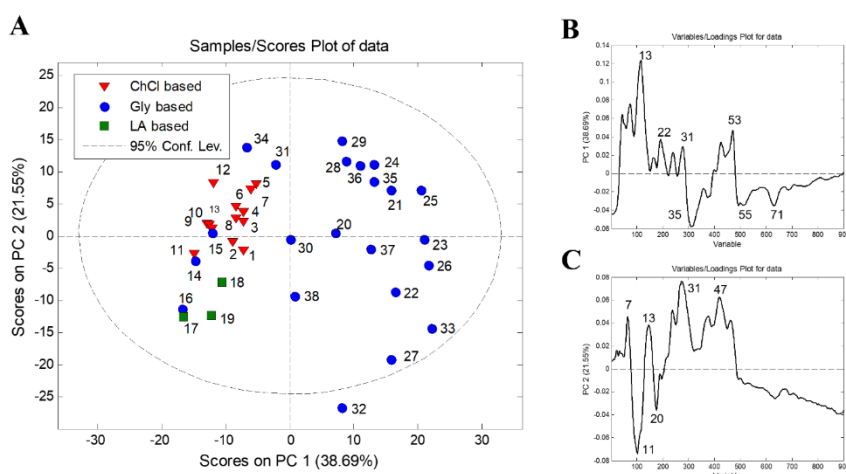
Eutektički ekstrakti (E1–E13) koji potiču od holin–hloridnih sistema su pokazali među sobom slične profile bogate zonama, ali sa prisutnim razlikama u manje intenzivnim zonama, koje je uslovlila HBD komponenta. U profilima ekstrakata E9–E11, gde je kao HBD korišćen polihidroksilni alkohol (glicerol ili etilen glikol), mogu se primetiti intenzivne zone na  $hR_F$  vrednostima 70 i 80, koje su plave i zelene boje. Ove zone su značajno manjeg intenziteta u profilima ekstrakta E5–E7, kod kojih je kao HBD korišćena organska kiselina (vinska ili limunska kiselina). Takođe je primetna razlika u profilu ekstrakta E12, kada je kao HBD korišćena urea, gde je odsutna karakteristična žuta zona na  $hR_F$  vrednosti 28. Ekstrakti (E20–E38) dobijeni pomoću eutektičkih smeša koje su kao zajedničku komponentu sadržale glicerol, pokazali su profile sa manjim brojem jedinjenja i intenziteti prisutnih zona su bili slabiji u poređenju sa ostalim ekstraktima. Između ekstrakata ove grupe se mogu uočiti razlike u prisustvu i intenzitetu zona koje je uslovlila druga komponenta. Povećanje molskog udela glicerola u odgovarajućim eutektičkim smešama, sa 1:1 na 2:1, rezultovalo je različitim uticajem na ekstrakciju. U slučaju kada je druga komponenta bila limunska kiselina, jabučna kiselina, L–lizin ili L–tirozin došlo je do porasta prinosa ekstrakcije, koji se ogleda u većem intenzitetu zona na profilu, dok je suprotan trend prisutan kada su kao druga komponenta korišćene ćilibarna kiselina, vinska kiselina ili urea. U sistemima koji su sadržali askorbinsku kiselinu povećanje udela glicerola nije imalo efekta na prinos ekstrakcije. Povećanje udela glicerola rezultovalo je promenom u prinosu ekstrakcije za većinu glicerinskih sistema, međutim nije dovelo do promena u sastavu ekstrakata koja se mogla uočiti vizuelnom procenom. Uzimajući u obzir prisustvo intenzivnih narandžastih zona u ekstraktima E1–E13 u poređenju sa E20–E38 može se pretpostaviti da je efikasnost ekstrakcije holin–hloridnih sistema veća od glicerinskih sistema. Na osnovu vizuelne procene može se uočiti da su ekstrakti E1–E4, E16–E19 pokazali sličan profil u kojem dominira veliki broj zona visokog intenziteta. Ovim ekstraktima je zajedničko da su dobijeni primenom eutektičkih smeša koje su kao jednu komponentu sadržale mlečnu kiselinu. Uzimajući u obzir razlike u fenolnim profilima koje je uslovio sastav eutektičkih smeša u daljem delu istraživanja i analize rezultata ekstrakti su podeljeni u tri grupe: ekstrakti na bazi holin–hlorida, glicerola ili mlečne kiseline.



Slika 24. HPTLC profili fenolnih jedinjenja eutektičkih i konvencionalnih ekstrakata propolisa. (Oznake ekstrakata su navedene Tabeli 16.)

Vizuelnim poređenjem hromatograma uočava se postojanje tri grupe ekstrakata, ali nije moguće utvrditi markere koji utiču na diferencijaciju ekstrakata u zavisnosti od primenjenih eutektičkih smeša. Slike hromatograma su obrađene kako bi se prikupili podaci koji su dalje korišćeni za hemometrijsku analizu. Matrica podataka se sastojala od 38 objekata, koji predstavljaju ispitivane eutektičke ekstrakte i 900 varijabli koje predstavljaju intenzitete piksela duž linija hromatograma. Dobijeni PCA model sastojao se od šest glavnih komponenata i objasnio je 84,00% ukupnog varijabiliteta (PC 1– 38,69%, PC 2– 21,55%, PC 3– 7,69%) među podacima.

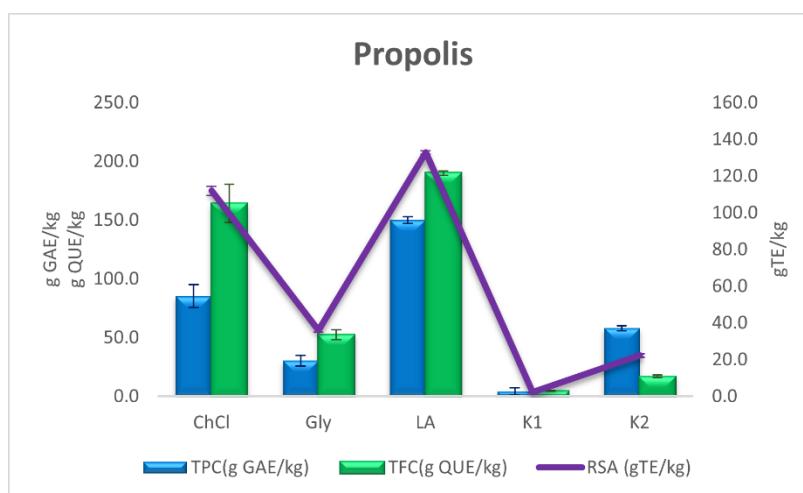
Na osnovu grafika skorova latentnih varijabli (Slika 25.A) je utvrđeno da su se ekstrakti razdvojili na osnovu sastava primenjenih eutektičkih smeša u tri klastera: holin–hloridni (ChCl based), glicerinski (Gly based) i mlečnokiselinski (LA based). Grupa ekstrakata dobijenih primenom smeša na bazi holin–hlorida zajedno sa grupom ekstrakta na bazi mlečne kiseline je odvojena od grupe ekstrakata na bazi glicerola duž PC1 ose. Ekstrakti E1–E4, koji su dobijeni primenom eutektičkih smeša holin–hlorid: mlečna kiselina, su se grupisali sa drugim objektima koji pripadaju holin–hloridnom klasteru, što ukazuje na dominantniju ulogu ove komponente u odnosu na mlečnu kiselinu u građenju interakcija između ciljanih jedinjenja i eutektičkih smeša. Ipak, ekstrakt E16 dobijen primenom eutektičkog sistema glicerol: mlečna kiselina, grupisao se sa ekstraktima na bazi mlečne kiseline sugerišući veći uticaj mlečne kiseline u odnosu na glicerol. Dodatno, ekstrakti E14 i E15 su se grupisali sa objektima grupe holin–hlorida iako ne sadrže ovu komponentu, što ukazuje na preovlađujući uticaj L–prolina u smeši u odnosu na glicerol. Rasutost glicerinskih ekstrakata na grafiku skorova, ukazuje na dominantan uticaj druge komponente eutektičke smeše ali i promenljivog molskog odnosa na ekstrakciju. Grafik vektora latentnih varijabli (Slika 25.B) pokazuje da su glavne zone koje uslovljavaju pomenute razlike na  $hR_F$  vrednosti 11, 31 i 47, dok dodatni uticaj na razdvajanje imaju i jedinjenja na  $hR_F$  vrednostima 7, 13 i 20.



Slika 25. Analiza glavnih komponenata dobijena za profil fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakta propolisa: A) grafik skorova latentnih varijabli; B/C) grafik vektora latentnih varijabli.

#### 4.2.3. Spektrofotometrijski eseji

Efikasnost ekstrakcije primenjenih eutektičkih smeša je procenjena na osnovu spektrofotometrijskih eseja, odnosno TPC, TFC i RSA vrednosti. Na Slici 26. grafički su prikazani rezultati spektrofotometrijskih eseja kao srednje vrednosti tri grupe eutektičkih ekstrakata (ekstrakti dobijeni smešama koje su sadržale holin–hlorid (ChCl), glicerol (Gly) i mlečnu kiselinu (LA) i dva konvencionalna ekstrakta.



Slika 26. Ukupan sadržaj fenola–plavi stub, ukupan sadržaj flavonoida– zeleni stub i antioksidativni kapacitet– ljubičasta linija u tri grupe eutektičkih ekstrakata (ChCl, Gly i LA) i konvencionalnim ekstraktima (K) u uzorku propolisa.

TPC, TFC i RSA vrednosti eutektičkih ekstrakata propolisa bile su u opsegu od 3 – 241 g GAE kg<sup>-1</sup>, 3,3 – 610 g RUE kg<sup>-1</sup> i 4,8 – 261 g TE kg<sup>-1</sup>, redom. Ekstrakti dobijeni primenom eutektičkih smeša koje su sadržale mlečnu kiselinu su pokazali najviše vrednosti TPC, TFC i RSA, malo niže vrednosti su imali ekstrakti dobijeni primenom holin–hloridnih smeša, dok su ekstrakti dobijeni primenom glicerinskih smeša pokazali najniže vrednosti. TPC vrednosti glicerinskih ekstrakata su bile niže od vrednosti ekstrakta K2 dobijenog ekstrakcijom sa čistim glicerolom, kao konvencionalnim rastvaračem. Međutim, glicerinski ekstrakti E16 i E14 su imali veće vrednosti TPC–a u poređenju sa ostalim ekstraktima iz glicerinske grupe, zbog uticaja druge komponente eutektika na ekstrakciju (mlečne kiseline i L–prolina). Za razliku od ukupnih fenola, glicerinske smeše su ekstrahovale flavonoide u boljem prinosu i ekstrakti su pokazali veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na

glicerol. Zakiseljena voda (ekstrakt K1) se pokazala kao loš medijum za ekstrakciju na osnovu rezultata spektrofotometrijskih eseja. Uočeno je prisustvo trenda u rezultatima spektrofotometrijskih eseja gde su ekstrakti bogati fenolima, odnosno flavonoidima, ispoljili veću antioksidativnu aktivnost. Ovaj trend je potvrđen visokim vrednostima Pirsonovog koeficijenta korelacije između vrednosti RSA i TPC ( $r = 0,9210$ ), kao i RSA i TFC ( $r = 0,8440$ ).

Rezultati spektrofotometrijskih eseja (Tabela 17.) pokazuju da je većina primenjenih eutektičkih smeša imala bolju efikasnost ekstrakcije u poređenju sa konvencionalnim rastvaračima što potvrđuje mogućnost njihovog korišćenja za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz propolisa. Takođe, ovi rezultati pokazuju da sastav eutektičke smeše, vrsta i odnos njenih komponenata utiču na efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja. Eutektičke smeše glicerol: mlečna kiselina 1:1 ( $n/n$ ) i L-glicin: mlečna kiselina 1:3 ( $n/n$ ) (ekstrakti E16 i E17) su se pokazale kao najbolji medijumi za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz propolisa. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima HPTLC analize, profili ovih ekstrakata bili su bogati žutim, narandžastim i plavim zonama visokog intenziteta.

Tabela 17. Ukupan sadržaj fenola, ukupan sadržaj flavonoida i antioksidativni kapacitet u eutektičkim ekstraktima i konvencionalnim ekstraktima propolisa. Oznake ekstrakta su navedene u Tabeli 16.

	RSA (g TE kg <sup>-1</sup> )	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC (g RUE kg <sup>-1</sup> )
E1	103 ± 4	124 ± 18	240 ± 30
E2	122 ± 2	88 ± 6	130 ± 10
E3	79 ± 2	59 ± 6	90 ± 10
E4	128 ± 2	138 ± 7	250 ± 10
E5	187 ± 2	119 ± 8	190 ± 14
E6	144 ± 4	83 ± 18	120 ± 30
E7	86 ± 2	67 ± 8	150 ± 14
E8	135 ± 4	103 ± 18	210 ± 30
E9	96 ± 3	72 ± 12	190 ± 20
E10	100 ± 2	67 ± 6	103 ± 10
E11	151 ± 2	98 ± 6	220 ± 10
E12	70 ± 3	53 ± 12	170 ± 20
E13	54 ± 1	37 ± 2	70 ± 4
E14	141 ± 4	110 ± 18	210 ± 30
E15	46,5 ± 0,5	35 ± 2	60 ± 4
E16	185 ± 7	241 ± 38	610 ± 50
E17	261 ± 2	186 ± 9	320 ± 13
E18	50,3 ± 0,5	34 ± 2	60 ± 4
E19	116 ± 2	101 ± 6	270 ± 10
E20	7,7 ± 0,1	6,4 ± 3	7,7 ± 0,3
E21	16,6 ± 0,9	11 ± 2	11,0 ± 0,3
E22	5,4 ± 0,1	5,0 ± 3	3,9 ± 0,3
E23	6,5 ± 0,1	6 ± 2	8,0 ± 0,3
E24	24,3 ± 0,9	17 ± 2	20,0 ± 0,4
E25	19,3 ± 0,9	12 ± 2	13,0 ± 0,4
E26	32,4 ± 0,5	3 ± 3	4,2 ± 0,3
E27	4,9 ± 0,1	4 ± 2	5,0 ± 0,3
E28	22,4 ± 0,9	27 ± 2	18,0 ± 0,1
E29	34,9 ± 0,9	28 ± 2	20,0 ± 0,4
E30	26,1 ± 0,9	15 ± 2	13,0 ± 0,4
E31	53 ± 1	34 ± 2	35,0 ± 0,4
E32	4,8 ± 0,1	3 ± 3	3,3 ± 0,4
E33	7,9 ± 0,1	6 ± 2	9,0 ± 0,3
E34	73,8 ± 0,9	52 ± 2	50,2 ± 0,4
E35	25,9 ± 0,9	17 ± 2	7,0 ± 0,3
E36	27,5 ± 0,9	22 ± 2	27,0 ± 0,4
E37	11,7 ± 0,9	8 ± 3	10,9 ± 0,4
E38	13,9 ± 0,9	5 ± 3	6,9 ± 0,3
K1	2,2 ± 0,1	4 ± 3	4,6 ± 0,1
K2	22,2 ± 0,9	58 ± 2	17 ± 1

#### 4.2.4. UHPLC analiza fenolnih jedinjenja

Primenom UHPLC–DAD–MS/MS metode određeno je i kvantifikovano ukupno šesnaest fenolnih jedinjenja u eutektskim ekstraktima propolisa (Tabela 18.).

Pinocembrin i hrizin su glavna fenolna jedinjenja prisutna u eutektskim ekstraktima i njihova prosečna koncentracija je bila najviša u ekstraktima dobijenim primenom smeša koje su sadržale mlečnu kiselinu i iznosila je 3111 i 3039 mg kg<sup>-1</sup> u proseku, redom. U holin–hloridnim ekstraktima koncentracija ovih fenolnih jedinjenja je bila niža (2672 i 2140 mg kg<sup>-1</sup>, prosečno), dok je u glicerinskim ekstraktima bila najniža (1128 i 919 mg kg<sup>-1</sup>, prosečno). Izoramnetin je treće najzastupljenije fenolno jedinjenje prisutno u ekstraktima. Eutektske smeše na bazi holin–hlorida i na bazi mlečne kiseline su pokazale sličnu efikasnost ekstrakcije ovog jedinjenja sa prosečnim koncentracijama 1522 i 1599 mg kg<sup>-1</sup>, dok je manja količina ekstrahovana pomoću glicerinskih smeša (725 mg kg<sup>-1</sup>). Pomoću tri ispitivane grupe eutektskih smeša ekstrahovan je kvercetin u sličnim koncentracijama (5,3 – 6,8 mg kg<sup>-1</sup>), pri čemu je smešama holin–hlorid: limunska kiselina 1:1 (*n/n*) (ekstrakt E5) i L–glicin: mlečna kiselina, 1:3 (*n/n*) (ekstrakt E17) ekstrahovan ovaj flavonol u najvećoj količini. Većina ispitivanih eutektskih smeša sadržala je organsku kiselinu kao jednu komponentu (mlečna, vinska, limunska, jabučna, maleinska, ćilibarna i askorbinska), zbog čega je pH vrednost tih smeša bila niska. Iako kisela sredina povoljno utiče na ekstrakciju fenolnih kiselina, samo su smeše holin–hlorida i limunske kiseline u molskim odnosima 1:1 i 2:1, kao i glicerola i askorbinske kiseline u molskim odnosima 1:1 i 2:1 (ekstrakti E5, E6, E28 i E29) ekstrahovale veće količine fenolnih kiselina, među kojima su najzastupljenije bile kofeinska i *p*–kumarinska kiselina.

Eutektske smeše koje su sadržale mlečnu kiselinu kao jednu od komponenti, pokazale su se najefikasnije u ekstrakciji fenolnih jedinjenja prisutnih u propolisu, holin–hloridne smeše su se pokazale kao dobri rastvarači, ali im je efikasnost bila niža, dok su glicerinske eutektske smeše bile najlošije, saglasno rezultatima spektrofotometrijskih eseja. U ovom istraživanju su ispitani glicerol i zakiseljena voda kao konvencionalni i ekološki prihvatljivi rastvarači, ali su pokazali nižu efikasnost ekstrakcije u odnosu na eutektske smeše. Svaka grupa eutektskih smeša je pokazala različit afinitet ka ekstrakciji fenolnih jedinjenja: eutektske smeše koje su sadržale mlečnu kiselinu su pokazale veliku sklonost ka ekstrakciji dihidrokempferola, hrizina i pinocembrina, holin–hloridne smeše su bile odličan rastvarač za ciljanu ekstrakciju eridiktiola, a glicerinske smeše su pokazale selektivnost ka ekstrakciji rutina. Navedeni rezultati potvrđuju mogućnost primene eutektskih smeša kao rastvarača za selektivnu ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz propolisa i pokazuju da se polarnost eutektskih smeša može prilagoditi, zbog čega se u literaturi nazivaju dizajnerskim rastvaračima.

Tabela 18. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima propolisa

Ekstrakti	Fenolna jedinjenja (mg kg <sup>-1</sup> )							
	CGA	RUT	VIT	IQUE	QR	DHK	ED	LUT
E1	–	1,0±0,3	0,1±0,1	0,7±0,3	1,6±0,4	2,9±0,2	6,7±0,2	34,9±0,9
E2	3,2±0,2	1,4±0,5	0,4±0,2	1,7±0,1	2,8±0,6	22,4±0,8	14,9±0,6	64,0±0,2
E3	4,7±0,4	1,8±0,20	0,5±0,3	1,5±0,3	2,9±0,5	21,5±0,6	18,7±0,8	76,1±0,5
E4	6,8±0,7	3,4±0,1	0,5±0,2	4,1±0,1	3,8±0,4	40,9±0,9	13,2±0,4	75,7±0,6
E5	6,8±0,6	16,7±0,6	1,4±0,1	7,7±0,5	13,6±0,6	61,2±0,4	79,7±0,7	127,8±0,5
E6	28,3±0,2	0,2±0,1	2,5±0,5	0,8±0,4	1,4±0,2	64,8±0,3	39,9±0,3	59,5±0,3
E7	3,9±0,1	3,9±0,2	0,7±0,2	3,6±0,3	7,1±0,4	28,6±0,5	43,3±0,2	86,7±0,4
E8	6,9±0,8	4,2±0,3	0,7±0,2	3,1±0,6	6,0±0,8	28,5±0,5	22,2±0,5	61,5±0,6
E9	3,8±0,9	65,6±0,5	1,0±0,3	5,7±0,7	9,5±0,9	27,4±0,7	39,4±0,6	103,0±0,8
E10	1,2±0,2	2,9±0,8	0,5±0,4	3,1±0,8	8,4±0,3	11,8±0,9	21,1±0,5	66,4±0,7
E11	1,0±0,1	3,7±0,7	0,6±0,2	2,9±0,9	5,6±0,2	13,0±0,5	18,7±0,2	64,3±0,5
E12	5,6±0,5	13,8±0,8	1,7±0,3	14,0±0,2	23,1±0,1	49,8±0,1	52,2±0,2	87,3±0,2
E13	0,3±0,05	3,0±0,6	0,4±0,06	1,8±0,9	3,3±0,2	13,9±0,5	20,1±0,3	45,1±0,9
E14	1,0±0,2	2,5±0,5	0,24±0,05	3,3±0,5	6,0±0,1	17,2±0,3	31,0±0,7	76,2±0,4
E15	3,6±0,6	5,3±0,4	0,75±0,3	4,2±0,4	7,9±0,9	18,1±0,4	22,9±0,8	57,2±0,5
E16	2,2±0,7	24,6±0,3	0,42±0,05	6,1±0,6	10,4±0,4	64,5±0,7	39,0±0,4	147,5±0,7
E17	0,9±0,8	4,4±0,3	0,4±0,1	6,3±0,8	11,3±0,4	72,1±0,5	33,0±0,7	127,2±0,6
E18	1,2±0,4	1,2±0,1	0,25±0,03	1,7±0,9	3,4±0,2	23,7±0,2	10,3±0,3	47,6±0,3
E19	13,2±0,1	2,0±0,2	0,53±0,04	2,8±0,7	4,8±0,6	12,8±0,8	9,6±0,5	13,5±0,6
E20	0,7±0,2	1,2±0,1	0,15±0,07	1,7±0,4	2,2±0,4	6,5±0,2	7,8±0,5	14,0±0,5
E21	0,8±0,3	3,1±0,3	0,47±0,08	2,0±0,8	2,5±0,7	13,1±0,5	14,5±0,4	26,1±0,1
E22	1,35±0,02	1,6±0,1	0,29±0,05	1,6±0,6	2,2±0,6	4,5±0,8	5,5±0,2	9,6±0,8
E23	0,6±0,02	1,0±0,8	0,37±0,06	1,7±0,9	2,7±0,4	8,4±0,6	8,6±0,6	13,9±0,3
E24	2,2±0,5	15,4±0,3	0,66±0,1	2,8±0,1	4,1±0,2	18,1±0,7	20,6±0,4	37,4±0,2
E25	5,5±0,5	3,6±0,2	0,64±0,02	3,6±0,4	4,5±0,5	16,7±0,2	18,2±0,8	28,0±0,4
E26	2,1±0,1	3,8±0,5	0,38±0,01	0,8±0,2	1,0±0,1	6,2±0,8	6,5±0,5	10,6±0,7
E27	1,9±0,3	1,7±0,4	0,35±0,08	1,0±0,4	1,2±0,6	4,8±0,5	5,4±0,8	8,6±0,8
E28	4,0±0,5	3,1±0,3	0,6±0,2	3,9±0,5	6,0±0,4	25,1±0,4	30,4±0,4	56,8±0,2
E29	8,7±0,2	87,2±0,2	1,1±0,5	5,3±0,2	8,1±0,8	38,1±0,7	51,7±0,2	87,8±0,3
E30	–	0,8±0,1	0,12±0,01	0,42±0,05	0,82±0,08	2,1±0,3	0,22±0,04	0,53±0,01
E31	4,2±0,8	18,6±4,5	0,21±0,03	0,33±0,08	13,7±0,8	5,7±0,9	0,6±0,1	2,1±0,3
E32	2,5±1,2	1,1±0,8	0,39±0,05	1,4±0,2	1,9±0,7	6,0±0,5	6,1±0,2	8,0±0,3
E33	8,1±2,6	2,8±1,2	0,78±0,06	2,6±0,1	2,4±0,6	10,5±0,2	11,4±0,2	17,2±0,5
E34	0,35±0,04	7,2±2,1	0,56±0,04	11,0±0,3	19,2±0,6	17,9±4,6	54,5±3,2	123,7±0,7
E35	1,1±0,4	44,0±6,5	0,86±0,05	4,5±0,4	7,2±0,4	19,2±3,8	24,1±1,3	40,4±0,3
E36	2,9±0,3	3,9±2,5	0,56±0,04	5,5±0,5	10,1±0,3	26,0±2,9	30,5±5,1	49,1±0,2
E37	7,6±0,4	1,9±1,3	0,48±0,03	1,6±0,2	2,7±0,6	8,2±6,5	9,6±4,6	18,7±0,6
E38	0,47±0,05	51,5±2,1	0,57±0,06	1,0±0,6	1,3±0,4	4,9±4,5	7,9±3,4	13,0±0,4
K1	5,2±1,2	1,5±1,0	0,35±0,05	1,5±0,4	2,5±0,4	17,8±4,4	9,0±5,3	11,6±0,2
K2	0,5±0,1	1,1±0,4	0,21±0,04	1,1±0,3	2,3±0,2	17,0±3,7	19,7±2,5	44,0±0,2

– Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za CGA 0,08 mg L<sup>-1</sup>.

Tabela 18. Nastavak

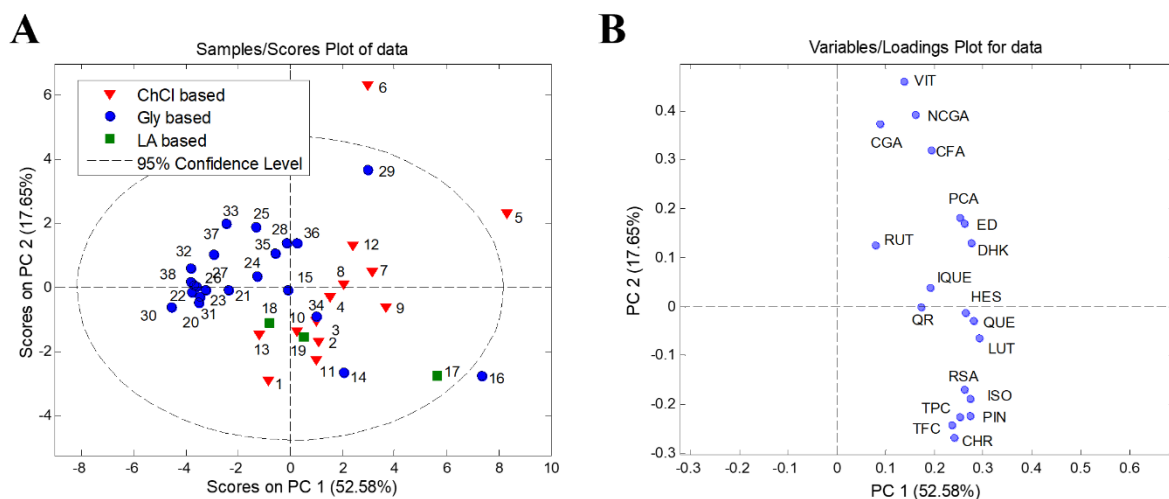
Ekstrakti	Fenolna jedinjenja (mg kg <sup>-1</sup> )							
	NCGA	CA	PCOA	QUE	HES	ISR	CHR	PIN
E1	3,8±0,2	65,1±0,5	79,7±0,2	73,8±0,5	32,5±0,6	1064±4	2438±4	2516±2
E2	71,4±0,5	331,7±0,4	213,8±0,6	136,8±0,4	57,8±0,5	1766±3	2876±5	3364±2
E3	105,4±0,4	251,9±0,4	216,7±0,2	166,4±0,3	75,3±0,7	1869±4	2504±4	3161±3
E4	180,3±0,2	426±2	568±3	106,0±0,8	–	1321±1	1758±6	2400±5
E5	388,3±0,5	871±2	1399±3	375,3±0,7	144,8±0,9	2204±3	2623±3	4156±2
E6	552±2	754±4	782±3	159,0±0,5	20,5±0,2	607±1	1125±4	1177±1
E7	190,9±0,2	546±3	910±4	257,8±0,8	85,2±0,5	1792±2	2108±2	2841±1
E8	230,5±0,8	522±2	386±3	153,2±0,6	63,3±0,7	1662±2	2136±1	13,0±0,9
E9	127,3±0,8	184,7±0,5	323±2	282,0±0,7	82,5±0,5	2508±3	2647±1	3750±5
E10	25,9±0,3	165,6±0,2	121,8±0,8	192,2±0,5	53,1±0,6	1530±4	1688±3	1889±3
E11	17,2±0,5	145,0±0,6	81,1±0,5	169,3±0,2	50,4±0,8	1828±2	2362±3	2565±4
E12	139,1±0,5	161,0±0,2	67,9±0,7	19,5±0,8	42,8±0,1	495±3	1763±3	2448±3
E13	4,2±0,2	17,0±0,8	7,6±0,2	114,8±0,8	40,2±0,3	1136±4	1792±1	2155±6
E14	27,6±0,8	177,5±0,9	251,9±0,5	207,3±0,2	67,6±0,2	1907±2	2924±2	3611±3
E15	97,8±0,2	174,1±0,3	187,2±0,4	171,0±0,6	45,7±0,7	1346±4	1470±1	1672±4
E16	58,3±0,5	585,8±0,3	813±2	297,5±0,7	106,8±0,9	2632±6	3110±1	4410±5
E17	30,4±0,5	419,5±0,3	536±1	310,1±0,9	40,0±0,7	2516±1	3317±5	3727±7
E18	45,5±0,2	195,1±0,4	224,6±0,5	132,4±0,8	39,7±0,4	1170±2	1876±6	2294±5
E19	61,1±0,8	173,4±0,7	119,9±0,5	79,6±0,9	26,1±0,5	1110±2	3923±4	3312±7
E20	19,1±0,6	103,4±0,5	87,6±0,2	29,6±806	12,8±0,8	336±1	638±2	773±6
E21	58,5±0,5	174,8±0,4	121,8±0,8	84,7±0,7	29,7±0,5	691±3	832±4	1012±3
E22	43,1±0,7	113,4±0,7	61,9±0,8	16,9±0,1	6,6±0,8	260±2	443±7	523±3
E23	44,2±0,5	163,4±0,5	92,3±0,6	47,5±0,5	17,1±0,5	429±2	517±1	621±4
E24	90,9±0,9	214,7±0,9	217,3±0,5	119,7±0,4	40,1±0,9	915±3	1031±4	1256±5
E25	277,5±0,7	494±3	243,1±0,5	99,4±0,6	31,3±0,3	657±2	657±7	854±5
E26	44,6±0,5	169,4±0,5	74,2±0,4	17,4±0,5	7,1±0,4	257±2	485±3	579±2
E27	73,9±0,8	137,4±0,5	61,8±0,9	16,6±0,7	6,3±0,5	211±4	362±1	465±6
E28	136,6±0,2	659±2	342,8±0,5	134,0±0,5	49,9±0,2	919±5	884±1	1092±4
E29	368±1	824±4	499±3	209,5±0,3	91,1±0,9	1571±3	1318±2	1790±4
E30	–	2,5±0,2	8,3±0,9	1,6±0,9	0,04±0,01	11,0±0,2	180±2	7,3±0,1
E31	12,4±0,5	50,6±0,8	19,5±0,4	1,5±0,4	0,2±0,1	11,2±0,8	625±6	24,3±0,5
E32	73,9±0,9	279,7±0,8	77,9±0,2	23,2±0,5	3,6±0,2	97,1±0,9	104,2±0,8	126±1
E33	231,7±0,5	396,6±0,9	126,7±0,2	63,1±0,5	18,0±0,8	342±1	320±2	437±2
E34	2,1±0,7	22,5±0,6	7,0±0,8	35,4±0,4	55,1±0,6	940±2	1468±2	1958±3
E35	92,6±0,5	499±1	248,5±0,8	137,3±0,9	39,4±0,3	975±1	893±5	1161±5
E36	153,1±0,2	733±2	396,3±0,9	162,6±0,7	46,1±0,4	1025±4	930±4	1207±3
E37	143,4±0,7	219,2±0,6	166,2±0,2	8,3±0,5	13,4±0,5	284±2	569±6	692±5
E38	3,9±0,6	4,3±0,2	5,1±0,4	0,42±0,09	10,5±0,8	136±0,4	464±2	537±2
K1	165,8±0,4	300,9±0,7	555±5	30,3±0,2	13,0±0,1	97,3±0,6	121±1	135±1
K2	56,1±0,2	186,5±0,5	524±3	119,2±0,4	166,4±0,8	1253±2	1541±2	1917±5

– Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za: NCGA 0,08 mg L<sup>-1</sup>, HES 0,03 mg L<sup>-1</sup>.

U cilju utvrđivanja kriterijuma za diferencijaciju ekstrakata u zavisnosti od primenjene eutektičke smeše, rezultati UHPLC analize i spektrofotometrijskih eseja iskorišćeni su kao ulazni podaci za multivarijantnu analizu. Matrica podataka se sastojala od 38 objekata (ispitivani eutektički ekstrakti) i 19 varijabli koje predstavljaju sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja, TPC, TFC i RSA vrednosti. Dobijeni PCA model sastojao se od šest glavnih komponenata i objasnio je 94,35% ukupnog varijabiliteta (PC 1–17,65%, PC 2– 17,65%, PC 3– 10,60%). Grafik skorova latentnih varijabli (Slika 27.A) je pokazao da su se ekstrakti odvojili na osnovu sastava primenjenih eutektičkih smeša na tri klastera koji odgovaraju sistemima koji sadrže holin–hlorid, glicerol i mlečnu kiselinu. Klaster koji čine ekstrakti dobijeni holin–hloridnim smešama je delimično preklapljen sa klasterom ekstrakta na bazi mlečne kiseline, što ukazuje na sličnu efikasnost ekstrakcije ova dva sistema. Udaljenost ekstrakata na bazi mlečne kiseline (E18 i E19) od holin–hloridnih ekstrakta (E1–E4), koji sadrže mlečnu kiselinu kao drugu komponentu, ukazuje na dominantnu ulogu mlečne kiseline u ovim sistemima na efikasnost ekstrakcije i sastav dobijenih ekstrakata. Slično ponašanje može se uočiti i kod glicerinskog ekstrakta E16 (druga komponenta u eutektiku je bila mlečna kiselina) koji se grupisao sa ekstraktom E17. Ekstrakti dobijeni korišćenjem sistema koji su sadržali glicerol kao komponentu su rasuti po grafiku, ukazujući na dominantan uticaj druge komponente eutektičke smeše.

Grafik vektora latentnih varijabli (Slika 27.B) je pokazao pozitivan uticaj svih varijabli na razdvajanje duž PC1 ose. Vrednosti TPC, TFC i RSA, i fenolna jedinjenja hrizin i izoramnetin su dovela do izdvajanja ekstrakata na bazi mlečne kiseline duž PC2 ose. Dobijeni PCA model je takođe rezultirao grupisanjem ekstrakata propolisa na osnovu sastava primenjenih eutektičkih smeša.

Poređenjem dobijenih PCA modela za profil fenolnih jedinjenja i za sadržaj fenolnih jedinjenja i vrednosti TPC, TFC i RSA, može se uočiti da pristup zasnovan na kombinovanju napredne analize podataka sa neciljanim hromatografskim profilisanjem (koje koristi ceo hromatografski signal kao jedinstveni hemijski otisak ekstrakta, bez identifikacije pojedinačnih pikova), daje bolji uvid u mehanizam ekstrakcije u poređenju sa ciljanom analizom (zasnovanom na identifikaciji i karakterizaciji nepoznatih metabolita).



Slika 27. Analiza glavnih komponenata za sadržaj fenolnih jedinjenja, TPC, TFC i RSA vrednosti u eutektičkim ekstraktima propolisa: A) grafik skorova latentnih varijabli; B) grafik vektora latentnih varijabli.

#### 4.2.5. Antimikrobna aktivnost

S obzirom na izraženo biološko dejstvo propolisa, ispitana je antimikrobna aktivnost eutektskih ekstrakata propolisa primenom difuzione metode u bunarićima (Tabela 19.). Ekstrakti propolisa su pokazali visok potencijal da inhibiraju Gram–pozitivne bakterije, dok su Gram–negativni sojevi bili visoko otporni što je u skladu sa prethodno objavljenim studijama.<sup>140</sup> Razlike u antimikrobnoj aktivnosti prema ispitanim sojevima, odnosno veća otpornost Gram–negativnih sojeva posledica je strukture i sastava ćelijskog zida. Ekstrakti propolisa dobijeni primenom eutektskih smeša na bazi holin–hlorida (E1–E13) i mlečne kiseline (E17–E19) inhibirali su ispitivane Gram–pozitivne bakterijske sojeve, dok su ekstrakti na bazi glicerola pokazali varijacije u antibakterijskoj aktivnosti. Ekstrakti E14–E16, E20, E24 i E37 su pokazali širok spektar aktivnosti protiv *S. aureus*, MRSA i *L. monocytogenes*. U pomenutim ekstraktima najzastupljenije fenolna jedinjenja su pinocembrin i hrizin, za koja je opisano u literaturi da imaju inhibitornu aktivnost protiv *S. aureus*<sup>141–143</sup> i *L. monocytogenes*.<sup>144</sup> Ekstrakt E4, dobijen primenom smeše holin–hlorida i mlečne kiseline u odnosu 1:3 (*n/n*) je jedini ispoljio aktivnost prema *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. enteritidis*. Antifungalna aktivnost protiv *C. albicans* prisutna je samo u ekstraktu E34, koji je dobijen primenom eutektske smeše glicerol: urea 1:1 (*n/n*), koja može biti posledica višeg sadržaja izokvercetin i kvercitrin za koje je opisano u literaturi da poseduje inhibitornu aktivnost protiv ovog soja.<sup>145,146</sup> Razlike u antimikrobnoj aktivnosti između eutektskih ekstrakata su posledica različitog sastava dobijenih ekstrakata i u skladu je sa rezultatima hemijske karakterizacije, koji su pokazali veći sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijeni smešama sa holin–hloridom i mlečnom kiselinom u poređenju sa glicerinskim smešama.

Tabela 19. Antimikrobna aktivnost ekstrakata propolisa određena difuzionom metodom u bunarićima.

Ekstrakti	Ispitivani sojevi						
	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. abicans</i>
E1	++	+++	+++	-	-	-	-
E2	++	++	++	-	-	-	-
E3	++	++	++	-	-	-	-
E4	++	++	+++	++	++	++	-
E5	+++	+++	+++	-	-	-	-
E6	+++	+++	++	-	-	-	-
E8	++	+++	+++	-	-	-	-
E9	++	+++	++	-	-	-	-
E10	++	++	++	-	-	-	-
E11	++	++	+++	-	-	-	-
E12	++	++	++	-	-	-	-
E13	+++	+++	+++	-	-	-	-
E14	+++	+++	++	-	-	-	-
E15	+++	+++	+++	-	-	-	-
E16	++	++	+++	-	-	-	-
E17	++	+++	+++	-	-	-	-
E18	++	++	++	-	-	-	-
E19	++	++	++	-	-	-	-
E20	++	++	++	-	-	-	-
E21	++	-	-	-	-	-	-
E22	-	-	++	-	-	-	-
E23	-	-	++	-	-	-	-
E24	++	++	++	-	-	-	-
E25	++	-	-	-	-	-	-
E26	-	-	++	-	-	-	-
E27	-	-	-	-	-	-	-
E28	-	-	-	-	-	-	-
E29	-	-	-	-	-	-	-
E30	-	-	-	-	-	-	-
E31	-	-	-	-	-	-	-
E32	-	-	-	-	-	-	-
E33	-	-	-	-	-	-	-
E34	++	++	-	-	-	-	++
E35	++	++	-	-	-	-	-
E36	++	++	-	-	-	-	-
E37	++	++	++	-	-	-	-
E38	-	-	-	-	-	-	-
K1	+	++	++	-	-	-	-
K2	+	++	++	-	-	-	-
VAN	-	++	++	-	-	-	NT
GEN	++	++	+++	+++	+++	-	NT
KAN	-	-	++	-	-	-	NT
HEM	-	-	++	-	-	-	NT
FCZ	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+++
NYS	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
MeOH	-	-	-	-	-	-	-

Na osnovu veličine zone inhibicije, rezultati su prikazani na sledeći način: nema inhibicije (-), zona inhibicije do 8mm (+), zona inhibicije 8–12mm (++) , zona inhibicije veća od 12 mm (+++).

Skraćenice: VAN– vankomicin, GEN– gentamicin, KAN– kanamicin, HEM– hemomicin, FCZ– flukonazol, NYS– nistatin, MeOH–metanol, NT–nije testirano.

### 4.3. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz bobičastog voća

#### 4.3.1. Odabir eutektičkih smeša

Hemijski sastav eutektičkih smeša određuje njihova fizičko–hemijska svojstva, kao što su polarnost, viskoznost i pH, a samim tim utiče na efikasnost ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja. Holin–hlorid se često koristi kao akceptor vodonične veze u pripremi eutektičkih smeša kada su ciljana jedinjenja fenoli.<sup>81</sup> Eutektičke smeše pripremljene od holin–hlorida i organskih kiselina su se pokazale kao dobri ekstrakcioni rastvarači za antocijane, zbog nižih pH vrednosti u poređenju sa smešama koje kao HBD sadrže polihidroksilne alkohole ili šećere.<sup>147</sup> U okviru istraživanja koje se bavilo ekstrakcijom fenolnih jedinjenja iz bobičastog voća, holin–hlorid je izabran kao HBA u kombinaciji sa pet organskih kiselina: jabučna, limunska, vinska, mlečna i ćilibarna. Osim karboksilnih kiselina, kao HBD izabrani su i glukoza, glicerol i urea, jer su pristupačne hemikalije koje se često koriste za pripremu eutektičkih smeša. Kako bi se dodatno procenio uticaj različitih HBA na svojstva smeša i efikasnost ekstrakcije, kao akceptori korišćene su i četiri aminokiseline: L–prolin, L–glicin, L–lizin i L–tirozin. Prethodno navedene HBA i HBD su mešane u odnosima 1:1, 1:2 ili 1:3, kako bi se ispitao uticaj molskog odnosa komponenata na ekstrakciju. Međutim, neke kombinacije HBA i HBD nisu uspele da se stope i formiraju tečnu fazu, ili su dobijene eutektičke smeše bile previše viskozne da bi se koristile kao rastvarači. U Tabeli 20. navedene su uspešno pripremljene eutektičke smeše koje su dalje korišćene kao rastvarači za ekstrakciju, dok su u Tabeli 21. navedene ostale isprobane kombinacije. Pored navedenih, ispitane su i smeše natrijum–acetat: mlečna kiselina, glukoza: mlečna kiselina, limunska kiselina: fruktoza, urea: glicerol, L–prolin: glicerol, koje su opisane u literaturi i korišćene za ekstrakciju fenolnih jedinjenja.<sup>24,148,149</sup> Viskoznost eutektičkih smeša ograničava njihovu efikasnost ekstrakcije, zbog čega su sadržaj vode u smeši i temperatura ekstrakcija pažljivo izabrani. Odabrano je da sadržaj vode bude 20% (w/w), jer ne menja značajno supramolekulsku strukturu eutektika i interakcije između HBA i HBD, dok je temperatura ekstrakcije postavljena na 50°C kako bi se dovoljno smanjila viskoznost, bez rizika degradacije bioaktivnih jedinjenja.<sup>24,124</sup> Svi ostali parametri ekstrakcije su držani konstantnim kako bi se proučavao samo uticaj sastava eutektičke smeše (HBA, HBD i molski odnos) na ekstrakciju. Efikasnost ekstrakcije eutektičkih smeša je poređena sa konvencionalnim rastvaračima i korišćeni su 0,01% (v/v) zakiseljeni metanol sa hlorovodoničnom kiselinom i 1% (w/v) rastvor limunske kiseline u vodi, koji je poznat kao GRAS rastvarač.

Tabela 20. Sastav eutektičkih smeša primenjenih u ekstrakciji bioaktivnih jedinjenja iz bobičastog voća.

Oznaka ekstrakta	Sastav eutektičkih smeša	Molarni odnos
E1	holin–hlorid: fruktoza	1:1
E2	holin–hlorid: fruktoza	5:2
E3	holin–hlorid: glukoza	1:1
E4	holin–hlorid: glukoza	5:2
E5	holin–hlorid: jabučna kiselina	1:1
E6	holin–hlorid: limunska kiselina	1:1
E7	holin–hlorid: vinska kiselina	1:1
E8	holin–hlorid: mlečna kiselina	1:1
E9	holin–hlorid: mlečna kiselina	1:2
E10	holin–hlorid: mlečna kiselina	1:3
E11	holin–hlorid: glicerol	1:1
E12	holin–hlorid: glicerol	1:2
E13	holin–hlorid: glicerol	1:3
E14	holin–hlorid: urea	1:1
E15	holin–hlorid: urea	1:2
E16	urea: glicerol	1:1
E17	urea: glicerol	1:2
E18	urea: glicerol	1:3
E19	L–prolin: glicerol	1:1
E20	L–prolin: glicerol	1:3
E21	L–prolin: glicerol	5:2
E22	L–prolin: limunska kiselina	1:1
E23	L–prolin: jabučna kiselina	1:1
E24	L–prolin: glukoza	1:1
E25	L–prolin: urea	1:1
E26	L–prolin: mlečna kiselina	1:1
E27	L–prolin: mlečna kiselina	1:3
E28	L–lizin: mlečna kiselina	1:1
E29	L–lizin: mlečna kiselina	1:3
E30	L–lizin: jabučna kiselina	1:1
E31	L–glicin: mlečna kiselina	1:3
E32	L–glicin: vinska kiselina	1:1
E33	L–glicin: jabučna kiselina	1:1
E34	natrijum–acetat: mlečna kiselina	1:3
E35	glukoza: mlečna kiselina	1:3
E36	limunska kiselina: fruktoza	1:1
Oznaka	Konvencionalni rastvarač	
K1	0,01% (v/v) hlorovodonična kiselina u metanolu	
K2	1% (w/v) limunska kiselina u vodi	

Tabela 21. Sastav neuspelih eutektičkih smeša primenjenih u ekstrakciji bioaktivnih jedinjenja iz bobičastog voća.

Sastav	Molarni odnos	Izgled
holin–hlorid: ćilibarna kiselina	1:1	kristališe kad se ohladi
L–prolin: ćilibarna kiselina	1:1	kristališe kad se ohladi
L–prolin: vinska kiselina	1:1	nije se stopila
L–glicin: mlečna kiselina	1:1	nije se stopila
L–glicin: glicerol	1:1	nije se stopila
L–glicin: glicerol	1:3	nije se stopila
L–glicin: urea	1:1	veoma viskozna
L–glicin: ćilibarna kiselina	1:1	nije se stopila
L–glicin: limunska kiselina	1:1	veoma viskozna
L–lizin: vinska kiselina	1:1	nije se stopila
L–lizin: limunska kiselina	1:1	veoma viskozna
L–lizin: ćilibarna kiselina	1:1	nije se stopila
L–lizin: glicerol	1:1	nije se stopila
L–lizin: urea	1:1	nije se stopila
L–lizin: glicerol	1:3	kristališe kad se ohladi
L–tirozin: mlečna kiselina	1:3	nije se stopila
L–tirozin: glicerol	1:1	nije se stopila
L–tirozin: glicerol	1:3	nije se stopila
L–tirozin: jabučna kiselina	1:1	nije se stopila
L–tirozin: mlečna kiselina	1:1	nije se stopila

#### 4.3.2. HPTLC profil fenolnih jedinjenja

Bobičasto voće je bogato fenolnim jedinjenjima različite polarnosti (antocijani, fenolne kiseline i flavonoidi) zbog čega je potrebno pronaći optimalne uslove za hromatografsko razdvajanje svih prisutnih klasa. Sastav mobilne faze korišćene za dobijanje HPTLC profila fenolnih jedinjenja je optimizovan kako bi se postigla maksimalna efikasnost razdvajanja upotrebom jedne mobilne faze. Ukupno je ispitano devet mobilnih faza koje su opisane u literaturi (Tabela 3). Mobilna faza 1 se pokazala kao nemešljiva, dok je prilikom upotrebe mobilnih faza 5, 6 i 7 došlo do pojave drugog fronta. Mobilna faza 2 je pokazala nisku elucionu moć i razdvojene zone nisu bile dovoljno oštre, dok su mobilne faze 3 i 8 dobro razdvojile većinu fenolnih jedinjenja, osim antocijana, koji su ostali na početnoj zoni. Optimalni rezultati razdvajanja, koji su podrazumevali veliki broj oštrih i dobro definisanih zona, kao i dobro odvajanje antocijana i drugih klasa fenolnih jedinjenja, postignuto je primenom mobilne faze 4, koja se sastojala od etil–acetata, vode, sirćetne kiseline i mravlje kiseline u odnosu 100/27/11/11 (v/v/v/v).

HPTLC profili fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata bobičastog voća (Slika 28.) su pokazali različite obrasce za svaku botaničku vrstu (aronija, borovnica ili crni godži). Poređenjem hromatograma u okviru svake botaničke vrste mogu se primetiti razlike u prisustvu i intenzitetu zona u zavisnosti od primenjene eutektičke smeše, što pokazuje da hemijski sastav smeše (HBA, HBD i molski odnos) utiče na izgled profila fenolnih jedinjenja, odnosno hemijski sastav ekstrakta.

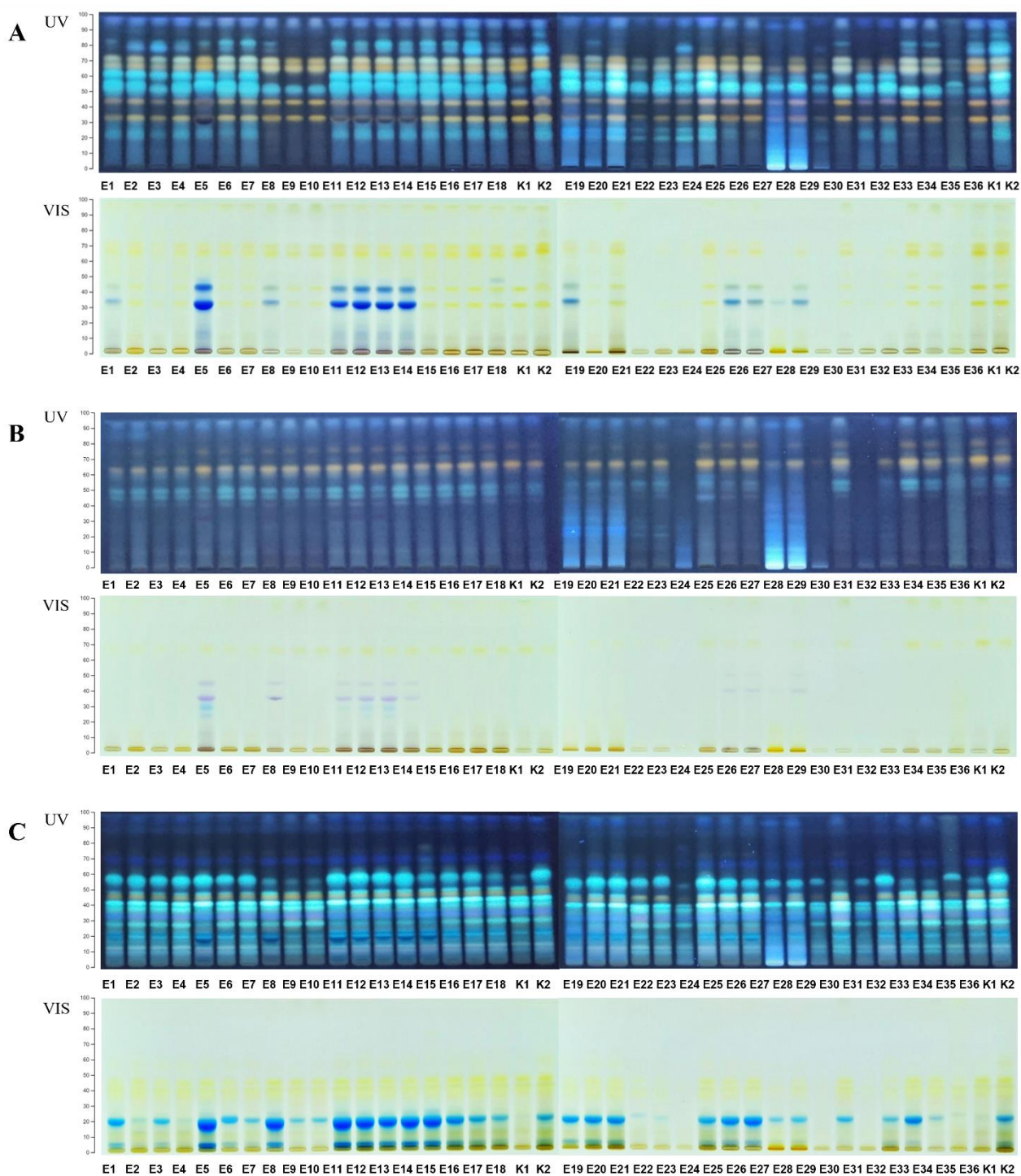
Eutektički ekstrakti aronije pokazuju profile fenolnih jedinjenja (Slika 28. A) koji su bogati zonama plave i narandžaste boje sa uočljivim razlikama u broju i intenzitetu zona u zavisnosti od primenjene eutektičke smeše. Ekstrakti (E1–E15) dobijeni primenom eutektičkih smeša koje su kao HBA sadržale holin–hlorid pokazuju varijacije u izgledu profila koje je uslovlila druga komponenta. Kad je kao HBD korišćena mlečna kiselina (ekstrakti E8–E10) može se uočiti odsustvo plave zone na  $hR_F$  vrednosti 60, koja je identifikovana kao neohlorogena kiselina poređenjem sa standardom (Slika 29.). Osim toga, u izgledu profila ova tri ekstrakta (E8–E10) mogu se videti razlike koje je uslovio molski odnos HBA i HBD, tako da su samo na profilu ekstrakta E8 (molski odnos je bio 1:1) prisutne plave

zone na  $hR_F$  vrednostima 80 i 85. Uticaj strukture HBD–a i molskog odnosa na sastav ekstrahovanih jedinjenja može se videti u slučaju zona koje potiču od antocijana ( $hR_F$  vrednosti 35 i 45). Zone antocijana su prisutne u ekstraktima kad je kao HBD korišćena jabučna kiselina, glicerol ili urea na  $hR_F$  vrednostima 35 i 45. Ekstrakti (E19–E33) dobijeni primenom eutektičkih smeša koje su kao HBA sadržale aminokiselinu, pokazuju različite profile koje su uslovile strukture obe komponente (HBA i HBD). Kod aminokiselinskih ekstrakata koji su kao HBD imali mlečnu kiselinu (E26–E29, E31, E34–35) uočava se isti trend kao u slučaju holin–hloridnih ekstrakata, odnosno odsustvo plave zone na  $hR_F$  vrednosti 60 (neohlorogena kiselina). Razlika između profila dobijenih primenom holin–hloridnih i aminokiselinskih sistema, a koja se može uočiti vizuelnom procenom, je prisustvo većeg broja plavih zona na  $hR_F$  vrednostima između 0 i 30, koje su prisutne samo u aminokiselinskim ekstraktima.

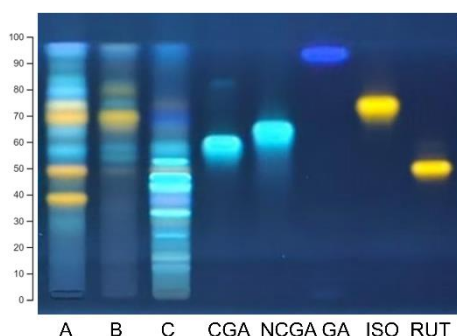
Profili fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata borovnice (Slika 28.B) su pokazali obrazac sa malim brojem zona, na kojem su prisutne plave i narandžaste zone jedinjenja srednje polarnosti na  $hR_F$  vrednostima između 40 i 70, kao i plave zone nepolarnih jedinjenja na  $hR_F$  vrednostima između 85 i 95. Profili se među sobom razlikuju po sastavu fenolnih jedinjenja, dok se jedinjenja koja su prisutna u svim ekstraktima razlikuju po intenzitetu zona, odnosno količini, u zavisnosti od primenjene eutektičke smeše (vrste HBA i HBD, molski odnos). Jedinjenja prisutna na hromatogramima ekstrakata E1–E15 potiču od zajedničke komponente eutektičke smeše, holin–hlorida, dok je razlike, koje odgovaraju manje intenzivnim zonama, uslovlila druga komponenta, fruktoza, glukoza, jabučna, mlečna, vinska, limunska kiselina, glicerol ili urea. Sličan trend je uočen i kod ekstrakata E19–E33 dobijenih pomoću eutektičkih smeša koje sadrže aminokiselinu (L–prolin, L–lizin i L–glicin) kao zajedničku komponentu. Prisustvo intenzivnih narandžastih i plavih zona u svim ekstraktima sugerise da je efikasnost ekstrakcije holin–hloridnih i aminokiselinskih eutektičkih smeša slična. Međutim, razlike između profila ove dve grupe ekstrakata primećuju se na  $hR_F$  vrednostima između 0 i 30, gde se plave zone pojavljuju samo u aminokiselinskim ekstraktima.

Profili eutektičkih ekstrakata crnog godžija (Slika 28.C) su pokazali obrazac u kojem dominiraju polarna i srednje polarna jedinjenja, koja se pojavljuju kao plave zone na  $hR_F$  vrednostima između 0 i 60, dok su nepolarnija jedinjenja prisutna na  $hR_F$  vrednostima 70, 90 i 95 kao tamnoplave zone. Poređenjem profila ekstrakata, odnosno intenziteta prisutnih traka, dobijenih primenom holin–hloridnih smeša (E1–E15) sa profilima ekstrakata (E19–E33) koji potiču od aminokiselinskih eutektičkih smeša može se uočiti slična efikasnost ekstrakcije. Uzimajući u obzir prisustvo većeg broja plavih zona u aminokiselinskim ekstraktima može se pretpostaviti da je sastav fenolnih jedinjenja različit. Osim uticaja HBA komponente (holin–hlorid i aminokiselina) na sastav ekstrahovanih jedinjenja, veliki uticaj imala je i HBD komponenta. Vizuelnom procenom može se uočiti manji intenzitet plave zone na  $hR_F$  vrednosti 55, koja je identifikovana kao hlorogena kiselina (Slika 29.) u ekstraktima koji su kao HBD imali mlečnu kiselinu (E8–E10, E26–E29, E31, E34–E35). Uticaj HBA i HBD komponentata i njihovog molskog odnosa na sastav dobijenih ekstrakata se takođe može uočiti na profilima pod vidljivom svetlošću gde se uočava različiti intenzitet plavih zona na  $hR_F$  vrednostima 5 i 20 koje potiču od antocijana.

Vizuelnim poređenjem profila ekstrakata dobijenih korišćenjem eutektičkih smeša sa profilima ekstrakata dobijenih primenom konvencionalnih rastvarača (ekstrakti K1 i K2) uočava se jednaka efikasnost ekstrakcije koja se ogleda u sličnom intenzitetu i broju traka.



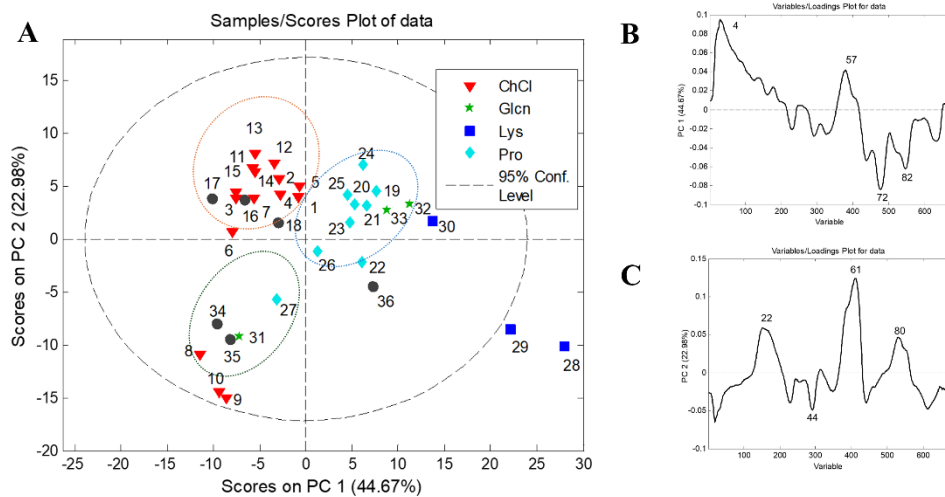
Slika 28. HPTLC profili eutektičkih i konvencionalnih ekstrakata: A) aronije, B) borovnice, C) crnog godžija. Skraćenice oznaka su navedene u Tabeli 20.



Slika 29. HPTLC profili metanolnih ekstrakata bobičastog voća i standarda fenolnih jedinjenja. Skraćenice: A– aronija, B– borovnica, C– crni godži, CGA– hlorogena kiselina, NCGA– neohlorogena kiselina, GA– galna kiselina, ISO– izokvercetin, RUT– rutin.

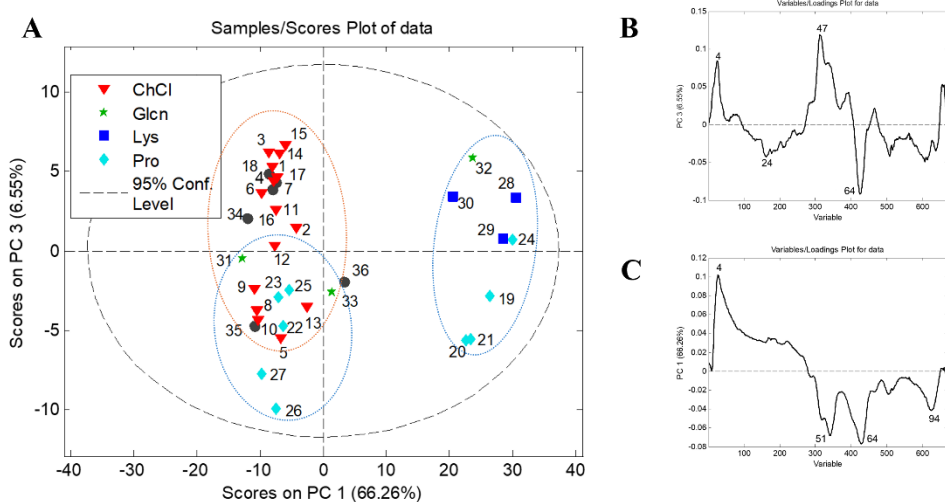
Vizuelna procena HPTLC hromatograma eutektičkih ekstrakata bobičastog voća sugerise da sastav eutektičkih smeša ima značajan uticaj na efikasnost ekstrakcije i sastav dobijenih ekstrakata. Kako bi se istražio mogući obrazac i identifikovale zone koje dovode do diferencijacije među ekstraktima, primenjena je analiza glavnih komponenata na podatke dobijene obradom slika hromatograma. Matrica podataka, za svaku vrstu voća pojedinačno, se sastojala od 36 objekata koji predstavljaju ispitivane eutektičke ekstrakte i 670 varijabli koje predstavljaju intenzitete sive boje izražene u pikselima duž linije hromatograma.

Dobijeni PCA model za ekstrakte aronije, sastojao se od pet glavnih komponenata i objasnio je 89,28% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1– 44,67%, PC2–22,98%, PC3–10,57%). Na osnovu grafika skorova latentnih varijabli (Slika 30.A) utvrđeno je da su se eutektički ekstrakti razdvojili na tri klastera na osnovu sastava primenjenih eutektičkih smeša: klaster koji odgovara ekstraktima dobijenim smešama na bazi holin–hlorida, na bazi aminokiselina i na bazi mlečne kiseline. Ekstrakti dobijeni korišćenjem holin–hloridnih smeša čine kompaktan klaster koji je odvojen duž PC1 ose od klastera aminokiselinskih ekstrakata. Ekstrakti dobijeni korišćenjem sistema koji su sadržali aminokiselinu kao komponentu su rasuti na grafiku, ukazujući na uticaj razlika u strukturi bočnih nizova aminokiselina (L–glicina, L–prolina i L–lizina). Treći klaster su formirali ekstrakti dobijeni primenom eutektika koji su sadržali mlečnu kiselinu (E8–E10, E27, E31, E34–E35), dok je druga komponenta bila različita, holin–hlorid, aminokiselina, natrijum–acetat i glukoza. Grupisanje ovih ekstrakata ukazuje na dominantnu ulogu mlečne kiseline u ekstrakciji koja je bila uočena i vizualnom procenom profila fenolnih jedinjenja. Grafik vektora latentnih varijabli za PC2 osu (Slika 30.C) ukazuje da se glavna zona koja je uslovlila pomenuto grupisanje nalazi na  $hR_F$  vrednosti 61 (odgovara neohlorogenoj kiselini), dok dodatni uticaj na razdvajanje imaju i jedinjenja na  $hR_F$  vrednostima 22 i 80.



Slika 30. Analiza glavnih komponenata za profil fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata aronije: A) grafik skorova latentnih varijabli; B/C) grafik vektora latentnih varijabli.

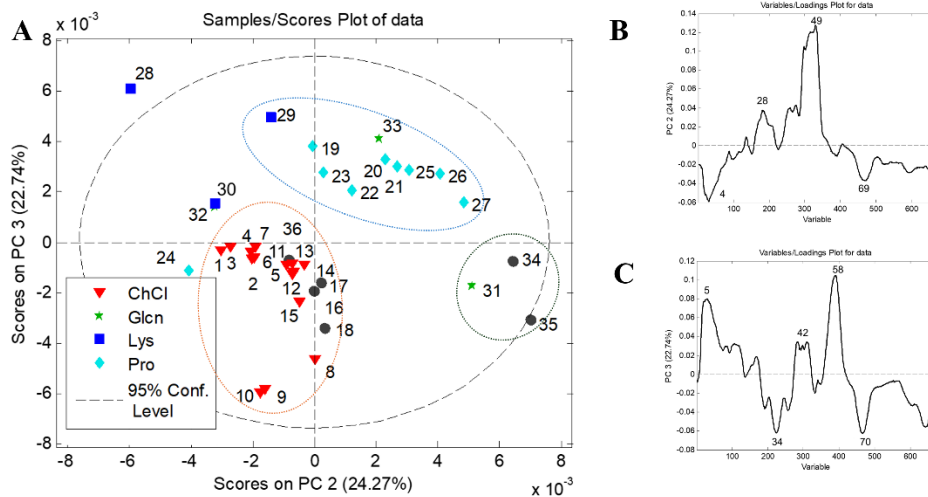
Dobijeni PCA model za profil fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata borovnice se sastojao od pet glavnih komponenata i objašnjavao je 91,50% ukupnog varijabiliteta (PC1–66,26%, PC2–11,27%, PC3–6,55%). Na osnovu grafika skorova latentnih varijabli (Slika 31. A), je utvrđeno da su se ekstrakti razdvojili duž PC1 ose na dva klastera prema sastavu primenjenih eutektičkih smeša. Prvi klaster su formirale dve grupe ekstrakata sa različitom HBA komponentom– holin–hlorid i aminokiselina, dok su drugi klaster formirali samo ekstrakti dobijeni aminokiselinskim smešama. Udaljenost ova dva klastera duž PC1 ose ukazuje na različitu efikasnost ekstrakcije eutektičkih smeša koje potiču od aminokiselina i dominantan uticaj HBD komponente na sastav ekstrakata. U okviru prvog klastera dolazi do delimičnog razdvajanja duž PC3 ose na osnovu razlike u HBA (holin–hlorid i aminokiselina), što pokazuje da obe komponente eutektika imaju uticaj na sastav ekstrahovanih jedinjenja. Grafik vektora latentnih varijabli (Slika 31. B) pokazuje da su glavne zone koje uslovljavaju razdvajanje duž PC1 ose na  $hR_F$  vrednostima 47 i 64.



Slika 31. Analiza glavnih komponenata za profil fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata borovnice: A) grafik skorova latentnih varijabli; B/C) grafik vektora latentnih varijabli.

Dobijeni PCA model za profil fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata crnog godžija se sastojao od pet glavnih komponenata i objašnjavao je 90,60% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1–35,89%, PC2–24,27%, PC3–22,74%). Na osnovu grafika skorova latentnih varijabli (Slika 32.A) je utvrđeno da su se ekstrakti razdvojili na osnovu sastava primenjenih eutektičkih smeša na tri klastera. Ekstrakti dobijeni holin–hloridnim smešama čine kompaktni klaster u donjem levom delu grafika.

Ekstrakti dobijeni primenom aminokiselinskih eutektičkih smeša su rasuti na grafiku što ukazuje na uticaj HBD komponente na ekstrakciju. U okviru ovog klastera došlo je do dodatnog razdvajanja duž PC2 ose ekstrakata E28, E29 i E30 koji su dobijeni smešama sa L–lizinom kao HBA, što ukazuje da strukturne razlike između aminokiselina utiču na profile ekstrakcije. L–lizin ima pozitivno naelektrisan bočni niz i zbog toga ima baznija svojstva, u poređenju sa pretežno neutralnim aminokiselinama L–prolinom i L–glicinom. Ekstrakti E31, E34 i E35, koji su dobijeni eutektičkim smešama sa mlečnom kiselinom, su formirali treći klaster, što ukazuje na dominantnu ulogu HBD u ovim smešama. Grafik vektora latentnih varijabli (Slika 31. B) pokazuje da je glavna zona koja uslovljava pomenute razlike na  $hR_F$  vrednosti 49, dok dodatni uticaj na razdvajanje imaju i jedinjenja na  $hR_F$  vrednostima 28 i 69.

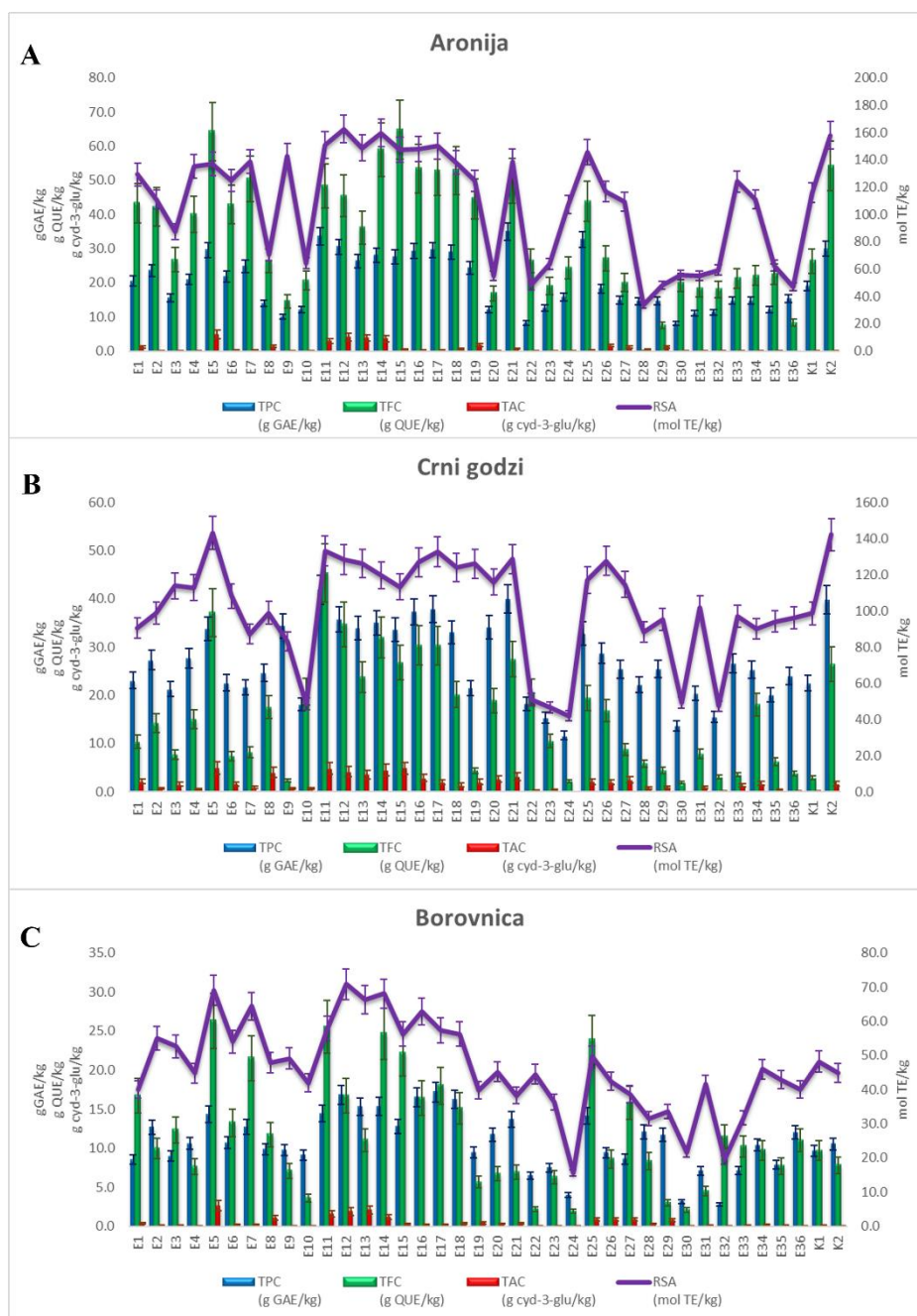


Slika 32. Analiza glavnih komponenta za profil fenolnih jedinjenja eutektičkih ekstrakata crnog godžija: A) grafik skorova latentnih varijabli; B/C) grafik vektora latentnih varijabli.

Dobijeni PCA modeli su rezultirali specifičnom klasifikacijom ekstrakata prema sastavu korišćenih eutektičkih smeša, kod svake vrste bobičastog voća, što potvrđuje da se eutektičke smeše mogu koristiti kao dizajnerski rastvarač. Podesiva svojstva eutektičkih smeša i njihove sposobnosti da interaguju sa jedinjenjima od interesa daje im prednost za upotrebu kao rastvarača za ciljanu ekstrakciju. Hemometrijska analiza je potvrdila uticaj HBA komponente (holin–hlorida ili aminokiselina) na sastav dobijenih ekstrakata. Struktura HBA komponente utiče na broj i jačinu vodoničnih veza koje se formiraju unutar eutektičke smeše, ali i između eutektika i ciljanih jedinjenja. Kada se kao HBA koristi holin–hlorid, vodonična veza se formira preko hloridnog anjona<sup>150</sup>, dok se u slučaju aminokiselina veza može formirati preko amino i karboksilne grupe.<sup>151</sup> Primećeno je grupisanje ekstrakata dobijenih primenom eutektičkih smeša koje su sadržale mlečnu kiselinu kod ekstrakata aronije i crnog godžija, što može biti posledica nekoliko razloga. Na efikasnost ekstrakcije primenom eutektičkih smeša u velikoj meri utiče viskoznost rastvarača i prisustvo tečne komponente, kakva je mlečna kiselina, može smanjiti viskoznost i poboljšati ekstrakciju.<sup>88</sup> Osim toga eutektičke smeše koje sadrže mlečnu kiselinu imaju visoko organizovanu strukturu u kojoj voda ima ključnu ulogu, što može izmeniti učinak ekstrakcije.<sup>152</sup> Prilikom ekstrakcije fenolnih jedinjenja primenom eutektičkih smeša, fenoli se ponašaju kao HBD komponenta i nadmeću se sa mlečnom kiselinom u građenju vodoničnih veza. Međutim, kad se kao HBA komponenta koristi holin–hlorid, tada je hloridni anjon obavijen hidroksilnim i karboksilnim grupama mlečne kiseline, što ometa njegove interakcije sa fenolnim jedinjenjem i može smanjiti efikasnost ekstrakcije.<sup>153</sup> Ovi rezultati potvrđuju složen uticaj HBD komponente na interakcije između eutektičkih smeša i ciljanih komponenta, a samim tim i na efikasnost ekstrakcije i sastav dobijenog ekstrakta.

## 4.3.3. Spektrofotometrijski eseji

Efikasnost ekstrakcije primenjenih eutektičkih rastvarača je procenjena i na osnovu spektrofotometrijskih eseja (Tabela 22. i na Slika 33.).



Slika 33. Ukupni sadržaj fenola – plavi stub, ukupan sadržaj flavonoida– zeleni stub, ukupan sadržaj antocijana– crveni stub i antioksidativni kapacitet– ljubičasta linija u eutektičkim (E) i konvencionalnim ekstraktima (K) za: A) aroniju; B) borovnicu; C) crni godži. (Oznake ekstrakata su navedene u Tabeli 20.)

Tabela 22. Ukupan sadržaj fenola, ukupan sadržaj flavonoida, ukupan sadržaj antocijana i antioksidativni kapacitet u eutektičkim (E) i konvencionalnim ekstraktima (K) za: A) aroniju; B) borovnicu; C) crni godži. (Oznake ekstrakata su navedene u Tabeli 20.)

Ekstrakti	Aronija				Borovnica				Crni godži			
	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC (g QUE kg <sup>-1</sup> )	TAC (g cyd-3-glu kg <sup>-1</sup> )	RSA (mol TE kg <sup>-1</sup> )	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC (g QUE kg <sup>-1</sup> )	TAC (g cyd-3-glu kg <sup>-1</sup> )	RSA (mol TE kg <sup>-1</sup> )	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC (g QUE kg <sup>-1</sup> )	TAC (g cyd-3-glu kg <sup>-1</sup> )	RSA (mol TE kg <sup>-1</sup> )
E1	21 ± 2	43 ± 6	1,2 ± 0,3	129 ± 8	8,5 ± 0,6	16 ± 2	0,4 ± 0,1	40 ± 2	23 ± 2	10 ± 1	2,2 ± 0,6	90 ± 6
E2	24 ± 2	42 ± 6	0,2 ± 0,1	110 ± 7	13 ± 1	10 ± 1	0,12 ± 0,03	55 ± 4	27 ± 2	14 ± 2	0,6 ± 0,2	99 ± 6
E3	16 ± 1	27 ± 4	0,2 ± 0,1	87 ± 6	9,0 ± 0,7	12 ± 2	0,12 ± 0,03	53 ± 3	21 ± 2	8 ± 1	1,5 ± 0,4	114 ± 7
E4	21 ± 2	40 ± 5	0,13 ± 0,03	140 ± 9	10,6 ± 0,8	8 ± 1	0,07 ± 0,02	45 ± 3	28 ± 2	15 ± 2	0,5 ± 0,1	113 ± 7
E5	30 ± 2	64 ± 9	5 ± 1	140 ± 9	14 ± 1	26 ± 3	2,6 ± 0,7	70 ± 4	34 ± 3	37 ± 5	5 ± 1	143 ± 9
E6	22 ± 2	43 ± 6	0,28 ± 0,07	130 ± 8	10,7 ± 0,8	13 ± 2	0,18 ± 0,05	54 ± 3	23 ± 2	7 ± 1	1,6 ± 0,4	108 ± 7
E7	25 ± 2	51 ± 7	0,30 ± 0,08	140 ± 9	12,7 ± 0,9	22 ± 3	0,18 ± 0,05	64 ± 4	22 ± 2	8 ± 1	0,9 ± 0,2	87 ± 6
E8	14 ± 1	27 ± 4	1,4 ± 0,4	71 ± 5	9,8 ± 0,7	12 ± 2	1,1 ± 0,3	48 ± 3	25 ± 2	18 ± 2	4 ± 1	99 ± 6
E9	10 ± 1	15 ± 2	0,08 ± 0,02	140 ± 9	9,7 ± 0,7	7,1 ± 0,9	0,09 ± 0,02	49 ± 3	34 ± 3	2 ± 0,3	0,7 ± 0,2	83 ± 5
E10	12 ± 1	21 ± 3	0,12 ± 0,03	64 ± 4	9,1 ± 0,7	3,6 ± 0,5	0,09 ± 0,02	42 ± 3	18 ± 1	21 ± 3	0,7 ± 0,2	49 ± 3
E11	34 ± 2	48 ± 6	3,0 ± 0,8	151 ± 10	14 ± 1	26 ± 3	1,6 ± 0,4	60 ± 4	42 ± 3	45 ± 6	4 ± 1	133 ± 8
E12	31 ± 2	45 ± 6	4 ± 1	163 ± 11	17 ± 1	17 ± 2	1,9 ± 0,5	70 ± 5	36 ± 3	35 ± 5	4 ± 1	128 ± 8
E13	26 ± 2	36 ± 5	4 ± 1	149 ± 9	15 ± 1	11 ± 1	2,1 ± 0,5	66 ± 4	34 ± 3	24 ± 3	3,6 ± 0,9	126 ± 8
E14	28 ± 2	59 ± 8	3,5 ± 0,9	156 ± 10	15 ± 1	25 ± 3	1,2 ± 0,3	68 ± 4	35 ± 3	32 ± 4	4 ± 1	120 ± 8
E15	28 ± 2	65 ± 9	0,5 ± 0,1	147 ± 9	12,8 ± 0,9	22 ± 3	0,28 ± 0,07	56 ± 4	34 ± 3	27 ± 4	5 ± 1	113 ± 7
E16	29 ± 2	53 ± 7	0,29 ± 0,07	148 ± 10	17 ± 1	16 ± 2	0,19 ± 0,05	60 ± 4	37 ± 3	30 ± 4	2,9 ± 0,8	127 ± 8
E17	30 ± 2	53 ± 7	0,32 ± 0,08	150 ± 10	17 ± 1	18 ± 2	0,25 ± 0,06	57 ± 4	38 ± 3	30 ± 4	2,0 ± 0,5	133 ± 8
E18	29 ± 2	53 ± 7	0,6 ± 0,2	138 ± 9	16 ± 1	15 ± 2	0,35 ± 0,09	56 ± 4	33 ± 2	20 ± 3	1,4 ± 0,4	124 ± 8
E19	24 ± 2	45 ± 6	1,8 ± 0,5	125 ± 8	9,4 ± 0,7	5,6 ± 0,8	0,4 ± 0,1	40 ± 3	22 ± 2	4 ± 0,6	2,1 ± 0,5	126 ± 8
E20	12 ± 1	17 ± 2	0,09 ± 0,02	55 ± 4	11,7 ± 0,9	6,7 ± 0,9	0,31 ± 0,08	45 ± 3	34 ± 3	19 ± 3	2,7 ± 0,7	116 ± 7

Tabela 22. Nastavak

Oznaka	Aronija				Borovnica				Crni godži			
	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC (g QUE kg <sup>-1</sup> )	TAC (g cyd-3-glu kg <sup>-1</sup> )	RSA (mol TE kg <sup>-1</sup> )	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC (g QUE kg <sup>-1</sup> )	TAC (g cyd-3-glu kg <sup>-1</sup> )	RSA (mol TE kg <sup>-1</sup> )	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC (g QUE kg <sup>-1</sup> )	TAC (g cyd-3-glu kg <sup>-1</sup> )	RSA (mol TE kg <sup>-1</sup> )
E20	12,2 ± 0,9	17 ± 2	0,09 ± 0,02	55 ± 4	11,7 ± 0,9	6,7 ± 0,9	0,31 ± 0,08	45 ± 3	34 ± 3	19 ± 3	2,6 ± 0,7	116 ± 7
E21	35 ± 3	50 ± 7	0,7 ± 0,2	139 ± 9	14 ± 1	6,9 ± 0,9	0,4 ± 0,1	38 ± 2	40 ± 3	27 ± 4	3,2 ± 0,8	127 ± 8
E22	8,2 ± 0,6	27 ± 4	0,04 ± 0,01	48 ± 3	6,5 ± 0,5	2,2 ± 0,3	0,05 ± 0,01	44 ± 3	18 ± 1	21 ± 3	0,30 ± 0,08	51 ± 3
E23	13 ± 1	19 ± 3	0,05 ± 0,01	64 ± 4	7,5 ± 0,5	6,3 ± 0,8	0,07 ± 0,02	36 ± 2	15 ± 1	11 ± 1	0,4 ± 0,1	47 ± 3
E24	16 ± 1	24 ± 3	0,11 ± 0,03	107 ± 7	4,0 ± 0,3	1,9 ± 0,3	0,02 ± 0,01	16 ± 1	11,7 ± 0,9	2,2 ± 0,3	0,10 ± 0,02	42 ± 3
E25	33 ± 2	44 ± 6	0,25 ± 0,06	146 ± 9	14 ± 1	24 ± 3	0,9 ± 0,2	50 ± 3	33 ± 2	20 ± 3	2,1 ± 0,6	117 ± 7
E26	18 ± 1	27 ± 4	1,6 ± 0,4	117 ± 7	9,4 ± 0,7	9 ± 1	0,9 ± 0,2	42 ± 3	29 ± 2	17 ± 2	2,0 ± 0,5	127 ± 8
E27	15 ± 1	20 ± 3	1,2 ± 0,3	110 ± 7	8,6 ± 0,6	16 ± 2	0,9 ± 0,2	39 ± 3	25 ± 2	9 ± 1	2,6 ± 0,7	115 ± 7
E28	15 ± 1	0,13 ± 0,02	0,5 ± 0,1	34 ± 2	12,1 ± 0,9	8 ± 1	0,30 ± 0,08	32 ± 2	22 ± 2	6 ± 1	0,8 ± 0,2	89 ± 6
E29	15 ± 1	7 ± 1	1,3 ± 0,3	48 ± 3	11,7 ± 0,9	3,0 ± 0,4	0,8 ± 0,2	34 ± 2	26 ± 2	4,4 ± 0,6	1,0 ± 0,3	95 ± 6
E30	8,1 ± 0,6	20 ± 3	0,08 ± 0,02	56 ± 4	3,2 ± 0,2	2,1 ± 0,3	0,03 ± 0,01	22 ± 1	14 ± 1	1,9 ± 0,3	0,06 ± 0,01	49 ± 3
E31	11,0 ± 0,8	18 ± 2	0,13 ± 0,03	55 ± 4	7,1 ± 0,5	4,5 ± 0,6	0,09 ± 0,02	42 ± 3	20 ± 2	8 ± 1	1,0 ± 0,3	102 ± 6
E32	11,3 ± 0,8	18 ± 2	0,09 ± 0,02	59 ± 4	2,8 ± 0,2	12 ± 2	0,03 ± 0,01	19 ± 1	16 ± 1	3,0 ± 0,4	0,14 ± 0,04	47 ± 3
E33	15 ± 1	21 ± 3	0,16 ± 0,04	124 ± 8	7,1 ± 0,5	10 ± 1	0,14 ± 0,04	32 ± 2	27 ± 2	3,5 ± 0,5	1,3 ± 0,3	97 ± 6
E34	15 ± 1	22 ± 3	0,13 ± 0,03	111 ± 7	10,4 ± 0,8	10 ± 1	0,22 ± 0,06	46 ± 3	25 ± 2	18 ± 2	1,7 ± 0,4	90 ± 6
E35	12,2 ± 0,9	23 ± 3	0,11 ± 0,03	63 ± 4	7,9 ± 0,6	8 ± 1	0,10 ± 0,03	43 ± 3	20 ± 2	6 ± 1	0,37 ± 0,09	94 ± 6
E36	15 ± 1	8 ± 1	0,02 ± 0,01	47 ± 3	12,0 ± 0,9	11 ± 2	0,07 ± 0,02	40 ± 3	24 ± 2	3,8 ± 0,5	0,20 ± 0,05	96 ± 6
K1	19 ± 1	26 ± 4	0,10 ± 0,02	116 ± 7	9,7 ± 0,7	10 ± 1	0,15 ± 0,04	48 ± 3	23 ± 2	2,9 ± 0,4	0,20 ± 0,05	99 ± 6
K2	30 ± 2	54 ± 7	0,20 ± 0,05	160 ± 10	10,5 ± 0,8	8 ± 1	0,08 ± 0,02	45 ± 3	40 ± 3	26 ± 4	1,7 ± 0,4	142 ± 9

Vrednosti TPC u eutektičkim ekstraktima aronije su se kretale u rasponu od 8,1 do 34,9 g GAE kg<sup>-1</sup> i najvišu vrednost je pokazao ekstrakt E21, koji je dobijen primenom eutektičke smeše L–prolina i glicerola u molskom odnosu 5:2. Vrednosti TFC su se kretala u rasponu od 0,1 do 64,8 g QUE kg<sup>-1</sup>, a najvišu vrednost je pokazao ekstrakt E14, koji je dobijen primenom eutektičke smeše holin–hlorida i uree u molskom odnosu 1:1. TAC vrednosti su se kretale u rasponu od 0,02 do 4,84 g cyd–3–glu kg<sup>-1</sup> i ekstrakt E5, dobijen primenom eutektičke smeše holin–hlorida i jabučne kiseline u molskom odnosu 1:1, imao je najvišu vrednost. Antioksidativna aktivnost izražena kao RSA vrednost bila je u rasponu od 33,9 do 62,6 mol TE kg<sup>-1</sup> i najveću vrednost RSA imao je ekstrakt E12, dobijen primenom eutektičke smeše holin–hlorida i glicerola u molskom odnosu 1:2. Visoka vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije uočena je između RSA i TPC vrednosti ( $r = 0,8157$ ), kao i između RSA i TFC vrednosti ( $r = 0,8119$ ), dok je između RSA i TAC vrednosti znatno niža ( $r = 0,4236$ ), što implicira da su fenolna jedinjenja, posebno flavonoidi, glavna jedinjenja odgovorna za antioksidativnu aktivnost ovih ekstrakata.

Eutektički ekstrakti borovnice su imali niže vrednosti TPC, TFC, TAC i RSA u poređenju sa druge dve vrste ispitivanog bobičastog voća i kretale su se u rasponu od 2,8 do 17,2 g GAE kg<sup>-1</sup>, od 1,9 do 26,3 g QUE kg<sup>-1</sup>, od 0,02 do 2,62 g cyd–3–glu kg<sup>-1</sup> i od 15,6 do 70,9 mol TE kg<sup>-1</sup>, redom. Ekstrakt E5, dobijen primenom eutektičke smeše holin–hlorida i jabučne kiseline u molskom odnosu 1:1, je pokazao najviše TFC i TAC vrednosti. Ekstrakt E17, dobijen primenom eutektičke smeše uree i glicerola u molskom odnosu 1:2, je pokazao najvišu TPC vrednost. Najvišu vrednost RSA imao je ekstrakt E12 koji je dobijen primenom eutektičke smeše holin–hlorida i glicerola u molskom odnosu 1:2. Visoka vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije uočena je između vrednosti RSA i TPC ( $r = 0,8119$ ), dok je između vrednosti RSA i TFC ( $r = 0,6789$ ) i vrednosti RSA i TAC ( $r = 0,5538$ ) bila niža, što ukazuje da su ukupna fenolna jedinjenja odgovorna za antioksidativnu aktivnost ovih ekstrakata, odnosno da na pomenutu aktivnost najveći uticaj imaju fenolne kiseline i druge klase fenolnih jedinjenja, osim flavonoida.

Eutektički ekstrakti crnog godžija su imali vrednosti TPC, TFC, TAC i RSA u rasponu od 11,7 do 41,8 g kg<sup>-1</sup>, od 1,9 do 45,4 g QUE kg<sup>-1</sup>, od 0,06 do 4,98 g cyd–3–glu kg<sup>-1</sup> i od 42,0 do 143,1 mmol TE kg<sup>-1</sup>, redom. Ekstrakt E11, dobijen primenom eutektičke smeše holin–hlorida i glicerola u molskom odnosu 1:1, je pokazao najviše TPC i TFC vrednosti. Najviše TAC i RSA vrednosti su izmerene u ekstraktu E5, koji je dobijen primenom eutektičke smeše holin–hlorida i jabučne kiseline u molskom odnosu 1:1. Visoka vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije zabeležena je između vrednosti RSA i TPC ( $r = 0,8244$ ), dok je između vrednosti RSA i TFC ili RSA i TAC bila niža ( $r = 0,5806$  i  $r = 0,6730$ , redom).

Rezultati TPC eseja su pokazali da su eutektičke smeše sa glicerolom kao HBD komponentom (urea: glicerol 1:2  $n/n$  i 1:3, holin–hlorid: glicerol 1:1 i 1:2,  $n/n$ , L–prolin: glicerol 5:2,  $n/n$ ) najbolji rastvarači za ekstrakciju fenolnih jedinjenja. U slučaju holin–hloridnih eutektičkih smeša najnižu viskoznost imaju smeše sa etilen glikolom i glicerolom kao HBD–om, dok je viskoznost najviša sa šećernim alkoholima i karboksilnim kiselinama.<sup>154</sup> Niža viskoznost eutektičkih smeša na bazi glicerola može doprineti njihovoj većoj efikasnosti kao rastvarača za ekstrakciju, a samim tim i višim TPC vrednostima. Najviše TFC vrednosti su imali ekstrakti (E5, E11, E14, E15) koji su dobijeni primenom eutektičkih smeša holin–hlorid: jabučna kiselina 1:1 ( $n/n$ ), holin–hlorid: urea 1:1 i 1:2 ( $n/n$ ) i holin–hlorid: glicerol 1:1 ( $n/n$ ), što je u skladu sa rezultatima dobijenim za lekovito bilje. COSMO–RS studija urađena za predviđanje efikasnosti ekstrakcije fenolnih jedinjenja prisutnih u petrovcu primenom eutektičkih smeša, opisana u odeljku 4.1.2.5., pokazala je sličnost u polarnosti između eutektičkih smeša sa glicerolom i određenih flavonoida. Rezultati teorijske studije predviđaju visoku rastvorljivost kvercitrina i izokvercetrina u smeši holin–hlorid: glicerol 1:1 ( $n/n$ ), što može objasniti rezultate TFC eseja za eutektičke ekstrakte bobičastog voća. Ukupan sadržaj antocijana je bio viši u ekstraktima E1–E14 koji su dobijeni holin–hloridnim eutektičkim smešama u poređenju sa ekstraktima E19–E34 dobijenim aminokiselinskim smešama. U obe navedene grupe ekstrakata su uočene varijacije u TAC vrednostima koje je uslovlila HBD komponenta i ekstrakti kod kojih su

glicerol, mlečna i jabučna kiselina bile HBD, su pokazali visoke vrednosti. Kao najbolji rastvarač za ekstrakciju antocijana pokazala se eutektička smeša E5, pripremljena od holin–hlorida i jabučne kiseline u molskom odnosu 1:1. Eutektički sistemi koji sadrže neku organsku kiselinu pokazuju veću efikasnost ekstrakcije antocijana u poređenju sa sistemima na bazi šećera ili polihidroksilnih alkohola, zbog nižih pH vrednosti.<sup>155</sup> Antocijani su visoko polarna jedinjenja, čija hemijska struktura i stabilnost zavisi od pH vrednosti i pretežno se nalaze u obliku flavilijum jona, koji je stabilan na pH < 2. Visoka TAC vrednost u ekstraktima dobijenim sa kiselim eutektičkim smešama je samim tim očekivana. Nekoliko studija<sup>156,157</sup> je potvrdilo da su eutektički rastvarači u kojima je jabučna kiselina korišćena kao HBD najbolji za ekstrakciju antocijana, dok su druge studije sugerisale da su eutektici sa oksalnom<sup>158</sup> ili limunskom kiselinom bolji.<sup>159</sup> Dobra ekstrakcija antocijana sa eutektičkim smešama koje su sadržale glicerol kao HBD može biti posledica niže viskoznosti ovih smeša. Uporedni *t*-test primenjen na rezultate spektrofotometrijskih eseja (Tabela P 5.) je pokazao da nema statistički značajne razlike u rezultatima dobijenim primenom eutektičkih rastvarača i zakiseljene vode, što ukazuje na jednaku efikasnost ekstrakcije. Međutim, statistički značajno viši sadržaj antocijana u eutektičkim ekstraktima u odnosu na one dobijene primenom zakiseljenog metanola u slučaju ekstrakata crnog godžija (E15, E20 i E21), ukazuju da su eutektičke smeše holin–hlorid: urea 1:2 (*n/n*), L–prolin: glicerol 1:2 i 5:2 (*n/n*) efikasniji mediji za ekstrakciju u odnosu na organski rastvarač. Rezultati spektrofotometrijskih eseja su u skladu sa rezultatima HPTLC–a i potvrđuju da sastav eutektičke smeša i odnos njenih komponenta utiču na efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja.

Za preliminarnu procenu efikasnosti ekstrakcije eutektičkim smešama korišćena su dva pristupa. Prvi pristup je obuhvatio hromatografsko profilisanje u kombinaciji sa hemometrijskom obradom i omogućio je diferencijaciju ekstrakata u zavisnosti od primenjenih eutektičkih smeša. Drugi pristup je obuhvatio spektrofotometrijske eseje i proveru statističke značajnosti efikasnosti ekstrakcije eutektičkih smeša u odnosu na konvencionalne rastvarače i pokazao koja se eutektička smeša pokazala kao najbolja za ekstrakciju određene grupe fenolnih jedinjenja. Oba pristupa su se pokazala korisna i uzimajući u obzir dobijene rezultate izabrano je pet eutektičkih smeša i jedan konvencionalni rastvarač za dalju analizu i detaljniju procenu uticaja sastava eutektičke smeše na ekstrakciju. Dalja analiza je obuhvatila određivanje HPTLC profila antioksidativne aktivnosti, UHPLC analizu fenolnih jedinjenja, određivanje antimikrobne aktivnosti difuzionom i dilucionom metodom i direktnu bioautografiju. Za dalju analizu je izabrano je od svake vrste bobičastog voća po pet eutektičkih ekstrakata, kao i konvencionalni ekstrakt koji je dobijen primenom zakiseljenog metanola (Tabela 23.).

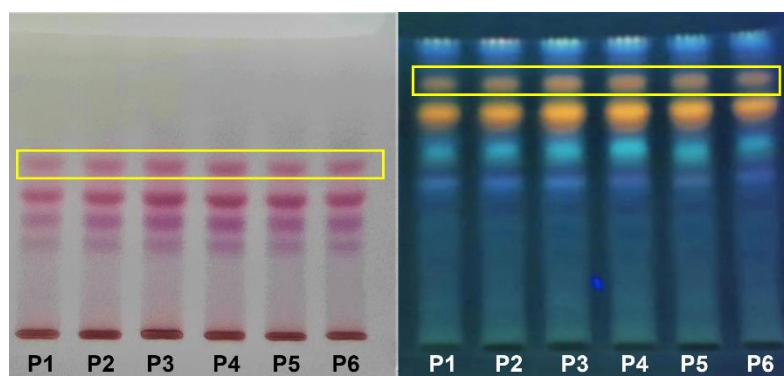
Tabela 23. Odabrani eutektički ekstrakti bobičastog voća za dalju analizu.

Ekstrakti	Sastav primenjene eutektičke smeše	Kriterijum za odabir
<b>Aronija</b>		
E5	holin–hlorid: jabučna kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	najviša TAC vrednost
E12	holin–hlorid: glicerol 1:2 ( <i>n/n</i> )	najviša RSA vrednost
E14	holin–hlorid: urea 1:1 ( <i>n/n</i> )	najviša TFC vrednost
E21	L–prolin: glicerol 5:2 ( <i>n/n</i> )	najviša TPC vrednost
E8	holin–hlorid: mlečna kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	Pripada mlečnokiselinskoj grupi ekstrakta, koja se izdvojila na osnovu izgleda HPTLC profila
<b>Borovnica</b>		
E5	holin–hlorid: jabučna kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	najviše TAC i TFC vrednosti
E12	holin–hlorid: glicerol 1:2 ( <i>n/n</i> )	najviša RSA vrednost
E17	urea: glicerol 1:2 ( <i>n/n</i> )	najviša TPC vrednost
E29	L–lizin: mlečna kiselina 1:3 ( <i>n/n</i> )	Pripada aminokiselinskoj grupi ekstrakta koja se izdvojila na osnovu izgleda HPTLC profila
E25	L–prolin: urea 1:1( <i>n/n</i> )	Pripada aminokiselinskoj grupi ekstrakta, koja se izdvojila na osnovu izgleda HPTLC profila
<b>Crni godži</b>		
E5	holin–hlorid: jabučna kiselina 1:1 ( <i>n/n</i> )	najviše TAC i RSA vrednosti
E11	holin–hlorid: glicerol 1:1 ( <i>n/n</i> )	najviše TPC i TFC vrednosti
E15	holin–hlorid: urea 1:2 ( <i>n/n</i> )	visoka TAC vrednost
E21	L–prolin: glicerol 5:2 ( <i>n/n</i> )	Pripada aminokiselinskoj grupi ekstrakta, koja se izdvojila na osnovu izgleda HPTLC profila
E34	natrijum–acetat: mlečna kiselina 1:3 ( <i>n/n</i> )	Pripada mlečnokiselinskoj grupi ekstrakta, koja se izdvojila na osnovu izgleda HPTLC profila

Kako bi se procenila ponovljivost ekstrakcije primenom eutektičkih smeša urađena je ekstrakcija uzorka borovnice u šest ponavljanja sa smešom holin–hlorida i jabučne kiseline u molskom odnosu 1:1. Procena ponovljivosti ekstrakcije je izvršena određivanjem HPTLC profila fenolnih jedinjenja i primenom spektrofotometrijskih eseja. Na dobijenim hromatogramima su izabrane dve zone fenolnih jedinjenja: narandžasta zona flavonoida pod UV svetlošću i crvena zona antocijana pod vidljivom svetlošću (Slika 34.). Izmerena je površina ispod odabranih pikova pomoću ImageJ programa za obradu slika i izračunati su parametri deskriptivne statistike (Tabela 24.). Dobijene su niske relativne standardne devijacije za površine ispod pikova, kao i za TPC, TFC, TAC i RSA vrednosti što potvrđuje ponovljivost postupka ekstrakcije primenom eutektičkih smeša.

Tabela 24. Rezultati spektrofotometrijskih eseja za šest ponovljenih ekstrakcija primenom eutektičke smeše holin–hlorid: jabučna kiselina 1:1 (*n/n*) na uzorku borovnice (ekstrakti P1–P6).

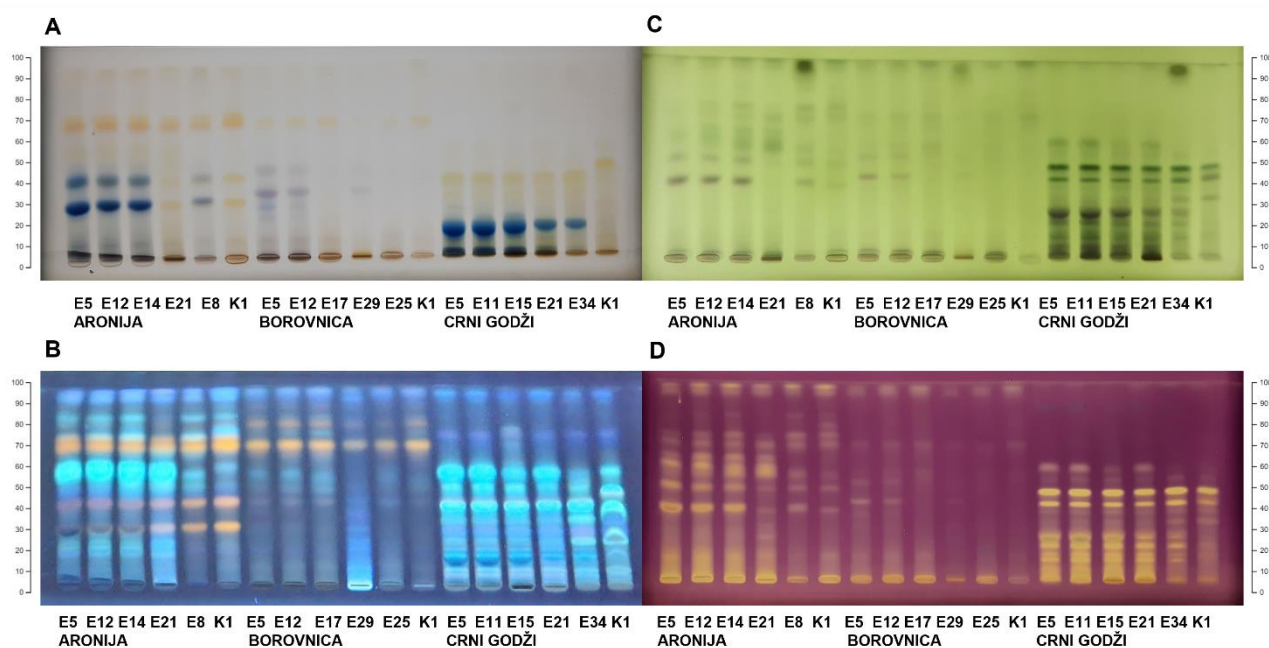
Ponovljena ekstrakcija	TPC (g GAE kg <sup>-1</sup> )	TFC (g QUE kg <sup>-1</sup> )	RSA (mol TE kg <sup>-1</sup> )	TAC (g cyd–3–glu kg <sup>-1</sup> )	Antocijani Površina ispod pika	Flavonoidi Površina ispod pika
P1	13,1	19,9	65,9	0,271	2817	21724
P2	13,9	22,7	61,5	0,287	3368	25499
P3	12,9	19,8	61,2	0,273	2801	24529
P4	12,7	22,4	60,4	0,247	2576	23262
P5	14,0	27,5	64,6	0,308	3503	25061
P6	15,4	20,2	71,1	0,466	4206	29821
$\bar{x}$	13,7	22,1	64,1	0,309	3212	24983
$\sigma$	1,0	2,9	4,1	0,080	604	2738
RSD	7,3%	13,3%	6,3%	25,8%	18,8%	11,0%


 Slika 34. HPTLC profili ekstrakata borovnice za šest ponovljenih ekstrakcija primenom eutektičke smeše holin–hlorid: jabučna kiselina 1:1 (*n/n*) (ekstrakt P1–P6), pod vidljivim i ultraljubičastim svetlom. Površine ispod zona označenih žutim kvadratom korišćene su za određivanje ponovljivosti.

#### 4.3.4. HPTLC profili antioksidativne aktivnosti

Rezultati spektrofotometrijskih eseja su pokazali da su eutektički ekstrakti bobičastog voća bogati fenolnim jedinjenjima i da imaju izraženu antioksidativnu aktivnost, zbog čega su odabrani ekstrakti dalje analizirani primenom HPTLC–FC i HPTLC–DPPH eseja. Kombinovanje antioksidativnih eseja i visoko–efikasne tankoslojne hromatografije omogućava identifikaciju pojedinačnih jedinjenja koja imaju antioksidativnu aktivnost, što predstavlja prednost u odnosu na spektrofotometrijske eseje koji pružaju informaciju o ukupnoj aktivnosti ekstrakta.<sup>160</sup> HPTLC–FC esej omogućava vizualizaciju fenolnih jedinjenja sa izraženom aktivnošću koje se pojavljuju kao plave zona na žutoj pozadini (Slika 35. C), dok se pomoću HPTLC–DPPH eseja ova jedinjenja mogu uočiti kao žute zone na ljubičastoj pozadini (Slika 35.D). Eutektički ekstrakti aronije su pokazali profile koji su bogati zonama sa antioksidativnom aktivnošću na  $hR_F$  vrednostima između 35 i 80. Eutektički ekstrakti borovnice pokazali su profile antioksidativne aktivnosti sa manjim brojem zona, što je u skladu sa profilima fenolnih jedinjenja i rezultatima spektrofotometrijskih eseja. Eutektički ekstrakti crnog godžija su pokazali profile bogate zonama sa antioksidativnom aktivnošću na nižim  $hR_F$  vrednostima. Vizuelnim poređenjem hromatograma dobijenih primenom dva antioksidativna eseja može se uočiti da je HPTLC–DPPH esej pokazao veći broj aktivnih zona što ukazuje na veću osetljivost ovog eseja i mogućnost detekcije šireg spektra jedinjenja. Međutim, hromatogrami dobijeni primenom HPTLC–FC eseja su otkrili prisustvo zone na  $hR_F$  vrednosti 97, koja je prisutna samo u ekstraktima dobijenim primenom eutektičkih smeša koje su sadržale mlečnu kiselinu (ekstrakti aronije E8, borovnice E29 i

crnog godžija E34). Prisustvo ove zone potvrđuje dominantnu ulogu mlečne kiseline na efikasnost ekstrakcije i sastav ekstrahovanih jedinjenja i u skladu je sa rezultatima HPTLC profilisanja.



Slika 35. HPTLC profili odabranih eutektičkih i metanolnog ekstrakta: A) profili fenolnih jedinjenja pod vidljivom svetlošću; B) profili fenolnih jedinjenja pod ultraljubičastom svetlošću; C) HPTLC–FC esej; D) HPTLC–DPPH esej.

#### 4.3.5. UHPLC analiza fenolnih jedinjenja

Primenom ultra–efikasne tečne hromatografije (UHPLC–DAD–MS/MS) određeno je i kvantifikovano ukupno 28 fenolnih jedinjenja u odabranim eutektičkim ekstraktima bobičastog voća (Tabela 25. i Slika 36.).

Najzastupljenija fenolna jedinjenja u eutektičkim ekstraktima aronije bila su hlorogena kiselina, cijanidin–3–O–glukozid i cijanidin–3–O–arabinozid. Eutektičke smeše holin–hlorid: glicerol 1:2 (*n/n*), holin–hlorid: urea 1:1 (*n/n*) i L–prolin: glicerol 5:2 (*n/n*) (ekstrakti E12, E14 i E21) ekstrahovale su hlorogenu kiselinu u količini oko dva puta većoj u poređenju sa metanolom. Eutektička smeša holin–hlorid: jabučna kiselina 1:1 (*n/n*) (ekstrakt E5) ekstrahovala je cijanidin–3–O–glukozid i cijanidin–3–O–arabinozid oko deset puta više u poređenju sa metanolom, što je u skladu sa rezultatima TAC esej. Navedena smeša se takođe pokazala kao odličan medijum za ciljanu ekstrakciju kempferol–3–O–glukozida i izoramnetina. Eutektička smeša L–prolin: glicerol 5:2 (*n/n*) (ekstrakt E21) ekstrahovala je flavonoid kvercetin dvadeset dva puta više u poređenju sa metanolom.

Najzastupljenija fenolna jedinjenja u eutektičkim ekstraktima borovnice su malvidin–3–O–glukozid, delfidin–3–O–glukozid i hlorogena kiselina. Eutektička smeša urea: glicerol 1:2 (*n/n*) (ekstrakt E17) se pokazala kao najbolji rastvarač za ekstrakciju nekoliko fenolnih jedinjenja (hlorogena kiselina, rutin, hiperozid, epikatehin, naringin i kempferol–3–O–glukozid) što je u skladu sa rezultatima spektrofotometrijskih esej. Ekstrakt E17 sadrži hlorogenu kiselinu u tri puta većim koncentracijama u poređenju sa metanolnim ekstraktom, dok naringin sadrži dva puta više. Eutektička smeša holin–hlorid : glicerol 1:2 (*n/n*) (ekstrakt E12) je ekstrahovala veće količine galne kiseline, kvercetina i miricetina u poređenju sa konvencionalnim rastvaračem. Za ekstrakciju antocijana iz borovnice najefikasnija se pokazala eutektička smeša holin–hlorid: jabučna kiselina 1:1 (*n/n*) (ekstrakt E5), jer je ekstrahovala delfidin–3–O–glukozid, malvidin–3,5–di–O–glukozid i malvidin–3–O–glukozid u većim prinosima u poređenju sa metanolom, što potvrđuje rezultate spektrofotometrijskih esej.

Najzastupljenija fenolna jedinjenja u eutektičkim ekstraktima crnog godžija bila su hlorogena kiselina, rutin i delfidin-3-O-glukozid. Eutektička smeša holin-hlorid: urea 1:2 (*n/n*) (ekstrakt E15) je bila odličan medijum za ekstrakciju većine proučavanih jedinjenja, a posebno za kvercetin, hiperozid, naringin i delfidin-3-O-glukozid, sa četiri do sedam puta većim prinosom ekstrakcije u poređenju sa metanolom. Eutektička smeša holin-hlorid: glicerol 1:1 (*n/n*) (ekstrakt E11) se pokazala kao odličan rastvarač za ciljanu ekstrakciju *p*-kumarinske kiseline i epikatehina, a smeša L-prolin: glicerol 5:2 (*n/n*) (ekstrakt E21) je ciljano ekstrahovala galnu kiselinu u poređenju sa metanolom i drugim eutektičkim rastvaračima.

Sadržaj fenolnih jedinjenja u eutektičkim ekstraktima (za svaki primenjeni sistem pojedinačno) i metanolnom ekstraktu upoređen je uporednim *t*-testom (Tabela P 6.). Statistički značajno veći sadržaj ovih jedinjenja zabeležen je u slučaju ekstrakta borovnice, što smešu urea: glicerol 1:2 (*n/n*) čini efikasnijim rastvaračima za ekstrakciju fenolnih jedinjenja u odnosu na metanol. U ostalim slučajevima nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u sadržaju fenolnih jedinjenja u eutektičkom i metanolnom ekstraktu što ukazuje na jednaku efikasnost ekstrakcije. Navedeni rezultati potvrđuju mogućnost korišćenja eutektičkih smeša za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz bobičastog voća, što im usled njihove ekološke prihvatljivosti daje veliku prednost u odnosu na konvencionalne rastvarače.

Slika 36. Toplotna mapa sadržaja fenolnih jedinjenja u odabranim ekstraktima bobičastog voća: A) aronija; B) borovnica; C) crni godži.

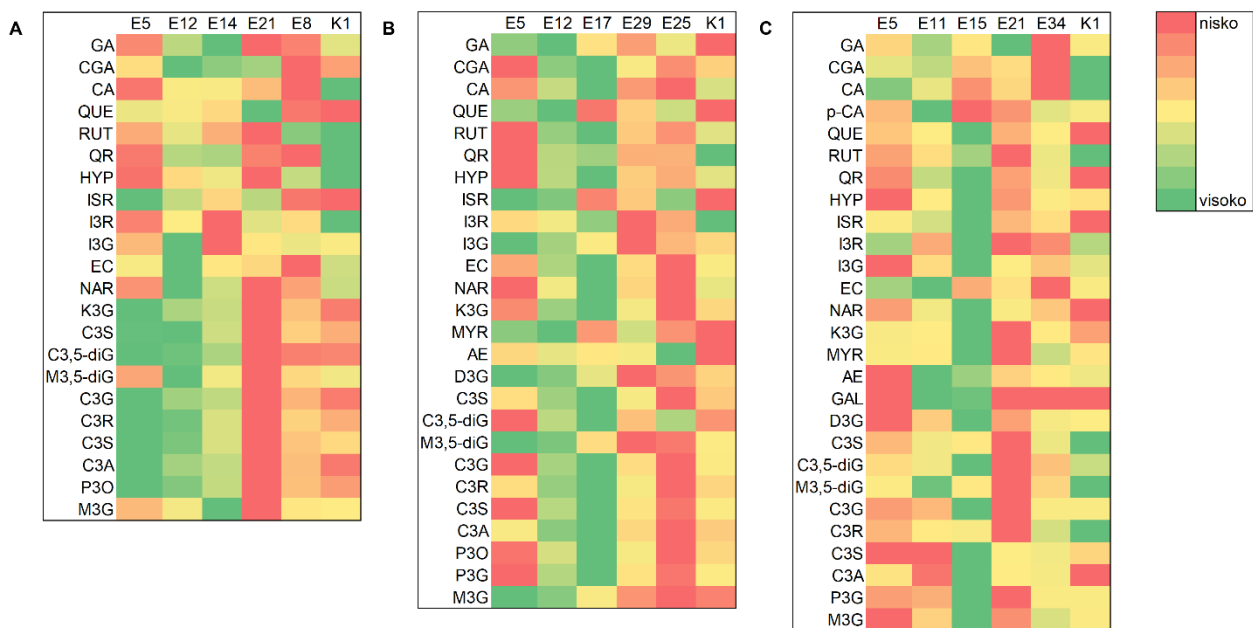


Tabela 25. Sadržaj fenolnih jedinjenja u odabranim ekstraktima bobičastog voća.

Ekstrakti	Fenolna jedinjenja (mg kg <sup>-1</sup> )							
	GA	CGA	CA	PCA	QUE	RUT	QR	HYP
Aronija								
E5	0,28 ± 0,02	871 ± 5	3,2 ± 0,4	–	35 ± 7	187 ± 9	0,22 ± 0,03	96 ± 3
E12	1,3 ± 0,3	1055 ± 7	8,3 ± 0,6	–	29 ± 4	200 ± 5	0,32 ± 0,04	115 ± 2
E14	2,2 ± 0,1	1023 ± 8	8,5 ± 0,7	–	23 ± 3	188 ± 6	0,32 ± 0,02	122 ± 7
E21	0,18 ± 0,02	1008 ± 9	5,4 ± 0,3	–	92 ± 2	181 ± 3	0,22 ± 0,02	94 ± 4
E8	0,26 ± 0,04	265 ± 2	2,8 ± 0,3	–	6,7 ± 0,3	223 ± 2	0,21 ± 0,02	130 ± 5
K1	0,9 ± 0,1	557 ± 4	42 ± 2	–	4,1 ± 0,3	232 ± 7	0,37 ± 0,03	149 ± 6
Borovnica								
E5	20 ± 7	41 ± 2	4,3 ± 0,1	–	53 ± 3	12 ± 4	0,14 ± 0,02	24 ± 2
E12	22 ± 2	159 ± 7	6,4 ± 0,8	–	61 ± 6	50 ± 7	0,38 ± 0,06	42 ± 8
E17	15 ± 4	191 ± 5	8,5 ± 0,3	–	7,4 ± 0,2	58 ± 2	0,41 ± 0,03	49 ± 6
E29	10 ± 8	77 ± 3	4,3 ± 0,7	–	31 ± 9	28 ± 9	0,23 ± 0,08	33 ± 5
E25	17 ± 6	50 ± 9	3,8 ± 0,2	–	46 ± 8	19 ± 5	0,24 ± 0,05	30 ± 3
K1	6,4 ± 0,3	65 ± 4	6,1 ± 0,6	–	3,5 ± 7	38 ± 8	0,47 ± 0,01	38 ± 9
Crni godži								
E5	1,0 ± 0,7	496 ± 6	10 ± 1	31 ± 9	1,8 ± 0,9	162 ± 5	0,09 ± 0,07	3,9 ± 0,5
E11	1,8 ± 0,4	551 ± 8	7,8 ± 0,9	72 ± 7	2,1 ± 0,4	179 ± 6	0,20 ± 0,02	5,1 ± 0,3
E15	1,1 ± 0,8	345 ± 1	5,0 ± 0,3	28 ± 2	11 ± 1	200 ± 7	0,33 ± 0,09	25 ± 1
E21	2,3 ± 0,5	419 ± 5	6,8 ± 0,8	30 ± 8	1,7 ± 0,7	147 ± 7	0,09 ± 0,04	4,4 ± 0,1
E34	–	107 ± 3	4,0 ± 0,4	41 ± 5	2,1 ± 0,6	186 ± 9	0,14 ± 0,08	5,6 ± 0,8
K1	1,2 ± 0,6	686 ± 9	11 ± 2	36 ± 4	1,4 ± 0,8	212 ± 9	0,08 ± 0,03	5,0 ± 0,7

– Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za: GA 0,09 mg L<sup>-1</sup>, PCA 0,10 mg L<sup>-1</sup>.

Tabela 25. Nastavak

Ekstrakti	Fenolna jedinjenja (mg kg <sup>-1</sup> )								
	ISR	I3R	I3G	EC	NAR	K3G	MYR	AE	GAL
Aronija									
E5	2,0 ± 0,2	5,9 ± 0,4	2,7 ± 0,6	33 ± 3	20 ± 4	105 ± 5	–	–	–
E12	1,7 ± 0,3	6,1 ± 0,3	3,2 ± 0,3	39 ± 3	84 ± 7	84 ± 5	–	–	–
E14	1,2 ± 0,3	5,8 ± 0,8	2,4 ± 0,8	33 ± 2	53 ± 2	76 ± 7	–	–	–
E21	1,7 ± 0,2	6,3 ± 0,5	2,8 ± 0,1	31 ± 3	11 ± 3	9 ± 2	–	–	–
E8	0,34 ± 0,02	6,0 ± 0,5	2,9 ± 0,5	22 ± 3	23 ± 6	44 ± 2	–	–	–
K1	0,21 ± 0,04	7,5 ± 0,9	2,8 ± 0,9	35 ± 3	54 ± 5	17 ± 3	–	–	–
Borovnica									
E5	32 ± 7	3,7 ± 0,2	19 ± 2	4,9 ± 0,2	–	3,1 ± 0,4	26 ± 4	2,5 ± 0,2	–
E12	31 ± 8	3,9 ± 0,7	14,2 ± 0,8	8,7 ± 0,5	15 ± 6	9,4 ± 0,9	30 ± 8	3,3 ± 0,7	–
E17	6,8 ± 0,9	4,5 ± 0,5	8,1 ± 0,6	12 ± 1	40 ± 1	11,6 ± 0,1	9 ± 2	2,9 ± 0,5	–
E29	19 ± 4	3,2 ± 0,8	5,5 ± 0,5	5,4 ± 0,4	11 ± 4	5,9 ± 0,3	18 ± 3	3,1 ± 0,8	–
E25	30 ± 6	3,5 ± 0,3	6,9 ± 0,9	4,1 ± 0,3	–	2,2 ± 0,7	8 ± 2	4,4 ± 0,3	–
K1	2,0 ± 0,4	4,7 ± 0,6	7,4 ± 0,1	5,8 ± 0,8	17 ± 2	5,0 ± 0,2	6 ± 1	–	–
Crni godži									
E5	2,4 ± 0,3	8,8 ± 0,4	0,51 ± 0,03	205 ± 6	14 ± 5	3,3 ± 0,8	2,8 ± 0,8	–	–
E11	3,3 ± 0,8	7,7 ± 0,1	0,64 ± 0,07	246 ± 5	19 ± 9	3,1 ± 0,5	2,7 ± 0,7	3,8 ± 0,4	2,1 ± 0,6
E15	5,8 ± 0,5	9,2 ± 0,8	2,2 ± 0,1	120 ± 9	50 ± 3	7,9 ± 0,4	3,7 ± 0,2	3,7 ± 0,1	1,9 ± 0,7
E21	1,9 ± 0,7	7,2 ± 0,3	0,68 ± 0,05	144 ± 1	17 ± 8	2,3 ± 0,6	–	2,7 ± 0,8	–
E34	2,2 ± 0,2	7,5 ± 0,7	0,62 ± 0,09	89 ± 4	15 ± 6	3,1 ± 0,9	3,1 ± 0,4	3,3 ± 0,3	–
K1	1,3 ± 0,6	8,7 ± 0,6	0,92 ± 0,02	152 ± 3	12 ± 1	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,5	3,4 ± 0,7	–

– Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za: NAR 0,08 mg L<sup>-1</sup>, MYR 0,06 mg L<sup>-1</sup>, AE 0,01 mg L<sup>-1</sup>, GAL 0,01 mg L<sup>-1</sup>.

Tabela 25. Nastavak

Ekstrakti	Antocijani (mg kg <sup>-1</sup> )										
	D3G	C3S	C3,5–diG	M3,5–diG	C3G	C3R	C3S	C3A	P3O	P3G	M3G
Aronija											
E5	–	9,3 ± 0,2	25 ± 4	0,37 ± 0,03	1390 ± 7	9,3 ± 0,8	43 ± 5	2375 ± 9	6,3 ± 0,2	–	0,38 ± 0,02
E12	–	9,3 ± 0,7	25 ± 3	0,88 ± 0,08	1123 ± 3	9,0 ± 0,4	42 ± 1	1942 ± 5	5,8 ± 0,4	–	0,65 ± 0,08
E14	–	7,4 ± 0,5	20 ± 2	0,52 ± 0,06	993 ± 8	7,1 ± 0,6	39 ± 8	1734 ± 1	4,7 ± 0,8	–	2,5 ± 0,4
E21	–	2,5 ± 0,9	7,0 ± 0,4	0,25 ± 0,04	57 ± 2	2,4 ± 0,3	26 ± 7	68 ± 8	0,76 ± 0,06	–	0,21 ± 0,06
E8	–	5,7 ± 0,3	8,3 ± 0,6	0,46 ± 0,09	440 ± 6	5,6 ± 0,9	34 ± 4	905 ± 7	2,8 ± 0,7	–	0,48 ± 0,07
K1	–	4,7 ± 0,8	8,7 ± 0,3	0,53 ± 0,05	157 ± 4	4,5 ± 0,5	36 ± 2	235 ± 2	1,9 ± 0,2	–	0,49 ± 0,03
Borovnica											
E5	743 ± 9	0,68 ± 0,06	0,71 ± 0,04	19 ± 4	18 ± 3	0,64 ± 0,08	0,36 ± 0,07	54 ± 4	0,20 ± 0,01	16 ± 2	917 ± 3
E12	680 ± 9	1,3 ± 0,4	2,6 ± 0,5	16,7 ± 0,6	74 ± 7	1,2 ± 0,2	3,5 ± 0,4	121 ± 9	0,65 ± 0,08	63 ± 1	730 ± 7
E17	501 ± 7	1,6 ± 0,2	3,1 ± 0,7	4,6 ± 0,1	103 ± 8	1,5 ± 0,4	5,2 ± 0,1	145 ± 3	1,2 ± 0,5	94 ± 7	131 ± 5
E29	198 ± 2	0,79 ± 0,09	1,6 ± 0,2	2,4 ± 0,8	34 ± 4	0,73 ± 0,07	2,0 ± 0,8	45 ± 5	0,50 ± 0,06	34 ± 3	46 ± 8
E25	286 ± 6	0,20 ± 0,05	2,6 ± 0,9	2,7 ± 0,4	18 ± 2	0,20 ± 0,06	0,55 ± 0,06	18 ± 8	0,17 ± 0,07	18 ± 8	25 ± 2
K1	409 ± 5	0,60 ± 0,03	1,2 ± 0,6	5,1 ± 0,7	39 ± 6	0,60 ± 0,03	2,2 ± 0,5	42 ± 6	0,42 ± 0,03	36 ± 5	38 ± 6
Crni godži											
E5	19 ± 2	13,7 ± 0,7	1,6 ± 0,8	4,5 ± 0,9	2,9 ± 0,2	13,5 ± 0,5	0,09 ± 0,02	1,1 ± 0,3	–	2,9 ± 0,5	1,9 ± 0,6
E11	26 ± 3	16,0 ± 0,4	1,7 ± 0,1	5,6 ± 0,2	3,0 ± 0,8	15,7 ± 0,8	0,09 ± 0,01	1,0 ± 0,2	–	3,0 ± 0,8	2,6 ± 0,3
E15	165 ± 9	15,8 ± 0,6	2,3 ± 0,5	4,5 ± 0,5	10,2 ± 0,9	15,8 ± 0,1	2,3 ± 0,3	9,2 ± 0,9	–	10,0 ± 0,7	9,0 ± 0,5
E21	23 ± 2	10,3 ± 0,1	1,1 ± 0,2	3,1 ± 0,6	2,6 ± 0,6	10,2 ± 0,7	0,34 ± 0,08	1,1 ± 0,1	–	2,7 ± 0,2	2,2 ± 0,8
E34	36 ± 4	16,0 ± 0,8	1,5 ± 0,8	4,3 ± 0,7	3,6 ± 0,7	16,1 ± 0,4	0,48 ± 0,06	1,6 ± 0,6	–	3,4 ± 0,9	4,3 ± 0,4
K1	30 ± 3	17,1 ± 0,5	1,9 ± 0,4	5,6 ± 0,8	3,6 ± 0,3	17,0 ± 0,6	0,27 ± 0,05	1,0 ± 0,4	–	3,5 ± 0,1	3,0 ± 0,9

– Sadržaj je ispod granice detekcije. Granica detekcije za D3G 0,01 mg L<sup>-1</sup>, P3O 0,01 mg L<sup>-1</sup>, P3G 0,01 mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.3.6. Antimikrobna aktivnost

S obzirom da fenolna jedinjenja pokazuju antimikrobnu aktivnost<sup>161–163</sup> u odabranim eutektičkim ekstraktima je ispitana je inicijalna aktivnost primenom difuzione metode u bunarićima (Tabela 26).

Eutektički ekstrakti aronije E5, E12 i E14 pokazali su visoku antibakterijsku aktivnost protiv svih ispitivanih sojeva, dok je ekstrakt E21 ima nižu aktivnost protiv Gram–negativnih sojeva. U pomenutim ekstraktima najzastupljenije fenolno jedinjenja je hlorogena kiselina, za koju je opisano u literaturi da ima inhibitornu aktivnost protiv *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* i *S. aureus*.<sup>164,165</sup> Niža aktivnost ekstrakta E21 u poređenju sa ostalim može biti posledica nižeg sadržaja antocijana, za koja su istraživanja pokazala da imaju značajnu aktivnost protiv *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica* i *S. typhimurium*.<sup>166,167</sup> Ekstrakt E8 pokazao je najnižu aktivnost što je u skladu sa nižim sadržajem fenolnih jedinjenja u ovom ekstraktu. Konvencionalni ekstrakt aronije (K1) imao je nižu aktivnost u poređenju sa eutektičkim ekstraktima E5, E12 i E14. Izražena antibakterijska aktivnost eutektičkih ekstrakata je u korelaciji sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja.

Ekstrakti borovnice pokazali su različitu antibakterijsku aktivnost protiv ispitivanih sojeva. Ekstrakti E5, E12 i E17 su inhibirali rast Gram–negativnih sojeva, dok ekstrakti E26 i E29 nisu ispoljili aktivnost. Opisana biološka aktivnost ekstrakta može biti posledica različitog fenolnog sastava ispitivanih ekstrakata s obzirom da su ekstrakti E5, E12 i E17 bogatiji fenolnim jedinjenjima u poređenju sa ekstraktima E26 i E29. Ekstrakt E17 je jedini pokazao aktivnost protiv *S. aureus* i MRSA, što bi moglo biti u korelaciji sa višom koncentracijom naringina za koji je opisano u literaturi da poseduje inhibitornu aktivnost protiv navedenih sojeva.<sup>168,169</sup> Ekstrakti E5 i E12 su pokazali sličnu aktivnost protiv *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* i *P. aeruginosa* i ovim ekstraktima je zajedničko da imaju visoke koncentracije malvidin–3–O–glukozida. Konvencionalni ekstrakt borovnice pokazao je nižu aktivnost od eutektičkih ekstrakata i samo je inhibirao rast *B. cereus*.

Među eutektičkim ekstraktima crnog godžija, ekstrakt E5 je ispoljio najveću antimikrobnu aktivnost od svih ispitivanih ekstrakata i pokazao je aktivnost protiv *B. cereus*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Ekstrakti E21 i E34 su pokazali inhibitornu aktivnost protiv *E. coli*, međutim ovi ekstrakti imaju različit sastav fenolnih jedinjenja i nije bilo moguće pretpostaviti koje je jedinjenje odgovorno za aktivnost navedenih ekstrakata. Ekstrakti E11 i E15 bili su najbogatiji fenolnim jedinjenjima, ali nisu ispoljili antimikrobnu aktivnost, osim ekstrakta E11 koji je inhibirao rast *S. aureus*. Takođe, konvencionalni ekstrakt crnog godžija nije ispoljio aktivnost protiv testiranih sojeva.

U slučaju ekstrakata aronije i borovnice antimikrobna aktivnost može se povezati sa sadržajem fenolnih jedinjenja. Međutim, dobijeni rezultati sugerišu da aktivnost ispitivanih ekstrakata može biti posledica prisustva drugih bioaktivnih jedinjenja, poput isparljivih organskih jedinjenja (eng. *Volatile organic compounds*– VOCs), zbog čega je potrebno identifikovati jedinjenja odgovorna za inhibitornu aktivnost. Eutektički ekstrakti borovnice i crnog godžija su pokazali nižu antibakterijsku aktivnost u poređenju sa ekstraktima aronije što može biti posledica prisustva proantocijanidina u aroniji.<sup>50</sup>

S obzirom da su eutektički ekstrakti ispoljili različitu antimikrobnu aktivnost, određene su MIC i MBC vrednosti primenom mikrodilucione metode sa dvostrukim serijskim razblaživanjem uzoraka (Tabela 27). Najosetljiviji sojevi su bili *B. subtilis* i *B. cereus* i svi ispitani ekstrakti su pokazali aktivnost protiv ovih sojeva, pri čemu su ekstrakti aronije imali niže MIC i MBC vrednosti prema *B. subtilis*, a ekstrakti borovnice i crnog godžija prema *B. cereus*. Najniža MIC vrednost za *B. subtilis* bila je 0,25 mg mL<sup>-1</sup>, dok je za *B. cereus* bila 0,09 mg mL<sup>-1</sup>. Ispitivani ekstrakti su ispoljili sličnu aktivnost prema *S. aureus* i MRSA, pri čemu su ekstrakti crnog godžija pokazali najjaču aktivnost, i najniža MIC vrednost iznosila je 0,50 mg mL<sup>-1</sup>. Razlika u aktivnosti se može primetiti u slučaju soja *L. monocytogenes*, gde su ekstrakti crnog godžija imali niže vrednosti MIC u poređenju sa ekstraktima aronije i borovnice, dok je u slučaju aktivnosti protiv *S. epidermidis* trend bio suprotan. Eutektički ekstrakti aronije pokazali su antibakterijsku aktivnost protiv svih ispitivanih Gram–

negativnih sojeva, međutim za inhibiciju rasta su bile potrebne koncentracije veće od  $2,00 \text{ mg mL}^{-1}$  u svim slučajevima, osim kod *P. aeruginosa* gde su MIC vrednosti za ekstrakte E5 i E12 bile  $1,50 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Tabela 26. Antimikrobna aktivnost odabranih ekstrakata bobičastog voća određena difuzionom metodom u bunarićima.

Ispitivani sojevi	Ekstrakti																		
	Aronija						Borovnica						Crni godži						VAN
	E5	E12	E14	E21	E8	K1	E5	E12	E17	E29	E25	K1	E5	E11	E15	E21	E34	K1	
<i>B. subtilis</i>	+++*	+++*	+++*	+++*	-	+++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++*
<i>B. cereus</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	+++*
<i>S. aureus</i>	++	+++	+++	+++	-	++	-	-	+++	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	+++*
MRSA	+++	+++	+++	++	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++*
<i>S. epidermidis</i>	+++	+++	+++	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++*
<i>L. monocytogenes</i>	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++*
<i>E.coli</i>	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-
<i>E. cloacae</i>	++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	++	+++	+++	++	-	++	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	+++	+++	+++	+++	-	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i>	++	+++	++	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	+++	-	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	++	-	-	++	-	-	-

Na osnovu veličine zone inhibicije, rezultati su prikazani na sledeći način: nema inhibicije (-), zona inhibicije do 8mm (+), zona inhibicije 8–12mm (++) , zona inhibicije veća od 12 mm (+++). \* Baktericidna aktivnost.

Tabela 27. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) u odabranim ekstraktima bobičastog voća.

mg mL <sup>-1</sup>	<i>B. subtilis</i> 6633		<i>B. cereus</i> 11778		<i>S. aureus</i> 6538		MRSA 33591		<i>S. epidermidis</i> 12228		<i>L. monocytogenes</i> 13932	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Aronija												
E5	0,25	>2,00	0,38	0,50	1,00	>2,00	1,00	>2,00	1,00	2,00	2,00	>2,00
E12	0,25	0,50	0,50	1,00	1,50	2,00	1,50	2,00	0,25	2,00	2,00	>2,00
E14	0,50	>2,00	0,38	0,50	2,00	>2,00	2,00	>2,00	1,00	2,00	2,00	>2,00
E21	0,75	1,00	0,38	0,50	2,00	>2,00	2,00	>2,00	1,00	2,00	2,00	>2,00
K1	0,25	>2,00	0,38	0,50	2,00	>2,00	>2,00	>2,00	1,00	2,00	2,00	>2,00
Borovnica												
E12	0,75	1,00	0,50	1,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	2,00	>2,00	>2,00	>2,00
E17	0,50	>2,00	0,09	0,13	2,00	>2,00	2,00	>2,00	>2,00	>2,00	2,00	>2,00
Crni godži												
E5	0,50	>2,00	0,09	0,25	1,00	2,00	1,00	>2,00	>2,00	>2,00	0,50	1,00
E11	0,50	>2,00	0,19	0,13	0,50	2,00	0,50	1,00	>2,00	>2,00	0,50	1,00
mg mL <sup>-1</sup>	<i>E. coli</i> 35218		<i>E. cloacae</i> 13047		<i>K. pneumoniae</i> 29665		<i>S. typhimurium</i> 14028		<i>S. enterica</i> 13076		<i>P. aeruginosa</i> 10145	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Aronija												
E5	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	1,50	2,00
E12	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	1,50	2,00
E14	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00
E21	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00
K1	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	1,50	2,00
Borovnica												
E12	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	2,00	>2,00
E17	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	1,50	2,00
Crni godži												
E5	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	0,75	1,00
E11	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	>2,00	0,75	1,00

### 4.3.7. Bioautografija

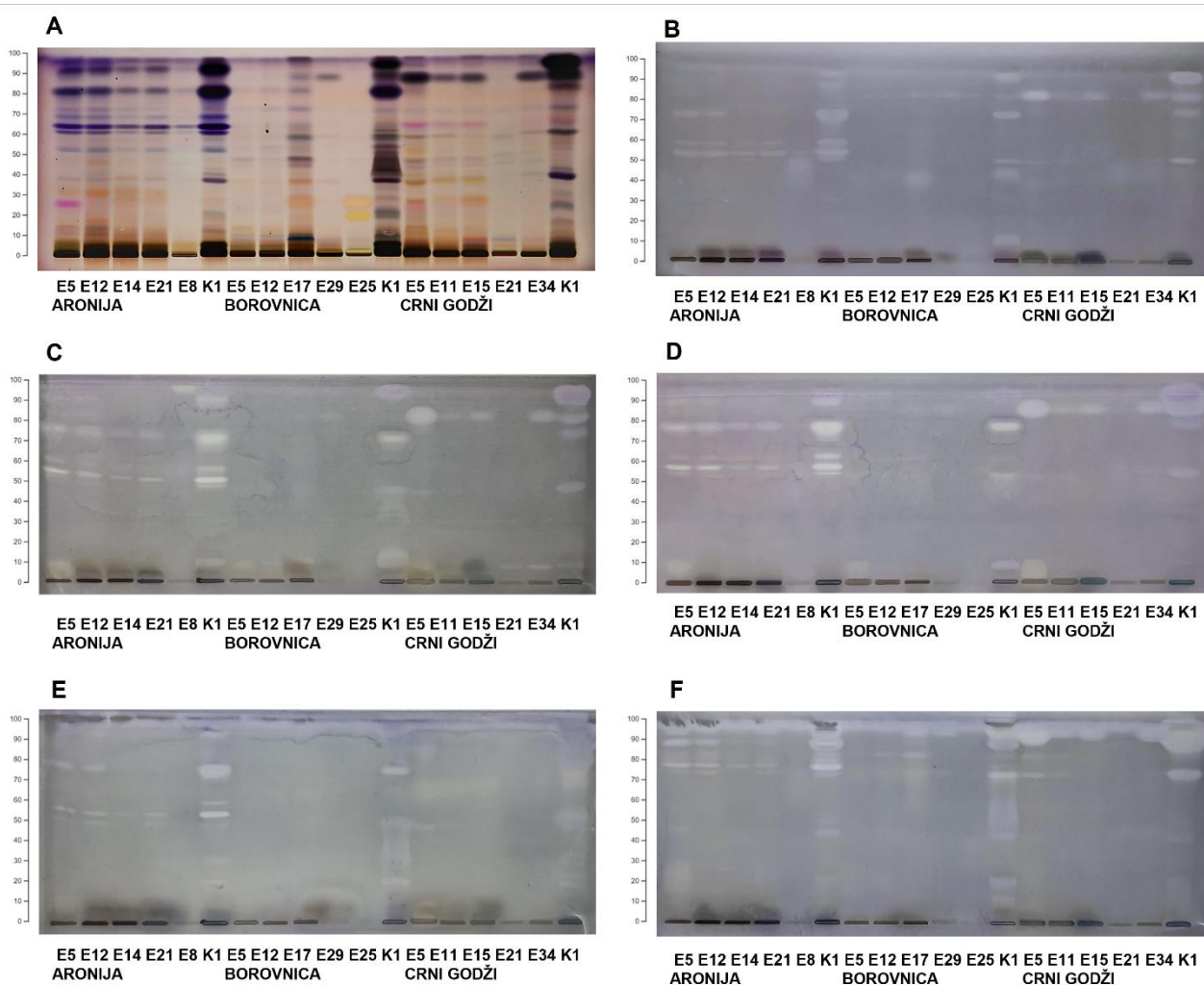
Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti eutektičkih ekstrakta bobičastog voća su pokazali da aktivnost ispitivanih ekstrakata ne potiče samo od prisustva fenolnih jedinjenja, već da može biti posledica prisustva i drugih bioaktivnih jedinjenja. Kako bi se detaljnije procenila antimikrobna aktivnost i identifikovala jedinjenja odgovorna za inhibitorno dejstvo primenjena je direktna bioautografija na odabrane sojeve bakterija (*B. subtilis*, *S. aureus*, MRSA, *E. coli* i *K. pneumoniae*).

Za hromatografsko razdvajanje su prvobitno primenjeni isti uslovi kao i za dobijanje profila fenolnih jedinjenja, međutim aktivne zone su se nalazile na frontu rastvarača, što ukazuje da je korišćena mobilna faza bila previše polarna. Kako bi se postiglo dobro razdvajanje jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću sastav mobilne faze je optimizovan (Tabela 4.) i odabrana je mobilna faza toluen: etil–acetat: mravlja kiselina 6/4/1 (v/v/v). Primenjeni hromatografski uslovi doveli su do razdvajanja nepolarnih i srednje polarnih jedinjenja, zbog čega je za hemijsku derivatizaciju korišćen je reagens anisaldehyd/sumporna kiselina (ANS) koji omogućava vizuelizaciju širokog spektra jedinjenja (Slika 37.A).

Bioautogrami Gram–pozitivnih sojeva (Slika 37. B, C i D) i Gram–negativnih sojeva (Slika 37. E i F) pokazali su specifičan obrazac za svaku vrstu bobičastog voća. Ekstrakti aronije i crnog godžija su pokazali bioautograme bogatije zonama u odnosu na ekstrakte borovnice, što je u skladu sa rezultatima ispitivanja antimikrobne aktivnosti. Vizuelnim poređenjem profila mogu se uočiti razlike u sastavu bioaktivnih jedinjenja i intenzitetu zona, odnosno koncentraciji jedinjenja u zavisnosti od primenjene eutektičke smeše. Zone najvećeg intenziteta su prisutne na  $hR_F$  vrednostima većim od 50, što sugeriše da su biološki aktivna jedinjenja nepolarna. Lipofilna jedinjenja pokazuju veću antimikrobnu aktivnost, jer lakše mogu proći kroz ćelijsku membranu ili ometati metaboličke procese i enzimsku aktivnost.<sup>170</sup> Bioaktivne zone mogu odgovarati monoterpenima na osnovu hromatografskog ponašanja, odnosno nepolarnim svojstvima, kao i prema metaboličkom profilu dobijenom ANS reagensom, gde su se pojavljivale kao plave zone.<sup>113,171</sup>

Antimikrobna aktivnost eutektičkih ekstrakata bobičastog voća procenjena je primenom tri metode: difuzione metode u bunarićima, mikrodilucione metode i bioautografije. Poređenjem dobijenih rezultata mogu se primetiti razlike u zavisnosti od primenjene metode što može biti posledica nekoliko razloga. Primenom difuzionih i dilucionih mikrobioloških metoda se ispituje aktivnost celokupnog ekstrakta za razliku od bioautografskih eseja kada se ispituje aktivnost pojedinačnih jedinjenja, a razdvajanjem komponenata prisutnih u ekstraktu može se izgubiti sinergistički efekat. Osim toga, bioautografija je osetljivija metoda u poređenju sa konvencionalnim antimikrobnim metodama, jer su analizirana jedinjenja skoncentrisana u pojedinačnim zonama, a koncentracija bakterija je niska zbog formiranja monosloja prilikom uranjanja ploče u suspenziju bakterijske kulture od interesa. Varijacije u rezultatima mogu biti i posledica uticaja adsorbensa na izražavanje antimikrobne aktivnosti jedinjenja u slučaju bioautografije, jer prilikom hromatografskog razdvajanja dolazi do interakcija između stacionarne faze i analita.<sup>76,78</sup>

Ispitivanje biološke aktivnosti primenom bioautografskih eseja je obuhvatilo ispitivanje antimikrobne i antioksidativne aktivnosti i omogućilo je paralelno poređenje hromatografskih podataka i biološke aktivnosti. Dobijeni bioautogrami pokazali su da analizirani ekstrakti imaju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na antimikrobnu. Pored toga, pokazali su da su različita jedinjenja prisutna u ekstraktima odgovorna za biološku aktivnost i da su fenolna jedinjenja pokazala antioksidativnu aktivnost, a lipofilna jedinjenja, najverovatnije monoterpeni pokazala antimikrobnu aktivnost.



Slika 37. HPTLC–direktna bioautografija eutektičkih i konvencionalnih ekstrakata bobičastog voća: A) metabolički profil; B) *B. subtilis*; C) *S. aureus*; D) MRSA; E) *E. coli*; F) *K. pneumoniae*.

#### 4.4. Poređenje uticaja matriksa na učinak ekstrakcije primenom prirodnih eutektičkih smeša

Eutektičke smeše su se pokazale kao dobri rastvarači za ekstrakciju fenolnih jedinjenja, što se može objasniti stvaranjem vodoničnih veza i dipol–dipol interakcija između rastvorenih supstanci i molekula rastvarača koje dovode do bolje rastvorljivosti i stabilizacije ciljanih jedinjenja. Dve teorije objašnjavaju kako eutektičke smeše rastvaraju i stabilizuju jedinjenja– teorija šupljina i teorija vezivanja.<sup>32</sup> Prema teoriji šupljina u strukturi eutektičke smeše postoje šupljine u kojim se smeštaju jedinjenja, dok prema teoriji vezivanja dolazi do interakcije između komponenata eutektika i rastvorenog jedinjenja. Međutim, nijedna od ove dve teorije ne uključuje uticaj matriksa na proces rastvaranja. Matriks može uticati na rastvaranje jedinjenja, a samim tim i na efikasnost ekstrakcije na različite načine: poroznost i veličina čestica mogu otežati proces mešanja, komponente matriksa kao što su lipidi, proteini, polisaharidi i drugi biomolekuli mogu ometati rastvaranje ciljanih jedinjenja, pH vrednost matriksa može uticati na formiranje veza, kao i prisustvo vode u uzorku. Kako bi se postigli visoki prinos i selektivnost u ekstrakciji različitih bioaktivnih jedinjenja potrebno je prilagoditi sastav eutektičkih smeša specifičnim karakteristikama matriksa.

U okviru istraživanja lekovitih biljaka koje je obuhvatila ova doktorska disertacija, kao najbolja eutektička smeša za ekstrakciju ukupnih fenolnih jedinjenja iz petrovca se pokazala smeša koja se sastojala od holin–hlorida i čilibarne kiseline u molskom odnosu 1:1 i 40% (w/w) vode, dok se za ekstrakciju ukupnih flavonoida najbolje pokazala smeša holin–hlorida i uree u molskom odnosu 1:2 i 20% (w/w) vode. Međutim posmatrajući rezultate kvantifikacije pojedinačnih fenolnih jedinjenja

može se uočiti da je smeša holin–hlorid: glicerol 1:1 (*n/n*), 20% (*w/w*) imala najveću efikasnost ekstrakcije za flavonoid glikozide (rutin, izokvercetin, kvercitrin, astragalin i viteksin), dok je smeša holin–hlorid: vinska kiselina 1:1 (*n/n*), 30% (*w/w*) bila najbolji medijum za ekstrakciju aglikana flavonoida, kao što su kvercetin, kemferol i naringenin. Za ekstrakciju protekatehuinske i siriginske kiseline se najbolje pokazala smeša L–prolin: maleinksa kiselina 1:1 (*n/n*), 20% (*w/w*), dok su se u slučaju ekstrakcije ostalih fenolnih kiselina prisutnih u petrovcu (hlorogena, *p*–hidroksibenzoeva, kofeinska i *p*–kumarinska kiselina) najbolje pokazale smeše holin–hlorida i uree u molskom odnosu 1:2 sa različitim udelom vode. U slučaju istraživanja koja su se bavila lekovitom biljkom podubicom kao najbolja eutektička smeša za ekstrakciju ukupnih fenola i flavonoida pokazala se smeša koja se sastojala od holin–hlorida i glicerola u molskom odnosu 1:1 i 20% (*w/w*) vode. Posmatrajući rezultate kvantifikacije pojedinačnih fenolnih jedinjenja može se primetiti da je najbolji rastvarač za ekstrakciju aglikana flavonoida (kvercetin, kemferola, hispidunila), kao i kumarina eskuletin bila smeša holin–hlorida i ćilibarne kiseline 1:1 (*n/n*), 20% (*w/w*), dok se za ekstrakciju flavonoid glikozida nije izdvojila samo jedna eutektička smeša kao najoptimalnija. Za ekstrakciju fenolnih kiselina su se dobro pokazale smeše na bazi holin–hlorida i vinske ili ćilibarne kiseline sa različitim udelom vode. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da su se dve smeše izdvojile kao najoptimalnije za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz lekovitog bilja: holin–hlorid i glicerol u molskom odnosu 1:1 i 20% (*w/w*) vode i holin–hlorid i ćilibarna kiselina 1:1 sa različitim udelom vode. Međutim, za ciljanu ekstrakciju određenog fenolnog jedinjenja ili klase nije moguće izdvojiti optimalnu eutektičku smešu, već dobijeni rezultati sugerišu da je neophodno prilagoditi sastav eutektičke smeše svakom uzorku i ciljanom jedinjenju.

U okviru istraživanju ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz propolisa najbolje su se pokazale eutektičke smeše na bazi mlečne kiseline, a pre svega smeše glicerol: mlečna kiselina, 1:1 (*n/n*) i L–glicin: mlečna kiselina, 1:3 (*n/n*). Za ekstrakciju tri najzastupljenija flavonoida u propolisu (hrizin, pinocembrin i izoramnetin) su se najbolje pokazale dve prethodno pomenute smeše, ali i smeša koja se sastojala od kalijum–acetata i mlečne kiseline u molskom odnosu 1:3. Osim smeša na bazi mlečne kiseline za ekstrakciju aglikana flavonoida se odlično pokazala i smeša holin–hlorid: vinska kiselina, 2:1 (*n/n*), koja je u višim prinosima ekstrahovala pinocembrin, luteolin, kvercetin i hespadulin, ali i fenolne kiseline: neohlorogenu, kofeinsku i *p*–kumarinsku kiselinu. Za ekstrakciju flavonoid glikozida su se pokazale najbolje smeša holin–hlorida i uree u molskom odnosu 1:2 u slučaju kvercetrina i izokvercetna, dok je u slučaju rutina to bila smeša holin–hlorida i glicerola u molskom odnosu 1:1.

U okviru istraživanja ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz bobičastog voća kao najbolje eutektičke smeše za ekstrakciju ukupnih fenola su se pokazale smeše koje su kao jednu komponentu imale glicerol, tako da je u slučaju aronije to bila smeša L–prolin: glicerol 5:2 (*n/n*), u slučaju borovnice smeša urea: glicerol 1:2 (*n/n*), dok je u slučaju crnog godžija to bila smeša holin–hlorid: glicerol 1:1 (*n/n*). Za ekstrakciju ukupnih flavonoida su se najbolje pokazale smeše holin–hlorid: urea 1:1 (*n/n*) i holin–hlorid: glicerol 1:1 (*n/n*), što se slaže sa rezultatima za lekovito bilje. Eutektička smeša pripremljena od holin–hlorida i jabučne kiseline u molskom odnosu 1:1 se pokazala kao najefikasnija za ekstrakciju ukupnih antocijana iz sva tri ispitivana uzorka bobičastog voća. Na osnovu rezultata kvantifikacije fenolnih jedinjenja iz bobičastog voća nije bilo moguće izdvojiti optimalnu smešu za ciljanu ekstrakciju nekih grupa fenolnih jedinjenja, kao što su alikani i glikozidi flavonoida, iako su se pojedine smeše pokazale kao efikasne za ciljanu ekstrakciju pojedinačnih jedinjenja, što je prokomentarisano u poglavlju 4.3.5. Međutim, za ciljanu ekstrakciju fenolnih kiselina su se kao dobri medijumi izdvojile smeše holin–hlorid: glicerol, 1:1 i 1:2 (*n/n*) i urea: glicerol 1:2 (*n/n*), dok se za ekstrakciju antocijana izdvojila smeša holin–hlorida: jabučne kiselina 1:1 (*n/n*).

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije pokazuju da je ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz prirodnih proizvoda kompleksan proces, u kojem osim uticaja sastava i strukture eutektičke smeše, udela vode i molskog odnosa, veliki uticaj ima i matriks, što otežava predviđanje učinka ekstrakcije i sastav

dobijenog ekstrakta. Međutim na osnovu ispitivanja tri različita prirodna proizvoda (lekovito bilje, propolis i bobičasto voće) može se sumirati sledeće:

- Eutektička smeša holin–hlorid: vinska kiselina 1:1 ili 2:1 (*n/n*) se dobro pokazala za ekstrakciju aglikona flavonoida iz petrovca i propolisa, kao i fenolnih kiselina iz podubice i propolisa;
- Eutektička smeša holin–hlorid: glicerol 1:1 (*n/n*) se pokazala kao dobro ekstrakciono sredstvo flavonoid glikozida u slučaju petrovca i propolisa, kao i fenolnih kiselina iz bobičastog voća;
- Eutektička smeša holin–hlorid: urea 1:2 (*n/n*) se pokazala kao dobar medijum za ekstrakciju fenolnih kiselina iz petrovaca i flavonoid glikozida iz propolisa;
- Eutektička smeša holin–hlorid: jabučna kiselina 1:1 (*n/n*) se pokazala kao najbolje ekstrakciono sredstvo za izolovanje antocijana iz bobičastog voća.

U revijalnom radu Rentea i saradnika<sup>34</sup> je ispitan uticaj različitih donora vodonične veze na ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz prirodnih matriksa i kod eutektičkih smeša koje sadrže organsku kiselinu pokazalo se da veći broj karbokslnih grupa dovodi do bolje ekstrakcije aglikona i lošije ekstrakcije glikozida. U slučaju kada se kao HBD koristi alkohol autori su primetili bolju ekstrakciju fenolnih kiselina. U revijalnom radu autora Reda (*Redha*)<sup>81</sup> urađen je pregled radova koji su se bavili ekstrakcijom fenolnih jedinjenja iz prirodnih izvora korišćenjem eutektičkih smeša i istaknuto je da je sastav eutektičke smeše primarni faktor koji utiče na prinos ekstrakcije, jer kombinacija različitih HBA i HBD rezultuje različitom polarnošću. Dodatno je u radu diskutovan uticaj molarnog odnosa HBA i HBD, temperature, odnosa čvrstog uzorka i rastvarača, dodatka vode i ekstrakcione tehnike na ekstrakciju, ali ne i uticaja matriksa. Autor smatra da zbog složenosti i razlika u biološkom matriksu između prirodnih izvora (npr. listovi biljaka, plodovi i alge) nije moguće predložiti opšti zaključak o najboljoj kombinaciji HBA i HBD za ekstrakciju specifičnih jedinjenja.

## 5. Zaključci

Ova doktorska disertacija obuhvatila je razvoj metodologije za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz prirodnih proizvoda primenom prirodnih eutektičkih smeša i uključila je sistematsku analizu značajnog broja eutektičkih smeša, primenu molekuskog modelovanja za predviđanje efikasnosti ekstrakcije i primenu hemometrijskih metoda za odabir optimalnih eutektičkih smeša. Predložena metoda ekstrakcije predstavlja zelenu alternativu konvencionalnoj metodi ekstrakcije organskim rastvaračima.

Eutektičke smeše su se pokazale kao odlični rastvarači za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz različitih matriksa, kao i da se njihova svojstva mogu prilagoditi kako bi ciljano ekstrahovale određenu klasu jedinjenja. Na efikasnost ekstrakcije i sastav ekstrahovanih jedinjenja utiču sledeći faktori:

- HBA komponenta – Rezultati HPTLC analize dobijeni za eutektičke ekstrakte bobičastog voća pokazali su jasne razlike u profilima fenolnih jedinjenja koje je uslovlila HBA komponenta. PCA model je potvrdio postojanje razlike u holin–hloridnim ekstraktima i aminokiselinskim ekstraktima, jer je došlo do grupisanja ekstrakata na osnovu HBA komponente i dodatno je ukazao na uticaj strukture bočnog niza aminokiselina na sastav ekstrahovanih jedinjenja.
- HBD komponenta – Rezultati dobijeni za sve izučavane matrikse su pokazali da HBD komponenta ima veliki uticaj na selektivnost i efikasnost ekstrakcije. Najveće razlike u sastavu ekstrahovanih jedinjenja je uslovlila klasa jedinjenja koja je primenjena kao HBD komponenta: organske kiseline, polihidroksilni alkoholi, šećeri, amidi. Međutim prisutne su manje razlike u okviru određene klase HBD i u slučaju ekstrakta dobijenih primenom eutektičkih smeša sa organskim kiselinama su najuočljivije. Mlečna kiselina je pokazala dominantan uticaj u slučaju eutektičkih ekstrakta propolisa, koji su imali najviši prinos i najjaču biološku aktivnost. Rezultati HPTLC analize dobijeni za eutektičke ekstrakte aronije su takođe pokazali dominantan uticaj mlečne kiseline na sastav ekstrahovanih jedinjenja i PCA model je pokazao da je neohlorogena kiselina jedinjenje koje utiče na diferencijaciju mlečnokiselinskih ekstrakata. Rezultati HPTLC analize i PCA modela dobijeni za eutektičke ekstrakte podubice su pokazali razliku u sastavu ekstrahovanih jedinjenja i dominantan uticaj uree kao HBD.
- Molski odnos komponenata – Rezultati HPTLC analize dobijeni za eutektičke ekstrakte propolisa su pokazali da promena molskog odnosa glicerola u eutektičkim smešama utiče na prinos ekstrakcije, međutim ne utiče na sastav ekstrakata. Rezultati spektrofotometrijskih eseja su potvrdili ovaj uticaj. Dobijeni PCA model za profil fenolnih jedinjenja i za sadržaj fenolnih jedinjenja su takođe potvrdili uticaj molskog odnosa na ekstrakciju i na graficima skorova latentnih varijabli se može uočiti rasutosti glicerinskih ekstrakata, kao posledica različitog molskog odnosa.
- Sadržaj vode – Rezultati dobijeni u sklopu istraživanja efikasnosti ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz lekovitog bilja primenom eutektičkih smeša su pokazali da povećanje sadržaja vode može smanjiti viskoznost eutektičke smeše, što pozitivno utiče na prinos ekstrakcije, ali dovodi do promene sastava ekstrahovanih jedinjenja, jer utiče i na polarnost eutektičke smeše. PCA model dobijen za profil fenolnih jedinjenja podubice je potvrdio postojanje razlike u sastavu ekstrahovanih jedinjenja koje je uslovio sadržaj vode. Osim toga, povećanje sadržaja vode u smeši dovodi do izjednačavanja efikasnosti ekstrakcije različitih eutektičkih smeša, što sugeriše da voda postaje glavni medijum za ekstrakciju i u sistemima sa 50% (w/w) vode postaje jedina komponenta koja vrši ekstrakciju. Rezultati COSMO–RS modela su potvrdili uticaj vode na rastvorljivost jedinjenja. Model urađen u sklopu istraživanja podubice je uključio molekule vode u supramolekulski kompleks (HBD:HBA:voda) i pokazao je bolje slaganje sa eksperimentalnim vrednostima u odnosu na COSMO–RS model koji nije uključio vodu, što je bilo u slučaju istraživanja petrovca.

- Fizičko–hemijski parametri – Različiti sastav eutektičkih smeša utiče na fizičko–hemijska svojstva eutektika i rezultati su pokazali da smeše koje su sadržale organsku kiselinu su uglavnom bolje ekstrahovale fenolne kiseline, što može biti posledica niže pH vrednosti eutektičke smeše. Takođe uticaj kisele komponente eutektika se može videti u slučaju ekstrakcije antocijana iz voća, gde su bile najuspešnije smeše one koje su sadržale organsku kiselinu, a samim tim i nižu pH vrednost. U slučaju ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz bobičastog voća rezultati su pokazali da su holin–hloridne eutektičke smeše koje sadrže polihidroksilni alkohol kao HBD bolja ekstrakciona sredstva u poređenju sa smešama koje su sadržale šećer kao HBD, što može biti posledica različite viskoznosti.

Dobijeni rezultati pokazuju da je ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz prirodnih proizvoda kompleksan proces, u kojem osim uticaja sastava i strukture eutektičke smeše, udela vode i molskog odnosa, veliki uticaj ima i matriks, što otežava predviđanje učinka ekstrakcije i sastava dobijenog ekstrakta. Za razliku od literaturnih podataka koji ukazuju na činjenicu da je zbog složenosti prirodnih proizvoda teško predložiti jedinstvenu eutektičku smešu za ekstrakciju fenolnih jedinjenja, u okviru ove disertacije urađeno je poređenje uticaja matriksa na učinak ekstrakcije i izdvojene su eutektičke smeše koje se mogu koristiti za selektivnu ekstrakciju određene klase fenolnih jedinjenja kod različitih matriksa.

COSMO–RS model primenjen u sklopu ove disertacije je pružio bolji uvid u međumolekulske interakcije koje utiču na proces ekstrakcije i omogućio predviđanje efikasnosti ekstrakcije određenih fenolnih jedinjenja koja koja je bila u saglasnosti sa eksperimentalnim podacima. Dobijeni rezultati potvrđuju korisnost i efikasnost predloženog teorijskog pristupa koji uključuje COSMO–RS modelovanje radi olakšavanja i racionalnog izbora eutektičkih smeša za ciljane ekstrakcije. Osim toga model primenjen u istraživanju podubice koji je zasnovan na ternarnim kompleksima HBD:HBA:voda, pokazuje da je vodonična veza između komponenata eutektičke smeše očuvana u prisustvu tri molekula vode, što odgovara masenom sadržaju vode od 20% i predstavlja redak primer u literaturi ispitivanja uticaja vode u COSMO–RS predviđanjima efikasnosti ekstrakcije. Rezultati COSMO–RS studije su u slučaju nekih eutektičkih smeša pokazali suprotan trend u poređenju sa eksperimentalnim rezultatima i neslaganje u rezultatima se uglavnom javlja u slučaju kada između rastvarača i rastvorene supstance prevladavaju nepolarne interakcije.

Visoko–efikasna tankoslojna hromatografija se pokazala kao korisna metoda u preliminarnoj proceni efikasnosti ekstrakcije primenom eutektičkih smeša iz tri razloga:

- Omogućava brzu, jednostavnu i ekološki prihvatljivu analizu kompleksnih matriksa – Ekološka prihvatljivost se pre svega ogleda u upotrebi malih količina rastvarača i uzoraka, ali i u brzini i malom utrošku energije, kao i mogućnosti istovremene analize više uzoraka. U slučaju HPTLC analize ekstrakta podubice je urađena procena ekološke prihvatljivosti ove metode pomoću NEMI piktograma i Eko–skale i metoda je ocenjena kao zelena.
- Pruža mogućnost hemijske i biološke derivatizacije – U slučaju ispitivanja ekstrakata bobičastog voća hemijska derivatizacija je omogućila identifikaciju različitih klasa jedinjenja, dok je biološka derivatizacija (bioautografija) pružila informacije o antioksidativnoj i antibakterijskoj aktivnosti pojedinačnih jedinjenja. Iako derivatizacija HPTLC ploča predstavlja veliku prednost ove metode, ona nije u skladu sa principima zelene analitičke hemije, jer jedan od principa sugeriše da derivatizaciju treba izbegavati. Međutim ako se posmatraju principi bele analitičke hemije, koja predstavlja kompromis između ekološke prihvatljivosti i korisnosti analitičke metode, situacija je drugačija, jer se nijedan od principa ne odnosi direktno na derivatizaciju. Sa aspekta bele analitičke hemije derivatizaciju treba posmatrati kroz toksičnost reagensa i količine formiranog otpada i ako su ovi principi ispunjeni metoda se može smatrati belom. Osim toga HPTLC metoda ispunjava sva četiri

- principa bele analitičke hemije koji se odnose na praktičnost– isplativost, vremenska efikasnost, zahtevnost i operativna jednostavnost.
- Kombinovanje sa hemometrijskom analizom podataka – Neciljano hromatografsko profilisanje, koje koristi ceo hromatografski signal kao jedinstveni hemijski otisak ekstrakta, bez identifikacije pojedinačnih pikova, je dalo sveobuhvatniji pristup u proceni učinka ekstrakcije u slučaju ekstrakta propolisa, u poređenju sa ciljanom analizom zasnovanom na identifikaciji i karakterizaciji nepoznatih metabolita. Jedna od strategija zelene analitičke hemije jeste primena hemometrijskih metoda, pri čemu se eksperimentalni dizajn najčešće primenjuje, jer smanjuje broj potrebnih eksperimenata. U ovoj disertaciji primenjena je analiza glavnih komponenata koja je omogućila smanjenje dimenzionalnosti podataka i grupisanje objekata što je pružilo uvid u efikasnost ekstrakcije primenom eutektičkih smeša.

## 6. Literatura

- (1) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *39* (1), 301–312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>.
- (2) Anastas, P. T. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **1999**, *29* (3), 167–175. <https://doi.org/10.1080/10408349891199356>.
- (3) Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27* (6), 497–511. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.003>.
- (4) de Marco, B. A.; Rechelo, B. S.; Tótolí, E. G.; Kogawa, A. C.; Salgado, H. R. N. Evolution of Green Chemistry and Its Multidimensional Impacts: A Review. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2019**, *27* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>.
- (5) Anastas, P.; Warner, J.; Anastas, P.; Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: Oxford, New York, 2000.
- (6) Tobiszewski, M.; Mechlińska, A.; Namieśnik, J. Green Analytical Chemistry—Theory and Practice. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (8), 2869–2878. <https://doi.org/10.1039/B926439F>.
- (7) Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.; Namieśnik, J. The 12 Principles of Green Analytical Chemistry and the SIGNIFICANCE Mnemonic of Green Analytical Practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *50*, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- (8) Nowak, P. M.; Wietecha-Posłuszny, R.; Pawliszyn, J. White Analytical Chemistry: An Approach to Reconcile the Principles of Green Analytical Chemistry and Functionality. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2021**, *138*, 116223. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116223>.
- (9) Janicka, P.; Płotka-Wasyłka, J.; Jatkowska, N.; Chabowska, A.; Fares, M. Y.; Andruch, V.; Kaykhaii, M.; Gębicki, J. Trends in the New Generation of Green Solvents in Extraction Processes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2022**, *37*, 100670. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100670>.
- (10) Pacheco-Fernández, I.; Pino, V. Green Solvents in Analytical Chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2019**, *18*, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.12.010>.
- (11) Hashemi, B.; Shiri, F.; Švec, F.; Nováková, L. Green Solvents and Approaches Recently Applied for Extraction of Natural Bioactive Compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2022**, *157*, 116732. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116732>.
- (12) Cvjetko Bubalo, M.; Vidović, S.; Radojčić Redovniković, I.; Jokić, S. Green Solvents for Green Technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2015**, *90* (9), 1631–1639. <https://doi.org/10.1002/jctb.4668>.
- (13) Chemat, F.; Abert Vian, M.; Ravi, H. K.; Khadhraoui, B.; Hilali, S.; Perino, S.; Fabiano Tixier, A.-S. Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules* **2019**, *24* (16), 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>.
- (14) Vian, M.; Breil, C.; Vernes, L.; Chaabani, E.; Chemat, F. Green Solvents for Sample Preparation in Analytical Chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2017**, *5*, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2017.03.010>.
- (15) Tobiszewski, M.; Namieśnik, J. Greener Organic Solvents in Analytical Chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2017**, *5*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2017.03.002>.
- (16) Ferraz, R.; Branco, L. C.; Prudêncio, C.; Noronha, J. P.; Petrovski, Ž. Ionic Liquids as Active Pharmaceutical Ingredients. *ChemMedChem* **2011**, *6* (6), 975–985. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100082>.
- (17) Kianfar, E.; Mafi, S. Ionic Liquids: Properties, Application, and Synthesis. *Fine Chemical Engineering* **2021**, 22–31. <https://doi.org/10.37256/fce.212021693>.
- (18) Singh, S. K.; Savoy, A. W. Ionic Liquids Synthesis and Applications: An Overview. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, *297*, 112038. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112038>.

- (19) Kaur, G.; Kumar, H.; Singla, M. Diverse Applications of Ionic Liquids: A Comprehensive Review. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, *351*, 118556. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118556>.
- (20) El Achkar, T.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S. Basics and Properties of Deep Eutectic Solvents: A Review. *Environ Chem Lett* **2021**, *19* (4), 3397–3408. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>.
- (21) Abbott, A. P.; Capper, G.; Davies, D. L.; Rasheed, R. K.; Tambyrajah, V. Novel Solvent Properties of Choline Chloride/Urea Mixtures. *Chem. Commun.* **2003**, No. 1, 70–71. <https://doi.org/10.1039/B210714G>.
- (22) Hansen, B. B.; Spittle, S.; Chen, B.; Poe, D.; Zhang, Y.; Klein, J. M.; Horton, A.; Adhikari, L.; Zelovich, T.; Doherty, B. W.; Gurkan, B.; Maginn, E. J.; Ragauskas, A.; Dadmun, M.; Zawodzinski, T. A.; Baker, G. A.; Tuckerman, M. E.; Savinell, R. F.; Sangoro, J. R. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (3), 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>.
- (23) Santana-Mayor, Á.; Rodríguez-Ramos, R.; Herrera-Herrera, A. V.; Socas-Rodríguez, B.; Rodríguez-Delgado, M. Á. Deep Eutectic Solvents. The New Generation of Green Solvents in Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2021**, *134*, 116108. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116108>.
- (24) Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *766*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.
- (25) Choi, Y. H.; van Spronsen, J.; Dai, Y.; Verberne, M.; Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiology* **2011**, *156* (4), 1701–1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>.
- (26) Martins, M. A. R.; Pinho, S. P.; Coutinho, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. *J Solution Chem* **2019**, *48* (7), 962–982. <https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1>.
- (27) Abranches, D. O.; Coutinho, J. A. P. Everything You Wanted to Know about Deep Eutectic Solvents but Were Afraid to Be Told. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* **2023**, *14* (1), 141–163. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-101121-085323>.
- (28) Picciolini, E.; Pastore, G.; Del Giacco, T.; Ciancaleoni, G.; Tiecco, M.; Germani, R. Aquo-DESSs: Water-Based Binary Natural Deep Eutectic Solvents. *Journal of Molecular Liquids* **2023**, *383*, 122057. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122057>.
- (29) Fajar, A.; Hanada, T.; Hartono, A.; Goto, M. *Demystifying the Phase Diagrams of Deep Eutectic Solvents within an Extensive Chemical Space*; 2023. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3338523/v1>.
- (30) Teixeira, G.; Abranches, D. O.; Ferreira, O.; Coutinho, J. A. P. Estimating the Melting Temperatures of Type V Deep Eutectic Solvents. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2023**, *62* (36), 14638–14647. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.3c01063>.
- (31) Dai, Y.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Tailoring Properties of Natural Deep Eutectic Solvents with Water to Facilitate Their Applications. *Food Chemistry* **2015**, *187*, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>.
- (32) Liu, Y.; Friesen, J. B.; McAlpine, J. B.; Lankin, D. C.; Chen, S.-N.; Pauli, G. F. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81* (3), 679–690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>.
- (33) Shishov, A.; Pochivalov, A.; Nugbienyo, L.; Andruch, V.; Bulatov, A. Deep Eutectic Solvents Are Not Only Effective Extractants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2020**, *129*, 115956. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115956>.
- (34) Rente, D.; Cvjetko Bubalo, M.; Panić, M.; Paiva, A.; Caprin, B.; Radojčić Redovniković, I.; Duarte, A. R. C. Review of Deep Eutectic Systems from Laboratory to Industry, Taking the

- Application in the Cosmetics Industry as an Example. *Journal of Cleaner Production* **2022**, *380*, 135147. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135147>.
- (35) Tang, B.; Zhang, H.; Row, K. H. Application of Deep Eutectic Solvents in the Extraction and Separation of Target Compounds from Various Samples. *Journal of Separation Science* **2015**, *38* (6), 1053–1064. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401347>.
- (36) Shishov, A.; Bulatov, A.; Locatelli, M.; Carradori, S.; Andruch, V. Application of Deep Eutectic Solvents in Analytical Chemistry. A Review. *Microchemical Journal* **2017**, *135*, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.015>.
- (37) Sutton, A. T.; Fraige, K.; Leme, G. M.; da Silva Bolzani, V.; Hilder, E. F.; Cavalheiro, A. J.; Arrua, R. D.; Funari, C. S. Natural Deep Eutectic Solvents as the Major Mobile Phase Components in High-Performance Liquid Chromatography—Searching for Alternatives to Organic Solvents. *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410* (16), 3705–3713. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1027-5>.
- (38) Giannenas, I.; Sidiropoulou, E.; Bonos, E.; Christaki, E.; Florou-Paneri, P. Chapter 1 - The History of Herbs, Medicinal and Aromatic Plants, and Their Extracts: Past, Current Situation and Future Perspectives. In *Feed Additives*; Florou-Paneri, P., Christaki, E., Giannenas, I., Eds.; Academic Press, 2020; pp 1–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00001-7>.
- (39) Stéphane, F. F. Y.; Jules, B. K. J.; Batiha, G. E.-S.; Ali, I.; Bruno, L. N.; Stéphane, F. F. Y.; Jules, B. K. J.; Batiha, G. E.-S.; Ali, I.; Bruno, L. N. Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs. In *Natural Medicinal Plants*; IntechOpen, 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98602>.
- (40) Stanković, M.; Topuzović, M.; Marković, A.; Pavlović, D.; Solujić, S.; Nićiforović, N.; Mihailović, V. Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Different Teucrium Chamaedrys L. Extracts. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2010**, *24* (sup1), 82–86. <https://doi.org/10.1080/13102818.2010.10817816>.
- (41) Zhiponova, M.; Yordanova, Z.; Pavlova, D.; Rogova, M.; Dimitrova, M.; Dragolova, D.; Tasheva-Terzieva, E.; Kapchina-Toteva, V. Importance of Phenolics in Populations of Teucrium Chamaedrys (Lamiaceae) from Serpentine Soils. *Aust. J. Bot.* **2020**, *68* (5), 352–362. <https://doi.org/10.1071/BT19124>.
- (42) Vlase, L.; Benedec, D.; Hanganu, D.; Damian, G.; Csillag, I.; Sevastre, B.; Mot, A. C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Tilea, I. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for Hyssopus Officinalis, Ocimum Basilicum and Teucrium Chamaedrys. *Molecules* **2014**, *19* (5), 5490–5507. <https://doi.org/10.3390/molecules19055490>.
- (43) Malheiros, J.; Simões, D. M.; Figueirinha, A.; Cotrim, M. D.; Fonseca, D. A. Agrimonia Eupatoria L.: An Integrative Perspective on Ethnomedicinal Use, Phenolic Composition and Pharmacological Activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2022**, *296*, 115498. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115498>.
- (44) Paluch, Z.; Biriczová, L.; Pallag, G.; Carvalho Marques, E.; Vargová, N.; Kmoníčková, E. The Therapeutic Effects of Agrimonia Eupatoria L. *Physiol Res* **2020**, *69* (Suppl 4), S555–S571. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934641>.
- (45) Al-Snafi, A. E. THE PHARMACOLOGICAL AND THERAPEUTIC IMPORTANCE OF AGRIMONIA EUPATORIA- A REVIEW. **2015**, *5* (2).
- (46) Irigoiti, Y.; Navarro, A.; Yamul, D.; Libonatti, C.; Tabera, A.; Basualdo, M. The Use of Propolis as a Functional Food Ingredient: A Review. *Trends in Food Science & Technology* **2021**, *115*, 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.041>.
- (47) Hossain, R.; Quispe, C.; Khan, R. A.; Saikat, A. S. M.; Ray, P.; Ongalbek, D.; Yeskaliyeva, B.; Jain, D.; Smeriglio, A.; Trombetta, D.; Kiani, R.; Kobarfard, F.; Mojgani, N.; Saffarian, P.; Ayatollahi, S. A.; Sarkar, C.; Islam, M. T.; Keriman, D.; Uçar, A.; Martorell, M.; Sureda, A.; Pintus, G.; Butnariu, M.; Sharifi-Rad, J.; Cho, W. C. Propolis: An Update on Its Chemistry and Pharmacological Applications. *Chin Med* **2022**, *17* (1), 1–60. <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00651-2>.

- (48) Santos, L. M.; Fonseca, M. S.; Sokolonski, A. R.; Deegan, K. R.; Araújo, R. P.; Umsza-Guez, M. A.; Barbosa, J. D.; Portela, R. D.; Machado, B. A. Propolis: Types, Composition, Biological Activities, and Veterinary Product Patent Prospecting. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2020**, *100* (4), 1369–1382. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10024>.
- (49) Barkaoui, S.; Madureira, J.; Boudhrioua, N.; Cabo Verde, S. Berries: Effects on Health, Preservation Methods, and Uses in Functional Foods: A Review. *Eur Food Res Technol* **2023**, *249* (7), 1689–1715. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04257-2>.
- (50) Denev, P.; Číž, M.; Kratchanova, M.; Blazheva, D. Black Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Polyphenols Reveal Different Antioxidant, Antimicrobial and Neutrophil-Modulating Activities. *Food Chemistry* **2019**, *284*, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.108>.
- (51) Zhang, Y.; Zhao, Y.; Liu, X.; Chen, X.; Ding, C.; Dong, L.; Zhang, J.; Sun, S.; Ding, Q.; Khatoom, S.; Cheng, Z.; Liu, W.; Shen, L.; Xiao, F. Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) as a New Functional Food Relationship with Health: An Overview. *Journal of Future Foods* **2021**, *1* (2), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.01.006>.
- (52) Islam, T.; Yu, X.; Badwal, T. S.; Xu, B. Comparative Studies on Phenolic Profiles, Antioxidant Capacities and Carotenoid Contents of Red Goji Berry (*Lycium Barbarum*) and Black Goji Berry (*Lycium Ruthenicum*). *Chemistry Central Journal* **2017**, *11* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0287-z>.
- (53) Lee, H. S.; Choi, C.-I. Black Goji Berry (*Lycium Ruthenicum* Murray): A Review of Its Pharmacological Activity. *Nutrients* **2023**, *15* (19), 4181. <https://doi.org/10.3390/nu15194181>.
- (54) Yang, W.; Guo, Y.; Liu, M.; Chen, X.; Xiao, X.; Wang, S.; Gong, P.; Ma, Y.; Chen, F. Structure and Function of Blueberry Anthocyanins: A Review of Recent Advances. *Journal of Functional Foods* **2022**, *88*, 104864. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104864>.
- (55) Kalt, W.; Cassidy, A.; Howard, L. R.; Krikorian, R.; Stull, A. J.; Tremblay, F.; Zamora-Ros, R. Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins. *Adv Nutr* **2020**, *11* (2), 224–236. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz065>.
- (56) Thirumurugan, D.; Cholarajan, A.; Vijayakumar, S. S. S. R. and R.; Thirumurugan, D.; Cholarajan, A.; Vijayakumar, S. S. S. R. and R. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In *Secondary Metabolites - Sources and Applications*; IntechOpen, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79766>.
- (57) Twaij, B. M.; Hasan, M. N. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *International Journal of Plant Biology* **2022**, *13* (1), 4–14. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>.
- (58) Lattanzio, V. Phenolic Compounds: Introduction. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; 2013; pp 1543–1580. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_57](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57).
- (59) Zhang, Y.; Cai, P.; Cheng, G.; Zhang, Y. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Natural Product Communications* **2022**, *17* (1), 1934578X211069721. <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>.
- (60) Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. The Role of Green Extraction Techniques in Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *71*, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.011>.
- (61) Picot-Allain, C.; Mahomoodally, M. F.; Ak, G.; Zengin, G. Conventional versus Green Extraction Techniques — a Comparative Perspective. *Current Opinion in Food Science* **2021**, *40*, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>.
- (62) Poole, C. *Instrumental Thin-Layer Chromatography*; Elsevier, 2023.
- (63) Milojković-Opsenica, D.; Andrić, F. High Performance Thin-Layer Chromatography. In *Green Chromatographic Techniques: Separation and Purification of Organic and Inorganic Analytes*; Inamuddin, Dr., Mohammad, A., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2014; pp 81–101. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7735-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7735-4_4).
- (64) Miller, J. M. *Chromatography: Concepts and Contrasts*; John Wiley & Sons, 2005.

- (65) Holčápek, M. Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques. (*No Title*).
- (66) Nováková, L.; Svoboda, P.; Pavlík, J. Chapter 29 - Ultra-High Performance Liquid Chromatography. In *Liquid Chromatography (Second Edition)*; Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., Riekkola, M.-L., Eds.; Elsevier, 2017; pp 719–769. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00029-4>.
- (67) Ahmed, F.; Eticha, T.; Hymete, A.; Ashenef, A.; Ahmed, F.; Eticha, T.; Hymete, A.; Ashenef, A. Principles and Applications of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography. In *High Performance Liquid Chromatography - Recent Advances and Applications*; IntechOpen, 2023. <https://doi.org/10.5772/intechopen.110540>.
- (68) Harvey, D. *Modern Analytical Chemistry*; McGraw-Hill, 2000.
- (69) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Analytical Chemistry*; Cengage Learning, 2014.
- (70) Malta, L. G.; Liu, R. H. Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*; 2014; pp 305–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00058-9>.
- (71) Sánchez-Rangel, J. C.; Benavides, J.; Heredia, J. B.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D. A. The Folin–Ciocalteu Assay Revisited: Improvement of Its Specificity for Total Phenolic Content Determination. *Anal. Methods* **2013**, *5* (21), 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/C3AY41125G>.
- (72) Shraim, A. M.; Ahmed, T. A.; Rahman, M. M.; Hijji, Y. M. Determination of Total Flavonoid Content by Aluminum Chloride Assay: A Critical Evaluation. *LWT* **2021**, *150*, 111932. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>.
- (73) Teng, Z.; Jiang, X.; He, F.; Bai, W. Qualitative and Quantitative Methods to Evaluate Anthocyanins. *eFood* **2020**, *1* (5), 339–346. <https://doi.org/10.2991/efood.k.200909.001>.
- (74) Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E.; Collaborators: Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **2005**, *88* (5), 1269–1278. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269>.
- (75) Munteanu, I. G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- (76) Choma, I.; Jesionek, W. Chapter 11 - Effects-Directed Biological Detection: Bioautography. In *Instrumental Thin-Layer Chromatography*; Poole, C. F., Ed.; Elsevier: Boston, 2015; pp 279–312. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417223-4.00011-X>.
- (77) Dewanjee, S.; Gangopadhyay, M.; Bhattacharya, N.; Khanra, R.; Dua, T. K. Bioautography and Its Scope in the Field of Natural Product Chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2015**, *5* (2), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>.
- (78) Urbain, A.; Simões-Pires, C. A. Thin-Layer Chromatography for the Detection and Analysis of Bioactive Natural Products. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2020; pp 1–29. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9907.pub2>.
- (79) Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S. K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2016**, *6* (2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- (80) Hossain, M. L.; Lim, L. Y.; Hammer, K.; Hettiarachchi, D.; Locher, C. A Review of Commonly Used Methodologies for Assessing the Antibacterial Activity of Honey and Honey Products. *Antibiotics* **2022**, *11* (7), 975. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070975>.
- (81) Ali Redha, A. Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (3), 878–912. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06641>.
- (82) Lazović, M.; Cvijetić, I.; Jankov, M.; Milojković-Opsenica, D.; Trifković, J.; Ristivojević, P. COSMO-RS in Prescreening of Natural Eutectic Solvents for Phenolic Extraction from Teucrium

- Chamaedrys. *Journal of Molecular Liquids* **2023**, *387*, 122649. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122649>.
- (83) Kovács, A.; Neyts, E. C.; Cornet, I.; Wijnants, M.; Billen, P. Modeling the Physicochemical Properties of Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemSusChem* **2020**, *13* (15), 3789–3804. <https://doi.org/10.1002/cssc.202000286>.
- (84) Beach, E. S.; Kundu, S. *Tools for Green Chemistry, Volume 10*; John Wiley & Sons, 2017.
- (85) Palmelund, H.; Andersson, M. P.; Asgreen, C. J.; Boyd, B. J.; Rantanen, J.; Löbmann, K. Tailor-Made Solvents for Pharmaceutical Use? Experimental and Computational Approach for Determining Solubility in Deep Eutectic Solvents (DES). *International Journal of Pharmaceutics: X* **2019**, *1*, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2019.100034>.
- (86) Jeliński, T.; Cysewski, P. Application of a Computational Model of Natural Deep Eutectic Solvents Utilizing the COSMO-RS Approach for Screening of Solvents with High Solubility of Rutin. *J Mol Model* **2018**, *24* (7), 180. <https://doi.org/10.1007/s00894-018-3700-1>.
- (87) Al-Maari, M. A.; Hizaddin, H. F.; Hayyan, A.; Hadj-Kali, M. K. Screening Deep Eutectic Solvents as Green Extractants for Oil from Plant Seeds Based on COSMO-RS Model. *Journal of Molecular Liquids* **2024**, *393*, 123520. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123520>.
- (88) Lazović, M.; Cvijetić, I.; Jankov, M.; Milojković-Opsenica, D.; Trifković, J.; Ristivojević, P. Efficiency of Natural Deep Eutectic Solvents to Extract Phenolic Compounds from Agrimonia Eupatoria: Experimental Study and In Silico Modelling. *Plants* **2022**, *11* (18), 2346. <https://doi.org/10.3390/plants11182346>.
- (89) Tobiszewski, M.; Marć, M.; Gałuszka, A.; Namieśnik, J. Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry. *Molecules* **2015**, *20* (6), 10928–10946. <https://doi.org/10.3390/molecules200610928>.
- (90) Gałuszka, A.; Migaszewski, Z. M.; Konieczka, P.; Namieśnik, J. Analytical Eco-Scale for Assessing the Greenness of Analytical Procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *37*, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013>.
- (91) Sajid, M.; Płotka-Wasyłka, J. Green Analytical Chemistry Metrics: A Review. *Talanta* **2022**, *238*, 123046. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123046>.
- (92) Płotka-Wasyłka, J. A New Tool for the Evaluation of the Analytical Procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta* **2018**, *181*, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.013>.
- (93) Płotka-Wasyłka, J.; Wojnowski, W. Complementary Green Analytical Procedure Index (ComplexGAPI) and Software. *Green Chem.* **2021**, *23* (21), 8657–8665. <https://doi.org/10.1039/D1GC02318G>.
- (94) Martínez, J.; Cortés, J. F.; Miranda, R. Green Chemistry Metrics, A Review. *Processes* **2022**, *10* (7), 1274. <https://doi.org/10.3390/pr10071274>.
- (95) Wojnowski, W.; Tobiszewski, M.; Pena-Pereira, F.; Psillakis, E. AGREEprep – Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2022**, *149*, 116553. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116553>.
- (96) Otto, M. *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, 2023.
- (97) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th ed.; Prentice Hall/Pearson: Harlow, 2010.
- (98) Kumar, N.; Bansal, A.; Sarma, G. S.; Rawal, R. K. Chemometrics Tools Used in Analytical Chemistry: An Overview. *Talanta* **2014**, *123*, 186–199. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.003>.
- (99) Kalinowska, K.; Bystrzanowska, M.; Tobiszewski, M. Chemometrics Approaches to Green Analytical Chemistry Procedure Development. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2021**, *30*, 100498. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100498>.
- (100) Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. [14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In *Methods*

- in Enzymology*; Oxidants and Antioxidants Part A; Academic Press, 1999; Vol. 299, pp 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- (101) Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chemistry* **1999**, *64* (4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).
- (102) Blois, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181* (4617), 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- (103) Narayanan, S.; Jadhav, A. P. Simultaneous Estimation of Aloe Emodin and Emodin from Rheum Emodi, Cassia Alata and Aloes by HPTLC. *Indian J Pharm Sci* **2015**, *77* (6), 783–787.
- (104) Bazylo, A.; Boruc, K.; Borzym, J.; Kiss, A. K. Aqueous and Ethanolic Extracts of *Galinsoga Parviflora* and *Galinsoga Ciliata*. Investigations of Caffeic Acid Derivatives and Flavonoids by HPTLC and HPLC-DAD-MS Methods. *Phytochemistry Letters* **2015**, *11*, 394–398. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.11.005>.
- (105) Patel, A. A.; Amin, A. A.; Patwari, A. H.; Shah, M. B. Validated High Performance Thin Layer Chromatography Method for Simultaneous Determination of Quercetin and Gallic Acid in *Leea Indica*. *Rev. bras. farmacogn.* **2017**, *27*, 50–53. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.017>.
- (106) Gomathi, D.; Kalaiselvi, M.; Ravikumar, G.; Sophia, D.; Gopalakrishnan, V. K.; Uma, C. Secondary Metabolite Credentials of *Evolvulus Alsinoides* by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). *J Biomed Res* **2012**, *26* (4), 295–302. <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20110128>.
- (107) Morlock, G. E.; Ristivojevic, P.; Chernetsova, E. S. Combined Multivariate Data Analysis of High-Performance Thin-Layer Chromatography Fingerprints and Direct Analysis in Real Time Mass Spectra for Profiling of Natural Products like Propolis. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1328*, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.053>.
- (108) Lebot, V.; Michalet, S.; Legendre, L. Identification and Quantification of Phenolic Compounds Responsible for the Antioxidant Activity of Sweet Potatoes with Different Flesh Colours Using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). *Journal of Food Composition and Analysis* **2016**, *49*, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.04.009>.
- (109) Łata, E.; Fulczyk, A.; Kowalska, T.; Sajewicz, M. Thin-Layer Chromatographic Method of Screening the Anthocyanes Containing Alimentary Products and Precautions Taken at the Method Development Step. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1530*, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.043>.
- (110) Krüger, S.; Mirgos, M.; Morlock, G. E. Effect-Directed Analysis of Fresh and Dried Elderberry (*Sambucus Nigra* L.) via Hyphenated Planar Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2015**, *1426*, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.021>.
- (111) Yao, R.; Heinrich, M.; Zou, Y.; Reich, E.; Zhang, X.; Chen, Y.; Weckerle, C. S. Quality Variation of Goji (Fruits of *Lycium* Spp.) in China: A Comparative Morphological and Metabolomic Analysis. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *9*.
- (112) Krenn, L.; Steitz, M.; Schlicht, C.; Kurth, H.; Gaedcke, F. Anthocyanin- and Proanthocyanidin-Rich Extracts of Berries in Food Supplements – Analysis with Problems. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *62* (11), 803–812. <https://doi.org/10.1691/ph.2007.11.7621>.
- (113) Gerlach, A. da C. L.; Gadea, A.; Silveira, R. M. B. da; Clerc, P.; Dévéhat, F. L. The Use of Anisaldehyde Sulfuric Acid as an Alternative Spray Reagent in TLC Analysis Reveals Three Classes of Compounds in the Genus *Usnea* Adans. (Parmeliaceae, Lichenized Ascomycota). Preprints February 24, 2018. <https://doi.org/10.20944/preprints201802.0151.v1>.
- (114) Pešić, M. B.; Milinčić, D. D.; Kostić, A. Ž.; Stanisavljević, N. S.; Vukotić, G. N.; Kojić, M. O.; Gašić, U. M.; Barać, M. B.; Stanojević, S. P.; Popović, D. A.; Banjac, N. R.; Tešić, Ž. Lj. *In Vitro* Digestion of Meat- and Cereal-Based Food Matrix Enriched with Grape Extracts: How Are Polyphenol Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity Affected? *Food Chemistry* **2019**, *284*, 28–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.107>.

- (115) Cretu, G. C.; Morlock, G. E. Analysis of Anthocyanins in Powdered Berry Extracts by Planar Chromatography Linked with Bioassay and Mass Spectrometry. *Food Chemistry* **2014**, *146*, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.038>.
- (116) Krüger, S.; Urmann, O.; Morlock, G. E. Development of a Planar Chromatographic Method for Quantitation of Anthocyanes in Pomace, Feed, Juice and Wine. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1289*, 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.005>.
- (117) Krüger, S.; Morlock, G. E. Fingerprinting and Characterization of Anthocyanins in 94 Colored Wheat Varieties and Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheat Crosses. *Journal of Chromatography A* **2018**, *1538*, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.032>.
- (118) Krüger, S.; Hüsken, L.; Fornasari, R.; Scainelli, I.; Morlock, G. E. Effect-Directed Fingerprints of 77 Botanical Extracts via a Generic High-Performance Thin-Layer Chromatography Method Combined with Assays and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1529*, 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.068>.
- (119) Klamt, A.; Jonas, V.; Bürger, T.; Lohrenz, J. C. W. Refinement and Parametrization of COSMO-RS. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102* (26), 5074–5085. <https://doi.org/10.1021/jp980017s>.
- (120) Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods VI: More Modifications to the NDDO Approximations and Re-Optimization of Parameters. *J Mol Model* **2013**, *19* (1), 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>.
- (121) Skarpalezos, D.; Detsi, A. Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources. *Applied Sciences* **2019**, *9* (19), 4169. <https://doi.org/10.3390/app9194169>.
- (122) Ruesgas-Ramón, M.; Figueroa-Espinoza, M. C.; Durand, E. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (18), 3591–3601. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054>.
- (123) Tsvetov, N.; Pasichnik, E.; Korovkina, A.; Gosteva, A. Extraction of Bioactive Components from *Chamaenerion Angustifolium* (L.) Scop. with Choline Chloride and Organic Acids Natural Deep Eutectic Solvents. *Molecules* **2022**, *27* (13), 4216. <https://doi.org/10.3390/molecules27134216>.
- (124) Savi, L. K.; Dias, M. C. G. C.; Carpine, D.; Waszczynskyj, N.; Ribani, R. H.; Haminiuk, C. W. I. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) Based on Citric Acid and Sucrose as a Potential Green Technology: A Comprehensive Study of Water Inclusion and Its Effect on Thermal, Physical and Rheological Properties. *International Journal of Food Science & Technology* **2019**, *54* (3), 898–907. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14013>.
- (125) Savi, L. K.; Carpiné, D.; Waszczynskyj, N.; Ribani, R. H.; Haminiuk, C. W. I. Influence of Temperature, Water Content and Type of Organic Acid on the Formation, Stability and Properties of Functional Natural Deep Eutectic Solvents. *Fluid Phase Equilibria* **2019**, *488*, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.01.025>.
- (126) Wang, T.; Xu, W.-J.; Wang, S.-X.; Kou, P.; Wang, P.; Wang, X.-Q.; Fu, Y.-J. Integrated and Sustainable Separation of Chlorogenic Acid from Blueberry Leaves by Deep Eutectic Solvents Coupled with Aqueous Two-Phase System. *Food and Bioprocess Processing* **2017**, *105*, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.07.010>.
- (127) Peng, X.; Duan, M.-H.; Yao, X.-H.; Zhang, Y.-H.; Zhao, C.-J.; Zu, Y.-G.; Fu, Y.-J. Green Extraction of Five Target Phenolic Acids from *Lonicerae Japonicae* Flos with Deep Eutectic Solvent. *Separation and Purification Technology* **2016**, *157*, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.10.065>.
- (128) Mohammad, A.; Inamuddin; Siddiq, A.; Naushad, Mu.; El-Desoky, G. E. Green Solvents in Thin-Layer Chromatography. In *Green Solvents I: Properties and Applications in Chemistry*; Mohammad, A., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2012; pp 331–361. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1712-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1712-1_11).
- (129) Qin, Z.; Cheng, H.; Song, Z.; Ji, L.; Chen, L.; Qi, Z. Selection of Deep Eutectic Solvents for Extractive Deterpenation of Lemon Essential Oil. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, *350*, 118524. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118524>.

- (130) Xu, D.; Chow, J.; Weber, C. C.; Packer, M. A.; Baroutian, S.; Shahbaz, K. Evaluation of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Fucoxanthin from the Alga *Tisochrysis Lutea* – COSMO-RS Screening and Experimental Validation. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2022**, *10* (5), 108370. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108370>.
- (131) Xie, Y.; Liu, H.; Lin, L.; Zhao, M.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Wu, Y. Application of Natural Deep Eutectic Solvents to Extract Ferulic Acid from Ligusticum Chuanxiong Hort with Microwave Assistance. *RSC Adv.* **2019**, *9* (39), 22677–22684. <https://doi.org/10.1039/C9RA02665G>.
- (132) Wlazło, M.; Alevizou, E. I.; Voutsas, E. C.; Domańska, U. Prediction of Ionic Liquids Phase Equilibrium with the COSMO-RS Model. *Fluid Phase Equilibria* **2016**, *424*, 16–31. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.08.032>.
- (133) Huber, V.; Hioe, J.; Touraud, D.; Kunz, W. Uncovering the Curcumin Solubilization Ability of Selected Natural Deep Eutectic Solvents Based on Quaternary Ammonium Compounds. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, *361*, 119661. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119661>.
- (134) Li, C.; Liu, X.; Ke, H.; Wang, H.; Xu, J.; Zhang, C. Enhancement of Clozapine Solubility in Three Aqueous Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents: Experimental and COSMO-RS Prediction. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, *359*, 119298. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119298>.
- (135) Wang, J.; Guo, Y.; Liu, F.; Zhang, X.; Wang, W.; Peng, Q. COSMO-RS Prediction and Experimental Verification of Deep Eutectic Solvents for Water Insoluble Pesticides with High Solubility. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, *349*, 118139. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118139>.
- (136) Makoś-Chelstowska, P.; Słupek, E.; Małachowska, A. Superhydrophobic Sponges Based on Green Deep Eutectic Solvents for Spill Oil Removal from Water. *Journal of Hazardous Materials* **2022**, *425*, 127972. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127972>.
- (137) Cui, Z.; Enjome Djocki, A. V.; Yao, J.; Wu, Q.; Zhang, D.; Nan, S.; Gao, J.; Li, C. COSMO-SAC-Supported Evaluation of Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Tea Polyphenols and Process Optimization. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, *328*, 115406. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115406>.
- (138) Fernández, M. de los Á.; Boiteux, J.; Espino, M.; Gomez, F. J. V.; Silva, M. F. Natural Deep Eutectic Solvents-Mediated Extractions: The Way Forward for Sustainable Analytical Developments. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1038*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.059>.
- (139) Pavlič, B.; Mrkonjić, Ž.; Teslić, N.; Kljakić, A. C.; Pojić, M.; Mandić, A.; Stupar, A.; Santos, F.; Duarte, A. R. C.; Mišan, A. Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) Extraction Improves Polyphenol Yield and Antioxidant Activity of Wild Thyme (*Thymus Serpyllum* L.) Extracts. *Molecules* **2022**, *27* (5), 1508. <https://doi.org/10.3390/molecules27051508>.
- (140) Dimkić, I.; Ristivojević, P.; Janakiev, T.; Berić, T.; Trifković, J.; Milojković-Opsenica, D.; Stanković, S. Phenolic Profiles and Antimicrobial Activity of Various Plant Resins as Potential Botanical Sources of Serbian Propolis. *Industrial Crops and Products* **2016**, *94*, 856–871. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.065>.
- (141) Rajbhandari, M.; Lindequist, U. Isolation of Flavonoids from *Anaphalis Busua* and Their Antibacterial Activity. *Journal of Institute of Science and Technology* **2020**, *25* (1), 1–6. <https://doi.org/10.3126/jist.v25i1.29415>.
- (142) Rasul, A.; Millimouno, F. M.; Ali Eltayb, W.; Ali, M.; Li, J.; Li, X. Pinocembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities. *BioMed Research International* **2013**, *2013* (1), 379850. <https://doi.org/10.1155/2013/379850>.
- (143) Wang, J.; Qiu, J.; Dong, J.; Li, H.; Luo, M.; Dai, X.; Zhang, Y.; Leng, B.; Niu, X.; Zhao, S.; Deng, X. Chrysin Protects Mice from *Staphylococcus Aureus* Pneumonia. *J Appl Microbiol* **2011**, *111* (6), 1551–1558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05170.x>.
- (144) Kharsany, K.; Viljoen, A.; Leonard, C.; van Vuuren, S. The New Buzz: Investigating the Antimicrobial Interactions between Bioactive Compounds Found in South African Propolis. *Journal of Ethnopharmacology* **2019**, *238*, 111867. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111867>.

- (145) Kim, S.; Woo, E.-R.; Lee, D. G. Synergistic Antifungal Activity of Isoquercitrin: Apoptosis and Membrane Permeabilization Related to Reactive Oxygen Species In. *IUBMB Life* **2019**, *71* (2), 283–292. <https://doi.org/10.1002/iub.1973>.
- (146) Yun, J.; Woo, E.-R.; Lee, D. G. Isoquercitrin, Isolated from *Aster Yomena* Triggers ROS-Mediated Apoptosis in *Candida Albicans*. *Journal of Functional Foods* **2016**, *22*, 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.041>.
- (147) Benvenuti, L.; Sanchez-Camargo, A. del P.; Zielinski, A. A. F.; Ferreira, S. R. S. NADES as Potential Solvents for Anthocyanin and Pectin Extraction from *Myrciaria Cauliflora* Fruit by-Product: *In Silico* and Experimental Approaches for Solvent Selection. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, *315*, 113761. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113761>.
- (148) Zainal-Abidin, M. H.; Hayyan, M.; Hayyan, A.; Jayakumar, N. S. New Horizons in the Extraction of Bioactive Compounds Using Deep Eutectic Solvents: A Review. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *979*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.012>.
- (149) Alishlah, T.; Mun'im, A.; Jufri, M. Optimization of Urea-glycerin Based NADES-UAE for Oxyresveratrol Extraction from *Morus alba* Roots for Preparation of Skin Whitening Lotion. | *Journal of Young Pharmacists | EBSCOhost*. <https://doi.org/10.5530/jyp.2019.11.33>.
- (150) Wang, H.; Liu, S.; Zhao, Y.; Wang, J.; Yu, Z. Insights into the Hydrogen Bond Interactions in Deep Eutectic Solvents Composed of Choline Chloride and Polyols. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, *7* (8), 7760–7767. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06676>.
- (151) Rahman, M. S.; Roy, R.; Montoya, C.; Halim, M. A.; Raynie, D. E. Acidic and Basic Amino Acid-Based Novel Deep Eutectic Solvents and Their Role in Depolymerization of Lignin. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, *362*, 119751. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119751>.
- (152) Macchioni, V.; Carbone, K.; Cataldo, A.; Frascini, R.; Bellucci, S. Lactic Acid-Based Deep Natural Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Metabolites of *Humulus Lupulus* L.: Supramolecular Organization, Phytochemical Profiling and Biological Activity. *Separation and Purification Technology* **2021**, *264*, 118039. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118039>.
- (153) Bakirtzi, C.; Triantafyllidou, K.; Makris, D. P. Novel Lactic Acid-Based Natural Deep Eutectic Solvents: Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Common Native Greek Medicinal Plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2016**, *3* (3), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.003>.
- (154) Zhang, Q.; Vigier, K. D. O.; Royer, S.; Jérôme, F. Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (21), 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/C2CS35178A>.
- (155) Radošević, K.; Ćurko, N.; Gaurina Srček, V.; Cvjetko Bubalo, M.; Tomašević, M.; Kovačević Ganić, K.; Radojčić Redovniković, I. Natural Deep Eutectic Solvents as Beneficial Extractants for Enhancement of Plant Extracts Bioactivity. *LWT* **2016**, *73*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>.
- (156) Popovic, B. M.; Micic, N.; Potkonjak, A.; Blagojevic, B.; Pavlovic, K.; Milanov, D.; Juric, T. Novel Extraction of Polyphenols from Sour Cherry Pomace Using Natural Deep Eutectic Solvents – Ultrafast Microwave-Assisted NADES Preparation and Extraction. *Food Chemistry* **2022**, *366*, 130562. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130562>.
- (157) Bosiljkov, T.; Dujmić, F.; Cvjetko Bubalo, M.; Hribar, J.; Vidrih, R.; Brnčić, M.; Zlatic, E.; Radojčić Redovniković, I.; Jokić, S. Natural Deep Eutectic Solvents and Ultrasound-Assisted Extraction: Green Approaches for Extraction of Wine Lees Anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing* **2017**, *102*, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.005>.
- (158) Cvjetko Bubalo, M.; Ćurko, N.; Tomašević, M.; Kovačević Ganić, K.; Radojčić Redovniković, I. Green Extraction of Grape Skin Phenolics by Using Deep Eutectic Solvents. *Food Chemistry* **2016**, *200*, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>.
- (159) Panić, M.; Gunjević, V.; Cravotto, G.; Radojčić Redovniković, I. Enabling Technologies for the Extraction of Grape-Pomace Anthocyanins Using Natural Deep Eutectic Solvents in up-to-Half-Litre Batches Extraction of Grape-Pomace Anthocyanins Using NADES. *Food Chemistry* **2019**, *300*, 125185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125185>.

- (160) Jankov, M.; Ristivojević, P.; Cvijetić, I.; Milojković-Opsenica, D. Assessing Radical Scavenging Capacity of *Sempervivum Tectorum* L. Leaf Extracts: An Integrated High-Performance Thin-Layer Chromatography/*in Silico*/Chemometrics Approach. *Journal of Chromatography A* **2023**, *1703*, 464082. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464082>.
- (161) Lima, M. C.; Paiva de Sousa, C.; Fernandez-Prada, C.; Harel, J.; Dubreuil, J. D.; de Souza, E. L. A Review of the Current Evidence of Fruit Phenolic Compounds as Potential Antimicrobials against Pathogenic Bacteria. *Microbial Pathogenesis* **2019**, *130*, 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.025>.
- (162) Lobiuc, A.; Pavăl, N.-E.; Mangalagiu, I. I.; Gheorghită, R.; Teliban, G.-C.; Amăriucăi-Mantu, D.; Stoleru, V. Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules* **2023**, *28* (3), 1114. <https://doi.org/10.3390/molecules28031114>.
- (163) Oulahal, N.; Degraeve, P. Phenolic-Rich Plant Extracts With Antimicrobial Activity: An Alternative to Food Preservatives and Biocides? *Frontiers in Microbiology* **2022**, *12*.
- (164) Lou, Z.; Wang, H.; Zhu, S.; Ma, C.; Wang, Z. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *Journal of Food Science* **2011**, *76* (6), M398–M403. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02213.x>.
- (165) Li, G.; Wang, X.; Xu, Y.; Zhang, B.; Xia, X. Antimicrobial Effect and Mode of Action of Chlorogenic Acid on *Staphylococcus Aureus*. *Eur Food Res Technol* **2014**, *238* (4), 589–596. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2140-5>.
- (166) Ma, Y.; Ding, S.; Fei, Y.; Liu, G.; Jang, H.; Fang, J. Antimicrobial Activity of Anthocyanins and Catechins against Foodborne Pathogens *Escherichia Coli* and *Salmonella*. *Food Control* **2019**, *106*, 106712. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106712>.
- (167) Cisowska, A.; Wojnicz, D.; Hendrich, A. B. Anthocyanins as Antimicrobial Agents of Natural Plant Origin. *Nat Prod Commun* **2011**, *6* (1), 149–156.
- (168) Imam, S. S.; Gilani, S. J.; Zafar, A.; Jumah, M. N. bin; Ali, R.; Ahmed, M. M.; Alshehri, S. Preparation and Optimization of Naringin Oral Nanocarrier: In Vitro Characterization and Antibacterial Activity. *Coatings* **2022**, *12* (9), 1230. <https://doi.org/10.3390/coatings12091230>.
- (169) Jaradat, N.; Shawarb, N.; Hussein, F.; Al-Masri, M.; Warad, I.; Khasati, A.; Shehadeh, M.; Qneibi, M.; Mahmoud Ali Hussein, A.; Makhamreh, S. Antibacterial and Antioxidant Screening of Semi-Synthetic Naringin Based Hydrazone and Oxime Derivatives. *Jundishapur J Microbiol* **2018**, *11* (6). <https://doi.org/10.5812/jjm.65496>.
- (170) McGaw, L. J.; Jäger, A. K.; van Staden, J. Antibacterial Effects of Fatty Acids and Related Compounds from Plants. *South African Journal of Botany* **2002**, *68* (4), 417–423. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30367-7](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30367-7).
- (171) Agatonovic-Kustrin, S.; Wong, S.; Dolzhenko, A. V.; Gegechkori, V.; Ku, H.; Tucci, J.; Morton, D. W. Evaluation of Bioactive Compounds from *Ficus Carica* L. Leaf Extracts via High-Performance Thin-Layer Chromatography Combined with Effect-Directed Analysis. *Journal of Chromatography A* **2023**, *1706*, 464241. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464241>.

## 7. Prilog

Tabela P 1. Uporedni  $t$ - test za spektrofotometrijske eseje kod uzorka petrovca.

	$t^*$	$P$
K1 vs E1	1,02	0,41
K1 vs E2	1,01	0,42
K1 vs E3	1,34	0,31
K1 vs E4	1,31	0,32
K1 vs E5	1,28	0,33
K1 vs E6	1,27	0,33
K1 vs E7	0,27	0,81
K1 vs E8	1,24	0,34
K1 vs E9	0,83	0,49
K1 vs E10	1,40	0,30
K1 vs E11	1,42	0,29
K1 vs E12	1,40	0,30
K1 vs E13	1,08	0,39
K1 vs E14	1,37	0,30
K1 vs E15	0,06	0,96
K1 vs E16	0,81	0,50
K1 vs E17	1,53	0,27
K1 vs E18	1,19	0,39
K1 vs E19	1,38	0,30

\* $t_{cr}= 4,30$ Tabela P 2. Uporedni  $t$ - test za kvantifikovane fenole kod uzorka petrovca.

	$t^*$	$P$
K1 vs E1	1,10	0,29
K1 vs E2	0,73	0,47
K1 vs E3	1,10	0,29
K1 vs E4	0,63	0,54
K1 vs E5	0,60	0,56
K1 vs E6	2,09	0,05
K1 vs E7	2,22	0,04
K1 vs E8	1,66	0,11
K1 vs E9	2,38	0,03
K1 vs E10	1,94	0,07
K1 vs E11	2,01	0,06
K1 vs E12	1,97	0,07
K1 vs E13	2,35	0,03
K1 vs E14	1,14	0,27
K1 vs E15	2,22	0,04
K1 vs E16	1,43	0,17
K1 vs E17	0,33	0,74
K1 vs E18	1,29	0,22
K1 vs E19	1,82	0,09

\* $t_{cr}= 2,10$

Tabela P 3. Uporedni  $t$ -test za spektrofotometrijske eseje kod uzorka podubice.

	$t^*$	$P$
K1 vs E1	1,89	0,20
K1 vs E2	1,36	0,31
K1 vs E3	1,80	0,21
K1 vs E4	1,80	0,27
K1 vs E5	0,70	0,56
K1 vs E6	1,71	0,23
K1 vs E7	1,36	0,31
K1 vs E8	2,53	0,13
K1 vs E9	1,74	0,22
K1 vs E10	1,25	0,34
K1 vs E11	1,71	0,23
K1 vs E12	1,70	0,23
K1 vs E13	1,83	0,21
K1 vs E14	1,44	0,29
K1 vs E15	1,63	0,25
K1 vs E16	1,28	0,33
K1 vs E17	1,75	0,22
K1 vs E18	1,60	0,25
K1 vs E19	1,47	0,28

\* $t_{cr}= 4,30$ Tabela P 4. Uporedni  $t$ -test za kvantifikovane fenole kod uzorka podubice.

	$t^*$	$P$
K1 vs E1	2,19	0,04
K1 vs E2	1,32	0,2
K1 vs E3	0,43	0,67
K1 vs E4	0,08	0,94
K1 vs E5	0,78	0,44
K1 vs E6	0,45	0,66
K1 vs E7	0,93	0,37
K1 vs E8	3,03	0,01
K1 vs E9	1,32	0,2
K1 vs E10	0,08	0,94
K1 vs E11	1,46	0,16
K1 vs E12	2,60	0,02
K1 vs E13	1,20	0,24
K1 vs E14	0,17	0,33
K1 vs E15	2,19	0,04
K1 vs E16	1,83	0,08
K1 vs E17	1,87	0,08
K1 vs E18	1,78	0,09
K1 vs E19	2,09	0,05

\* $t_{cr}= 2,10$

Tabela P 5. Uporedni  $t$ - test za spektrofotometrijske eseje kod uzorak bobičastog voća.

	Aronija		Borovnica		Crni godži	
	$t^*$	$P$	$t^*$	$P$	$t^*$	$P$
K1 vs E1	2,01	0,14	0,16	0,88	0,13	0,91
K1 vs E2	0,88	0,44	1,59	0,21	1,59	0,21
K1 vs E3	1,14	0,34	1,33	0,27	1,38	0,26
K1 vs E4	1,87	0,16	1,20	0,32	2,48	0,09
K1 vs E5	2,55	0,08	2,48	0,09	2,52	0,09
K1 vs E6	1,94	0,15	1,99	0,14	1,84	0,16
K1 vs E7	2,19	0,12	2,06	0,13	0,45	0,68
K1 vs E8	1,11	0,35	1,34	0,27	1,62	0,20
K1 vs E9	0,17	0,88	0,56	0,61	0,16	0,88
K1 vs E10	1,34	0,27	1,92	0,15	0,62	0,58
K1 vs E11	2,76	0,07	2,52	0,09	3,01	0,06
K1 vs E12	2,17	0,12	2,13	0,12	2,94	0,06
K1 vs E13	2,03	0,14	1,73	0,18	2,98	0,06
K1 vs E14	2,32	0,10	2,41	0,09	3,13	0,05
K1 vs E15	2,17	0,12	2,18	0,12	3,37	0,04
K1 vs E16	2,35	0,10	2,37	0,10	3,02	0,06
K1 vs E17	2,32	0,10	3,01	0,06	2,77	0,07
K1 vs E18	2,49	0,09	2,96	0,06	2,66	0,08
K1 vs E19	2,38	0,10	1,55	0,22	1,11	0,35
K1 vs E20	1,38	0,26	0,77	0,50	3,52	0,04
K1 vs E21	2,95	0,06	0,71	0,53	3,20	0,05
K1 vs E22	1,21	0,31	2,39	0,10	0,61	0,58
K1 vs E23	1,37	0,26	1,70	0,19	0,96	0,41
K1 vs E24	1,89	0,16	1,61	0,21	1,27	0,29
K1 vs E25	2,48	0,09	1,68	0,19	3,17	0,05
K1 vs E26	1,14	0,34	1,11	0,35	2,14	0,12
K1 vs E27	2,27	0,11	0,29	0,79	2,14	0,12
K1 vs E28	1,49	0,23	0,89	0,44	0,60	0,59
K1 vs E29	1,44	0,25	1,22	0,31	0,39	0,72
K1 vs E30	1,41	0,25	1,79	0,17	1,27	0,29
K1 vs E31	1,38	0,26	2,50	0,09	1,11	0,35
K1 vs E32	1,40	0,25	1,21	0,31	1,18	0,32
K1 vs E33	0,11	0,92	1,15	0,33	0,86	0,45
K1 vs E34	2,94	0,06	0,57	0,61	0,56	0,61
K1 vs E35	1,28	0,29	2,09	0,13	0,52	0,64
K1 vs E36	1,43	0,25	0,49	0,66	0,02	0,99

\* $t_{cr}=3,18$

Tabela P 5. Nastavak

	Aronija		Borovnica		Crni godži	
	$t^*$	$P$	$t^*$	$P$	$t^*$	$P$
K2 vs E1	1,94	0,15	0,21	0,84	1,91	0,15
K2 vs E2	1,55	0,22	1,63	0,20	1,90	0,15
K2 vs E3	1,85	0,16	1,27	0,29	2,79	0,07
K2 vs E4	2,43	0,09	0,70	0,53	2,31	0,10
K2 vs E5	0,24	0,82	2,28	0,11	0,65	0,56
K2 vs E6	1,85	0,16	1,69	0,19	2,53	0,09
K2 vs E7	1,65	0,20	1,91	0,15	2,02	0,14
K2 vs E8	1,69	0,19	1,73	0,18	1,68	0,19
K2 vs E9	2,30	0,11	0,58	0,60	1,70	0,19
K2 vs E10	1,78	0,17	2,34	0,10	1,42	0,25
K2 vs E11	0,58	0,60	2,37	0,10	0,65	0,56
K2 vs E12	0,03	0,98	2,03	0,14	0,38	0,73
K2 vs E13	1,49	0,23	1,73	0,18	1,49	0,23
K2 vs E14	1,37	0,26	2,23	0,11	0,75	0,51
K2 vs E15	0,12	0,91	2,05	0,13	1,08	0,36
K2 vs E16	1,19	0,32	2,20	0,12	0,74	0,51
K2 vs E17	1,31	0,28	2,75	0,07	0,64	0,57
K2 vs E18	1,12	0,34	2,68	0,08	2,10	0,13
K2 vs E19	1,56	0,22	1,74	0,18	2,83	0,07
K2 vs E20	1,76	0,18	0,35	0,75	1,66	0,20
K2 vs E21	0,85	0,46	0,48	0,66	0,75	0,51
K2 vs E22	1,66	0,20	1,81	0,17	1,44	0,25
K2 vs E23	1,79	0,17	1,77	0,17	1,63	0,20
K2 vs E24	2,18	0,12	1,62	0,20	1,80	0,17
K2 vs E25	1,34	0,27	1,89	0,16	1,77	0,17
K2 vs E26	2,13	0,12	0,61	0,58	2,73	0,07
K2 vs E27	2,24	0,11	0,06	0,96	2,49	0,09
K2 vs E28	1,74	0,18	0,78	0,49	2,10	0,13
K2 vs E29	1,74	0,18	1,23	0,31	2,17	0,12
K2 vs E30	1,80	0,17	1,83	0,16	1,85	0,16
K2 vs E31	1,76	0,18	2,99	0,06	2,44	0,09
K2 vs E32	1,79	0,17	1,14	0,34	1,78	0,17
K2 vs E33	2,54	0,08	1,02	0,38	2,16	0,12
K2 vs E34	2,32	0,10	1,60	0,21	1,63	0,20
K2 vs E35	1,75	0,18	1,75	0,18	2,32	0,10
K2 vs E36	1,74	0,18	0,03	0,98	2,32	0,10
K1 vs K2	2,18	0,12	1,20	0,32	2,47	0,09

\* $t_{cr}=3,18$

Tabela P 6. Usporedni  $t$ -test za kvantifikovane fenole kod uzorak bobičastog voća.

	$t^*$	$P$
Aronija		
K1 vs E5	1,51	0,14
K1 vs E12	1,64	0,11
K1 vs E14	1,61	0,12
K1 vs E21	0,11	0,92
K1 vs E8	0,73	0,47
Borovnica		
K1 vs E5	1,33	0,19
K1 vs E12	1,89	0,07
K1 vs E17	3,21	0,00
K1 vs E29	0,73	0,47
K1 vs E25	1,28	0,21
Crni godži		
K1 vs E5	1,05	0,30
K1 vs E11	0,21	0,83
K1 vs E15	0,41	0,68
K1 vs E21	1,39	0,18
K1 vs E34	1,14	0,26

\* $t_{cr}=2,05$

**Biografija**

Mila Lazović je rođena 27. decembra 1994. u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Beogradu. Osnovne akademske studije na studijskom programu Hemija na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2014/15. godine. Diplomirala je 2018. godine sa prosečnom ocenom 9,20 i završnim radom pri Katedri za analitičku hemiju pod naslovom „Lipidni profili semenki gajenog voća”. Master akademske studije na istom fakultetu upisala je školske 2018/19. godine, a diplomirala je 2019. godine sa prosečnom ocenom 9,75 i završnim radom pod naslovom „Lipidni i masnokiselinski profili semenki voća”. Doktorske akademske studije (smer: Hemija) upisala je školske 2019/20. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu pri Katedri za analitičku hemiju pod mentorstvom red. prof. dr Jelene Trifković.

U periodu od oktobra 2018. do marta 2019. godine bila je zaposlena kao saradnik u nastavi pri Katedri za analitičku hemiju na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, gde je bila angažovana za izvođenje laboratorijskih vežbi na nekoliko predmeta. Od novembra 2019. godine je u zvanju istraživač–pripravnik, a od januara 2020. zaposlena je na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta u Beogradu. U zvanje istraživač–saradnik je izabrana u decembru 2022. godine. U školskim godinama 2020/21., 2021/22. i 2022/23. angažovana je kao saradnik za izvođenje laboratorijskih vežbi na predmetima u sklopu Katedre za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta. Tokom školske 2023/24. godine angažovana je kao saradnik za izvođenje laboratorijskih vežbi na predmetu Analitička hemija na Poljoprivrednom fakultetu.

Član je Srpskog hemijskog društva od 2020. godine. Član je Kluba mladih hemičara Srbije od 2018. godine i član Upravnog odbora od 2022. godine.

**Objavljeni radovi u sklopu doktorske disertacije****Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)**

1. Lazović, M.\*, Cvijetić, I.\*, Jankov, M., Milojković-Opsenica, D., Trifković, J., Ristivojević, P. Efficiency of Natural Deep Eutectic Solvents to Extract Phenolic Compounds from *Agrimonia eupatoria*: Experimental Study and In Silico Modelling. *Plants*, **2022**, *11*, 2346. (\*equal contribution)  
<https://doi.org/10.3390/plants11182346>  
**(Plant Sciences: 39/239; IF<sub>2021</sub> = 4.658)**
2. Lazović, M., Cvijetić, I., Jankov, M., Milojković-Opsenica, D., Trifković, J., Ristivojević, P. COSMO-RS in prescreening of Natural Eutectic Solvents for phenolic extraction from *Teucrium chamaedrys*. *Journal of Molecular Liquids*, **2023**, *387*, 122649.  
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122649>  
**(Physics, Atomic, Molecular & Chemical: 4/35; IF<sub>2022</sub> = 6.0)**
3. Lazović, M., Ivković, Đ., Jankov, M., Dimkić, I., Janakiev, T., Trifković J., Milojković-Opsenica, D., Ristivojević, P. Enhancement of propolis food preservation and functional ingredient characteristics by natural eutectic solvents extraction of phytochemicals. *Food Bioscience*, **2024**, *57*, 103467. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103467>  
**(Food Science & Technology: 37/142; IF<sub>2022</sub> = 5.4)**
4. Lazović, M., Jović, M. D., Petrović, M., Dimkić, I., Gašić, U., Opsenica, D. M., Ristivojević, P., & Trifković, J. Potential application of green extracts rich in phenolics for innovative functional foods: natural deep eutectic solvents as media for isolation of biocompounds from berries. *Food & Function*, **2024**, *15*, 4122-4139. <https://doi.org/10.1039/d3fo05292c>  
**(Food Science & Technology: 22/142; IF<sub>2022</sub> = 6.1)**

**Rad objavljeni u međunarodnom časopisu (M23)**

1. Lazović, M., Cvijetić, I., Trifković, J., Agatonović-Kuštrin S., Morton D., Ristivojević, P. Green analytical profiling of *Teucrium chamaedrys* L. using natural deep eutectic solvents and planar chromatography: a greenness assessment by the National Environmental Methods Index and analytical eco-scale. *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, **2023**, *36*, 351–358. <https://doi.org/10.1007/s00764-023-00250-3>  
**(Chemistry, Analytical: 70/86; IF<sub>2022</sub> = 1.6)**

**Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)**

1. Mila Č. Lazović, Marko D. Jović, Ivica Z. Dimkić, Dušanka M. Milojković Opsenica, Petar M. Ristivojević, Jelena Đ. Trifković, *Potential application of green extracts rich in phenolics for innovative functional foods: Natural deep eutectic solvents as medium for isolation of biocompounds from berries*, XXII Congress EuroFoodChem, Book of abstracts PP 84, p. 209, ISBN 978-86-7132-083-2 June 14-16, 2023, Belgrade, Serbia.

**Saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)**

1. Mila Lazović, Milica Jankov, Jelena Trifković, Ilija Cvijetić, Petar Ristivojević, Dušanka Milojković Opsenica, *Green analytical approach for extraction and chemical profiling of phenolic compounds from natural products: A case study of Teucrium chamaedrys L.* 58<sup>th</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society, Book of abstracts AH-6, p.51; ISBN: 978-86-7132-079-5, June 9-10, 2022, Belgrade, Serbia.
2. Đurđa D. Ivković, Mila Č. Lazović, Milica S. Jankov, Petar M. Ristivojević, *Total phenolic, flavonoid contents and radical scavenging activities of NADES- based propolis extracts*, 8<sup>th</sup> Conference of Young Chemists of Serbia, Book of abstracts AC PP 12, p. 35, ISBN 978-86-7132-080-1, October 29, 2022, Belgrade, Serbia.
3. Mila Č. Lazović, Petar M. Ristivojević, Jelena Đ. Trifković, Dušanka M. Milojković Opsenica, *Green extraction of bioactive compounds from chokeberry: screening of Natural Deep Eutectic Solvents and chemical profiling*, 8<sup>th</sup> Conference of Young Chemists of Serbia, Book of abstracts AC PP 16, p. 39, ISBN 978-86-7132-080-1, October 29, 2022, Belgrade, Serbia.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора      **Мила Ч. Лазовић**

Број индекса                **ДХ17/2019**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Развој методологије за зелену екстракцију биоактивних компонената из природних производа применом природних еутектичких смеша**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 11.10.2024.

М. Лазовић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Мила Ч. Лазовић
Број индекса	ДХ17/2019
Студијски програм	Хемија
Наслов рада	Развој методологије за зелену екстракцију биоактивних компонента из природних производа применом природних еутектичких смеша
Ментор	др Јелена Трифковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**,

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

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

Потпис аутора

У Београду, 11.10.2024.

M. Lazovic

## Изјава о коришћењу

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

**Развој методологије за зелену екстракцију биоактивних компонената из природних производа применом природних еутектичких смеша**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 11.10.2024.

M. Lazović

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