



**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD**

Vesna Novakov, spec. inž. tehnol.

**Karakterizacija ekstrakata peteljki višnje (*Prunus cerasus*  
L.) i trešnje (*Prunus avium* L.) dobijenih subkritičnom  
vodom**

- Doktorska disertacija -

Mentor: Prof. dr Jaroslava Švarc-Gajić

Novi Sad, 2019.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Vesna Novakov
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Jaroslav-Švarc-Gajić, redovni profesor
Nalov rada: NR	Karakterizacija ekstrakata peteljki višnje ( <i>Prunus cerasus</i> L.) i trešnje ( <i>Prunus avium</i> L.) dobijenih subkritičnom vodom
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada: FO	6 poglavlja / 212 strana / 57 slika / 29 tabela / 535 literaturna navoda
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Peteljke višnje i trešnje, ekstrakcija subkritičnom vodom, hemijski profil, biološka aktivnost
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je usmeren ka optimizaciji ekstrakcije peteljki višnje i trešnje subkritičnom vodom, biološku i hemijsku karakterizaciju dobijenih ekstrakata i poređenje ispitivanih uzoraka. Optimizacija ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju izvedena je na osnovu sadržaja ukupnih fenola i flavonoida. Ispitani su i optimizovani najznačajniji parametri tehnike: odnos droga:rastvarač, temperatura, pritisak, vreme ekstrakcije i brzina mešanja.</p> <p>Hemijski profil dobijenih ekstrakata je definisan primenom tečne hromatografije (HPLC–PDA) i gasne hromatografije uz maseno-spektrometrijsku detekciju (GC–MS). Definisan je i protokol disperzivne tečno-tečne mikroekstrakcije koji je prethodio gasnoj hromatografiji (DLLME GC–MS).</p> <p>Primenom deset različitih testova ispitan je antioksidativni i antiradikalni potencijal ekstrakata. Antimikrobni potencijal ekstrakata je ispitan na osam mikrobni sojeva. <i>In vitro</i> testovima ispitan je sposobnost inhibicije <math>\alpha</math>-amilaze, <math>\alpha</math>-glukozidaze, tirozinaze, acetilholinesteraze, butirilholinesteraze i lipaze. Antikancerogeni potencijal i antiproliferativna aktivnost su ispitani na tri histološki različite ćelijske linije.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	8. mart 2018. godine
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>Predsednik: dr Snežana Kravić, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Mentor: dr Jaroslava Švarc-Gajić, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Član: dr Daniela Šojić Merkulov, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p>
---	--

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monographic documentation
Type of record: TR	Textual material, printed
Contents code: CC	Doctoral disertation
Author: AU	Vesna Novakov
Mentor: MN	Dr Jaroslava Švarc-Gajić, full professor
Title: TI	Characterization of extracts of sour cherry ( <i>Prunus cerasus</i> L.) and sweet cherry ( <i>Prunus avium</i> L.) stems obtained by subcritical water
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Physical description: PD	6 chapters / 212 pages / 57 figures / 29 tables / 535 references
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Food engineering
Subject, Key words SKW	Sour and sweet cherry stems, subcritical water extraction, chemical profile, biological activity
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>The aim of this thesis was to optimize the subcritical water extraction of sour and sweet cherry stems, biologically and chemically characterize obtained extracts and compare tested samples. Optimization of subcritical water extraction was performed on the basis of total phenolic and flavonoid contents. The most important parameters of the technique were examined and optimized: sample-to-solvent ratio, temperature, pressure, extraction time and agitation rate.</p> <p>Chemical profiles of obtained extracts were defined by liquid chromatography (HPLC–PDA) and gas chromatography with mass-spectrometry detection (GC–MS). The protocol for dispersive liquid-liquid microextraction which preceded to gas chromatography analysis (DLLME GC–MS) was also defined.</p> <p>Antimicrobial potential of the extracts was determined against eight different microbial strains. Ability of extracts to inhibit <math>\alpha</math>-amylase, <math>\alpha</math>-glucosidase, tyrosinase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lipase was determined by <i>in vitro</i> assays. Anticarcinogenic potential and antiproliferative activity were tested against three histologically different cell lines.</p>
Accepted on Senate on: AS	March 8 <sup>th</sup> 2018
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	President: dr Snežana Kravić, Associate professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad

	<p>Mentor: dr Jaroslava Švarc-Gajić, Full professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p>
--	---

Member: dr Daniela Šojić Merkulov, Associate  
professor, Faculty of Sciences, University of  
Novi Sad

## **Zahvalnica**

*Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji za Instrumentalne metode analize Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Pojedini delovi eksperimentalnog rada urađeni su u laboratorijama Agronomskog fakulteta u Čačku, Prirodno-matematičkog fakulteta u Seldžuku, Instituto Superior de Engenharia u Portu i Univerziteta Balearskih ostrva u Palma de Majorci.*

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru **prof. dr Jaroslavi Švarc-Gajić** na ogromnoj pomoći, nesebičnoj podršci, strpljenju i razumevanju u toku izrade doktorske disertacije. **Prof. dr Snežani Kravić** i **prof. dr Danieli Šojić Merkulov** zahvaljujem na ukazanoj časti prihvatanjem članstva u Komisiji.*

*Ovom prilikom želim da izrazim zahvalnost **dr Aleksandri Cvetanović**, naučnom saradniku, za otvorenost i spremnost da mi izađe u susret svaki put kada mi je bilo potrebno.*

***Biljani Zvizdalo**, **Tanji Brezo-Borjan** i **dr Ani Đurović** veliko hvala na prijatnom ambijentu i lepim trenucima tokom izvođenja eksperimentalnog dela ove disertacije.*

*Najiskrenije se zahvaljujem **prof. dr Pavlu Maškoviću** sa Agronomskog fakulteta u Čačku na pomoći oko analiza bioloških karakteristika dobijenih uzoraka.*

*Najiskrenije veliku zahvalnost dugujem **prof. dr Gokanu Zengin** (Gökhan Zengin) sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Seldžuku u Turskoj na pomoći oko ispitivanja enzimske aktivnosti ekstrakata.*

**Svoju doktorsku disertaciju posvećujem majci.**

**Vesna**



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DEO</b>	4
<b>2.1. Trendovi u valorizaciji bio-otpada</b>	5
2.1.1. Odpad prehrambene industrije	6
2.1.2. Animalni otpad	10
2.1.3. Odpad celulozno-papirne industrije	12
2.1.4. Šumski otpad	14
2.1.5. Komunalni otpad	16
<b>2.2. Nusproizvodi prerade višnje i trešnje</b>	18
2.2.1. Višnja	18
2.2.2. Trešnja	21
<b>2.3. Biološka aktivnost prirodnih jedinjenja</b>	24
2.3.1. Fenolna jedinjenja	24
2.3.1.1. Fenolne kiseline	26
2.3.1.2. Flavonoidi	28
2.3.2. Antioksidativno delovanje	34
2.3.2.1. Slobodni radikali	34
2.3.2.2. Oksidativni stres	39
2.3.2.3. Lipidna peroksidacija	40
2.3.2.4. Antioksidanti i antioksidativni sistemi	41
2.3.3. Antimikrobno delovanje	48
2.3.4. Antidijabetsko delovanje	51
2.3.5. Neuroprotektivno delovanje	55
2.3.6. Antimelanogeno delovanje	62
2.3.7. Gojaznost i antigojazni agensi	66
2.3.8. Antikancerogena aktivnost	69
<b>2.4. Ekstrakcija</b>	73
2.4.1. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju	74
2.4.1.1. Aparatura za izvođenje ekstrakcije subkritičnom vodom	80
<b>2.5. Mikroekstrakcione tehnike</b>	82
2.5.1. Mikroekstrakcija u tečnoj fazi	82
2.5.1.1. Mikroekstrakcija u kapi	83

2.5.1.2. Tečno-fazna mikroekstrakcija na šupljem vlaknu	88
2.5.1.3. Disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija	92
2.5.2. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi	97
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO</b>	102
<b>3.1. Hemikalije i reagensi</b>	103
<b>3.2. Biljni materijal</b>	104
<b>3.3. Ekstrakcija</b>	104
3.3.1. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju	104
3.3.1.1. Određivanje optimalnih procesnih parametara	105
3.3.1.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	106
3.3.1.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	107
<b>3.4. Hemijska karakterizacija ekstrakata</b>	108
3.4.1. HPLC–PDA	108
3.4.2. GC–MS	109
3.4.2.1. Priprema ekstrakata za GC–MS analizu	109
3.4.2.2. Priprema ekstrakata za DLLME GC–MS analizu	109
3.4.2.2.1. DLLME postupak	109
3.4.2.3. GC–MS analiza	109
<b>3.5. Ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata</b>	110
3.5.1. Određivanje antioksidativne i antiradikalske aktivnosti	110
3.5.1.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala	110
3.5.1.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije hidroksilnih radikala	111
3.5.1.3. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala	112
3.5.1.4. Određivanja redukcione sposobnosti	113
3.5.1.5. Određivanje sposobnosti heliranja metalnih jona	113
3.5.1.6. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije	114
3.5.1.7. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti	114
3.5.1.8. Određivanje redukcione sposobnosti FRAP metodom	115
3.5.1.9. Određivanje antioksidativnog potencijala ORAC metodom	115
3.5.1.10. Određivanje antioksidativnog potencijala DNK-biosenzornom metodom	116
3.5.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata	117
3.5.3. Određivanje aktivnosti inhibicije odabranih enzima	117
3.5.4. Određivanje antiproliferativne aktivnosti MTT testom	119

<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	121
<b>4.1. Ekstrakcija peteljki višnje i trešnje</b>	122
4.1.1. Određivanje optimalnog odnosa droga:rastvarač	122
4.1.2. Uticaj temperature	123
4.1.3. Uticaj pritiska	126
4.1.4. Uticaj vremena ekstrakcije	127
4.1.5. Uticaj brzine mešanja	129
<b>4.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata</b>	130
4.2.1. HPLC–PDA analiza	130
4.2.2. GC–MS analiza	132
4.2.3. DLLME GC–MS analiza	135
4.2.3.1. DLLME postupak	135
4.2.3.1.1. Odabir ekstrakcionog sredstva	135
4.2.3.1.2. Odabir disperznog sredstva	139
4.2.3.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata peteljki višnje i trešnje primenom DLLME GC–MS	139
<b>4.3. Biološka aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje</b>	144
4.3.1. Antioksidativna i antiradikalska aktivnost	144
4.3.1.1. Sposobnost inhibicije DPPH radikala	144
4.3.1.2. Sposobnost inhibicije hidroksilnih radikala	145
4.3.1.3. Sposobnost inhibicije ABTS radikala	145
4.3.1.4. Određivanje redukcione sposobnosti	146
4.3.1.5. Određivanje sposobnosti heliranja metalnih jona	146
4.3.1.6. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije	147
4.3.1.7. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti	147
4.3.1.8. Određivanje redukcione sposobnosti FRAP metodom	148
4.3.1.9. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ORAC metodom	148
4.3.1.10. DNK-biosenzorna metoda	148
4.3.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata	149
4.3.3. Određivanje sposobnosti inhibicije biološki značajnih enzima	153
4.3.3.1. Antidijabetska aktivnost	154
4.3.3.2. Antimelanogena aktivnost	155
4.3.3.3. Neuroprotektivna aktivnost	156
4.3.3.4. Antiaterogena aktivnost	157

4.3.4. Određivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata	158
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	161
<b>6. LITERATURA</b>	165

## **1. UVOD**

Bio-otpad, kao što su peteljke, listovi, ljuska, kora i seme, često sadrže biološki aktivna jedinjenja (Aires i dr., 2017) i druge vredne komponente koje se pravilno odabranim tehnologijama mogu izolovati. Pored toga, biomasa danas predstavlja značajnu polaznu sirovinu za proizvodnju bioenergije i biogoriva. Bio-gorivo se dobija različitim tehnologijama, kao što su fermentacija, transesterifikacija, piroliza, gasifikacija, hidrotermalna konverzija itd.

Višnje i trešnje se konzumiraju širom sveta zbog prijatnih senzornih svojstava, bogatog ukusa visoke nutritivne vrednosti i sadržaja biološki aktivnih jedinjenja. Višnje i trešnje su bogate fenolnim kiselinama, antocijaninima, flavan-3-olima i flavonolima.

Malobrojne objavljene studije o osobinama peteljki *Prunus* vrsta ukazuju na značajan potencijal prvenstveno zbog prepoznate farmakološke aktivnosti.

Fenolna jedinjenja sintetišu brojne biljne vrste i danas su prepoznata kao jedna od najznačajnijih grupa bioaktivnih jedinjenja prirodnog porekla. Uzimajući u obzir da su biološki aktivna jedinjenja veoma osetljiva, termonestabilna i uobičajeno prisutna u biljnom materijalu u malim količinama, konvencionalni postupci ekstrakcije nisu najpogodnija opcija za njihovo izolovanje. Zbog toga je ispitivanje mogućnosti ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju s ciljem dobijanja ekstrakata visokog potencijala izuzetno atraktivna problematika, pogotovo ako se uzmu u obzir superiorne solvacione osobine ovog rastvarača, njegova bezbednost i „zeleni“ karakter kao i niska cena. U literaturi su podaci koji opisuju osobine ekstrakata peteljki višnje i trešnje veoma retki, dok se naročito ističe nedostatak podataka o svojstvima ekstrakata dobijenih subkritičnom vodom.

Cilj ove doktorske disertacije bio je usmeren ka optimizaciji ekstrakcije peteljki višnje i trešnje subkritičnom vodom, biološku i hemijsku karakterizaciju dobijenih ekstrakata i poređenje ispitivanih uzoraka. Ispitan je i definisan optimalan odnos biljnog materijala i rastvarača, optimalni temperatura, pritisak ekstrakcije, vreme ekstrakcije i brzina mešanja. Hemijski profil ekstrakata je definisan primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (eng. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*, GC–MS) uz derivatizaciju. Osim toga, primenjena je optimizovana disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija (eng. *Dispersive Liquid–Liquid Microextraction*, DLLME) za jednostavnu i brzu pripremu ekstrakata peteljki, pogodna za povezivanje sa hromatografskim sistemom. Ekstrakti peteljki višnje i trešnje analizirani su visokop performansnom tečnom hromatografijom sa detektorom sa nizom fotodioda (eng. *High Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detector*, HPLC–PDA). Karakterizacija biološke aktivnosti dobijenih ekstrakata izvedena je definisanjem antioksidativnog, antimikrobnog i antiproliferativnog potencijala, kao i

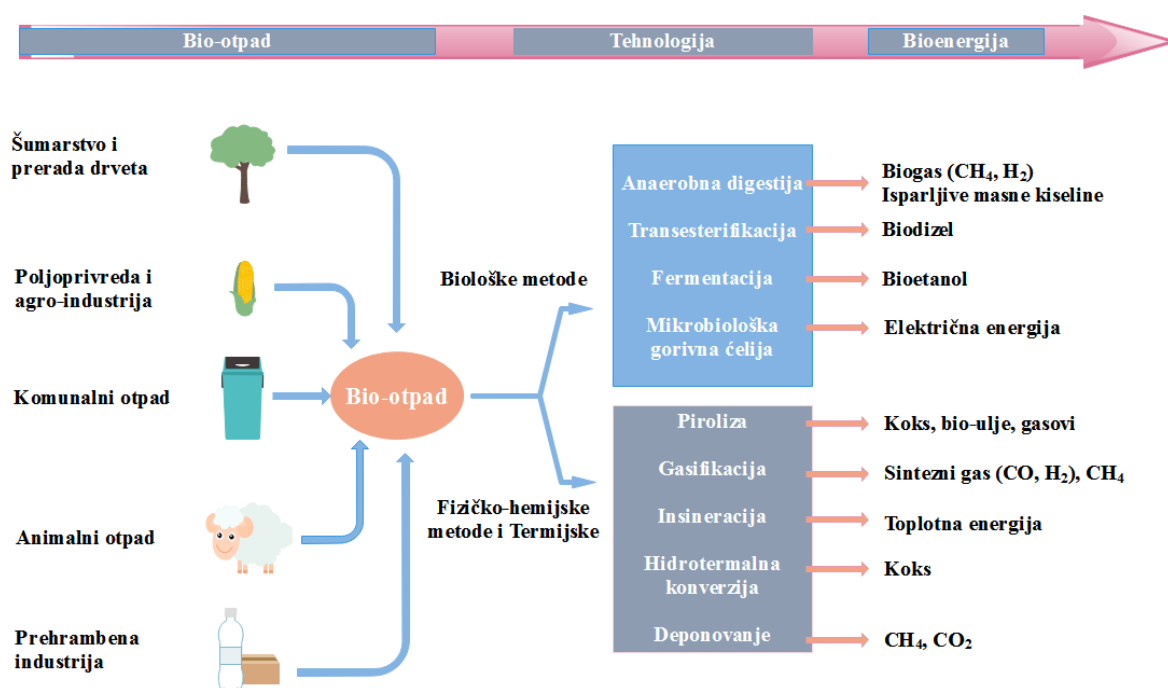
određivanjem sposobnosti inhibicije odabranih enzima i to:  $\alpha$ -amilaze,  $\alpha$ -glukozidaze, tirozinaze, acetilholinesteraze, butirilholinesteraze i lipaze.

## **2. Teorijski deo**



## 2.1. Trendovi u valorizaciji bio-otpada

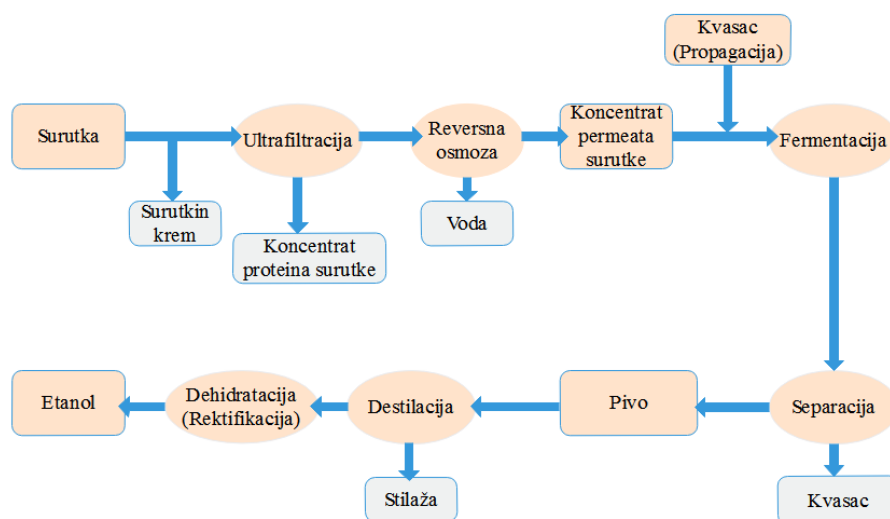
Bio-otpad predstavlja biorazgradivi deo biomase nastao u poljoprivredi, šumarstvu, prehrambenoj i srodnim industrijama, kao i biorazgradivi deo industrijskog i komunalnog otpada (Predojević, 2010). Procena je da se godišnje proizvede oko 146 milijardi tona biomase, i da je dovoljna svega jedna osmina od ukupne biomase proizvedene u toku godine kako bi se zadovoljile svetske potrebe za energijom (Asghari i Yoshida, 2010). U svetu se godišnje sakupi oko 1,3 milijardi tona čvrstog komunalnog otpada, a procena je da će do 2025. godine količina nastalog otpada porasti i do 2,2 milijarde tona (Bhatia i dr., 2018). Većina ovog otpada se čuva na deponijama zagađujući životnu sredinu i produkujući metan i ugljen-dioksid, koji izazivaju globalno zagrevanje. Konverzija bio-otpada različitim tehnologijama u energiju je jedan od mogućih načina njegovog iskorišćenja (Bhatia i dr., 2018) (Slika 1).



Slika 1. Metode tretiranja bio-otpada.

### 2.1.1. Otpad prehrambene industrije

U prehrambenoj industriji, restoranima i marketima se svakodnevno generiše velika količina čvrstog, tečnog i polu-čvrstog otpada. Čvrsti otpad uključuje voće neodgovarajućeg kvaliteta, peteljke, trop procesuiranog voća, otpad nastao čišćenjem povrća kao i filtracioni mulj. Ovakav otpad je uglavnom bogat skrobom, ligninom, celulozom i monosaharidima, u najvećoj meri glukozom i fruktozom. Tečni otpad nastaje kao posledica upotrebe velike količine vode u ovim industrijama za sanitaciju, čišćenje, kuvanje i pranje. Nastali efluenti sadrže suspendovane čestice, organsku materiju i azot u različitim formama, masti i ulja i druge neorganske materije (Hegde i dr., 2018). Tečni efluenti su, između ostalih, surutka iz proizvodnje sira, tofua, efluent od pranja procesne opreme u pekarstvu, efluent iz pivare, otpadna voda iz procesa prerade krompira. Slatka surutka nastaje pri proizvodnji sira kao što je *Cheddar*, *Mozzarella*, švajcarski sir i drugi tvrdi sirevi. Kisela surutka, koja ima vrednost pH do 5,1, nastaje pri proizvodnji kotidž sira (eng. *cottage cheese*). Pri proizvodnji jednog kilograma sira dobije se oko devet litara surutke, a procenjuje se da godišnje nastane oko  $10^8$  tona ovog efluenta (Koushki i dr., 2012). Surutka se danas dosta koristi za dobijanje etanola (Koushki i dr., 2012) (Slika 2).



Slika 2. Osnovni koraci u proizvodnji etanola iz surutke (Rajarajan i dr., 2016).

Nakon što se ultrafiltracijom iz surutke odvoji protein, dobijeni permeat (ultrafiltrat) se koncentruje procesom reversne osmoze kako bi sadržaj laktoze bio podesan za efikasnu fermentaciju. Fermentacija laktoze iz permeata surutke se izvodi sojem kvasca *Kluyveromyces marxianus*. Nakon završetka fermentacije kvasac se odvaja iz fermentisanog supstrata a zaostala tečnost (pivo) se uvodi u destilator kako bi se izdvojio nastali etanol, koji se dalje uvodi u rektifikator radi dehidratacije. Ukoliko će se proizvedeni anhidrovani etanol koristiti kao gorivo, tada se obavezno denaturiše dodavanjem benzina ili neke druge opasne supstance kako bi se sprečila njegova upotreba za proizvodnju alkoholnih pića. Etanol proizveden iz surutke se upotrebljava u proizvodnji parfema, boja, alkoholnih pića itd.

Prilikom obrade krompira generiše se velika količina otpadne vode koja je bogata skrobom, koji predstavlja dobar supstrat za proizvodnju etanola. Ljuska krompira je dobar izvor fenolnih jedinjenja (25–125 mg/100 g) (Sing i Saldaña, 2011). Ona sadrži fenolne kiseline poput hlorogenske, galne, protokatehinske i kafene (Samarin i dr., 2012). Otpad paradajza je jedan od najviše produkovanih i najmanje iskorišćenih vrsta otpada. Trop paradajza se najvećim delom koristi kao hrana za životinje, dok njegova primena u proizvodnji goriva nije dovoljno istražena. U industriji soka se prilikom obrade jabuke generiše od 12 do 20% tropa. Trop jabuke obično uključuje koru, peteljku, seme i pulpu. Trop grožđa predstavlja čvrsti ostatak dobijen nakon ceđenja soka ili proizvodnje vina u vinarijama (Hegde i dr., 2018). Tropovi se često kompostiraju, koriste u proizvodnji hrane za životinje ili za ekstrakcije ulja iz semenki. Semenke grožđa sadrže 10–20% ulja, koje se obično ekstrahuje rastvaračima, najčešće heksnom i petroleum etrom, i prečišćava pre upotrebe (Anđelković, 2015). Ukoliko se želi dobiti jestivo ulje visokog kvaliteta onda se koristi metoda hladnog ceđenja, odnosno presovanje semenki grožđa. Veoma je zastupljena i kombinacija presovanja pa zatim ekstrakcija rastvaračem (Anđelković, 2015). Vodeni ekstrakt pokožice grožđa je korišćen kao supstrat za dobijanje pululana pomoću soja *Aureobasidium pullulans* (Israilides i dr., 1994).

U toku godine se produkuje više od dvanaest miliona tona otpadnog ulja od prženja/pripreme hrane, a procenjuje se da će do 2020. godine taj broj dostići osamnaest miliona tona (Bhatia i dr., 2018). Znatne količine ovog ulja se direktno ispuštaju u životnu sredinu doprinoseći njenom zagađenju.

Biodizel je bio-gorivo koje se proizvodi iz biljnog ulja, masnoća životinjskog porekla ili otpadnog ulja putem transesterifikacije sa kratkolančanim alkoholom (metanol, etanol) u prisustvu katalizatora. Svrha transesterifikacije biljnog ulja (ili animalne masnoće) jeste smanjenje njenog viskoziteta radi povećanja podesnosti za primenu u dizel motorima. Sirovina za proizvodnju biodizela (Tabela 1) se bira u zavisnosti od njene dostupnosti i cene. Biodizel

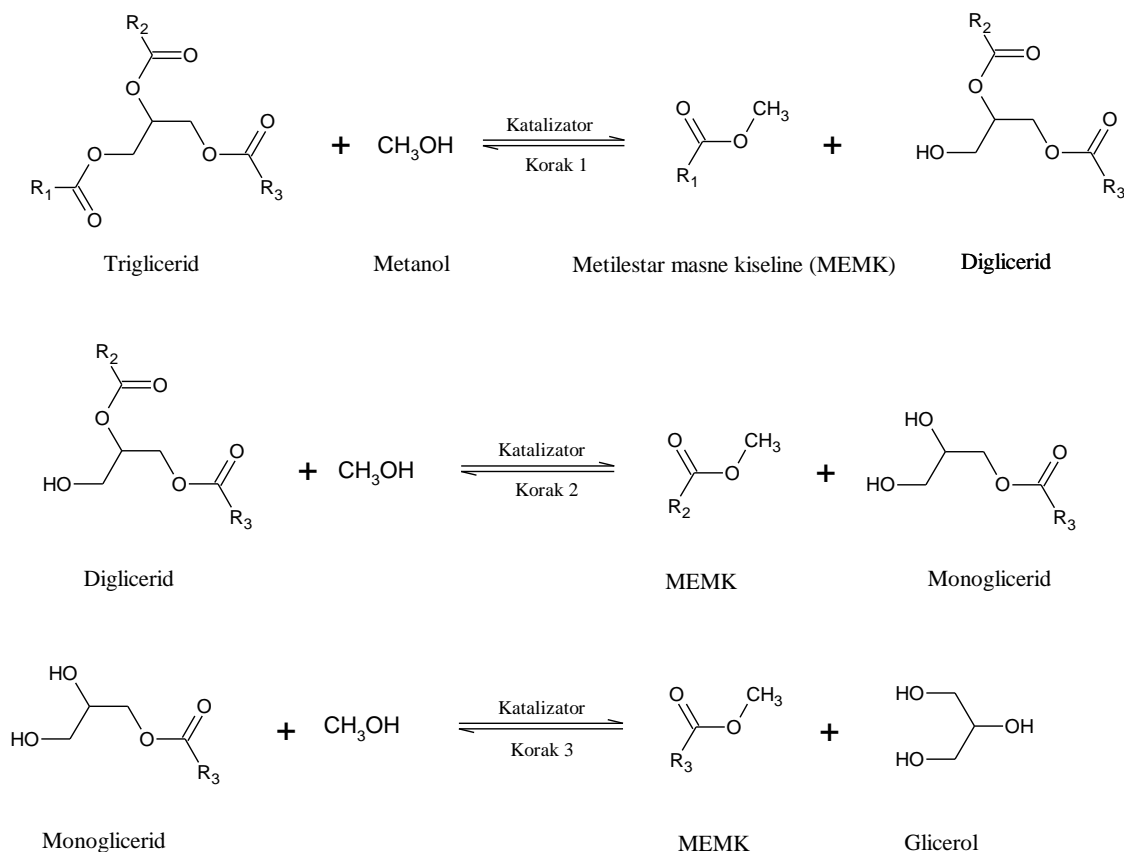
može da se koristi u motorima u čistoj formi (B100) ili mešan sa dizelom mineralnog porekla u različitim odnosima, na primer kao B20 (20% biodizela : 80% dizela mineralnog porekla), B5 ili B2 (Bhatia i dr., 2018).

Tabela 1. Uobičajene sirovine za proizvodnju biodizela (Karmakar i Halder, 2019).

<i>Jestiva ulja</i>	<i>Nejestiva ulja</i>	<i>Animalne masnoće</i>	<i>Drugi izvori</i>
Ječam	<i>Camelina sativa</i>	Goveđi loj	Alge (cijanobakterije)
Kanola	<i>Ricinus communis</i>	Kokošija mast	Gljive
Kokos	Seme pamuka	Riblje ulje	Mikroalge
Kukuruz	<i>Croton megalocarpus</i>	Svinjsko salo	Miskantus (slonova trava)
Palma	<i>Jatropha curcas</i>		Topola
Kikiriki	Jojoba		<i>Calophyllum inophyllum</i>
	<i>Pongamia pinnata</i>		Talog kafe
Uljana repica	<i>Madhuca indica</i>		
Pirinčane mekinje	Nag Champa		
Šafran	Nim		
Susam	<i>Hevea brasiliensis</i>		
	Seme duvana		
Soja	<i>Calophyllum inophyllum</i>		
Suncokret	Ulje kapoka		
Pšenica	Destilat masnih kiselina		
Sirovi sladun	palme		
( <i>Quercus frainetto</i> )	<i>Manilkara zapota</i>		
	Ulje koštice urme		
	Gorki badem		
	Seme bundeve		
	Avokado		
	Lan		

Tehnologija proizvodnje biodizela uključuje proces transesterifikacije triglicerida sa alkoholom, najčešće metanolom, kojim nastaje metilestar masne kiseline (biodizel) i glicerol kao glavni i sporedni produkti, redom (Slika 3). Prvi korak u ovom procesu je konverzija

triglicerida u digliceride koji se dalje konvertuje u monogliceride a on potom u glicerol. U svakom koraku procesa transesterifikacije se iz jednog molekula glicerida produkuje molekul estra (Bhuiya i dr., 2016). Na proces transesterifikacije utiču brojni faktori, kao što su intenzitet mešanja, temperatura i pritisak, čistoća reaktanata, priroda sirovine, molarni odnos alkohola i ulja, vrsta i koncentracija katalizatora (Bhuiya i dr., 2016).



Slika 3. Mehanizam transesterifikacije.

Najčešće korišćeni kiseli katalizatori u proizvodnji biodizela su hlorovodonična i sumporna kiselina kao i derivati toluen sulfonske kiseline, dok su među baznim katalizatorima to hidroksidi i karbonati natrijuma i kalijuma i natrijum-metoksid.

Pri proizvodnji 10 kg biodizela generiše se oko 1 kg sirovog glicerola koji uobičajeno sadrži 80% glicerola i 20% zaostalih komponenti, kao što su voda, alkoholi i/ili soli (Almeida i dr., 2018). Sirovi glicerol može da se upotrebi kao izvor ugljenika pri biotehnoškoj proizvodnji celuloze pomoću soja *Komagataeibacter saccharivorans* (Gayathri i Srinikethan, 2018) i u proizvodnji lipida mikroorganizmom *Trichosporon oleaginosus*, a dobijeni proizvod se može dalje iskoristiti kao sirovina za proizvodnju biodizela (Chen i dr., 2018a). Marrugo i

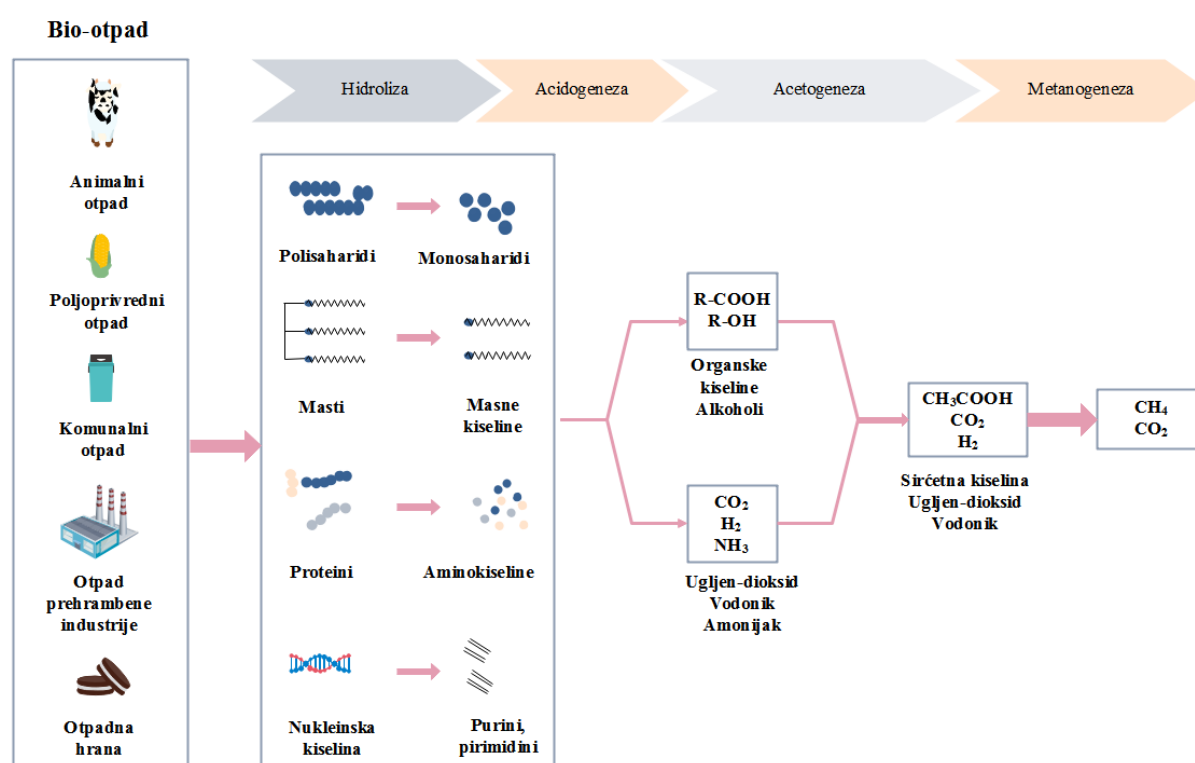
dr. (2019) su demonstrirali da sirovi glicerol može da se upotrebi kao vezivno sredstvo u proizvodnji peleta od biomase agro-industrijskog porekla (bagase šećerne trske, ljuške od kafe i pirinča). Istraživanje Rzechonek i dr. (2019) je ukazalo da sirovi glicerol može biti odličan supstrat za proizvodnju limunske i izolimunske kiseline u aseptičnim uslovima pomoću kvasca *Yarrowia lipolytica*. Autori su u kiseloj sredini (vrednost pH 3) postigli koncentraciju izolimunske kiseline od oko 42,5 g/l, što je bila jedna od trenutno najviše postignutih.

### 2.1.2. Animalni otpad

Animalni otpad iz mesne prerađivačke industrije (dlaka, perje, kosti, životinjska masnoća, meso) sadrži značajne količine organske materije, koja uzrokuje neprijatan miris, i ukoliko se takav otpad ne obradi on postaje pogodan medijum za rast patogenih mikroorganizama (Bhatia i dr., 2018). Upravljenje animalnim otpadom predstavlja veliki problem proizvođačima stoke. Na farmama se ovakav otpad obično odlaže u lagune kako bi se kasnije koristio kao đubrivo. Prirodnom dekompozicijom ovog otpada nastaje metan koji je mnogo štetniji za životnu sredinu u odnosu na ugljen-dioksid. Konverzija animalnog otpada u bio-gorivo je i dalje limitirana zbog visokih troškova, dok je konverzija u biogas ekonomičnija s obzirom da ovaj otpad sadrži većinu neophodnih mikroorganizama i moguće ga je direktno upotrebiti u tehnološkom procesu (Bhatia i dr., 2018).

Biogas, uobičajeno smeša metana (50–70%), ugljen-dioksida (30–40%), vodonika (1–10%), azota (1–3%), kiseonika (0,1%), ugljen-monoksida i vodonik-sulfida u tragovima (Ubwa i dr., 2013), se dobija postupkom anaerobne digestije (AD) koja predstavlja biohemijski proces dekompozicije organskog molekula u anaerobnim uslovima. Tokom hidrolize, prvog od četiri koraka anaerobne digestije (Slika 4), odgovarajuće hidrolitičke bakterije luče hidrolitičke enzime (Tabela 2) koji konvertuju biopolimere (lipide, ugljene hidrate, proteine) u jednostavnije molekule (masne kiseline, šećere, aminokiseline). U drugom koraku monosaharidi, dugolančane masne kiseline i aminokiseline, nastale procesom hidrolize, su supstrat za fermentativne mikroorganizme i proizvodnju organskih kiselina kao što su sirćetna, propionska, buterna i druge kratkolančane masne kiseline, alkohola, vodonika i ugljen-dioksida (Chirsty i dr., 2014). U trećem AD koraku, delovanjem acetogenih bakterija se isparljive masne kiseline (koje imaju lance ugljenika duže od dve jedinice) i alkoholi (sa više od jednog molekula ugljenika) konvertuju u acetate, vodonik i ugljen-dioksid. Tokom metanogeneze, ključnog koraka u celom procesu jer predstavlja najsporiju biohemijsku fazu u proizvodnji biogasa, metanogene bakterije koriste intermedijarne produkte ostalih faza anaerobne digestije i

fermentišu ih u metan, ugljen-dioksid i vodu. Na proces anaerobne digestije utiču različiti procesni parametri, kao što su vrednost pH i temperatura. Različitim mikroorganizmima odgovaraju različiti optimalni uslovi. Metanogene bakterije su aktivne u opsegu vrednosti pH od 6,7 do 7,2, dok je za druge fermentativne bakterije odgovarajući i širi opseg vrednosti pH (4–8,5) (Bhatia i dr., 2018). Temperatura je takođe važan procesni parametar, zbog uticaja na rast i aktivnost mikroorganizama. Anaerobni mikroorganizmi su najaktivniji u mezofilnoj (30–40 °C) i termofilnoj temperaturnoj oblasti (50–60 °C) (Yadvika i dr., 2004).



Slika 4. Proizvodnja biogasa procesom anaerobne digestije.

Digestat, nusprodukt procesa anaerobne digestije, nalazi primenu kao visokovrednovano đubrivo koje može da zameni uobičajeno mineralno đubrivo. Većina postrojenja za proizvodnju biogasa koristi mešavinu različitih supstrata. Kodigestija različitih supstrata čini AD stabilnijom i pouzdanijom, omogućava dobijanje digestata dobrog kvaliteta i povećava prinos biogasa (Khalid i dr., 2011). Evropska proizvodnja biogasa je dostigla  $1,35 \cdot 10^7$  t u 2014. godini (Achinas i dr., 2017), pri čemu je Nemačka najveći proizvođač biogasa, a potom sledi Italija, Velika Britanija, Francuska i Švajcarska.

Tabela 2. Pojedine grupe hidrolitičkih enzima i njihove funkcije (Adekunle i Okolie, 2015).

<i>Enzimi</i>	<i>Supstrati</i>	<i>Degradacioni proizvodi</i>
Proteinaza	Proteini	Aminokiseline
Celulaza	Celuloza	Celobioza i glukoza
Hemicelulaza	Hemiceluloza	Šećeri, kao što su glukoza, ksiloza, manosa i arabinoza
Amilaza	Skrob	Glukoza
Lipaza	Lipidi	Masne kiseline i glicerol
Pektinaza	Pektin	Šećeri, kao što su galaktoza, arabinoza i pektinska (poligalakturonska) kiselina

### 2.1.3. Otpad celulozno-papirne industrije

Celulozno-papirna industrija proizvodi velike količine otpada. Pri proizvodnji jedne tone papira generiše se 50 kg suvog mulja, pri čemu je 70% primarni a 30% sekundarni mulj (Coimbra i dr., 2015). Ovakav otpad se koristi za dobijanje toplotne energije i, ređe, biogasa (Bayr i Riatala, 2012), dok se primenljivost za kompostiranje ili korišćenje u poljoprivredi smatra neadekvatnim zbog nepovoljnog sastava mulja (Coimbra i dr., 2015). Piroliza je jedna od opcija termičke valorizacije papirnog otpada (Coimbra i dr., 2015), čime se dobija bio-ulje i koks.

Piroliza podrazumeva termohemijski proces konverzije otpada/biomase a odvija se na temperaturi od 300 do 850 °C u odsustvu kiseonika. Dobijeni proizvodi su bio-ulje, koks (čvrsti ostatak) i gasovi. Glavne komponente lignocelulozne biomase, celuloza, hemiceluloza i lignin, se termički degradiraju u temperaturnom opsegu od 300 do 500 °C (Roy i Dias., 2017). U zavisnosti od temperature, brzine zagrevanja i drugih parametara pirolize razlikuju se: spora, umerena, brza i fleš piroliza (Tabela 3), pri čemu su najčešće u upotrebi spora i brza piroliza (Roy i Dias., 2017).

Konvencionalnu ili sporu pirolizu, kojom se tradicionalno proizvodi koks, karakterišu male brzine zagrevanja (0,1–0,8 °C/s), dugo vreme boravka gasa i čvrste faze (5–30 min ili 25–35 h) i temperature od 300 do 550 °C. Nastali koks sadrži ugljenik (63–91%) i kiseonik (10–30%), i može da se koristi u procesima sagorevanja, dobijanju aktivnog uglja, za filtraciju i adsorpciju polutanata, i kao đubrivo (Guedes i dr., 2018).



Tabela 3. Pregled procesnih parametara pirolize i prinosa proizvoda.

<i>Proces</i>	<i>t</i> (°C)	<i>Brzina zagrevanja</i>	<i>Trajanje procesa</i>	<i>Biomasa</i>	<i>Prinos proizvoda (%)</i>		
					<i>Bio-ulje</i>	<i>Koks</i>	<i>Gas</i>
Spora piroliza	300–550	< 50 °C/min (0,1–0,8 °C/s)	5–30 min; 25–35 h	Briket/cela	20–50	25–35	20–50
Umerena piroliza	300–450	200–300 °C/min (3–5 °C/s)	~ 10 min	Neobrađena/ sečena/ fino mlevena	35–50	25–40	20–30
Brza/fleš piroliza	300–1000	10–1000 °C/s	< 2 s	Fino mlevena	60–75	10–25	10–30

Brza piroliza je visokotemperaturni proces pri kome se biomasa zagreva velikom brzinom (10-1000°C/s) (Roy i Dias., 2017) u odsustvu kiseonika. Brza piroliza se izvodi sa sirovinom koja sadrži ispod 10% vlage. Proces se izvodi na temperaturi od 400 do 500 °C i traje 0,5–2 s (Isahak i dr., 2012). Najčešće su prinosi bio-ulja, koksa i gasovitih produkata 60–70%, 12–15% i 13–25%, redom. Uopšteno, brza piroliza se koristi za dobijanje bio-ulja visoke čistoće. Bio-ulje predstavlja kompleksnu smeša organskih supstanci kao što su aromatični ugljovodonici, fenoli, ketoni, estri, etri, šećeri, alkoholi, furani, amini i voda, nastalih tokom reakcije pirolize ili onih prisutnih u polaznoj sirovini (Guedes i dr., 2018). Nayan i dr. (2013) su utvrdili da bio-ulje dobijeno sporom pirolizom semena *Azadirachta indica* sadrži približno 41 jedinjenje dužine lanaca ugljenika u opsegu od C<sub>6</sub> do C<sub>47</sub>, dok bio-ulje semena *Shorea robusta*, takođe dobijeno procesom spore pirolize, sadrži 32 jedinjenja dužine lanaca ugljenika u opsegu od C<sub>6</sub> do C<sub>20</sub> (Singh i dr., 2014). Bio-ulje se koristi kao gorivo za kotlove i peći, u proizvodnji tečnih goriva (No, 2014), jedinjenja dodate vrednosti (Hu i dr., 2012) i bio-asfalta (Zhang i dr., 2017).

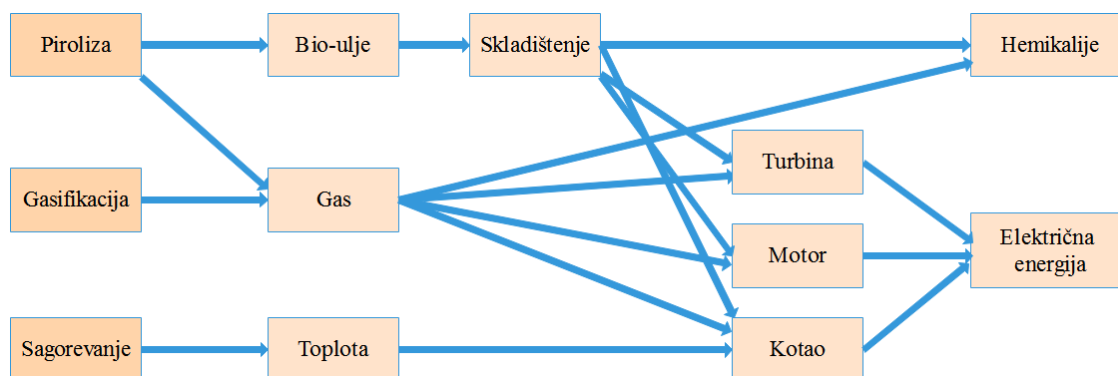
Fleš piroliza je proces u kome se veoma male čestice biomase (105–250 µm) (Goyal i dr., 2008) zagrevaju velikom brzinom u kratkom periodu od nekoliko sekundi, ili kraće, u protočnom reaktoru ili reaktoru sa fluidizovanim slojem, sa ciljem dobijanja maksimalnog prinosa bio-ulja. U studiji Saadi i dr. (2019) prinos bio-ulja dobijenog fleš pirolizom kore nara na temperaturi od 750 °C je iznosio oko 53%, dok je prinos koksa bio najveći na 850 °C (~50%). Biogas dobijen fleš pirolizom je bio kvalitetniji u odnosu na isti dobijen sporom pirolizom zbog nižeg sadržaja ugljen-dioksida (32,4 i 66,6%, redom) i većeg sadržaja sinteznog gasa (50,8 i 26,8 redom). Druga studija (Acikgoz i Kockar, 2007) je pokazala da se može postići prinos bio-

ulja čak oko 69% fleš pirolizom semena lana (*Linum usitatissimum*) na temperaturi od 550 °C pri veličini čestica sirovine iznad 1,8 mm.

#### 2.1.4. Šumski otpad

Šumski otpad, bogat lignoceluloznim materijalom, se može klasifikovati u dve kategorije: otpad nastao sečom šumske drvene mase i otpad proizveden u drvno-baznoj industriji. U industriji nameštaja se prilikom obrade 1000 kg drvene sirovine proizvede približno 45% drvnog otpada (Bhatia i dr., 2018). Velika količina otpada nastaje i prilikom uređenja parkova, čišćenja vodotokova i trasa dalekovoda, usled održavanja zelenih površina i prilikom hortikulturnih radova. Drvna biomasa može da se koristi kao obnovljivi izvor za dobijanje toplotne, električne i mehaničke energije. Najčešći način proizvodnje energije iz drvnog otpada jeste sagorevanje u kotlovima ili ložištima. Drvni otpad se procesom gasifikacije može konvertovati i u gasno gorivo (Poskrobko i dr., 2016).

Piroliza, gasifikacija i sagorevanje su tri glavne metode za termičku konverziju biomase u bio-gorivo. Ovi procesi se međusobno razlikuju po operativnim uslovima (opseg temperature, brzina zagrevanja, odsustvo ili prisustvo kiseonika), zahtevanom stepenu suvoće sirovine i željenim produktima (Slika 5) (Bridgwater, 2003).



Slika 5. Termička konverzija biomase.

Proces gasifikacije se odvija u prisustvu gasifikacionog agensa (vazduh, čisti kiseonik ili vodena para ili smeša ovih komponenata) na povišenim temperaturama između 500 i 1400 °C, na atmosferskom ili povišenom pritisku do 33 bar (Ahmad i dr., 2016). Gasifikacija je proces termohemijske konverzije čvrstog goriva u smešu gorivih gasova putem parcijalne oksidacije na visokim temperaturama, uobičajeno od 800 do 1000 °C, pri čemu se vazduh/kiseonik obično

koristi kao gasifikacioni agens (Rios i dr., 2018). Proces gasifikacije biomase/čvrstog goriva se odvija u četiri različite faze (Puig-Arnavat i dr., 2010):

- Sušenje – uklanjanje vlage iz biomase na temperaturi od 100 do 200 °C, tako da na kraju sadržaj vlage bude ispod 5%;
- Piroliza;
- Oksidacija – proces u kome dolazi do reakcije između čvrste karbonizovane biomase i kiseonika iz vazduha uz nastajanje ugljen-dioksida. Vodonik prisutan u biomasi je oksidovan uz obrazovanje vode. Ukoliko je kiseonik prisutan u substehiometrijskoj količini, može doći do parcijalne oksidacije i nastanka ugljen-monoksida;
- Redukcija – u odsustvu (ili substehiometrijskom prisustvu) kiseonika odvija se nekoliko reakcija u području temperature od 800 do 1000 °C. Neke od osnovnih reakcija su prikazane u Tabeli 4.

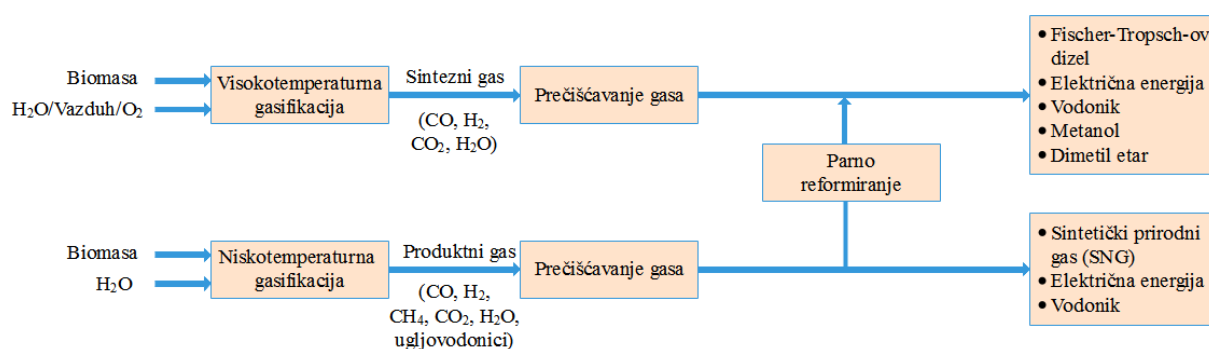
Sirovi produkt procesa gasifikacije je produktni gas koji uobičajeno sadrži ugljen-monoksid, vodonik, metan, alifatični ugljovodonik, benzen i toluen i ter (Samiran i dr., 2016). Termin „sintezni gas“ se uopšteno odnosi na produktni gas koji se dobija iz svih tipova gasifikacionih procesa. Sintezni gas se uobičajeno dobija pri višim temperaturama gasifikacije (iznad 1200 °C) gde je sirovina konvertovana u vodonik i ugljen-monoksid (pored vode i ugljen-dioksida) (Slika 6) (Samiran i dr., 2016).

Sintezni gas može biti korišćen u proizvodnji sintetičkih goriva i hemijskih supstanci, kao i za generisanje električne i toplotne energije. Prednost gasifikacije u odnosu na druge termohemijske procese je u tome što proizvedeni gas može da se koristi u različite svrhe, na primer za kombinovano generisanje toplotne i električne energije (u gasnim motorima, turbinama i gorivnim ćelijama), za konverziju u gasna goriva (vodonik, sintetički prirodni gas), za sintezu tečnog goriva preko Fischer-Tropsch-ovog procesa ili za sintezu hemijskih supstanci (metanola, dimetil etra, amonijaka, okso-alkohola) (Brachi i dr., 2014).

Tabela 4. Faze gasifikacije (Dasappa, 2018).

	$t$ (°C)		
<b>Sušenje</b>	100–200	toplota + sirovina	$\rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{osušena sirovina}$
<b>Piroliza</b>	$\geq 250$	toplota + osušena sirovina	$\rightarrow (\text{gasovi} + \text{ter}) + \text{koks}$
<b>Oksidacija</b>	1000–1200		$\Delta H^*$ (kJ/mol)
		$\text{CO} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \leftrightarrow \text{CO}_2$	-283
		$\text{H}_2 + \frac{1}{2}\text{O}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{O}$	-241,9
		$\text{C} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{CO}_2$	-393,5
		$\text{C} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \leftrightarrow \text{CO}$	-110,6
<b>Redukcija</b>	800–1000		
		$\text{C} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO} + \text{H}_2$	-131,4
		$\text{C} + \text{CO}_2 \leftrightarrow 2\text{CO}$	172,4
		$\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$	-42,3
		$\text{C} + 2\text{H}_2 \leftrightarrow \text{CH}_4$	-74,8

\* - Promena entalpije hemijske reakcije



Slika 6. Proizvodnja sinteznog i produktnog gasa i njihova uobičajena primena.

### 2.1.5. Komunalni otpad

Prosečni građanin Evropske unije godišnje proizvede 481 kg čvrstog komunalnog otpada, pri čemu je prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (eng. *Food and Agriculture Organization of the United Nation*, FAO) od toga 260 kg otpadna hrana, što predstavlja 58% ukupne količine (Vakalis i dr., 2017). Spaljivanjem čvrstog komunalnog otpada izbegava se produkcija metana, koji se uobičajeno generiše kao sporedni produkt kod otvorenog odlaganja takvog otpada. Kontrolisano sagorevanje (insineracija) može biti

iskorišćeno u turbinama s ciljem proizvodnje električne energije. Insineracijom jedne tone otpada proizvede se približno 500–600 kWh električne energije (Bhatia i dr., 2018). U Japanu i Kini se 27 odnosno 80%, redom, čvrstog komunalnog otpada tretira insineracijom (Bhatia i dr., 2018). U Engleskoj je 2011. godine 18% čvrstog komunalnog otpada bilo podvrgnuto insineraciji, 42% reciklaži i kompostiranju, a 40% je odloženo na deponije, dok je u Nemačkoj u 2009. godini reciklirano i kompostirano 66,3%, tretirano insineracijom 31,9% i deponovano 0,4% otpada (Nixon i dr., 2013). Insineracijom otpada se postiže: redukcija zapremine (70–90%) (Dou i dr., 2017) i dobijanje energije.

Insineracijom čvrstog komunalnog otpada nastaju: pepeo, leteći pepeo i ostatak (eng. *Air Pollution Control Residue*, APCr). Maseni odnos pepela i letećeg pepela je uobičajeno od 4:1 do 5:1 (Dou i dr., 2017). Pepeo nastao insineracijom je toksičan zbog prisustva različitih opasnih neorganskih i organskih komponenata, kao što su teški metali i dioksini. Osim toga, pepeo sadrži znatne količine hlorida i sulfata, pa je neophodno njegovo tretiranje pre odlaganja. Trenutno se primenjuje nekoliko tehnika za tretiranje različitih vrsta pepela čvrstog komunalnog otpada uključujući solidifikaciju/stabilizaciju cementom, topljenje, stabilizaciju primenom hemijskih jedinjenja i ekstrakciju toksičnih komponenti (Saikia i dr., 2015). Pepeo i leteći pepeo mogu biti iskorišćeni u proizvodnji cementa i betona. Leteći pepeo može biti upotrebljen u proizvodnji cementnog klinkera, dok se pepeo može primeniti kao aditiv u cementu ili upotrebiti u izgradnji puteva, odnosno kao bazni putni materijal (Saikia i dr., 2015).

## 2.2. Nusproizvodi prerade višnje i trešnje

### 2.2.1. Višnja

Višnja pripada porodici ruža (*Rosaceae*) (Tabela 5), poreklom iz zapadne Azije i jugoistočne Evrope (Baris i dr., 2017). Pojedini autori smatraju da je obična višnja (*Prunus cerasus* L.) nastala ukrštanjem divlje trešnje (*Cerasus avium* L.) sa stepskom višnjom (*Prunus fruticosa* Pall.) (Blagojević i dr., 2012).

Tabela 5. Taksonomija višnje (*Prunus cerasus* L.).

Carstvo	<i>Plantae</i>
Divizija	<i>Magnoliophyta</i>
Klasa	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Rosales</i>
Porodica	<i>Rosaceae</i>
Rod	<i>Prunus</i>
Vrsta	<i>Prunus cerasus</i>

Srbija je četvrta zemlja u Evropi po površini na kojoj se uzgaja višnja (13990 ha) (Keserović i dr., 2016). Na našim prostorima višnja se gaji u južnoj i istočnoj Srbiji, Mačvi, delovima Šumadije, Sremu, severu Bačke i srednjem Banatu. Od mnogobrojnih dostupnih sorti višnje uglavnom se gaji oblačinska višnja (Tabela 6). Turska je najveći proizvođač višnje u svetu sa godišnjom proizvodnjom od 192705 tona, zatim sledi Poljska (189200 t), Ruska Federacija (170000 t) i Sjedinjene Američke Države (160118 t) (Angin, 2014). Višnja se koristi za proizvodnju sokova, nektara, alkoholnih pića, džemova i kao sastojak mlečnih i konditorskih proizvoda (Kołodziejczyk i dr., 2013).

Tabela 6. Privredno značajne sorte višnje.

<i>Sorta</i>	<i>Poreklo</i>	<i>Vreme sazrevanja</i>	<i>Prosečna masa ploda [g]</i>	<i>Ukus</i>	<i>Primena</i>
<i>Erdska rodna</i>	Mađarska	Krajem druge dekade juna	6,5	Slatko-nakiseli	Stona potrošnja i prerada
<i>Oblačinska višnja</i>	Tačno poreklo nije utvrđeno	Druga dekada juna	2,5–4,0	Slatko-kiselkast	Zamrzavanje i razni vidovi prerade
<i>Reksele</i>	Nemačka	Treća dekada juna	5,5	Kiseo	Zamrzavanje i razni vidovi prerade
<i>Ujferhetska grozdasta</i>	Mađarska	Kraj juna, početak jula	7	Slatko-kiselkast	Stona potrošnja i prerada
<i>Šumadinka</i>	Srbija	Prva dekada jula	7	Izrazito kiseo	Razni vidovi prerade

Plod višnje u proseku sadrži 12–22% suve materije, 10–13% šećera, 1–2,4% organskih kiselina, 0,7–1,9% proteina, oko 0,5% mineralnih materija i oko 15 mg vitamina C i drugih korisnih supstanci (Mézes i dr., 2017). Višnje sadrže znatnu količinu antocijanina koji se odlikuju antioksidativnim i antiinflamatornim svojstvima (Blando i dr., 2004). Među brojnim jedinjenjima najznačajniji identifikovani antocijanini su: cijanidin-3-*O*-(2'-glukozil)-rutinozid, cijanidin-3-*O*-soforozid i cijanidin-3-*O*-rutinozid (Wojdyło i dr., 2014).

Bioaktivna jedinjenja su identifikovana u svim delovima višnje. Iz koštice višnje izolovani su avenasterol-5-en, avenasterol-7-en, sitosterol, stigmasterol i stigmast-7-enol, dok je prunetin-5-glukozid detektovan u peteljka, a kvercetin-3-*O*-rutinosil-7, kemferol-3-*O*-rutinosil-4-4'-di-*O*-glukozid i kvercetin-3-*O*-rutinosil-4'-di-*O*-glukozid su identifikovani u svežim listovima i voću (Ahmad i dr., 2017). Tektokrizin-5-glukozid, genistein-5-glukozid i prunetin-5-glukozid izolovani su iz kore višnje (Geibel i dr., 1990), kao i pinostrobin-5- $\beta$ -D-glukozid, apigenin-5-glukozid, genkvanin-5-glukozid i neosakuranin (Geibel i Feucht, 1991). Flavonodi kemferol, izoramnetin-3-*O*- $\beta$ -rutinozid, kvercetin i kvercetin-3-*O*- $\beta$ -glukopiranozid, kao i fenolne kiseline *p*-hidroksibenzoeva, protokatehinska i vanilinska kiselina, identifikovani su u voću (Piccolella i dr., 2008). Osim toga, ovi autori su izolovali epikatehin-3-malat i epikatehin-3-(1''-metil)malat iz pomenutog voća. Nadalje, u višnjama su identifikovane neohlorogenska i hlorogenska kiselina, derivati *p*-kumarinske kiseline, kao i antocijanini, uključujući cijanidin-3-glukozil-rutinozid, cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinozid (Kim i dr., 2005). Prema ovim autorima, zahvaljujući velikom sadržaju fenola, posebno antocijanina, koji se odlikuju jakom antineurodegenerativnom aktivnošću, preporučuje se konzumiranje višanja i trešanja.

Preradom višnje zaostaje velika količina koštice, najčešće bez ikakve dalje primene. Prema Yilmaz i Gökmen-u (2013) koštica višnje može biti iskorišćena kao izvor dijetetskih vlakana, proteina i lipida. Međutim, prisustvo cijanogenih glikozida ograničava njihovu primenu. U studiji Senica i dr. (2017) u koštici višnje je detektovan amigdalin, neoamigdalin i prunazin. Sadržaj amigdalina u koštici se kretao od 2 do 2,8 mg/g, a neoamigdalina i prunazina od 0,032 do 0,035 i od 1 do 1,3 mg/g, redom.

Ulje ekstrahovano iz koštica višnje je bogato polinezasićenim masnim kiselinama, tokoferolima,  $\beta$ -karotenom i fenolnim jedinjenjima. U ulju je detektovano prisustvo palmitinske (6,4%), stearinske (1,2%), oleinske (46,3%), linolne (41,5%) i linoleinske kiseline (4,6%). Górnáš i dr. (2016a) su u ulju koštice višnje detektovali, po prvi put, prisustvo  $\alpha$ -eleostearinske kiseline. Pomenuta kiselina poseduje potentnu antioksidativnu i antitumornu aktivnost (Zhang i dr., 2012). su u semen

Angin (2014) je u studiji demonstrirao mogućnost dobijanja aktivnog uglja od koštica višnje putem hemijske aktivacije pomoću  $ZnCl_2$ . Prema autoru, pri optimalnim uslovima (700 °C, odnos impregnacije 3:1) dobijeni aktivni ugalj je imao sadržaj ugljenika od 80,78%, vodonika od 1,87%, azota od 1,54% i kiseonika od 15,81%. U studiji González i dr. (2003) je demonstrirana piroliza koštica višnje u atmosferi azota. Prinosi frakcija su varirali u opsezima od 20 do 56,8% za koks, od 32 do 58% za bio-ulje i od 8,8 do 47,6% za gas, sa prosečnom toplotnom moći od 31,8 MJ/kg, 11,5 MJ/kg i 15,7 MJ/Nm<sup>3</sup>, redom. Prema autorima, glavne komponente bio-ulja su bili alifatični i aromatični ugljovodonici i hidroksilna i karboksilna jedinjenja usled kojih takvo ulje može biti primenjeno kao tečno gorivo ili kao izvor tečnih ugljovodonika. Gasnu fazu su činili vodonik, ugljen-monoksid, ugljen-dioksid, metan i tragovi etilena i etana. Dobijeni gas može biti iskorišćen kao izvor toplote u pirolitičkom reaktoru ili za generisanje toplote/struje u kombinovanom ciklusu gasne i parne turbine. Koks se odlikovao sadržajem ugljenika iznad 70% i velikom toplotnom vrednošću usled čega je podesan kao čvrsto gorivo, prekursor u proizvodnji aktivnog uglja ili za dobijanje briketa.

U industriji soka se prilikom proizvodnje soka od višnje generiše velika količina presovane pulpe, koja je značajan izvor polifenola. Cilek i dr. (2012) su odredili ukupan sadržaj fenola u liofilizovanom ekstraktu pulpe višnje, u iznosu od 91,29 mg ekvivalenta galne kiseline/g suve mase. U studiji Šaponjac i dr. (2016) ekstrakt pulpe višnje je inkapsuliran u surutku i proteine soje i inkorporiran u keks s ciljem dobijanja fortifikovanog proizvoda. Prema autorima, zamenom brašna inkapsulatom osim poboljšanja nutritivne vrednosti (polifenolni sadržaj i antioksidativna aktivnost) i boje proizvoda, postignuta je i njihova stabilnost. U studiji Oancea i dr. (2018) je demonstrirana mogućnost inkapsuliranja ekstrakta antocijanina kožica



višnje u smešu izolata proteina surutke i akacija gume sa efikasnošću inkapsulacije od oko 70%. Prema autorima, izolat proteina surutke štiti antocijanine od želudačne digestije. Sem toga, inkapsulirani ekstrakt višnje može biti upotrebljen kao faktor rasta probiotičkog soja *Lactobacillus casei*<sup>®</sup>.

### 2.2.2. Trešnja

Trešnja (*Prunus avium* Linnaeus (L.)) takođe pripada porodici ruža (*Rosaceae*) (Tabela 7). Plodovi trešnje su uglavnom slatkog do gorkog ukusa, a koriste se za proizvodnju džemova, želea, marmelada, kompoti, sokova ili sirupa. Trešnjino drvo se koristi u industriji nameštaja i za izradu muzičkih instrumenata.

Prema podacima koje su naveli Wunsch i Hormaza (2002) trešnje vode poreklo iz oblasti oko Kaspijskog i Crnog mora, a danas se mogu naći duž kontinentalnog dela Evrope i područja zapadne Azije. Trešnje daju dobre prinose na peskovitim ilovačama, aluvijalnim gajnjačama, i karbonatnim černozemima. Srbija je na 14. mestu u Evropi po površini na kojoj se uzgaja trešnja (3682 ha). Najveće površine nalaze se u opštini Grocka (1032 ha), što čini više od 25% ukupne površine u našoj zemlji (Keserović i dr., 2016). Neke od privredno značajnih sorti trešnje date su u Tabeli 8. Turska je najveći proizvođač trešnje u svetu sa 494325 tona proizvedenih u 2013. godini (Ouaabou i dr., 2018). Iza nje slede Sjedinjene Američke Države (301205 t), Iran (200000 t), Italija (131205 t) i Ruska Federacija sa 78000 tona.

Tabela 7. Taksonomija trešnje (*Prunus avium* L.).

Carstvo	<i>Plantae</i>
Divizija	<i>Magnoliophyta</i>
Klasa	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Rosales</i>
Porodica	<i>Rosaceae</i>
Rod	<i>Prunus</i>
Vrsta	<i>Prunus avium</i>

Tabela 8. Privredno značajne sorte trešnje.

<i>Sorta</i>	<i>Poreklo</i>	<i>Vreme sazrevanja</i>	<i>Prosečna masa ploda [g]</i>
<i>Burlat</i>	Francuska	Druga dekada maja u Srbiji	7
<i>Karmen</i>	Mađarska	Kraj maja, početak juna	10
<i>Samit</i>	Kanada	Prva dekada juna	9,5
<i>Van</i>	Kanada	Prva dekada juna	7
<i>Kordija</i>	Češka	Sredina juna	9
<i>Germersdorfska</i>	Nemačka	Sredina juna	8-9
<i>Regina</i>	Nemačka	Kraj juna	8
<i>Svithart</i>	Kanada	Kraj juna, početak jula	7,5

Trešnje sadrže značajne količine važnih nutritijenata i bioaktivnih komponenata, uključujući glukozu, fruktozu, vitamin C, antocijanine (cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-glukozid, pelargonidin-3-rutinozid, peonidin-3-rutinozid, peonidin-3-glukozid), neohlorogensku i *p*-kumaroilhininsku kiselinu (Gao i Mazza, 1995). U trešnjama su identifikovane kafena, protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarinska, vanilinska, ferulna (Mattila i dr., 2006) i hlorogenska kiselina (Ballistreri i dr., 2013) kao i flavan-3-oli (katehin i epikatehin) (Wang i sar., 2017a). Plod trešnje takođe sadrži organske kiseline, kalijum, masne kiseline i karotenoide (Gonçalves i dr., 2017a). Karakteriše ga visok sadržaj vode (oko 80%) i nizak sadržaj natrijuma. U plodu i koštici trešnje je identifikovan amigdalin, a prunazin još i u cvetu i peteljka, redom (Del Cueto i dr., 2017). Visok sadržaj antioksidanata i fitohemikalija u trešnjama povezan je sa zdravstveno povoljnim delovanjem. Prema Jakob i dr. (2003) konzumiranje trešanja smanjuje nivo urata u plazmi delujući pozitivno kod gihta. U studiji Sharma i Sisodia (2014) demonstrirano je radioprotektivno delovanje ekstrakta trešnje u mozgu albino miša. Autori smatraju da je ovo delovanje ekstrakta povezano sa antioksidativnom aktivnošću njegovih konstituenata.

Trešnja se većinom konzumira u svežem stanju, a određeni procenat (oko 15% proizvodnje u Evropskoj uniji) se obradi u prehrambenoj industriji, pri čemu se generiše znatna količina otpada (koštica) sa limitiranom upotrebom. Godišnje se u Srbiji proizvede približno 140000 tona višnje i trešnje. Prosečna težina voća je od 2,6 do 3 g pri čemu koštica čini 15% ukupne težine ploda, što ukazuje da se oko 21000 tona organskog čvrstog otpada proizvede kao sporedni produkt (Pap i dr., 2016). Koštice voća su koristan izvor ulja bogatog funkcionalnim

bioaktivnim jedinjenjima, kao što su masne kiseline, tokohromanoli, karotenoidi, fitosteroli i skvaleni (Górnaš i dr., 2016b). Prema Górnaš i dr. (2016b) glavne masne kiseline u ulju koštice trešnje su oleinska (33,62–49,92%), linolna (31,13–38%),  $\alpha$ -eleostearinska (7,23–10,73%) i palmitinska kiselina (5,59–7,10%). U ispitivanim uzorcima sadržaj ukupnih tokohromanola i sterola se kretao od 83,1 do 111,1 i od 233,6 do 419,4 mg/100 g ulja, redom. Górnaš i dr. (2015) su demonstrirali upotrebu koštice trešnje za ekstrakciju tokoferola. Vukelić i dr. (2018) su demonstrirali dobijanje aktivnog uglja iz smeše koštice višnje i trešnje (1:1). Prema autorima, cena ovako dobijenog uglja je više od šest puta niža u odnosu na komercijalni aktivni ugalj, a primena istovetna. Ona uključuje upotrebu u sistemima za prečišćavanje vazduha i vode kao filter za teške metale, ugljovodonike i organske kontaminante.

List i peteljku trešnje karakteriše veći sadržaj ukupnih dijetetskih vlakana, vitamina C, ukupnih karotenoida i polifenola u odnosu na plod (izuzev antocijanina koji su detektovani samo u plodu) (Dziadek i dr., 2019). U listu je detektovana kafena, hlorogenska, *p*-kumarinska i ferulna kiselina kao i flavonol miricetin, dok su u peteljci trešnje pored miricetina detektovane kafena, hlorogenska i *p*-kumarinska kiselina. Prema autorima, usled značajnog sadržaja antioksidanasa listovi i peteljke trešnje mogu biti potencijalni izvor za proizvodnju funkcionalne hrane kao što su pića i prehrambeni aditivi, u formi liofilizovanih prahova ili ekstrakata.

## 2.3. Biološka aktivnost prirodnih jedinjenja

Poslednjih decenija farmakološka, medicinska i biohemijska svojstva fenolnih jedinjenja su dokumentovana brojnim radovima. Studije su potvrdile njihovo antioksidativno (Wen i dr., 2017; Grzesik i dr., 2018), antibakterijsko (Iranshahi i dr., 2015), antiinflamatorno (Miguel, 2011; Procházková i dr., 2011), antikancerogeno, antiviralno kao i inhibitorno dejstvo prema fosfolipazi A<sub>2</sub>, ciklooksigenazi, lipoksigenazi, glutation reduktazi i ksantin oksidazi (Leopoldini i sar., 2011), zbog čega je velika pažnja naučne javnosti usmerena ka pomenutim jedinjenjima.

### 2.3.1. Fenolna jedinjenja

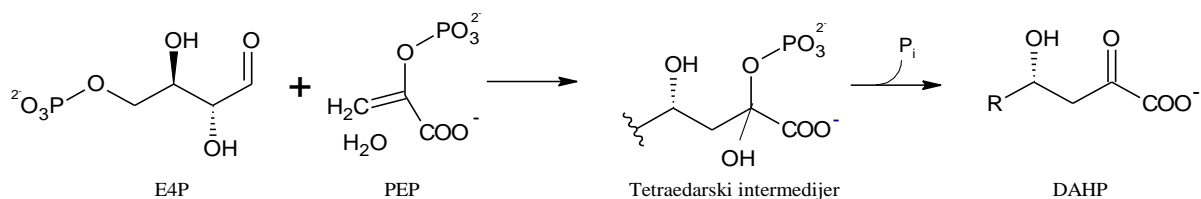
Fenolna jedinjenja ili polifenoli predstavljaju široko rasprostranjenu heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita, sa više od 8000 identifikovanih jedinjenja, i jednu od najvažnijih klasa prirodnih antioksidanasa. U svojoj osnovnoj strukturi ova jedinjenja sadrže najmanje jedan aromatski prsten (C<sub>6</sub>) sa jednom ili više hidroksilnih grupa, pored ostalih supstituenata kao što su metoksil (-OCH<sub>3</sub>) i karboksil (-COOH) grupe.

U literaturi se navode različite klasifikacije fenolnih jedinjenja. Međutim, najčešća klasifikacija se zasniva na broju atoma ugljenika koji su vezani za osnovni skelet fenola (Robards i dr., 1999), što je prikazano u Tabeli 9.

Biogenetski put nastanka fenolnih jedinjenja može biti različit. Metabolički put šikimske kiseline predstavlja glavni hemizam biosinteze fenolnih jedinjenja u biljkama. Ciklus počinje reakcijom fosfoenolpiruvata (PEP) i eritroze-4-fosfata (E4P) u kojoj nastaje 3-deoksi-D-arabinoheptulozonat-7-fosfat (DAHP) (Balachandran i dr., 2016) (Slika 7). Nizom složenih biohemijskih reakcija nastaje šikimska kiselina (Dewick, 2002) koja je glavni prekursor u sintezi aromatičnih aminokiselina poput fenilalanina, tirozina i triptofana. Daljim transformacijama fenilalanina i tirozina dobijaju se različite klase polifenolnih jedinjenja. Ciklusom šikimske kiseline nastaju jedinjenja C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> tipa, odnosno B i C prsten flavonoida (Delgado-Vargas i Paredes-López, 2003).

Tabela 9. Klasifikacija fenolnih jedinjenja.

<i>Osnovni skelet</i>	<i>Klasa</i>	<i>Primeri</i>
$C_6$	Prosti fenoli Benzohinoni	Katehol, hidrohinon, rezorcinol
$C_6-C_1$	Fenolne kiseline	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina, salicilna kiselina
$C_6-C_2$	Fenilsirćetne kiseline	<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina
$C_6-C_3$	Cimetne kiseline Fenilpropeni Kumarini Hromoni	Kafena kiselina, ferulna kiselina Eugenol, miristicin Umbeliferon, eskuletin, skopolin Eugenin
$C_6-C_4$	Naftohinoni	Juglon
$C_6-C_1-C_6$	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
$C_6-C_2-C_6$	Stilbeni Antrahinoni	Rezveratrol Emodin
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoidi Flavoni Flavonoli Flavonol glikozidi Flavanonoli  Flavanoni Flavanon glikozidi  Antocijanini  Flavanoli (katehini)  Halkoni	Sinensetin, nobiletin, tangeretin Kvercetin, kemferol Rutin Dihidrokvercetin i dihidrokemferol glikozidi Hesperetin, naringenin Hesperidin, neohesperidin, narirutin, naringin, eriocitrin Glikozidi pelargonidina, peonidina, delfinidina, petunidina, cijanidina Katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin Florizin, arbutin
$(C_6-C_3)_2$	Lignini	Pinorezinol
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonoidi	Agatisflavon



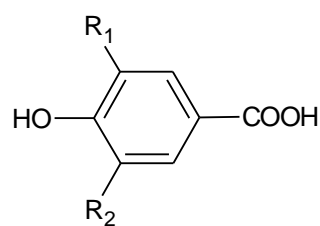
Slika 7. Sinteza 3-deoksi-D-arabinoheptulozonat-7-fosfata (DAHP).

Drugi način odvijanja biosinteze fenolnih jedinjenja je acetogeninski put. Ovim metaboličkim putem se dobijaju fenolna jedinjenja poput izokumarina, orcinola, depsidona, ksantona, hinona. Pojedine grupe polifenola mogu biti sintetisane i kombinacijom ova dva puta, što predstavlja mešoviti put biogenerisanja polifenola. Biosinteza i akumulacija fenolnih jedinjenja se kontroliše endogeno tokom rasta biljke. Egzogeni faktori kao što su svetlost, temperatura, oštećenja i drugi faktori koji indukuju stres (Cvetanović, 2016) takođe značajno utiču na biosintezu fenolnih jedinjenja.

#### 2.3.1.1. Fenolne kiseline

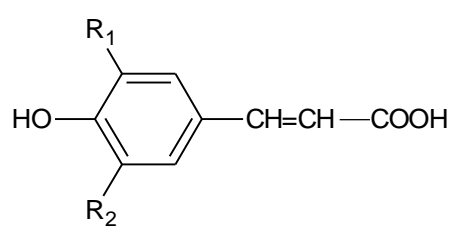
Pojam fenolne kiseline obuhvata sva jedinjenja koja sadrže najmanje jednu fenolnu i jednu karboksilnu grupu. Najznačajnije fenolne kiseline su derivati benzoeve kiseline i derivati cimetine kiseline (Slika 8).

a)



$R_1=R_2=H$ : *p*-hidroksibenzoeva kiselina  
 $R_1=OH, R_2=H$ : protokatehinska kiselina  
 $R_1=R_2=OH$ : galna kiselina  
 $R_1=OCH_3, R_2=H$ : vanilinska kiselina  
 $R_1=R_2=OCH_3$ : siringinska kiselina

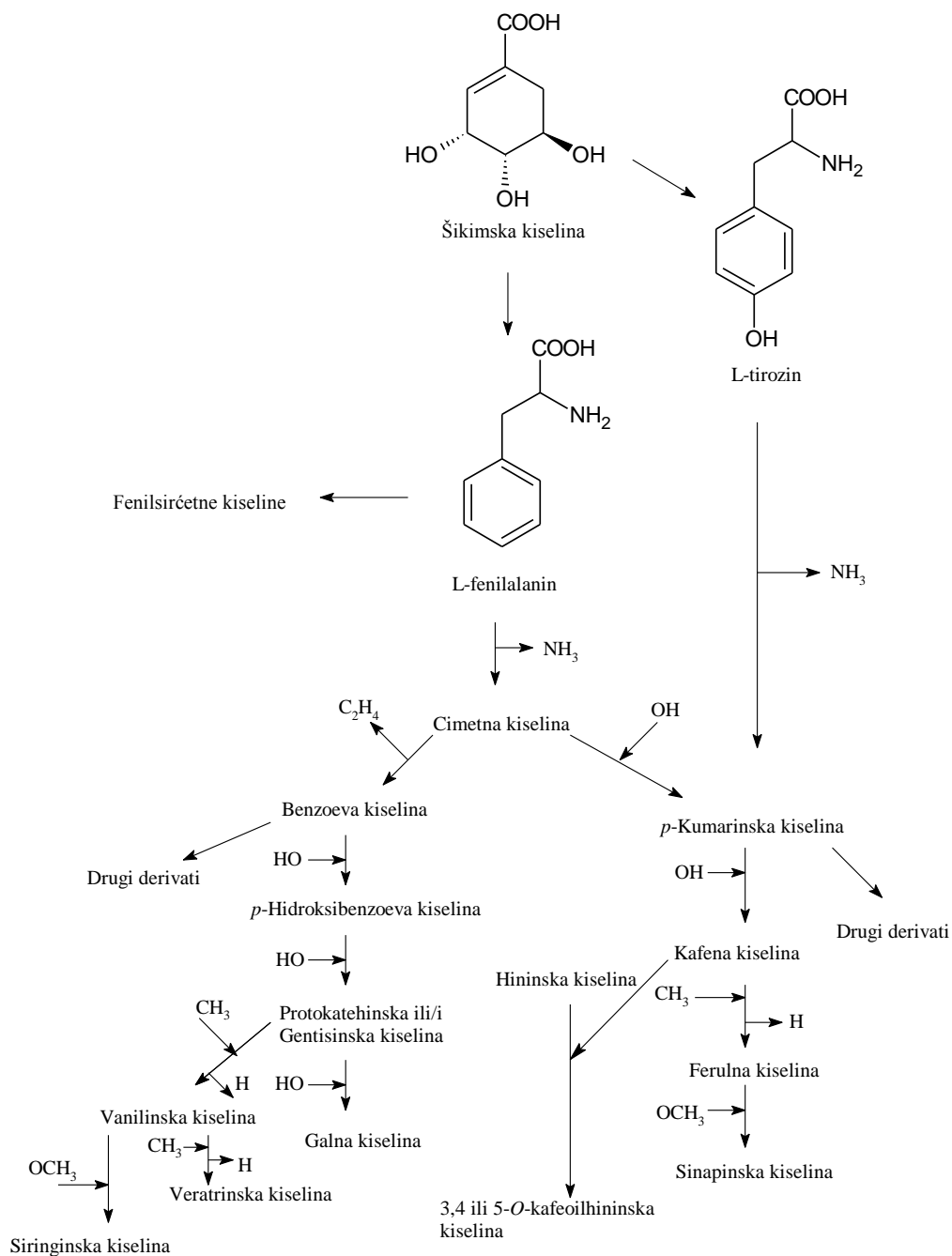
b)



$R_1=R_2=H$ : *p*-kumarinska kiselina  
 $R_1=OH, R_2=H$ : kafena kiselina  
 $R_1=OCH_3, R_2=H$ : ferulna kiselina  
 $R_1=R_2=OCH_3$ : sinapinska kiselina

Slika 8. Struktura fenolnih kiselina: a) derivati benzoeve kiseline i b) derivati cimetine kiseline.

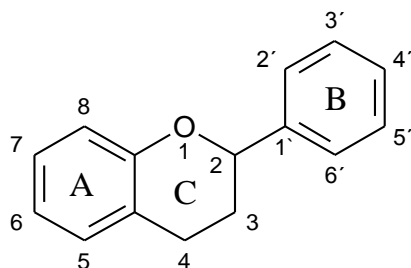
Fenolne kiseline nastaju putem šikimske kiseline iz L-fenilalanina ili L-tirozina (Heleno i dr., 2015) (Slika 9). Najpre, reakcijama deaminacije L-fenilalanina i/ili L-tirozina nastaju cimetna i/ili *p*-kumarinska kiselina, redom. Zatim, hidroksilacijom cimetne kiseline i potom nastale *p*-kumarinske kiseline dobija se kafena kiselina, a njenim metilovanjem ferulna kiselina. Degradacijom bočnog lanca cimetne kiseline dobija se benzoeva kiselina koja se dalje transformiše reakcijama hidroksilacije do *p*-hidroksibenzoeve, protokatehinske i galne kiseline. Degradacijom bočnog lanca cimetne kiseline dobija se benzoeva kiselina koja se dalje transformiše reakcijama hidroksilacije do *p*-hidroksibenzoeve, protokatehinske i galne kiseline.



Slika 9. Šematski prikaz biosinteze fenolnih kiselina.

## 2.3.1.2. Flavonoidi

Najveću grupu biljnih polifenola čine flavonoidi (Rice-Evans, 1997) sa više od 6000 identifikovanih jedinjenja (Singh i dr., 2017a). Prisutni su u voću, povrću, biljnim plodovima, čaju, crnom vinu, u listovima, semenu, kori i cvetovima biljaka (Hollman i Katan, 1999; Kale i dr., 2008). Osnovni strukturni skelet flavonoida čini petnaest atoma ugljenika u osnovnoj C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> strukturi (Slika 10), od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C), a ostalih šest ugljenikovih atoma čine benzenski prsten B povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji C-2 (flavoni, flavonoli, flavanoni, flavani i antocijanidini), na poziciji C-3 (izoflavoni) i na poziciji C-4 (neoflavoni).



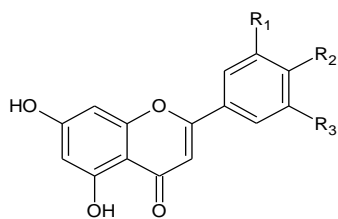
Slika 10. Osnovna struktura flavonoida.

U zavisnosti od stepena oksidacije i supstitucione šeme piranskog prstena C, flavonoidi se mogu podeliti na više strukturno različitih klasa jedinjenja, od kojih su neka prikazana na Slici 11.

Raznovrsnost i veliki broj flavonoida posledica su brojnih modifikacija njihove osnovne skeletne strukture, kao što su hidroksilacija, metilacija, dimerizacija i glikolizacija (Rice-Evans i dr., 1997). Glikolizacijom hidroksilnih grupa nastaju O-glikozidi, a flavonoidnog jezgra C-glikozidi. Glikolizacija se najčešće javlja u poziciji 7 kod flavona, flavanona i izoflavona, u poziciji 3 i 7 kod flavonola i flavanola i u poziciji 3 i 5 kod antocijanidina (Cuyckens i Claeys, 2004). C-glikolizacija se odigrava samo u poziciji 6 i/ili 8 (Cuyckens i Claeys, 2004). Glukoza je najčešća šećerna komponenta glikozida, a za njom slede galaktoza, ramnoza, ksiloza i arabinoza, dok su manoza, fruktoza, glukuronska i galakturonska kiselina veoma retke (Markham, 1982; Iwashina, 2000). Od disaharida najprisutniji su rutinoza i neohesperidoza.



## a) Flavoni

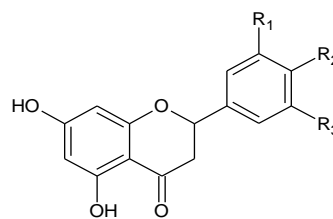


$R_1=R_3=H$ ,  $R_2=OH$ : apigenin

$R_1=R_2=OH$ ,  $R_3=H$ : luteolin

$R_1=R_2=R_3=OH$ : tricetin

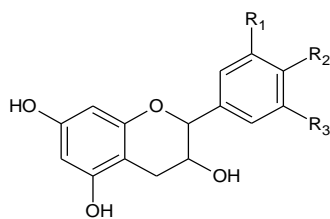
## b) Flavanoni



$R_1=R_3=H$ ,  $R_2=OH$ : naringenin

$R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ ,  $R_3=H$ : hesperetin

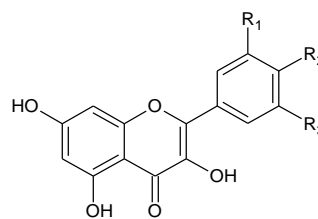
## c) Flavan-3-oli



$R_1=R_2=OH$ ,  $R_3=H$ : katehin

$R_1=R_2=R_3=OH$ : galokatehin

## d) Flavonoli



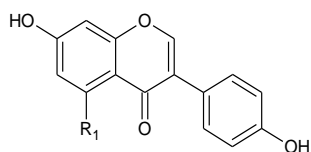
$R_1=R_3=H$ ,  $R_2=OH$ : kemferol

$R_1=R_2=OH$ ,  $R_3=H$ : kvercetin

$R_1=R_2=R_3=OH$ : miricetin

$R_1=OCH_3$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=H$ : izoramnetin

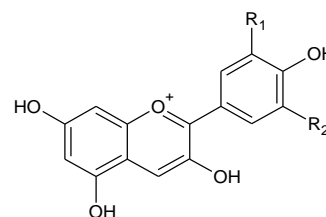
## e) Izoflavoni



$R_1=H$ : daidžein

$R_1=OH$ : genistein

## f) Antocijanidini

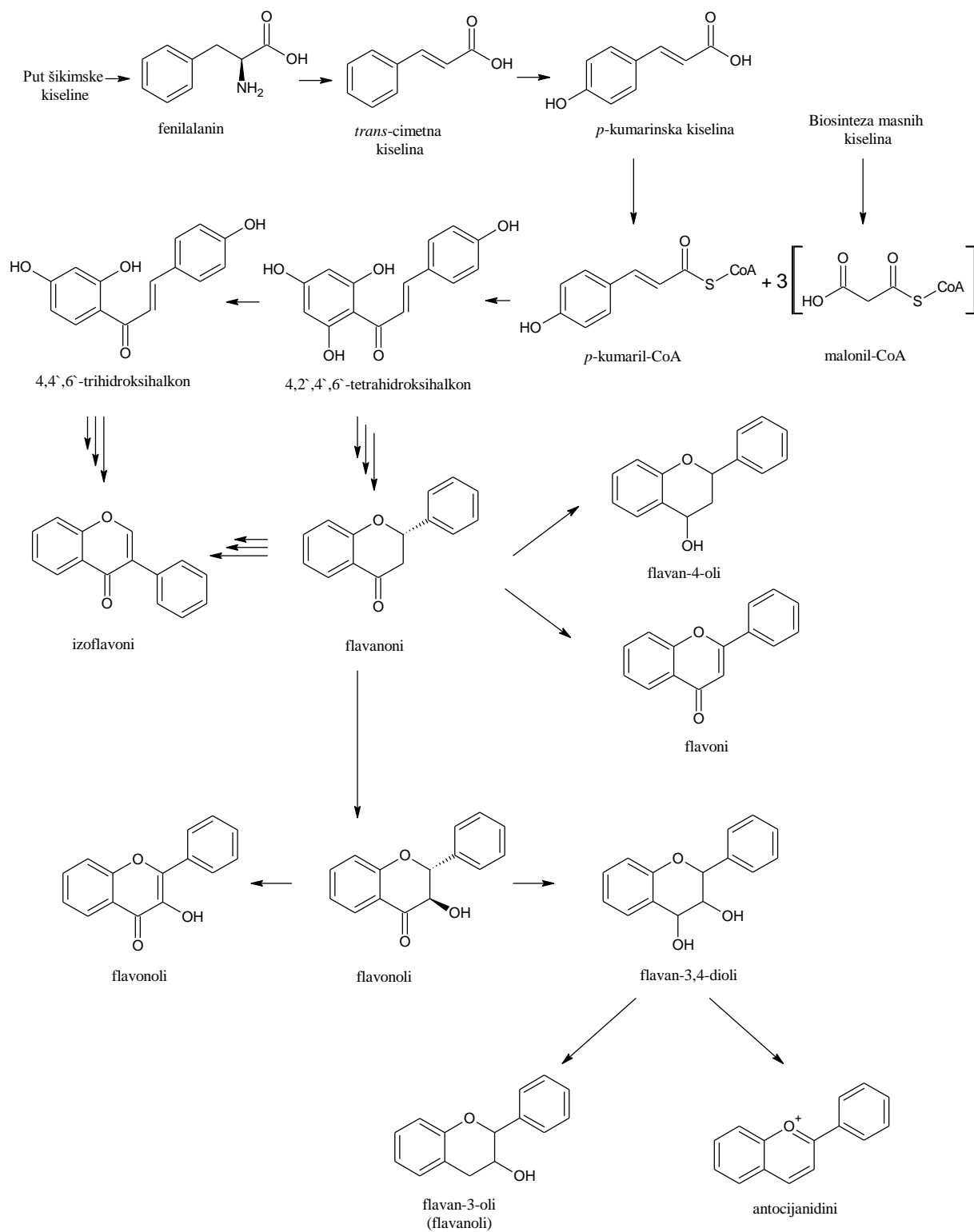


$R_1=OH$ ,  $R_2=H$ : cijanidin

$R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ : petunidin

Slika 11. Hemijske strukture različitih klasa flavonoida.

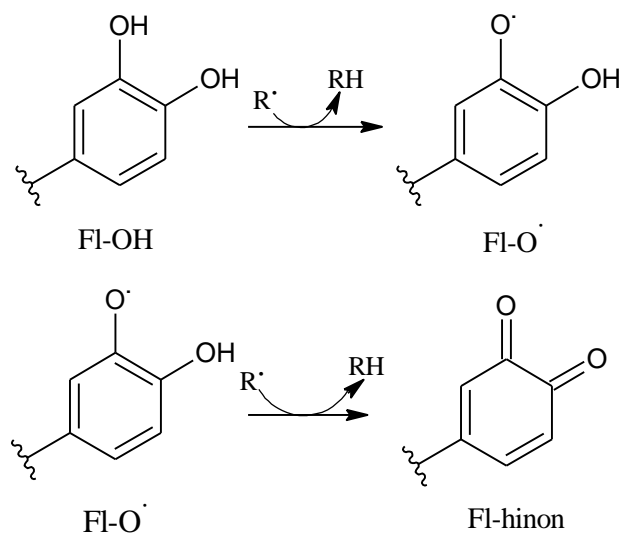
Flavonoidi nastaju kombinovanim biosintetskim putem (putem šikimske kiseline i acetogeninskim putem). Biosinteza flavonoida počinje kondenzacijom tri molekula malonil-CoA (koenzim A) sa molekulom *p*-kumaroil-CoA i obrazovanjem 4,2',4',6'-tetrahidrohalkona, čijom ciklizacijom nastaje piranski prsten C i formira se flavanon (Slika 12). Daljim transformacijama nastaju svi ostali tipovi flavonoidnih molekula i to: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, flavan-4-oli, flavan-3,4-dioli, izoflavoni, antocijanidini (Raffa i dr., 2017), auron, halkoni i proantocijanidini.



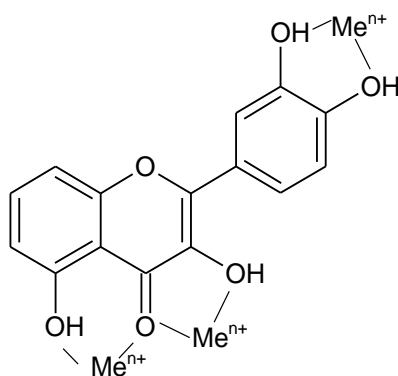
Slika 12. Biosintetski put nastanka flavonoida.

Biološki i farmakološki efekat flavonoida vezan je za inhibiciju određenih enzima i njihov antioksidativni potencijal. Antioksidativni kapacitet mnogih flavonoida je znatno veći od vitamina C i E (Procházková i dr., 2011). Flavonoidi svoje antioksidativno dejstvo pokazuju na nekoliko načina:

- „Hvatači“ su reaktivnih vrsta kiseonika, pri čemu sami prelaze u radikale. Flavonoidi (Fl-OH) otpuštaju vodonikov atom stvarajući radikal flavonoida (Fl-O<sup>•</sup>) (Slika 13) koji naknadno može da otpusti još jedan vodonikov atom reagujući sa drugim slobodnim radikalom (R<sup>•</sup>). Naknadno otpuštanje vodonikovog atoma može biti mehanizam prevođenja radikala u hinon (Procházková i dr., 2011).
- Heliraju metalne jone (Cu, Fe); raspored hidroksilnih grupa i karbonilna grupa u poziciji 4 prstena C (Leopoldini i dr., 2011) omogućava građenje stabilnih helatnih kompleksa sa jonima gvožđa i/ili bakra (Me<sup>n+</sup>) (Slika 14).
- Redukuju  $\alpha$ -tokoferil radikal, koji je potencijalni prooksidant, donirajući mu atom vodonika i sprečavajući oksidaciju lipoproteina male gustine (LDL) (Procházková i dr., 2011).
- Inhibiraju enzime odgovorne za generisanje superoksid-anjon-radikala, kao što su ksantin oksidaza, protein kinaza C, ciklooksigenaza, lipoksigenaza, mikrozomalna monooksigenaza, glutation S-transferaza, mitohondrijalna sukcin oksidaza i NADH oksidaza (Procházková i dr., 2011; Ravishankar i dr., 2013).
- Aktiviraju enzimske antioksidante indukujući enzime II faze detoksifikacije (glutation S-transferazu i UDP-glukuronozil transferazu) koji predstavljaju glavne sisteme odbrane od elektrofilnih toksičnih agenasa i oksidativnog stresa (Ravishankar i dr., 2013).

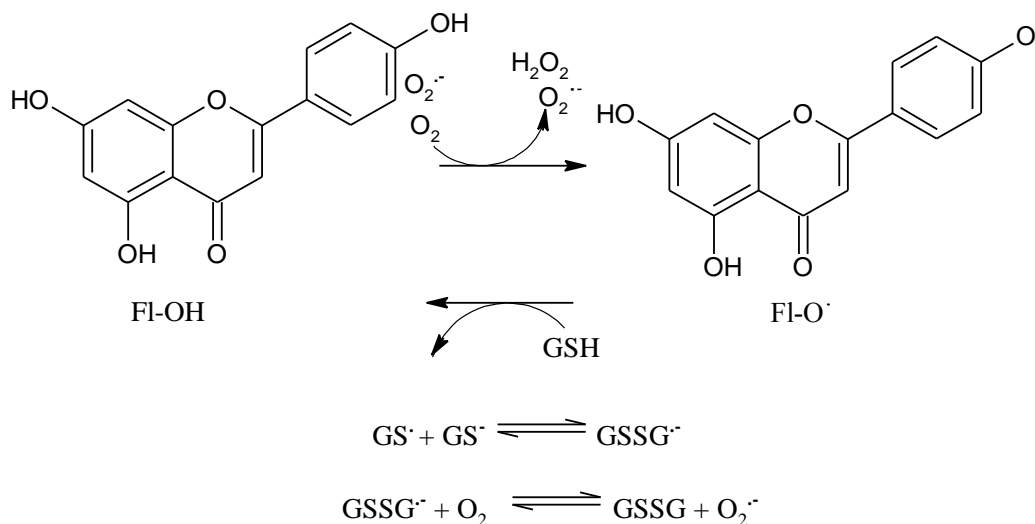


Slika 13. Flavonoidi kao „hvatači“ reaktivnih vrsta kiseonika (R•).

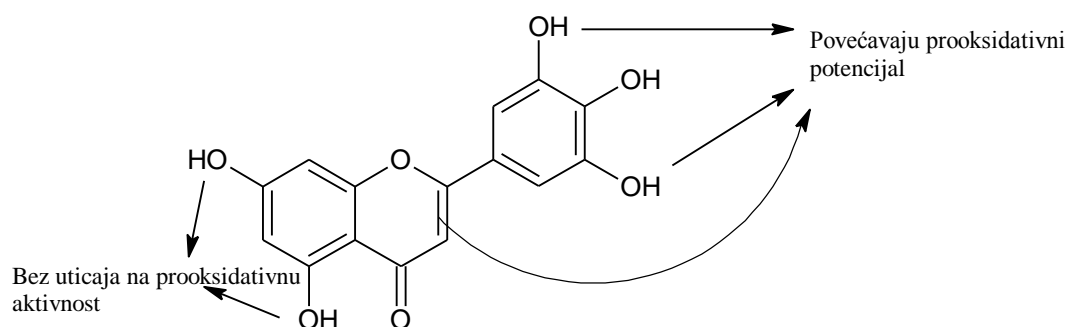


Slika 14. Pozicije vezivanja metalnih jona (Me<sup>n+</sup>) u molekulima flavonoida.

Ponekad u uslovima oksidativnog stresa flavonoidi mogu imati i prooksidativno delovanje, tako da i sami mogu generisati slobodne radikale (Slika 15) (Rietjens i dr., 2002). Broj hidroksilnih grupa, njihova pozicija i prisustvo dvostruke veze u C prstenu su značajni faktori za prooksidativnu aktivnost flavonoida (Eghbaliferiz i Iranshahi, 2016) (Slika 16).



Slika 15. Mehanizam prooksidativnog delovanja flavonoida.



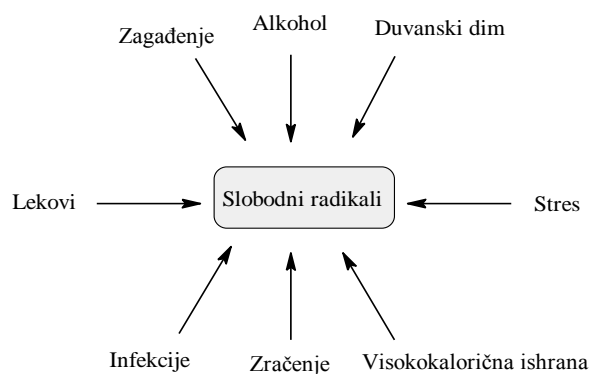
Slika 16. Veza strukture i prooksidativne aktivnosti flavonoida. Korelacija između prooksidativnog potencijala i orto–di/trihidroksilovanog B-prstena i prisutnih dvostrukih veza.

## 2.3.2. Antioksidativno delovanje

### 2.3.2.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su reaktivne vrste u obliku jona, atoma ili molekula sa jednim ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, koji teže formiranju elektronski par. Zahvaljujući nesprenom elektronu slobodno-radikalske vrste karakteriše visoka reaktivnost. Oni lako stupaju u reakciju, međusobno ili sa drugim molekulima, pri čemu nespareni elektroni obrazuju hemijske veze uz oslobađanje energije i prelasku u niže energetske stanje. Slobodni radikali nastaju u aerobnim procesima kao što je ćelijsko disanje, izloženost mikrobnim infekcijama uključujući aktivaciju fagocita, tokom intenzivnih fizičkih aktivnosti (Pisoschi i Pop, 2015), a

takođe, i delovanjem polutanata/toksina kao što su duvanski dim, alkohol, pesticidi, jonizujuće i ultraljubičasto (UV) zračenje (Slika 17). Profesionalna izloženost metalima sa promenljivom valencom (Fe, Cu, Cd, itd.) i upotreba lekova i drugih ksenobiotika sa redoks-ciklizirajućim metabolizmom (Đukić, 2008) dovode do obrazovanja slobodnih radikala.



Slika 17. Najvažniji izvori slobodnih radikala.

Nespareni elektron slobodnog radikala se može nalaziti na atomu različitih elemenata, te se tako mogu razlikovati reaktivne vrste kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS), reaktivne vrste hlora (eng. *Reactive Chlorine Species*, RCS), reaktivne vrste azota (eng. *Reactive Nitrogen Species*, RNS), reaktivne vrste broma (eng. *Reactive Bromine Species*, RBS) i reaktivne vrste sumpora (eng. *Reactive Sulphur Species*, RSS) (Pinkernell i dr., 2000; Halliwell i Whiteman, 2004; Gruhlke i Slusarenko, 2012; Breton i dr., 2017), čiji je pregled prikazan u Tabeli 10.

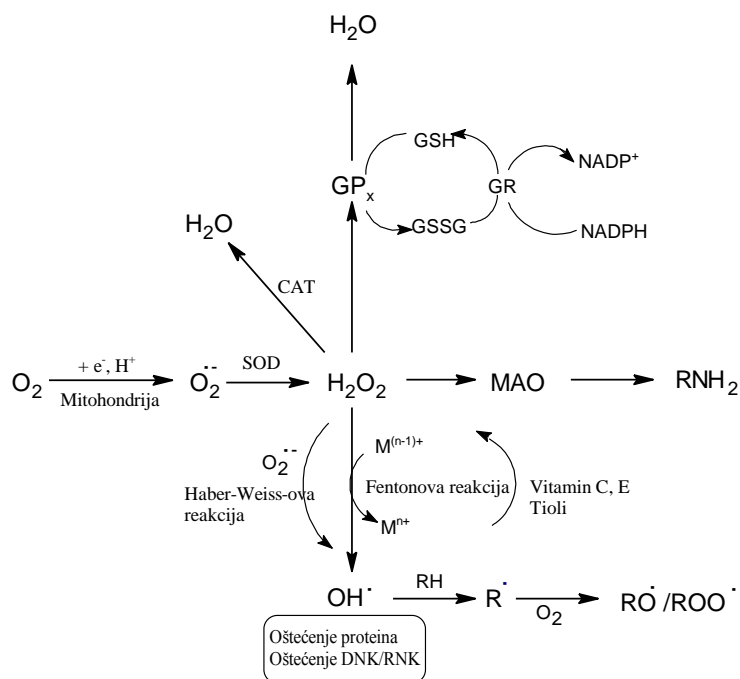
Tabela 10. Reaktivne slobodno-radikalske i neradikalske vrste.

<i>Slobodno-radikalske vrste</i>	<i>Neradikalske vrste</i>
<b><i>Reaktivne vrste kiseonika</i></b>	
Superoksid-anjon-radikal, O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Vodonik-peroksid, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Hidroksil-radikal, OH <sup>•</sup>	Hipobromna kiselina, HOBr
Hidroperoksil-radikal, HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Hipohlorna kiselina, HOCl
Peroksil-radikal, RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Ozon, O <sub>3</sub>
Alkoksil-radikal, RO <sup>•</sup>	Singletni kiseonik, <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Karbonatni radikal, CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Organski peroksidi, ROOH
Ugljendioksidni radikal, CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Peroksinitrit, ONOO <sup>•</sup>
	Peroksinitritna kiselina, ONOOH
<b><i>Reaktivne vrste azota</i></b>	
Azotmonoksidni radikal, NO <sup>•</sup>	Nitritna kiselina, HNO <sub>2</sub>
Azotdioksidni radikal, NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Nitrozil katjon, NO <sup>+</sup>
	Nitrozil anjon, NO <sup>-</sup>
	Azot(III)-oksid, N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	Azot(IV)-oksid, N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
	Peroksinitrit, ONOO <sup>•</sup>
	Peroksinitritna kiselina, ONOOH
	Nitronijum katjon, NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>
	Alkil peroksinitriti, ROONO
	Alkil peroksinitrati, RO <sub>2</sub> ONO
	Nitronijum hlorid, NO <sub>2</sub> Cl
<b><i>Reaktivne vrste hlora</i></b>	
Atomski hlor, Cl <sup>•</sup>	Hipohlorna kiselina, HOCl
	Nitril (nitronijum) hlorid, NO <sub>2</sub> Cl
	Hloramini
	Hlor (gas), Cl <sub>2</sub>
	Brom hlorid, BrCl
<b><i>Reaktivne vrste broma</i></b>	
Atomski brom, Br <sup>•</sup>	Hipobromna kiselina, HOBr
	Brom (gas), Br <sub>2</sub>
	Brom hlorid, BrCl
<b><i>Reaktivne vrste sumpora</i></b>	
Tijl radikal, RS <sup>•</sup>	Tiol, RSH
	Disulfid, RSSR
	Sulfenska kiselina, RSOH
	Tiosulfinat (disulfid-S-monoksid), RS(O)SR
	Tiosulfonat (disulfid-S-dioksid), RS(O <sub>2</sub> )SR

Najznačajniju grupu slobodno-radikalskih vrsta u živim sistemima čine reaktivne vrste kiseonika (ROS), koje se različitim fiziološkim procesima produkuju iz molekuskog kiseonika (Losada-Barreiro i Bravo-Díaz, 2017) (Slika 18). Pored ROS, reaktivne vrste azota (RNS) su



takođe značajne za biološke sisteme. Poznato je da i ROS, kao i RNS, imaju dvostruku ulogu u biološkim sistemima - oni u isto vreme mogu biti štetni i korisni za ljudski organizam (Valko i dr., 2006). U zdravom organizmu, pri niskim koncentracijama, reaktivne vrste kiseonika imaju fiziološku funkciju. Oni regulišu signalne puteve unutar ćelije (Đukić, 2008), a uključeni su i u odbranu od raznih infektivnih agenasa. Pri visokim koncentracijama, ROS uzrokuju oštećenja ćelijskih konstituenata, lipida, proteina ili nukleinskih kiselina (Valko i dr., 2007).



Slika 18. Šematski prikaz nastanka reaktivnih vrsta kiseonika.

$GP_x$  – glutacion peroksidaza;  $GR$  – glutacion reduktaza;  $GSH$  – redukovani oblik glutationa;  $GSSG$  – oksidovani oblik glutationa ili glutacion disulfid;  $SOD$  – superoksid dizmutaza;  $CAT$  – katalaza;  $MAO$  – monoamin oksidaza;  $RH$  – lipid;  $NADPH$  – redukovani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata;  $NADP^+$  – oksidovani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata;  $DNK$  – dezoksiribonukleinska kiselina;  $RNK$  – ribonukleinska kiselina.

Od svih ROS, najveću reaktivnost i toksičnost poseduje hidroksil radikal. Vreme poluživota ovog radikala u vodenim rastvorima kraće je od 1 ns (Jomova i Valko, 2011). *In vivo* hidroksil radikal izaziva velika oštećenja unutar ćelije (Tabela 11) i nespecifično napada i oštećuje sve ćelijske biomolekule, inicirajući pri tome lančane, slobodno-radikalske procese i uzrokujući razne ćelijske i metaboličke poremećaje (Vlaisavljević, 2014).

Ovaj radikal nastaje tokom hemijskih reakcija u prisustvu redukovanih oblika prelaznih metala ili  $O_2^{\cdot-}$  u Fentonovoj reakciji ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$ ) i Haber-Weiss-ovoj reakciji ( $Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$  (I stupanj),  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$  (II stupanj)), u specijalnom slučaju Fentonove reakcije ( $Fe^{3+} + OH^- \rightarrow Fe^{2+} + OH^{\cdot}$ ) (Patlevič i dr., 2016), tokom fotohemijskih reakcija razlaganja vode dejstvom jonizujućeg zračenja, homolitičkim raskidanjem O-O veze pod dejstvom toplotne energije, a može nastati i reakcijom vode i ozona u alkalnoj sredini.

Tabela 11. Karakteristike nekih ROS u biljnim i animalnim ćelijama (Mittler, 2017).

<i>ROS</i>	<i>Vreme poluživota</i>	<i>Radijus dejstva</i>	<i>Način delovanja</i>	<i>Mesto nastanka</i>	<i>„Hvatači“ ROS</i>
$O_2^{\cdot-}$	1-4 $\mu$ s	30 nm	Reaguje sa Fe-S-proteinima dizmutujući u $H_2O_2$	Apoplast, hloroplasti, mitohondrija, peroksizomi, transportni lanci elektrona	SOD, flavonoidi, askorbat
$OH^{\cdot}$	1 ns	1 nm	Ekstremno reaktivan sa svim biomolekulima (DNK, RNK, proteini, lipidi)	Fe i $H_2O_2$ (Fentonova reakcija)	Flavonoidi, prolin, šećeri, askorbat
$H_2O_2$	> 1 ms	> 1 $\mu$ m	Reaguje sa proteinima hema i DNK	Peroksizomi, hloroplasti, mitohondrija, citosol, apoplast	APX, CAT, GPx, PER, PRX, askorbat, glutation
$^1O_2$	1-4 $\mu$ s	30 nm	Oksiduje lipide, proteine (ostaci Trp, His, Tyr, Met i Cys)	Membrane, hloroplasti, jezgro	Karotenoidi, vitamin E

APX – askorbat peroksidaza;

GPx – glutation peroksidaza; PER – peroksidaza; PRX – peroksiredoksin;

SOD – superoksid dizmutaza; Trp – triptofan, His – histidin; Tyr – tirozin, Met – metionin; Cys - cistein.

### 2.3.2.2. Oksidativni stres

Stalna izloženost organizma izuzetno visokoj koncentraciji kiseonika u atmosferi doprinela je razvoju antioksidativnog sistema odbrane (eng. *Antioxidative Defense System*, ADS), odnosno brojnih mehanizama za neutralizaciju slobodnih radikala, za sprečavanje njihovog prekomernog stvaranja, kao i za reparaciju nastalih oštećenja (Đukić, 2008). ADS čine različiti molekuli neproteinskog porekla (glutation, vitamini A, C i E, flavonoidi), kao i enzimski „hvatači“ ROS (superoksid dizmutaza, katalaza, glutacion peroksidaza) (Martindale i Holbrook, 2002).

Kod zdravih aerobnih organizama produkcija slobodno-radikalnih vrsta je u stalnoj ravnoteži sa antioksidativnim odbrambenim sistemom. Kada dođe do narušavanja oksido-reduktivne ravnoteže usled povišenog nivoa slobodnih radikala dolazi do stanja oksidativnog stresa. Kao posledica oksidativnog stresa javljaju se oksidativna oštećenja. Ona se izražavaju kroz različita patološka stanja, kao što su: ateroskleroza, *diabetes mellitus*, neurodegenerativna oboljenja (Alzheimer, Parkinson), kancer (Đukić, 2008; Jomova i Valko, 2011; Persson i dr., 2014; Pisoschi i Pop, 2015). Potom, ishemija/reperfuzija (Scherz-Shouval i Elazar, 2011), inflamatorne bolesti creva (Chron-ova bolest i ulcerozni kolitis) i celijačna bolest (Patlevič i dr., 2016).

Oksidativni stres može da se manifestuje kroz različite odgovore ćelija, kao što su proliferacija ili adaptacija, inhibicija rasta ili ćelijska smrt. Proliferacijom, kojom mnoge ćelije odgovaraju na umereni stres, nastaje fibroza tkiva ali je ovaj proces odgovoran i za zarastanje rana. Adaptacija, koja podrazumava inicijaciju ADS, delimično ili potpuno štiti ćeliju od ROS, a podrazumeva povećanje koncentracije intracelularnog  $Ca^{2+}$  i prelaznih metala koji mogu da katalizuju slobodno-radikalne reakcije. Oksidativni stres može da izazove ozbiljna oštećenja ćelije (proteina, lipida, DNK) što u nekim slučajevima može biti inicijalna reakcija za adaptacione procese (Radojković, 2012). Takođe, oksidativno oštećenje može da izazove i starenje ćelije (ćelija preživljava, ali gubi sposobnost deobe), ali i njenu smrt. Naime, ako u ćeliji ne dođe do zamene oštećenih biomolekula, mogu da se jave trajna oksidativna oštećenja ili može da dođe do pokretanja procesa poput apoptoze ili nekroze, koji neizbežno vode do smrti ćelije (Halliwell i Gutteridge, 2007). Apoptoza je unutarćelijski mehanizam programirane smrti ćelije. Prvi put je opisana 1972. godine, a naziv je dobila od grčke reči *apoptosis* koja znači opadanje lišća ili latica cveća (Đukić, 2008). Proces apoptoze je neophodan za održavanje ravnoteže između starih i mladih ćelija normalnog tkiva (Cvetanović, 2016). Kod odraslih osoba, preko milion ćelija umre, i isto toliko nastane, tokom jednog minuta (Zhang i Herman,

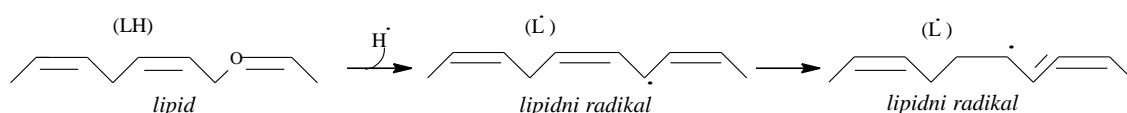
2002). Nekroza je pasivan tip ćelijske smrti i nastaje usled kolapsa ćelijskih homeostatskih mehanizama, a ispoljava se u ekstremnim nefiziološkim uslovima.

### 2.3.2.3. Lipidna peroksidacija

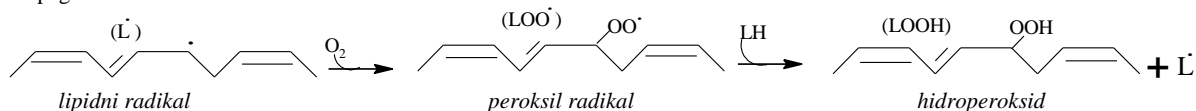
Lipidna peroksidacija (LPO) je kompleksan proces interakcije kiseonikovih slobodnih radikala i polinezasićenih masnih kiselina koji vodi nastanku veoma reaktivnih elektrofilnih aldehida (Reed, 2011). U biološkim sistemima lipidna peroksidacija može da se odvija enzimskim (pod dejstvom lipooksigenaza) i neenzimskim putem.

Nezavisno od načina indukcije, lipidna peroksidacija se odvija kroz inicijalnu, propagacionu i terminalnu fazu (Đukić, 2008) (Slika 19). Tokom faze inicijacije dolazi do oduzimanja vodonikovog atoma metilenske grupe (-CH<sub>2</sub>-) molekula polinezasićene masne kiseline (LH) pod dejstvom snažnog oksidanta, npr. hidroksil-radikala. Nastali lipidni radikal (L<sup>•</sup>) reaguje sa molekulskim kiseonikom pri čemu nastaje peroksil-radikal (LOO<sup>•</sup>), ključni radikal propagacione faze LPO. Peroksil-radikal omogućava nastavak lančane reakcije oduzimanjem vodonikovog atoma susednom molekulu polinezasićene masne kiseline, pri čemu se formira lipidni hidroperoksid (LOOH) i novi lipidni radikal. Na ovaj način se faza propagacije ponavlja više puta. U fazi terminacije dolazi do reakcije intramolekularne reorganizacije peroksil-radikala (1,3-ciklizacija) uz istovremeni transfer elektrona, pri čemu nastaje endoperoksid. Spontanom fragmentacijom sekundarnih produkata LPO, lipidnih hidroperoksida i endoperoksida, nastaju niskomolekularni aldehidi, na primer, malondialdehid.

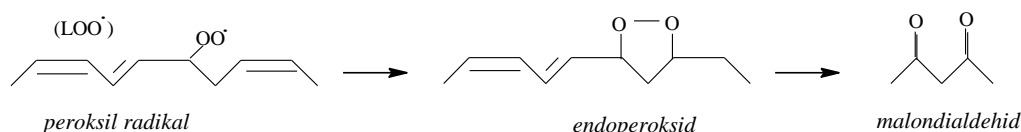
Inicijalna faza



Propagaciona faza



Terminalna faza

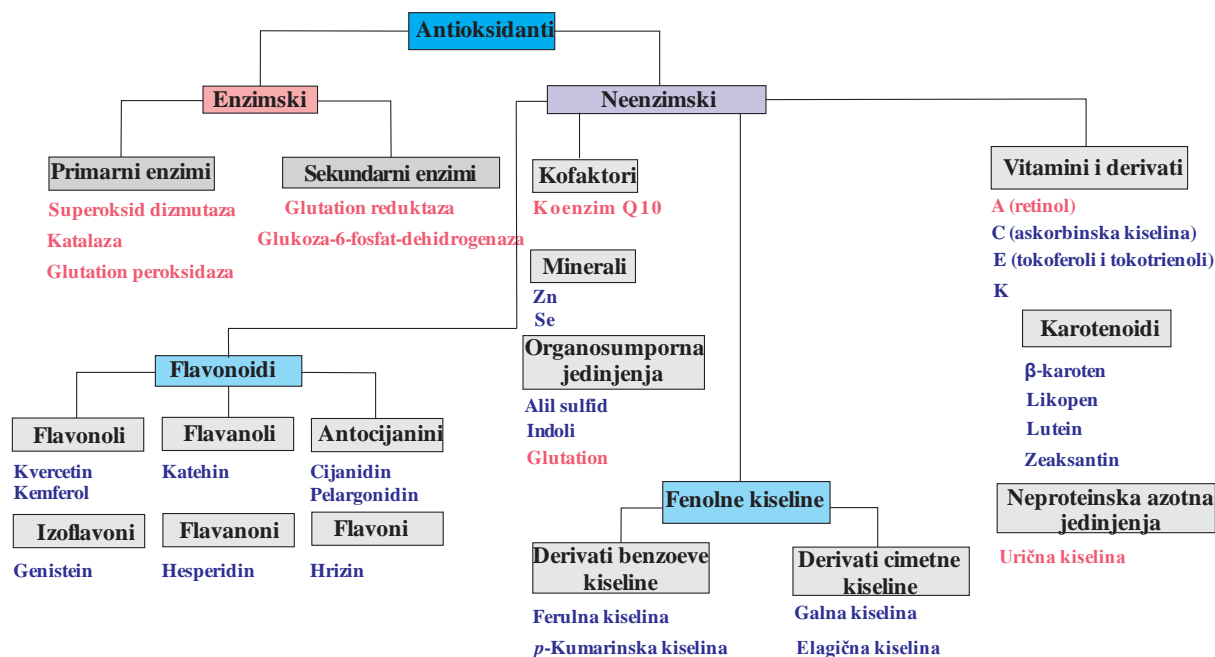


Slika 19. Mehanizam lipidne peroksidacije.

Lipidna peroksidacija se prekida reakcijom dva lipidna radikala pri čemu nastaje neradikal i molekularni kiseonik ( $LOO\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL + O_2$ ). Lančana reakcija autooksidacije može da se zaustavi antioksidantima, koji neutrališu slobodne radikale prekidajući propagacionu fazu. Uobičajeno, „hvatači“ radikala daju jedan elektron slobodnom radikal i redukuju ga.

#### 2.3.2.4. Antioksidanti i antioksidativni sistemi

Prema definiciji Halliwell-a i Gutteridge-a antioksidant je agens koji sprečava ili neutrališe oksidativna oštećenja ciljnih molekula, a prema definiciji Khlebnikov-a to je supstanca koja direktno „hvata“ reaktivne kiseonične vrste ili indirektno deluje tako što aktivira antioksidativnu zaštitu ili inhibira produkciju ROS (Carocho i Ferreira, 2013). Neki antioksidanti se sintetišu u organizmu (endogeni), dok se drugi (egzogeni) unose putem ishrane ili upotrebom dijetetskih suplemenata. Antioksidanti mogu dalje da se podele na enzimske i neenzimske (Carocho i Ferreira, 2013) (Slika 20).



Slika 20. Klasifikacija prirodnih antioksidanata. Predstavnici endogenih antioksidanata obeleženi su crvenom bojom, a egzogenih plavom.

Najznačajniji enzimi koji učestvuju u antioksidativnom sistemu odbrane su superoksid dizmutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza i glutation S-transferaza.

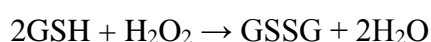
*Superoksid dizmutaza* (SOD) je metaloprotein koji katalitički konvertuje superoksid anjon do vodonik-peroksida i molekuskog kiseonika u prisustvu kofaktora kao što su joni bakra, cinka ili mangana (Nimse i Pal, 2015). Kod sisara postoje tri izoforme SOD: citoplazmična CuZn-SOD (SOD1), mitohondrijalna Mn-SOD (SOD2) i ekstracelularna EC-SOD (SOD3). SOD3 je prvenstveno locirana u tkivima unutar ekstracelularnog matriksa i na površinama ćelije, sa manjom frakcijom u plazmi i ekstracelularnim fluidima (Chio i Tuveson, 2017).

*Katalaza* (CAT) je tetramerni hem enzim koji štiti ćelije tako što uklanja vodonik-peroksid katališući reakciju njegove razgradnje do vode i molekuskog kiseonika. Katalaza je prisutna u skoro svim aerobnim organizmima (Krych-Madej i Gebicka, 2017). CAT je jedan od najefikasnijih enzima u živom svetu. Samo jedan njen molekul je dovoljan da razgradi  $6 \cdot 10^9$  molekula vodonik-peroksida (Carocho i Ferreira, 2013).

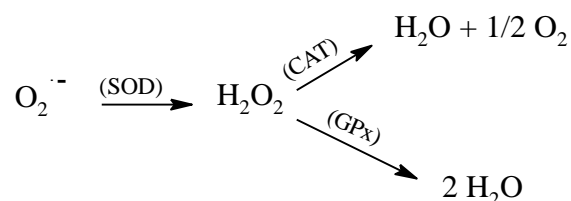
*Glutation reduktaza* (GR) je flavoprotein koji katalizuje redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovanu oblik (GSH) u prisustvu NADPH (redukovanu oblik nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata) kao koenzima.



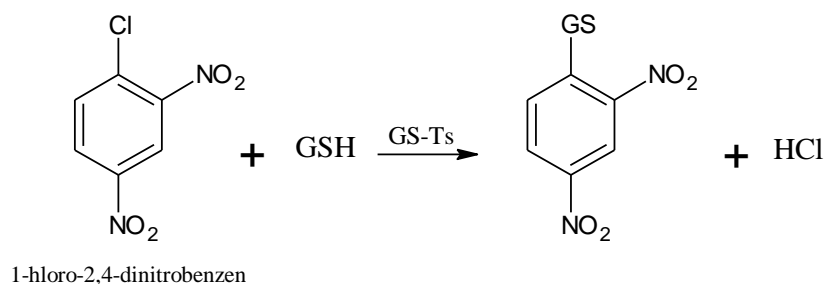
*Glutation peroksidaza* (GPx) je familija enzima sa selenom u aktivnom centru, koji katališu reakciju GSH i vodonik-peroksida pri čemu nastaje oksidovani oblik glutaciona (GSSG) (Kankofer, 2001).



Glutation peroksidaza, superoksid dizmutaza i katalaza ispoljavaju sinergistički efekat u „hvatanju“ superoksid-anjon-radikala (Nimse i Pal, 2015):



*Glutation S-transferaze* (GS-Ts) su enzimi koji katališu vezivanje glutaciona ( $\gamma$ -glutamilcisteinglicin; GSH) (Slika 21) (Gulick i Fahl, 1995) preko sulfhidrilnih grupa za elektrofilne centre molekula organskih jedinjenja. Na ovaj način molekuli postaju lakše rastvorljivi u vodi, i lakše se izlučuju iz organizma (Wilce i Parker, 1994). Pored reakcije detoksifikacije (na primer, ksenobiotika) enzimi katališu i druge reakcije poput izomerizacije i redukcije (Wu i Dong, 2012). Glutation S-transferaze su uključene u biološke procese kao što je biosinteza steroida i prostaglandina, katabolizam tirozina i apoptoza (Wu i Dong, 2012).

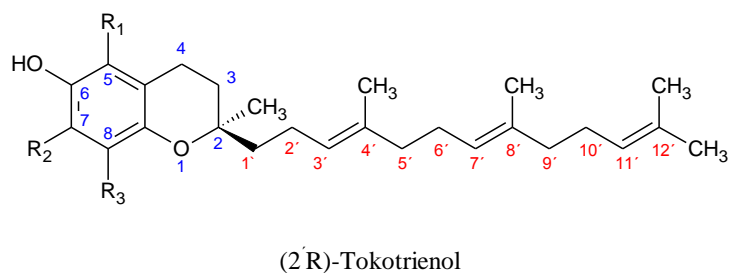
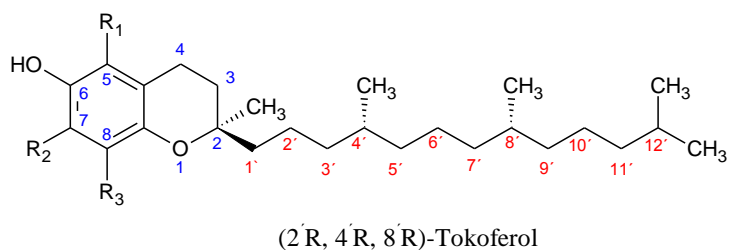


Slika 21. Katalitička reakcija glutation S-transferaze.

U neenzimske komponente antioksidativnog sistema odbrane ubrajaju se različita hidrosolubilna i liposolubilna jedinjenja. Neka od njih su:

*α-Tokoferol* (Slika 22), najzastupljenija izoforma vitamina E u biološkim sistemima, je liposolubilni antioksidant koji prekida lančanu reakciju lipidnih peroksida tako što neutrališe lipidne alkoksil i peroksil-radikale (Đukić, 2008). *α*-tokotrienol je u poređenju sa *α*-tokoferolom superiorniji u neutralisanju peroksil-radikala i peroksidaciji lipida u jetri pacova i lipozomalnim membranama (Peh i dr., 2016). Pri istim molarnim koncentracijama *α*- i *γ*-tokoferol imaju relativno sličan kapacitet hvatanja reaktivnih vrsta kiseonika tokom lipidne oksidacije (Vennerås, 2013). Sem toga, *γ*-tokoferol može da reaguje i sa reaktivnim vrstama azota (Vennerås, 2013). *γ*-tokoferol kao i *γ*-tokotrienol efikasno redukuju azotne radikale. *γ*-tokoferol „hvata“ radikale azota bez formiranja toksičnih produkata (Nesaretnam i dr., 2007). Radikali azota, proistekli iz azot-monoksida, uzrokuju ozbiljna oštećenja u našem telu. Kombinacijom superoksida i azot-monoksida nastaje peroksinitrit, koji je takođe toksičan za naše telo. *γ*-tokoferol je superiorniji u odnosu na *α*-tokoferol u detoksifikaciji nitrozo jedinjenja i peroksinitrita preko formiranja 5-nitro-*γ*-tokoferola (Mathur i dr., 2015).

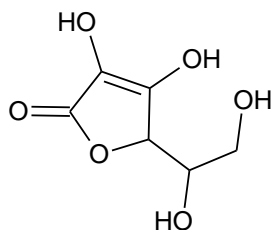




<i>Vitamin E</i>	<i>R</i> <sub>1</sub>	<i>R</i> <sub>2</sub>	<i>R</i> <sub>3</sub>	<i>Molekulska masa</i>
α-Tokoferol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	430,71
β-Tokoferol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	416,68
γ-Tokoferol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	416,68
δ-Tokoferol	H	H	CH <sub>3</sub>	402,65
α-Tokotrienol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	424,66
β-Tokotrienol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	410,63
γ-Tokotrienol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	410,63
δ-Tokotrienol	H	H	CH <sub>3</sub>	396,61

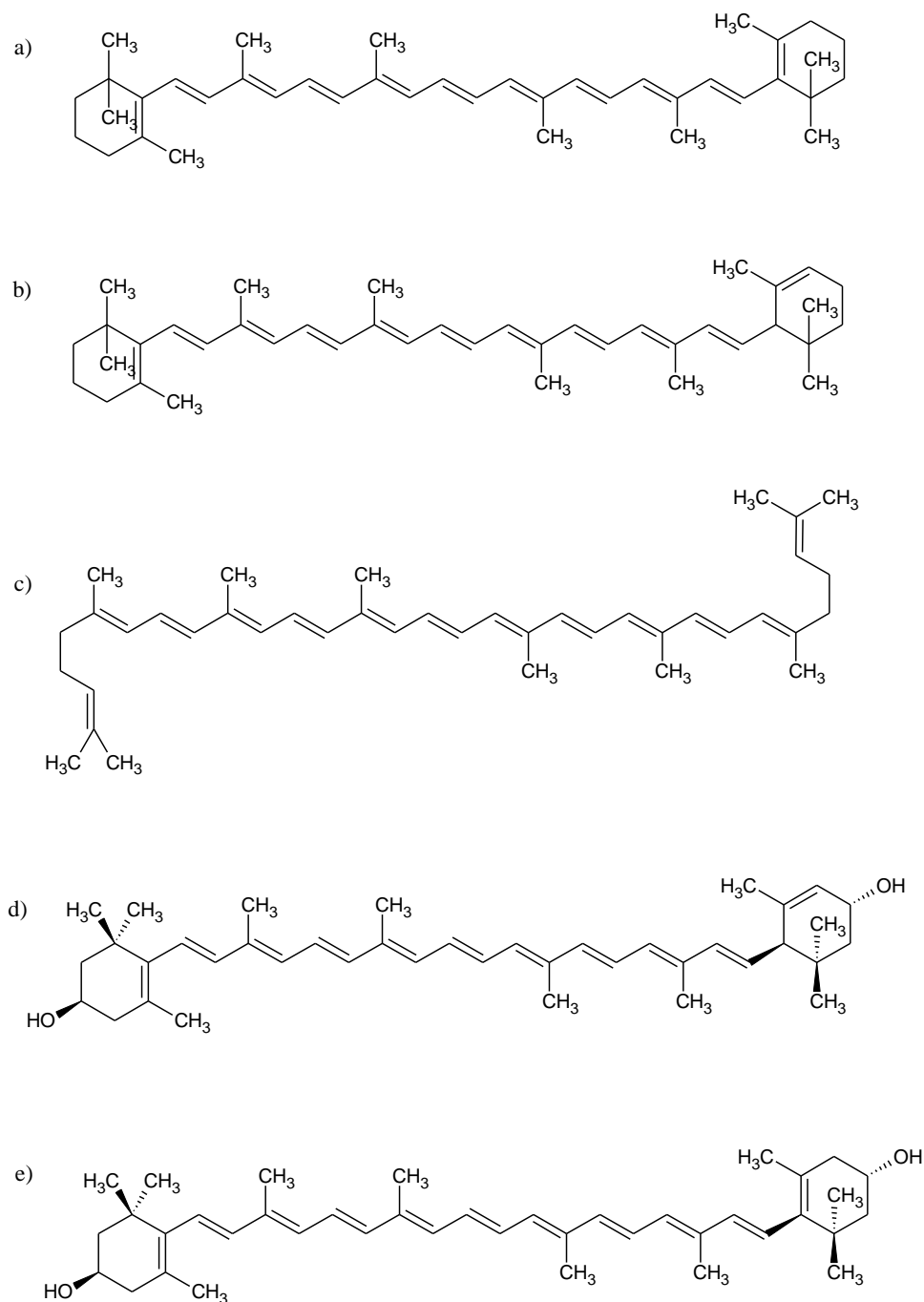
Slika 22. Hemijske strukture tokoferola i tokotrienola, izomera vitamina E.

*L*-askorbinska kiselina (vitamin C) (Slika 23) je hidrosolubilni antioksidant koji deluje kao „hvatač“ superoksid-anjon-radikala, hidroksil-radikala, vodonik-peroksida, singletnog kiseonika i reaktivnih vrsta azota (Carocho i Ferreira, 2013; Adisakwattana i dr., 2017).



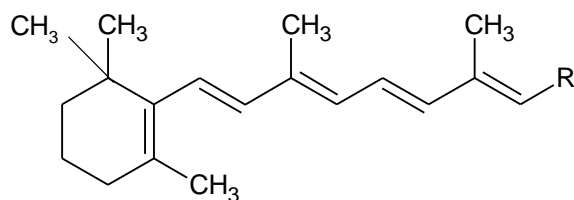
Slika 23. Hemijska struktura L-askorbinske kiseline.

$\beta$ -Karoten (prekursor vitamina A) (Slika 24) je liposolubilni antioksidant koji deluje kao „hvatač“ singletnog kiseonika, peroksil-radikala, superoksid-anjon-radikala (Khopde i dr., 1998), kao i tijil, azotdioksidnog i sulfonil-radikala, sposobnih da iniciraju peroksidaciju lipida, pri čemu nastaje  $\beta$ -karoten-katjon radikal i različiti adukti (Everett i dr., 1996). Karotenoidi su veoma reaktivni prema singletnom kiseoniku pri čemu je likopen najefikasniji „hvatač“ *in vitro* (Miller i dr., 1996). Likopen je dvostruko i desetostruko potentniji „hvatač“ singletnog kiseonika u odnosu na  $\beta$ -karoten i  $\alpha$ -tokoferol, redom (Wang i dr., 2014). Prema Mascio i dr. (1989) likopen je potentniji „hvatač“ singletnog kiseonika od  $\alpha$ -karotena a ovaj karotenoid od  $\beta$ -karotena. Prema Sindhu i dr. (2010) lutein efikasno „hvata“ superoksid-radikal, hidroksil-radikal i inhibira lipidnu peroksidaciju *in vitro* i generisanje superoksid-radikala *in vivo*. Sem toga, on je potentniji „hvatač“ pomenutih radikala u poređenju sa zeaksantinom (Sindhu i dr., 2010).



Slika 24. Hemijske strukture  $\beta$ -karotena (a),  $\alpha$ -karotena (b), likopena (c), luteina (d) i zeaksantina (e).

Vitamin A (Slika 25) i njegovi derivati (retinoidi) su važni mikronutritijenti koji regulišu mnoge biološke procese, na primer, ćelijski rast i diferencijaciju (Pasquali i dr., 2013). S obzirom na njihovu hidrofobnu prirodu, vitamin A (*trans* retinol) i vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) štite ćelijske membrane od peroksidacije (Khan i dr., 2010).



<i>Jedinjenje</i>	<i>Supstituenti</i>
	<i>R</i>
Retinol	CH <sub>2</sub> OH
Retinal	CHO
Retinoična kiselina	COOH
Retinil palmitat	CH <sub>2</sub> O-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -CH <sub>3</sub>

Slika 25. Hemijska struktura molekularnih formi vitamina A i njegovih derivata.

### 2.3.3. Antimikrobno delovanje

Uprkos ogromnom napretku u medicini, infektivna oboljenja uzrokovana bakterijama, gljivicama, virusima i parazitima i dalje su značajan globalni problem. Tokom godina su razvijeni različiti antibiotici i antimikrobni lekovi s ciljem poboljšanja kvaliteta života ljudi. Otpornost mikroorganizama na antibiotike kao i nuspojave određenih antibiotika usmerili su pažnju naučnika ka istraživanju novih antimikrobnih agenasa, većinom iz biljnih ekstrakata, s ciljem otkrivanja novih hemijskih struktura kako bi se prevazišli gore pomenuti nedostaci (Dash i dr., 2011). Posebnu opasnost predstavljaju mikroorganizmi koji postaju rezistentni na određeni antibiotik koji je prethodno bio efikasan. Specifične pretnje predstavljaju (Dodds, 2017):

- *Escherichia coli* rezistentna na treću generaciju cefalosporina, uključujući rezistentnost prema fluorohinolonima;
- *Klebsiella pneumoniae* rezistentna prema trećoj generaciji cefalosporina i prema karbapenemima;
- *Staphylococcus aureus*: (MRSA) (eng. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* – Meticilin rezistentni stafilokokus aureus);
- *Streptococcus pneumoniae* rezistentna na peniciline;
- Netifoidalna *Salmonella* rezistentna na fluorohinolone;
- *Shigella* vrste rezistentne prema fluorohinolonima;

- *Neisseria gonorrhoeae* sa povećanom rezistentnošću prema trećoj generaciji cefalosporina;
- Tuberkuloza (XDR-TB) (eng. *Extensively Drug-Resistant Tuberculosis* – Ekstenzivno rezistentna tuberkuloza);
- Malarija sa verovatnom rezistentnošću prema artemisininu u području velikog Mekonga;
- Influenca, iako je u ovom trenutku rezistentnost prema oseltamiviru (inhibitor neuraminidaze) ispod 2%;
- Rezistentnost HIV-a (eng. *Human Immunodeficiency Virus* – Virus humane imunodeficijencije) prema lekovima.

Većina antibiotika u kliničkoj upotrebi nema dovoljno širok spektar dejstva prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama (Singh i dr., 2017b). Zbog toga je većina antibiotika grupisana na agense specifične za Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Postoji i mali broj agenasa koji su delimično efikasni i prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijskim infekcijama (Singh i dr., 2017b).

Tokom protekle tri decenije veliki udeo novouvedenih antiinfektivnih i antikancerogenih lekova je proistekao iz prirodnih produkata ili derivata istih (Newman i Cragg, 2016). Izvori prirodnih antibiotika su najčešće prokariotske bakterije, eukariotski mikroorganizmi, biljke i različiti animalni organizmi (Balouiri i dr., 2016). Biljke i drugi izvori prirodnog porekla sadrže brojna kompleksna i strukturno različita jedinjenja. Danas su mnogi istraživači fokusirani na ispitivanje biljnih ekstrakata i ekstrakata mikrobiološkog porekla, etarskih ulja, čistih sekundarnih metabolita i novih sintetisanih molekula kao potencijalnih antimikrobnih agenasa (Ekpenyong i dr., 2015). Intenzivne studije su poslednjih godina sprovedene s ciljem ispitivanja mogućnosti primene biljnih ekstrakata i etarskih ulja u tretmanu infekcija patogenim bakterijama i gljivicama (Irkin i Korukluoglu, 2007; Kuete i dr., 2009; Picerno i dr., 2011; Ekpenyong i dr., 2015; Rathod i dr., 2015; Noundou i dr., 2016; Idris i Nadzir, 2017; Bello i dr., 2018; Tian i dr., 2018). Hemijska jedinjenja izolovana iz biljaka, koja su odgovorna za antimikrobnu aktivnost su najčešće po svojoj strukturi fenolne kiseline, flavonoidi, tanini, alkaloidi, triterpenoidi, steroidi (Puupponen-Pimiä i dr., 2001; Cushnie i Lamb, 2005; Picerno i dr., 2011; Martins i dr., 2015; Guil-Guerrero i dr., 2016; Noundou i dr., 2016). Pojedina etarska ulja poput ulja origana, ruzmarina, majčine dušice ili karanfilića, kao i pojedini njihovi konstituenti (eugenol, karvakrol i timol) demonstriraju antifungalnu aktivnost prema gljivi *Aspergillus niger* (Bouddine i dr., 2012). Inhibitornim delovanjem prema patogenim sojevima

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Listeria innocua* odlikuje se etarsko ulje eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*) (Said i dr., 2016). Antimikrobno delovanje etarskih ulja može biti povezano sa njihovom sposobnošću penetriranja kroz membrane bakterija i inhibiranja ćelijskih procesa (Vieitez i dr., 2018). Hidrofobni karakter etarskih ulja omogućava njihovo lakše inkorporiranje unutar lipidnog dvosloja ćelijskih membrana bakterija uzrokujući poremećaje u njihovoj strukturi, permeabilnosti i protoku protona pri čemu dolazi do pada membranskog potencijala, intracelularnog pH i inhibicije sinteze adenozin-trifosfata (Čabarkapa, 2015).

Uobičajene metode određivanja antimikrobnog potencijala su disk difuziona metoda i diluciona metoda (agar diluciona i bujon diluciona metoda). Princip disk difuzione metode jeste da se ispitivana supstanca difunduje u hranljivu podlogu (Mueller-Hinton agar ili krvni agar) prethodno zasejanu mikroorganizmima na nju. U ovoj metodi se koriste diskovi ili tablete obložene poznatom koncentracijom uzorka. Nakon perioda inkubacije (uslovi zavise od bakterijske vrste, najčešće 24 h na 37 °C) očitava se rezultat kao prečnik zone inhibicije rasta mikroorganizma, i izražava u mm. Ukoliko su posmatrani mikroorganizmi (bakterije, gljive) osetljivi na delovanje testiranog ekstrakta ili njegovih komponenti, u zoni dejstva antibiotika neće doći do njihovog rasta.

Dilucione metode su najpogodnije za određivanje MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) vrednosti s obzirom da omogućavaju utvrđivanje koncentracije testiranog antimikrobnog agensa u agaru (agar diluciona) ili bujonu (makrodiluciona ili mikrodiluciona metoda). Ukoliko se koristi bujon mikrodiluciona metoda tada se u svaki bunarić mikrotitar ploče doda određena zapremina tečne podloge i potom odgovarajuća zapremina ispitivanog uzorka (npr. ekstrakta, etarskog ulja, čiste supstance) određene koncentracije. Potom se dodaje suspenzija bakterija/gljiva tako da svaka bakterijska/gljivična kultura bude tretirana svim ispitivanim koncentracijama uzorka. Nakon inkubacije pod odgovarajućim uslovima, zavisno od mikroorganizma, vrši se utvrđivanje pri kojoj koncentraciji uzorka je došlo do inhibicije rasta bakterijske/gljivične kulture odnosno utvrđivanje MIC vrednosti datog uzorka za datu kulturu bakterija/gljiva. U makrodilucionoju metodi testiranje se izvodi u epruvetama, a koristi se najmanje 2 ml suspenzije. Agar diluciona metoda je slična bujon dilucionoju metodi, osim što su razblaženja ispitivanog uzorka sastavni deo čvrste podloge u nizu Petri ploča.

#### 2.3.4. Antidijabetsko delovanje

Prevalenca dijabetesa dramatično je povećana u proteklih nekoliko godina i procenjuje se da je više od 430 miliona ljudi pogođeno ovim endokrinim oboljenjem (WHO, 2016). Dijabetes melitus (*diabetes mellitus*) obuhvata niz metaboličkih stanja uzrokovana delimičnim ili potpunim nedostatkom insulina. Izloženost hroničnoj hiperglikemiji može uzrokovati mikrovaskularne komplikacije u retini, bubregu ili perifernim nervima (Egan i Dinneen, 2014). Za nastanak makrovaskularnih komplikacija dijabetesa (infarkt miokarda, moždani udar, bolest perifernih arterija) podjednako su značajne hronična hiperglikemija, dislipidemija i hipertenzija (Stojanović i sar., 2012).

Tri glavne vrste dijabetesa su (Hu i Jia, 2018):

- Dijabetes melitus tip 1 (T1DM);
- Dijabetes melitus tip 2 (T2DM);
- Gestacijski dijabetes melitus (GDM).

Dijabetes melitus tip 1 je uzrokovan autoimunom destrukcijom  $\beta$ -ćelija Langerhans-ovih ostrvaca. Ovaj destruktivni proces dovodi do apsolutnog nedostatka insulina sa nedetektabilnim nivoom C-peptida (Egan i Dinneen, 2014). Insulin je polipeptidni hormon koji luče  $\beta$ -ćelije smeštene u Langerhans-ovim ostrvcima endogenog dela pankreasa (Larsen i dr., 2017) gde prvo transkripcijom mesindžer ribonukleinske kiseline (mRNK) i translacijom na ribozomima nastaje preproinsulin. Preproinsulin sadrži signalnu sekvenciju aminokiselina koja se prolaskom kroz membranu endoplazmatskog retikuluma odcepljuje i nastaje proinsulin (peptid od 81 aminokiseline) koji se sastoji od tri domena: amino-terminalnog B-lanca, karboksi-terminalnog A-lanca i C-peptida koji ih povezuje (Larsen i dr., 2017), i skladišti se u sekretornim granulama Golgi-jevog aparata. Delovanjem endopeptidaza dolazi do odvajanja insulina i C-peptida, koji se iz  $\beta$ -ćelija procesom egzocitoze izlučuju u cirkulaciju u ekvimolarnim količinama (Larsen i dr., 2017). C-peptid ima duže vreme poluživota u odnosu na insulin (20–30 i 3–5 min, redom), tako da je njegova koncentracija 3–6 puta veća u odnosu na koncentraciju insulina u krvnoj plazmi (Larsen i dr., 2017). Zbog toga je C-peptid postao važan biomarker za insulinsku sekreciju kod osoba sa dijabetesom. Merenje nivoa C-peptida se obično primenjuje kako bi se utvrdilo da li se radi o dijabetesu tipa 1 ili 2, ali i za ocenu funkcije ostrvaca kod osoba sa dijabetičnom ketoacidozom (Lv i dr., 2019).

Približno 95% osoba obolelih od dijabetesa boluje od T2DM (Kreider, 2019). T2DM je hronično metaboličko oboljenje definisano perzistentnom hiperglikemijom usled povećane insulinske rezistencije i/ili smanjene sekrecije insulina (Davis i dr., 2019). Gojazne osobe, osobe sa hipertenzijom ili sa sindromom policističnih jajnika mogu imati i insulinsku rezistenciju (Egan i Dinneen, 2014). T2DM se najčešće otkriva posle 25 godine života i udružen je sa prekomernom telesnom težinom u više od 90% slučajeva (Tabela 12).

Tabela 12. Osnovne razlike između dijabetes melitusa tipa 1 i tipa 2 (Kreider, 2019).

<i>Kliničke karakteristike</i>	<i>Dijabetes melitus tip 1</i>	<i>Dijabetes melitus tip 2</i>
Životno doba za dijagnozu	Mlađe životno doba (uobičajeno ispod 25 godine)	Uobičajeno iznad 25 godine
Telesna težina	Mala ili normalna težina; prekomerna težina/ tendencija ka gojaznosti	Preko 90% pacijenata je sa prekomernom težinom
Autoantitela	Pozitivna	Negativna
Nivo C-peptida	Nizak do nedetektabilan	Normalan do visok (u ranom stadijumu bolesti) Nizak (kasnije tokom bolesti)
Zavisnost od insulina	Da	Promenljiva
Insulinska osetljivost	Normalna do povećana	Opadajuća
Dijagnostifikovanje kod članova porodice	Nije učestalo (5–10%)	Često (75–90%)
Rizik za nastanak dijabetesne ketoacidoze	Veliki	Mali

Gestacijski dijabetes melitus je definisan kao ugljenohidratna netolerancija koja je nastala ili otkrivena prvi put tokom trudnoće, izuzimajući žene koje su verovatno imale predgestacijski dijabetes (Egan i Dinneen, 2014). Žene kod kojih je dijagnostifikovan GDM su podložnije preeklampsiji, prevremenom porođaju kao i razvoju T2DM (Lefkovits i dr., 2019). Fetalna organomegalija, ramena distocija, prelom kosti pa čak i smrt prate 1–4% GDM trudnoća, dok



je makrozomija (novorođenčad > 4 kg) i LGA (eng. *Large for Gestational Age* - Velika za gestacijsku starost) novorođenčadi vezana za 10–20% ovih trudnoća (Lefkovits i dr., 2019).

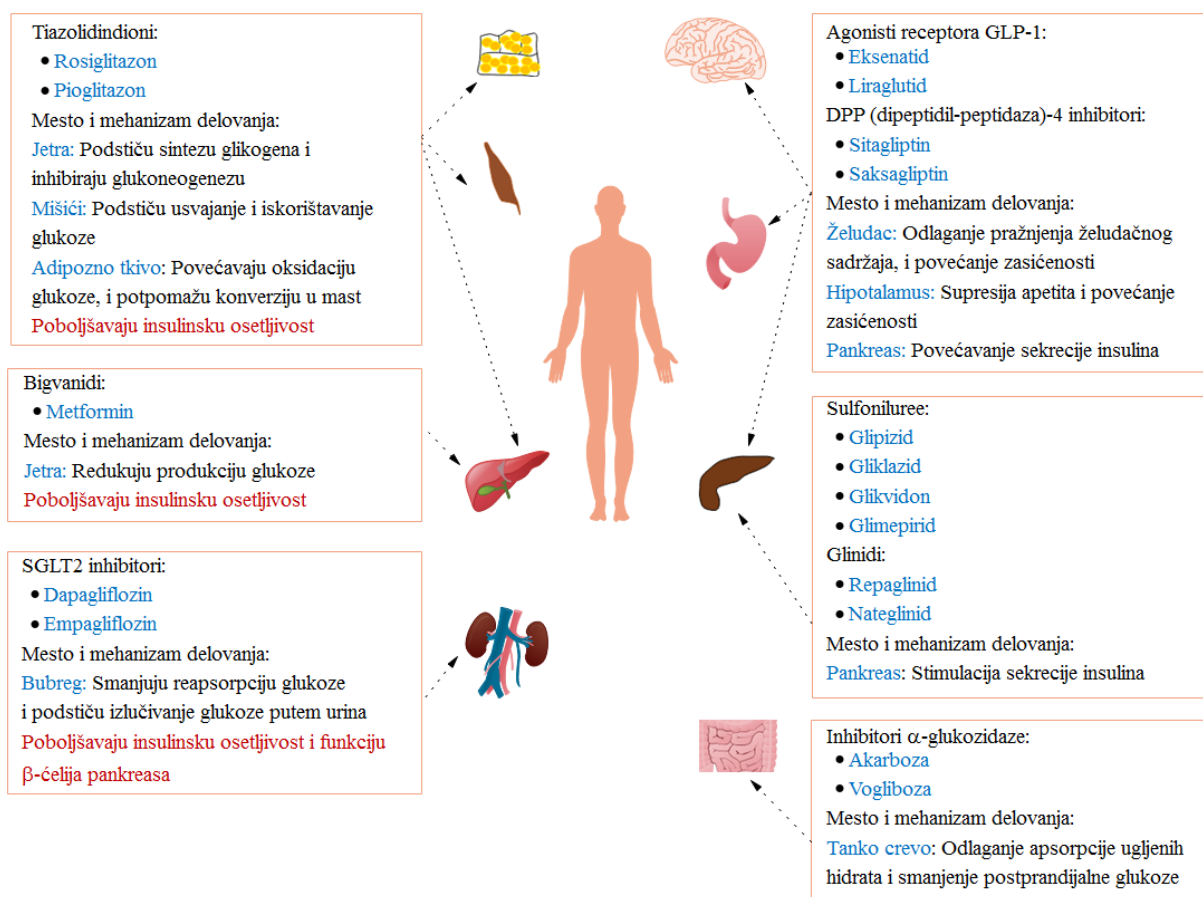
U kliničkoj praksi su znatno manje zastupljene druge vrste dijabetesa, uključujući monogeni i sekundarni dijabetes. MODY (eng. *Maturity-Onset Diabetes of the Young* - Dijabetes zrele dobi kod mladih) dijabetes je monogeni tip dijabetesa uzrokovan anomalijom u jednom genu, koja dovodi do poremećaja funkcije  $\beta$ -ćelija i sekrecije insulina i rezultira hiperglikemijom (Kreider, 2019). Glavna obeležja ovog tipa dijabetesa su rani početak (do 25 godine života), održavanje normoglikemije bez primene insulina najmanje pet godina nakon postavljanja dijagnoze, kao i da se nasleđuje autozomno dominantno i da je prisutan u barem tri generacije jedne porodice (Stipančić, 2003). Dijabetes koji nastaje usled oboljenja pankreasa se naziva pankreatogeni, sekundarni pankreasni dijabetes ili dijabetes uzrokovan bolešću egzogenog pankreasa, a odnedavno dijabetes melitus tip 3c (T3cDM) (Kreider, 2019). Dominantni uzrok T3cDM je hronični pankreatitis (u više od 75% slučajeva) (Kreider, 2019).

Kod T2DM najčešće nije potrebna primena parenteralnog insulina ali je ipak neophodno uzimanje lekova kako bi se postigla normoglikemija. U terapiji se uobičajeno primenjuju sledeće kategorije antidijabetika: bigvanidi (metformin), sulfoniluree, tiazolidindioni, inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze, agonisti receptora glukagonu sličnog peptida-1 (GLP-1), dipeptidil-peptidaza-4 (DPP-4) inhibitori i inhibitori natrijum-glukoznog kotransportera 2 (SGLT2). Na Slici 26 su prikazani ciljni organi i mehanizmi delovanja različitih vrsta antidijabetika izuzev insulina.

Pojedini trenutno dostupni antidijabetici, uključujući akarbozu, maglitol i voglibozu, deluju inhibiranjem aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze (Figueiredo-González i dr., 2016). Međutim, njihovo delovanje je najčešće povezano sa gastrointestinalnim nusfektima kao što su abdominalni bol, meteorizam i dijareja (Figueiredo-González i dr., 2016). Zbog toga su novije studije orjentisane ka pronalaženju novih inhibitora  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze iz prirodnih izvora, kao što su biljke, s ciljem umanjenja toksičnosti i nusfekata inhibitora koji se primenjuju za kontrolu hiperglikemije (Nair i dr., 2013).

Istraživanje Shettar i dr. (2017) je pokazalo da vodeni ekstrakt lista *Ximenia amaricana* ispoljava značajnu antidijabetičku aktivnost. Glavni fitokonstituent u ovom ekstraktu je bila 9,12-oktadekandionska kiselina. Antidijabetički potencijal je demonstrirao i vodeni ekstrakt lista *Zanthoxylum armatum* (Rynjah i dr., 2018). Prema autorima, antidijabetičko delovanje je povezano sa prisustvom različitih hemijskih konstituenata kao što su alkaloidi, saponini, tanini. Etanolni ekstrakt lista *Annona muricata* kao i njegoa etilacetatna i *n*-butanolna frakcija su demonstrirali jaku inhibitornu aktivnost prema  $\alpha$ -amilazi (Justino i dr., 2018). Etilacetatna i *n*-butanolna frakcija su ispoljile veću inhibitornu aktivnost prema  $\alpha$ -glukozidazi u odnosu na

etanolni ekstrakt. U pomenutim organskim frakcijama je detektovano prisustvo različitih fenolnih jedinjenja, kao što su hlorogenska i kafena kiselina, procijanidini, katehin, kvercetin, kvercetin-glukozid i rutin, koja su prema autorima mogla doprineti inhibitornim kapacitetima etilacetatne i *n*-butanolne frakcije. Etanolni ekstrakt nadzemnog dela *Achillea cucullata* je demonstrirao jako inhibitorno delovanje prema  $\alpha$ -glukozidazi (Eruygur i dr., 2019), a lista *Bauhinia forficata* odnosno *Syzygium cumini* prema  $\alpha$ -amilazi (Franco i dr., 2018). Prema Trinh i dr. (2017) etilacetatni ekstrakt grančice *Garcinia oblongifolia* je potencijalni izvor inhibitora  $\alpha$ -glukozidaze. Od jedanaest izolovanih ksantona norkovanin je demonstrirao najveći potencijal inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze. Istraživanje Agawane i dr. (2018) je demonstriralo da metanolni ekstrakt lista *Mentha arvensis* značajno inhibira  $\alpha$ -glukozidazu i umereno  $\alpha$ -amilazu. Prema autorima, inhibitorni kapacitet je verovatno uzrokovan visokim sadržajem polifenola.



Slika 26. Ciljni organi i mehanizmi delovanja različitih vrsta antidijabetičkih lekova (Hu i Jia, 2018).

### 2.3.5. Neuroprotektivno delovanje

Demencija je progresivno oboljenje povezano sa nepovratnim oštećenjem i gubitkom kognitivnih sposobnosti (Gagliese i dr., 2018). Približno od 4,5 do 8% osoba iznad sedamdeset i 15–64% iznad osamdeset godina pati od demencije (Gagliese i dr., 2018). Demencija kod starijih ljudi je najčešće uzrokovana neurodegeneracijom. U degenerativne demencije između ostalih spadaju Alzheimer-ova bolest, demencija sa Lewy-jevim telima, frontotemporalna lobarna degeneracija i Parkinsonova bolest (Tabela 13) (Gale i dr., 2018). Alzheimer-ova bolest (AB) je najčešći tip demencije i karakteriše se gubitkom holinergičkih neurona u području mozga koji je vezan za pamćenje i učenje, akumulacijom  $\beta$ -amiloidnog peptida i formiranjem neurofibrilarnih klubadi hiperfosforilacijom tau proteina (Najafi i dr., 2016). Trenutno je oko 35 miliona ljudi širom sveta pogođeno AB (Liu i dr., 2019), a procena je da će ih do 2040. godine biti više od 81 milion (Xie i dr., 2016).

Bitna karakteristika neurodegenerativnih oboljenja jeste sklonost ka agregaciji proteina. Akumulacija agregata proteina je u osnovi neurodegenerativnih oboljenja. Iako je hipoteza amiloidne kaskade modifikovana poslednjih godina ona se i dalje smatra najverovatnijim mehanizmom nastanka AB. Prema ovoj hipotezi akumulacija  $\beta$ -amiloidnih depozita deluje kao patološki okidač za formiranje neurofibrilarnih klubadi preko tau proteina dovodeći do neuronalne disfunkcije i ćelijske smrti (Barage i Sonawane, 2015).

Amiloidne depozite grade amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptidi koji nastaju cepanjem amiloid prekursor proteina (APP) enzimima  $\beta$ -sekretazom i  $\gamma$ -sekretazom. Amiloid prekursor protein je transmembranski glikoprotein čiji veći deo molekula čini N-terminalni ekstracelularni segment (ektodomen), dok su transmembranski i intracelularni C-terminalni delovi znatno kraći. Pod normalnim okolnostima razlaganje APP se odvija po „neamiloidogenom putu“ delovanjem dva enzima:  $\alpha$ -sekretaze i  $\gamma$ -sekretaze (Slika 27). Delovanjem  $\alpha$ -sekretaze oslobađa se ektodomen, solubilni APP $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ), u ekstracelularni prostor, dok C-terminalni fragment APP sa 83 aminokiseline (CTF83) ostaje u plazmatičnoj membrani. Pod uticajem  $\gamma$ -sekretaze cepa se CTF83 i oslobađa p3 peptid i AICD peptid (APP intracelularni domen) u ekstracelularni prostor i citoplazmu, redom. Kod Alzheimer-ove bolesti umesto  $\alpha$ -sekretaze aktivira se  $\beta$ -sekretaza koja cepanjem APP oslobađa solubilni APP $\beta$  (sAPP $\beta$ ) u ekstracelularni prostor, a C-terminalni fragment sa 99 aminokiselina (CTF99) ostaje u plazmatičnoj membrani. CTF99 se cepa delovanjem  $\gamma$ -sekretaze, što dovodi do stvaranja amiloid- $\beta$  peptida i AICD peptida (Wilkins i Swerdlow, 2017).  $A\beta_{40}$  (amiloidni peptid koji sadrži 40 aminokiseline) i  $A\beta_{42}$  (amiloidni peptid koji sadrži 42 aminokiseline) su glavni izoformni oblici, pri čemu  $A\beta_{42}$  u najvećoj meri

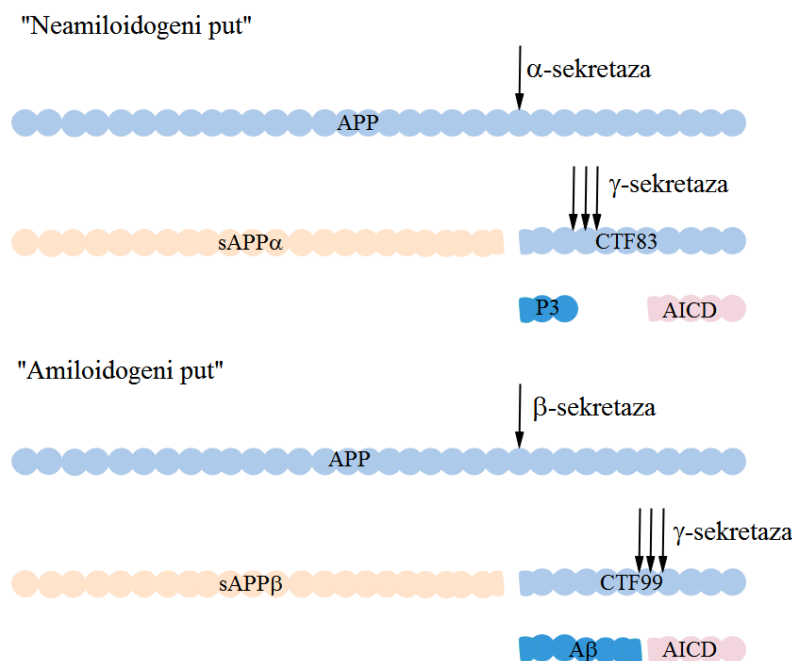
doprinosi AB (Thakur i dr., 2019). Mutacije gena povećavaju produkciju A $\beta$ <sub>42</sub>, a njegovo nagomilavanje u mozgu inicira agregaciju i formiranje amiloidnih depozita (Thakur i dr., 2019).

Tabela 13. Prikaz pojedinih kognitivnih oštećenja/sindroma demencije, klasifikovanih u dve kategorije.

<i>Neurodegenerativna</i>	<i>Neneurodegenerativna</i>
Alzheimer-ova bolest	Vaskularna demencija (multiinfarktna demencija, ishemijska bolest malih krvnih sudova, hronični/subakutni subduralni hematomi, hipoksična/ishemična encefalopatija)
Demencija sa Lewy-jevima telima, Parkinsonova bolest, frontotemporalna lobarna degeneracija	Hidrocefalus sa normalnim pritiskom
Multipla sistemska atrofija	Uzroci metaboličke prirode (hipotireoidizam, malnutricija, Cushing-ov sindrom)
Huntington-ova bolest, Wilson-ova bolest, dentatorubralna-palidoluizijalna bolest	Uzroci autoimune prirode (limbični encefalitis, Hashimoto encefalopatija)
Kognitivno oštećenje uzrokovano alkoholom/demencija	Depresija, bipolarni poremećaj („pseudodemencija“)
Hronična traumatska encefalopatija	Uzroci neoplastične/paraneoplastične prirode (NMDA-receptor i encefalopatija CRMP-5 antitela, tumor mozga)
Prionska bolest (Creutzfeldt-Jakob-ova bolest, fatalna familijarna insomnija)	Infekcije (sifilis, neurokognitivno oštećenje povezano sa HIV-om)
Bolest motornog neurona (amiotrofična lateralna skleroza, primarna lateralna skleroza)	Uzroci toksične prirode (olovo, arsen, organofosfatni pesticidi)
	Vaskulitis (primarni vaskulitis centralnog nervnog sistema, Behçet-ova bolest, sistemska eritemski lupus)
	Nedostatak vitamina (B12, tiamin, niacin, folna kiselina)

NMDA – *N*-metil-D-aspartat; CRMP-5 – Protein-5 koji reguliše odgovor kolapsina;

HIV – Virus humane imunodeficijencije.

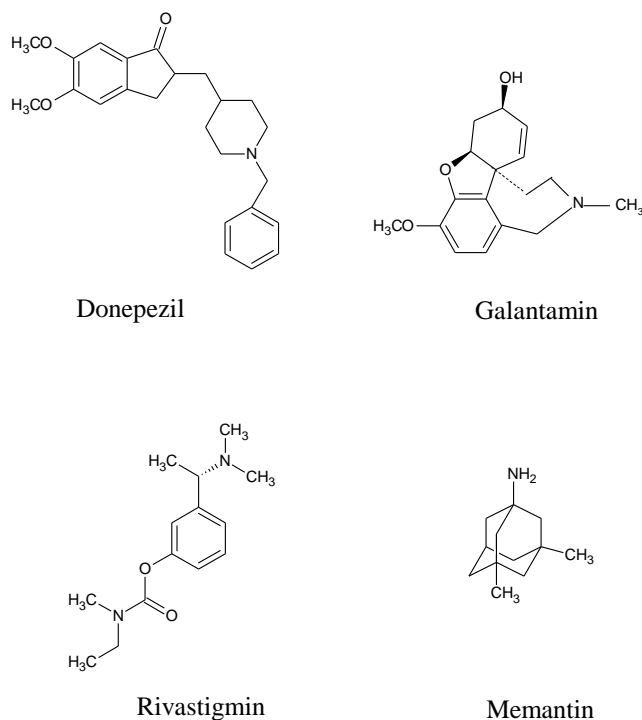


Slika 27. Putevi razlaganja amiloid prekursor proteina (APP).

Amiloid- $\beta$  peptid, glavni konstituent interneuronalnih i cerebrovaskularnih depozita karakterističnih za AB, vezuje acetilholinesterazu (AChE) i butirilholinesterazu (BChE) formirajući fibrile koji su opasniji od samih agregata A $\beta$  (Nalivaeva i Turner, 2016). APP je prekursor amiloid- $\beta$  peptida, patološkog agensa u AB, dok je AChE povezana sa njegovom patogenezom bilo povećavanjem holinergičkog deficita ili formiranjem A $\beta$  fibrila i toksičnošću (Nalivaeva i Turner, 2016). Amiloid prekursor protein i acetilholinesteraza su ciljna mesta u terapiji Alzheimer-ove bolesti inhibitorima AChE (Nalivaeva i Turner, 2016), koji su uz memantin, trenutno jedini dostupni lekovi za AB. Enzim acetilholinesteraza brzo hidrolizuje aktivni neurotransmiter acetilholin (ACh) u neaktivna jedinjenja holin i sirćetnu kiselinu (Vanzolini i dr., 2013). Jedan molekul AChE u toku jednog minuta može da hidrolizuje  $6 \cdot 10^5$  molekula ACh (Đorđević i dr., 2014). Niski nivoi ACh u sinaptičkoj pukotini su povezani sa smanjenom holinergičkom funkcijom, karakterističnom za AB. Patofiziologija AB ukazuje da je gubitak kognitivne sposobnosti povezan sa kontinuiranim opadanjem nivoa ACh uzrokovanog degeneracijom holinergičkih neurona. Situaciju dodatno pogoršava i dekompozicija dostupnog ACh dejstvom acetilholinesteraze u sinaptičkom području neuronalnih ćelija. Nivo ACh opada do 90% kod osoba sa AB, i ne može biti kontrolisan u krajnjem stadijumu Alzheimer-ove bolesti (Ahmad i dr., 2018). BChE lokalizovana u glijalnim ćelijama centralnog nervnog sistema i neuronima deluje koregulišući holinergičku

neurotransmisiju (de Candia i dr., 2017). Utvrđeno je da butirilholinesteraza može da nadomesti katalitičku funkciju AChE u sinaptičkoj pukotini, i njena aktivnost se povećava 30–60% tokom AB (de Candia i dr., 2017). Zbog toga su trenutna istraživanja usmerena i ka pronalaženju potencijalnih inhibitora butirilholinesteraze. Trenutno se jedan takav agens, nazvan „bisnorcymserine“, nalazi u prvoj fazi kliničkog ispitivanja (Vilela i dr., 2018).

Uobičajeno korišćeni inhibitori acetilholinesteraze su donepezil, galantamin i rivastigmin (Slika 28), dok je u Kini za tretiranje AB odobren i huperzin A, alkaloid ekstrahovan iz biljke *Huperzia serrata* (Agatonovic-Kustrin i dr., 2018). Donepezil, galantamin, rivastigmin i huperzin A su kompetitivni ili reverzibilni inhibitori acetilholinesteraze, dok je memantin (Slika 28) nekompetitivni antagonist NMDA receptora (Tabela 14) (Korábečný i dr., 2018). Ireverzibilni inhibitori AChE, posebno organofosfatna jedinjenja, najčešće se primenjuju kao insekticidi i nervni bojni agensi (Agatonovic-Kustrin i dr., 2018). Mnogi odobreni lekovi za tretiranje AB imaju ograničeno terapijsko delovanje i dužinu tolerancije, usled nedovoljne raspoloživosti, hepatotoksičnosti i neselektivnosti, uzrokujući pojave poput vrtoglavice, dijareje, mučnine i povraćanja (Agatonovic-Kustrin i dr., 2018). Takrin, prvi odobreni AChE inhibitor za tretman AB, je povučen sa tržišta lekova usled hepatotoksičnosti (Najafi i dr., 2017). Trenutno ne postoje lekovi koji mogu da izleče ili zaustave progresiju Alzheimer-ove bolesti.



Slika 28. Hemijske strukture terapijskih agenasa za Alzheimer-ovu bolest.

Zbog ozbiljnih nuspojava dostupnih inhibitora holinesteraze potraga za novijim efikasnim i netoksičnim inhibitorima je od velikog interesa među istraživačima. Iz tog razloga je mnogo novih inhibitora holinesteraze izolovano iz prirodnih izvora ili sintetisano (Öztaskin i dr., 2017). Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju da sekundarni metaboliti biljaka kao što su steroli, terpenoidi, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja poseduju izvesnu sposobnost ka inhibiciji AChE (Ajayi i dr., 2019). Etilacetatni i metanolni ekstrakt cveta *Crocus chrysanthus* (Zengin i dr., 2019) i metanolni ekstrakt semena *Silybum marianum* (Nazir i dr., 2018) su demonstrirali inhibitornu aktivnost prema AChE i BChE. Heksanski ekstrakt lukovice *Rhodolirium andicola* se odlikovao većim potencijalom inhibicije AChE u odnosu na hloroformski ekstrakt (Moraga-Nicolás i dr., 2018). U heksanskom ekstraktu je detektovan alkaloid norplavin-diacetat, dok su galantamin, likoramin i 6 $\alpha$ -deoksi-tazetin identifikovani kod oba ekstrakta. Prema autorima, likoramin, norplavin-diacetat i 6 $\alpha$ -deoksi-tazetin su potencijalni inhibitori acetilholinesteraze uz od ranije poznat inhibitor galantamin. Sposobnost ka inhibiciji AChE, odnosno AChE i BChE su ispoljili fenolni diterpeni 7 $\alpha$ -metoksirosmanol i izorosmanol ekstrahovani iz nadzemnih delova žalfije (Sallam i dr., 2016), i flavon nepitrin izolovan iz ruzmarina (Karim i dr., 2017), redom. Potentnu inhibitornu aktivnost prema AChE su demonstrirali epikatehin galat (flavan-3-ol), 1,2,3,4,6-*O*-pentagaloilglukoza, herbacetin

(flavonol), rodiosin i rodionin (flavonol glikozidi), jedinjenja izolovana iz korena biljke *Rhodiola crenulata* (Li i dr., 2017). Istraživanje Arjun i dr. (2018) je pokazalo da flavonoid *trans*-tefrostakin, izolovan iz lista biljke *Tephrosia purpurea*, efikasno inhibira AChE, kao i izoviteksin-7-*O*-metil (*C*-glikozilflavon) koji je izolovan iz lista *Anthocleista vogelii* (Ajayi i dr., 2019). Da je berberin-hlorid, izohinolinski alkaloid izolovan iz rizoma biljke *Coptis chinensis*, potentni inhibitor AChE i BChE, a 13-alkilberberin i dehidroevodiamin potentni inhibitori AChE, odnosno hidrokoptisonin BChE demonstrirano je u studiji Cao i dr. (2018). U studiji Ahmad i dr. (2018) jadvarin-A (norditerpenoid alkaloid), izotalatizidin-hidrat i dihidropentaginin su pokazali kompetitivno inhibitorno delovanje inhibirajući AChE i BChE, redom, dok su 1 $\beta$ -hidroksi, 14 $\beta$ -acetil kondelfin i jadvarin-B demonstrirali nekompetitivni tip inhibicije. Navedena jedinjenja su izolovana iz nadzemnih delova biljke *Delphinium denudatum*.



Tabela 14. Dostupni lekovi u terapiji Alzheimer-ove bolesti.

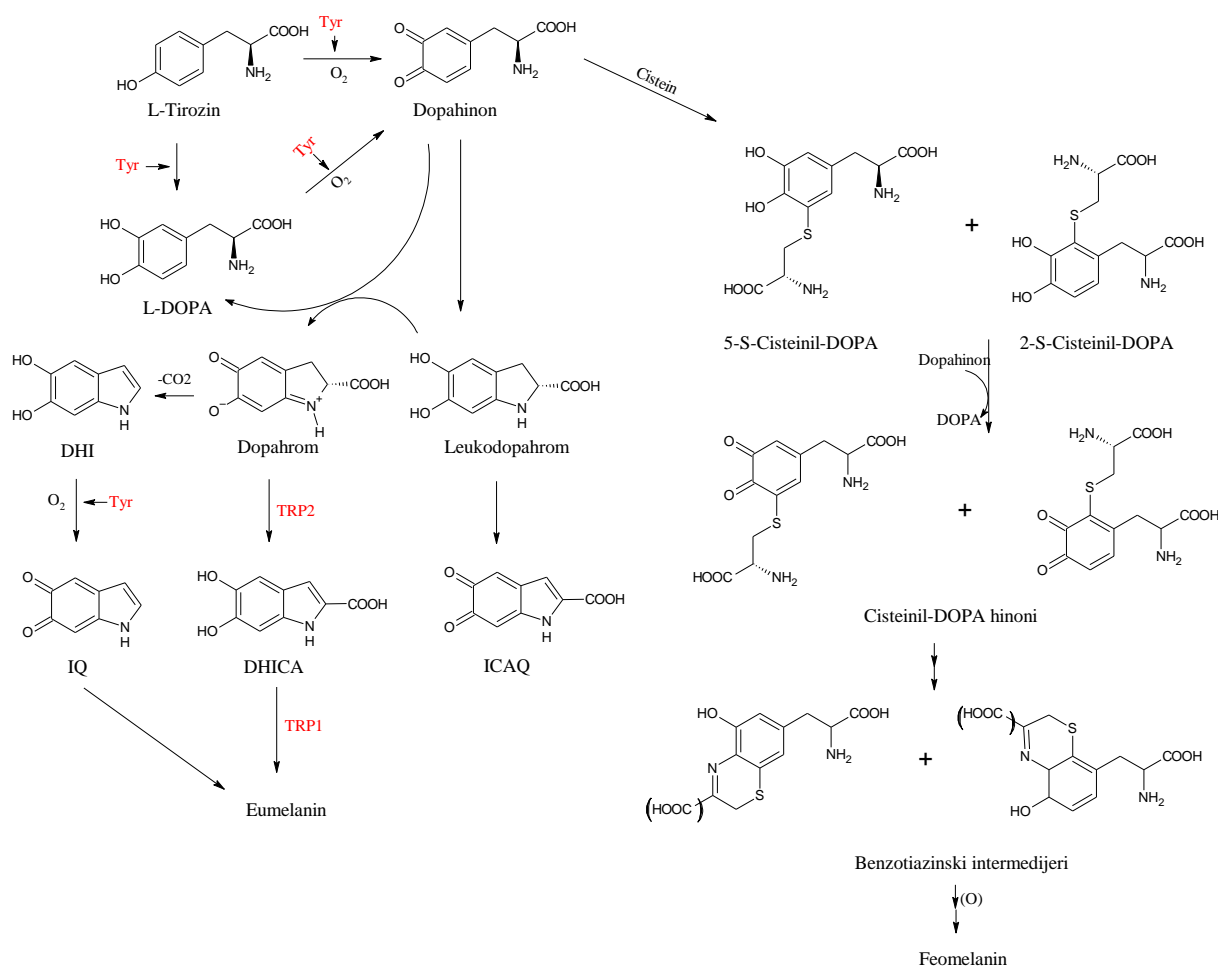
<i>Terapijski agens</i>	<i>Mehanizam delovanja</i>	<i>Prednost</i>	<i>Nedostatak</i>
<b><i>Donepezil</i></b>	Reverzibilni inhibitor AChE	Poboljšavanje kognitivnih deficita; Povećavanje održivosti neurona u odnosu na toksičnost A $\beta$ <sub>42</sub>	Obnavljanje holinergičkog deficita u periodu ne dužem od tri godine; Svojstva bolesti se ne modifikuju
<b><i>Galantamin</i></b>	Reverzibilni inhibitor AChE	Poboljšavanje kognitivnih deficita; Povećavanje održivosti neurona u odnosu na toksičnost A $\beta$ <sub>42</sub>	Obnavljanje holinergičkog deficita u periodu ne dužem od tri godine; Svojstva bolesti se ne modifikuju
<b><i>Rivastigmin</i></b>	Reverzibilni inhibitor AChE	Poboljšavanje kognitivnih deficita	Obnavljanje holinergičkog deficita u periodu ne dužem od tri godine; Svojstva bolesti se ne modifikuju
<b><i>Huperzin A</i></b>	Reverzibilni inhibitor AChE	Antiinflamatorna svojstva; Neuroprotektivna svojstva (u odnosu na toksičnost A $\beta$ <sub>42</sub> i ekscitotoksičnost); Zaštita mitohondrija u odnosu na toksičnost iniciranu A $\beta$ ; Redukcija akumulacije reaktivnih kiseoničnih vrsta; Inhibicija GSK-3 $\beta$ ; Povećavanje nivoa $\beta$ -katenina	
<b><i>Memantin</i></b>	Antagonist NMDA receptora		Svojstva bolesti se ne modifikuju

GSK-3 $\beta$  – Glikogen-sintetaza-kinaza-3 $\beta$

### 2.3.6. Antimelanogeno delovanje

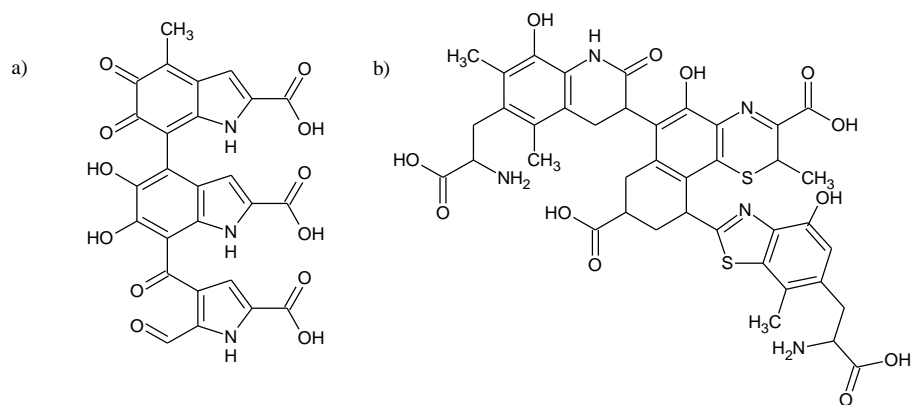
Ljudska koža ima površinu od 1,5 do 2 m<sup>2</sup> i čini približno 15% težine celog organizma, i najveći je ljudski organ (Xie i dr., 2018). Koža se sastoji iz tri sloja epidermisa, dermisa i potkožnog tkiva (hipodermisa). Epidermis, koji ima važnu ulogu u održavanju temperature tela, sadrži keratinocite, melanocite, Merkelove i Langerhans-ove ćelije. U dermisu, lociranom ispod epidermisa, se nalaze brojni nervni završetci, folikuli dlaka, znojne, lojne i apokrine žlezde, krvni i limfni sudovi. Potkožno tkivo se sastoji od areolarnog vezivnog tkiva, adipoznog tkiva, elastina, fibroblasta, makrofaga i adipocita (Lee i dr., 2018). Za boju ljudske kože je u najvećoj meri odgovoran pigment melanin koji se sintetiše u melanocitima, u bazalnom sloju epidermisa unutar sitnih organela-melanozoma, procesom koji se naziva melanogeneza (Napagoda i dr., 2018). Sinteza melanina je kontrolisana ključnim melanogenim enzimima kao što su tirozinaza, tirozinazi-srodni proteini TRP1 (eng. *Tyrosinase-Related Protein 1*) i TRP2/DCT (eng. *Tyrosinase-Related Protein 2/Dopachrome Tautomerase*) (Park i dr., 2018). U inicijalnoj fazi melanogeneze dolazi do formiranja dopahinona iz L-tirozina u dva koraka. Prvo se odvija hidrosilacija L-tirozina u L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) što je praćeno oksidacijom L-DOPA u dopahinon katalitičkim delovanjem tirozinaze. Dopahinon predstavlja supstrat za sintezu dve vrste melanina, eumelanina i feomelanina (Slika 29). Kada se formira dopahinon, on podleže intramolekularnoj ciklizaciji stvarajući leukodopahrom (ciklodopa). Redoksnom izmenom između leukodopahroma i dopahinona nastaje dopahrom i L-DOPA. Postepenom dekompozicijom dopahroma nastaje 5,6-dihidroksiindol i 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilna kiselina. Ovaj proces katališe tirozinazi-srodan protein 2. Kao završni produkt oksidacije ovih dihidroksiindola nastaje eumelanin (braon/crne boje). Veruje se da TRP1 katališe oksidaciju 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilne kiseline u eumelanin (Pillaiyar i dr., 2017). Sa druge strane, u prisustvu cisteina ili glutationa, dopahinon se konvertuje u 5-S-cisteinil DOPA-u ili glutationil DOPA-u koji se dalje prevode do feomelanina (crvenkaste/žute boje). Na Slici 30 su prikazane hemijske strukture eumelanina i feomelanina. Eumelanin produkovan u ljudskim melanocitima je efikasan protektor od sunčevog zračenja, antioksidant i „hvatač“ slobodnih radikala, dok feomelanin deluje kao endogeni fotosenzitizer koji generiše reaktivne kiseonične vrste nakon izlaganja UV zračenju doprinoseći kancerogenezi (Dzierżęga-Lęcznar i dr., 2015). Iako obe vrste melanina generišu ciklobutan pirimidin dimer, dugo nakon izlaganja ćelije UVA zračenju, feomelanin je potentniji generator ovih mutagenih DNK fotoprodukata (Dzierżęga-Lęcznar i dr., 2015). Uopšteno, melanin je odgovoran za apsorbovanje i zaštitu kože od štetnog delovanja UVA i UVB zračenja, ali prekomerna akumulacija ovog epidermalnog pigmenta može da

uzrokuje pege, melazmu, solarni lentigo, postinflamatornu hiperpigmentaciju (Jdey i dr., 2017) i kancer kože (Şöhretoğlu i dr., 2018). Pored ultraljubičastog zračenja i pojedine supstance mogu da stimulišu proizvodnju melanina, kao što su forskolin, toksin kolere, melanocitni-stimulišući hormon, izobutilmetilksantin, analozi diacilglicerola i metaboliti vitamina D, koji su okidač melanogeneze i nekih oboljenja poput Cushing-ovog sindroma i tumora melanocita (Lee i dr., 2018).



Slika 29. Put melanogeneze (sinteza eumelanina i feomelanina) (Pillaiyar i dr., 2017).

*DHI* – 5,6-dihidroksiindol; *DHICA* – 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilna kiselina; *IQ* – indol-5,6-hinon; *ICAQ* – indol-2-karboksilna kiselina-5,6-hinon; *IQ* – indol-5,6-hinon; *Tyr* – tirozinaza; *TRP1* – tirozinazi-srodan protein 1; *TRP2* – tirozinazi-srodan protein 2.



Slika 30. Hemijska struktura eumelanina (a) i feomelanina (b) (Migas i Krauze-Baranowska, 2015).

Tirozinaza je ključni enzim u biosintezi melanina kod sisara, bakterija, biljaka i gljiva (Šöhretoğlu i dr., 2018). Tirozinaza učestvuje i u procesu sinteze neuromelanina katališući oksidaciju dopamina do dopahinona. Prekomerna produkcija dopahinona dovodi do neuronalnog oštećenja i ćelijske smrti. To povezuje tirozinazu sa neurodegenerativnim oboljenjima kao što su Parkinsonova i Huntington-ova bolest (Pillaiyar i dr., 2017). Osim toga, tirozinaza je odgovorna za reakcije enzimskog tamnjenja u voću i povrću (Šöhretoğlu i dr., 2018).

Genetski faktori, endokrini poremećaji, povrede, kontraceptivne pilule, trudnoća i lekovi koji utiču na produkciju melanina, kao što su hlorpromazin i hidrosihlorokvin, su neki od značajnijih faktora koji doprinose hiperpigmentaciji kože (Saeedi i dr., 2019). Tretman hiperpigmentacije je veoma složen. U težim slučajevima primenjuje se tretman laserom, dok se pege, mrlje, melazme mogu tretirati sa topikalno kozmetičkim proizvodima (Saeedi i dr., 2019).

Trenutno je veliki broj istraživanja usmeren ka pronalazenju novih i efikasnih jedinjenja za izbeljivanje kože s obzirom da kozmetički proizvodi sa efektima izbeljivanja čine veliki deo tržišta kozmetičkih proizvoda. Studije o inhibiciji biosinteze melanina su ukazale da arbutin, kojična kiselina i drugi prirodni produkti inhibiraju melanogenezu i hiperpigmentaciju (Lee i dr., 2019). Međutim, kojična kiselina uzrokuje dermalnu senzibilizaciju pri terapijskim koncentracijama, dok je arbutin potencijalno citotoksičan (Mukherjee i dr., 2018). Poremećaj u melanogenezi je često povezan sa nastankom malignog melanoma (Chen i dr., 2016). Prema tome, inhibitori tirozinaze mogu biti potencijalno korisni za prevenciju kancera kože i nekih dermatoloških oboljenja povezanih sa hiperpigmentacijom (Chen i dr., 2016), potom kao konzervansi, biocidi i bioinsekticidi (Chen i dr., 2019). Biljke i njihovi ekstrakti su značajni i

jeftini izvori aktivnih jedinjenja koja mogu biti primenjena za inhibiciju aktivnosti tirozinaze i proizvodnje melanina (Muddathir i dr., 2017).

Fatiha i dr. (2015) su ispitivali antitirozinaznu aktivnost etanolnih ekstrakata lista različitih vrsta mente. Rezultati pokazuju da se vrsta *Mentha rotundifolia* odlikuje najvećom sposobnošću inhibicije tirozinaze, sa dominantnim detektovanim jedinjenjima: rozmarinskom kiselinom, diosminom (flavonski glikozid) i luteolinom (flavon). Antitirozinazno delovanje su demonstrirale ekstrakti lista i peteljke *Taraxacum mongolicum* (dandelion), a najpotentniji je bio 50% etanolno-vodeni ekstrakt peteljke (Xie i dr., 2018). Navedeni ekstrakt maslačka je imao najveći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, dok je među detektovanim jedinjenjima ferulna kiselina bila dominantna komponenta. Pomenuta kiselina je efikasan inhibitor tirozinaze (Sahin, 2018). Lee i dr. (2019) su izolovali *p*-kumarinsku kiselinu i kvercetin kao najaktivnije komponente etanolnog ekstrakta *Kummerowia striata*. Rezultati izvedenih testova su pokazali da ova jedinjenja poseduju antimelanogenu i antioksidativnu aktivnost. Etanolni ekstrakt je demonstrirao antimelanogeno delovanje inhibirajući aktivnost tirozinaze i sintezu melanina u B16F10 ćelijama melanoma, bez indukovane citotoksičnosti. Da je kvercetin potentni inhibitor tirozinaze pokazano je u studiji Şöhretoğlu i sar. (2018). Kvercetin je demonstrirao veći potencijal inhibicije ovog enzima u odnosu na kojičnu kiselinu. IC<sub>50</sub> vrednost su iznosile 40,94 i 46,94 µM, redom. U istoj studiji kemferol je demonstrirao slabiju inhibitornu aktivnost u odnosu na kvercetin. Razlika između strukture kvercetina i kemferola je dodatna hidroksilna grupa na poziciji C-3' prstena B. Flavonoidi koji imaju hidroksilnu grupu na poziciji C-3' prstena B, hidroksilnu grupu na poziciji C-3 i karbonilnu grupu na poziciji C-4 prstena C ispoljavaju veći kapacitet inhibicije tirozinaze (Şöhretoğlu i dr., 2018). Wagle i dr. (2019) su ispitivali antitirozinazni potencijal četrnaest izolovanih jedinjenja etanolnog ekstrakta korena *Pueraria lobata* (kudzu) i utvrdili da je izoflavon kalikozin (3'-hidroksiformononetin) veoma potentan inhibitor tirozinaze. Osim toga, prema autorima, prisustvo hidroksilne i metoksilne grupe na poziciji C-3' i C-4', redom, skeleta izoflavona igra ključnu ulogu u inhibiciji aktivnosti tirozinaze. Movahhedini i dr. (2016) su ispitivali antitirozinaznu aktivnost etarskog ulja i ekstrakta *Ajuga chamaecistus*. Samo je etarsko ulje demonstriralo sposobnost inhibicije tirozinaze. U njemu su detektovani, između ostalih jedinjenja, spatulenol (triciklični seskviterpenoid), linalool (monoterpeniski alkohol), timol i karvakrol. Potentnu antitirozinaznu aktivnost pokazuje etarsko ulje *Cinnamomum zeylanicum* (cimet), *Citrus hystrix* (kafir limeta), *Citrus grandis* (pomelo) (Aumeeruddy-Elalfi i dr., 2016), *Mentha longifolia* (divlja menta) (Asghari i dr., 2018). U etarskom ulju mente je utvrđeno prisustvo značajne količine 1,8-cineola (33,5%), linaloola (15,1%), mentona (12,9%) i *trans*-piperiton oksida (12,6%). Potentnu

inhibiciju tirozinaze su demonstrirali hidrometanolni ekstrakt cveta *Cassia auriculata* (Napagoda i dr., 2018), etanolni ekstrakt lista *Morus nigra* (crni dud) (de Freitas i dr., 2016), metanolni ekstrakti mahune i kore *Acacia nilotica* (akacija) (Muddathir i dr., 2017), etanolni ekstrakti nadzemnog dela *Daucus carota* (šargarepa), odnosno nadzemnog dela *Frankenia laevis* (Jdey i dr., 2017). U šargarepi su detektovane kao glavne fenolne komponente hlorogenska kiselina i kvercetin, a u frankeniji galna kiselina, *p*-kumarinska kiselina i katehin.

### 2.3.7. Gojaznost i antigojazni agensi

Prevalenca gojaznosti i prekomerne uhranjenosti je dramatično povećana usled savremenog načina života i povećanog konzumiranja hrane bogate mastima i šećerima (Liu i dr., 2018). U svetu je više od 1,9 milijardi odraslog stanovništva prekomerno uhranjeno, 650 miliona gojazno, dok je 41 milion dece uzrasta do pet godina prekomerno uhranjeno ili gojazno (Sosnowska i dr., 2018). Gojaznost je hronična bolest koju karakteriše prekomerno uvećanje masnih depoa. Antropometrijski standard za definisanje gojaznosti i stepena gojaznosti je indeks telesne mase (eng. *Body Mass Index*, BMI), surogat procenta masnog tkiva u ukupnoj telesnoj masi čoveka (Popović, 2016). BMI se zasniva na pretpostavci da gojaznost (Tabela 15) postoji kada osoba ima telesnu masu veću od idealne telesne mase koja odgovara njegovoj telesnoj visini i računa se na sledeći način:

$$BMI = \frac{\text{Telesna masa (kg)}}{[\text{Telesna visina (m)}]^2}$$

Gojaznost može uzrokovati mnoge hronične bolesti poput kardiovaskularne, dijabetesa, kancera, metaboličkog poremećaja (Du i dr., 2018). Ona može biti jatrogena, odnosno sekundarna prouzrokovana upotrebom određenih lekova (antipsihotika, antidepresiva, antiepileptika, steroida i insulina) ili podstaknuta drugim oboljenjima (Cushing-ov sindrom, hipotireoidizam i hipotalamična disfunkcija) (Mohamed i dr., 2014).

Tabela 15. BMI vrednosti koje je objavila Svetska zdravstvena organizacija (Mohamed i dr., 2014).

<i>Kategorija uhranjenosti</i>	<i>BMI (<math>\frac{kg}{m^2}</math>)</i>
Pothranjenost	< 18,5
Normalna uhranjenost	18,5–24,9
Prekomerna uhranjenost	25–29,9
Gojaznost I stepena	30–34,9
Gojaznost II stepena	35–39,9
Gojaznost III stepena	$\geq 40$

Jedna od strategija za prevenciju gojaznosti jeste redukcija digestije masti i apsorpcije u organima za varenje (Liu i dr., 2018). Pankreasna lipaza (triacilglicerol-acil-hidrolaza) produkovana u acinarnim ćelijama pankreasa, koja katališe hidrolizu triacilglicerola u gastrointestinalnom traktu, je ključni enzim za apsorpciju lipida. Ona je odgovorna za hidrolizu 50–70% ukupnih dijetarnih masti (Sosnowska i dr., 2018). Inhibicija lipaze uz redukciju apsorpcije lipida je atraktivan pristup za razvijanje novih lekova za tretiranje gojaznosti i prekomerne uhranjenosti (Liu i dr., 2018). Inhibitor lipaze orlistat (Tabela 16) je odobren 1999. godine od strane Američke agencije za hranu i lekove (eng. *US Food and Drug Administration*, USFDA) kao lek za tretiranje gojaznosti (Liu i dr., 2018). Farmakoterapijom se, uz dijetu i vežbanje, postiže smanjenje telesne mase za 2–10% po godini (Mohamed i dr., 2014).

Potencijal biljaka, lekovitog bilja i njihovih derivata za tretiranje gojaznosti i dalje je u velikoj meri neistražen i može biti odlična alternativa za razvoj bezbednih i efikasnih lekova (baziranih na prirodnim produktima) za lečenje gojaznosti (Balaji i dr., 2016). U potrazi za bioaktivnim inhibitorima pankreasne lipaze iz prirodnih izvora, testirani su različiti biljni ekstrakti i njihove fitohemikalije kako bi se utvrdilo da li se odlikuju sposobnošću inhibicije lipaze. Znatna kapacitet inhibicije ovog enzima su demonstrirali metanolni ekstrakti *Eriochloa villosa*, *Orixa japonica* i *Setaria italica* (Sharma i dr., 2005), etanolni ekstrakti listova *Garcinia vilersiana*, *Cryptolepis elegans* i *Phyllanthus chamaepeuce* (Dechakhuamphu i Wingchum, 2015), etilacetatni ekstrakt kore *Oroxylum indicum* (Mangal i dr., 2017). Tri flavonoida izolovana iz kore *Oroxylum indicum* (oroksilin A, hrizin, baikalein) su demonstrirala antilipaznu aktivnost, pri čemu se oroksilin A odlikovao najvećim kapacitetom inhibicije lipaze.

Tabela 16. Lekovi za tretiranje gojaznosti (Mohamed i dr., 2014).

<i>Lek</i>	<i>Mehanizam delovanja</i>	<i>Efekat na telesnu težinu</i>	<i>Nusefekti</i>
Fentermin ( <i>Fastin</i> ) Dietilpropion	Supresant apetita smanjuje usvajanje hrane. Simpatomimetski amin podstiče oslobađanje norepinefrina.	3,6 kg manje u roku od šest meseci 3 kg manje u roku od šest meseci	Glavobolja, insomnia, razdražljivost, palpitacija, nervoza
Fluoksetin ( <i>Prozac</i> <sup>®</sup> )	Redukuje uzimanje hrane putem selektivne inhibicije ponovnog preuzimanja serotonina.	4,74 kg manje u roku od šest meseci i 3,15 kg u roku od godinu dana	Uzrujanost, nervoza
Sibutramin ( <i>Meridia</i> )	Redukuje uzimanje hrane putem inhibicije ponovnog preuzimanja serotonina-norepinefrina.	4,45 kg manje u roku od godinu dana	Glavobolja, insomnia, suvoća usta i konstipacija. Dugotrajan tretman povećava opasnost od srčanog i moždanog udara.
Orlistat ( <i>Xenical</i> <sup>®</sup> )	Inhibitor lipaze smanjuje apsorpciju masti.	2,59 kg manje u roku od šest meseci i 2,89 kg u roku od godinu dana	Dijareja, nadutost, abdominalni bol i dispepsija
Rimonabant ( <i>Acomplia</i> )	Selektivni blokator kanabinoidnog receptora tip 1 (CB1) redukuje uzimanje hrane.	5,1 kg manje u roku od godinu dana	Vrtoglavica, mučnina, dijareja, artralgiya

Sposobnost inhibicije lipaze je demonstrirao cijanidin-3-glukozid, antocijanin izolovan iz aronije (Worsztynowicz i dr., 2014), 5-metoksi-7-hidroksi-9,10-dihidro-1,4-fenantrenhinon izolovan iz biljke *Dendrobium formosum* (Inthongkaew i dr., 2017), strictinin (hidrosolubilni tanin) izolovan iz Pu'er čaja (*Camellia sinensis*) (Chen i dr., 2018b), biflavonoidi izoginkgetin, bilobetin, ginkgetin i sciadopitizin koji su izolovani iz *Ginkgo biloba*-e (Liu i dr., 2018). Habtemariam (2013) je ispitivao potencijal inhibicije kemferol-3-*O*-rutinozida, rutina, kvercetina, luteolina i kemferola, izolovanih jedinjenja iz nadzemnih delova *Cassia auriculata*. Najpotentniji je bio kemferol-3-*O*-rutinozid, dok su kvercetin, luteolin i rutin pokazali slab



inhibitorni kapacitet a kemferol neaktivnost.  $IC_{50}$  vrednost za pomenuta jedinjenja je iznosila 1,7, 43,9, 76,5 i 91  $\mu\text{g/ml}$ , redom. Rutin u odnosu na kemferol-3-*O*-rutinozid ima jednu hidroksilnu grupu više u B prstenu skeleta flavonoida. Ova razlika u strukturi se u velikoj meri odrazila na potencijal inhibicije lipaze s obzirom da je rutin oko pedeset puta slabiji inhibitor ovog enzima.

### 2.3.8. Antikancerogena aktivnost

Pored kardiovaskularnih bolesti, maligne bolesti su vodeći uzročnik mortaliteta u svetu. Karcinom dojke najčešća je maligna bolest kod žena, dok su karcinomi pluća i prostate najčešće maligne bolesti kod muškaraca (Soguel i dr., 2017). Za maligna oboljenja karakteristična je nekontrolisana deoba ćelija uz odsustvo apoptoze, prodiranje u okolna tkiva, širenje po organizmu putem krvotoka ili limfotoka i formiranje sekundarnih tumora. Sekundarni (metastazirani) tumori su najčešći uzroci smrtnosti kod bolesnika sa malignim tumorom (Kenific i dr., 2010).

Kancerogeneza je proces transformacije ćelija iz normalnih u maligne, a kancerogen je svaka supstanca ili agens koji indukuje razvoj maligne bolesti. Kancerogeni faktori mogu biti egzogeni ili endogeni. U egzogene faktore spadaju: agensi povezani sa konzerviranjem i pripremom hrane, ksenobiotici, jonizujuće i nejonizujuće zračenje, prirodna i sintetička hemijska jedinjenja, virusi Epstein-Barr virus, humani papiloma virus, humani T-limfotropni virus, virus hepatitisa B i C, i određeni paraziti (Švarc-Gajić, 2009). Osim toga, alkohol, dim cigarete (Tabela 17) kao i upotreba hrane kontaminirane mikotoksinima doprinosi pojavi određenih vrsta neoplazmi (Tanaka i dr., 2013). U endogene faktore spadaju uslovi i agensi koji uzrokuju poremećaj imunog sistema i inflamaciju (na primer, ulcerozni kolitis, pankreatitis), genetska predodređenost, hormonski status, starost (Oliveira i dr., 2007; Tanaka i dr., 2013).

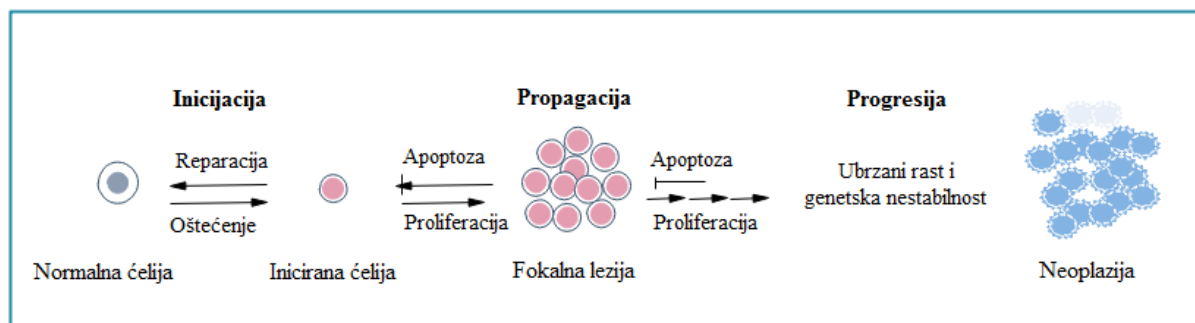
Tabela 17. Inflamacija i povezani kanceri (Shi i dr., 2017).

<i>Induktor</i>	<i>Inflamacija</i>	<i>Kancer</i>
Patogeni creva	Inflamatorna bolest creva	Kancer debelog creva
Dim cigarete	Bronhitis	Kancer pluća
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis	Karcinom želuca
Humani papiloma virus	Cervicitis	Karcinom cerviksa
Virus hepatitisa B/C	Hepatitis	Hepatocelularni karcinom
Bakterija, kamen žučne kese	Holecistis (zapaljenje žučne kese)	Kancer žučne kese
Epstein-Barr virus	Mononukleoza	Bruckitt-ov limfom
Ultraljubičasto zračenje	Opekotine od sunca	Melanom
Azbestna vlakna	Azbestoza	Mezoteliom
Gram-uropatogeni	Šistozomijaza (Bilharzija)	Kancer mokraćne bešike
Želudačna kiselina, alkohol, duvan	Ezofagitis (zapaljenje sluzokože jednjaka)	Karcinom jednjaka

Kancerogeneza započinje fazom inicijacije, nastavlja se fazom promocije i završava fazom progresije odnosno metastaziranja. Inicirana ćelija sama po sebi nije ćelija kancera s obzirom da nema svojstvo nekontrolisanog rasta. Osim toga, ne produkuju sve inicirane ćelije kancere. Naime, mnoge od njih podležu programiranoj ćelijskoj smrti ili apoptozi ili bivaju uništene imunim odgovorom. Da bi se inicirana ćelija transformisala u ćeliju kancera, i eventualno produkovala detektabilni tumor, neophodna je faza propagacije. U ovoj fazi dolazi do ekspanzije iniciranih ćelija u fokalne lezije (Slika 31). Tokom faze propagacije dolazi do promene u ekspresiji gena i povećanja broja ćelija s deobom (Klaunig, 2011). Propagacija je završna, ireverzibilna faza kancerogeneze u kojoj usled akumulacije genetskih mutacija dolazi do autonomnog rasta tumora. Ova faza uključuje obrazovanje kancera ili nekog drugog tipa neoplazme.

Supstance koje iniciraju proces kancerogeneze, poput hemijskih kancerogena koji direktno deluju na ćelijske receptore, se označavaju kao primarni kancerogeni (Švarc-Gajić., 2009). Hemijski kancerogeni su, između ostalih, policiklični aromatični ugljovodonici, aromatični amini/amidi, karbamati (Oliveira i dr., 2007). Nasuprot primarnim kancerogenima, pro-kancerogeni nisu direktno uključeni kao takvi u proces kancerogeneze, nego se reakcijama biotransformacije prevode u aktivne oblike. Promoteri nemaju sposobnost da sami iniciraju proces kancerogeneze, ali potpomažu procese inicirane primarnim kancerogenom. Ove supstance mogu značajno povećati proliferaciju ćelija kancera. Estri forbola, izolovani iz krotona, imaju potencijal da deluju kao promoteri tumora putem aktivacije protein kinaze. Ko-

kancerogene supstance su supstance koje pri istovremenom izlaganju kad i primarnom kancerogenu značajno povećavaju ekspresiju tumora. Ove efekte ko-kancerogeni ispoljavaju čak i ukoliko im je organizam bio izložen pre izlaganja primarnom kancerogenu. Komponente dima cigarete i azbesta deluju kao ko-kancerogeni (Švarc-Gajić., 2009).



Slika 31. Faze kancerogeneze.

Hemoterapija kancera obuhvata primenu lekova koji sadrže farmakološki aktivno jedinjenje malih molekulskih masa, kao što je paklitaksel. Aktivne komponente relativno slobodno cirkulišu unutar telesnih fluida i stižu do lokacije tumora. Hemoterapeutici izazivaju smrt udaljenih i cirkulišućih kancernih ćelija kao i malih nedetektabilnih sekundarnih tumora, čak i ukoliko je nepoznata njihova tačna lokacija (Buyel, 2018). Hemoterapija se često koristi u kombinaciji sa radioterapijom kako bi se povećala efikasnost lečenja. Međutim, efikasnost hemoterapije u velikoj meri zavisi od sposobnosti leka da penetrira u tkivo tumora, što je u slučaju velikih, čvrstih tumora otežano zbog ograničene vaskularizacije (Buyel, 2018).

Brojna istraživanja su usmerena ka otkrivanju novih jedinjenja antitumornog delovanja s obzirom da je kancer globalni rastući problem. Paklitaksel je šezdesetih godina prošlog veka otkriven u okviru jednog takvog projekta. On je izolovan iz kore pacifičke tise (*Taxus brevifolia*) (Wani i Horwitz, 2014). Veliki broj otkrivenih antikancerogenih jedinjenja predstavljaju primarne ili sekundarne metabolite biljaka u svojoj osnovnoj formi ili u strukturno modifikovanoj (stilbeni, lignani, steroidi, seskvi- i diterpeni, itd.) (Cvetanović, 2016). Rezveratrol (3,4',5-trihidroksi-*trans*-stilben) izolovan iz kože crnog grožđa pored antioksidativnog delovanja demonstrira i antiproliferativno (Siddiqui i dr., 2015). Antikancerogeni potencijal imaju i genistein (izoflavon), likopen (karotenoid nađen u brojnom voću), mahanin (alkaloid), i desmiflavazid D (glikozid pregnana) (Buyel, 2018). Flavonoidi citrusnog voća kao što su hesperedin, nobiletin, 2'-hidroksiflavanon i kvercetin, se takođe

odlikuju antikancerogenim delovanjem (Chikara i dr., 2018). Antikancerogeni potencijal imaju i flavonoidi ahirobihalkon i luteolin (de Souza i dr., 2018) kao i alkaloidi murajazolin, *O*-metilmurajamin A (Arun i dr., 2017), arborinin (Piboonprai i dr., 2018) i piperlongumin (Piska i dr., 2018). Karnizinska kiselina (diterpen prisutan u znatnoj količini u žalfiji i ruzmarinu) ima brojna bioaktivna svojstva uključujući antioksidativno, antiinflamatorno i antikancerogeno (Bahri i dr., 2016). Betulinska kiselina (pentaciklični triterpenoid) demonstrira antikancerogenu, antinociceptivnu, antiplazmodijalnu i antihelmitinsku aktivnost među značajnijim bioaktivnostima (Costa i dr., 2014), a zerumbin (monociklični seskviterpen) antiproliferativnu aktivnost (Sithara i dr., 2018).

## 2.4. Ekstrakcija

Kvalitativne i kvantitativne karakteristike ekstrakata zavise od primenjenog ekstragenta i tehnike ekstrakcije. Ekstrakcija sa konvencionalnim rastvaračima karakteriše se niskom selektivnošću, visokim utroškom organskog rastvarača i dugim trajanjem procesa. Organski rastvarači koji se primenjuju u konvencionalnim ekstrakcionim tehnikama imaju negativan uticaj na životnu sredinu i zdravlje ljudi. Jedan od glavnih prioriteta politike Evropske unije u oblasti životne sredine jeste da se u periodu od 2010. do 2040. godine značajno redukuje upotreba opasnih rastvarača u industrijskim primenama (Naffati i dr., 2017). Veliki problem predstavljaju i neželjeni ostaci organskih rastvarača u dobijenim ekstraktima. Usled nedovoljne selektivnosti organskih rastvarača dobijeni ekstrakti često sadrže interferirajuće komponente iz matriksa uzorka.

Sve razvijenija svest o negativnom uticaju ljudskih aktivnosti na životnu sredinu doprinela je razvoju „zelenih“ tehnologija. U okviru ovog koncepta razvijene su savremene ekstrakcione tehnike (ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija, ekstrakcija fluidima u superkritičnom stanju, ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju) koje imaju za cilj postizanje kompromisa između ekonomskih i ekoloških zahteva, uz visoke performanse i konkurentnost tehnoloških procesa. Osnovni ciljevi savremenih tehnologija su efikasnost i brzina procesa bez neželjenih efekata na životnu sredinu, uz dobijanje zdravstveno bezbednih proizvoda visokog kvaliteta. Sa aspekta „zelene“ hemije ekstrakcija fluidima u sub- i superkritičnom stanju dobila je na izuzetnom značaju. Ovi fluidi zamenjuju toksične organske rastvarače korišćene u tradicionalnim ekstrakcionim postupcima, uz istovremeno postizanje bolje selektivnosti i efikasnosti. Gustina ovih fluida je relativno niska što doprinosi povećanju rastvorljivosti komponenti u njima. Rastvorljivost jedinjenja u sub- i superkritičnim fluidima je slična rastvorljivosti u organskim rastvaračima, međutim ovi fluidi imaju veću difuzivnost, manji viskozitet i površinski napon od organskih rastvarača, što utiče na skraćivanje procesa i manju potrošnju rastvarača (Wang i dr., 2001; Švarc-Gajić, 2012). Kod superkritične ekstrakcije najčešće korišćeni fluid je ugljen-dioksid. Superkritičnim ugljen-dioksidom mogu se ekstrahovati samo nepolarne komponente uzorka, kao što su masne kiseline, steroli, terpeni, itd. (He i dr., 2012).

### 2.4.1. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju

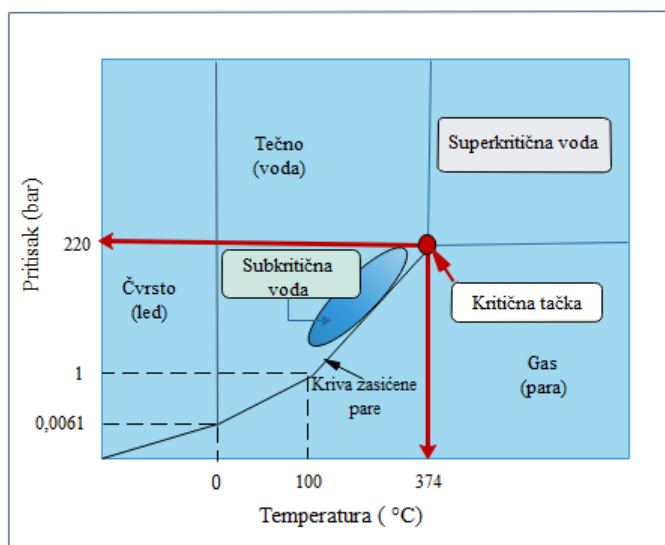
Voda kao ekstragens privlači posebnu pažnju zbog svojih izuzetnih solvacionih i fizičko-hemijskih osobina. U superkritičnom stanju (temperatura i pritisak su iznad 374 °C i 22,1 MPa, redom), posebno ukoliko je zasićena kiseonikom, voda postaje izuzetno reaktivna pa može biti primenjena za degradaciju kontaminanata i razaranje organskog otpada. Superkritičnom vodom je moguće oksidativno razgraditi organska i neorganska jedinjenja kao i tretirati otpadnu vodu, sa velikom reakcionom brzinom, visokom efikasnošću, u veoma kratkom vremenu, i bez nastajanja neželjenih SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub> (Kosari i dr., 2018). Tokom procesa oksidacije superkritičnom vodom C-H-N-jedinjenja bivaju brzo degradirani do ugljen-dioksida, vode, azota i neorganskih soli (Yang i dr., 2018a). Usled zahtevanih ekstremnih operativnih uslova oksidacija superkritičnom vodom je veoma skup proces, ali sa druge strane tretiranje jako koncentrovane otpadne vode može generisati veliku količinu energije i znatno smanjiti operativne troškove. Oksidacione reakcije su jako egzotermne i visoko koncentrovane otpadne vode (hemijska potrošnja kiseonika je iznad 80 g O<sub>2</sub>/l) tretiranjem ovim procesom mogu osloboditi dovoljno toplote, čineći proces atraktivnim za dobijanje energije (Benjumea i dr., 2017). U studiji Chang i dr. (2013) oksidacija superkritičnom vodom je primenjena za tretiranje vode kontaminirane 2,4,6-trinitrotoluenom (TNT). Pri optimalnim operativnim uslovima (550 °C, 24 MPa, 2 min, i pri višku kiseonika od 300%) stopa uklanjanja TNT je iznosila preko 99%. Sem toga, studije su potvrdile da se oksidacija superkritičnom vodom može uspešno primeniti za tretiranje otpadne vode opterećene surutkom (Söğüt i dr., 2011), industrijske otpadne vode sa sirćetnom kiselinom i krotonaldehidom kao glavnim jedinjenjima (Bermejo i Cocero, 2006), komunalnog otpadnog mulja (Qian i dr., 2016), industrijskog i otpadnog mulja (Yang i dr., 2019a), za degradaciju tributil fosfata (Kosari i dr., 2018) kao i organofosfatnih retardanata plamena (Yang i dr., 2019b).

Voda u subkritičnom stanju je prepoznata kao „zeleni“ rastvarač i primenjuje se za konverziju različitih biomaterijala kao što su proteini, lipidi, ugljeni hidrati, i dobijanje jedinjenja dodate vrednosti (Ahmed i Chun, 2018). Kada je reč o hidrolizi subkritičnom vodom, proteini su najčešće hidrolizovani biopolimeri. Hidroliza subkritičnom vodom je korišćena za dobijanje funkcionalnih hidrolizata/peptida ili aminokiselina iz različitih izvora, kao što je animalni otpad (Cheng i dr., 2008; Esteban i dr., 2010; Zhu i dr., 2010), riblji otpad (Kang i dr., 2001; Ahmed i Chun, 2018) i otpad morskih plodova (Yoshida i Tavakoli, 2004). U studiji Asaduzzaman i Chun (2015) je opisano dobijanje hidrolizata iz japanske leteće lignje. Hidroliza subkritičnom vodom u trajanju od tri minuta je izvedena u opsegu temperatura i pritiska od 160

do 280 °C i od 6 do 66 bar, redom. Odnos uzorka i vode je iznosio 1:25 (m/v), dok je brzina mešanja iznosila 140 o/min. Najveći prinos redukujućih šećera je ostvaren na temperaturi od 220 °C, a aminokiselina na 250 °C (oko 421 i 380 mg/100 g, redom). U hidrolizatu su detektovane sve esencijalne aminokiseline, među kojima je leucin bio najzastupljeniji. Prema autorima, redukujući šećeri dobijeni ovom tehnologijom mogu biti upotrebljeni kao izvor energije i prehrambeni aditivi. Esteban i dr. (2010) su demonstrirali da je hidroliza subkritičnom vodom efikasan proces za konverziju  $\alpha$ -keratina iz svinjske dlake u aminokiseline. U pomenutoj studiji je najveći prinos aminokiselina (325 mg/g proteina) postignut pri temperaturi od 250 °C, vremenu 60 min i koncentraciji supstrata od 10 g/l. Pri ovim operativnim uslovima su dobijene značajne količine niskomolekularnih aminokiselina, među kojima su najveći prinosi postignuti za alanin i glicin (85 i 55 mg aminokiseline/g proteina, redom). Pojedina ispitivanja su bila usmerena na dobijanje šećera iz različitih izvora biomase (šećerne trske, kokosove kore, obezmašćenih semenki grožđa, presovanog palminog vlakna) primenom hidrolize subkritičnom vodom (Prado i dr., 2014a; Prado i dr., 2014b). Abaide i dr. (2019a) su opisali dobijanje šećera iz ljuske pirinča, a Abaide i dr. (2019b) iz pirinčane slame putem hidrolize subkritičnom vodom. Prema Abaide i dr. (2019a) najveći prinos redukujućih šećera (oko 18 g/100 g ljuske) i efikasnost (oko 39 g šećera/100 g ugljenih hidrata) je ostvaren pri temperaturi od 220 °C uz odnos vode i uzorka od 7,5:1 (m/m). Pri ovim uslovima u hidrolizatu je celobioza bila dominantni šećer (18 g/l), a zatim ksiloza (17,7 g/l), arabinoza (3,6 g/l), glukoza (1,5 g/l) i levulinska kiselina (0,7 g/l). Prema autorima, ovako dobijeni šećeri mogu biti primenjeni za proizvodnju bioetanolu i za dobijanje drugih hemijskih jedinjenja sa dodatom vrednošću. Levulinska kiselina može biti primenjena za dobijanje metil vinil ketona i alkena, a ksiloza za dobijanje ksilitola (poliol). U studiji Abaide i dr. (2019b) najveći prinos redukujućih šećera (oko 33 g/100 g pirinčane slame) kao i efikasnost (oko 72 g šećera/100 g ugljenih hidrata) su ostvareni na temperaturi od 220 °C i pri odnosu vode i uzorka od 7,5:1 (m/m). Najveći sadržaj levulinske kiseline u hidrolizatu je dobijen na temperaturi od 260 °C pri odnosu vode i uzorka od 15:1. Mayanga-Torres i dr. (2017) su otpad prerade kafe (prah i obezmašćena pogača) tretirali subkritičnom vodom radi hidrolize i ekstrakcije redukujućih šećera u polukontinualnom protočnom sistemu. U slučaju praha kafe maksimalni prinos šećera je iznosio 6,3% za redukujuće šećere i 9% za ukupne redukujuće šećere (150 °C i 30 MPa), dok je maksimalni prinos za ukupne fenole iznosio 26,64 mg ekvivalenta galne kiseline/g praha, pri temperaturi od 200 °C i pritisku od 22,5 MPa. Za obezmašćenu pogaču maksimalni prinos u slučaju redukujućih i ukupnih redukujućih šećera su iznosili 8,79% i 17,23%, redom, pri temperaturi od 175 °C. Pri ovoj temperaturi je dobijen maksimalni prinos ukupnih fenola od

55,31 mg ekvivalenta galne kiseline/g pogače. Prema autorima, prinos šećera opada na temperaturama iznad 175 °C, što je povezano sa degradacijom šećera i nastankom 5-hidroksimetilfurfurala, furfurala i organskih kiselina.

Zbog svoje visoke reaktivnosti voda, kao ekstragens, se najčešće primenjuje u svojoj subkritičnoj oblasti temperatura i pritiska, te se tehnika označava kao ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju (eng. *Subcritical Water Extraction*, SWE). Subkritična voda je u osnovi voda zagrejana do temperature iznad temperature ključanja (100 °C), a ispod kritične temperature (374 °C), i pod pritiskom dovoljnim da je zadrži u tečnom agregatnom stanju (Slika 32). Vodu pri ambijentalnim uslovima karakteriše relativno visoka temperatura ključanja i visoka dielektrična konstanta ( $\epsilon$ ) (Tabela 18). Pri zagrevanju vode dolazi do značajnog pada njene polarnosti pri čemu nastaje rastvarač selektivan prema umereno-polarnim jedinjenjima. Iz ovog razloga voda može biti korišćena za ekstrakciju umereno-polarnih, pa čak i nepolarnih jedinjenja pod specifičnim uslovima (Švarc-Gajić, 2012). Subkritična voda se ponaša kao bazni ili kiseli katalizator u hemijskim reakcijama s obzirom da je njena konstanta disocijacije veća u odnosu na vodu sobne temperature (Naffati i dr., 2017).



Slika 32. Fazni dijagram vode.

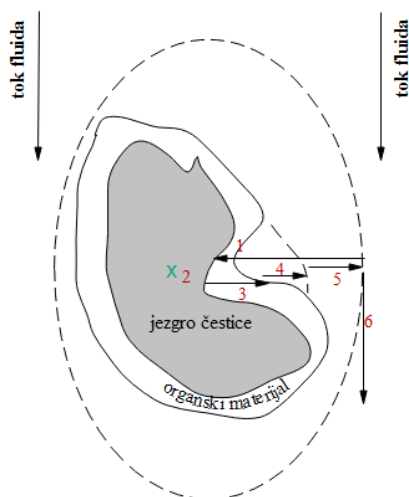


Tabela 18. Fizičko-hemijska svojstva vode pod različitim uslovima (Bubalo i dr., 2015).

<i>Parametri</i>	<i>Voda pod normalnim uslovima</i>	<i>Subkritična voda</i>	<i>Superkritična voda</i>	<i>Pregrejana para</i>
$T$ (°C)	25	250	400	400
$P$ (bar)	1	50	500	1
$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	0,997	0,80	0,58	0,0003
Relativna dielektrična konstanta ( $\epsilon$ )	78,5	27,1	10,5	1
Jonski proizvod vode ( $pK_w$ )	14,0	11,2	11,9	-
Specifični toplotni kapacitet ( $C_p$ ) [kJ/kgK]	4,22	4,86	6,8	2,1
Dinamički viskozitet ( $\eta$ ) [mPas]	0,89	0,11	0,07	0,02
Toplotna provodljivost ( $\lambda$ ) [mW/mK]	608	620	438	55

Kao i kod ostalih tehnika ekstrakcije čvrstih uzoraka mehanizam ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju podrazumeva fazu desorpcije, difuzije i solvatacije (Wiboonsirikul i Adachi, 2008; Švarc-Gajić, 2012). Prema Haghghi Asl i Khajenoori (2013) mehanizam SWE se može podeliti u šest faza, koje su prikazane na Slici 33. Da bi se jedinjenja odvojila od matriksa čvrstih čestica ona se moraju prvo desorbovati. Nakon desorpcije ona difunduju kroz pore čvrstih čestica koje često mogu biti ispunjene organskim slojem. Pre tačke solvatacije komponente sporim mehanizmom difuzije prodiru kroz difuzioni sloj. U difuzionom sloju je difuzija isključivi mehanizam prenosa mase (Švarc-Gajić, 2012). Mešanjem se ne može uticati na transportni mehanizam u difuzionom sloju, ali se može uticati na debljinu sloja, smanjujući

difuzno rastojanje. Osim toga, transport kroz difuzioni sloj zavisi i od koeficijenta difuzije analita. Iako za većinu biljnog materijala limitirajući korak obično predstavlja difuzija rastvorka kroz čvrst materijal, u procesu SWE se kao ograničavajući faktor navodi raspodela rastvorka između matriksa uzorka i rastvarača (Vladić, 2017).



Slika 33. Šematski prikaz mehanizma ekstrakcije: (1) brz ulaz fluida; (2) desorpcija rastvorka iz matriksa; (3) difuzija rastvorka kroz organski materijal; (4) difuzija rastvorka kroz fluid u poroznom materijalu; (5) difuzija rastvorka kroz difuzioni sloj; (6) solvatacija rastvorka.

Prilikom ekstrakcije jedinjenja iz biljnog materijala subkritičnom vodom usled visoke reaktivnosti ovog medijuma može doći do njihove degradacije. Kada se radi o prirodnim glikozidima ili supstancama vezanim za komponente matriksa, hidrolitički potencijal vode može doprineti efikasnosti procesa. Proces je tada potrebno voditi pod strogo kontrolisanim uslovima kako bi se proces hidrolize vodio do željenog stepena, uz izbegavanje degradacije komponenata (Švarc-Gajić, 2012).

Temperatura je najznačajniji parametar koji utiče na proces SWE, a zavisi od ciljnih jedinjenja. Dielektrična konstanta ( $\epsilon$ ) vode na određenoj temperaturi se može izračunati pomoću sledeće jednačine (Richter i dr., 2006):

$$\epsilon = 78,54 \cdot [1 - 4,579 \cdot 10^{-3} \cdot (t - 25) + 1,19 \cdot 10^{-5} \cdot (t - 25)^2 - 2,8 \cdot 10^{-8} \cdot (t - 25)^3]$$

gde je:

$t$  – temperatura ( °C).

Dielektrična konstanta je jedan od najznačajnijih parametara polarnosti rastvarača. Jednostavnim zagrevanjem vode od sobne temperature (25 °C) do 250 °C dielektrična konstanta se menja od približno 80 do 27, što je između vrednosti dielektričnih konstanti etanola i metanola na 25 °C (33 i 24, redom) (Todd i Baroutian, 2017). Zagrevajući vodu do 250 °C rastvorljivost umereno-polarnih jedinjenja se povećava 4–5 redova veličine (Švarc-Gajić, 2012).

Uopšteno, povišenje temperature povećava efikasnost procesa ekstrakcije usled narušavanja interakcija između analita i matriksa uzorka koje su uslovljene Van der Waals-ovim i vodoničnim vezama i interakcijama dipola (Richter i dr., 1996). Zagrevanje utiče na kohezivne (rastvorak-rastvorak) i adhezivne (rastvorak-matriks) interakcije smanjenjem energije aktivacije potrebne za odvijanje procesa desorpcije (Bubalo i dr., 2015). U uslovima povišene temperature dolazi do smanjenja viskoziteta rastvarača, čime se olakšava njegovo prodiranje u pore matriksa i povećava efikasnost procesa ekstrakcije (Richter i dr., 1996). Zavisnost viskoziteta vode od temperature može se predstaviti sledećom jednačinom (Plaza i Turner, 2015):

$$\eta(T) = 2,414 \cdot 10^{-5} \cdot 10^{247,8/(T-140)}$$

gde je:

$\eta$  – dinamički viskozitet (Pas) i

$T$  – apsolutna temperatura (K).

U većini slučajeva efikasnost ekstrakcije subkritičnom vodom raste s temperaturom do određene vrednosti. Međutim, povećanje temperature smanjuje selektivnost ekstrakcije zbog povećane rastvorljivosti i drugih jedinjenja uzorka. Osim toga, na povišenim temperaturama dolazi do razgradnje termolabilnih jedinjenja, i do odvijanja reakcija poput karamelizacije i Maillard-ove reakcije. Iako produkti Maillard-ove reakcije doprinose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata dobijenih SWE, oni takođe mogu biti toksični, mutageni i kancerogeni (Vergara-Salinas i dr., 2015).

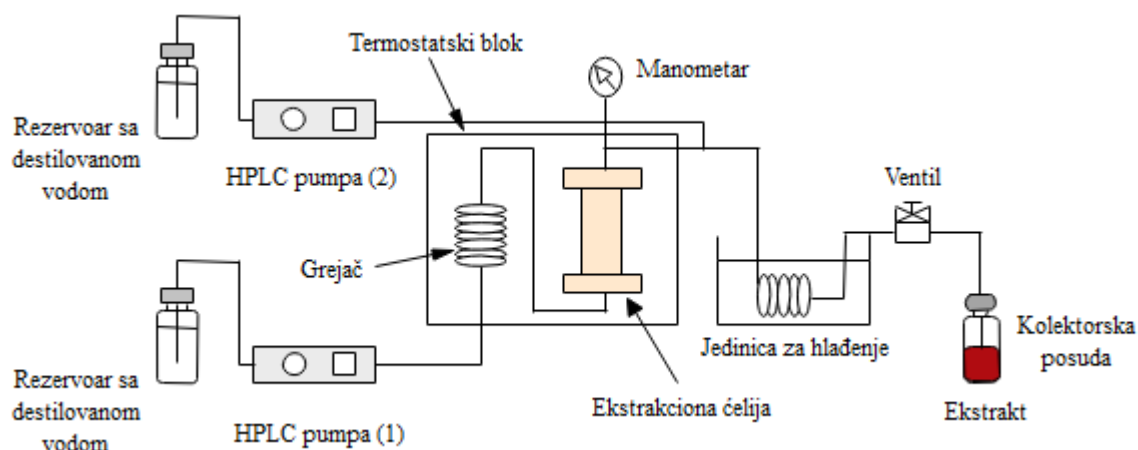
Uticaj pritiska tokom ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju ogleda se u boljem prodiranju rastvarača u pore čvrstog biljnog materijala, čime se intenzivira prenos mase.

Takođe, primenom povišenog pritiska tokom ekstrakcije kontrolišu se i problemi vezani za mehuriće vazduha koji se mogu naći unutar pora matriksa a koji sprečavaju da rastvarač dođe u kontakt sa jedinjenjima od interesa.

Dodatak organskih i neorganskih modifikatora, površinski aktivnih materija i aditiva može da poboljša rastvorljivost ciljnih jedinjenja, i da utiče na fizičko-hemijska svojstva kako rastvarača tako i matriksa uzorka (Plaza i Turner, 2015). Različiti organski rastvarači mogu da se koriste kao modifikatori u SWE, međutim, njihova primena je nepoželjna zbog mogućnosti zaostatka u proizvodu.

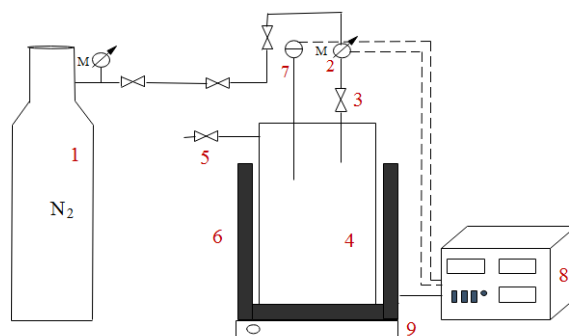
#### 2.4.1.1. Aparatura za izvođenje ekstrakcije subkritičnom vodom

Na tržištu je veoma retka komercijalna aparatura za izvođenje ekstrakcije subkritičnom vodom. Poslednjih godina sve su приметniji naporu u konstruisanju uređaja koji operišu sa vodom u subkritičnom stanju. Generalno, ovakvi uređaji mogu biti konstruisani za rad u dinamičnim (protočnim) i statičnim uslovima. Šematski prikaz uređaja koji se zasniva na protočnom režimu rada dat je na Slici 34. Proces SWE započinje dovođenjem vode na željene vrednosti pritiska i temperature. Zagrevanje vode se postiže prolaskom vode kroz grejač. Nakon dovođenja vode u subkritično stanje, ona se uvodi u ekstrakcionu ćeliju, najčešće od kiselootpornog nerđajućeg čelika, i pušta da pod pritiskom kontinualno protiče kroz sloj uzorka, ekstrahujući pritom željene komponente. Nakon hlađenja i dekompresije, dobijeni ekstrakt se sakuplja u kolektorske posude. Posebnom visokopritisnom pumpom se zagrejana voda propušta kroz izlaznu cev ekstrakcione ćelije kako bi se izbeglo začepljenje usled precipitacije nepolarnih komponenata.



Slika 34. Šematski prikaz protočnog sistema za ekstrakciju subkritičnom vodom (Rangsriwong i dr., 2009).

Šematski prikaz šaržnog uređaja za SWE je dat na Slici 35 (Zeković i dr., 2014). U ekstrakcionu ćeliju (4) se unese uzorak i doda određena zapremina destilovane vode. Ekstrakciona ćelija se zatvori i smesti unutar električne grejne obloge (6). Električna grejna obloga zagreva ekstrakcionu ćeliju, a temperatura se meri i kontroliše regulatorom priključenim na sondu za merenje temperature (7). Odgovarajući radni pritisak se postiže uvođenjem azota (1) u ekstrakcionu ćeliju. Magnetna mešalica (9) se koristi za mešanje u cilju povećanja prenosa mase i toplote, i preveniranja lokalnog pregrevanja materijala na unutrašnjim zidovima ekstrakcione ćelije. Nakon ekstrakcije, ekstrakciona ćelija se vadi iz grejne obloge i brzo hladi u ledenom vodenom kupatilu. Azot se ispušta iz ekstrakcione ćelije otvaranjem izlaznog ventila (5).



Slika 35. Šematski prikaz diskontinualnog sistema za ekstrakciju subkritičnom vodom: (1) boca sa gasom; (2) manometar; (3) ulazni ventil za gas; (4) ekstrakciona ćelija; (5) izlazni ventil za gas; (6) električna grejna podloga; (7) sonda za merenje temperature; (8) termoregulator; (9) magnetna mešalica.

## 2.5. Mikroekstrakcione tehnike

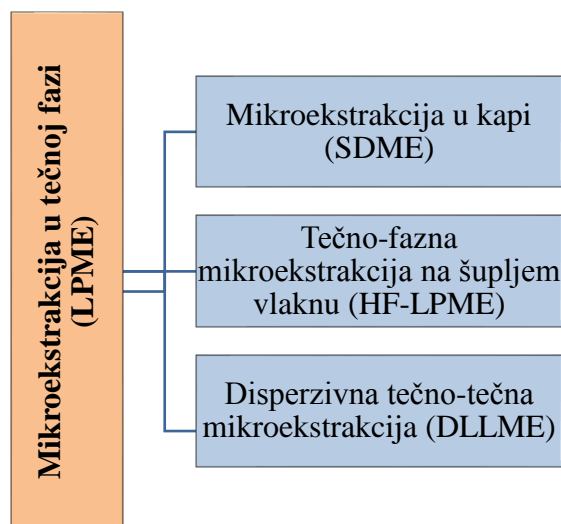
Poslednjih decenija je razvijen veliki broj mikroekstrakcionih tehnika kako bi se unapredila kompatibilnost sa savremenim analitičkim instrumentima, smanjila upotreba opasnih hemikalija i omogućilo uzorkovanje i priprema uzoraka iz vrlo malih bioloških (Ocaña-González i dr., 2016) i nebioloških sistema. Savremeni postupci pripreme uzoraka prate šest opštih trendova: pojednostavljivanje, automatizaciju, minijaturizaciju, ekspeditivnost, ekonomski aspekt i bezbednost (Valcárcel i dr., 2014). U tom kontekstu pojavile su se nove mikroekstrakcione tehnike kao što su mikroekstrakcija na čvrstoj i tečnoj fazi.

Mikroekstrakcione tehnike se primenjuju u kombinaciji sa različitim analitičkim tehnikama koje su po svojoj osetljivosti i dizajnu u potpunosti kompatibilne. Ove tehnike pripreme uzoraka se kupuju sa gasnom hromatografijom, visokoperformansnom tečnom hromatografijom, induktivno spregnutom plazmom, masenom spektrometrijom, atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom, kapilarnom elektroforezom (CE), UV/VIS spektrofotometrijom i infracrvenom spektroskopijom (Abadi i dr., 2012).

### 2.5.1. Mikroekstrakcija u tečnoj fazi

Mikroekstrakcija u tečnoj fazi (eng. *Liquid-Phase Microextraction*, LPME) je minijaturizovana tečno-tečna ekstrakciona tehnika u kojoj je zapremina ekstrakcione faze ispod 100  $\mu\text{l}$  (Fernández i Vidal, 2014). LPME tehnikom se postiže uzorkovanje, ekstrakcija,

razdvajanje i koncentrovanje u jednom koraku. Osnovna klasifikacija mikroekstrakcije u tečnoj fazi (Sarafraz-Yazdi i Amiri, 2010) je predstavljena na Slici 36.



Slika 36. Osnovna klasifikacija mikroekstrakcije u tečnoj fazi.

#### 2.5.1.1. Mikroekstrakcija u kapi

Mikroekstrakcija u kapi (eng. *Single Drop Microextraction*, SDME) je metoda koja se zasniva na raspodeli analita između mikrokapi ekstrakcionog (organskog) rastvarača na vrhu igle mikrošprica i vodene faze uzorka ili „headspace“ faze iznad čvrstog/tečnog uzorka. Nakon ekstrakcije mikropap se uvlači u mikrošpric, te injektuje u GC, HPLC ili CE sistem. U mikroekstrakciji u kapi potrošnja rastvarača u poređenju sa tradicionalnom tečno-tečnom ekstrakcijom je znatno niža, čak do 99%, čime je praktično eliminisana potreba za otparavanjem rastvarača i rekonstituisanjem analita pre injektovanja u odgovarajući analitički instrument.

Različite tehnike mikroekstrakcije u tečnoj fazi koje pripadaju kategoriji mikroekstrakcije u kapi su prikazane u Tabeli 19. Sve tehnike su zasnovane na principu prenosa analita iz uzorka, direktno ili preko druge faze (na primer, „headspace“-a) ili medijatora, u ekstrakcionom rastvaraču mikrolitarske zapremine (Zichová i dr., 2018).

Tabela 19. Tehnike mikroekstrakcije u kapi.

<i>SDME</i>	<i>Akronim</i>
<i>Dvofazni ekstrakcioni sistemi</i>	
Mikroekstrakcija u kapi sa direktnim potapanjem	DI-SDME
Protočna mikroekstrakcija	CFME
„Drop-to-drop“ mikroekstrakcija	DDME
Mikroekstrakcija sa direktnim suspendovanjem kapljice	DSDME
<i>Trofazni ekstrakcioni sistemi</i>	
Mikroekstrakcija u kapi u „headspace“ fazi	HS-SDME
Tečno-tečno-tečna mikroekstrakcija	LLLME
Rastvaračem potpomognuta mikroekstrakcija	SSME

U zavisnosti od pozicije kapi SDME tehnika je definisana kao (Fernández i Vidal, 2014):

- 1) Mikroekstrakcija u kapi sa direktnim potapanjem,
- 2) Mikroekstrakcija u kapi u „headspace“ fazi.

U mikroekstrakciji u kapi sa direktnim potapanjem (eng. *Direct Immersion-Single Drop Microextraction*, DI-SDME) najčešće se koristi GC mikrošpric, nekoliko mikrolitara rastvarača, magnetni mešač i od 0,3 do 40 ml uzorka (Kokosa, 2015). Iglom mikrošprica se probije septum vijale u kojoj se nalazi vodeni rastvor uzorka i potom se njemu izloži kap rastvarača koja se formira na vrhu igle (Slika 37a). Prenos analita iz vodene faze u organsku fazu/kap se odvija dok se ne postigne ravnoteža (Rutkowska i dr., 2014). Ravnotežnu koncentraciju analita u organskoj fazi ( $C_{r,org}$ ) moguće je izračunati pomoću sledeće jednačine (Carasek i dr., 2018):

$$C_{r,org} = K \cdot C_{r,vod} - \frac{K \cdot C_{o,vod}}{1 + K \cdot V_{org}/V_{vod}}$$

gde je:

$C_{r,vod}$  – ravnotežna koncentracija analita u vodenoj fazi,

$C_{o,vod}$  – početna koncentracija analita u vodenoj fazi,

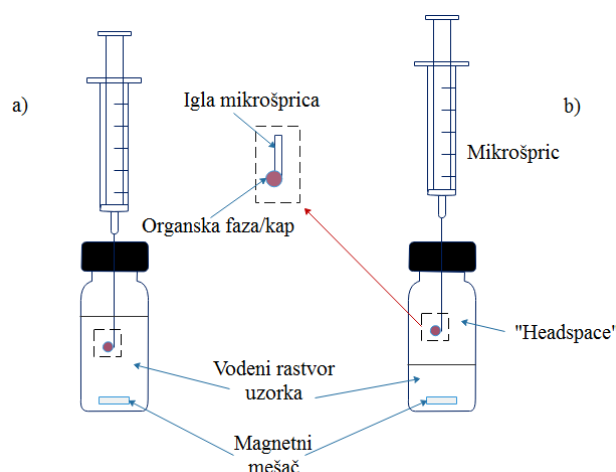
$V_{vod}$  – zapremina vodene faze,

$V_{org}$  – zapremina organske faze i

$K$  – koeficijent raspodele.



Nakon završetka ekstrakcije „obogaćena“ kap se uvlači u mikrošpric i injektuje u analitički instrument. Da bi kap ekstrakcionog rastvarača na vrhu igle mikrošprica ostala stabilna tokom ekstrakcije neophodno je da budu uklonjene nerastvorljive ili čestične materije iz rastvora uzorka, da se odabere organski rastvarač koji je slabo rastvorljiv u vodi i ima nizak napon pare, ali je optimalan za efikasnu ekstrakciju analita, da proces ekstrakcije ne traje dugo i da brzina mešanja rastvora ne bude suviše velika. Ukoliko se koristi magnetni mešač uobičajeno je da se primenjuju brzine mešanja od 300 do 600 o/min, odnosno do 1000 o/min u slučaju primene mikroekstrakcije u kapi u „headspace“ fazi. Ukoliko se koriste igle sa specijalno modifikovanim vrhovima brzine mešanja mogu biti i do 1700 o/min (Jeannot i dr., 2010). Potreba za mešanjem i/ili dinamičkim modom ekstrakcije je uslovljena sporim prenosom mase u tečno-tečnim sistemima usled malih koeficijenata difuzije u tečnostima.



Slika 37. Mikroekstrakcija u kapi: sa direktnim potapanjem (a), u „headspace“ fazi (b).

U mikroekstrakciji u kapi u „headspace“ fazi (eng. *Headspace-Single Drop Microextraction*, HS-SDME) mikrokap organskog rastvarača se nalazi iznad rastvora uzorka, odnosno u „headspace“ fazi (Slika 35b). Analiti se prvo raspodeljuju iz vodenog rastvora uzorka u „headspace“ fazu i potom bivaju ekstrahovani u organsku fazu/kap. Ravnotežnu koncentraciju analita u organskoj fazi ( $C_{r,org}$ ) moguće je izračunati primenom sledeće jednačine (Carasek i dr., 2018):

$$C_{r,org} = \frac{K_{org,vod} \cdot C_{o,vod}}{1 + \left(\frac{K_{h,vod} \cdot V_h}{V_{vod}}\right) + \left(\frac{K_{org,vod} \cdot V_{org}}{V_{vod}}\right)}$$

gde je:

$K_{h,vod}$  – koeficijent raspodele analita između „headspace“ i vodene faze,

$K_{org,vod}$  – koeficijent raspodele analita između organske i vodene faze i

$V_h$  – zapremina „headspace“ faze.

Trofazna SDME je zasnovana na ravnoteži između uzorka, „headspace“ faze i mikrokapi organskog rastvarača (Plotka-Wasyłka i dr., 2016). Prenos mase u HS-SDME je brži nego u DI-SDME iz razloga što su koeficijenti difuzije u gasnoj fazi uobičajeno veći od odgovarajućih koeficijenata difuzije u tečnoj fazi (Plotka-Wasyłka i dr., 2016). Osim toga, povećanjem brzine mešanja i zagrevanjem poboljšavaju se prenosi mase u vodenoj fazi i podstiče konvekcija u „headspace“ prostoru. Zbog toga, može brže da se postigne ravnoteža između uzorka i parne faze.

Na efikasnost SDME ekstrakcije mogu da utiču različiti faktori (Tabela 20). Na osnovu osobina analita i matriksa uzorka odabira se odgovarajuća tehnika mikroekstrakcije u kapi. HS-SDME je podesna za ekstrakciju uglavnom isparljivih i poluisparljivih polarnih i nepolarnih jedinjenja manje molekulske mase. DI-SDME je pogodna za ekstrakciju poluisparljivih nepolarnih ili umereno polarnih jedinjenja većih molekulskih masa. DI-SDME je korišćena za ekstrakciju analita poput pesticida iz povrća i voća (Yang i dr., 2013), pesticida iz kokosove vode (dos Anjos i de Andrade, 2014), hidroksilovanih metabolita policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz morske vode (Wang i dr., 2017b) i akrilamida iz hleba, čipsa i keksa (Saraji i Javadian, 2019). HS-SDME je bila primenjena za ekstrakciju analita poput trihalometana iz uzoraka vode (Aguilera-Herrador i dr., 2008), organskih jedinjenja kalaja iz uzoraka morske vode i ljuskara (Xiao i dr., 2008) i kratkolančanih masnih kiselina (C<sub>2</sub>–C<sub>5</sub>) iz oksidacionih produkata asfaltena (Li i dr., 2010).

Tabela 20. Eksperimentalni faktori u SDME (Tang i dr., 2018).

	<i>Parametar</i>	<i>Zahtevi i efekti</i>
<i>Kap</i>	Zapremina kapi	(i) Zapremina je uobičajeno 0,2–5 $\mu\text{l}$ , ali može iznositi i do 30 $\mu\text{l}$ ; (ii) Količina ekstrahovanog analita povećava se sa zapreminom kapi; (iii) Veća kap je nestabilna i može da padne.
	Rastvarač	(i) Treba da se odlikuje malom isparljivošću i niskim naponom pare (posebno u „headspace“ modu); (ii) Treba da bude nemešljiv sa uzorkom ili kontaktnom fazom; (iii) Treba da bude dovoljno viskoznan kako bi obezbedio stabilnost kapi; (iv) Treba da bude kompatibilan sa raspoloživom analitičkom instrumentacijom.
<i>Uzorak</i>	Jonska jačina	(i) Uobičajeno, dodatak soli smanjuje rastvorljivost analita u uzorku i povećava ekstrakcionu efikasnost; (ii) Ekstrakcija može biti ograničena suviše velikom jonskom jačinom (neželjeno visoki viskozitet uzorka).
	Vrednost pH	(i) Zahteva podešavanje pH-osetljive analize.
<i>Ekstrakcija</i>	Temperatura	(i) Viša temperatura uzrokuje povećanu isparljivost analita i potpomaže ekstrakciju u „headspace“ modu; (ii) Više temperature mogu da uzrokuju isparavanje rastvarača i re-ekstrakcije analita u uzorak; (iii) Podesna je ambijentalna temperatura kako bi se sprečio gubitak rastvarača u otvorenom sistemu.
	Mešanje	(i) Mešanjem se povećava prenos mase analita, a rezultat je povećana efikasnost ekstrakcije; (ii) Velika brzina mešanja može uzrokovati nestabilnost kapi.
	Vreme	(i) Duža vremena ekstrakcije vode povećanju količine ekstrahovanih analita; (ii) Međutim, kap može postati nestabilna tokom dužeg vremena ekstrakcije; (iii) Re-ekstrakcija analita u uzorak je moguća tokom dužeg vremena ekstrakcije.

Za efikasnu ekstrakciju analita je veoma bitno odabrati odgovarajući ekstrakcioni rastvarač. Selekcija rastvarača se bazira na principu „slično rastvara slično“, a krajni izbor će zavisiti od efikasnosti ekstrakcije, stabilnosti mikrokapi, isparljivosti, polarnosti, viskoziteta i kompatibilnosti sa analitičkim sistemom (Sarkhosh i dr., 2011). U DI-SDME se najčešće koristi

toluen. Ovaj rastvarač obezbeđuje stabilnu kap i odsustvo mehurića vazduha tokom ekstrakcije s obzirom da ima niži napon pare od drugih rastvarača (Zichová i dr., 2018). U slučaju primene reverzno-fazne HPLC, uzorcima koji su ekstrahovani rastvaračem nemešljivim sa vodom, kao što je rastvarač toluen, se zamenjuju ili razblažuju rastvaračem koji je kompatibilan sa HPLC, kao što je acetonitril (Jeannot i dr., 2010).

U SDME ekstrakcijama kontrola temperature je od izuzetnog značaja i to naročito za „headspace“ ekstrakcije. Koeficijent raspodele analita između organske i vodene faze je neznatno zavisian od temperature, ali su koeficijenti raspodele analita između vodene i „headspace“ faze kao i između „headspace“ i organske faze jako zavisne od temperature (Jeannot i dr., 2010). Povišenje temperature vodi ka smanjenju koeficijenta raspodele analita između „headspace“ i organske faze, rezultujući smanjenom osetljivošću. Rešenje ovog problema bi bilo hlađenje ekstrakcionog rastvarača uz zagrevanje uzorka. To usložnjava prateću aparaturu, ali je prihvatljivo za analize ultratragova ili za slabo isparljive analite sa malom mogućnošću transfera u „headspace“ fazu na ambijentalnoj temperaturi (Zichová i dr., 2018).

Još jedan faktor koji može da utiče na efikasnost SDME ekstrakcije jeste zapremina kapi. Količina analita ekstrahovanog u organsku kap/fazu je linearno proporcionalna veličini kapi, što je predstavljeno sledećom jednačinom (Sarkhosh i dr., 2011):

$$N = V_{org,r} \cdot K \cdot C_{o,vod}$$

gde je:

$N$  – broj molova ekstrahovanog analita u organsku kap,

$K$  – koeficijent raspodele analita između vodene faze i organske kapi,

$V_{org,r}$  – zapremina organske kapi pri ravnoteži i

$C_{o,vod}$  – početna koncentracija analita u vodenom rastvoru.

Ukoliko se upotrebi standardna igla mikrošprica maksimalna zapremina kapi je uobičajeno 2–3  $\mu\text{l}$ . Kapi sa zapreminama iznad 3  $\mu\text{l}$  su nestabilne i mogu da se odvoje od vrha igle (Jeannot i dr., 2010).

#### 2.5.1.2. Tečno-fazna mikroekstrakcija na šupljem vlaknu

Tečno-fazna mikroekstrakcija na šupljem vlaknu (eng. *Hollow Fiber-Liquid-Phase Microextraction*, HF-LPME) je bazirana na korišćenju šupljeg vlakna kao nosača tečne ekstrakcione faze. Najčešće se koristi šuplje vlakno od polipropilena dužine od 1,5 do 10 cm

(An i dr., 2017). Pre imobilizacije ekstragensa vlakno se očisti rastvaračem (metanol, acetonitril, aceton ili voda) kako bi se uklonile nečistoće. Vlakno se zatim uranja u ekstrakcioni (organski) rastvarač s ciljem imobilizacije rastvarača u pore vlakna. Na ovaj način formira se sloj organskog rastvarača unutar zida šupljeg vlakna. Uobičajena debljina sloja je 200  $\mu\text{m}$ , a ukupna zapremina imobilizovanog organskog rastvarača 15–20  $\mu\text{l}$ .

Zavisno od vrste ekstrakcije (akceptorske) faze tečno-fazna mikroekstrakcija na šupljem vlaknu je klasifikovana u više konfiguracija. Razlikuju se (Sharifi i dr., 2016; Ocaña-González i dr., 2016):

- 1) Dvofazna HF-LPME – u ovoj konfiguraciji se isti rastvarač, obično organski rastvarač nemešljiv sa vodom, koristi za impregniranje zida poroznog šupljeg vlakna i punjenje lumena tog vlakna. Sistem se najčešće upotrebljava u GC određivanjima s obzirom da se akceptorska faza obično odlikuje niskom isparljivošću.
- 2) Trofazna HF-LPME – u ovoj konfiguraciji akceptorska faza je vodeni rastvor. Analiti bivaju ekstrahovani iz vodenog rastvora uzorka u tanak sloj/film organskog rastvarača nakon čega se re-ekstrahuju i koncentruju u vodenom (akceptorskom) rastvoru. Sistem se najčešće koristi u HPLC ili CE određivanjima s obzirom da je akceptorska faza obično kompatibilna sa mobilnim fazama ili nosačima pufera ovih analitičkih tehnika.

Na osnovu mehanizma prenosa mase tokom ekstrakcije razlikujemo:

- 1) Statički mod HF-LPME – u ovom modu se rastvor obično meša magnetnim mešačem kako bi se debljina difuzionog sloja smanjila.
- 2) Dinamički mod HF-LPME - u ovom modu se male zapremine vodenog rastvora uzorka naizmenično propuštaju kroz kanal/lumen šupljeg vlakna. Rad u dinamičkom modu zahteva složeniju instrumentaciju kao i optimizaciju i kontrolisanje većeg broja eksperimentalnih parametara u odnosu na statičke sisteme HF-LPME.

Različiti faktori mogu da utiču na efikasnost HF-LPME uključujući vrstu materijala šupljeg vlakna, vrstu ekstrakcionog rastvarača, temperaturu, vreme ekstrakcije, brzinu mešanja, vrednost pH donorske i akceptorske faze, zapreminu uzorka i organskog rastvarača. Za imobilizaciju organskog rastvarača najčešće se koristi vlakno od polipropilena (Tabela 21).

Pored vlakna od pomenutog materijala mogu se koristiti i vlakna od polietarsulfona ili poliviniliden fluorida.

Tabela 21. Karakteristike nosača od polipropilena (Zakić, 2001).

<i>Karakteristika</i>	<i>Vrednost</i>
Specifična masa [kg/m <sup>3</sup> ]	900–910
Čvrstoća pri zatezanju [MPa]	300–750
Modul elastičnosti [GPa]	3,5–12,0
Izduženje pri kidanju [%]	6,0–25,0
Tačka razmekšavanja [°C]	~160
Tačka paljenja [°C]	~590
Udarne žilavost (pri $t = 20$ °C) [J/cm <sup>2</sup> ]	~0,30
Upijanje vode [%]	0
Koeficijent toplotne provodljivosti [W/m°C]	0,088
Termički koeficijent linearnog širenja [1/°C]	$120 \cdot 10^{-6}$
Toplotna provodljivost i električna provodljivost	niska
Korozivna otpornost (na kiseline, baze i soli)	visoka

Vrsta ekstrakcionog rastvarača je značajan faktor koji ima veliki uticaj na efikasnost ekstrakcije. U tečno-faznoj mikroekstrakciji na šupljem vlaknu organski rastvarač treba da ispuni uslove niske isparljivosti, nemešljivošću sa vodom i sposobnošću dobre adhezivnosti u porama šupljeg vlakna. Rastvorljivost analita u organskom rastvaraču treba da bude veća od rastvorljivosti u donorskoj fazi kako bi se favorizovao transfer iz donorske u akceptorsku fazu. Najčešće korišćeni organski rastvarači su toluen, hloroform, 1-oktanol i *n*-heksil etar. Poslednjih godina se povećava upotreba jonskih tečnosti i supramolekularnih rastvarača u HF-LPME (Sharifi i dr., 2016).

Kao i kod drugih ekstrakcionih tehnika i ovde je vreme ekstrakcije veoma značajno, i poželjno je da bude što kraće. Uobičajeno primenjena vremena ekstrakcije su u opsegu od 30 do 60 min.

Temperatura na efikasnost ekstrakcije utiče na dva načina. Temperatura utiče na brzinu prenosa mase analita i na koeficijent raspodele između organske i vodene faze (Xiong i Hu, 2008). Sa povišenjem temperature povećava se brzina prenosa mase analita, ali se koeficijent raspodele smanjuje. Suviše visoke temperature mogu imati nepovoljan efekat na efikasnost ekstrakcije usled isparavanja organskog rastvarača, povećanja rastvorljivosti organskog

rastvarača u vodenoj fazi i formiranja mehurića vazduha na površini šupljeg vlakna (Xiong i Hu, 2008; Yang i dr., 2010).

Zapremina uzorka i zapremina rastvarača su dva bitna faktora koja utiču na efikasnost ekstrakcije analita u tečno-faznoj mikroekstrakciji na šupljem vlaknu. Naime, povećanjem faznog odnosa uzorka i organskog rastvarača faktor koncentrovanja raste do određenog stepena (Xiong i Hu, 2008).

Vrednost pH donorske i akceptorske faze može da ima značajan uticaj na efikasnost ekstrakcije, posebno kada ciljni analiti imaju jonizabilne funkcionalne grupe. Vrednost pH donorske faze treba da bude podešena tako da analiti budu u njihovoj neutralnoj formi, i samim tim se favorizuje raspodela u organski rastvarač. U trofaznim sistemima vrednost pH akceptorske faze treba da bude podešena tako da se ekstrahovani analiti zadrže u ekstrakcionoj fazi. Za kisele analite donorska i akceptorska faze treba da budu kiseli i bazni rastvori, redom. Za bazne analite donorska faza je bazni, a akceptorska faza kiseli rastvor.

Brzina mešanja je parametar koji ima veliki uticaj u HF-LPME. U statičkom modu tečno-fazne mikroekstrakcije na šupljem vlaknu mešanje se izvodi magnetnim mešačem. Mešanje rastvora uzorka skraćuje vreme dostizanja termodinamičke ravnoteže, posebno za analite sa većim molekulskim masama (Sibiya i dr., 2013). Suviše velike brzine mešanja mogu negativno uticati na ekstrakciju s obzirom da se u tom slučaju analiti ne zadržavaju dovoljno dugo na površini vlakna da bi difuzijom penetrirali u ekstrakcionu fazu (González-Sálama i dr., 2018). Pored toga, za brzine mešanja jednake ili veće od 1400 o/min magnetni mešač naginje ka nasumičnom rotiranju što vodi ka slaboj reproduktivnosti (Xiong i Hu, 2008).

HF-LPME je veoma podesna mikroekstrakciona tehnika kada se analiziraju kompleksni matriksi ili u slučajevima kada je dostupna samo ograničena zapremina uzorka. Glavni nedostatak HF-LPME jeste adsorpcija hidrofobnih interferirajućih supstanci ili mehurića vazduha na površini vlakna, što se odražava na reproduktivnost rezultata (Ocaña-González i dr., 2016).

U poređenju sa mikroekstrakcijom na kapi tečno-fazna mikroekstrakcija na šupljem vlaknu ima nekoliko prednosti (Fernández i Vidal, 2014):

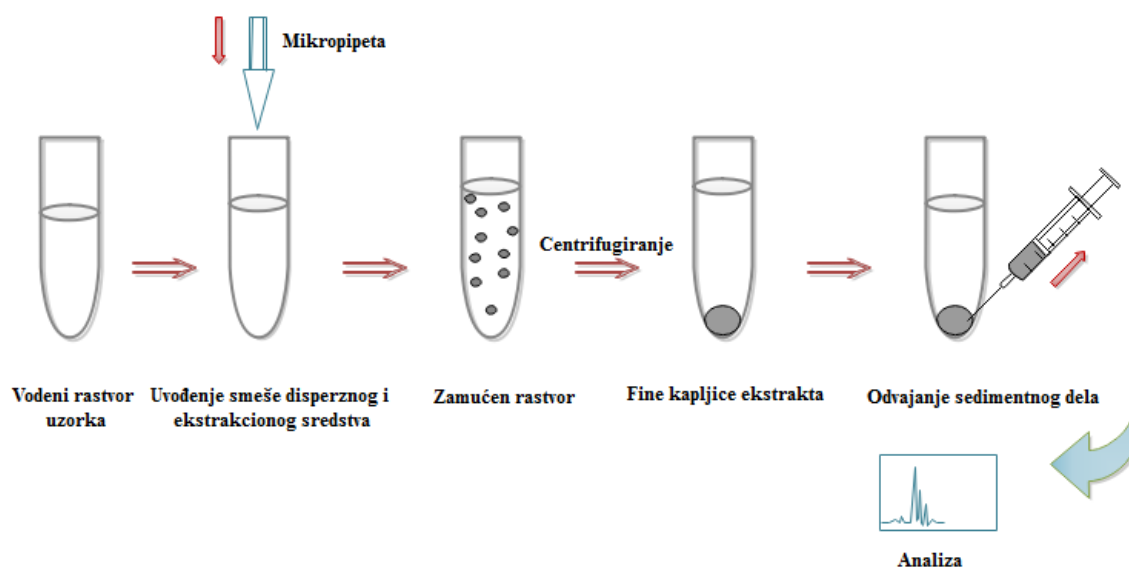
- 1) Mogu da se koriste veće brzine mešanja jer je izbegnut problem nestabilnosti kapi. Iako pri velikim brzinama mešanja može doći do pojave neželjenih mehurića vazduha na površini vlakna.
- 2) Veća je površina dodira između ekstrakcione faze i rastvora uzorka što favorizuje prenos mase.

- 3) Šuplje vlakno deluje kao svojevrsna membrana zbog čega mogu da se analiziraju i uzorci kompleksnog matriksa.
- 4) Vlakno može da se baci nakon jedne upotrebe zbog njegove niske cene.

Od svog nastanka HF-LPME je pokazala potencijal za ekstrakciju analita iz različitih matriksa poput fluorohinolona iz bioloških uzoraka (urin goveda) i uzoraka životne sredine (površinska, česmenska i otpadna voda) (Payán i dr., 2011), policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz uzoraka rečne vode (Sibiya i dr., 2013), naloksona, buprenorfina i njegovog metabolita norbuprenorfina iz uzoraka ljudske plazme (Sun i dr., 2014).

### 2.5.1.3. Disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija

Sredinom prve decenije 21. veka razvijena je disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija (eng. *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) (Rezaee i dr., 2006). DLLME se zasniva na trokomponentnoj smeši rastvarača, a postupak podrazumeva brzo ubrizgavanje mešavine ekstrakcionog i disperznog sredstva u vodeni rastvor ispitivanog uzorka, nakon čega se stvara zamućen rastvor (Slika 38). Usled velike dodirne površine između ekstrakcionog rastvarača i vodene faze, stanje ravnoteže se postiže veoma brzo vodeći ka veoma brznoj ekstrakciji. Ovo je ujedno i najvažnija prednost disperzivne tečno-tečne mikroekstrakcije. Nakon ekstrakcije i razdvajanja faza centrifugiranjem, organski sloj se odvaja i analizira.



Slika 38. Šematski prikaz disperzivne tečno-tečne mikroekstrakcije.



Disperzivna tečno–tečna mikroekstrakcija je atraktivna tehnika zbog lakog rukovanja, niske cene, brze ekstrakcije, upotrebe malih zapremina organskih rastvarača, visokih faktora koncentrovanja i lakog povezivanja sa separacionim tehnikama kao što su GC i HPLC (Botrel i dr., 2017; Bravo i dr., 2017a). U konvencionalnoj DLLME tehnici najčešće se koristi 20–100  $\mu$ l ekstrakcionog sredstva, 0,5–2 ml disperznog sredstva i od 5 do 10 ml vodenog rastvora uzorka, a ukupno trajanje ekstrakcije, uključujući i centrifugiranje, iznosi od 2 do 10 min (Leong i dr., 2014). Faktori koji utiču na efikasnost procesa DLLME su (Rezaee i dr., 2010; Kocúrová i dr., 2012):

- Ekstrakciono sredstvo – organski rastvarači koji se primenjuju kao ekstrakciona sredstva moraju imati veću gustinu od vode i nisku rastvorljivost u vodi. Halogenovani ugljovodonici kao što su hlorobenzen, hloroform, ugljen-tetrahlorid i tetrahloroetilen, iako veoma toksični, obično se koriste kao ekstrakciona sredstva zbog njihove velike gustine.
- Disperzno sredstvo – rastvorljivost disperznog sredstva u ekstrakcionom rastvaraču i vodenom rastvoru uzorka je bitan uslov pri njegovom izboru. Aceton, metanol, etanol i acetonitril najčešće se koriste kao disperzna sredstva.
- Zapremina ekstrakcionog sredstva – povećanjem zapremine ekstrakcionog sredstva povećava se i zapremina sedimentnog ostatka koji nastaje nakon centrifugiranja. Sa porastom sedimentacione zapremine smanjuje se faktor koncentrovanja (F). Optimalna zapremina ekstrakcionog sredstva treba da obezbedi visok F i dovoljnu zapreminu sedimentnog ostatka za njegovo lako odvajanje.
- Zapremina disperznog sredstva – direktno utiče na disperziju ekstrakcionog sredstva u vodenoj fazi i na efikasnost same ekstrakcije. Variranjem zapremine disperznog sredstva menja se i zapremina sedimentnog ostatka.

U disperzivnoj tečno–tečnoj mikroekstrakciji faktor koncentrovanja se definiše kao odnos koncentracije analita u sedimentnom ostatku ( $C_{sed}$ ) i početne koncentracije analita u uzorku ( $C_0$ ):

$$F = \frac{C_{sed}}{C_0}$$

Dok se efikasnost ekstrakcije (E) izračunava na osnovu sledeće jednačine (Rezaee i dr., 2010):

$$E = \frac{n_{sed}}{n_0} \cdot 100 = \frac{C_{sed} \cdot V_{sed}}{C_0 \cdot V_{aq}} \cdot 100 [\%]$$

gde je:

$n_0$  – ukupna količina analita,

$n_{sed}$  - količina analita u sedimentnom ostatku,

$V_{sed}$  – zapremina sedimentnog ostatka i

$V_{aq}$  – zapremina vodenog rastvora uzorka.

Nedostaci DLLME se ogledaju u malom broju ekstrakcionih sredstava koja zadovoljavaju gore navedene uslove. Osim toga, upotreba disperznog sredstva može da komplikuje proces razdvajanja faza. Iz tog razloga se centrifugiranje smatra neophodnim korakom ove mikroekstrakcione tehnike. Da bi se prevazišli nedostaci DLLME, prvobitni princip tehnike se može modifikovati uvođenjem ekstrakcionih sredstava koja su lakša od vode, kao i izostavljanjem disperznog sredstva, a time i potrebe za centrifugiranjem (Kocúrová i dr., 2012). DLLME se može klasifikovati prema disperzionoj tehnici na (Mansour i Khairy, 2017):

- 1) Normalnu DLLME (eng. *normal DLLME*, n-DLLME),
- 2) DLLME potpomognutu ultrazvukom (eng. *Ultrasound-assisted DLLME*, USA-DLLME),
- 3) DLLME potpomognutu vorteksovanjem (eng. *Vortex-assisted DLLME*, VA-DLLME),
- 4) DLLME potpomognutu vazduhom (eng. *AIR-assisted DLLME*, AA-DLLME).

Prema gustini primenjenog ekstrakcionog sredstva disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija se deli na:

- a) DLME sa ekstrakcionim sredstvom čija je gustina veća od vode (n-DLLME i DLLME zasnovana na jonskim tečnostima (IL-DLLME)),
- b) DLLME sa ekstrakcionim sredstvom čija je gustina manja od vode (DLLME sa rastvaračem male gustine (LDS-DLLME) i DLLME sa solidifikacijom organske kapljice (DLLME-SFOD)).

U tehnici disperzivno tečno–tečne mikroekstrakcije potpomognute ultrazvukom disperzija ekstrakcionog sredstva u vodenom rastvoru uzorka se izaziva ultrazvukom.

U disperzivnoj tečno–tečnoj mikroekstrakciji potpomognutoj vorteksovanjem vodeni rastvor uzorka i ekstrakciono sredstvo vorteksuju se sa ili bez disperznog sredstva radi formiranja emulzije.

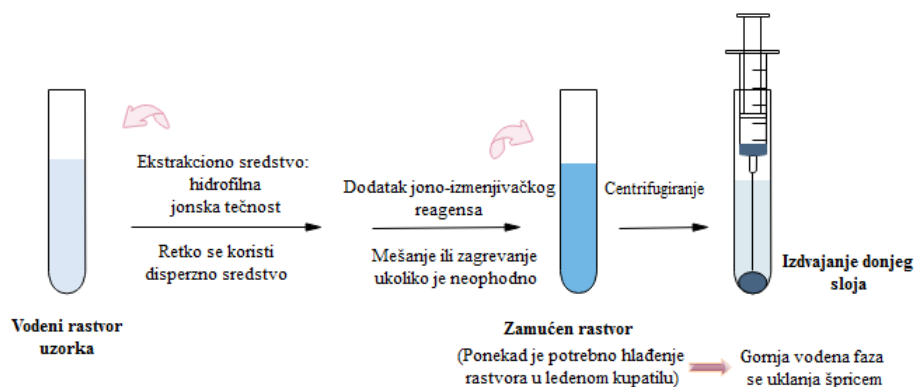
U disperzivnoj tečno–tečnoj mikroekstrakciji potpomognutoj vazduhom pomoću šprica se uvlači i ubrizgava ekstrakciono sredstvo u rastvor uzorka s ciljem formiranja zamućenog rastvora. Postupak se ponavlja više puta.

U disperzivnoj tečno–tečnoj mikroekstrakciji sa solidifikacijom organske kapljice kao ekstrakciono sredstva koriste se organski rastvarači koji imaju malu gustinu i tačku topljenja (10–25 °C), kao što su 1-dodekanol i 1-undekanol (Mansour i Khairy, 2017; Sena i dr., 2017). Nakon razdvajanja faza centrifugiranjem i solidifikacije ekstrakcionog agensa u ledenom kupatilu, ekstrakt sa površine (organska kapljica) se zahvata špatulom ili forcepsom i prenosi u vijalu, gde se otapa na ambijentalnoj temperaturi. Tako dobijeni ekstrakt se potom razblažuje odgovarajućim rastvaračem i analizira (Guiñez i dr., 2017).

U disperzivnoj tečno–tečnoj mikroekstrakciji sa rastvaračem male gustine (eng. *Low Density Solvent-DLLME*, LDS-DLLME) koriste se manje toksični organski rastvarači u odnosu na rastvarače u konvencionalnoj DLLME, kao što su oktanol, heksan, toluen, cikloheksan, *orto*-ksilen. S obzirom da se u ovom postupku DLLME upotrebljavaju rastvarači koji imaju manju gustinu od vode, organska faza se izdvaja na površini vodenog rastvora uzorka (Botrel i dr., 2017).

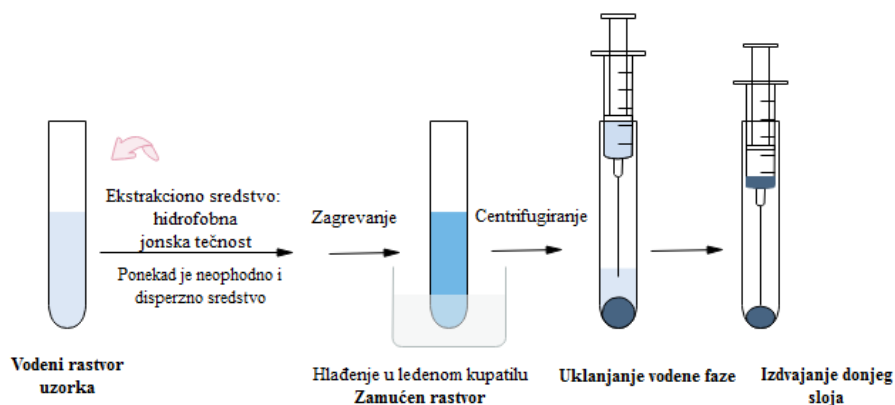
Prednost disperzivne tečno–tečne mikroekstrakcije zasnovane na jonskim tečnostima (eng. *Ionic Liquid-DLLME*, IL-DLLME) u odnosu na konvencionalne ekstrakcione tehnike se ogleda u brzini ekstrakcije, lakom rukovanju i izbegavanju korišćenja veoma toksičnih hlorovanih rastvarača. Jonske tečnosti, koje se koriste u ovoj tehnici DLLME, su organske soli koje su tečne na niskim temperaturama (ispod ili oko 100 °C). U konvencionalnoj IL-DLLME kao ekstrakciono sredstvo upotrebljava se hidrofobna jonska tečnost. Hidrofobna jonska tečnost se rastvori u odabranom disperznom sredstvu, a potom se ova smeša dodaje vodenom rastvoru uzorka. Nakon razdvajanja faza centrifugiranjem, sedimentni deo se odvaja i injektuje u analitički instrument. Imidazolijum jonske tečnosti koje sadrže heksafluorofosfat najčešće se koriste kao ekstrakciono, a metanol kao disperzno sredstvo u IL-DLLME. Ova DLLME tehnika korišćena je za određivanje organskih jedinjenja i metala u različitim uzorcima (Saraji i Boroujeni, 2014).

Ukoliko se koristi *in situ* IL-DLLME tehnika (Slika 39) tada se prvo hidrofilna jonska tečnost rastvori u vodenom rastvoru uzorka, a potom se ovom rastvoru dodaje jono-izmenjivački agens kako bi došlo do prelaska hidrofilne u hidrofobnu jonsku tečnost (Ojeda i Rojas, 2011).



Slika 39. *In situ* IL-DLLME.

Ukoliko se primeni temperaturno-potpomognuta IL-DLLME tehnika tada se vodeni rastvor uzorka i hidrofobna jonska tečnost (ekstrakciono sredstvo) zagrevaju (50–90 °C) kako bi se formirale mikrokapi. Nakon hlađenja zamućenog rastvora u ledenom kupatilu sledi centrifugiranje radi razdvajanja faza (Slika 40).



Slika 40. Temperaturno-potpomognuta IL-DLLME.

Primena IL-DLLME potpomognute mikrotalasima, ultrazvukom ili vorteksovanjem podrazumeva korišćenje mikrotalasa, ultrazvuka ili vorteksa radi disperzije hidrofobne jonske

tečnosti u vodeni rastvor uzorka, kako bi se formirale mikrokapi. Ukoliko je neophodno i disperzno sredstvo, tada se koristi odgovarajući organski rastvarač, surfaktant ili hidrofilna jonska tečnost. U velikom broju slučajeva ekstrakcija traje do sedam minuta, ili malo duže ukoliko je potrebno hlađenje rastvora (Trujillo-Rodríguez i dr., 2013).

### 2.5.2. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid-Phase Microextraction*, SPME) je po svom dizajnu i principima veoma slična tečno-faznoj mikroekstrakciji na šupljem vlaknu i zasniva se na raspodeli analita između tečnog uzorka i filma ekstrakcione faze imobilisanog na inertnom nosaču. Kod ove tehnike ekstrakciona faza i nije zapravo čvrsta, iako sam naziv tehnike to implicira.

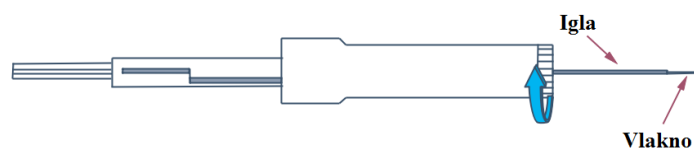
Neke od prednosti pripreme uzoraka primenom SPME su (Płotka-Wasyłka i dr., 2015):

- 1) Visoka osetljivost (mogućnost određivanja supstanci na ppt nivou).
- 2) Mala zapremina uzoraka.
- 3) Jednostavnost i brzina: ne zahteva se upotreba složene opreme, alata ili uređaja.
- 4) Izbegava se upotreba toksičnih rastvarača.
- 5) Mogućnost višestruke upotrebe SPME vlakna.
- 6) Mogućnost *in situ* uzorkovanja.
- 7) Mogućnost automatizacije.
- 8) Kompatibilnost sa instrumentalnim tehnikama – gasnom hromatografijom, tečnom hromatografijom, visokoperformansnom tečnom hromatografijom ili kapilarnom elektroforezom u „off-line“ ili „on-line“ modovima.

SPME omogućava analizu brojnih uzoraka u tečnom, gasovitom ili čvrstom agregatnom stanju, često vrlo složenog matriksa, uz određivanje tragova ili ultratragova analita (Płotka-Wasyłka i dr., 2015).

SPME prenosni sistem se sastoji od držača i vlakna (Slika 41). SPME držač je robustan metalni mehanizam koji izgleda kao modifikovani špric sa iglom za probijanje septuma. Igla sadrži uvlačivo 1–2 cm dugo SPME vlakno. Tokom uzorkovanja vlakno se izvlači iz zaštitne igle i izlaže se direktno uzorku. Nakon određenog vremena kontakta vlakno se ponovo uvlači u zaštitnu iglu. Pored uloge da mehanički štiti analite ekstrahovane vlaknom, zaštitna igla ima i ulogu da probije septum hromatografskog injekcionog bloka u kome se prikupljeni analiti

kvantitativno desorbuju. Ekstrakciona vlakna su dizajnirana da u potpunosti budu kompatibilna po svojoj geometriji i veličini sa injekcionim blokovima (Švarc-Gajić, 2012).



Slika 41. SPME uređaj.

Komercijalno SPME vlakno je vlakno od stopljenog silicijum-dioksida obloženo sa tankim filmom poli(dimetilsiloksana) (PDMS), poli(etilen glikola) (PEG; Carbowax™, CW), divinilbenzena (DVB) ili poliakrilata (PA) (Grafit i dr., 2018). Vlakna sa ekstrakcionim slojem kao što je poliakrilat se koriste za uzorkovanje polarnih analita poput fenola i nekih pesticida i insekticida, dok se višeslojna vlakna sa polarnim ekstrakcionim slojevima poput PDMS/DVB, PDMS/CAR (Carboxen®) ili CW/DVB koriste za ekstrakciju jako polarnih jedinjenja kao što su alkoholi, amini i etri (Spietelun i dr., 2013). Napolarni PDMS se uglavnom koristi za ekstrakciju nepolarnih jedinjenja kao što su benzen, toluen, etilbenzen i ksilen (BTEX) ili policiklični aromatični ugljovodonici (PAH-ovi) (Spietelun i dr., 2013).

SPME ekstrakcioni slojevi/faze vlakana mogu biti klasifikovani prema vrsti, debljini, polarnosti i prema tome da li ekstrakciona faza koristi mehanizme adsorpcije (čvrsta ekstrakciona faza) ili apsorpcije (tečna ekstrakciona faza) za ekstrakciju analita iz uzorka. U Tabeli 22 su predstavljena komercijalno dostupna vlakna, a na Slici 42 hemijske strukture polimera koji se uobičajeno koriste kao SPME ekstrakcione faze vlakana. Neke smernice prilikom izbora podesnog SPME vlakna su (Shirey, 2012):

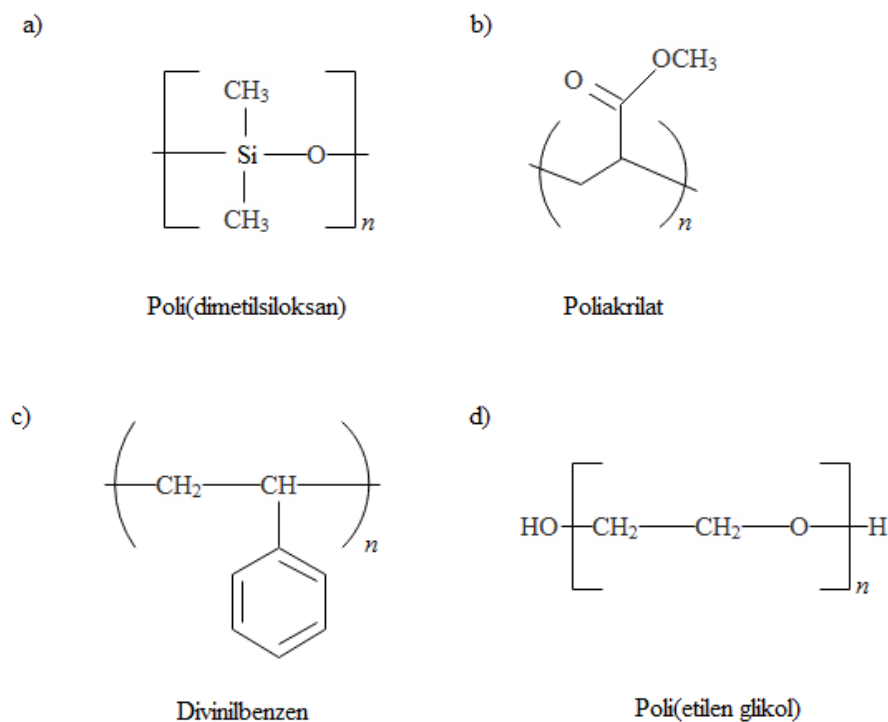
- Vlakna sa čvrstom ekstrakcionom fazom su podesnija za analite sa niskim koncentracijama;
- Vlakna sa čvrstom ekstrakcionom fazom imaju niži kapacitet usled čega je potrebno definisati linearni opseg za svaki analit;
- Vlakna sa čvrstom ekstrakcionom fazom su pogodna za kompleksne uzorke sa raznolikim koncentracionim opsezima;
- DVB/Carboxen®/PDMS vlakna su pogodna za kompleksne uzorke sa nižim koncentracijama analita;

- Vlakno sa PDMS (30  $\mu\text{m}$ ) kao ekstrakcionom fazom je podesno za skrining uzoraka i različite analite duž širokog opsega molekularnih masa;
- Vlakna sa tečnom ekstrakcionom fazom su pogodnija za „nečiste“ uzorke;
- Vlakna sa PEG kao ekstrakcionom fazom su podesna za širok opseg analita;
- Vlakna sa PA kao ekstrakcionom fazom su podesna za ekstrakciju supstituisanih aromatičnih amina.

Tabela 22. Vrste komercijalno dostupnih SPME ekstrakcionih faza vlakana (Shirey, 2012).

<i>Vrsta ekstrakcione faze</i>	<i>Mehanizam ekstrakcije</i>	<i>Polarnost</i>
7 $\mu\text{m}$ PDMS	Apsorpcija	Nepolaran
30 $\mu\text{m}$ PDMS	Apsorpcija	Nepolaran
100 $\mu\text{m}$ PDMS	Apsorpcija	Nepolaran
85 $\mu\text{m}$ PA	Apsorpcija	Polaran
60 $\mu\text{m}$ PEG (Carbowax™)	Apsorpcija	Polaran
15 $\mu\text{m}$ Carbo-pack Z/PDMS	Sorpcija (Ap/Ad)*	Bipolaran
65 $\mu\text{m}$ PDMS/DVB	Sorpcija	Bipolaran
55 $\mu\text{m}$ /30 $\mu\text{m}$ DVB/Carboxen®/PDMS	Sorpcija	Bipolaran
85 $\mu\text{m}$ Carboxen®/PDMS	Sorpcija	Bipolaran

\*Ap/Ad – Apsorpcija/Adsorpcija



Slika 42. Hemijska struktura polimera koji se najčešće koriste kao SPME tečne ekstrakcione faze.

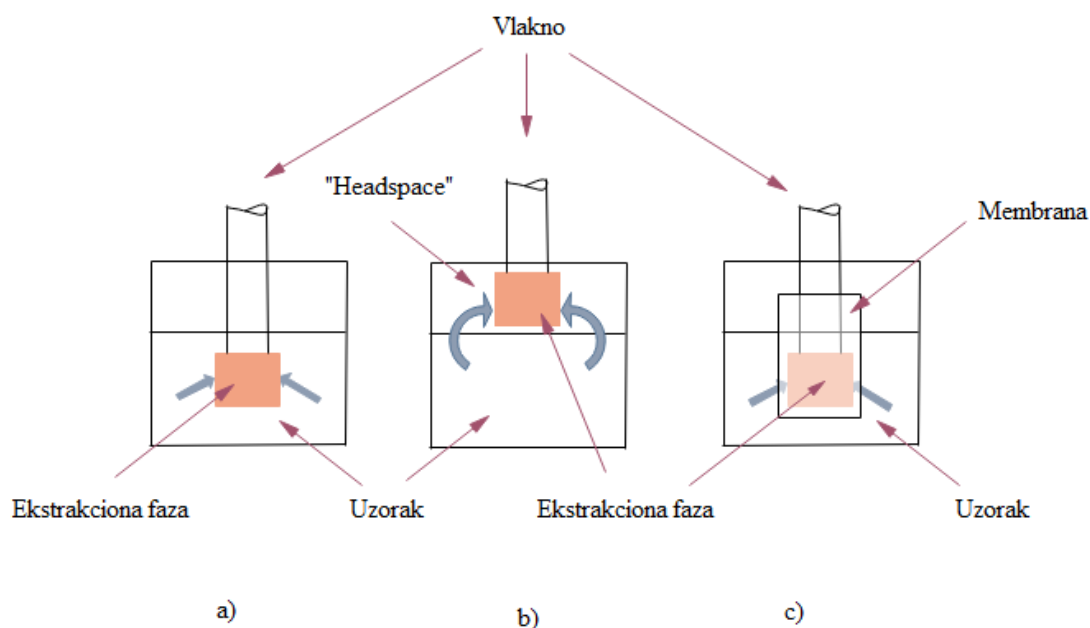
U zavisnosti od kontakta vlakna i uzorka, mikroekstrakciju je moguće izvesti (Płotka-Wasyłka i dr., 2015):

- 1) Direktno (direktno potapanje, DI),
- 2) „Headspace“ kontaktom (HS),
- 3) Preko zaštitne membrane.

U čvrsto-faznoj mikroekstrakciji sa direktnim potapanjem (eng. *Direct Immersion-Solid-Phase Microextraction*, DI-SPME) vlakno se izlaže uzorku analita (Slika 43a). Preko „headspace“ ekstrakcije (eng. *Headspace-Solid-Phase Microextraction*, HS-SPME) analiti se prevode iz uzorka u gasnu fazu nakon čega dospevaju do ekstrakcione faze vlakna (Slika 44b). S obzirom da je vlakno smešteno u „headspace“ prostor vlakno je zaštićeno od velikih molekulske masa i drugih interferirajućih jedinjenja prisutnih u matriksu, kao što su huminske materije ili proteini. Osim toga, „headspace“ mod dopušta modifikaciju matriksa, kao što je promena vrednosti pH, bez oštećivanja vlakna.



DI-SPME je podesnija za gasovite ili manje kompleksne tečne matrikse, a HS-SPME za ekstrakciju kompleksnijih tečnih i čvrstih uzoraka. Za veoma „nečiste“ uzorke podesna je upotreba „headspace“ moda ili SPME sa zaštitnom membranom u zavisnosti od isparljivosti analita (Slika 43c). Osnovna svrha membranske barijere jeste zaštita vlakna. Osim toga, upotrebom membrane od odgovarajućeg materijala moguće je postići određeni stepen selektivnosti u ekstrakcionom procesu. Međutim, kinetika membranske ekstrakcije je sporija u odnosu na direktnu ekstrakciju s obzirom da analiti moraju da difunduju kroz membranu pre raspodele ili adsorpcije u ekstrakcionu fazu (Pawliszyn, 2012).



Slika 43. Modovi izvođenja SPME: čvrsto-fazna mikroekstrakcija sa direktnim potapanjem (a), „headspace“ čvrsto-fazna mikroekstrakcija (b), čvrsto-fazna mikroekstrakcija sa zaštitnom membranom (c).

### **3. Eksperimentalni deo**

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije realizovan je u laboratoriji za instrumentalne metode analize Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Deo istraživanja izveden je u laboratoriji za prehrambene tehnologije Agronomskog fakulteta u Čačku, laboratoriji Prirodno-matematičkog fakulteta u Seldžuku (Turska), laboratoriji na Instituto Superior de Engenharia, Politehnički institut u Portu (Portugalija), i u laboratoriji za analitičku hemiju i životnu sredinu na Univerzitetu Balearskih ostrva u Palma de Majorci (Španija).

### 3.1. Hemikalije i reagensi

Galna kiselina i rutin trihidrat su proizvodi kompanije Dr Ehrenstarfor GmbH (Augsburg, Nemačka). Aluminiјum-hlorid heksahidrat, 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina i natriјum-karbonat proizvedeni su od strane AlfaAesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Nemačka). Folin-Ciocalteu reagens i kalijum-peroksodisulfat su proizvodi kompanije Lach:ner (Neratovice, Republika Češka). Linolna kiselina, trihlorsirćetna kiselina, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-hidrat (DPPH), tiobarbiturna kiselina (TBA), 2-deoksiriboza, rastvor vodonik peroksida, askorbinska kiselina, fosfatni pufer, derivatizacioni agens N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamid (BSTFA), amonijum-sulfat i organski rastvarači su proizvodi kompanije Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD). Akarboza, kojična kiselina, L-3,4-dihidroksifenilalanin, 3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT),  $\alpha$ -amilaza (EC 3.2.1.1),  $\alpha$ -glukozidaza (EC 3.2.1.20), tirozinaza, L-glutation, acetilholinesteraza (EC 3.1.1.7), butirilholinesteraza (EC 3.1.1.8), lipaza (EC 3.1.1.3), galantamin, 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoeva kiselina (DTNB), acetiltioholin-jodid, butiriltioholin-hlorid, 4-N-trofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid (PNPG), ferozin, deoksiadenilična kiselina i parafinsko ulje su proizvodi kompanije Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Nemačka). Nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid je proizvod Merck-a (Darmstadt, Nemačka). Resazurin, amracin, nistatin, Sabouraud dekstrozni agar, Tween-80, Tween-20, *cis*-diamindihloroplatina (*cis*-DDP) su proizvodi Tedia Company (SAD). Etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), natriјum-nitrit i natriјum-hidroksid su proizvodi Centrohema (Stara Pazova, Srbija). Trihlorsirćetna kiselina, gvožđe(III)-hlorid, rastvor vodonik peroksida i kalijum-fericijanid su proizvedeni u kompaniji Zorka (Šabac, Srbija), a kalijum-dihidrogenfosfat u kompaniji Kemika (Zagreb, Hrvatska). Mueller-Hinton agar (MHA) i Sabouraud dekstrozni agar nabavljeni su na Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ (Beograd, Srbija). Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičkog stepena čistoće.

### 3.2. Biljni materijal

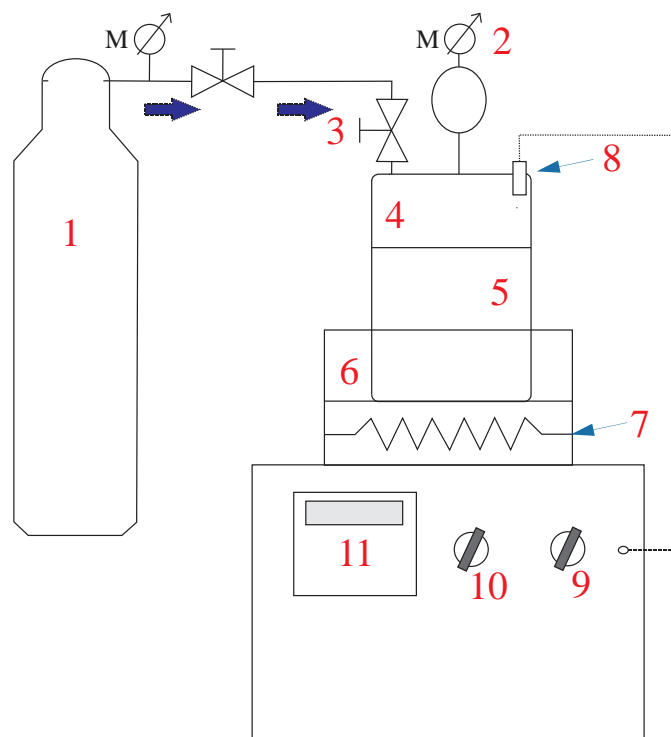
Biljni materijal koji je korišćen u eksperimentalnom radu je sakupljen na teritoriji Bečeja tokom juna meseca 2015. godine. Peteljke višnje i trešnje su manuelno odvojene od plodova i potom ostavljene da se suše na ambijentalnoj temperaturi bez direktnog dejstva svetlosti i uz prirodnu ventilaciju. Reprezentativni uzorak, dobijen postupkom „čtvrtnja“ kombinovanog uzorka, upakovan je u platnenu vreću i skladišten zaštićen od uticaja vlage na suvom i tamnom mestu. Neposredno pre upotrebe peteljke su samlevene u električnom mlinu za kafu (Clatronic<sup>®</sup>, Nemačka).

### 3.3. Ekstrakcija

#### 3.3.1. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju

Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju izvođena je u ekstrakcionom sistemu prikazanom na Slici 44. Peteljke višnje/trešnje su zajedno sa rastvaračem unete u ekstrakcionu posudu (5) ukupne zapremine 1,7 l. Kompresija je izvođena azotom čistoće 99,99% (Messer, Nemačka) preko ventila (3). Azot je korišćen i kako bi se sprečila eventualna oksidacija na visokim temperaturama. Pomoću manometra (2) (Inol, Slovenija, model IM 811A12) kontrolisana je vrednost pritiska u ekstrakcionoj posudi. Temperatura je merena pomoću termopara Pt 100 (8) i regulisana regulatorom temperature (11) (Nigos, Srbija, model 1011P). Zagrevanje je izvedeno primenom grejne podloge (7). Vibraciona platforma (6) (1-5 Hz) u ekstrakcionom sistemu korišćena je kako bi se intenzivirao prenos mase i sprečilo lokalno pregrevanje.

Nakon ekstrakcije dobijeni ekstrakti su filtrirani kroz kvalitativni filter papir Whatman broj 1. Filtrati su čuvani u frižideru do analize.



Slika 44. Šematski prikaz ekstraktora/reaktora subkritičnom vodom: (1) boca sa gasom; (2) manometar; (3) ventil; (4) poklopac ekstrakcione/reakcione posude; (5) ekstrakciona/reakciona posuda; (6) mehanička obloga sa vibracionom platformom; (7) grejna podloga; (8) termoelement za merenje temperature; (9) prekidač za uključivanje vibracione platforme; (10) glavni prekidač; (11) termoregulator.

### 3.3.1.1. Određivanje optimalnih procesnih parametara

Ispitana su četiri različita odnosa droga:rastvarač i to: 1:30; 1:50; 1:70; 1:90, pri čemu su ostali parametri ekstrakcije održavani konstantnim: frekvencija vibracije 1 Hz, temperatura 100 °C, pritisak 30 bar, vreme ekstrakcije 30 min. U ekstraktima dobijenim pod ovim uslovima određen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida. Odabir odnosa izvršen je na osnovu sadržaja pomenutih komponenata, i on je dalje održavan konstantnim u svim narednim ekstrakcijama.

Nakon odabranog optimalnog odnosa droga:rastvarač, praćen je uticaj temperature, najvažnijeg parametra ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju, na sadržaj pomenutih komponenata. Uslovi ekstrakcije su bili isti kao i u prethodnom ispitivanju (frekvencija vibracije 1 Hz, pritisak 30 bar, vreme ekstrakcije 30 min) uz usvojeni odnos droga:rastvarač (1:90). Ispitano je šest različitih vrednosti temperature (100; 120; 140; 150; 185 i 210 °C).

Pritisak je praćen u opsegu vrednosti od 20 do 74 bar, koristeći prethodno usvojene vrednosti temperature i odnosa droga:rastvarač.

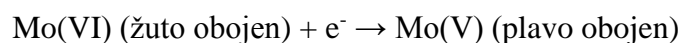
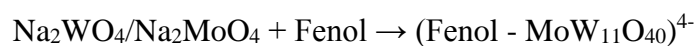
Uticao vremena ekstrakcije definisan je na osnovu sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, kao i u prethodnim fazama optimizacije. Ekstrakcije su izvođene u trajanju od 20 do 90 min.

Uticao brzine mešanja, odnosno frekvencije vibracije, na sadržaj pomenutih komponenata ispitan je u opsegu vrednosti od 1 do 5 Hz.

Tečni ekstrakti, dobijeni ekstrakcijom peteljki višnje i trešnje subkritičnom vodom pri optimalnim uslovima (odnos droga:rastvarač 1:90, temperatura 150 °C, pritisak 20 bar, vreme ekstrakcije 30 min, brzina mešanja 3 Hz), korišćeni su u testovima ispitivanja njihove biološke aktivnosti, kao i u definisanju hemijskog profila primenom HPLC i GC tehnika.

### 3.3.1.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

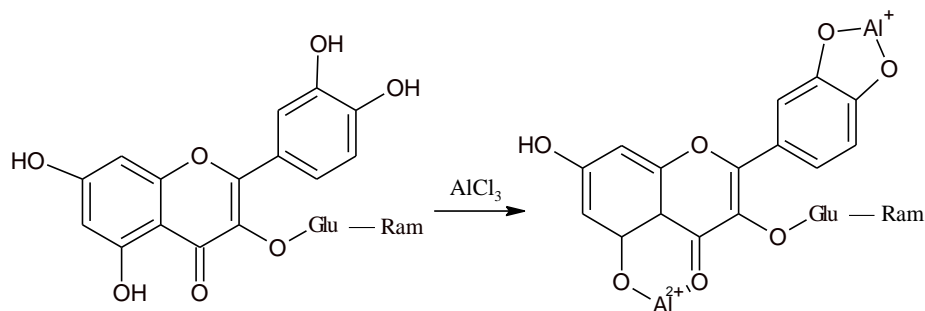
Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima peteljki višnje i trešnje određen je metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965; Kähkönen i dr., 1999). Metoda se zasniva na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon. Nastali fenoksidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens (smeša  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  i  $\text{LiSO}_4$ ) do plavo obojenog jona (Fenol -  $\text{MoW}_{11}\text{O}_{40}$ )<sup>4-</sup>:



Reakciona smeša pripremljena je mešanjem ekstrakta (0,1 ml), 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20%). Kao slepa proba korišćena je smeša u koju je umesto ekstrakta dodata destilovana voda (0,1 ml). Nakon inkubacije od 60 min na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbancija ispitivane smeše na talasnoj dužini od 750 nm. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta. Sadržaj fenola izračunat je na osnovu kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline. Ukupan sadržaj fenola u analiziranim uzorcima izražen je kao mg ekvivalenta galne kiseline po g droge  $\pm$  standardna devijacija (mg EGK/g  $\pm$  SD).

## 3.3.1.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima peteljki višnje i trešnje određen je kolorimetrijskom metodom po Markham-u (1989). Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida zasnovano je na osobini flavonoida da sa metalima grade odgovarajuće metalo-komplekse. Naročito značajan je kompleks sa aluminijumom (Slika 45).



Slika 45. Struktura rutina i njegov kompleks sa aluminijumom.

Reakciona smeša pripremljena je mešanjem 1 ml ekstrakta sa 4 ml destilovane vode i 0,3 ml 5%  $\text{NaNO}_2$ . Paralelno je pripremljena i slepa proba. Nju je činila smeša u koju je umesto 1 ml uzorka dodat 1 ml destilovane vode. Reakcija se odvijala na sobnoj temperaturi u trajanju od 6 min. Nakon inkubacije u reakcionu smešu dodato je 0,3 ml  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  i 5 min kasnije još 2 ml  $\text{NaOH}$  (1 M). Dobijena smeša potom je dopunjena destilovanom vodom do ukupne zapremine od 10 ml. Apsorbanca uzorka izmerena je na talasnoj dužini od 510 nm. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta. Sadržaj flavonoida izračunat je na osnovu kalibracione krive standardnog rastvora rutina. Ukupan sadržaj flavonoida u analiziranim uzorcima izražen je kao mg ekvivalenta rutina po gramu droge  $\pm$  standardna devijacija (mg ER/g  $\pm$  SD).

### 3.4. Hemijska karakterizacija ekstrakata

#### 3.4.1. HPLC–PDA

Polifenolni sastav ekstrakata peteljki višnje i trešnje određen je primenom HPLC-a metodom prema Rubilar i dr. (2007) uz male modifikacije. Korišćen je HPLC sistem (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) sa pumpom LC-20AD, degazerom DGU-20AS, termostatom CTO-10AS VP, autoinjektorom SIL-20A HT i detektorom SPD-M20A. Razdvajanje fenolnih jedinjenja izvršeno je na Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> koloni (250 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5 µm) koja je bila zaštićena pretkolonom istih karakteristika, termostatiranoj na 25 °C. Zapremina injektovanih uzoraka je iznosila 20 µl. Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A (metanol) i B (voda), oba sa 0,1% rastvorom mravlje kiseline, pri protoku od 1 ml/min. Primenjen je sledeći gradijent: 0 min 85% B, 85–70% B za 20 min, 70–55% B za 20 min, 55–50% B za 5 min, 50–45% B za 5 min, 45–30% B za 15 min, 30–0% B za 10 min, nadalje, 100% A za 5 min i 85% B za 10 min, i 10 min za rekondicioniranje kolone pre sledećeg injektovanja.

Hromatogrami su snimljeni pri različitim talasnim dužinama: 280 nm za monomerne flavan-3-ole ((+)-katehin i (-)-epikatehin)), derivate benzoeve kiseline (galna, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina), naringin, naringenin i cimetnu kiselinu, 320 nm za derivate cimetne kiseline (kafena, ferulna, hlorogenska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina) i 360 nm za rutin i kvercetin. Lab Solutions softver (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) korišćen je za kontrolu i obradu podataka. Analiti u ekstraktima su identifikovani poređenjem njihovih retencionih vremena i UV-VIS spektra sa standardnim jedinjenjima. Korišćena je smeša 16 standarda. Koncentracije pojedinačnih fenolnih jedinjenja u uzorcima izračunate su na osnovu kalibracionih dijagrama standardnih rastvora fenolnih jedinjenja (koncentracioni opseg od 1 do 50 µg/l), i izražene su u miligramu po litru ekstrakta (mg/l).



### 3.4.2. GC–MS

#### 3.4.2.1. Priprema ekstrakata za GC–MS analizu

Ekstrakti peteljki višnje i trešnje dobijeni subkritičnom vodom (2 ml) su uparavani u struji azota na temperaturi od 80 °C. Suvi ostaci su rastvoreni u acetonitrilu (200 µl), i dodat je BSTFA reagens (200 µl). Uzorci su mešani 30 s i smešteni u autoinjektor.

#### 3.4.2.2. Priprema ekstrakata za DLLME GC–MS analizu

##### 3.4.2.2.1. DLLME postupak

Amonijum-sulfat (5%) je dodat ekstraktima peteljki i rastvoren uz mešanje. Nakon toga, ekstrakti su filtrirani kroz 0,22 µm politetrafluoroetilen filter. Smeša organskog ekstrakcionog rastvarača (200 µl), disperznog sredstva (700 µl) i 200 µl BSTFA reagensa je pipetirana u kivete. Filtrirani ekstrakt (4 ml) potom je dodat u smešu, i smeša je mešana 90 s, nakon čega je centrifugirana pri 3500 o/min tokom 120 s. Nakon centrifugiranja, organski sloj je odvojen i injektovan u GC-MS (1 µl).

#### 3.4.2.3. GC–MS analiza

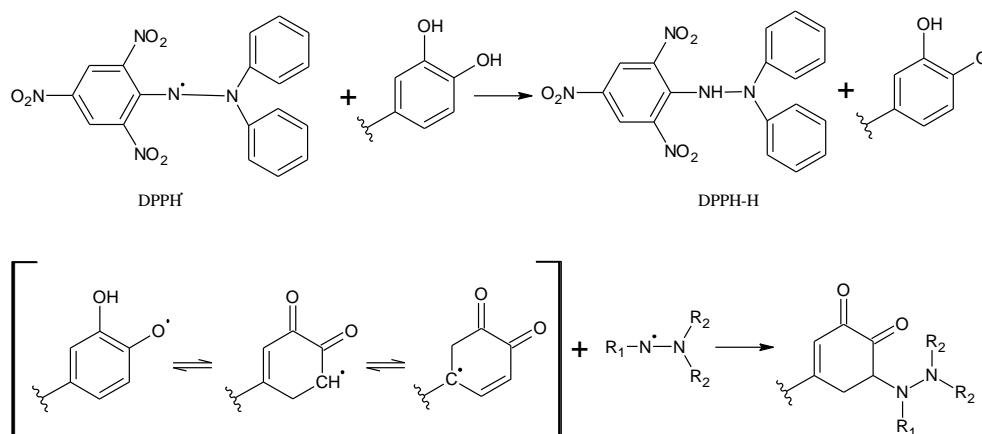
Ekstrakti peteljki višnje i trešnje analizirani su gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom koristeći GC/7890 MS model HP 5973C (Agilent Technologies, Palo Alto, SAD) opremljen sa DB-5 kapilarnom kolonom (dužine 30 m x 0,25 mm unutrašnjeg prečnika; obloženom sa 0,25 mm filma (5% fenil - 95% dimetilpolisiloksan)). ChemStation softver korišćen je za kontrolu sistema i akviziciju podataka. Temperatura GC-injekcionog bloka je iznosila 290 °C, a injektovano je 1 µl uzorka u splitless modu. Helijum (čistoće 99,9999%) je korišćen kao gas nosač u režimu konstantnog protoka od 1 ml/min. Razdvajanje komponenti vršeno je prema sledećem programu: početna temperatura 70 °C (1 min), a potom 10 °C/min do 290 °C (ukupno trajanje analize 30 min, zadržavanje 5 min). Komponente su analizirane na masenom spektrometru (temperatura transfer-linije 280 °C, temperatura jonskog izvora 230 °C, energija elektrona 70 eV) u sken modu, u opsegu m/z 50-400.

### 3.5. Ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata

#### 3.5.1. Određivanje antioksidativne i antiradikalske aktivnosti

##### 3.5.1.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Sposobnost neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala određena je primenom spektrofotometrijske metode (Espín i dr., 2000) koja je zasnovana na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog azot-centriranog DPPH radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H. Nastanak DPPH-H objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata uzorka da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH radikal prelazi u redukovani neutralni DPPH-H. Neutralizacija DPPH radikala fenolnim jedinjenjima odvija se preko dva simultana mehanizma. Najpre, fenolno jedinjenje predaje vodonikov atom DPPH radikalu, pri čemu nastaje redukovani neutralni DPPH-H oblik i ariloksi radikal koji je rezonantno stabilizovan. Nadalje, nastali ariloksi radikal može da reaguje sa još jednim DPPH radikalom, pri čemu dolazi do njihove kondenzacije i prelaska u neutralni molekul (Slika 46).



Slika 46. Mehanizam neutralizacije DPPH radikala (DPPH<sup>•</sup>) fenolnim jedinjenjima.

Ekstrakti peteljki višnje i trešnje (1 mg/ml) pomešani su sa 95% metanolom i 90  $\mu$ M rastvorom DPPH radikala u metanolu do različitih finalnih koncentracija (0,01; 0,02; 0,05; 0,1 i 0,2 mg/ml). Kao kontrola korišćena je smeša u koju je umesto uzorka dodata destilovana voda. Nakon inkubacije od 60 min na sobnoj temperaturi merena je apsorbanca reakcione smeše na

talasnoj dužini od 515 nm. Na osnovu izmerene apsorbance ispitivanog uzorka i kontrole izračunat je kapacitet neutralizacije slobodnih (DPPH) radikala (*RSC*, eng. *Radical Scavenging Capacity*) prema jednačini:

$$RSC(\%) = 100 - \frac{A_{uz} \cdot 100}{A_{kon}}$$

gde je:

$A_{uz}$  – apsorbanca uzorka i

$A_{kon}$  – apsorbanca kontrole.

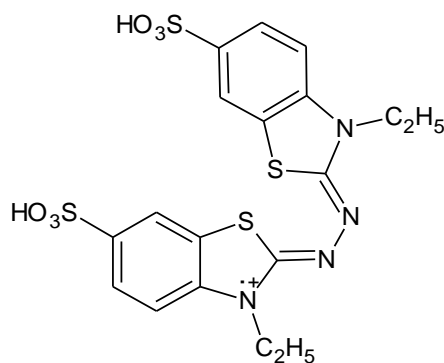
Sva merenja izvedena su u tri ponavljanja, nakon čega je dobijena zavisnost između vrednosti *RSC* (%) i koncentracije ekstrakta. Iz dobijene zavisnosti pomoću jednačine linearne regresije izračunata je  $IC_{50}$  vrednost (mg/ml), definisana kao koncentracija ekstrakta koja neutrališe 50% DPPH radikala ( $RSC = 50\%$ ).

### 3.5.1.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije hidroksilnih radikala

Sposobnost inhibicije nespecifičnog hidroksilnog radikala određena je primenom metode po Hinneburg i dr. (2006). Od tečnih ekstrakata napravljena je serija rastvora u rasponu sadržaja 0,15-1,3 mg/ml. Rastvori tečnih ekstrakata pomešani su sa 500  $\mu$ l 5,6 mM rastvora 2-deoksi-D-riboze, 100  $\mu$ l rastvora  $FeCl_3$  (100  $\mu$ M) i EDTA (104 mM) (1:1, v/v), 100  $\mu$ l  $H_2O_2$  (1 mM), 100  $\mu$ l rastvora askorbinske kiseline (1 mM) i 2,7 ml fosfatnog pufera vrednosti pH 7,4. Nakon toga, reakciona smeša je inkubirana 30 min na 50 °C. Po završetku perioda inkubacije u smešu je dodat 1 ml trihlorsirćetne kiseline (2,8%) i 1 ml tiobarbiturine kiseline (1%). Potom je nastavljena inkubacija na 50 °C u trajanju od 30 min. Kao kontrola korišćena je smeša u koju je umesto uzorka dodata destilovana voda. Svakoj probi i kontroli merena je apsorbanca spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 532 nm. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja. Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$  vrednosti (mg/ml).

## 3.5.1.3. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala

Sposobnost neutralizacije 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS) radikal-katjona,  $ABTS^{+\cdot}$  (Slika 47), određena je primenom metode Delgado-Andrade i dr. (2005).



Slika 47. Hemijska struktura ABTS radikal-katjona.

Metoda se zasniva na reakciji ABTS sa kalijum-persulfatom pri čemu nastaje ABTS radikal-katjon. Rastvor ABTS reagensa je pripremljen mešanjem 7 mM vodenog rastvora ABTS i 2,45 mM kalijum-persulfata u odnosu 1:1 (v/v) i inkubacijom na sobnoj temperaturi tokom 16 h. Inkubacija se odvijala u mraku. ABTS reagens je razblažen fosfatnim puferom (vrednost pH 7,4) kako bi se apsorbancija na 734 nm podesila na  $0,70 \pm 0,02$ . Odgovarajuća razblaženja tečnih ekstrakata (10  $\mu$ l) su pomešana sa ABTS reagensom (4 ml) i inkubacija je izvršena na 30 °C tokom 30 min. Nakon inkubacije izmerena je apsorbancija na 734 nm. Kao kontrola korišćena je smeša u koju je umesto uzorka dodata destilovana voda. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja. Sposobnost neutralizacije  $ABTS^{+\cdot}$  izračunata je na osnovu sledeće jednačine:

$$RSC (\%) = \left( \frac{A_{kon} - A_{uz}}{A_{kon}} \right) \cdot 100$$

gde je:

$A_{uz}$  – apsorbancija uzorka i

$A_{kon}$  – apsorbancija kontrole.

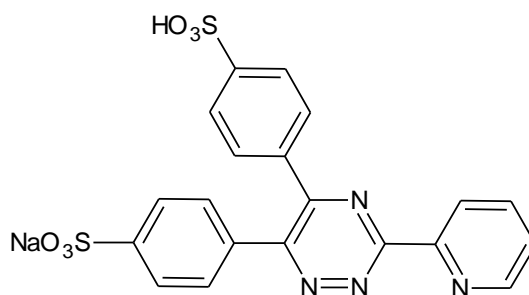
Iz dobijene zavisnosti *RSC* (%) od koncentracije ekstrakta izračunata je  $IC_{50}$  vrednost (mg/ml).

#### 3.5.1.4. Određivanje redukcionne sposobnosti

Redukciona sposobnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje određena je prema metodi po Oyaizu (1986). Metoda se zasniva na praćenju redukcije  $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$  pod dejstvom ispitivanih uzoraka. Rastvori (1 ml) ekstrakta peteljki različitih sadržaja (0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8 i 1 mg/ml) pomešani su sa fosfatnim puferom (1 ml, 0,2 M, vrednost pH 6,6) i kalijum-fericijanidom (1 ml, 1%). Dobijena smeša inkubirana je 20 min na temperaturi od 50 °C. Nakon inkubacije, 1 ml 10% rastvora trihlorsirćetne kiseline dodat je smeši i ona je centrifugirana 10 min na 3000 o/min. Dobijenom supernatantu (2 ml) dodato je 2 ml bidestilovane vode i 0,4 ml  $FeCl_3$  (0,1%). Apsorbanca uzorka izmerena je na talasnoj dužini od 700 nm. Sva merenja izvedena su u tri ponavljanja. Redukciona sposobnost ispitivanih ekstrakata je izražena preko  $EC_{50}$  vrednosti (mg/ml).

#### 3.5.1.5. Određivanje sposobnosti heliranja metalnih jona

U sklopu određivanja i definisanja antioksidativnog potencijala određena je i sposobnost heliranja metalnih jona (Carter, 1971; Yan i dr., 2006). Metoda se zasniva na kompleksiranju gvožđe(II)-jona. Ferozin (Slika 48) kvantitativno gradi kompleks sa  $Fe(II)$ -jonima. U prisustvu helirajućih agenasa dolazi do smanjenja intenziteta crvene/magenta boje koja potiče od ferozinskog kompleksa. Ovo se prati spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 562 nm (Gülçin, 2012; Dasgupta i Klein, 2014).



Slika 48. Hemijska struktura ferozina.

Tečni ekstrakti peteljki razblaženi su destilovanom vodom do finalnog sadržaja od 10 mg/ml. Od ovog rastvora napravljena je serija razblaženja u opsegu sadržaja od 0,02 do 2 mg/ml. Od svakog rastvora uzimano je po 1 ml za pripremu reakcione smeše. Smeša je pripremana mešanjem sa 1 ml FeSO<sub>4</sub> (0,125 mM) i 1 ml ferozina (0,3125 mM). Ovako pripremljenoj reakcionoj smeši je nakon 10 min merena apsorbancija na talasnoj dužini od 562 nm. Rezultati su izraženi kao IC<sub>50</sub> vrednosti (mg/ml).

#### 3.5.1.6. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije

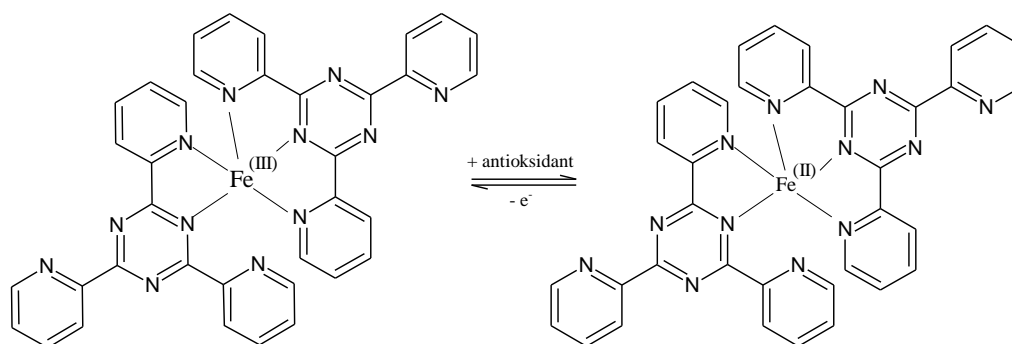
Sposobnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje da inhibiraju lipidnu peroksidaciju određena je po tiocijanidnoj metodi (Hsu i dr., 2008). Tečni ekstrakti su razblaženi destilovanom vodom do finalnog sadržaja od 10 mg/ml. Od ovog rastvora napravljena je serija razblaženja u opsegu od 0,1 do 7 mg/ml. Od svakog rastvora je potom uzet alikvot od 0,5 ml koji je pomešan sa 2,5 ml emulzije linolne kiseline (40 mM, pH 7,0). Emulzija linolne kiseline pripremana je mešanjem 0,2084 g linolne kiseline i 0,2804 g Tween-20 u 50 ml fosfatnog pufera (40 mM). Reakciona smeša je inkubirana na 37 °C tokom 72 h. Nakon inkubacije, 0,1 ml reakcione smeše pomešano je sa 4,7 ml etanola (75%), 0,1 ml FeCl<sub>2</sub> (20 mM) i 0,1 ml amonijum-tiocijanata (30%). Posle intenzivnog mešanja u trajanju od 3 min merena je apsorbancija na talasnoj dužini od 500 nm. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja. Rezultati su izraženi kao IC<sub>50</sub> vrednosti (mg/ml).

#### 3.5.1.7. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje određena je fosfomolibdenskom metodom (Prieto i dr., 1999). Tečni ekstrakti su razblaženi destilovanom vodom, pri čemu je napravljena serija razblaženja u opsegu sadržaja od 0,5 do 4 mg/ml. Od svakog rastvora uzimano je po 0,3 ml i pomešano sa 3 ml smeše reagensa. Smešu reagensa su činile sumporna kiselina (0,6 M), natrijum-fosfat (28 mM) i amonijum-molibdat (4 mM). Reakciona smeša potom je inkubirana na 95 °C u trajanju od 90 min. Nakon hlađenja merena je apsorbancija na talasnoj dužini od 695 nm. Kao slepa proba korišćena je smeša u koju je umesto uzorka dodata destilovana voda. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja. Askorbinska kiselina je korišćena kao referentna supstanca, a ukupna antioksidativna aktivnost izražena je kao mg ekvivalenta askorbinske kiseline po ml ekstrakta (mg EAK/ml).

## 3.5.1.8. Određivanje redukcijske sposobnosti FRAP metodom

Redukcijska sposobnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje ispitana je i FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodom. Pri niskoj vrednosti pH dolazi do redukcije gvožđe(III)-2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin kompleksa doniranjem elektrona od strane antioksidanta, i obrazovanja intenzivnog plavo obojenog gvožđe(II)-2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin kompleksa (Slika 49).



Slika 49. Redukcija gvožđe(III)-2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin kompleksa.

U bunariće mikroploče odmereno je po 180  $\mu$ l sveže pripremljenog FRAP reagensa (dobijenog mešanjem 10 ml 0,3 mol/l acetatnog pufera (vrednost pH 3,6), 1 ml 0,01 mol/l rastvora 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) u 0,04 mol/l HCl, i 1 ml 0,02 mol/l FeCl<sub>3</sub>) i 20  $\mu$ l uzorka. Reakciona smeša potom je inkubirana na 37 °C u trajanju od 4 min, nakon čega je merena apsorbanca na talasnoj dužini od 593 nm (Barroso i dr., 2016). Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja. Redukcioni potencijal ispitivanih ekstrakata izračunat je na osnovu kalibracione krive standardnog rastvora askorbinske kiseline. Rezultat je izražen kao  $\mu$ g ekvivalenta askorbinske kiseline po ml ekstrakta ( $\mu$ g EAK/ml).

## 3.5.1.9. Određivanje antioksidativnog potencijala ORAC metodom

Antioksidativni potencijal ekstrakata peteljki višnje i trešnje ispitana je i ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metodom. Pomešano je 25  $\mu$ l uzorka, standarda ili fosfatnog pufera (za slepu probu) i 150  $\mu$ l rastvora fluoresceina ( $1,5 \cdot 10^{-8}$  g/l), i inkubirano na temperaturi od 37 °C u trajanju od 30 min (Huang i dr., 2002). Reakcije su inicirane dodatkom 25  $\mu$ l rastvora 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorida (AAPH) (40 g/l), a promena

intenziteta fluorescencije merena je tokom 100 min pri temperaturi od 37 °C uz  $\lambda_{\text{ekscitacije}}$  485 nm i  $\lambda_{\text{emisije}}$  528 nm. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja. Za kalibracionu krivu korišćen je standardni rastvor Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina). Rezultat je izražen kao  $\mu\text{g}$  ekvivalenta Trolox-a po mililitru ekstrakta ( $\mu\text{g ET/ml}$ ).

### 3.5.1.10. Određivanje antioksidativnog potencijala DNK-biosenzornom metodom

Biosenzorne-DNK metode simuliraju *in vivo* izlaganje molekula dezoksiribonukleinske kiseline reaktivnim vrstama kiseonika. Antioksidativna aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje određena je DNK-biosenzornom metodom naspram hidroksilnih radikala. Rastvor deoksiadenilne kiseline (oligonukleotida) ( $dA_{20}$ , 1 g/l) razblažen je puferom A (rastvor natrijum-fosfata, natrijum-hlorida i etilendiamintetrasirćetne kiseline neposredno pre korišćenja. Fentonov rastvor (za generisanje  $\text{OH}^{\bullet}$ ) pripremljen je mešanjem  $\text{Fe}^{2+}:\text{EDTA}:\text{H}_2\text{O}_2$  (1:2:40  $\mu\text{mol/l}$ ) (Mello i dr., 2006).

Voltometrija sa pravougaonim impulsima izvedena je primenom Autolab PSTAT 10 uređaja i kontrolisana GPES softverom, verzija 4,8 (EcoChemie, Holandija). Korišćena je klasična ćelija sa tri elektrode i to: radnom elektrodom od ugljenične paste ( $d = 3$  mm), pomoćnom platinskom elektrodom i  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{\text{sat}}$  referentnom elektrodom. Radna elektroda sa ugljeničnom pastom (CPE) pripremljena je homogenizovanjem 5 g ugljeničnog praha spektroskopske čistoće i 1,8 g parafinskog ulja, kao vezivne komponente. Nakon toga ugljeničnom pastom napunjen je teflonski kalup elektrode. Radna elektroda pripremana je za svaku analizu (Barroso i dr., 2016).

Biosenzorni eksperiment se sastojao iz tri koraka: imobilizacije DNK, promene strukture oligonukleotida uranjanjem  $dA_{20}$ -CPE u Fentonov rastvor u prisustvu/odsustvu antioksidanata, detekcije i merenja struje pika u rastvoru fosfatnog pufera vrednosti pH 7,4.

Imobilizacija DNK izvedena je adsorpcijom, nanošenjem 4  $\mu\text{l}$  sveže pripremljenog rastvora  $dA_{20}$  (100 mg/l) u puferu A na površinu elektrode od ugljenične paste, i njegovim isparavanjem u struji azota. Promena strukture DNK izazvana je uranjanjem radne elektrode u Fentonov rastvor u odsustvu ili prisustvu rastvora galne kiseline, odnosno ekstrakta peteljki u puferu A. Nakon 30 s radna elektroda je ispirana vodom i uronjena u fosfatni pufer. Voltometrija sa pravougaonim impulsima (frekvencija = 25 Hz; potencijal koraka = 5,1 mV; amplituda = 20 mV) (Barroso i dr., 2016) izvedena je u opsegu potencijala od 0,7 do 1,5 V i merena je struja pika. Struja pika, kao kvantitativna karakteristika, korišćena je za kvantifikaciju antioksidativnog potencijala, interpolacijom u kalibracionu krivu definisanu sa



rastvorom galne kiseline. Rezultat je izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline po litru ekstrakta (mg EGK/l).

### 3.5.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata

Antimikrobna aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje određena je merenjem njihove minimalne inhibitorne koncentracije mikrodilucionom metodom (Sarker i dr., 2007) za sledeće sojeve mikroorganizama: *Staphylococcus aureus* ATCC (eng. *American Type Culture Collection* – Američka selekcija kultura) 25923, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231) i *Aspergillus niger* (ATCC 16404). Identifikacija ispitivanih mikroorganizama potvrđena je od strane Laboratorije za mikologiju Odseka za mikrobiologiju Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu. Sterilisani Mueller-Hinton agar korišćen je u eksperimentima sa bakterijama, dok je u slučaju gljiva primenjivan Sabouraud dekstrozni agar.

Pri određivanju antimikrobne aktivnosti suvi ekstrakti peteljki višnje i trešnje razblaženi su vodom do sadržaja 800 µg/ml, odakle je potom pravljena serija razblaženja: 625; 312,5; 156; 78; 39 i 19,5 µg/ml. Nakon mešanja ekstrakata sa sojevima mikroorganizama koncentracija bakterijskih ćelija iznosila je  $10^6$  CFU (eng. *Colony Forming Unit* - Jedinica za formiranje kolonija) po mililitru, dok je koncentracija gljiva iznosila  $3 \cdot 10^4$  CFU/ml. Kao pozitivna kontrola korišćen je antibiotik Amracin kod sojeva bakterija i antimikotik Nistatin kod sojeva gljiva. Petri ploče sa zasejanim mikroorganizmima su obavijene parafilmom i inkubirane. U slučaju bakterija inkubacija je trajala 24 h na temperaturi od 37 °C, a u slučaju gljiva 48 h na 28 °C, nakon čega je određivana minimalna inhibitorna koncentracija. MIC vrednost predstavljala je onu koncentraciju ekstrakta pri kojoj je dolazilo do promene boje, odnosno najmanju koncentraciju koja je inhibirala rast bakterija i gljiva. Rezultat je izražen u µg/ml.

### 3.5.3. Određivanje aktivnosti inhibicije odabranih enzima

Inhibitorna aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje prema enzimima određena je merenjem inhibicije  $\alpha$ -amilaze,  $\alpha$ -glukozidaze, tirozinaze, acetilholinesteraze, butirilholinesteraze i lipaze. Za potrebe određivanja sposobnosti inhibicije ovih enzima suvi ekstrakti peteljki su rastvarani u vodi (2 mg/ml). Ovako pripremljeni rastvori suvih ekstrakata su dalje korišćeni u analizi.

Sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze određena je pomoću Caraway-Somogyi jod/kalijum-jodid metode (Zengin i dr., 2014). Rastvor ekstrakta peteljke višnje/trešnje (2 mg/ml; 25  $\mu$ l) pomešan je sa 50  $\mu$ l rastvora  $\alpha$ -amilaze (10 u/ml) u fosfatnom puferu (vrednost pH 6,9 sa 6 mM rastvorom natrijum-hlorida) i nanešen na mikroploču sa 96 bunarića. Dodavanjem 50  $\mu$ l rastvora skroba (0,05%) inicirana je reakcija. Reakciona smeša je inkubirana 10 min na temperaturi od 37 °C. Slepa proba pripremana je bez dodatka rastvora enzima. Reakcija je zaustavljena dodatkom 25  $\mu$ l hlorovodonične kiseline (1 M), nakon čega je dodato 100  $\mu$ l rastvora joda u kalijum-jodidu (5/1, m/m). Apsorbance uzorka i slepe probe su očitane na talasnoj dužini od 630 nm. Korišćen je Multiskan™ GO čitač mikroploče (Thermo Scientific™). Sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze dobijena je oduzimanjem apsorbance slepe probe od apsorbance uzorka, i izražena kao ekvivalent akarboze po gramu suvog ekstrakta peteljke višnje, odnosno trešnje (mmol EA/g ekstrakta).

Sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze određena je metodom po Zengin i dr. (2014). Rastvor ekstrakta peteljke višnje/trešnje (2 mg/ml; 50  $\mu$ l) pomešan je sa glutationom (0,5 mg/ml; 50  $\mu$ l), rastvorom  $\alpha$ -glukozidaze (0,2 u/ml; 50  $\mu$ l) u fosfatnom puferu (0,1 M, vrednost pH 6,8) i rastvorom PNP-g-a (10 mM; 50  $\mu$ l) u 96-čelijskoj mikroploči. Reakciona smeša je inkubirana 15 min na temperaturi od 37 °C. Slepa proba pripremana je bez dodatka rastvora enzima. Reakcija je zaustavljena dodatkom 50  $\mu$ l rastvora natrijum-karbonata (0,2 M), nakon čega je izmerena apsorbance na talasnoj dužini od 400 nm. Sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze dobijena je oduzimanjem apsorbance slepe probe od apsorbance uzorka, i izražena kao ekvivalent akarboze po gramu suvog ekstrakta peteljke višnje, odnosno trešnje (mmol EA/g ekstrakta).

Sposobnost inhibicije tirozinaze određena je po modifikovanoj dopahrom metodi koristeći L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat (Zengin i dr., 2015). Rastvor ekstrakta peteljke višnje/trešnje (2 mg/ml; 25  $\mu$ l) pomešan je sa rastvorom tirozinaze (200 u/ml; 40  $\mu$ l) i fosfatnim puferom (10  $\mu$ l, 40 mM, vrednost pH 6,8). Reakcija je inicirana dodatkom 40  $\mu$ l rastvora L-DOPA (10 mM), nakon čega je smeša inkubirana 15 min na 25 °C. Slepa proba pripremana je bez dodatka rastvora tirozinaze. Apsorbance slepe probe i uzorka očitana je na 492 nm. Na osnovu razlike apsorbance uzorka i slepe probe izračunata je aktivnost inhibicije tirozinaze i izražena kao ekvivalent kojične kiseline po gramu suvog ekstrakta peteljke višnje, odnosno trešnje (mg EKK/g ekstrakta).

Aktivnost inhibiranja acetilholinesteraze i butirilholinesteraze određena je primenom Ellman-ove metode (Zengin i dr., 2014). Rastvor ekstrakta peteljke višnje/trešnje (2 mg/ml; 50  $\mu$ l) pomešan je sa rastvorom DTNB-a (3 mM, 125  $\mu$ l), rastvorom acetilholinesteraze (0,265

u/ml), odnosno butirilholinesteraze (0,026 u/ml) (25  $\mu$ l) u tris-HCl puferu (vrednost pH 8,0) u 96-ćelijskoj mikroploči. Smeša je inkubirana 15 min na 25 °C. Reakcija je inicirana dodatkom rastvora acetiltioholin-jodida (15 mM) odnosno butiriltioholin-hlorida (1,5 mM) (25  $\mu$ l), nakon čega je reakciona smeša inkubirana 10 min na 25 °C. Slepa proba je pripremana bez dodavanja rastvora enzima. Apsorbance uzorka i slepe probe očitane su na talasnoj dužini od 405 nm. Na osnovu razlike apsorbance uzorka i slepe probe izračunata je aktivnost inhibicije acetilholinesteraze, odnosno butirilholinesteraze, i izražena kao ekvivalent galantamina po gramu suvog ekstrakta peteljke višnje, odnosno trešnje (mg EGALA/g ekstrakta).

Aktivnost inhibiranja lipaze određena je korišćenjem *p*-nitrofenil butirata (*p*-NPB) kao supstrata (Grochowski i dr., 2017). Rastvor lipaze (1 mg/ml) pripremljen je u 50 mM tris-HCl puferu (vrednost pH 8,0). Rastvor ekstrakta peteljke višnje/trešnje (2 mg/ml; 25  $\mu$ l) pomešan je sa rastvorom lipaze (50  $\mu$ l) u 96-ćelijskoj mikroploči. Smeša je inkubirana 20 min na 25 °C. Reakcija je inicirana dodatkom *p*-NPB (5 mM, 50  $\mu$ l). Slepa proba je pripremana bez dodatka rastvora enzima. Apsorbance uzorka i slepe probe očitane su na talasnoj dužini od 405 nm. Rezultat je izražen kao ekvivalent orlistata po gramu suvog ekstrakta peteljke višnje, odnosno trešnje (mg EO/g ekstrakta).

#### 3.5.4. Određivanje antiproliferativne aktivnosti MTT testom

Antiproliferativna aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje određena je MTT testom (Mosman, 1983; Dighe i dr., 2011; Baviskar i dr., 2012). Test se zasniva na nastanku ljubičasto-plavih kristala formazana raspadom tetrazolijumove MTT soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida) pod dejstvom dehidrogenaze živih ćelija. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih ćelija i očitava se spektrofotometrijski na 580 nm.

Pri određivanju antiproliferativne aktivnosti ekstrakata peteljki višnje i trešnje korišćene su sledeće tumorske ćelije, gajene na podlogama:

- Hep2c (podloga: MEM Eagle/5% FCS), humana ćelijska linija raka cerviksa (*human cervix carcinoma*),
- RD (podloga: MEM Eagle/5% FCS), humana ćelijska linija rabdomyosarkoma (*rhabdomyosarcoma*),
- L2OB (podloga: MEM Eagle/5% FCS), mišja tumorska fibroblastna linija u koju su transefektovani neki humani geni.

Za potrebe ispitivanja antiproliferativne aktivnosti ekstrakata peteljki višnje i trešnje, suvi ekstrakti su rastvarani u apsolutnom etanolu (5 mg/ml). Suspenzije ćelija prenešene su na mikrotitar ploče sa 96 bunarića ( $2 \cdot 10^5$  ćelija/ml; 100  $\mu$ l/otvor), a potom inkubirane 24 h na 37 °C u atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. Nakon perioda inkubacije ćelijskim suspenzijama dodat je rastvor ekstrakata peteljki različitih koncentracija (25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000  $\mu$ g/ml), kao i kontrola (apsolutni etanol). Ćelije su inkubirane 48 h na 37 °C. Kontrolne ćelije su rasle pod istim uslovima. Po završetku perioda inkubacije odbačen je supernatant, a ćelijama je dodato 100  $\mu$ l MTT rastvora (500  $\mu$ g/ml), nakon čega je usledila inkubacija u trajanju od četiri sata, na 37 °C, u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Reakcija je prekinuta dodatkom 100  $\mu$ l natrijum-dodecilsulfata (10% u 10 mM HCl). Nastali formazanski kristali rastvoreni su dodatkom dimetil-sulfoksida i nakon 24 h očitana je apsorbanca na 580 nm na spektrofotometru (Ascent 6-384 [Suomi], MTX Lab Systems Inc., Vienna, VA 22182, SAD). Uzimajući u obzir da je apsorbanca formazana direktno proporcionalna broju živih ćelija, apsorbanca tretiranih ćelija deljena je sa apsorbancom kontrolnih (netretiranih) ćelija, i potom je dobijena vrednost množena sa 100. Apсорbanca slepe probe oduzimana je od apsorbance odgovarajućeg uzorka. Antiproliferativna aktivnost izražena je kao IC<sub>50</sub> vrednost (koncentracija koja inhibira 50% ćelijskog rasta). Rezultati su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta.

\*

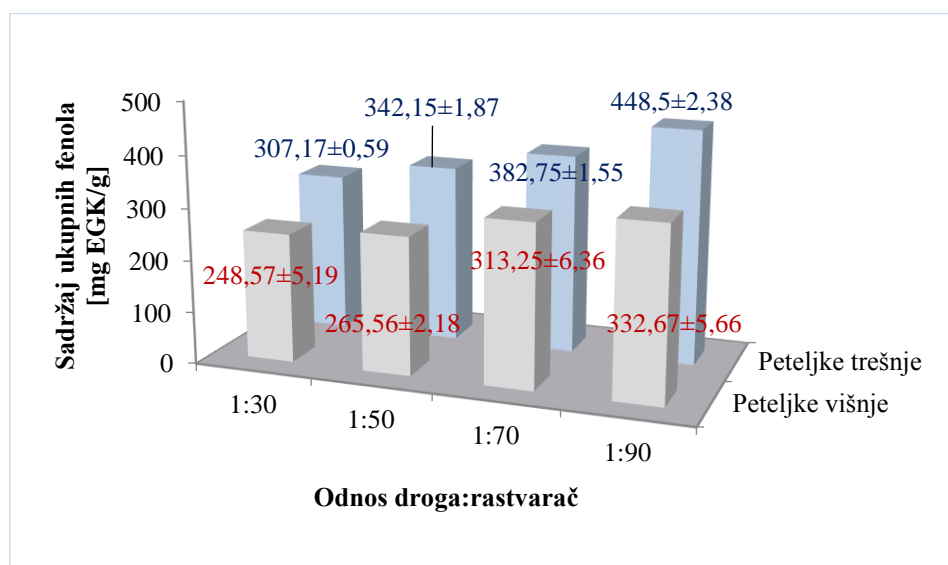
## **4. Rezultati i diskusija**

## 4.1. Ekstrakcija peteljki višnje i trešnje

### 4.1.1. Određivanje optimalnog odnosa droga:rastvarač

Iako odnos droga:rastvarač (eng. *Sample-to-Solvent Ratio*, SSR) utiče na prinos i koncentraciju ciljnih jedinjenja (Cvetanović i dr., 2017a), ovaj parametar često se zanemaruje. Rastvorljivost ciljnih jedinjenja kao i ravnotežna koncentracija zavisni su od odnosa droga:rastvarač, i zbog toga je za maksimalne prinose važno odrediti optimalni SSR odnos (Cacace i Mazza, 2003). Optimizacija ovog parametra izvedena je merenjem ukupnih fenolnih i flavonoidnih jedinjenja spektrofotometrijskom metodom. I pored činjenice da spektrofotometrijska metoda ima određena ograničenja, ona još uvek predstavlja najčešću metodu za rutinsku kvantifikaciju fenolnih jedinjenja.

U radu su ispitana četiri različita odnosa droga:rastvarač (1:30; 1:50; 1:70 i 1:90, m/v), a dobijeni rezultati prikazani su na Slikama 50 i 51 kao srednja vrednost tri nezavisna ponavljanja ( $\pm 2SD$ ). Ekstrakcija je izvedena na 100 °C tokom 30 min. Tokom ekstrakcije pritisak je održavan na 30 bar.

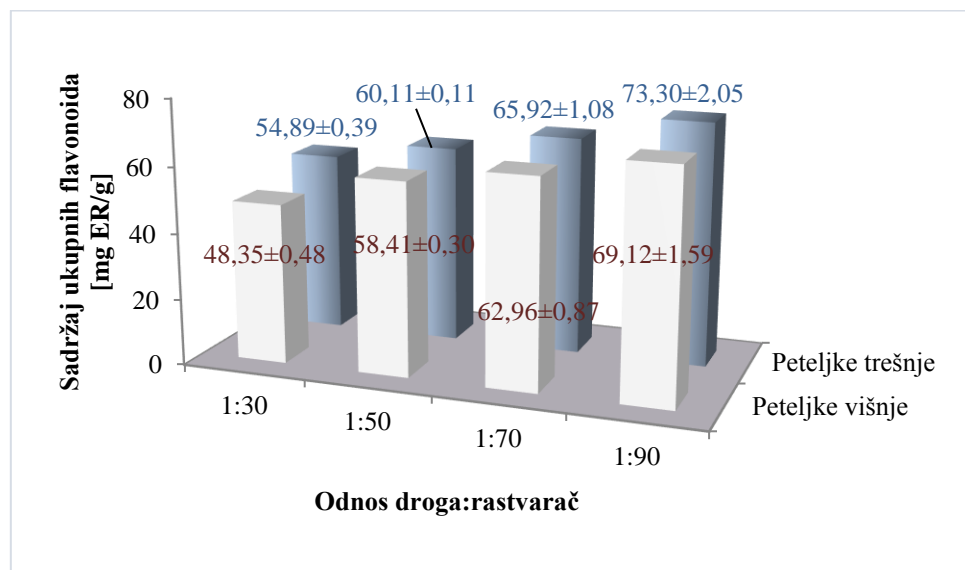


Slika 50. Uticaj odnosa droga:rastvarač na prinos ukupnih fenola.

Histogram na Slici 50 pokazuje da je sa porastom odnosa droga:rastvarač rastao i prinos fenola u ekstraktima, što je u skladu sa principima prenosa mase, odnosno, koncentracionim gradijentom. Do sličnih rezultata o uticaju odnosa droga:rastvarač na ekstrakciju fenolnih jedinjenja došli su Tunchaiyaphum i dr. (2013) za koru manga i Sood i Gupta (2015) za koru

nara. Prema Al-Farsi i Lee-u (2008) veće zapremine rastvarača potenciraju rastvaranje biološki aktivnih jedinjenja, ali ujedno i razblažuju uzorak (Ho i dr., 2008). Zbog toga je neophodno pronaći optimalni odnos za svaki uzorak, rastvarač i ekstrakcionu tehniku.

Prinosi ukupnih flavonoida pri različitim odnosima droga:rastvarač su bili u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za fenolna jedinjenja, što ukazuje da su veći odnosi droga:rastvarač vodili većim prinosima i flavonoidnih jedinjenja.



Slika 51. Uticaj odnosa droga:rastvarač na prinos ukupnih flavonoida.

Prezentovani rezultati pokazuju da odnos droga:rastvarač ima značajan uticaj na sadržaj fenolnih i flavonoidnih jedinjenja. Za peteljke višnje i trešnje odabran je optimalni odnos droga:rastvarač od 1:90 i on je primenjivan u svim narednim eksperimentima.

#### 4.1.2. Uticaj temperature

Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju peteljki višnje i trešnje ispitana je u opsegu vrednosti temperatura od 100 do 210 °C. Ekstrakcije su trajale 30 min, a proces je vođen pri pritisku od 30 bar. Uticaj temperature na ekstrakcioni proces posmatran je merenjem prinosa fenola i flavonoida (Tabela 23).

Sadržaji ukupnih fenola i flavonoida rasli su sa porastom temperature ekstrakcije od 100 do 150 °C. Najveća koncentracija ukupnih fenola postignuta je pri temperaturi od 150 °C i iznosila je za peteljke višnje i trešnje 465,72 i 511,62 mg EGK/g, redom. Prinosi ukupnih

flavonoida pri ovoj temperaturi su iznosili 76,85 i 81,84 mg ER/g, redom. Porast temperature favorizuje ekstrakciju fenolnih jedinjenja povećavajući koeficijent difuzije rastvarača, rastvorljivost jedinjenja, brzinu difuzije, smanjujući viskozitet i površinski napon rastvarača (Xu i dr., 2015a). Porast sadržaja ukupnih fenola (do 150 °C) može biti objašnjen povećanom rastvorljivošću određenih fenolnih jedinjenja na datim temperaturama usled odgovarajuće polarnosti rastvarača i formiranjem novih fenolnih jedinjenja kao rezultat dekompozicionih procesa matriksa uzorka (Naffati i dr., 2017). Na osnovu izvedene HPLC-PDA analize ekstrakata peteljki višnje i trešnje (poglavlje 4.2.1) galna kiselina je bila dominantno fenolno jedinjenje. U studiji ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ljuske pistača subkritičnom vodom, Erşan i dr. (2018) su demonstrirali značajan uticaj temperature na prinos galne kiseline. Prinos galne kiseline je rastao sa porastom temperature od 110 do 170 °C. Na 190 °C dobijeni ekstrakt se karakterisao smanjenim sadržajem galne kiseline, i prisustvom pirogalola. Fabian i dr. (2010) su zaključili da do opadanja sadržaja galne kiseline u SWE ekstraktu obezmašćenih pirinčanih mekinja, dobijenog na temperaturi od 200 °C, verovatno dolazi zbog konverzije galne kiseline u njen primarni dekarboksilacioni produkt, pirogalol. Opadanje sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima peteljki višnje i trešnje dobijenih subkritičnom vodom na temperaturama višim od 150 °C može biti objašnjeno mogućom degradacijom termolabilnih fenolnih jedinjenja prisutnih u ispitivanim uzorcima. Pojedini autori su zaključili da nakon određene temperature primena više temperature dovodi do degradacije fenolnih jedinjenja (Xu i dr., 2015a; Ahmadian-Kouchaksaraie i dr., 2016; Munir i dr., 2018).

Uopšteno, primena temperatura iznad 120 °C rezultovala je ekstraktima tamnije boje (Slike 52 i 53). Reakcije „tamnjenja“ (eng. *browning reactions*), kao što su Maillard-ova reakcija i reakcija karamelizacije, karakteristične su za procese u subkritičnoj vodi (Plaza i dr., 2010). Mnogi od proizvoda Maillard-ove reakcije su intenzivno obojeni, tako da su najverovatnije bili odgovorni za „tamnjenje“ reakcione smeše (Lachos-Perez i dr., 2018). Reakcije „tamnjenja“ eksponencijalno rastu sa temperaturom, a brzina reakcija je najveća na temperaturama između 140 i 160 °C (Yildiz, 2010).



Tabela 23. Uticaj temperature ekstrakcije na prinos ukupnih fenola i flavonoida.

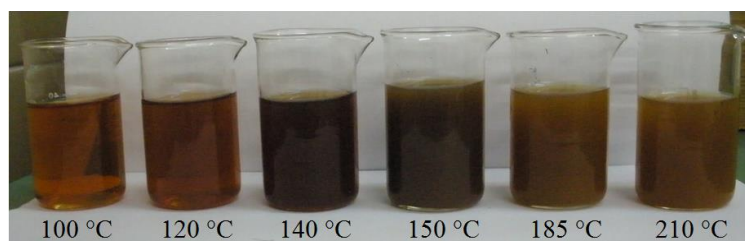
<i>t [°C]</i>	<i>Peteljke višnje</i>		<i>Peteljke trešnje</i>	
	<i>TPC<sup>a</sup> [mg EGK/g]</i>	<i>TFC<sup>b</sup> [mg ER/g]</i>	<i>TPC [mg EGK/g]</i>	<i>TFC [mg ER/g]</i>
100	357,72±4,56 <sup>c</sup>	59,59±1,58	464,41±2,34	65,67±0,57
120	417,69±3,17	64,08±0,42	495,19±2,56	79,30±2,57
140	427,90±1,99	70,12±0,81	504,57±2,24	79,94±5,90
150	465,72±7,26	76,85±0,56	511,62±4,53	81,84±1,64
185	445,01±1,36	71,57±2,83	489,73±8,66	79,06±1,84
210	438,53±1,64	70,76±1,35	438,59±2,09	63,13±1,58

<sup>a</sup> Sadržaj ukupnih fenola (EGK: Ekvivalent galne kiseline)

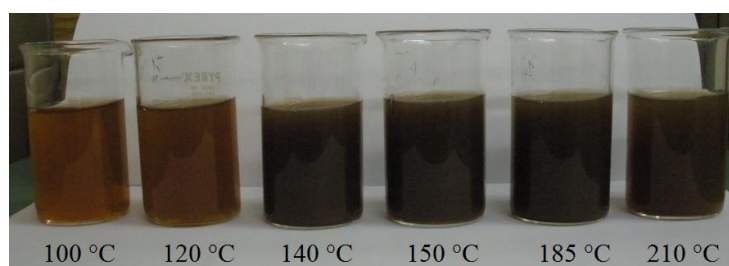
<sup>b</sup> Sadržaj ukupnih flavonoida (ER: Ekvivalent rutina)

<sup>c</sup> ±2SD

Prezentovani rezultati ukazuju da je temperatura od 150 °C najpodesnija za SWE fenola i flavonoida iz peteljki višnje i trešnje. Na 150 °C prinos je bio maksimalan, a degradacija još nije bila intenzivna. Na najvišoj ispitanoj temperaturi (210 °C) prinos fenola i flavonoida, redom, je bio za svega 6-15 i 8-23% niži u odnosu na optimalnu temperaturu, potvrđujući slabu do umerenu degradaciju fenolnih jedinjenja.



Slika 52. Boja ekstrakata peteljki višnje u zavisnosti od temperature ekstrakcije.



Slika 53. Boja ekstrakata peteljki trešnje u zavisnosti od temperature ekstrakcije.

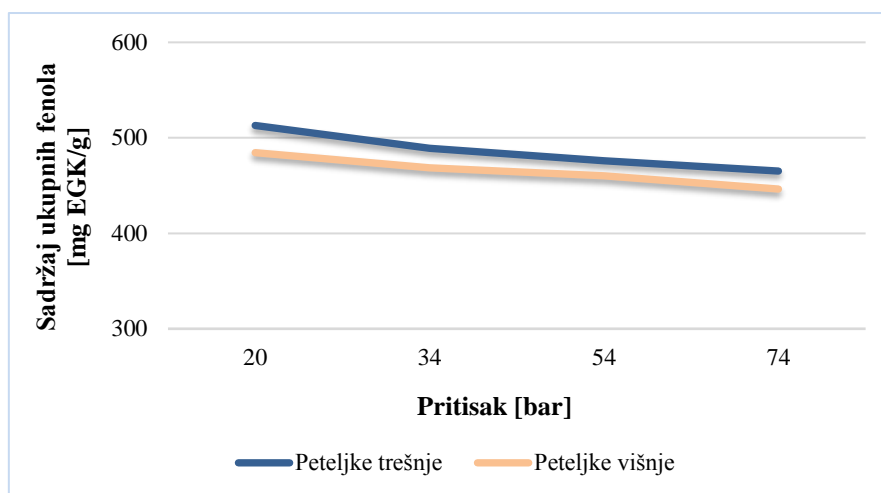
#### 4.1.3. Uticaj pritiska

Uopšteno se smatra da pritisak ekstrakcije, kao operativni parametar, nema značajan uticaj na ekstrakciju subkritičnom vodom jer tečnosti nisu kompresibilni fluidi. Solvatacione osobine rastvarača se ne menjaju značajno sa pritiskom (Rizvi, 2010; Osorio-Tobón i Meireles, 2013). U slučaju SWE, pritisak ima mali uticaj na dielektričnu konstantu i solvataciona svojstva vode. Dielektrična konstanta vode neznatno raste sa povećanjem pritiska, tako da visoki pritisci nisu preporučljivi za ekstrakciju nepolarnih jedinjenja (Švarc-Gajić, 2012). Osim toga, visoki pritisci teško se održavaju i zahtevaju ispunjavanje posebnih zahteva od strane opreme i svih pratećih elemenata. U slučaju ekstrakcije subkritičnom vodom pritisak se najčešće održava dovoljno visokim da vodu zadrži u tečnom agregatnom stanju na primenjenim temperaturama.

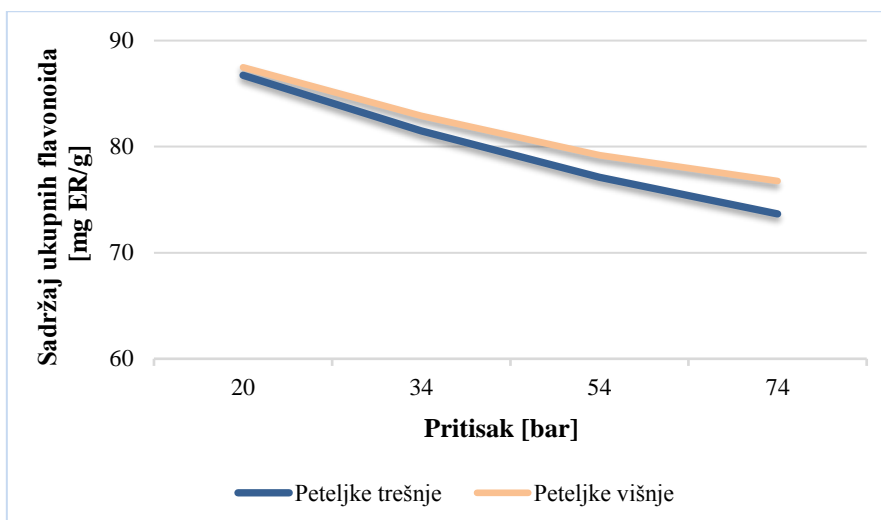
Da bi se odredio optimalni pritisak eksperimenti su izvedeni uz prethodno usvojen optimalni SSR (1:90) i temperaturu (150 °C). Vreme ekstrakcije (30 min) i brzina mešanja (1 Hz) bili su kao i u prethodnim eksperimentima. Ispitani su pritisci u opsegu od 20 do 74 bar. Dobijeni rezultati prikazani su na Slikama 54 i 55 kao srednje vrednosti tri ponavljanja ( $\pm 2SD$ ).

Najveći prinosi fenolnih komponenti (484,47 i 512,94 mg EGK/g, redom) u ekstraktima peteljki višnje i trešnje su dobijeni na pritisku od 20 bar. Sa povećanjem pritiska do 74 bar došlo je do pada koncentracije fenolnih jedinjenja za približno 38 mg EGK/g i 47 mg EGK/g za peteljke višnje i trešnje, redom, odnosno za 8 i 9%. Dobijeni rezultati ukazuju da za efikasnu ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz peteljki višnje i trešnje nisu potrebni visoki pritisci, što predstavlja tehnološku pogodnost. Pritisci iznad 20 bar uzrokovali su opadanje sadržaja flavonoidnih komponenti u ekstraktima, najverovatnije što su većina fenolnih jedinjenja iz uzoraka relativno polarna, tako da blagi porast polarnosti rastvarača sa porastom pritiska ne pogoduje ekstrakciji.

Pritisak od 20 bar je usvojen kao optimalan i primenjen je u svim daljim ispitivanjima.



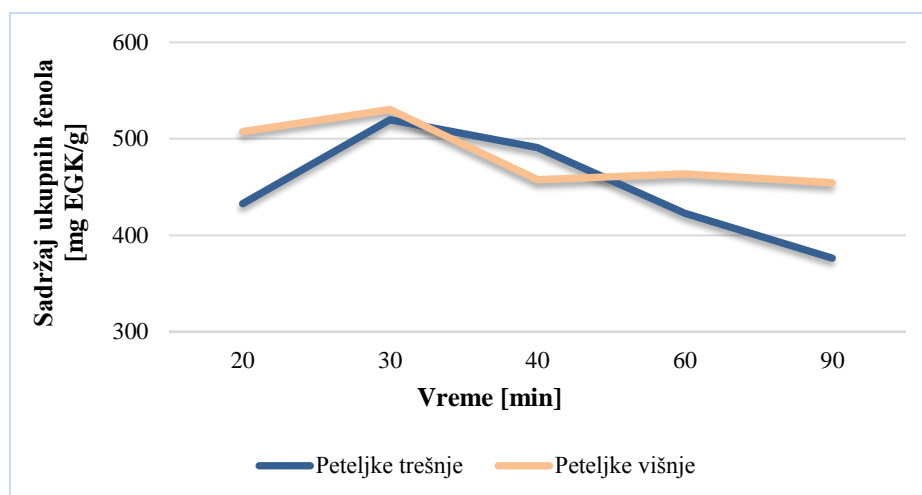
Slika 54. Uticaj pritiska na prinos ukupnih fenola.



Slika 55. Uticaj pritiska na prinos ukupnih flavonoida.

#### 4.1.4. Uticaj vremena ekstrakcije

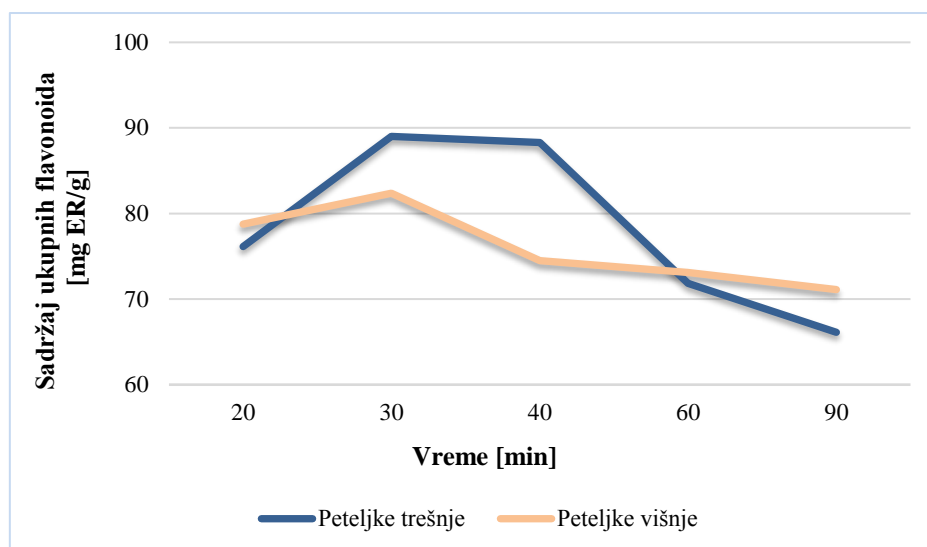
Definisanje optimalnog vremena ekstrakcije je važno s obzirom da duže vreme ekstrakcije može uzrokovati degradaciju jedinjenja. Uticaj vremena ekstrakcije na prinos fenolnih jedinjenja je ispitan u opsegu od 20 do 90 min uz primenu prethodno usvojenih eksperimentalnih uslova. Rezultati su prikazani na Slici 56.



Slika 56. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima peteljki.

Ekstrakcioni prinos fenolnih jedinjenja je rastao sa vremenom ekstrakcije do 30 min, kada je dolazilo do solvatacije lako dostupne frakcije fenolnih jedinjenja sa površine čvrstih čestica uzorka i najmanjeg otpora prenosu mase. Nakon ekstrakcije lako dostupne frakcije dolazilo je do rastvaranja teže frakcije koja se nalazila u porama čvrstog uzorka. Tokom ove ekstrakcione faze zapaža se pad brzine ekstrakcije. Najsporija ekstrakciona faza je odgovarala difuziji vezanih jedinjenja u porama čvrstog uzorka u matriks koji je ispunjavao pore čvrstog uzorka (Švarc-Gajić, 2012). Nakon 30 min ekstrakcionog procesa došlo je do pada prinosa fenola u ekstraktima peteljki, što je ukazalo na moguću degradaciju bioaktivnih komponenti. Maksimalni sadržaj fenola za peteljke višnje i trešnje je iznosio 530,37 i 519,70 mg EGK/g, redom (za 30 min), dok su minimalne koncentracije ukupnih fenola postignute pri vremenu ekstrakcije od 90 min, i iznosile su 463,60 i 376,27 mg EGK/g, redom. Isti trend je zapažen i u slučaju sadržaja ukupnih flavonoida za oba uzorka (Slika 57).

Na osnovu dobijenih rezultata, vreme ekstrakcije od 30 min je usvojeno kao optimalno. Relativno kratka vremena ekstrakcije, potvrđena prezentovanim rezultatima, kojim se postižu dobri prinosi ciljnih jedinjenja, predstavljaju još jednu prednost ekstrakcije subkritičnom vodom.



Slika 57. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima peteljki.

#### 4.1.5. Uticaj brzine mešanja

Konvektivni prenos mase poboljšava efikasnost ekstrakcije smanjenjem debljine difuzionog sloja i može se ostvariti protokom rastvarača, mešanjem ili vibracijom. U primenjenom ekstraktoru konvektivni prenos mase je bio obezbeđen vibracionim kretanjem platforme na kojoj je bila smeštena ekstrakciona posuda. Vibraciono kretanje ekstrakcione posude je osiguravalo efikasno mešanje i konvektivni prenos mase, a pored toga je i sprečavalo lokalno pregrevanje u kontaktu sa grejnom podlogom. Ispitivana brzina mešanja je bila u opsegu od 1 do 5 Hz. U ispitivanom opsegu sadržaj ukupnih fenola se kretao od 451,86 do 497,52 mg EGK/g (peteljke višnje) i od 449,31 do 509,32 mg EGK/g (peteljke trešnje). Prinos fenolnih i flavonoidnih jedinjenja se povećavao sa porastom brzine mešanja od 1 do 3 Hz. Veće brzine mešanja, za ovaj model ekstraktora, proizvodile su niže prinose. Maksimalni sadržaji ukupnih fenola za ekstrakte peteljki višnje i trešnje dobijeni su primenom brzine mešanja od 3 Hz i iznosili su 497,52 i 509,31 mg EGK/g, redom, dok su maksimalne koncentracije ukupnih flavonoida bile 84,66 i 85,08 mg ER/g, redom (za 3 Hz). Brzina mešanja od 3 Hz je usvojena kao optimalni operativni parametar za ekstrakciju subkritičnom vodom peteljki višnje i trešnje.

Definisane vrednosti operativnih parametara pri kojima su se ostvarivali maksimalni prinosi su podrazumevali: odnos droga:rastvarač 1:90, temperatura 150 °C, pritisak 20 bar, vreme ekstrakcije 30 min i brzinu mešanja 3 Hz.

## 4.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata

### 4.2.1. HPLC–PDA analiza

Visokoperformansna tečna hromatografija kombinovana sa različitim detektorima je najuniverzalnija metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenolnih jedinjenja. Ekstrakti peteljki višnje i trešnje, dobijeni pri optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom, analizirani su visokoperformansnim tečnim hromatografom sa detektorom sa nizom fotodioda. Ukupni sadržaj fenola izračunat spektrofotometrijskom metodom je bio veći od sume pojedinačnih fenolnih jedinjenja određenih visokoperformansnom tečnom hromatografijom, što se moglo objasniti neselektivnosti po Folin-Ciocalteu metode. Folin-Ciocalteu test daje pozitivnu reakciju i na ugljene hidrate, proteine, aminokiseline, vitamine, nezasićene masne kiseline, tiole, nukleotide, amine, aldehide i ketone (Everette i dr., 2010).

Prema rezultatima HPLC–PDA analize galna (3,4,5-hidroksibenzoeva) kiselina je bila dominantno fenolno jedinjenje u ekstraktima peteljki višnje (36,93 mg/l) i trešnje (85,39 mg/l). Dokumentovano je da galna kiselina ima potentnu antiherpesnu aktivnost i jako antivirusno delovanje prema virusu parainfluence tipa 3 (Özçelik i dr., 2011).

Pored galne i protokatehinska kiselina (3,4-hidroksibenzoeva kiselina) je u relativno visokoj koncentraciji bila zastupljena u oba ekstrakta (10,49 i 13,11 mg/l za peteljke višnje i trešnje, redom). U studiji Bursal i dr. (2013) ferulna kiselina je bila dominantna fenolna kiselina u vodenim i etanolnim ekstraktima peteljki trešnje. Ovakva različitost može biti povezana s brojnim faktorima, kao što su genetski faktori i faktori životne sredine, stepen zrelosti, sorta i dr. (Melicháčová i dr., 2010), kao i sa primenjenom ekstrakcionom tehnikom i rastvaračem. U ispitivanim uzorcima peteljki višnje i trešnje je bilo utvrđeno prisustvo vanilinske i siringinske kiseline (derivati benzoeve kiseline), međutim njihova količina nije mogla biti pouzdano kvantifikovana primenjenom metodom.

Kada su u pitanju derivati cimetine kiseline, hlorogenska i kafena kiselina su detektovane samo u ekstraktu peteljke trešnje. Njihov sadržaj u ispitivanom ekstraktu je iznosio 4,66 i 2,54 mg/l, redom. Kafena kiselina se odlikuje spektrom farmakoloških delovanja, uključujući antiinflamatorno, antioksidativno i imunomodulirajuće delovanje (Zhou i dr., 2014). Farmakološke studije su, takođe pokazale da ova kiselina ispoljava zaštitno delovanje prema vodonik peroksidom-indukovanim oksidativnim oštećenjem u mozgu, cerebralnoj ishemiji. Nadalje, da sprečava biohemijske promene i promene u ponašanju uzrokovane aluminijumom

(Anwar i dr., 2012). Anwar i dr. (2012) su *in vitro* i *in vivo* testovima potvrdili da kafena kiselina menja aktivnost acetilholinesteraze, i poboljšava memoriju.

Sinapinska kiselina nije detektovana u ispitivanim uzorcima peteljki višnje i trešnje, dobijenim na 150 °C i 20 bar. Pretpostavlja se da bi primena nižih temperatura i viših pritisaka doprinela ekstrakciji ove kiseline. U istraživanju Cvetanović i dr. (2018a) maksimalni prinos sinapinske kiseline u ekstraktu kamilice dobijenom subkritičnom vodom je postignut na temperaturi i pritisku od 100 °C i 45 bar, redom. Pomenuta kiselina je detektovana i u ekstraktu *Lavatera thuringiaca* dobijenom subkritičnom vodom na 140 °C i 40 bar (Mašković i dr., 2018).

Kada su u pitanju flavonoidi i njihovi glikozidi, samo je u ekstraktu peteljke trešnje detektovan naringin (naringenin-7-*O*-neohesperidozid). Njegov sadržaj u ispitivanom ekstraktu je iznosio 0,86 mg/l. Ovaj flavanon-7-*O*-glikozid je dominantan flavonoid *Citrus* vrsta i glavni je uzročnik gorčine *Citrus* voća (Bacanli i dr., 2015). Naringin se odlikuje antiinflamatornim, antioksidativnim, antiulceroznim, antimutagenim i antikancerogenim delovanjem (Das i dr., 2018; Maatouk i dr., 2018). Rutin (kvercetin-3-*O*-rutinozid) je bio detektovan u oba ispitivana ekstrakta, ali njegova količina nije mogla biti pouzdano određena primenjenom metodom. S obzirom da šećerne komponente u molekulima glikozida povećavaju polarnost molekula, glikozidi se bolje ekstrahuju na nižoj temperaturi subkritične vode (Cvetanović, 2016). Polarnost subkritične vode na 115 °C se pokazala odgovarajućom za ekstrakciju rutina iz kamilice (Cvetanović i dr., 2019).

U ekstraktima obe vrste peteljki su identifikovani naringenin i katehin na pragu granice detekcije. Za ekstrakciju naringenina su verovatno podesnije više ekstrakcione temperature, i to temperature oko 170 °C (Cvetanović i dr., 2018b), dok su za ekstrakciju katehina verovatno pogodnije niže temperature. Katehin je detektovan samo u ekstraktu kamilice dobijenom na temperaturi subkritične vode od 130 °C (Cvetanović i dr., 2019).

U ekstraktima peteljki višnje i trešnje dobijenim subkritičnom vodom nije detektovan kvercetin. Kvercetin je detektovan u ekstraktu kamilice dobijenom subkritičnom vodom primenom 0,05 M HCl kao modifikatora (Cvetanović, 2016). Prema Cvetanović, dodatak kiseline je doprineo hidrolizi aglikona, i modifikovali su se polarnost rastvarača i matriks uzorka.

#### 4.2.2. GC–MS analiza

Za definisanje detaljnijeg hemijskog profila ekstrakata peteljki višnje i trešnje primenjena je i gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom, uz prethodnu derivatizaciju. Analiza je omogućila identifikaciju organskih jedinjenja različitih hemijskih klasa (Tabela 24). U vodenim ekstraktima su identifikovana jedinjenja različite polarnosti, čime je potvrđena sposobnost subkritične vode, kao ekstragensa, da ekstrahuje različite klase jedinjenja (Švarc-Gajić i dr., 2018a).

Polioli detektovani u ekstraktima (Tabela 24) su verovatno nastali usled hidrotermalne degradacije celuloze (Serra i dr., 2010). Celuloza i drugi biljni polisaharidi se sa povišenim temperaturama konvertuju u šećere, čak i bez upotrebe katalizatora, što je i potvrđeno u ovoj disertaciji. U ekstraktima su, pored drugih alkohola, detektovani sorbitol i glicerol. Interesantna je mogućnost dobijanja sorbitola iz biomase s obzirom da se ovaj alkohol u velikoj meri koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji kao dijetetski zaslađivač, humektant i zgušnjivač. Glicerol visoke čistoće se koristi, takođe, u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, ali sam postupak njegovog prečišćavanja je skup i nije potpuno efikasan (Bartocci i dr., 2018). Poznato je da je glicerol sporedni produkt u proizvodnji biodizela. Na svakih 10 litara biodizela dobije se oko 1 litar sirovog glicerola (Johnson i Taconi, 2007). Sirovi glicerol sadrži dosta nečistoća (metanol, soli, dugolančane masne kiseline i dr.), i ukoliko se ne tretira i odlaže na odgovarajući način, može biti štetan po životnu sredinu i zdravlje ljudi (Yang i dr., 2018b).

U ekstraktima peteljki višnje i trešnje detektovane su takođe zasićene i nezasićene masne kiseline srednjih i dugih lanaca. U ekstraktu peteljke trešnje detektovana je samo heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina). U ekstraktu peteljke višnje identifikovana je 3-metil-5-keto-3-heksenoinjska kiselina, izvedena iz heksenoinjske kiseline. U istom ekstraktu detektovana je i nonanska (pelargonska) kiselina. Nonanska kiselina se koristi u proizvodnji lubrikanata, kozmetičkih proizvoda i fluida koji se upotrebljavaju u obradi metala. U većini primena ova kiselina se koristi u obliku derivata, kao što su mono-, di- ili poliolestri (Noureddini i Rempe, 1996). U ekstraktu peteljke višnje detektovana je i oktadekanoinska (stearinska) kiselina. Pomenuta dugolančana masna kiselina se koristi u proizvodnji sapuna, boja i kozmetičkih proizvoda. U farmaciji se upotrebljava u izradi masti, supozitorija, enteričnih obloga za tablete (Calvo i Cepeda, 2008).



Tabela 24. GC–MS profil ekstrakata peteljki višnje i trešnje.

<i>Peteljke višnje</i>		<i>Peteljke trešnje</i>	
<i>Karakteristični joni</i>	<i>Jedinjenje</i>	<i>Karakteristični joni</i>	<i>Jedinjenje</i>
<b><i>Alkoholi</i></b> 217, 147 297, 147 147, 205 319, 205	Arabitol Etilen glikol, 3-hidroksi-4-metoksifenil Glicerol Sorbitol	<b><i>Alkoholi</i></b> 217, 147 147, 205 319, 205	Arabitol Glicerol Sorbitol
<b><i>Masne kiseline</i></b> 313, 117 271, 147 215, 117 117, 341	Heksadekanska kiselina 3-Heksenoinska kiselina, 3- metil-5-keto Nonanska kiselina Oktadekanoinska kiselina	<b><i>Masne kiseline</i></b> 313, 117	Heksadekanska kiselina
<b><i>Organske kiseline</i></b> 147, 188 179, 105, 135 147, 233 147, 245  125, 169, 95 147, 217 147, 233 117, 147 147, 72, 219	Acetatna kiselina Benzoeva kiselina Butanoična kiselina 2-Butendionska kiselina  2-Furankarboksilna kiselina Gulonska kiselina Malična kiselina Propanska kiselina Propanska kiselina, 3- hidroksi	<b><i>Organske kiseline</i></b> 147, 188 179, 105, 135 147, 233 147, 245 183, 273  125, 169, 95 147, 217 147, 233 117, 147  240, 166	Acetatna kiselina Benzoeva kiselina Butanoična kiselina 2-Butendionska kiselina Butenoična kiselina, 2- izopropil-3-hidroksi 2-Furankarboksilna kiselina Gulonska kiselina Malična kiselina Propanska kiselina  Pirol-2-karboksilna kiselina
<b><i>Šećeri</i></b> 217, 147 217, 147 191, 147 217, 129  103, 147	Arabinoza D-fruktoza D-galaktoza D-glukoza  Ksiluloza	<b><i>Šećeri</i></b> 217, 147 217, 147  217, 129 204, 147 103, 147	Arabinoza D-fruktoza  D-glukoza Manoza Ksiluloza

Tabela 24. (nastavak)

129, 103	D-riboza	129, 103	D-riboza
204, 147	D-ksiloza	204, 147	D-ksiloza
<b><i>Ostala organska jedinjenja</i></b>		<b><i>Ostala organska jedinjenja</i></b>	
		103, 217	Dihidroksiacetone dimer
		87, 177	Ditian, t-tutil [1,3]
		179, 268	<i>m</i> -Gvajakol (3-metoksifenol)
		239, 254	Hidroksihinol (1,3-dihidrofeno)
152, 167	Piridin		
411, 43, 245	Lanost-8-en-3-on		

Organske kiseline su uobičajeni konstituenti biljnih i animalnih tkiva. U ekstraktima peteljki višnje i trešnje su identifikovane brojne organske kiseline. Pirol-2-karboksilna kiselina i 2-izopropil-3-hidroksi butenoična kiselina su detektovane samo u ekstraktu peteljke trešnje. Pirol-2-karboksilna kiselina verovatno je formirana Maillard-ovom reakcijom. Derivati pirol-2-karboksilne kiseline ispoljavaju antiviralnu aktivnost, posebno prema klasičnom ptičijem virusu influence, dok se natrijumove soli 5-arilpirol-2-karboksilne kiseline odlikuju antikonvulzivnom aktivnošću (Khusnutdinov i dr., 2010).

U oba ekstrakta peteljki identifikovana je 2-furankarboksilna ili 2-furoinska kiselina. Kiselina je poznata po baktericidnom i fungicidnom delovanju, a karakteriše je slatkasti, uljast, biljni i zemljani miris. Acetatna (sirćetna) i propanska kiseline su takođe detektovane u ekstraktima. Sirćetna kiselina, pored brojnih primena, koristi se i u konzerviranju hrane, proizvodnji adheziva visokih tačaka topljenja i lateks boja (Moulik i dr., 2016; Wang i dr., 2017c). Propanska kiselina snižava sadržaj masnih kiselina u jetri i plazmi, ispoljava imunosupresivno delovanje i povećava osetljivost tkiva na insulin (Al-Lahham i dr., 2010). Osim toga, propanska kiselina prolazi krvno-moždanu barijeru uzrokujući umerenu, reverzibilnu unutarćelijsku acidifikaciju koja može uticati na oslobađanje neurotransmitera, uključujući glutamat, dopamin i serotonin (Al-Dbass, 2010).

U ekstraktima su detektovani različiti monomerni šećeri, što ukazuje na snažnu hidrolizu biljnih polisaharida pri datim uslovima ekstrakcije. U oba ekstrakta peteljki je detektovana arabinoza. Ona nalazi primenu kao niskokalorijski zaslađivač, intermedijer u sintezi različitih lekova, a koristi se i u proizvodnji vitamina B2 (Bravo i dr., 2017b). Ekstrakt peteljke višnje sadržao je i D-ribozu. D-riboza je petougljenični šećer koji se koristi za hemijsku sintezu

vitamina B2, pojačivača mirisa, antiviralnih agenasa kao i u lečenju miokardijalne ishemije i za poboljšanje srčanog rada (Park i dr., 2017). Manozna (detektovana samo u ekstraktu peteljke trešnje) ima bitnu ulogu u ljudskom metabolizmu, posebno u glikolizaciji određenih proteina, a veruje se i da ovaj šećer pomaže kod infekcija urinarnog trakta (Kranjčec i dr., 2014).

U ekstraktima peteljki detektovana su jedinjenja fenolne strukture, *m*-gvajakol i hidroksihinol. Ona su verovatno nastala hidrolizom polifenolnih konstituenata, na primer, lignina. Gvajakol se odlikuje antimikrobnim, antiinflamatornim i antinociceptivnim delovanjem (Wu i dr., 2014).

#### 4.2.3. DLLME GC–MS analiza

##### 4.2.3.1. DLLME postupak

Na efikasnost disperzivne tečno-tečne mikroekstrakcije utiče više faktora, a među najznačajnijima su vrsta i zapremina ekstrakcionog i disperznog rastvarača, vreme i temperatura ekstrakcije, vrednost pH, vrsta soli i koncentracija. Da bi se postigao dobar faktor obogaćivanja (eng. *Enrichment Factor*, EF) za ciljna jedinjenja, dobra selektivnost prema analitima, a slaba ka interferirajućim konstituentima matriksa, neophodno je da glavni parametri ove mikroekstrakcione tehnike budu optimizovani (Švarc-Gajić i dr., 2018b).

##### 4.2.3.1.1. Odabir ekstrakcionog sredstva

Ekstrakt peteljke višnje korišćen je kao model sistem za optimizaciju efikasnosti DLLME protokola. U testovima je korišćen aceton kao disperzioni rastvarač s ciljem selekcije optimalnog ekstrakcionog sredstva. Testirana su tri hlorovana rastvarača i to dihlormetan, trihloretilen i ugljen-tetrahlorid. Ostali uslovi u DLLME protokolu (zapremina rastvarača, vreme mešanja, sadržaj soli) su bili isti. Broj identifikovanih jedinjenja se razlikovao u zavisnosti od upotrebljenog ekstrakcionog sredstva (Tabela 25).

Najviše jedinjenja je identifikovano kada je korišćen ugljen-tetrahlorid kao ekstrakciono sredstvo. U ekstraktima su detektovane aromatične organske kiseline, derivati fenola, aldehidi, masne kiseline, derivati azulena i drugi složeni organski molekuli. Sa porastom broja atoma hlora u ekstrakcionom sredstvu kompleksnost analiziranih ekstrakata je rasla, što se moglo povezati sa opadanjem njihove polarnosti sa brojem atoma hlora i činjenicom da je njihova rastvorljivost u vodi opadala sa brojem supstitucienata (Stroo i Ward, 2010).

Moglo se pretpostaviti da je manja rastvorljivost ugljen-tetrahlorida u vodi (805 mg/l, 20 °C) u poređenju sa dihlormetanom (2000 mg/l, 20 °C) i trihloretilenom (1070 mg/l, 20 °C) (WHO, 2003; Dobaradran i dr., 2010; Xu i dr., 2015b) doprinela efikasnijoj raspodeli analita u organski rastvarač. Hlorovani organski rastvarači su se pokazali kao vrlo efikasni u izolovanju različitih hemijskih klasa iz vodenih uzoraka, što je bilo u saglasnosti sa literaturnim navodima (González i dr., 2015).

U ekstraktu koji je dobijen sa dihlormetanom kao ekstrakcionim sredstvom identifikovan je najmanji broj hemijskih jedinjenja. Međutim, samo u ovom ekstraktu su identifikovana dva biološki aktivna organska jedinjenja: retinoinska kiselina i biogeni aromatični monoamin tiramin. Retinoinska kiselina, aktivni metabolit vitamina A (retinol), ima značajnu ulogu u razvoju nervnog sistema i regulisanju sinaptičke plastičnosti (de Hoog i dr., 2018), a primenjuje se u lečenju Cushing-ove bolesti (Sesta i dr., 2016). Tiramin nastaje dekarboksilacijom tirozina bakterijama. On može da se akumulira u brojnim namirnicama, naročito fermentisanim, kao što su sir, soja sos i riblji sos (Jiang i dr., 2018). Konzumiranje hrane sa povišenim sadržajem tiramina može uzrokovati migrenu, hipertenziju, neurološka i respiratorna oboljenja (Jiang i dr., 2018).

S obzrom da je najviše jedinjenja identifikovano kada je korišćen ugljen-tetrahlorid kao ekstrakciono sredstvo, ovaj rastvarač je primenjen za dalju optimizaciju DLLME postupka.

Tabela 25. Identifikovana jedinjenja u ekstraktima peteljki višnje u zavisnosti od DLLME ekstrakcionog sredstva.

<i>Ekstrakciono sredstvo</i>						
<i>Karakteristični joni</i>	<i>Dihlormetan Jedinjenje</i>	<i>Ver.*</i>	<i>Trihloretilen Jedinjenje</i>	<i>Ver.</i>	<i>Tetrahlormetan Jedinjenje</i>	<i>Ver.</i>
75, 173, 117					Acetofenon	37,8%
105, 77, 120					Acetofenon, 2,5-dihidroksi	76,4%
207, 147	Benzoeva kiselina	79,2%	Benzaldehid, 3,4,5-trihidroksi	91,9%		
125, 169, 95			Acetofenon, 2,5-dihidroksi	66,2%		
75, 151, 167	Benzoeva kiselina, 4-metoksi-propil estar	83,2%	Benzaldehid, 2-hidroksi-4-metoksi	91,8%	Benzoeva kiselina	91,9%
165, 91, 135			Benzaldehid, 4-hidroksi	89,4%		
163, 41, 205					Acetofenon, 2',6'-dihidroksi	74,0%
293, 219	Fenol, 2-izobutil, 6-izopropil	45,8%			Azulen, 5H-ciklopropa [3,4]benz[1,2-e]5-1, 9,9a-bis(acetiloksi)-3-[(acetiloksi)metil]-2-hloro-)	65,8%
179, 105, 135	Benzaldehid, 3-hidroksi-4-metoksi	27,5%	Benzoeva kiselina	91,2%	Benzoeva kiselina, 2,4-dihidroksi	40,7%
41, 55					Benzaldehid, 4-hidroksi	73,8%
179, 151	Glicerol, 1-monolinoleoil	10,9%	Benzoeva kiselina, 2,5-dihidroksi	87,8%	Benzenacetatna kiselina, 3-hidroksi	48,6
209, 310					Benzaldehid, 3,4-dihidroksi	75,4%
180, 45	Fenol, 2-hidroksi	47,9%				
299, 133			Benzoeva kiselina, 3-hidroksi	91,8%		
281, 147					Benzaldehid, 2-hidroksi-4-metoksi	60,2%
183, 105	Fenol, 3-hidroksi	33,0%				
224, 45					Benzaldehid, 3,5-dimetoksi-4-hidroksi	65,5%
193, 43	Retinoična kiselina, 13- <i>cis</i>	43,3%				
299, 329, 61			Benzoeva kiselina, 3,4-dihidroksi	60,0%		
194, 137	Tiramin	30,0%				

Tabela 25. (nastavak)

<i>Ekstrakciono sredstvo</i>						
<i>Karakteristični joni</i>	<i>Dihlormetan</i>		<i>Trihloretilen</i>		<i>Tetrahlormetan</i>	
	<i>Jedinjenje</i>	<i>Ver.</i>	<i>Jedinjenje</i>	<i>Ver.</i>	<i>Jedinjenje</i>	<i>Ver.</i>
193, 165, 72			Benzoeva kiselina, 3-metoksi-4-hidroksi	60,2%		
166, 181, 151					Benzoeva kiselina, 3-hidroksi	86,2%
209, 166, 191			Benzil alkohol	75,7%	Benzil alkohol	79,1%
159, 103					Benzoeva kiselina, 4-hidroksi	88,6%
263, 278			Cinamaldehyd, 3,5-dimetoksi-4-hidroksi	89,9%		
355, 267			Cimetna kiselina	53,3%		
192, 149, 91					Benzoeva kiselina, 2,5-dihidroksi	42,3%
281, 133			2-Furan-karboksilna kiselina	12,8%	2-Propenska kiselina, 3-fenil	38,1%
179, 151, 173					Benzoeva kiselina, 3,4-dihidroksi	35,7%
207, 297			Glicerol, 1-monolinoleoil	13,5%		
327, 45					Benzoeva kiselina, 3,5-dimetoksi-4-hidroksi	40,8%
297, 267			9,12,15-Oktadekatrienska kiselina	20,5%	Fenol, 2-metoksi	80,1%
215, 117					Benzoeva kiselina, 3-metoksi-4-hidroksi	56,9%
193, 370			Fenol, 2-hidroksi	53,2%	Propionska kiselina, 2-hidroksifenil, 3-	40,1%
268, 45					Benzenpropanonska kiselina, 3-metoksi-4-hidroksi	61,4%
222, 280			Fosforna kiselina	27,9%		
239, 112					Benzohinon, 2,5-di-tert-butil-1,4	75,2%
147, 220			Trineksapak-etil	21,3%		
206, 236					Katehol, 4-metil	96,0%
194, 163					Cinamaldehyd, 3,5-dimetoksi-4-hidroksi	54,8%
267, 193					2-Furankarboksilna kiselina	81,2%
139, 109, 183					Furan-2-karboksilna kiselina, 3-metil	70,5%
267, 126					Glicerol, 1-monolinoleoil	71,5%
267, 193, 283					Izokaprionska kiselina, 2-hidroksi	50,2%

Tabela 25. (nastavak)

<b>Ekstrakciono sredstvo</b>						
<b>Karakteristični joni</b>	<b>Dihlormetan</b>		<b>Trihloretilen</b>		<b>Tetrahlormetan</b>	
	<b>Jedinjenje</b>	<b>Ver.</b>	<b>Jedinjenje</b>	<b>Ver.</b>	<b>Jedinjenje</b>	<b>Ver.</b>
267, 223, 193					Heksanska kiselina	51,4%
164, 147, 296					Nonanska kiselina	40,3%
355, 45					9,12,15-Oktadekatrienska kiselina	56,8%
299, 283					Fosforna kiselina	50,2%
147, 192					Fosfonat, 4-hlorofenil	61,5%
207, 223					Fenol, 4-hidroksi	70,4%
370, 147					Spirost-8-en-11-on, 3-hidroksi	52,7%
220, 250					Trineksapak-etil	43,0%

\*Ver. – Verovatnoća

#### 4.2.3.1.2. Odabir disperznog sredstva

Kvalitativan sastav ekstrakta koji je dobijen korišćenjem ugljen-tetrahlorida kao ekstrakcionog sredstva i acetona kao disperznog sredstva upoređen je sa sastavom ekstrakta koji je dobijen kada je kao disperzno sredstvo upotrebljen acetonitril. Svi ostali eksperimentalni uslovi (zapremine rastvarača, vreme ekstrakcije, itd.) su bili isti kao i prilikom odabira optimalnog ekstrakcionog sredstva. Sastav oba ekstrakta bio je sličan, sa izuzetkom derivata benzohinona, benzil alkohola i 4-metil-katehola, koji su identifikovani samo u ekstraktima kada je korišćen aceton kao disperzno sredstvo, odnosno 2-etil heksanonske kiseline koja je identifikovana samo u ekstraktu dobijenom uz primenu acetonitrila kao disperznog sredstva. Za dalje ispitivanje ekstrakata peteljki višnje i trešnje odabran je aceton kao optimalno disperzno sredstvo.

#### 4.2.3.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata peteljki višnje i trešnje primenom DLLME GC-MS

Ekstrakti peteljki višnje i trešnje dobijeni subkritičnom vodom su analizirani gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom nakon primene optimizovanog protokola za DLLME, kako bi se utvrdile razlike u njihovom hemijskom sastavu (Tabela 26). BSTFA je korišćen za *in situ* derivatizaciju, omogućavajući simultanu derivatizaciju i DLLME. Iako je ovaj reagens sililacije prilično nestabilan u vodenim rastvorima, zbog brzine sililacije i mikroekstrakcije mogao se koristiti u analizi.

S obzirom da je biljni materijal sakupljen sa istog geografskog područja, iste godine i sezone, analiza je odražavala razlike u hemijskom sastavu *Prunus cerasus* i *Prunus avium* vrsta. Oba ekstrakta peteljki su se odlikovala prisustvom bioaktivnih fenolnih jedinjenja, aldehida i degradacionih produkata lignina. Detektovano je i nekoliko masnih kiselina, uključujući kapronsku i  $\alpha$ -linoleinsku.

Samo u ekstraktu peteljke trešnje detektovana je *p*-anisinska kiselina. Ova metoksibenzoeva kiselina je i sastojak ulja anisa (*Oleum anisi*), a odlikuje se antiseptičkim i vermifugnim svojstvima (Saha i dr., 2013). Piceol ili 4-hidroksiacetofenon identifikovan je u peteljka trešnje, ne i višnje. Inače, jedinjenje je detektovano i u *Saccocalyx satureioides* (Mohamadi i dr., 2015) i *Crinum buphanoides* (Masi i dr., 2018). Samo u ekstraktu peteljke trešnje identifikovani su metilsulfonil, 6-formilgvajakol i *n*-pentadekanska kiselina.

U ekstraktima peteljki višnje i trešnje detektovan je acetofenon (acetilbenzen, hipnon). On se odlikuje slatkastim ostrim mirisom, a koristi se u proizvodnji parfema, kao aditiv za maskiranje mirisa boja, za sintezu suzavca, kao rastvarač i kao intermedijer u proizvodnji smola i lekova (kapi za nos) (Sanders i dr., 1953).

Siringaldehid (fenolni aldehid) i *p*-hidroksi-anisaldehyd (aromatični aldehid), detektovani u ekstraktima obe vrste peteljki su najverovatnije nastali tokom reakcija dekompozicije u subkritičnoj vodi. Vanilin i siringaldehid su degradacioni produkti lignina koji mogu nastati u subkritičnoj vodi (Wahyudiono i dr., 2013). Siringaldehid se odlikuje antimikrobnim, antifungalnim i antiparazitskim svojstvima (Yancheva i dr., 2016), a dokumentovano je i njegovo neuroprotektivno delovanje (Bozkurt i dr., 2014) kao i antihiperглиkemijsko dejstvo kod streptozotocinom-indukovanog dijabetesa kod pacova (Huang i dr., 2012). U ekstraktima obe vrste peteljki detektovane su benzoeva i protokatehinska kiseline. Nadalje, brojni derivati benzoeve kiseline su identifikovani u ekstraktima i to vanilinska, siringinska, gentisinska i  $\beta$ -rezorcilna kiselina, kao i *m*- i *p*-salicilna kiselina. Ova jedinjenja su poznata po svojim antioksidativnim, antiinflamatornim i drugim zdravstveno povoljnim svojstvima. Siringinska kiselina se odlikuje brojnim farmakološkim svojstvima, kao što su antihiperглиkemijsko, antiangiogeno, antiglikaciono, neuroprotektivno, antiproliferativno, antiendotoksično i kardioprotektivno (Rasheeda i dr., 2018). Identifikovana je u zrnima žitarica, listovima *Alpinia calcarata* Roscoe, u *Lentinula edodes* (šitake), *Herba dendrobii*, *Radix Isatidis* (Shi i dr., 2016) i listovima vrsta *Kalanchoë* (Bogucka-Kocka i dr., 2018). Vanilinska kiselina je fenolni derivat jestivih biljaka i voća koja se odlikuje antifilarialnim, antimikrobnim, hemopreventivnim, hepatoprotektivnim i kardioprotektivnim delovanjem (Kumar i dr., 2012). Velike količine



vanilinske kiseline su nađene u korenu biljke *Angelica sinensis* (Kineska anđelika) (Kumar i dr., 2011).

U ekstraktima peteljki detektovani su i katehol, gvajakol i cimetna kiselina. Cimetna kiselina se odlikuje brojnim farmakološkim/biološkim svojstvima uključujući antioksidativnu, hepatoprotektivnu, antidijabetsku, antifungalnu i antiinflamatornu aktivnost (Zhang i dr., 2013; Novak i dr., 2018). Ova kiselina je nađena u pojedinom voću i brojnim začinima. Katehol je polifenolno jedinjenje koje se nalazi u povrću, voću, čajevima, gajenom duvanu i nekim tradicionalnim kineskim prirodnim lekovitim sredstvima. Ovo jedinjenje je izolovano iz bukovog drveta i *Mimosa catechu* (Zhu i dr., 2018).

Melilotna kiselina je identifikovana u ekstraktima peteljki višnje i trešnje. Jedinjenje je takođe detektovano u trešnjinim listovima inficiranim gljivicom *Taphrina wiesneri* (Fujii i dr., 1971) i u cvetovima biljke *Melilotus officinalis* (kokotac) (Martino i dr., 2006). Melilotna kiselina je najverovatnije degradacioni produkt kumarina (Bocks, 1967).

Oba ekstrakta peteljki sadržala su benzil alkohol, jedinjenje prijatnog aromatičnog mirisa. Ovaj monoaromatični alkohol se koristi u 322 kozmetičke formulacije koje su svrstane u 43 kategorije proizvoda (Pugh i dr., 2015), i jedan je od češćih kontaktnih alergena (Saiyasombati i Kasting, 2003). Benzil alkohol se odlikuje bakteriostatskim delovanjem čak i pri niskim koncentracijama (Pugh i dr., 2015).

Formiranje derivata furana očekivano je prilikom termičkog tretmana organskih materija. Tretman peteljki višnje i trešnje subkritičnom vodom produkovao je dve furankarboksilne kiseline i to: 2-furoinsku i 3-metil-2-furoinsku kiselinu. Drugonavedena kiselina detektovana je nedavno u zelenoj ljusci badema (Meshkini, 2018). Detektovana 2-furoinska kiselina ima baktericidno delovanje (Dodd i dr., 1944) i potencijal da efikasno snižava holesterol i trigliceride kod pacova (Hall i dr., 1993).

Derivat azulena detektovan je u ekstraktima obe vrste peteljki. U ranijim studijama derivati azulena su demonstrirali antiinflamatornu, antibakterijsku, antiulcernu, antikancerogenu i antiretroviralnu aktivnost (Peet i dr., 2016).

Tabela 26. Identifikovana jedinjenja u ekstraktima peteljki višnje i trešnje.

<b>Karakteristični joni</b>	<b>Peteljke višnje</b>	<b>Peteljke trešnje</b>	<b>Verovatnoća</b>
75, 173, 117	Acetofenon	Acetofenon	22,1%
193, 89		Acetofenon, 4-hidroksi ( <i>piceol</i> )	20,0%
293, 219	Azulen, 5H-ciklopropa[3,4]benz[1,2-e]5-1,9,9a-bis(acetiloksi)-3-[(acetiloksi)metil]-2-hloro-	Azulen, 5H-ciklopropa[3,4]benz[1,2-e]5-1,9,9a-bis(acetiloksi)-3-[(acetiloksi)metil]-2-hloro-	76,0%
41, 55	Benzaldehid, 4-hidroksi	Benzaldehid, 4-hidroksi	71,7%
206, 236		Benzaldehid, 2-metoksi-3-hidroksi ( <i>6-formilgvajakol</i> )	84,9%
281, 147	Benzaldehid, 2-hidroksi-4-metoksi ( <i>p-anisaldehyd</i> , 2-hidroksi)	Benzaldehid, 4-metoksi-2-hidroksi ( <i>p-anisaldehyd</i> , 2-hidroksi)	92,3%
224, 45	Benzaldehid, 3,5-dimetoksi-4-hidroksi ( <i>siringaldehyd</i> )	Benzaldehid, 3,5-dimetoksi-4-hidroksi ( <i>siringaldehyd</i> )	70,8%
75, 151, 167	Benzoeva kiselina	Benzoeva kiselina	90,1%
135, 209, 165		Benzoeva kiselina, 4-metoksi ( <i>p-anisinska kiselina</i> )	97,1%
166, 181, 151	Benzoeva kiselina, 3-hidroksi ( <i>m-salicilna kiselina</i> )	Benzoeva kiselina, 3-hidroksi ( <i>m-salicilna kiselina</i> )	55,6%
159, 103	Benzoeva kiselina, 4-hidroksi ( <i>p-salicilna kiselina</i> )	Benzoeva kiselina, 4-hidroksi ( <i>p-salicilna kiselina</i> )	77,1%
192, 149, 91	Benzoeva kiselina, 2,5-dihidroksi ( <i>gentisinska kiselina</i> )	Benzoeva kiselina, 2,5-dihidroksi ( <i>gentisinska kiselina</i> )	45,6%
179, 151, 173	Benzoeva kiselina, 3,4-dihidroksi ( <i>protokatehinska kiselina</i> )	Benzoeva kiselina, 3,4-dihidroksi ( <i>protokatehinska kiselina</i> )	41,6%
327, 45	Benzoeva kiselina, 3,5-dimetoksi-4-hidroksi ( <i>siringinska kiselina</i> )	Benzoeva kiselina, 3,5-dimetoksi-4-hidroksi ( <i>siringinska kiselina</i> )	55,6%
215, 117	Benzoeva kiselina, 3-metoksi-4-hidroksi ( <i>vanilinska kiselina</i> )	Benzoeva kiselina, 3-metoksi-4-hidroksi ( <i>vanilinska kiselina</i> )	67,5%
225, 315		Benzoeva kiselina, 3-etil-2-metoksi-4- ( <i>metilsulfonil</i> )	86,1%
239, 112	Benzohinon, 2,5-di- <i>tert</i> -butil-1,4	Benzohinon, 2,5-di- <i>tert</i> -butil-1,4	78,0%
209, 166, 191	Cinamaldehyd, 4-hidroksi-3-metoksi ( <i>konferil aldehyd</i> )	Cinamaldehyd, 4-hidroksi-3-metoksi ( <i>konferil aldehyd</i> )	84,3%
194, 163	Cinamaldehyd, 3,5-dimetoksi-4-hidroksi ( <i>sinapaldehyd</i> )	Cinamaldehyd, 3,5-dimetoksi-4-hidroksi ( <i>sinapaldehyd</i> )	51,2%
267, 193	2-Furankarboksilna kiselina ( <i>2-furoinska kiselina</i> )	2-Furankarboksilna kiselina ( <i>2-furoinska kiselina</i> )	66,8%

Tabela 26. (nastavak)

<b>Karakteristični joni</b>	<b>Peteljke višnje</b>	<b>Peteljke trešnje</b>	<b>Verovatnoća</b>
139, 109, 183	Furan-2-karboksilna kiselina, 3-metil (3-metil-2-furoinska kiselina)	Furan-2-karboksilna kiselina, 3-metil (3-metil-2-furoinska kiselina)	54,4%
267, 126	Glicerol, 1-monolinoleoil	Glicerol, 1-monolinoleoil	32,3%
267, 223, 193	Heksanska kiselina (kapronska kiselina)	Heksanska kiselina (kapronska kiselina)	40,5%
171, 75, 143		2-Heksenoinska kiselina	65,6%
355, 45	9,12,15-Oktadekatrienska kiselina ( $\alpha$ -linoleinska kiselina)	9,12,15-Oktadekatrienska kiselina ( $\alpha$ -linoleinska kiselina)	70,1%
117, 299		<i>n</i> -Pentadekanska kiselina	55,4%
299, 283	Fosforna kiselina	Fosforna kiselina	40,6%
147, 192	Fosfonat, 4-hlorofenil	Fosfonat, 4-hlorofenil	30,5%
224, 45	Fenol, 2-hidroksi (katehol)	Fenol, 2-hidroksi (katehol)	56,2%
297, 267	Fenol, 2-metoksi (gvajakol)	Fenol, 2-metoksi (gvajakol)	50,0%
281, 133	2-Propenska kiselina, 3-fenil (cimetna kiselina)	2-Propenska kiselina, 3-fenil (cimetna kiselina)	65,0%
193, 370	Propionska kiselina, 2-hidroksifenil, 3-(melilotna kiselina)	Propionska kiselina, 2-hidroksifenil, 3-(melilotna kiselina)	66,7%
220, 250	Trineksapak-etil	Trineksapak-etil	50,3%

### 4.3. Biološka aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje

#### 4.3.1. Antioksidativna i antiradikalska aktivnost

Biljni fenoli su poznati po svojoj antioksidativnoj aktivnosti koja je korisna u prevenciji brojnih bolesti (Lippman i dr., 1994; Halliwell, 1997). Ovu aktivnost prirodni fenoli uglavnom ispoljavaju zbog svojih redoks svojstava koja im omogućavaju da deluju kao redukujući agensi, donori vodonika, „hvatači” singletnog kiseonika i kao potencijalni helatori metalnih jona (Rice-Evans i dr., 1995). Danas su dostupne brojne analitičke metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta. Ove metode se razlikuju po reakcionim mehanizmima i uslovima, oksidantima i ciljanim vrstama, i prema formi prikazivanja rezultata. Metode su zasnovane na UV/VIS spektrometriji, hemiluminescenciji, fluorometriji, elektrohemiji ili hromatografskim tehnikama (Sánchez-Moreno, 2002).

##### 4.3.1.1. Sposobnost inhibicije DPPH radikala

Sposobnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje ka neutralisanju DPPH radikala izražena je preko inhibitornih koncentracija ( $IC_{50}$  vrednost) kao srednja vrednost tri ponavljanja ( $\pm 2SD$ ). Razlike između antiradikalske aktivnosti peteljki višnje i trešnje bile su statistički beznačajne pri  $p < 0,05$  ( $p = 0,2291$ ). Bliske  $IC_{50}$  vrednosti ( $0,025 \pm 0,0025$  i  $0,023 \pm 0,0003$  mg/ml za peteljke višnje i trešnje, redom) su ukazale na približan sadržaj jedinjenja koja učestvuju u mehanizmu neutralizacije DPPH radikala. Prvulović i dr. (2011) su ispitali antiradikalsku aktivnost ekstrakata peteljki trešnje primenom DPPH testa i zaključili da je ova aktivnost bila u korelaciji sa sadržajem polifenola i flavonoida u uzorcima, ali ne i sa sadržajem tanina. Acetonski ekstrakti peteljki dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom neutralisali su od 29,88 do 86,94% DPPH radikala. Istraživanje Bastos i dr. (2015) je pokazalo da su ekstrakti peteljki trešnje dobijeni konvencionalnom ekstrakcijom smešom metanol/voda efikasniji u neutralisanju DPPH radikala u poređenju sa infuzima i dekoktima. Ekstrakti peteljki trešnje ( $IC_{50} = 0,36$  mg/ml) ispoljili su bolja antiradikalska svojstva u poređenju sa ekstraktima ploda ( $IC_{50} = 0,99$  mg/ml), što je bilo povezano sa većim sadržajem fenolnih jedinjenja. Ekstrakti ljuske crnog luka (Lee i dr., 2014a) dobijeni ekstrakcijom subkritičnom vodom na  $110$  °C inhibirali su 64,72% DPPH radikala pri koncentraciji od 0,2 mg/ml, dok su ekstrakti dobijeni pri temperaturi od  $165$  °C pokazali nižu aktivnost, inhibirajući samo 11,45% radikala pri istoj koncentraciji. Ekstrakti pulpe smokve dobijeni subkritičnom vodom (Maghsoudlou i dr., 2016) inhibirali su oko 65% DPPH radikala

pri mnogo većoj koncentraciji (1 mg/ml) u odnosu na oba uzorka peteljki. U poređenju sa literaturnim podacima, ekstrakti peteljki višnje i trešnje su demonstrirali veći antiradikalni kapacitet.

#### 4.3.1.2. Sposobnost inhibicije hidroksilnih radikala

Zbog negativnog uticaja hidroksilnih radikala na žive sisteme, merenje sposobnosti njihove neutralizacije od strane prirodnih molekula je veoma važno. U slučaju neutralizacije hidroksilnih radikala od strane ekstrakata peteljki višnje i trešnje zapažena je značajna razlika za 95%-tnu verovatnoću ( $p = 0,0248$ ). Ekstrakti peteljki trešnje pri koncentraciji od  $0,471 \pm 0,004$  mg/ml su neutralisali 50% hidroksilnih radikala, dok je isti efekat sa ekstraktima peteljki višnje postignut pri koncentraciji od  $0,553 \pm 0,04$  mg/ml. Ovi rezultati su ukazali na dobru antiradikalnu aktivnost ispitanih ekstrakata. Sposobnost neutralizacije hidroksilnih radikala od strane ekstrakata obe vrste peteljki je bila nešto slabija u poređenju sa ekstraktima *Inonotus obliquus* (Yuan i dr., 2017) dobijenih subkritičnom vodom. *Inonotus obliquus* (čaga) je parazitska gljiva koja raste na brezi i koristi se u tradicionalnoj medicini zbog svojih antikancerogenih svojstava.  $IC_{50}$  vrednosti za ekstrakte peteljki višnje i trešnje su bile približno dva puta veće u odnosu na ekstrakte pomenute gljive (0,13 mg/ml). U ranijim ispitivanjima metanolni ekstrakti listova trešnje (0,2 mg/ml) neutralisali su 43,99% hidroksilnih radikala (Kutlu i dr., 2014). U poređenju sa ovim rezultatom ekstrakti peteljki višnje i trešnje su pokazali nešto nižu antiradikalnu aktivnost.

#### 4.3.1.3. Sposobnost inhibicije ABTS radikala

ABTS test je izveden u opsegu sadržaja ekstrakata od 2 do 6 mg/ml. Ekstrakti peteljki višnje i trešnje su neutralisali 50% ABTS radikala pri koncentraciji od  $5,090 \pm 0,02$  i  $4,052 \pm 0,01$  mg/ml, redom. Razlike između antiradikalne aktivnosti ekstrakata bile su statistički značajne ( $p < 0,05$ ). Određena sposobnost neutralizacije ABTS radikala ekstrakata peteljki višnje i trešnje je bila niža u odnosu na metanolne ekstrakte cvetova, listova i korena *Hieracium pannosum*-a, za koje su dobijene  $IC_{50}$  vrednosti od 0,258, 0,240 i 0,101 mg/ml, redom (Gökbulut i dr., 2017). Ekstrakti peteljki višnje i trešnje su demonstrirali nižu antiradikalnu aktivnost i u odnosu na hloroformski ekstrakt nadzemnih delova *Santolina chamaecyparissus* ( $IC_{50} = 0,024$  mg/ml) (Meriem i dr., 2018).

#### 4.3.1.4. Određivanje redukcijske sposobnosti

Test redukcijske moći zasniva se na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  jon i često se koristi kao indikator elektron-donirajućeg kapaciteta koji može biti u jakoj korelaciji sa njegovim antioksidativnim kapacitetom (Manach i dr., 2004). Redukcijska sposobnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje je određena za opseg sadržaja ekstrakata od 0,1 do 1 mg/ml. Dobijeni rezultati su pokazali dobar kapacitet redukcije oba ekstrakta, a dobijene  $\text{EC}_{50}$  vrednosti su bile bliske. Naime,  $\text{EC}_{50}$  vrednost za ekstrakt peteljke višnje je iznosila  $0,479 \pm 0,009$  mg/ml, a za peteljke trešnje  $0,486 \pm 0,009$  mg/ml. Razlika između redukcijskih sposobnosti ekstrakata ( $p = 0,3994$ ) bila je statistički beznačajna ( $p < 0,05$ ). Analizirani ekstrakti peteljki su demonstrirali bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na metanolne ekstrakte peteljki i listova *Coleostephus myconis* vrsta ( $\text{EC}_{50} = 0,78$  mg/ml) (Bessedá i dr., 2016), ali slabiju u poređenju sa metanolnim ekstraktima cvetova ( $\text{EC}_{50} = 0,41$  mg/ml) i vegetativnih delova ( $\text{EC}_{50} = 0,39$  mg/ml) divljeg *Taraxacum*-a (Dias i dr., 2014). U odnosu na list, plod i koren burjana (0,15, 0,24 i 0,31 mg/ml, redom) (Cvetanović i dr., 2018b) niža redukcijska sposobnost, odnosno antioksidativna aktivnost.

#### 4.3.1.5. Određivanje sposobnosti heliranja metalnih jona

Antioksidativni kapacitet ekstrakata peteljki višnje i trešnje okarakterisan je i određivanjem sposobnosti heliranja metalnih jona. Joni prelaznih metala (posebno  $\text{Fe}^{2+}$ ) učestvuju u stvaranju hidroksilnih radikala u Fentonovoj reakciji. Ovi radikali su veoma reaktivni i mogu inicirati niz neželjenih reakcija, uzrokujući oštećenje značajnih biomolekula (DNK, proteina, membranskih lipida).

Homeostaza gvožđa u organizmu je regulisan proces, koji se narušava pojavom neke bolesti koja može dovesti do povećane koncentracije gvožđa u tkivima (Car i dr., 2017), uzrokujući oksidativni stres. Da bi se izbeglo štetno delovanje „slobodnog gvožđa“ ključno je njegovo odgovarajuće heliranje (Jomova i Valko, 2011). Ukoliko nije helirano na odgovarajući način ono će učestvovati u formiranju slobodnih radikala ( $\text{OH}^{\bullet}$ ).

Ekstrakt peteljke trešnje demonstrirao je veći kapacitet heliranja gvožđa ( $\text{IC}_{50} = 0,264 \pm 0,004$  mg/ml) u odnosu na ekstrakt peteljke višnje ( $\text{IC}_{50} = 0,348 \pm 0,002$  mg/ml). Razlika između aktivnosti ekstrakata bila je statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Ekstrakt peteljke trešnje se pored značajnijeg kapaciteta heliranja gvožđa odlikovao i većim sadržajem fenola i flavonoida. Khan i dr. (2012) su istakli u svojim istraživanjima korelaciju između  $\text{IC}_{50}$  vrednosti helirajuće

aktivnosti i sadržaja fenola i flavonoida u metanolnom ekstraktu *Sonchus asper*-a. U poređenju sa literaturnim podacima za druge biljke, ekstrakti peteljki su ispoljili slabiju sposobnost heliranja metalnih jona u poređenju sa etanolnim ekstraktom *Glinus oppositifolius* ( $IC_{50} = 0,121$  mg/ml) (AsokKumar i dr., 2009) i ekstraktom peteljke aronije ( $IC_{50} = 33,12$   $\mu$ g/ml) koji je dobijen primenom subkritične vode (Cvetanović i dr., 2017b).

#### 4.3.1.6. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije

Ispitivanje uticaja ekstrakata peteljki višnje i trešnje na proces lipidne peroksidacije neophodan je u cilju sagledavanja ukupne biološke aktivnosti ekstrakata. Razlika između aktivnosti ekstrakata je bila na granici da bi se mogla smatrati statistički značajnom ( $p = 0,0499$  za 95%-tnu verovatnoću), što ukazuje da ekstrakti peteljki višnje i trešnje imaju sličan potencijal da inhibiraju lipidnu peroksidaciju. Inhibitorne koncentracije ekstrakata peteljki trešnje i višnje su iznosile  $3,27 \pm 0,63$  i  $4,01 \pm 0,46$  mg/ml, redom. U poređenju sa literaturnim podacima, ovi rezultati su potvrdili nižu aktivnost u poređenju sa istraživanjem koje su sproveli Bastos i dr. (2015). Za ekstrakte peteljki trešnje dobijene konvencionalnom ekstrakcijom smešom metanol/voda, infuze i dokokte,  $IC_{50}$  vrednosti su iznosile 0,07, 0,24 i 0,13 mg/ml, redom, ukazujući na njihov veći potencijal da inhibiraju lipidnu peroksidaciju, merenu tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance (TBARS) testom. Moguć razlog značajnih razlika u aktivnosti može biti dekompozicija komponenata koje učestvuju u sprečavanju lipidne peroksidacije, uzimajući u obzir veliku reaktivnost subkritične vode. Osim toga, geografske i klimatske varijacije mogu biti odgovorne za različit hemijski sastav. U poređenju sa ekstraktom peteljke aronije ( $IC_{50} = 0,03$  mg/ml) (Cvetanović i dr., 2017b) dobijenog subkritičnom vodom ekstrakti peteljki višnje i trešnje su takođe pokazali znatno manju sposobnost da deluju kao inhibitori lipidne peroksidacije.

#### 4.3.1.7. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Ukupna antioksidativna moć ekstrakata peteljki višnje i trešnje određena je korišćenjem fosfomolibdenske metode. Metoda je zasnovana na redukciji Mo(VI) u Mo(V) pomoću antioksidanata pri čemu dolazi do formiranja fosfat/Mo(V) kompleksa sa maksimalnom apsorpcijom na talasnoj dužini od 695 nm. U ovoj metodi antioksidativni kapacitet ekstrakata peteljki je izražen preko ekvivalenta askorbinske kiseline (AK) po ml ekstrakta.

Ukupni antioksidativni kapacitet ekstrakata peteljki višnje i trešnje je bio sličan, sa vrednostima od  $1,099 \pm 0,087$  i  $1,193 \pm 0,014$  mg EAK/ml, redom. Razlike između antioksidativne aktivnosti ekstrakata peteljki bile su statistički beznačajne pri  $p < 0,05$  ( $p = 0,1367$ ). Ranije je dokumentovano da antioksidanti koji ne ispoljavaju antioksidativnu aktivnost u DPPH testu, u fosfomolibdenskom testu mogu ispoljiti jak antioksidativni kapacitet (Loo i dr., 2008). Polifenoli, askorbinska kiselina, glutation, cistein, tokoferoli i aromatični amini imaju potencijal doniranja vodonika i elektrona ispoljavajući aktivnost u oba testa (Marwah i dr., 2007).

#### 4.3.1.8. Određivanje redukcionne sposobnosti FRAP metodom

Ekstrakt peteljke višnje demonstrirao je neznatno veću FRAP vrednost ( $448,1 \pm 33,7$   $\mu$ g EAA/ml) od ekstrakta peteljke trešnje ( $433,8 \pm 10,8$   $\mu$ g EAA/ml). Razlika između aktivnosti ekstrakata obe vrste peteljki ( $p = 0,3476$ ) bila je statistički beznačajna ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.1.9. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ORAC metodom

Za ekstrakt peteljke trešnje dobijena ORAC vrednost iznosila je  $11,03 \pm 1,1$   $\mu$ g ET/ml dok je za ekstrakt peteljke višnje ona bila  $10,81 \pm 0,9$   $\mu$ g ET/ml. Razlika između aktivnosti ekstrakata peteljki ( $p = 0,7738$ ) bila je statistički beznačajna ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.1.10. DNK-biosenzorna metoda

Antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata peteljki određena je i primenom DNK biosenzornog testa. Metoda je jednostavna i omogućava brzu karakterizaciju antioksidativnih svojstava, a zasniva se na merenju stepena oštećenja DNK od strane hidroksilnih radikala u prisustvu antioksidanata iz uzorka. Hidroksilni radikali generisani Fentonovom reakcijom uzrokuju oksidativno oštećenje DNK. Ukupni antioksidativni kapacitet ekstrakta peteljke višnje ( $47,91$  mg EGK/l) bio je nešto bolji u odnosu na ekstrakt peteljke trešnje ( $34,47$  mg EGK/l).

Uzimajući u obzir sve gore navedene rezultate, može se zaključiti da ispitani subkritični vodeni ekstrakti peteljki višnje i trešnje ispoljavaju značajnu antioksidativnu aktivnost. U većini testova dobijeni rezultati antioksidativne i antiradikalske aktivnosti su korelirali sa sadržajem fenola.



#### 4.3.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata peteljki višnje i trešnje prikazani su u Tabeli 27. Rezultati su izraženi preko minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata. U literaturi su primenjeni različiti kriterijumi za utvrđivanje potencijala ekstrakata i izolovanih jedinjenja da deluju kao antimikrobni agensi. U okviru ove doktorske disertacije antimikrobna aktivnost ispitanih ekstrakata je definisana kao značajna sa MIC vrednostima manjim od 100 µg/ml, umerena za minimalnu inhibitornu koncentraciju između 100 i 625 µg/ml, i slaba sa MIC vrednostima većim od 625 µg/ml (Kuete i dr., 2009; Bueno, 2012; Teinkela i dr., 2017). Antimikrobna aktivnost je određena za osam različitih mikrobnih linija i to šest bakterijskih i dve gljivične. Sposobnost ka inhibiciji ispitivanih mikrobnih linija poređena je sa standardnim antibioticima amracinom i nistatinom, za bakterije i gljivice, redom. Dobijene MIC vrednosti za analizirane ekstrakte bile su u opsegu od 19,53 do 625 µg/ml (Tabela 27).

Ekstrakt peteljke trešnje pokazao je najveću aktivnost prema bakterijskim linijama *Staphylococcus aureus* i *Proteus vulgaris* sa MIC vrednostima od 19,53 µg/ml. Ekstrakt je ispoljio jednaku aktivnost ka inhibiciji rasta pomenutih linija kao i standardni antibiotik amracin. Hlorogenska kiselina je kvantifikovana samo u ekstraktu peteljke trešnje, a prema istraživanju Fattouch i dr. (2007) pomenuta kiselina pokazuje najveću inhibitornu aktivnost prema bakterijskim sojevima *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i gljivici *Candida albicans*.

Galna kiselina koja je bila dominantno fenolno jedinjenje u ekstraktima peteljki trešnje i višnje, ima značajan potencijal da inhibira rast Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, ali ne i Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* (Tafesh i dr., 2011). Ekstrakti peteljke trešnje su pokazali najvišu antimikrobnu aktivnost prema *Staphylococcus aureus*, a najnižu prema *Escherichia coli* (625 µg/ml). Ekstrakti peteljke višnje su ispoljili umerenu antimikrobnu aktivnost prema pomenutim bakterijskim linijama. U studiji Borges i dr. (2013) galna (hidroksi-benzoeva) i ferulna (hidroksi-cimetna) kiseline demonstrirale su antimikrobnu aktivnost prema soju *Staphylococcus aureus* ali i *Escherichia coli*. Takođe, autori su pokazali da su hidroksi-cimetne kiseline efikasnije od hidroksi-benzoevih kiselina, uzimajući u obzir MIC i MBC (eng. *Minimum Bactericidal Concentration* – Minimalna baktericidna koncentracija) vrednosti. Uopšteno, hidroksi-cimetne kiseline, usled njihovog bočnog propenskog lanca, su manje polarne od odgovarajućih hidroksi-benzoevih kiselina što olakšava transport ovih molekula kroz ćelijsku membranu (Monte i dr., 2014). Istraživanje Tafesh i dr. (2011) demonstriralo je da kafena, cimetna, vanilinska, siringinska i protokatehinska kiselina

ne inhibiraju rast bakterijskih linija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Da kafena kiselina ne inhibira rast *Staphylococcus aureus* potvrđeno je i u studiji Zhou i dr. (2014). Međutim, u nedavnom istraživanju je dokumentovano da galna (Özçelik i dr., 2011; Pacheco-Ordaz i dr., 2017), vanilinska, protokatehinska i ferulna kiselina (Pacheco-Ordaz i dr., 2017) inhibiraju rast soja *Escherichia coli*. Pokazano je da taj potencijal imaju kafena i hlorogenska kiselina, kao i naringin (Özçelik i dr., 2011). MIC vrednosti za pomenuta jedinjenja su iznosile 8, 8 i 4 µg/ml, redom. Jaku korelaciju između hlorogenske kiseline i inhibicije aktivnosti patogene bakterije *Escherichia coli* potvrdila je i studija Aires i dr. (2017). Sve gore pomenute kiseline, kao i naringin, su identifikovane u uzorcima peteljki višnje i trešnje. Za antimikrobnu aktivnost ekstrakata peteljki verovatno je odgovorno sinergističko delovanje različitih komponenata u ekstraktima.

Prema istraživanju Ördögh i dr. (2010) metanolni ekstrakti komine trešnje nisu pokazali aktivnost prema bakterijskoj liniji *Staphylococcus aureus* ali jesu prema *Streptococcus pyogenes* (6,13 mg/ml). U poređenju sa subkritičnim vodenim ekstraktom đumbira (Švarc-Gajić i dr., 2017), crnog dudu (*Morus nigra*), podubice (*Teucrium chamaedrys*) i gaveza (*Symphytum officinale*) (Nastić i dr., 2018) ekstrakt peteljke trešnje je bio potentniji prema bakterijskim linijama *Staphylococcus aureus* i *Proteus vulgaris*, dok je ekstrakt peteljke višnje pokazao isti nivo antimikrobne aktivnosti prema Gram-negativnoj bakteriji *Proteus mirabilis* kao i ekstrakti đumbira i podubice (78,13 µg/ml).

Tabela 27. Antimikrobna aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje.

Mikrobna linija	MIC vrednosti ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Peteljke višnje	Peteljke trešnje	Amracin	Nistatin
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	312,50	19,53	19,53	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	312,50	156,25	39,10	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	312,50	625	39,10	/
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	312,50	19,53	19,53	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	78,12	156,25	19,53	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	312,50	156,25	19,53	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	312,50	312,50	/	19,53
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	39,10	156,25	/	39,10

U odnosu na metanolni ekstrakt listova *Annona muricata* (graviola) (Pinto i dr., 2017) ekstrakt peteljke trešnje dobijen subkritičnom vodom je bio aktivniji prema bakterijskoj liniji *Staphylococcus aureus*, a ekstrakt peteljke višnje prema bakterijskom soju *Escherichia coli*. Prema studiji Perry i Brennan-a (1997) hidrohinton poseduje potencijal da inhibira rast soja *Escherichia coli*. S obzirom da je hidrohinton detektovan samo u ekstraktu peteljke višnje, pretpostavlja se da je doprineo većoj potentnosti ovog ekstrakta prema pomenutoj Gram-negativnoj bakteriji u odnosu na ekstrakt peteljke trešnje.

Ekstrakti peteljki višnje i trešnje su pokazali umerenu antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnoj bakteriji *Bacillus subtilis*, sa MIC vrednostima od 312,5 i 156,25  $\mu\text{g/ml}$ , redom. Smatra se da je inhibitorno delovanje različitih fenolnih jedinjenja povezano sa

njihovim delovanjem na ćelijski zid Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Tian i dr., 2018).

Ekstrakti peteljki višnje i trešnje demonstrirali su umerenu antimikrobnu aktivnost prema Gram-negativnoj bakteriji *Klebsiella pneumoniae*, sa MIC vrednostima od 312,5 i 156,25 µg/ml, redom. Istraživanje Özçelik i dr. (2011) je demonstriralo da galna, kafena i hlorogenska kiselina kao i flavonoid naringin inhibiraju rast obe bakterije. S obzirom da su samo u ekstraktu peteljke trešnje dobijenom subkritičnom vodom bila identifikovana pomenuta jedinjenja, pretpostavlja se da su ona doprinela jačoj antimikrobnoj aktivnosti ovog ekstrakta u odnosu na ekstrakt peteljke višnje. U odnosu na dihlormetanski ekstrakt nadzemnih delova biljke *Mitracarpus frigidus* (Fabri i dr., 2009) ekstrakt peteljke trešnje je ispoljio istu, a višnje višu inhibitornu vrednost.

Ekstrakti peteljki trešnje i višnje su pokazali umerenu antimikrobnu aktivnost prema liniji *Candida albicans* sa MIC vrednostima od 312,5 µg/ml. U ekstraktu peteljki su identifikovane vanilinska, siringinska i gentisinska kiselina koje imaju značajan potencijal da inhibiraju gljivičnu liniju *Candida albicans* (Ren i dr., 2009). Navedeni soj inhibiraju, takođe, hlorogenska i kafena kiselina (Özçelik i dr., 2011) koje su identifikovane u ekstraktima peteljki. Kada su u pitanju ekstrakti drugih biljnih vrsta, dihlormetanski ekstrakt biljke *Mitracarpus frigidus* (Fabri i dr., 2009) ispoljio je istu antimikrobnu moć kao i ekstrakti peteljki višnje i trešnje dobijeni subkritičnom vodom. Ekstrakti kamilice (Cvetanović i dr., 2015), đumbira (Švarc-Gajić i dr., 2017) i peteljke aronije (Cvetanović i dr., 2017b) dobijeni istom ekstrakcionom tehnikom ispoljili su jaču inhibitornu moć prema ovoj gljivičnoj liniji.

Ekstrakt peteljke višnje demonstrirao je značajnu antimikrobnu aktivnost prema liniji *Aspergillus niger* sa MIC vrednošću od 39,1 µg/ml, što je odgovaralo aktivnosti standardog antimikotika nistatina. Ekstrakt peteljke trešnje ispoljio je umerenu antimikrobnu aktivnost prema istoj liniji (156,25 µg/ml). U poređenju sa subkritičnim vodenim ekstraktom kamilice (Cvetanović i dr., 2015) ekstrakt peteljke višnje je ispoljio istu antifungalnu aktivnost, dok je u odnosu na subkritične vodene ekstrakte đumbira (Švarc-Gajić i dr., 2017) i peteljke aronije (Cvetanović i dr., 2017b) ispoljio nižu aktivnost.

Ekstrakti peteljki trešnje dobijeni subkritičnom vodom i višnje demonstrirali su širok spektar antimikrobnog delovanja.

#### 4.3.3. Određivanje sposobnosti inhibicije biološki značajnih enzima

Dijabetes i Alzheimer-ova bolest su danas jedni od najzastupljenijih globalnih zdravstvenih problema. Inhibicija ključnih enzima koji učestvuju u razvoju bolesti može imati bitnu ulogu u olakšavanju simptoma (Gonçalves i Romano, 2017b). Proizvedeno je nekoliko sintetskih inhibitora enzima (akarboza i vogliboza za amilazu/glukozidazu; galantamin, takrin i rivastigmin za holinesterazu; orlistat za pankreasnu lipazu), međutim upotreba sintetskih inhibitora je često praćena sa sporednim efektima, kao što su gastrointestinalne smetnje i hepatotoksičnost (Buchholz i Melzig, 2016; Mocan i dr., 2016; Annamalai i dr., 2017; Sang i dr., 2017). Sa druge strane, biljni sekundarni metaboliti poseduju potencijal da deluju kao inhibitori enzima sa manje izraženim nus efektima (Pereira i dr., 2017).

U okviru ove disertacije ispitana je aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje dobijenih subkritičnom vodom prema inhibiciji  $\alpha$ -amilaze,  $\alpha$ -glukozidaze, tirozinaze, acetilholinesteraze, butirilholinesteraze i lipaze, a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 28. Ispitivani ekstrakti demonstrirali su inhibitorne efekte prema  $\alpha$ -amilazi,  $\alpha$ -glukozidazi, tirozinazi i acetilholinesterazi. U svim primenjenim testovima peteljke višnje pokazale su jače enzim-inhibitorno delovanje u odnosu na peteljke trešnje. Ovi nalazi su u suprotnosti sa sadržajem ukupnih fenola i sa antioksidativnom aktivnošću gde su ekstrakti peteljke trešnje demonstrirali veću aktivnost, što je najverovatnije povezano sa drugim jedinjenjima nefenolne prirode. Katanić i dr. (2017) su u svom istraživanju ustanovili da nije postojala korelacija između sadržaja fenola, antioksidativnih svojstava i enzim-inhibitornih aktivnosti ( $\alpha$ -amilaza,  $\alpha$ -glukozidaza i holinesteraza) za metanolni ekstrakt *Digitalis lamarckii*. Autori smatraju da su ispitane aktivnosti bile vezane za nefenolne inhibitore, uključujući saponine i alkaloidne. Ipak, galna, protokatehinska i hlorogenska kiselina, koje su bile dominantne komponente u ekstraktima peteljki trešnje su najverovatnije doprinele enzim-inhibitornom delovanju. Efikasnost navedenih kiselina kao antidijabetskih agenasa potvrđena je *in vivo* i *in vitro* studijama (Adefegha i dr., 2015; Oboh i dr., 2015; Oboh i dr., 2016; Cen i dr., 2016). Pomenuta jedinjenja takođe ispoljavaju i anti-tirozinazno delovanje (Chang, 2009; Su i dr., 2013; Gheibi i dr., 2016; Truong i dr., 2017).

Tabela 28. Enzim-inhibitorna aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje.

<i>Test</i>	<i>Peteljke višnje</i>	<i>Peteljke trešnje</i>
<b><i>Antidijabetska aktivnost</i></b>		
Inhibicija $\alpha$ -amilaze (mmol EA/g ekstrakta)	0,20 $\pm$ 0,01*	0,14 $\pm$ 0,01
Inhibicija $\alpha$ -glukozidaze (mmol EA/g ekstrakta)	0,87 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,08
<b><i>Antimelanogena aktivnost</i></b>		
Inhibicija tirozinaze (mg EKK/g ekstrakta)	4,34 $\pm$ 0,57	3,75 $\pm$ 0,34
<b><i>Neuroprotektivna aktivnost</i></b>		
Inhibicija acetilholinesteraze (mg EGALA/g ekstrakta)	1,13 $\pm$ 0,18	1,05 $\pm$ 0,12
Inhibicija butirilholinesteraze (mg EGALA/g ekstrakta)	n.a.	n.a.
<b><i>Antiaterogena aktivnost</i></b>		
Inhibicija lipaze (mg EO/g ekstrakta)	n.a.	n.a.

\* $\pm$ SD tri paralelna merenja. EA: Ekvivalent akarboze; EKK: Ekvivalent kojične kiseline; EGALA: Ekvivalent galantamina; EO: Ekvivalent orlistata; n.a., nije aktivan.

#### 4.3.3.1. Antidijabetska aktivnost

Oba ispitana ekstrakta su ispoljila veću aktivnost ka inhibiranju  $\alpha$ -glukozidaze nego  $\alpha$ -amilaze, što je bilo u skladu sa literaturnim podacima (Kocak i dr., 2017; Cvetanović i dr., 2018b; Ozer i dr., 2018b). Dobijena vrednost inhibitorne koncentracije u slučaju  $\alpha$ -amilaze iznosila je 0,20 mmol EA/g za ekstrakt peteljke višnje, odnosno 0,14 mmol EA/g za ekstrakt peteljke trešnje, dok su u slučaju  $\alpha$ -glukozidaze ove vrednosti iznosile 0,87 i 0,61 mmol EA/g, redom (Tabela 28). U poređenju sa etil-acetatnim ekstraktom *Stachys annua subsp. annua* var. *annua* (Kocak i dr., 2017) ekstrakti peteljki višnje i trešnje su ispoljili manji stepen inhibicije  $\alpha$ -amilaze i veći  $\alpha$ -glukozidaze. Katehin, benzoeva, *p*-hidroksibenzoeva i hlorogenska kiselina su bile dominantne komponente u etil-acetatnom ekstraktu. Ozer i dr. (2018) su u svom istraživanju utvrdili da postoji jaka korelacija između *p*-hidroksibenzoeve kiseline i inhibicije aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze. U poređenju sa ekstraktom korena burjana dobijenom subkritičnom vodom (Cvetanović i dr., 2018b), ekstrakti peteljki su ispoljili veću aktivnost ka inhibiranju  $\alpha$ -glukozidaze, a manju  $\alpha$ -amilaze. U ispitanom ekstraktu korena burjana detektovana je velika

koncentracija galne kiseline, poznate po jakom inhibitornom delovanju prema  $\alpha$ -amilazi (Oboh i dr., 2016).

#### 4.3.3.2. Antimelanogena aktivnost

Tirozinaza je ključni enzim u biosintezi melanina. Prekomerna akumulacija melanina, usled visoke aktivnosti tirozinaze, može dovesti do pojave staračkih fleka, pega, melazme i čak melanoma (Chiari i dr., 2011). Inhibitori tirozinaze se upotrebljavaju u kozmetičkim preparatima za izbeljivanje kože, kao i u tretmanu dermatoloških poremećaja povezanih sa hiperpigmentacijom. Do sada je sintetisano nekoliko inhibitora ovog enzima, međutim, oni uglavnom ispoljavaju nusefekte, kao što je citotoksičnost, ili dovode do pojave dermatitisa, postinflamatorne pigmentacije, ohronoze (Chiari i dr., 2011). Zbog ovoga, nametnula se potreba ka pronalaženju i izolovanju prirodnih inhibitora pomenutog enzima. U tom smislu, ispitana je inhibitorna aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje dobijenih subkritičnom vodom, a dobijeni rezultati (Tabela 28) su izraženi kao ekvivalent kojične kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg EKK/g).

Ekstrakt peteljke višnje je ispoljio veći stepen inhibicije tirozinaze (4,34 mg EKK/g) u odnosu na ekstrakt peteljke trešnje (3,75 mg EKK/g). U ekstraktima peteljki detektovane su benzoeva i cimetna kiselina koje su poznate po inhibitornom delovanju ka tirozinazi (Kermasha i dr., 1993; Lim i dr., 1999). Ekstrakti peteljke višnje su ispoljili veći potencijal ka inhibiranju tirozinaze u poređenju sa etil-acetatnim ekstraktom *Centranthus longiflorus* (4,30 mg EKK/g) i metanolnim ekstraktom *Cerithe minor* (3,30 mg EKK/g) (Zengin i dr., 2016), a manji u odnosu na metanolni ekstrakt rizoma *Iris schachtii* (6,98 mg EKK/g) (Mocan i dr., 2018). Razlog ovakve aktivnosti ekstrakta rizoma irisa, prema autorima, može biti prisustvo kemferola, od ranije poznatog jakog inhibitora tirozinaze. U poređenju sa ekstraktima drugih biljaka dobijenim ekstrakcijom subkritičnom vodom, ekstrakti peteljki višnje i trešnje su ispoljili nižu aktivnost u odnosu na ekstrakte korena, ploda i lista burjana (9,32, 10,94 i 19,67 mg EKK/g) (Cvetanović i dr., 2018b). Značajna aktivnost ekstrakta lista burjana se može povezati sa visokom koncentracijom hlorogenske i kafene kiseline poznatih po svojoj tirozinaza-inhibitornoj aktivnosti (Kermasha i dr., 1993; Zengin i dr., 2017).

#### 4.3.3.3. Neuroprotektivna aktivnost

Holinesteraza hidrolizuje acetilholin (ACh) i druge estre holina u nervnim sinapsama i drugim tkivima. Postoje dve vrste holinesteraze, različitih biohemijskih svojstava, i to: acetilholinesteraza (prava holinesteraza) i butirilholinesteraza (pseudoholinesteraza ili holinesteraza plazme). Acetilholinesteraza (AChE) je pronađena u svim ekcitolnim tkivima (centralni i periferni nervni sistem i mišići) i eritrocitima (Santarpia i dr., 2013). Butirilholinesteraza (BChE) hidrolizuje holin i alifatične estere, a ovaj  $\alpha$ -glikoprotein se nalazi u centralnom i perifernom nervnom sistemu, u većini tkiva, i u jetri. Biološka uloga acetilholinesteraze je prekid prenosa nervnih impulsa u holinergičkim sinapsama brzom hidrolizom neurotransmitera acetilholina (Mukherjee i dr., 2007). Fiziološka funkcija butirilholinesteraze nije u potpunosti razjašnjena, međutim snižena aktivnost ovog enzima se javlja kod određenih patoloških stanja kao što je oboljenje jetre, inflamacija, povreda, infekcija i neishranjenost (Santarpia i dr., 2013). Savremeni pristupi u tretmanu Alzheimer-ove bolesti, senilne (staračke) demencije, ataksije, *Myasthenia gravis* i Parkinsonove bolesti (Mukherjee i dr., 2007) su uglavnom zasnovani na inhibitornoj aktivnosti ovih enzima. U zdravom mozgu acetilholinesteraza ima dominantnu ulogu (80%) u regulisanju nivoa acetilholina, a butirilholinesteraza minornu. Međutim, u mozgu osobe obolele od Alzheimer-ove bolesti aktivnost AChE opada i do oko 60% od normalne vrednosti, dok se aktivnost BChE povećava čak do 120% (Pandolfi i dr., 2017). Inhibitori AChE i memantin su za sada jedini odobreni lekovi u tretmanu pomenute bolesti. Upotreba lekova poput takrina, donepezila, galantamina i rivastigmina povezana je sa nusfektima kao što su oštećenje jetre, agresija, depresija, tegobe povezane sa gastrointestinalnim traktom, genitourinarnim traktom. (Pavlović i dr., 2010; Shekhar i Kumar, 2015). Stoga su istraživanja vezana za pronalaženje novih prirodnih inhibitora sve zastupljenija. U tom smislu, ispitana je inhibitorna moć subkritičnih vodenih ekstrakata peteljke višnje i trešnje, a dobijeni rezultati (Tabela 28) su izraženi kao ekvivalent galantamina po gramu suvog ekstrakta (mg EGALA/g).

Oba ispitivana ekstrakta su ispoljila aktivnost prema inhibiciji acetilholinesteraze, ali ne i butirilholinesteraze. Ekstrakt peteljke višnje ispoljio je neznatno veći stepen inhibicije AChE (1,13 mg EGALA/g) u odnosu na ekstrakt peteljke trešnje (1,05 mg EGALA/g). S obzirom da je ekstrakt peteljke višnje imao manji sadržaj ukupnih fenola od ekstrakta peteljke trešnje, njegovo jače AChE inhibitorno delovanje je najverovatnije bilo povezano sa prisustvom nefenolnih inhibitora. U pojedinim dokumentovanim istraživanjima pokazano je da ne postoji korelacija između ukupnih fenola i antiholinesterazne aktivnosti (Russo i dr., 2015). U



poređenju sa inhibitornom aktivnošću drugih biljaka, ekstrakt peteljke višnje je ispoljio jače inhibitorno delovanje ka AChE u odnosu na metanolni i vodeni ekstrakt *Clinopodium vulgare* (1,08 i 0,25 mg EGALA/g, redom), ali slabije u odnosu na acetonski ekstrakt (1,34 mg EGALA/g) (Sarikurkcu i dr., 2015). Metanolni i vodeni ekstrakti ove biljke (talca ili čepića) imali su veći sadržaj ukupnih fenola od acetonskog ekstrakta. U metanolnom ekstraktu identifikovane su protokatehinska, hlorogenska, kafena, ferulna i rozmarinska kiselina, kao i apigenin u visokim koncentracijama. U vodenom ekstraktu je utvrđena najveća koncentracija benzoeve kiseline, a u acetonskom, *p*-hidroksibenzoeve kiseline. Samo je acetonski ekstrakt talca ispoljio inhibitornu aktivnost ka BChE. Prema autorima, ekstrakti koji sadrže nepolarne fitohemikalije pokazuju veću inhibitornu aktivnost, posebno prema acetilholinesterazi, butirilholinesterazi i tirozinazi.

#### 4.3.3.4. Antiaterogena aktivnost

Svetska zdravstvena organizacija definiše gojaznost kao prekomernu akumulaciju masti koja može narušiti zdravlje (Chedda i dr., 2016). Gojaznost je često povezana sa drugim bolestima, kao što su dijabetes, kardiovaskularne bolesti, muskuloskeletne bolesti i neke vrste karcinoma (Lunagariya i dr., 2014). U Srbiji više od polovine odraslih osoba (54%) ima problem prekomerne težine, pri čemu je 36,7% predgojazno, a 17,3% gojazno (Crnobrnja i dr., 2012). Trenutni terapijski pristupi u lečenju gojaznosti su dosta ograničani s obzirom na izražene nusfekte lekova. Zbog toga su tekuća istraživanja usmerena ka otkrivanju prirodnih agenasa, kao i na formulisanju lekova na bazi prirodnih jedinjenja koji bi mogli redukovati telesnu mast (Chedda i dr., 2016). Na tržištu su dostupne dve vrste lekova za redukciju gojaznosti inhibitori pankreasne lipaze i inhibitori apetita. Trenutno je samo jedan inhibitor lipaze, orlistat (Xenical<sup>®</sup>), u upotrebi. Međutim, njegova primena je limitirana usled toksičnog delovanja na pojedine unutrašnje organe, uključujući bubrege i jetru (Chedda i dr., 2016). U potrazi za prirodnim bioaktivnim inhibitorima lipaze kao antigoznim agensima, ispitivani su različiti biljni ekstrakti i njihove fitohemikalije (Lunagariya i dr., 2014).

U okviru ove disertacije ispitana je inhibitorna aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje dobijenih subkritičnom vodom ka pankreasnoj lipazi. Ekstrakti nisu ispoljili aktivnost prema ovom enzimu (Tabela 28). Kada su u pitanju ekstrakti drugih biljnih vrsta, etil-acetatni ekstrakti *Buplerum croceum*-a i *Achillea phrygia*-e kao i metanolni ekstrakt *Buplerum croceum*-a su ispoljili inhibitornu aktivnost prema lipazi (Zengin i dr., 2017). Autori smatraju da je aktivnost bila vezana za prisustvo kvercetina i apigenina. U istraživanju Mocan i dr. (2018) metanolni

ekstrakti rizoma i nadzemnih delova irisa su ispoljili inhibitorno delovanje prema lipazi za razliku od vodenih ekstrakata. U metanolnim ekstraktima su detektovani katehin i benzoeva kiselina, koja je poznata kao inhibitor lipaze (Karamać i Amarowicz, 1996). Dihlormetanski ekstrakti žalfije su ispoljili veći potencijal prema inhibiciji lipaze u odnosu na metanolne i vodene ekstrakte (Zengin i dr., 2018). Prema autorima, veća inhibitorna aktivnost dihlormetanskih ekstrakata je najverovatnije povezana sa prisustvom nefenolnih inhibitora.

#### 4.3.4. Određivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata

Određivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata peteljki višnje i trešnje izvedeno je u *in vitro* uslovima primenom MTT testa. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata je određena za tri različite ćelijske linije: Hep2c-humana ćelijska linija raka cerviksa, RD-humana ćelijska linija rabdomyosarkoma i L2OB-mišja tumorska fibroblastna linija sa transefektovanim humanim genima. Cisplatin je primenjen kao standardno jedinjenje jer predstavlja hemoterapeutski agens koji se koristi u tretmanu velikog broja kancera i tumora. Dobijeni rezultati, prikazani u Tabeli 29, pokazuju da su ispitani ekstrakti pokazali visoku antiproliferativnu aktivnost prema ispitanim tumorskim linijama. Dobijene  $IC_{50}$  vrednosti za ekstrakte su bile u opsegu od 8,38 do 11,40  $\mu\text{g/ml}$ . U skladu sa Američkim nacionalnim institutom za kancer, kriterijum za citotoksičnu aktivnost za biljne ekstrakte je  $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$  (Graidist i dr., 2015).

Tabela 29. *In vitro* citotoksična aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje.

Ćelijska linija	$IC_{50}$ vrednost ( $\mu\text{g/ml}$ )*		
	Peteljke višnje	Peteljke trešnje	Cis-diamindihloroplatina(II)
<b>Hep2c ćelije<sup>a</sup></b>	8,38±0,44	10,65±0,29	0,94±0,55
<b>RD ćelije<sup>b</sup></b>	11,40±0,66	10,55±0,83	1,40±0,97
<b>L2OB ćelije<sup>c</sup></b>	9,69±0,39	8,87±0,43	0,72±0,64

\*±2SD;

<sup>a</sup>humana ćelijska linija raka cerviksa (*human cervix carcinoma*), <sup>b</sup>humana ćelijska linija rabdomyosarkoma (*rhabdomyosarcoma*), <sup>c</sup>mišja tumorska fibroblastna linija sa transefektovanim humanim genima.

Hep2c ćelijske linije su se pokazale kao osetljivije na dejstvo ekstrakta peteljke višnje ( $IC_{50} = 8,38 \mu\text{g/ml}$ ) nego L2OB ( $IC_{50} = 9,69 \mu\text{g/ml}$ ) i RD ( $IC_{50} = 11,40 \mu\text{g/ml}$ ) ćelijske linije.

Ekstrakt peteljke trešnje je ispoljio najveću antiproliferativnu aktivnost prema L2OB ćelijama (8,87 µg/ml). Koncentracije ovog ekstrakta neophodne da inhibiraju 50% ćelijskog rasta za RD i Hep2c ćelije su iznosile 10,55 i 10,65 µg/ml, redom. U slučaju RD ( $p = 0,3846$ ) i L2OB ( $p = 0,1645$ ) ćelijskih linija nije primećena značajna razlika između analiziranih ekstrakata. Međutim, u slučaju Hep2c ćelija razlika između ekstrakata peteljki se mogla okarakterisati kao statistički značajna ( $p = 0,0072$ ).

U istraživanju Bastos i dr. (2015) metanolni ekstrakt peteljke trešnje nije ispoljio antitumornu aktivnost prema ispitanim tumorskim ćelijskim linijama (adenokarcinom dojke (MCF-7), nesitnoćelijski kancer pluća (NCI-460), kolorektalni karcinom (HCT-15), karcinom grlića materice (HeLa) i hepatocelularni karcinom (HepG2)). Za pomenuti ekstrakt određena  $IC_{50}$  vrednost za kolorektalni karcinom je bila iznad 400 µg/ml, dok je za metanolni ekstrakt ploda trešnje ona iznosila 73,51 µg/ml. Ekstrakti analizirani u okviru ove doktorske disertacije demonstrirali su mnogo bolju citotoksičnu aktivnost s obzirom da su  $IC_{50}$  vrednosti bile oko 10 µg/ml. Ovi rezultati ukazuju da se ekstrakcijom vodom u subkritičnom stanju mogu povećati prinosi jedinjenja sa antiproliferativnim svojstvima. Druge studije takođe potvrđuju superiornost ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju nad drugim ekstrakcionim tehnikama (Lee i dr., 2014a; Cvetanović i dr., 2017b). U studiji Lee i dr. (2014b) subkritični vodeni ekstrakti lista i peteljki žen-šena, dobijeni pri temperaturi ekstrakcije od 190 °C, pokazali su veću citotoksičnu aktivnost prema humanim tumorskim ćelijskim linijama nego etanolni ekstrakti. U ekstraktu lista odnosno peteljke žen-šena kemferol je bio dominantni flavonoid dok je kvercetin detektovan samo u ekstraktu dobijenom pri temperaturi ekstrakcije od 190 °C. Osim toga, sadržaj kemferola u etanolnom i subkritičnom vodenom ekstraktu se nije znatno razlikovao. Prema autorima, jaka citotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata je verovatno uzrokovana flavonoid-flavonoid interakcijama. Prema istraživanju Cvetanović i dr. (2017b) subkritični vodeni ekstrakt peteljke aronije demonstrirao je veću citotoksičnu aktivnost prema Hep2c i L2OB ćelijskim linijama, sa  $IC_{50}$  vrednostima od 12,01 i 2,98 µg/ml, redom, u odnosu na ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom. Za ovaj ekstrakt izračunate  $IC_{50}$  vrednosti za Hep2c i L2OB ćelije su bile 13,27 i 3,19 µg/ml, redom. Ekstrakti peteljki višnje i trešnje dobijeni ekstrakcijom subkritičnom vodom su ispoljili veću citotoksičnu aktivnost prema Hep2c ćelijama, a manju prema L2OB ćelijama u odnosu na ekstrakt peteljke aronije dobijen istom ekstrakcionom tehnikom. Ekstrakt peteljke aronije je imao visok sadržaj kemferola, luteolina, rutina, sinapinske i *p*-kumarinske kiseline, poznatih potentnih bioaktivnih molekula, kao i apigenina, koji je prema autorima, jedan od najaktivnijih molekula u pogledu citotoksične aktivnosti.

Aktivnost drugih biljnih ekstrakata prema Hep2c, RD i L2OB ćelijskim linijama ispitana je u studiji Mašković i dr. (2015) i Nastić i dr. (2018). Etanolni ekstrakti *Onosma aucheriana* inhibirali su rast sve tri tumorske ćelijske linije ali su izračunate  $IC_{50}$  vrednosti ( $IC_{50(\text{Hep2c})} = 40,34 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50(\text{RD})} = 50,57 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50(\text{L2OB})} = 25,54 \mu\text{g/ml}$ ) bile mnogo više od vrednosti određenih za ekstrakte peteljki višnje i trešnje koje su prezentovane u okviru ove doktorske disertacije. Visoka antiproliferativna aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje dobijenih subkritičnom vodom se može objasniti vrlo specifičnim fitohemijskim sastavom i formiranjem citotoksičnih jedinjenja tokom same ekstrakcije, kao i visokim prinosom fenolnih i drugih antikancerogenih jedinjenja. U istraživanju Nastić i dr. (2018) RD ćelijska linija bila je najosetljivija na ispitivane subkritične vodene ekstrakte crnog duda, podubice, zdravca i gaveza, dok je Hep2c ćelijska linija bila najmanje osetljiva. Najveću inhibiciju rasta posmatranih tumorskih ćelija ispoljio je ekstrakt crnog duda ( $IC_{50(\text{RD})} = 11,10 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50(\text{L2OB})} = 17,41 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50(\text{Hep2c})} = 28,14 \mu\text{g/ml}$ ). Ovaj ekstrakt se odlikovao i najnižim sadržajem ukupnih fenola. Najniža citotoksična aktivnost je određena za ekstrakt podubice i Hep2c ćelijsku liniju ( $36,39 \mu\text{g/ml}$ ). Pomenuti ekstrakt se odlikovao i najvećom antioksidativnom aktivnošću kao i najvišim sadržajem ukupnih fenola. Prema autorima, citotoksična aktivnost ekstrakata može biti povezana sa visokim sadržajem fenolnih kiselina, ali i drugih sekundarnih metabolita, kao i sa sinergističkim delovanjem jedinjenja ekstrahovanih subkritičnom vodom i neoformiranih jedinjenja.

## **5. Zaključci**

- Optimizacija ekstrakcije peteljki višnje i trešnje subkritičnom vodom je izvedena na osnovu sadržaja ukupnih fenola i flavonoida. Određeni optimalni uslovi za ekstrakciju subkritičnom vodom podrazumevali su odnos droga:rastvarač 1:90, temperaturu 150 °C, pritisak 20 bar, vreme ekstrakcije 30 min i brzinu mešanja 3 Hz.
- Analiza fenolnog sastava ekstrakata izvedena je primenom HPLC–PDA metode. Identifikovane su fenolne kiseline i flavonoidi, pri čemu je galna kiselina bila dominantno jedinjenje u oba uzorka. Njen sadržaj u ekstraktima peteljki višnje i trešnje je iznosio 36,93 i 85,39 mg/l, redom.
- Detaljniji hemijski sastav ekstrakata peteljki višnje i trešnje dobijenih subkritičnom vodom izveden je primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom, uz derivatizaciju primenom dva različita protokola pripreme uzoraka. U vodenim ekstraktima su identifikovana jedinjenja različite polarnosti što je ukazalo na mogućnost subkritične vode da ekstrahuje različite hemijske klase. U uzorcima su detektovani polioli, zasićene i nezasićene dugolančane i srednjelančane masne kiseline, organske kiseline, monomerni šećeri i druga organska jedinjenja.
- Primenom optimizovanog protokola disperzivne tečno-tečne mikroekstrakcije i gasno-hromatografske analize uz maseno-spektrometrijsku detekciju, nisu ustanovljene značajnije razlike u hemijskom sastavu ekstrakata peteljki višnje i trešnje dobijenih subkritičnom vodom. U optimizovanom DLLME protokolu ugljen-tetrahlorid je korišćen kao ekstrakciono, a aceton kao disperzno sredstvo. Oba ekstrakta su se odlikovala značajnim sadržajem bioaktivnih fenolnih jedinjenja, aldehida i degradacionih produkata lignina. U ekstraktu peteljke trešnje, za razliku od višnje, utvrđeno je prisustvo piceola, *p*-anisinske i 2-heksenoinske kiseline pored ostalih jedinjenja.
- Biološka aktivnost ekstrakata peteljki višnje i trešnje je utvrđena ispitivanjem njihove antioksidativne, antiradikalske, antimikrobne i antiproliferativne aktivnosti, kao i sposobnosti inhibicije određenih enzima.

- Primenom deset različitih testova, na osnovu kojih su posmatrani različiti mehanizmi antioksidativnog delovanja, ispitivani ekstrakti peteljki obe *Prunus* vrste su pokazali znatan antioksidativni potencijal. U većini testova ekstrakt peteljki trešnje je ispoljio malo potentnije antioksidativno delovanje u odnosu na ekstrakt peteljke višnje, što je koreliralo sa sadržajem fenola u uzorcima.
- Antimikrobna aktivnost ekstrakata određena je za osam mikrobnih linija, a dobijene vrednosti su upoređene sa vrednostima standardnih antibiotika, amracina i nistatina. Određene minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) su se kretale u granicama od 19,53 do 625 µg/ml. Ekstrakt peteljke višnje je u poređenju sa ekstraktom peteljke trešnje pokazao veću aktivnost prema Gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* i *Proteus mirabilis* kao i gljivici *Aspergillus niger*. Ekstrakt je demonstrirao značajnu aktivnost prema *Aspergillus niger* sa MIC vrednošću od 39,1 µg/ml, što je odgovaralo aktivnosti standardnog antimikotika nistatina. Ekstrakt peteljke trešnje je ispoljio veću aktivnost prema bakterijskim linijama *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* i *Proteus vulgaris* u odnosu na ekstrakt peteljke višnje. Ekstrakt peteljke trešnje je pokazao najveći stepen aktivnosti prema *Staphylococcus aureus* i *Proteus vulgaris* sa MIC vrednostima u iznosu od 19,53 µg/ml. Ekstrakt je ispoljio jednaku sposobnost inhibiranja rasta pomenutih mikrobnih linija kao i standardni antibiotik amracin.
- Antidijabetsko delovanje ekstrakata peteljki je utvrđeno ispitivanjem sposobnosti inhibicije  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. U slučaju  $\alpha$ -amilaze dobijene vrednosti inhibitorne koncentracije su se kretale u opsegu od 0,14 do 0,20 mmol EA/g, dok su u slučaju  $\alpha$ -glukozidaze bile u opsegu od 0,61 do 0,87 mmol EA/g, što je ukazalo na slabiju antidijabetsku aktivnost ekstrakata. Ekstrakt peteljke višnje je ispoljio potentnije antidijabetsko delovanje u odnosu na ekstrakt peteljke trešnje.
- Antimelanogeno delovanje ekstrakata peteljki je utvrđeno ispitivanjem sposobnosti inhibicije tirozinaze. Sposobnost ekstrakata peteljki da inhibiraju tirozinazu je bila definisana ekvivalentom kojične kiseline koji se kretao u opsegu od 3,75 do 4,34 mg EKK/g. Oba ekstrakta su ispoljila značajnu antimelanogenu aktivnost, pri čemu su se i u ovom slučaju peteljke višnje odlikovale većom sposobnošću inhibiranja enzima.

- Neuroprotektivno delovanje ekstrakata peteljki je utvrđeno ispitivanjem sposobnosti inhibicije acetilholinesteraze i butirilholinesteraze. Zajedničko za ispitivane ekstrakte peteljki jeste da su pokazali sposobnost inhibicije acetilholinesteraze (AChE), ali ne i butirilholinesteraze. Ekstrakt peteljke višnje je ispoljio neznatno veći stepen inhibicije AChE (1,13 mg EGALA/g) u odnosu na ekstrakt peteljke trešnje (1,05 mg EGALA/g).
- Antiaterogeno delovanje ekstrakata peteljki je ispitano određivanjem sposobnosti inhibicije pankreasne lipaze. Ekstrakti peteljki obe *Prunus* vrste nisu pokazali aktivnost prema lipazi.
- Antiproliferativna aktivnost ekstrakata peteljki je ispitana na humanim ćelijskim linijama raka cerviksa (Hep2c) i rabdomiosarkoma (RD) kao i na mišjoj tumorskoj fibroblastnoj liniji sa transefektovanim humanim genima (L2OB). Ispitani ekstrakti su pokazali visoku antiproliferativnu aktivnost prema odabranim tumorskim ćelijama. Dobijene  $IC_{50}$  vrednosti za ekstrakte su bile u opsegu od 8,38 do 11,40  $\mu\text{g/ml}$ . Hep2c ćelijske linije su se pokazale kao osetljivije na dejstvo ekstrakta peteljke višnje ( $IC_{50} = 8,38 \mu\text{g/ml}$ ) nego L2OB ( $IC_{50} = 9,69 \mu\text{g/ml}$ ) i RD ( $IC_{50} = 11,40 \mu\text{g/ml}$ ) ćelijske linije. Ekstrakt peteljke trešnje je ispoljio najveću antiproliferativnu aktivnost prema L2OB ćelijama (8,87  $\mu\text{g/ml}$ ). Koncentracije ovog ekstrakta neophodne da inhibiraju 50% ćelijskog rasta za RD i Hep2c ćelije su iznosile 10,55 i 10,65  $\mu\text{g/ml}$ , redom.



## **6. Literatura**

- Abadi, M.D.M., Ashraf, N., Chamsaz, M., Shemirani, F. (2012). An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV-Vis spectrophotometry, *Talanta*, **99**, 1-12.
- Abaide, R., E., Ugalde, G., Di Luccio, M., Moreira, R. de F.P.M., Tres, M.V., Zobot, G.L., Mazutti, M.A. (2019a). Obtaining fermentable sugars and bioproducts from rice husks by subcritical water hydrolysis in a semi-continuous mode, *Bioresource Technology*, **272**, 510-520.
- Abaide, E.R., Mortari, S.R., Ugalde, G., Valério, A., Amorim, S.M., Di Luccio, M., Moreira, R. de F.P.M., Kuhn, R.C., Priamo, W.L., Tres, M.V., Zobot, G.L., Mazutti, M.A. (2019b). Subcritical water hydrolysis of rice straw in a semi-continuous mode, *Journal of Cleaner Production*, **209**, 386-397.
- Achinas, S., Achinas, V., Euverink, G.J.W. (2017). A technological overview of biogas production from biowaste, *Engineering*, **3**, 299-307.
- Acikgoz, C., Kockar, O.M. (2007). Flash pyrolysis of linseed (*Linum usitatissimum* L.) for production of liquid fuels, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **78**, 406-412.
- Adefegha, S.A., Oboh, G., Ejakpovi, I.I., Oyeleye, S.I. (2015). Antioxidant and antidiabetic effects of gallic and protocatechuic acids: A structure-function perspective, *Comparative Clinical Pathology*, **24**, 1579-1585.
- Adekunle, K.F., Okolie, J.A. (2015). A review of biochemical process of anaerobic digestion, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **6**, 205-212.
- Adisakwattana, S., Thilavech, T., Sompong, W., Pasukamonsent, P. (2017). Interaction between ascorbic acid and gallic acid in a model of fructose-mediated protein glycation and oxidation, *Electronic Journal of Biotechnology*, **27**, 32-36.
- Agatonovic-Kustrin, S., Kettle, C., Morton, D.W. (2008). A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **106**, 553-565.
- Agawane, S.B., Gupta, V.S., Kulkarni, M.J., Bhattacharya, A.K., Koratkar, S.S. (2018). Chemo-biological evaluation of antidiabetic activity of *Mentha arvensis* L. and its role in inhibition of advanced glycation end products, *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.07.003>.
- Aguilera-Herrador, E., Lucena, R., Cárdenas, S., Valcárcel, M. (2008). Determination of trihalomethanes in waters by ionic liquid-based single drop microextraction/gas chromatographic/mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1209**, 76-82.
- Ahmad, A.A., Zawawi, N.A., Kasim, F.H., Inayat, A., Khasri, A. (2016). Assessing the gasification performance of biomass: A review on biomass gasification process conditions,

- optimization and economic evaluation, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **53**, 1333-1247.
- Ahmad, I., Shamsi, S., Zaman, R. (2017). A review on sour cherry (*Prunus cerasus*): A high value Unani medicinal fruit, *International Journal of Green Pharmacy*, **11**, 1-6.
- Ahmad, H., Ahmad, S., Ali, M., Latif, A., Shah, S.A.A., Naz, H., ur Rahman, N., Shaheen, F., Wadood, A., Khan, H.U., Ahmad, M. (2018). Norditerpenoid alkaloids of *Delphinium denudatum* as cholinesterase inhibitors, *Bioorganic Chemistry*, **78**, 427-435.
- Ahmadian-Kouchaksaraie, Z., Naizmand, R., Najafi, M.N. (2016). Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from Crocus sativus petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **36**, 234-244.
- Ahmed, R., Chun, B.S. (2018). Subcritical water hydrolysis for the production of bioactive peptides from tuna skin collagen, *The Journal of Supercritical Fluids*, **141**, 88-96.
- Aires, A., Dias, C., Carvalho, R., Saavedra, M.J. (2017). Analysis of glycosylated flavonoids extracted from sweet-cherry stems, as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia coli* isolates, *Acta Biochimica Polonica*, **64**, 265-271.
- Ajayi, O.S., Aderogba, M.A., Obuotor, E.M., Majinda, R.R.T. (2019). Acetylcholinesterase inhibitor from *Anthocleista vogelii* leaf extracts, *Journal of Ethnopharmacology*, **231**, 503-506.
- Al-Dbass, A.M. (2010). N-Acetylcysteine reduces the neurotoxic effects of propionic acid in rat pups, *Journal of King Saud University – Science*, **26**, 254-260.
- Al-Farsi, M.A., Lee, C.Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds, *Food Chemistry*, **108**, 977-985.
- Al-Lahham, S.H., Peppelenbosch, M.P., Roelofsen, H., Vonk, R.J., Venema, K. (2010). Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1801**, 1175-1183.
- Almeida, A., Ribeiro, A., Ramalho, E., Piláo, R. (2018). Crude glycerol gasification in a fixed bed gasifier, *Energy Procedia*, **153**, 149-153.
- An, J., Trujillo-Rodríguez, M.J., Pino, V., Anderson, J.L. (2017). Non-conventional solvents in liquid phase microextraction and aqueous biphasic systems, *Journal of Chromatography A*, **1500**, 1-23.
- Andelković, M.Z. (2015). Optimizacija ekstrakcije i karakterizacija fenolnih jedinjenja i bio ulja iz sorti Vranac i Merlo (*Vitis vinifera* L.) i njihova potencijalna primena, *Doktorska disertacija*, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš.

- Angin, D. (2014). Production and characterization of activated carbon from sour cherry stones by zinc chloride, *Fuel*, **115**, 804-811.
- Annamalai, S., Mohanam, L., Raja, V., Dev, A., Prabhu, V. (2017). Antiobesity, antioxidant and hepatoprotective effects of Diallyl trisulphide (DATS) alone or in combination with Orlistat on HFD induced obese rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **93**, 81-87.
- Anwar, J., Spanevello, R.M., Thomé, G., Stefanello, N., Schmatz, R., Gutierrez, J., Vieira, J., Baldissarelli, J., Carvalho, F.B., da Rosa, M.M., Rubin, M.A., Fiorenza, A., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C. (2012). Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **103**, 386-394.
- Arjun, P., Nagasundaram, N., Prakash, V.S.G., Kannan, R.R. (2018). Zebrafish bio-assay guided isolation of human acetylcholinesterase inhibitory *trans*-tephrostachin from *Tephrosia purpurea* (L.) Pers, *Neuroscience Letters*, **687**, 268-275.
- Arun, A., Patel, O.P.S., Saini, D., Yadav, P.P., Konwar, R. (2017). Anti-colon cancer activity of *Murraya koenigii* leaves is due to constituent murrayazoline and O-methylmurrayamine A induced mTOR/AKT downregulation and mitochondrial apoptosis, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **93**, 510-521.
- Asaduzzaman, A.K.M., Chun, B.S. (2015). Recovery of functional materials with thermally stable antioxidative properties in squid muscle hydrolyzates by subcritical water, *Journal of Food Science and Technology*, **52**, 793-802.
- Asghari, F.S., Yoshida, H. (2010). Conversion of Japanese red pine wood (*Pinus densiflora*) into valuable chemicals under subcritical water conditions, *Carbohydrate Research*, **345**, 124-131.
- Asghari, B., Zengin, G., Bahadori, M.B., Abbas-Mohammadi, M., Dinparast, L. (2018). Amylase, glucosidase, tyrosinase, and cholinesterases inhibitory, antioxidant effects, and GC-MS analysis of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha*) essential oil: A natural remedy, *European Journal of Integrative Medicine*, **22**, 44-49.
- AsokKumar, K., UmaMaheswari, M., Sivashanmugam, A.T., SubhadraDevi, V., Subhashini, N., Ravi, T.K. (2009). Free radical scavenging and antioxidant activities of *Glinus oppositifolius* (carpet weed) using different *in vitro* assay systems, *Pharmaceutical Biology*, **47**, 474-482.
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., Mahomoodally, M.F. (2016). Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants, *South African Journal of Botany*, **103**, 89-94.

- Bacanli, M., Başaran, A.A., Başaran, N. (2015). The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin, *Food and Chemical Toxicology*, **81**, 160-170.
- Bahri, S., Jameleddine, S., Shlyonsky, V. (2016). Relevance of carnosic acid to the treatment of several health disorders: Molecular targets and mechanisms, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **84**, 569-582.
- Balachandran, N., Heimhalt, M., Liuni, P., To, F., Wilson, D.J., Junop, M.S., Berti, P.J. (2016). Potent inhibition of 3-Deoxy-d-arabinoheptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase by DAHP oxime, a phosphate group mimic, *Biochemistry*, **55**, 6617-6629.
- Balaji, M., Ganjaji, M.S., Kumar, G.E.N.H., Parim, B.N., Mopuri, R., Dasari, S. (2016). A review on possible therapeutic targets to contain obesity: The role of phytochemicals, *Obesity Research & Clinical Practice*, **10**, 363-380.
- Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., Rapisarda, P. (2013). Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy, *Food Chemistry*, **140**, 630-638.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**, 71-79.
- Barage, S.H., Sonawane, K.D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease, *Neuropeptides*, **52**, 1-18.
- Baris, E., Bedó, J., Edosa, O.S., Kiss, E., Veres, A. (2017). Preliminary results of SSR based characterization of sour (*Prunus cerasus* L.) and sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes cultivated in Hungary, *Columella – Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, **4**, 31-45.
- Barroso, M.F., Ramalhosa, M.J., Alves, R.C., Dias, A., Soares, C.M.D., Oliva-Teles, M.T., Delerue-Matos, C. (2016). Total antioxidant capacity of plant infusions: Assessment using electrochemical DNA-based biosensor and spectrophotometric methods, *Food Control*, **68**, 153-161.
- Bartocci, P., Bidini, G., Asdrubali, F., Beatrice, C., Frusteri, F., Fantozzi, F. (2018). Batch pyrolysis of pellet made of biomass and crude glycerol: Mass and energy balances, *Renewable Energy*, **124**, 172-179.
- Bastos, C., Barros, L., Dueñas, M., Calhelha, R.C., Queiroz, M.J.R.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2015). Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L.: The widely studied fruits and the unexplored stems, *Food Chemistry*, **173**, 1045-1053.

- Baviskar, B.A., Khadabadi, S.S., Deore, S.L., Shiradkar, M.R. (2012). Synthesis of clubbed triazolyl indeno[1,2-C]isoquinolines as a novel anticancer agent, *Der Pharmacia Sinica*, **3**, 24-30.
- Bayr, S., Rintala, J. (2012). Thermophilic anaerobic digestion of pulp and paper mill primary sludge and co-digestion of primary and secondary sludge, *Water Research*, **46**, 4713-4720.
- Bello, O.M., Ibitoye, T., Adetunji, C. (2018). Assessing antimicrobial agents of Nigeria flora, *Journal of King Saud University – Science*, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.017>.
- Benjumea, J.M., Sánchez-Oneto, J., Portela, J.R., de la Ossa, E.J.M. (2017). Temperature control in a supercritical water oxidation reactor: Assessing strategies for highly concentrated wastewaters, *The Journal of Supercritical Fluids*, **119**, 72-80.
- Bermejo, M.D., Cocero, M.J. (2006). Destruction of an industrial wastewater by supercritical water oxidation in a transpiring wall reactor, *Journal of Hazardous Materials*, **B137**, 965-971.
- Bessada, S.M.F., Barreira, J.C.M., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., Oliveira, M.B.P.P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species, *Industrial Crops and Products*, **89**, 45-51.
- Bhatia, S.K., Joo, H.S., Yang, Y.H. (2018). Biowaste-to-bioenergy using biological methods – A mini-review, *Energy Conversion and Management*, **177**, 640-660.
- Bhuiya, M.M.K., Rasul, M.G., Khan, M.M.K., Ashwath, N., Azad, A.K. (2016). Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel–Part: 1 selection of feedstocks, oil extraction techniques and conversion technologies, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **55**, 1109-1128.
- Blagojević, R., Božić, V., Stanković, M. (2012). *Tehnologija proizvodnje višnje i marele*, Kancelarija za program podrške u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš.
- Blando, F., Gerardi, C., Nicoletti, I. (2004). Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) anthocyanins as ingredients for functional foods, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2004**, 253-258.
- Bocks, S.M. (1967). Fungal metabolism-I.: The transformations of coumarin, *o*-coumaric acid and *trans*-cinnamic acid by *Aspergillus niger*, *Phytochemistry*, **6**, 127-130.
- Bogucka-Kocka, A., Zidorn, C., Kasprzycka, M., Szymczak, G., Szewczyk, K. (2018). Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoë* species, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **25**, 622-630.

- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M.J., Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria, *Microbial Drug Resistance*, **19**, 256-265.
- Botrel, B.M.C., Abreu, D.C.P., Saczk, A.A., Bazana, M.J.F., Nascimento, C.D.F., Rosa, P.V. (2017). Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of menthol residue in fish by GC-MS, *Microchemical Journal*, **133**, 70-75.
- Bouddine, L., Louaste, B., Achahbar, S., Chami, N., Chami, F., Remmal, A. (2012). Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods, *African Journal of Biotechnology*, **11**, 14083-14087.
- Bozkurt, A.A., Mustafa, G., Tarik, A., Adile, O., Murat, S.H., Mesut, K., Yildiray, K., Coskun, S., Murat, C. (2014). Syringaldehyde exerts neuroprotective effect on cerebral ischemia injury in rats through anti-oxidative and anti-apoptotic properties, *Neural Regeneration Research*, **9**, 1884-1890.
- Brachi, P., Chirone, R., Miccio, F., Miccio, M., Picarelli, A., Ruoppolo, G. (2014). Fluidized bed co-gasification of biomass and polymeric wastes for a flexible end-use of the syngas: Focus on bio-methanol, *Fuel*, **128**, 88-98.
- Bravo, M.A., Parra, S., Vargas, C., Quiroz, W. (2017a). Determination of organotin compounds in sediment samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography – pulsed flame photometric detection (DLLME-GC-PFPD), *Microchemical Journal*, **134**, 49-53.
- Bravo, C., Garcés, D., Faba, L., Sastre, H., Ordóñez, S. (2017b). Selective arabinose extraction from *Pinus* sp. sawdust by two-step soft acid hydrolysis, *Industrial Crops & Products*, **104**, 229-136.
- Breton, M.L., Bannan, T.J., Shallcross, D.E., Khan, M.A., Evans, M.J., Lee, J., Lidster, R., Andrews, S., Carpenter, L.J., Schmidt, J., Jacob, D., Harris, N.R.P., Bauguitte, S., Gallagher, M., Bacak, A., Leather, K.E., Percival, C.J. (2017). Enhanced ozone loss by active inorganic bromine chemistry in the tropical troposphere, *Atmospheric Environment*, **155**, 21-28.
- Bridgwater, A.V. (2003). Renewable fuels and chemicals by thermal processing of biomass, *Chemical Engineering Journal*, **91**, 87-102.
- Bubalo, M.C., Vidović, S., Redovniković, I.R., Jokić, S. (2015). Green solvents for green technologies, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **90**, 1631-1639.

- Buchholz, T., Melzig, M.F. (2016). Medicinal plants traditionally used for treatment of obesity and diabetes mellitus - screening for pancreatic lipase and  $\alpha$ -amylase inhibition, *Phytotherapy Research*, **30**, 260-266.
- Bueno, J. (2012). *In vitro* antimicrobial activity of natural products using minimum inhibitory concentrations: Looking for new chemical entities or predicting clinical response, *Medicinal & Aromatic Plants*, **1**, 113.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ, Bilsel, G., Gören, A.C. (2013). Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS, *Food Research International*, **51**, 66-74.
- Buyel, J.F. (2018). Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents, *Biotechnology Advances*, **36**, 506-520.
- Cacace, J.E., Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries, *Journal of Food Engineering*, **59**, 379-389.
- alvo, B., Cepeda, E.A. (2008). Solubilities of stearic acid in organic solvents and in azeotropic solvent mixtures, *Journal of Chemical & Engineering Data*, **53**, 628-633.
- Cao, T.Q., Ngo, Q.M.T., Seong, S.H., Youn, U.J., Kim, J.A., Kim, J., Kim, J.C., Woo, M.H., Choi, J.S., Min, B.S. (2018). Cholinesterase inhibitory alkaloids from the rhizomes of *Coptis chinensis*, *Bioorganic Chemistry*, **77**, 625-632.
- Car, Ž., Peroković, V.P., Pisarović, S.T. (2017). 3-Hidroksipiridin-4-oni (II. dio): Biološka primjena kao kelatora željeza, *Kemija u industriji*, **66**, 17-28.
- Carasek, E., Morés, L., Merib, J. (2018). Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, **19**, e00060.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology*, **51**, 15-25.
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine), *Analytical Biochemistry*, **40**, 450-458.
- Cen, Y., Xiao, A., Chen, X., Liu, L. (2016). Isolation of  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Kadsura longipedunculata* using a high-speed counter-current chromatography target guided by centrifugal ultrafiltration with LC-MS, *Molecules*, **21**, 1190.
- Chang, T.S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors, *International Journal of Molecular Sciences*, **10**, 2440-2475.



- Chang, S.J., Liu, Y.C., Yang, X.Q. (2013). Study on explosive wastewater treatment by supercritical water oxidation, *Advanced Materials Research*, **610-613**, 1934-1938.
- Chedda, U., Kaikini, A., Bagle, S., Seervi, M., Sathaye, S. (2016). *In vitro* pancreatic lipase inhibition potential of commonly used Indian spices, *IOSR Journal of Pharmacy*, **6**, 10-13.
- Chen, B.J., Shi, M.J., Cui, S., Hao, S.X., Hider, R.C., Zhou, T. (2016). Improved antioxidant and anti-tyrosinase activity of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* by degradation, *International Journal of Biological Macromolecules*, **92**, 715-722.
- Chen, J., Yan, S., Zhang, X., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valéro, J.R. (2018a). Chemical and biological conversion of crude glycerol derived from waste cooking oil to biodiesel, *Waste Management*, **71**, 164-175.
- Chen, T.Y., Wang, M.M.C., Hsieh, S.K., Hsieh, M.H., Chen, W.Y., Tzen, J.T.C. (2018b). Pancreatic lipase inhibition of strictinin isolated from Pu'er tea (*Cammelia sinensis*) and its anti-obesity effects in C57BL6 mice, *Journal of Functional Foods*, **48**, 1-8.
- Chen, Y.M., Su, W.C., Li, C., Shi, Y., Chen, Q.X., Zheng, J., Tang, D.L., Chen, S.M., Wang, Q. (2019). Anti-melanogenesis of novel kojic acid derivatives in B16F10 cells and zebrafish, *International Journal of Biological Macromolecules*, **123**, 723-731.
- Cheng, H., Zhu, X., Zhu, C., Qian, J., Zhu, N., Zhao, L., Chen, J. (2008). Hydrolysis technology of biomass waste to produce amino acids in sub-critical water, *Bioresurce Technology*, **99**, 3337-3341.
- Chiari, M.E., Vera, D.M.A., Palacios, S.M., Carpinella, M.C. (2011). Tyrosinase inhibitory activity of a 6-isoprenoid-substituted flavanone isolated from *Dalea elegans*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **19**, 3474-3482.
- Chikara, S., Nagaprashantha, L.D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., Singhal, S.S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment, *Cancer Letters*, **413**, 122-134.
- Chio, I.I.C., Tuveson, D.A. (2017). ROS in cancer: The burning question, *Trends in Molecular Medicine*, **23**, 411-429.
- Chirsty, P.M., Gopinath, L.R., Divya, D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **34**, 167-173.
- Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., Sumnu, G. (2012). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio, *European Food Research and Technology*, **235**, 587-596.

- Coimbra, R.N., Calisto, V., Ferreira, C.I.A., Esteves, V.I., Otero, M. (2015). Removal of pharmaceuticals from municipal wastewater by adsorption onto pyrolyzed pulp mill sludge, *Arabian Journal of Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.12.001>.
- Costa, J.F.O., Barbosa-Filho, J.M., Maia, G.L. de A., Guimarães, E.T., Meira, C.S., Ribeiro-dos-Santos, R., de Carvalho, L.C.P., Soares, M.B.P. (2014). Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia, *International Immunopharmacology*, **23**, 469-474.
- Crnobrnja, V., Srdić, B., Stokić, E., Dujmović, F., Andrejić, B. (2012). Analiza učestalosti rizičnih oblika gojaznosti kod studenata Novosadskog univerziteta, *Medicinski pregled*, **65**, 133-137.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26**, 343-356.
- Cuyckens, F., Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, *Journal of Mass Spectrometry*, **39**, 1-15.
- Cvetanović, A. (2016). Optimizacija savremenih ekstrakcionih postupaka za izolovanje apigenina iz cveta kamilice (*Chamomilla recutita* L.) i karakterizacija biološke aktivnosti dobijenih ekstrakata, *Doktorska disertacija*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Mašković, P., Savić, S., Nikolić, Lj. (2015). Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds, *Industrial Crops and Products*, **65**, 582-591.
- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Gašić, U., Tešić, Ž., Zengin, G., Zeković, Z., Đurović, S. (2017a). Isolation of apigenin from subcritical water extracts: Optimization of the process, *The Journal of Supercritical Fluids*, **120**, 32-42.
- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Zeković, Z., Mašković, P., Đurović, S., Zengin, G., Delerue-Matos, C., Lozano-Sánchez, J., Jakšić, A. (2017b). Chemical and biological insights on aronia stems extracts obtained by different extraction techniques: From wastes to functional products, *The Journal of Supercritical Fluids*, **128**, 173-181.
- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Zeković, Z., Gašić, U., Tešić, Ž., Zengin, G., Mašković, P., Mahomoodally, M.F., Đurović, S. (2018a). Subcritical water extraction as a cutting edge technology for the extraction of bioactive compounds from chamomile: Influence of pressure on chemical composition and bioactivity of extracts, *Food Chemistry*, **266**, 389-396.

- Cvetanović, A., Zeković, Z., Švarc-Gajić, J., Razić, S., Damjanović, A., Zengin, G., Delerue-Matos, C., Moreira, M. (2018b). A new source for developing multi-functional products: Biological and chemical perspectives on subcritical water extracts of *Sambucus ebulus* L., *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **93**, 1097-1104.
- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Zeković, Z., Jerković, J., Zengin, G., Gašić, U., Tešić, Ž., Mašković, P., Soares, C., Barroso, M.F., Delerue-Matos, C., Đurović, S. (2019). The influence of the extraction temperature on polyphenolic profiles and bioactivity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) subcritical water extracts, *Food Chemistry*, **266**, 389-396.
- Čabarkapa, I. (2015). Sposobnost formiranja biofilma različitih sojeva *Salmonella* Enteritidis i inhibitorni efekat etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm, *Doktorska disertacija*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Das, S., Ghosh, P., Koley, S., Roy, A.S. (2018). Binding of naringin and naringenin with hen egg white lysozyme: A spectroscopic investigation and molecular docking study, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **192**, 211-221.
- Dasappa, R.N.S. (2018). A critical assessment of tar generated during biomass gasification - Formation, evaluation, issues and mitigation strategies, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **91**, 1045-1064.
- Dasgupta, A., Klein, K. (2014). *Antioxidants in food, vitamins and supplements: Prevention and treatment of disease*, Elsevier Inc., San Diego, USA.
- Dash, B.K., Faruquee, H.M., Biswas, S.K., Alam, M.K., Sisir, S.M., Prodhan, U.K. (2011). Antibacterial and antifungal activities of several extracts of *Centella asiatica* L. against some human pathogenic microbes, *Life Sciences and Medicine Research*, **2011**, LSMR-35.
- Davis, P.J., Liu, M., Alemi, F., Jensen, A., Avramović, S., Levy, E., Hayes, R.B., Schwartz, M.D. (2019). Prior antibiotic exposure and risk of type 2 diabetes among Veterans, *Primary Care Diabetes*, **13**, 49-56.
- de Candia, M., Zaetta, G., Denora, N., Tricarico, D., Majellaro, M., Cellamare, S., Altomare, C.D. (2017). New azepino[4,3-b]indole derivatives as nanomolar selective inhibitors of human butyrylcholinesterase showing protective effects against NMDA-induced neurotoxicity, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **125**, 288-298.
- de Freitas, M.M., Fontes, P.P., Souza, P.M., Fagg, C.W., Guerra, E.N.S., NoAbrega, Y.K.D.M., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y., Simeoni, L.A., Homem-de-Mello, M., Magalhães, P.A.

- (2016). Extracts of *Morus nigra* L. leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: Tyrosinase inhibition and cytotoxicity, *PloS ONE*, **11**, e0163130.
- de Hoog, E., Lukewich, M.K., Spencer, G.E. (2018). Retinoic acid inhibits neuronal voltage-gated calcium channels, *Cell Calcium*, **72**, 51-61.
- de Souza, P.O., Bianchi, S.E., Figueiró, F., Heimfarth, L., Moresco, K.S., Gonçalves, R.M., Hoppe, J.B., Klein, C.P., Salbego, C.G., Gelain, D.P., Bassani, V.L., Filho, A.Z., Moreira, J.C.F. (2018). Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines, *Toxicology in Vitro*, **51**, 23-33.
- Dechakhamphu, A., Wongchum, N. (2015). Screening ant-pancreatic lipase properties of 28 traditional Thai medicinal herbs, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **5**, 1042-1045.
- Del Cueto, J., Ionescu, I.A., Pičmanová, M., Gericke, O., Motawia, M.S., Olsen, C.E., Campoy, J.A., Dicenta, F., Møller, B.L., Sánchez-Pérez, R. (2017). Cyanogenic glucosides and derivatives in almond and sweet cherry flower buds from dormancy to flowering, *Frontiers in Plant Science*, <https://doi.org/10.3389>.
- Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J.A., Morales, F.J. (2005). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 7832-7836.
- Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. (2003). *Natural colorants for food and nutraceutical uses*, CRC Press LLC, Boca Raton, USA.
- Dewick, P.M. (2002). *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*, second edition, John Wiley & Sons, Ltd, New York. USA.
- Dias, M.I., Barros, L., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2014). Nutritional composition, antioxidant activity and phenolic compounds of wild *Taraxacum* sect. *Ruderalia*, *Food Research International*, **56**, 266-271.
- Dighe, R.D., Shiradkar, M.R., Rohom, S.S., Dighe, P.D. (2011). Synthesis and SAR of methyl linked cyclohexyl thiophenyl triazoles for their Anti-Alzheimer activity, *Der Chemica Sinica*, **2**, 70-87.
- Dobaradran, S., Nabizadeh, R., Mahvi, A.H., Mesdaghinia, A.R., Naddafi, K., Yunesian, M., Rastkari, N., Nazmara, Sh. (2010). Survey on degradation rates of trichloroethylene in aqueous solutions by ultrasound, *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, **7**, 307-312.

- Dodd, M.C., Stillman, W.B., Roys, M., Crosby, C. (1944). The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **82**, 11-18.
- Dodds, D.R. (2017). Antibiotic resistance: A current epilogue, *Biochemical Pharmacology*, **134**, 139-146.
- dos Anjos., J.P., de Andrade, J.B. (2014). Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC-MS, *Microchemical Journal*, **112**, 119-126.
- Dou, X., Ren, F., Nguyen, M.Q., Ahamed, A., Yin, K., Chan, W.P., Chang, V.W.C. (2017). Review of MSWI bottom ash utilization from perspectives of collective characterization, treatment and existing application, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **79**, 24-38.
- Du, X., Bai, M., Huang, Y., Jiang, Z., Chen, F., Ni, H., Li, Q. (2018). Inhibitory effect of astaxanthin on pancreatic lipase with inhibition kinetics integrating molecular docking simulation, *Journal of Functional Foods*, **48**, 551-557.
- Dziadek, K., Kopeć, A., Tabaszewska, M. (2019). Potential of sweet cherry (*Prunus avium* L.) by-products: bioactive compounds and antioxidant activity of leaves and petioles, *European Food Research and Technology*, **245**, 763-772.
- Dzierżęga-Lęcznar, A., Kurkiewicz, S., Tam, I., Marek, Ł., Stępień, K. (2017). Pheomelanin content of cultured human melanocytes from lightly and darkly pigmented skin: A pyrolysis-gas chromatography/tandem mass spectrometry study, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **124**, 349-354.
- Đorđević, M., Antunović, M., Rusić, B., Denić, K., Đorđević, S. (2014). Dijagnostički značaj određivanja aktivnosti holinesteraze, *MD-Medical Data*, **6**, 143-146.
- Đukić, M.M. (2008). *Oksidativni stres: Kliničko-dijagnostički značaj*, Mono i Manjana, Beograd.
- Egan, A.M., Dinneen, S.F. (2014). What is diabetes?, *Medicine*, **42**, 679-681.
- Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M. (2016). Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: Updated review of mechanisms and catalyzing metals, *Phytotherapy Research*, **30**, 1379-1391.
- Ekpenyong, C.E., Akpan, E., Nyoh, A. (2015). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts, *Chinese Journal of Natural Medicines*, **13**, 321-337.

- Erşan, S., Üstündağ, Ö.G., Carle, R., Schweiggert, R.M. (2018). Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls, *Food Chemistry*, **253**, 46-54.
- Eruygur, N., Koçyiğit, U.M., Taslimi, P., Ataş, M., Tekin, M., Gülçin. İ. (2019). Screening the *in vitro* antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase, antidiabetic activities of endemic *Achillea cucullata* (Asteraceae) ethanol extract, *South African Journal of Botany*, **120**, 141-145.
- Espín, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 648-656.
- Esteban, M.B., García, A.J., Márquez, M.C. (2010). Sub-critical water hydrolysis of hog hair for amino acid production, *Bioresource Technology*, **101**, 2472-2476.
- Everett, S.A., Dennis, M.F., Patel, K.B., Maddix, S., Kundu, S.C., Willson, R.L. (1996). Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl, and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant  $\beta$ -carotene, *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 3988-3994.
- Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., Walker, R.B. (2010). A thorough study of reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu reagent, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 8139-8144.
- Fabian, C., Tran-Thi, N.Y., Kasim, N.S., Ju, Y.H. (2010). Release of phenolic acids from defatted rice bran by subcritical water treatment, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 2576-2581.
- Fabri, R.L., Nogueira, M.S., Braga, F.G., Coimbra, E.S., Scio, E. (2009). *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects, *Bioresource Technology*, **100**, 428-433.
- Fatiha, B., Didier, H., Naima, G., Khodir, M., Martin, K., Léocadie, K., Caroline, S., Mohamed, C., Pierre, D. (2015). Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. Spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae), *Industrial Crops and Products*, **74**, 722-730.
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C.I.G., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., Cabras, P. (2007). Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 963-969.

- Fernández, E., Vidal, L. (2014). Liquid-phase extraction and microextraction, In: *Ionic liquids in separation technology* (Ríos, A.P.D.L., Fernández, F.J.H., eds.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Figueiredo-González, M., Grosso, C., Valentão, P., Andrade, P.B. (2016).  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose?, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **118**, 322-327.
- Franco, R.R., Carvalho, D. da S., de Moura, F.B.R., Justino, A.B., Silva, H.C.G., Peixoto, L.G., Espindola, F.S. (2018). Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes *mellitus*, *Journal of Ethnopharmacology*, **215**, 140-146.
- Fujii, S., Aoki, H., Komoto, M., Munakata, K. (1971). Production of melilotic acid by action of *Taphrina wiesneri*, *Agricultural and Biological Chemistry*, **35**, 1133-1138.
- Gagliese, L., Gauthier, L.R., Narain, N., Freedman, T. (2018). Pain, aging and dementia: Towards a biopsychosocial model, *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, **87**, 207-2015.
- Gale, S.A., Acar, D., Daffner, K.R. (2018). Dementia, *The American Journal of Medicine*, **131**, 1161-1169.
- Gao, L., Mazza, G. (1995). Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 343-346.
- Gayathri, G., Srinikethan, G. (2018). Crude glycerol as a cost effective carbon source for the production of cellulose by *K. saccharivorans*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **16**, 326-330.
- Geibel, M., Feucht, W. (1991). Flavonoid 5-glucosides from *Prunus cerasus* bark and their characteristic weak glycosidic bonding, *Phytochemistry*, **30**, 1519-1521.
- Geibel, M., Geiger, H., Treutter, D. (1990). Tectochrysin 5- and genistein 5-glucosides from the bark of *Prunus cerasus*, *Phytochemistry*, **29**, 1351-1353.
- Gheibi, N., Zavareh, S.H., Behbahani, G.R.R., Haghbeen, K., Sirati-sabet, M., Ilghari, D., Chegini, K.G. (2016). Comprehensive kinetic and structural studies of different flavonoids inhibiting diphenolase activity of mushroom tyrosinase, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **52**, 304-310.
- Gökbulut, A., Orhan, N., Orhan, D.D. (2017). Phenolic compounds characterization, carbohydrate digestive enzyme inhibitory and antioxidant activities of *Hieracium pannosum* Bioss, *South African Journal of Botany*, **108**, 387-392.

- Gonçalves, A.C., Bento, C., Silva, B.M., Silva, L.R. (2017a). Sweet cherries from Fundão possess antidiabetic potential and protect human erythrocytes against oxidative damage, *Food Research International*, **95**, 91-100.
- Gonçalves, S., Romano, A. (2017b). Inhibitory properties of phenolic compounds against enzymes linked with human diseases, In: *Phenolic compounds - Biological activity* (Soto-Hernández, M., Palma-Tenango, M., Garcíá-Mateos, M. del R., eds.), *InTech*, DOI: 10.5772/66844.
- González, J.F., Encinar, J.M., Canito, J.L., Sabio, E., Chacón, M. (2003). Pyrolysis of cherry stones: energy uses of the different fractions and kinetic study, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **67**, 165-190.
- González, A., Avivar, J., Cerdá, V. (2015). Determination of priority phenolic pollutants exploiting an in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction-multisyringe chromatography system, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **407**, 2013-2022.
- González-Sálamo, J., González-Curbelo, M.A., Socas-Rodríguez, B., Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.A. (2018). Determination of phthalic acid esters in water samples by hollow fiber liquid-phase microextraction prior to gas chromatography tandem mass spectrometry, *Chemosphere*, **201**, 254-261.
- Górnaś, P., Mišina, I., Ruisa, S., Rubauskis, E., Lācis, G., Segliņa, D. (2015). Composition of tocochromanols in kernels recovered from different sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars: RP-HPLC/FLD and RP-UPLC-ESI/MS<sup>n</sup> study, *European Food Research and Technology*, **240**, 663-667.
- Górnaś, P., Rudzińska, M., Raczyk, M., Mišina, I., Soliven, A., Segliņa, D. (2016a). Composition of bioactive compounds in kernel oils recovered from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) by-products: Impact of the cultivar on potential applications, *Industrial Crops and Products*, **82**, 44-50.
- Górnaś, P., Rudzińska, M., Raczyk, M., Mišina, I., Segliņa, D. (2016b). Impact of cultivar on profile and concentration of lipophilic bioactive compounds in kernel oils recovered from sweet cherry (*Prunus avium* L.) by-products, *Plant Foods from Human Nutrition*, **71**, 158-164.
- Goyal, H.B., Seal, D., Saxena, R.C. (2008). Bio-fuels from thermochemical conversion of renewable resources: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **12**, 504-517.
- Grafit, A., Muller, D., Kimchi, S., Avissar, Y.Y. (2018). Development of a solid-phase microextraction (SPME) fiber protector and its application in flammable liquid residues analysis, *Forensic Science International*, **292**, 138-147.



- Graidist, P., Martla, M., Sukpondma, Y. (2015). Cytotoxic activity of *Piper cubeba* extract in breast cancer cell lines, *Nutrients*, **7**, 2707-2718.
- Grochowski, D.M., Uysal, S., Aktumsek, A., Granica, S., Zengin, G., Ceylan, R., Locatelli, M., Tomczyk, M. (2017). *In vitro* enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of *Potentilla thuringiaca*, *Phytochemistry Letters*, **20**, 365-372.
- Gruhlke, M.C.H., Slusarenko, A.J. (2012). The biology of reactive sulfur species (RSS), *Plant Physiology and Biochemistry*, **59**, 98-107.
- Grzesik, M., Naparło, K., Bartosz, G., Sadowska-Bartosz, I. (2018). Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants, *Food Chemistry*, **241**, 480-492.
- Guedes, R.E., Luna, A.S., Torres, A.R. (2018). Operating parameters for bio-oil production in biomass pyrolysis: A review, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **129**, 134-149.
- Guil-Guerrero, J.L., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes, J.C., Carlosama-Yepep, M., Ruales, P. (2016). Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics, *Livestock Science*, **189**, 32-49.
- Guiñez, M., Martinez, L.D., Fernandez, L., Cerutti, S. (2017). Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop and fluorescence detection for the determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples, *Microchemical Journal*, **131**, 1-8.
- Gulick, A.M., Fahl, W.E. (1995). Mammalian glutathione S-transferase: Regulation of an enzyme system to achieve chemotherapeutic efficacy, *Pharmacology & Therapeutics*, **66**, 237-257.
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview, *Archives of Toxicology*, **86**, 345-391.
- Habtemariam, S. (2013). Antihyperlipidemic components of *Cassia auriculata* aerial parts: Identification through *in vitro* studied, *Phytotherapy Research*, **27**, 152-155.
- Haghighi Asl, A., Khajenoori, M. (2013). Subcritical water extraction, In: *Mass transfer – Advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling* (Nakajima, H., ed.), *InTech*, DOI: 10.5772/54993.
- Hall, I.H., Wong, O.T., Reynolds, D.J., Chang, J.J. (1993). Hypolipidemic effects of 2-furoic acid in *Sprague-Dawley* rats, *Archiv der Pharmazie*, **326**, 15-23.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human diseases: A general introduction, *Nutrition Reviews*, **55**, S44-S49.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free radicals in biology and medicine*, fifth edition, Oxford University Press Inc., New York, USA.

- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology*, **142**, 231-255.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, **55**, 481-504.
- He, L., Zhang, X., Xu, H., Xu, C., Yuan, F., Knez, Ž., Novak, Z., Gao, Y. (2012). Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS<sup>+</sup> assay, *Food and Bioproducts Processing*, **90**, 215-223.
- Hegde, S., Lodge, J.S., Trabold, T.A. (2018). Characteristics of food processing wastes and their use in sustainable alcohol production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **81**, 510-523.
- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites *versus* parent compounds: A review, *Food Chemistry*, **173**, 501-513.
- Hinneburg, I., Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices, *Food Chemistry*, **97**, 122-129.
- Ho, C.H.L., Cacace, J.E., Mazza, G. (2008). Mass transfer during pressurized low polarity water extraction of lignans from flaxseed meal, *Journal of Food Engineering*, **89**, 64-71.
- Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (1999). Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability, *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 937-942.
- Hsu, C.K., Chiang, B.H., Chen, Y.S., Yang, J.H., Liu, C.L. (2008). Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water, *Food Chemistry*, **108**, 633-641.
- Hu, C., Jia, W. (2018). Therapeutic medications against diabetes: What we have and what we expect, *Advanced Drug Delivery Reviews*, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.11.008>.
- Hu, X., Mourant, D., Gunawan, R., Wu, L., Wang, Y., Lievens, C., Li, C.Z. (2012). Production of value-added chemicals from bio-oil via acid catalysis coupled with liquid-liquid extraction, *RSC Advances*, **2**, 9366-9370.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4437-4444.

- Huang, C.H., Chen, M.F., Chung, H.H., Cheng, J.T. (2012). Antihyperglycemic effect of syringaldehyde in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Natural Products*, **75**, 1465-1468.
- Idris, F.N., Nadzir, M.M. (2017). Antimicrobial activity of *Centella asiatica* on *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis*, *Chemical Engineering Transactions*, **56**, 1381-1386.
- Inthongkaew, P., Chatsumpun, N., Supasuteekul, C., Kitisripanya, T., Putalun, W., Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B. (2017).  $\alpha$ -Glucosidase and pancreatic lipase inhibitory activities and glucose uptake stimulatory effect of phenolic compounds from *Dendrobium formosum*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **27**, 480-487.
- Iranshahi, M., Rezaee, R., Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F. (2015). Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin, *Life Sciences*, **137**, 125-132.
- Irkin, R., Korukluoglu, M. (2007). Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts, *African Journal of Biotechnology*, **6**, 384-387.
- Isahak, W.N.R.W., Hisham, M.W.M., Yarmo, M.A., Hin, T.Y. (2012). A review on bio-oil production from biomass by using pyrolysis method, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**, 5910-5923.
- Israilides, C., Scanlon, B., Smith, A., Harding, S.F., Junkel, K. (1994). Characterization of pullulans produced from agro-industrial wastes, *Carbohydrate Polymers*, **25**, 203-209.
- Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants, *Journal of Plant Research*, **113**, 287-299.
- Jacob, R.A., Spinozzi, G.M., Simon, V.A., Kelley, D.S., Prior, R.L., Hess-Pierce, B., Kader, A.A. (2003). Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women, *The Journal of Nutrition*, **133**, 1826-1829.
- Jdey, A., Falleh, H., Jannet, S.B., Hammi, K.M., Dauvergne, X., Ksouri, R., Magné, C. (2017). Phytochemical investigation and antioxidant, antibacterial and anty-tyrosinase performances of six medicinal halophytes, *South African Journal of Botany*, **112**, 508-514.
- Jeannot, M.A., Przyjazny, A., Kokosa, J.M. (2010). Single drop microextraction-Development, applications and future trends, *Journal of Chromatography A*, **1217**, 2326-2336.
- Jiang, W., Chen, Y., He, X., Hu, S., Li, S., Liu, Y. (2018). A study of the tyramine/glucose Maillard reaction: Variables, characterization, cytotoxicity and preliminary application, *Food Chemistry*, **239**, 377-384.

- Johnson, D.T., Taconi, K.A. (2007). The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production, *Environmental Progress*, **26**, 338-348.
- Jomova, K., Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*, **283**, 65-87.
- Justino, A.B., Miranda, N.C., Franco, R.R., Martins, M.M., da Silva, N.M., Espindola, F.S. (2018). *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with *in vitro* antidiabetic and inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **100**, 83-92.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3954-3962.
- Kale, A., Gawande, S., Kotwal, S. (2008). Cancer phytotherapeutics: Role for flavonoids at the cellular level, *Phytotherapy Research*, **22**, 567-577.
- Kang, K., Quitain, A.T., Daimon, H., Noda, R., Goto, N., Hu, H.Y., Fujie, K. (2001). Optimization of amino acids production from waste fish entrails by hydrolysis in sub- and supercritical water, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **79**, 65-70.
- Kankofer, M. (2001). Antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine retained and not-retained placenta: Activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase, catalase and superoxide dismutase, *Placenta*, **22**, 466-472.
- Karamać, M., Amarowicz, R. (1996). Inhibition of pancreatic lipase by phenolic acids - examination *in vitro*, *Zeitschrift für Naturforschung C*, **51**, 903-905.
- Karim, N., Khan, I., Abdelhalim, A., Halim, H.A., Hanrahan, J.R. (2017). Molecular docking and anti-amnesic effects of nepitrin isolated from *Rosmarinus officinalis* on scopolamine-induced memory impairment in mice, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **96**, 700-709.
- Karmakar, B., Halder, G. (2019). Progress and future of biodiesel synthesis: Advancements in oil extraction and conversion technologies, *Energy Conversion and Management*, **182**, 307-339.
- Katanić, J., Ceylan, R., Matić, S., Boroja, T., Zengin, G., Aktumsek, A., Mihailović, V., Stanić, S. (2017). Novel perspectives on two *Digitalis* species: Phenolic profile, bioactivity, enzyme inhibition, and toxicological evaluation, *South African Journal of Botany*, **109**, 50-57.
- Kenific, C.M., Thorburn, A., Debnath, J. (2010). Autophagy and metastasis: Another double-edged sword, *Current Opinion in Cell Biology*, **22**, 241-245.

- Kermasha, S., Goetghebeur, M., Monfette, A., Metche, M., Rovel, B. (1993). Inhibitory effects of cysteine and aromatic acids on tyrosinase activity, *Phytochemistry*, **34**, 349-353.
- Keserović, Z., Magazin, N., Milić, B., Dorić, M. (2016). *Voćarstvo i vinogradarstvo: Deo voćarstvo*, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., Dawson, L. (2011). The anaerobic digestion of solid organic waste, *Waste Management*, **31**, 1737-1744.
- Khan, A., Khan, M.I., Iqbal, Z., Shah, Y., Ahmad, L., Watson, D.G. (2010). An optimized and validated RP-HPLC/UV detection method for simultaneous determination of all-trans-retinol (vitamin A) and  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) in human serum: Comparison of different particulate reversed-phase HPLC columns, *Journal of Chromatography B*, **878**, 2339-2347.
- Khan, R.A., Khan, M.R., Sahreen, S., Ahmed, M. (2012). Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill, *Chemistry Central Journal*, **6**, 12.
- Khopde, S.M., Priyadarsini, K.I., Mukherjee, T., Kulkarni, P.B., Satav, J.G., Bhattacharya, R.K. (1998). Does  $\beta$ -carotene protect membrane lipids from nitrogen dioxide?, *Free Radical Biology & Medicine*, **25**, 66-71.
- Khusnutdinov, R.I., Baiguzina, A.R., Mukminov, R.R., Akhmetov, I.V., Gubaidullin, I.M., Spivak, S.I., Dzhemilev, U.M. (2010). New synthesis of pyrrole-2-carboxylic and pyrrole-2,5-dicarboxylic acid esters in the presence of iron-containing catalysts, *Russian Journal of Organic Chemistry*, **46**, 1053-1059.
- Kim, D.O., Heo, H.J., Kim, Y.J., Yang, H.S., Lee, C.Y. (2005). Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 9921-9927.
- Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **254**, 86-99.
- Kocak, M.S., Uren, M.C., Calapoglu, M., Tepe, A.S., Mocan, A., Rengasamy, K.R.R., Sarikurkcü, C. (2017). Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Stachys annua* subsp. *annua* var. *annua*, *South African Journal of Botany*, **113**, 128-132.
- Kocúrová, L., Balogh, I.S., Šandrejová, J., Andruch, V. (2012). Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review, *Microchemical Journal*, **102**, 11-17.
- Kokosa, J.M. (2015). Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods, *Trends in Analytical Chemistry*, **71**, 194-2014.

- Kołodziejczyk, K., Sójka, M., Abadias, M., Viñas, I., Guyot, S., Baron, A. (2013). Polyphenol composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extracts obtained from industrial sour cherry pomace, *Industrial Crops and Products*, **51**, 279-288.
- Korábečný, J., Nepovimová, E., Cikánková, T., Špilovská, K., Vašková, L., Mazeiová, E., Kuča, K., Hroudová, J. (2018). Newly developed drugs for Alzheimer's disease in relation to energy metabolism, cholinergic and monoaminergic neurotransmission, *Neuroscience*, **370**, 191-206.
- Kosari, M., Golmohammadi, M., Towfighi, J., Ahmadi, S.J. (2018). Decomposition of tributyl phosphate at supercritical water oxidation conditions: Non-catalytic, catalytic, and kinetic reaction studies, *The Journal of Supercritical Fluids*, **133**, 103-113.
- Koushki, M., Jafari, M., Azizi, M. (2012). Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains, *Journal of Food Science and Technology*, **49**, 614-619.
- Kranjčec, B., Papeš, D., Altarac, S. (2014). D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women: A randomized clinical trial, *World Journal of Urology*, **32**, 79-84.
- Kreider, K.E. (2019). The diagnosis and management of atypical types of diabetes, *The Journal for Nurse Practitioners*, **15**, 171-176.e1.
- Krych-Madej, J., Gebicka, L. (2017). Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **171**, 10-17.
- Kuete, V., Nana, F., Ngameni, B., Mbaveng, A.T., Keumedjio, F., Ngadjui, B.T. (2009). Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae), *Journal of Ethnopharmacology*, **124**, 556-561.
- Kumar, S., Prahalathan, P., Raja, B. (2011). Antihypertensive and antioxidant potential of vanillic acid, a phenolic compound in L-NAME-induced hypertensive rats: A dose-dependence study, *Redox Report*, **16**, 208-215.
- Kumar, S., Saravanakumar, M., Raja, B. (2012). Antihypertensive, antioxidant and free radical scavenging potential of syringic and vanillic acid in L-NAME induced hypertension. *In-vivo* and *in-vitro* study, *Journal of Pharmacy Research*, **5**, 2942-2948.
- Kutlu, T., Takim, K., Çeken, B., Kizil, M. (2014). DNA damage protecting activity and *in vitro* antioxidant potential of the methanol extract of cherry (*Prunus avium* L.), *Journal of Medicinal Plant Research*, **8**, 715-726.

- Lachos-Perez, D., Baseggio, A.M., Mayanga-Torres, P.C., Maróstica Junior, M.R., Rostagno, M.A., Martínez, J., Forster-Carneiro, T. (2018). Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel, *The Journal of Supercritical Fluids*, **138**, 7-16.
- Larsen, P.B., Linneberg, A., Hansen, T., Hansen, L.F. (2017). Reference intervals for C-peptide and insulin derived from a general adult Danish population, *Clinical Biochemistry*, **50**, 408-413.
- Lee, K.A., Kim, K.T., Kim, H.J., Chung, M.S., Chang, P.S., Park, H., Paik, H.D. (2014a). Antioxidant activities of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts produced by ethanol, hot water, and subcritical water extraction, *Food Science and Biotechnology*, **23**, 615-621.
- Lee, K.A., Kim, K.T., Chang, P.S., Paik, H.D. (2014b). *In vitro* cytotoxic activity of ginseng leaf/stem extracts obtained by subcritical water extraction, *Journal of Ginseng Research*, **38**, 289-292.
- Lee, J.O., Kim, E., Kim, J.H., Hong, Y.H., Kim, H.G., Jeong, D., Kim, J., Kim, S.H., Park, C., Seo, D.B., Son, Y.J., Han, S.Y., Cho, J.Y. (2018). Antimelanogenesis and skin-protective activities of *Panax ginseng* calyx ethanol extract, *Journal of Ginseng Research*, **42**, 389-399.
- Lee, J.Y., Cho, Y.R., Park, J.H., Ahn, E.K., Jeong, W., Shin, H.S., Kim, M.S., Yang, S.H., Oh, J.S. (2019). Anti-melanogenic and anti-oxidant activities of ethanol extract of *Kummerowia striata*: *Kummerowia striata* regulate anti-melanogenic activity through down-regulation of TRP-1, TRP-2 and MITF expression, *Toxicology Reports*, **6**, 10-17.
- Lefkovits, Y.R., Stewart, Z.A., Murphy, H.R. (2019). Gestational diabetes, *Medicine*, **47**, 114-118.
- Leong, M.I., Fuh, M.R., Huang, S.D. (2014). Beyond dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A*, **1335**, 2-14.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chemistry*, **125**, 288-306.
- Li, Y., Xiong, Y., Liang, Q., Fang, C., Wang, C. (2010). Application of headspace single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of short-chain fatty acids in RuO<sub>4</sub> oxidation products of asphaltenes, *Journal of Chromatography A*, **1217**, 3561-3566.
- Li, F.J., Liu, Y., Yuan, Y., Yang, B., Liu, Z.M., Huang, L.Q. (2017). Molecular interaction studies of acetylcholinesterase with potential acetylcholinesterase inhibitors from the root of *Rhodiola crenulata* using molecular docking and isothermal titration calorimetry methods, *International Journal of Biological Macromolecules*, **104**, 527-532.

- Lim, J.Y., Ishiguro, K., Kubo, I. (1999). Tyrosinase inhibitory *p*-coumaric acid from ginseng leaves, *Phytotherapy Research*, **13**, 371-375.
- Lippman, S.M., Benner, S.E., Hong, V.K. (1994). Cancer chemoprevention, *Journal of Clinical Oncology*, **12**, 851-873.
- Liu, P.K., Weng, Z.M., Ge, G.B., Li, H.L., Ding, L.L., Dai, Z.R., Hou, X.D., Leng, Y.H., Yu, Y., Hou, J. (2018). Biflavones from *Ginkgo biloba* as novel pancreatic lipase inhibitors: Inhibition potentials and mechanism, *International Journal of Biological Macromolecules*, **118**, 2216-2223.
- Liu, X., Bian, J., Li, D., Liu, C., Xu, S., Zhang, G., Zhang, L., Gao, P. (2019). Structural features, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of polysaccharides from stem of *Physalis alkekengi* L., *Industrial Crops & Products*, **129**, 654-661.
- Loo, A.Y., Jain, K., Darah, I. (2008). Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*, *Food Chemistry*, **107**, 1151-1160.
- Losada-Barreiro, S., Bravo-Díaz, C. (2017). Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **133**, 379-402.
- Lunagariya, N.A., Patel, N.K., Jagtap, S.C., Bhutani, K.K. (2014). Inhibitors of pancreatic lipase: State of the art and clinical perspectives, *EXCLI Journal*, **13**, 897-921.
- Lv, R., Chen, Y., Xia, N., Liang, Y., He, Q., Li, M., Qi, Z., Lu, Y., Z., S. (2019). Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection to C-peptide in human urine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **162**, 179-184.
- Maatouk, M., Mustapha, N., Mokdad-Bzeouich, I., Chaaban, H., Ioannou, I., Ghedira, K., Ghoul, M., Chekir-Ghedira, L. (2018). Heated naringin mitigate the genotoxicity effect of mitomycin C in BALB/c mice through enhancing the antioxidant status, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **97**, 1417-1423.
- Maghsoudlou, E., Kenari, R.E., Amiri, Z.R. (2016). The effects of extraction technique on phenolic compounds extracted from fig (*Ficus carica*) pulp and skin, *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, **11**, 758-769.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 727-747.
- Mangal, P., Khare, P., Jagtap, S., Bishnoi, M., Kondepudi, K.K., Bhutani, K.K. (2017). Screening of six Ayurvedic medicinal plants for anti-obesity potential: An investigation on bioactive constituents from *Oroxylum indicum* (L.) Kurz bark, *Journal of Ethnopharmacology*, **187**, 138-146.



- Mansour, F.R., Khairy, M. A. (2017). Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography B*, **1061-1062**, 382-391.
- Markham, K.R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press, London, United Kingdom.
- Markham, K.R. (1989). Flavones, flavonols and their glycosides, In: *Methods in plant biochemistry* (Dey, P.M., Harborne, J.B., eds.), Academic Press Ltd, London, United Kingdom.
- Marrugo, G., Valdés, C.F., Gómez, C., Chejne, F. (2019). Pelletizing of Colombian agro-industrial biomasses with crude glycerol, *Renewable Energy*, **134**, 558-568.
- Martindale, J.L., Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival, *Journal of Cellular Physiology*, **192**, 1-15.
- Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F., Collina, S. (2006). Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, **1125**, 147-151.
- Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I.C.F.R. (2015). Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species, *Industrial Crops and Products*, **74**, 648-670.
- Marwah, R.G., Fatope, M.O., Mahrooqi, R.A., Varma, G.B., Abadi, H.A., Al-Burtamani, S.K.S. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman, *Food Chemistry*, **101**, 465-470.
- Mascio, P.D., Kaiser, S., Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **274**, 532-538.
- Masi, M., Mubaiwa, B., Cimmino, A., van Otterlo, W.A.L., Green, I.R., Evidente, A. (2018). First isolation of acetovanillone and piceol from *Crinum buphanoides* and *Crinum graminicola* (I. Verd.) Amaryllidaceae, *South African Journal of Botany*, **114**, 37-39.
- Mašković, P.Z., Diamanto, L.D., Vujić, J.M., Cvetanović, A.D., Radojković, M.M., Gadžurić, S.B., Zengin, G. (2015). *Onosma aucheriana*: A source of biologically active molecules for novel food ingredients and pharmaceuticals, *Journal of Functional Foods*, **19**, 479-486.
- Mašković, P.Z., Veličković, V., Đurović, S., Zeković, Z., Radojković, M., Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Mitić, M., Vujić, J. (2018). Biological activity and chemical profile of *Lavatera thuringiaca* L. extracts obtained by different extraction approaches, *Phytomedicine*, **38**, 118-124.

- Mathur, P., Ding, Z., Saldeen, T., Mehta, J.L. (2015). Tocopherols in the prevention and treatment of atherosclerosis and related cardiovascular disease, *Clinical Cardiology*, **38**, 570-576.
- Mattila, P., Hellström, J., Törrönen, R. (2006). Phenolic acids in berries, fruits, and beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 7193-7199.
- Mayanga-Torres, P.C., Lachos-Perez, D., Rezende, C.A., Prado, J.M., Ma, Z., Tompsett, G.T., Timko, M.T., Forster-Carneiro, T. (2017). Valorization of coffee industry residues by subcritical water hydrolysis: Recovery of sugars and phenolic compounds, *The Journal of Supercritical Fluids*, **120**, 75-85.
- Melicháčová, S., Timoracká, M., Bystrická, J., Vollmannová, A., Čéry, J. (2010). Relation of total antiradical activity and total polyphenol content of sweet cherries (*Prunus avium* L.) and tart cherries (*Prunus cerasus* L.), *Acta agriculturae Slovenica*, **95**, 21-28.
- Mello, L.D., Hernandez, S., Marrazza, G., Mascini, M., Kubota, L.T. (2006). Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 1374-1382.
- Meriem, D., Abderrahmane, B., Moufida, A., Lekhmici, A. (2018). *In vitro* and *in vivo* antioxidant, antihemolytic and anti-inflammatory activities of *Santolina chamaecyparissus* extracts, *Pharmacognosy Communications*, **1**, 15-24.
- Meshkini, A. (2018). Modulation of oxidative stress in thrombin-stimulated platelets by almond by-product, *Waste and Biomass Valorization*, **9**, 1015-1025.
- Mézes, Z., Szenteleki, K., Gaál, M. (2017). Simulation model for sour cherry product lines, *Computers and Electronics in Agriculture*, **140**, 190-202.
- Migas, P. Krauze-Baranowska, M. (2015). The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics, *Phytochemistry Letters*, **13**, 35-40.
- Miguel, M.G. (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **1**, 7-15.
- Miller, N., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, *FEBS Letters*, **384**, 240-242.
- Mittler, R. (2017). Opinion: ROS are good, *Trends in Plant Science*, **22**, 11-19.
- Mocan, A., Zengin, G., Uysal, A., Gunes, E., Mollica, A., Degirmenci, N.S., Alpsoy, L., Aktumsek, A. (2016). Biological and chemical insights of *Morina persica* L.: A source of bioactive compounds with multifunctional properties, *Journal of Functional Foods*, **25**, 94-109.

- Mocan, A., Zengin, G., Mollica, A., Uysal, A., Gunes, E., Crişan, G., Aktumsek, A. (2018). Biological effects and chemical characterization of *Iris schachtii* Markgr. extracts: A new source of bioactive constituents, *Food and Chemical Toxicology*, **112**, 448-457.
- Mohamadi, S., Zhao, M., Amrani, A., Marchioni, E., Zama, D., Benayache, F., Benayache, S. (2015). On-line screening and identification of antioxidant phenolic compounds of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur, *Industrial Crops and Products*, **76**, 910-919.
- Mohamed, G.A., Ibrahim, S.R.M., Elkhayat, E.S., Dine, R.S.E. (2014). Natural anti-obesity agents, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, **52**, 269-284.
- Monte, J., Abreu, A.C., Borges, A., Simões, L.C., Simões, M. (2014). Antimicrobial activity of selected phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and their biofilms, *Pathogens*, **3**, 473-498.
- Moraga-Nicolás, F., Jara, C., Godoy, R., Iturriaga-Vásquez, P., Venthur, H., Quiroz, A., Becerra, J., Mutis, A., Hormazábal, E. (2018). *Rhodolirium andicola*: a new renewable source of alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity, a study from nature to molecular docking, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **28**, 34-43.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55-63.
- Moulik, S., Nazia, S., Vani, B., Sridhar, S. (2016). Pervaporation separation of acetic acid/water mixtures through sodium alginate/polyaniline polyion complex membrane, *Separation and Purification Technology*, **170**, 30-39.
- Movahhedini, N., Zengin, G., Bahadori, M.B., Sarikurkcu, C., Bahadori, S., Dinparast, L. (2016). *Ajuga chamaecistus* subsp. *scoparia* (Boiss.) Rech.f.: A new source of phytochemicals for antidiabetic, skin-care, and neuroprotective uses, *Industrial Crops and Products*, **94**, 89-96.
- Muddathir, A.M., Yamauchi, K., Batubara, I., Mohieldin, E.A.M., Mitsunaga, T. (2017). Antityrosinase, total phenolic content and antioxidant activity of selected Sudanese medicinal plants, *South African Journal of Botany*, **109**, 9-15.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants, *Phytomedicine*, **14**, 289-300.
- Mukherjee, P.K., Biswas, R., Sharma, A., Banerjee, S., Biswas, S., Katiyar, C.K. (2018). Validation of medicinal herbs for anti-tyrosinase potential, *Journal of Herbal Medicine*, **14**, 1-16.

- Munir, M.T., Kheirkhah, H., Baroutian, S., Quek, S.Y., Young, B.R. (2018). Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion skin, *Journal of Cleaner Production*, **183**, 487-494.
- Naffati, A., Vladić, J., Pavlić, B., Radosavljević, R., Gavarić, A., Vidović, S. (2017). Recycling of filter tea industry by-products: Application of subcritical water extraction for recovery of bioactive compounds from *A. uva-ursi* herbal dust, *The Journal of Supercritical Fluids*, **121**, 1-9.
- Nair, S.S., Kavrekar, V., Mishra, A. (2013). *In vitro* studies on alpha amylase and alpha glucosidase activities of selected plant extracts, *European Journal of Experimental Biology*, **3**, 128-132.
- Najafi, Z., Saeedi, M., Mahdavi, M., Sabourian, R., Khanavi, M., Tehrani, M.B., Moghadam, F.H., Edraki, N., Karimpour-Razkenari, E., Sharifzadeh, M., Foroumadi, A., Shafiee, A., Akbarzadeh, T. (2016). Design and synthesis of novel anti-Alzheimer's agents: Acridine-chromenone and quinoline-chromenone hybrids, *Bioorganic Chemistry*, **67**, 84-94.
- Najafi, Z., Mahdavi, M., Saeedi, M., Karimpour-Razkenari, E., Asatouri, R., Vafadarnejad, F., Moghadam, F.H., Khanavi, M., Sharifzadeh, M., Akbarzadeh, T. (2017). Novel tacrine-1,2,3-triazole hybrids: *In vitro*, *in vivo* biological evaluation and docking study of cholinesterase inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **125**, 1200-1212.
- Nalivaeva, N.N., Turner, A.J. (2016). AChE and amyloid precursor protein (APP) – Cross talk in Alzheimer's disease, *Chemico Biological Interactions*, **259**, 301-306.
- Napagoda, M.T., Kumari, M., Qader, M.M., De Soyza, S.G., Jayasinghe, L. (2018). Evaluation of tyrosinase inhibitory potential in flowers of *Cassia auriculata* L. for the development of natural skin whitening formulation, *European Journal of Integrative Medicine*, **21**, 39-42.
- Nastić, N., Švarc-Gajić, J., Delerue-Matos, C., Barroso, M.F., Soares, C., Moreira, M.M., Morais, S., Mašković, P., Srček, V.G., Slivac, I., Radošević, K., Radojković, M. (2018). Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants, *Industrial Crops and Products*, **111**, 579-589.
- Nayan, N.K., Kumar, S., Singh, R.K. (2013). Production of the liquid fuel by thermal pyrolysis of neem seed, *Fuel*, **103**, 437-443.
- Nazir, N., Karim, N., Abdel-Halim, H., Khan, I., Wadood, S.F., Nisar, M. (2018). Phytochemical analysis, molecular docking and anti-amnesic effects of methanolic extract of *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds in scopolamine induced memory impairment in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, **210**, 198-208.

- Nesaretnam, K., Yew, W.W., Wahid, M.B. (2007). Tocotrienols and cancer: Beyond antioxidant activity, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**, 445-452.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014, *Journal of Natural Products*, **79**, 629-661.
- Nimse, S.B., Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *RSC Advances*, **5**, 27986-28006.
- Nixon, J.D., Wright, D.G., Dey, P.K., Ghosh, S.K., Davies, P.A. (2013). A comparative assessment of waste incinerators in the UK, *Waste Management*, **33**, 2234-2244.
- No, S.Y. (2014). Application of bio-oils from lignocellulosic biomass to transportation, heat and power generation – A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **40**, 1108-1125.
- Noundou, X.S., Krause, R.W.M., van Vuuren, S.F., Ndinteh, D.T., Olivier, D.K. (2016). Antibacterial effects of *Alchornea cordifolia* (Schumach. and Thonn.) Müll. Arg extracts and compounds on gastrointestinal, skin, respiratory and urinary tract pathogens, *Journal of Ethnopharmacology*, **179**, 76-82.
- Noureddini, H., Rempe, M.L. (1996). Pelargonic acid in enhanced oil recovery, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73**, 939-941.
- Novak, I., Klasinc, L., McGlynn, S.P. (2018). Photoelectron spectra and biological activity of cinnamic acid derivatives revisited, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **189**, 129-132.
- Oancea, A.M., Hasan, M., Vasile, A.M., Barbu, V., Enachi, E., Bahrim, G., Rápeanu, G., Silvi, S., Stánciuc, N. (2018). Functional evaluation of microencapsulated anthocyanins from sour cherries skins extract in whey proteins isolate, *LWT – Food Science and Technology*, **95**, 129-134.
- Oboh, G., Agunloye, O.M., Adefegha, S.A., Akinyemi, A.J., Ademiluyi, A.O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (*in vitro*): A comparative study, *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, **26**, 165-170.
- Oboh, G., Ogunsuyi, O.B., Ogunbadejo, M.D., Adefegha, S.A. (2016). Influence of gallic acid on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties of acarbose, *Journal of Food and Drug Analysis*, **24**, 627-634.
- Ocaña-González, J.A., Fernández-Torres, R., Bello-López, M.Á., Ramos-Payán, M. (2016). New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review, *Analytica Chimica Acta*, **905**, 8-23.

- Ojeda, C.B., Rojas, F.S. (2011). Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: Recent applications, *Chromatographia*, **74**, 651-679.
- Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz, L.F.P., Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **79**, 593-616.
- Ördögh, L., Galgóczy, L., Krisch, J., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of fruit juices and pomace extracts against acne-inducing bacteria, *Acta Biologica Szegediensis*, **54**, 45-49.
- Orhan, I.E., Senol, F.S., Gulpinar, A.R., Sekeroglu, N., Kartal, M., Sener, B. (2012). Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analysis, *Food Chemistry*, **130**, 882-888.
- Osorio-Tobón, J.F., Meireles, M.A.A. (2013). Recent applications of pressurized fluid extraction: Curcuminoids extraction with pressurized liquids, *Food and Public Health*, **3**, 289-303.
- Ouaabou, R., Nabil, B., Hidar, N., Lahnine, L., Idlimam, A., Lamharrar, A., Hanine, H., Mahrouz, M. (2018). Valorization of solar drying process in the production of dried Moroccan sweet cherries, *Solar Energy*, **172**, 158-164.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, **44**, 307-315.
- Özçelik, B., Kartal, M., Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids, *Pharmaceutical Biology*, **49**, 396-402.
- Ozer, M.S., Kirkan, B., Sarikurcu, C., Cengiz, M., Ceylan, O., Atilgan, N., Tepe, B. (2018). *Onosma heterophyllum*: Phenolic composition, enzyme inhibitory and antioxidant activities, *Industrial Crops and Products*, **111**, 179-184.
- Öztaskin, N., Taslimi, P., Maraş, A., Gülcin, İ., Göksu, S. (2017). Novel antioxidant bromophenols with acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory actions, *Bioorganic Chemistry*, **74**, 104-114.
- Pacheco-Ordaz, R., Wall-Medrano, A., Goñi, M.G., Ramos-Clamont-Montfort, G., Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A. (2017). Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria, *Letters in Applied Microbiology*, **66**, 25-31.
- Pandolfi, F., Vita, D.D., Bartolami, M., Coluccia, A., Santo, R.D., Costi, R., Andrisano, V., Alabiso, F., Bergamini, C., Fato, R., Bartolini, M., Scipione, L. (2017). New pyridine

- derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase and amyloid aggregation, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **141**, 197-210.
- Pap, S., Radonić, J., Trifunović, S., Adamović, D., Mihajlović, I., Miloradov, M.V., Sekulić, M.T. (2016). Evaluation of the adsorption potential of eco-friendly activated carbon prepared from cherry kernels for the removal  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  from aqueous wastes, *Journal of Environmental Management*, **184**, 297-306.
- Park, H.C., Kim, Y.J., Lee, C.W., Rho, Y.T., Kang, J.W., Lee, D.H., Seong, Y.J., Park, Y.C., Lee, D., Kim, S.G. (2017). Production of D-ribose by metabolically engineered *Escherichia coli*, *Process Biochemistry*, **52**, 73-77.
- Park, J., Jung, H., Kim, K., Lim, K.M., Kim, J.Y., Jho, E.H., Oh, E.S. (2018). D-tyrosine negatively regulates melanin synthesis by competitively inhibiting tyrosinase activity, *Pigment Cell & Melanoma Research*, **31**, 374-383.
- Pasquali, M.A.D.B., Gelain, D.P., Zeidán-Chuliá, F., Pires, A.S., Gasparotto, J., Terra, S.R., Moreira, J.C.F. (2013). Vitamin A (retinol) downregulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) by oxidant-dependent activation of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B in human lung cancer A549 cells, *Cellular Signalling*, **25**, 939-954.
- Patlevič, P., Vašková, J., Švorc Jr., P., Vaško, L., Švorc, P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases, *Integrative Medicine Research*, **5**, 250-258.
- Pavlović, D.M., Pavlović, A.M., Totić, S. (2010). Farmakoterapija demencija, *Vojnosanitetski pregled*, **67**, 419-426.
- Pawliszyn, J. (2012). *Handbook of solid phase microextraction*, Elsevier Inc, London, United Kingdom.
- Payán, M.R., López, M.Á.B., Fernández-Torres, R., González, J.A.O., Mochón, M.C. (2011). Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental matrices, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **55**, 332-341.
- Peet, J., Selyutina, A., Bredihhin, A. (2016). Antiretroviral (HIV-1) activity of azulene derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **24**, 1653-1657.
- Peh, H.Y., Tan, W.S.D., Liao, W., Wong, W.S.F. (2016). Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol, *Pharmacology & Therapeutics*, **162**, 152-169.
- Pereira, D.M., Andrade, C., Valentão, P., Andrade, P.B. (2017). Natural products as enzyme inhibitors, In: *Natural products targeting clinically relevant enzymes* (Andrade, P.B., Valentão, P., Pereira, D.M., eds.), DOI: 10.1002/9783527805921.ch1.

- Perry, N.B., Brennan, N.J. (1997). Antimicrobial and cytotoxic phenolic glycoside esters from the New Zealand tree *Toronia toru*, *Journal of Natural Products*, **60**, 623-626.
- Persson, T., Popescu, B.O., Cedazo-Minguez, A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail?, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, **2014**, 1-11.
- Piboonprai, K., Khumkhong, P., Khongkow, M., Yata, T., Ruangrunsi, N., Chansrinियom, C., Iempridee, T. (2018). Anticancer activity of arborinine from *Glycosmis parva* leaf extract in human cervical cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **500**, 866-872.
- Piccolella, S., Fiorentino, A., Pacifico, S., D'Abrosca, B., Uzzo, P., Monaco, P. (2008). Antioxidant properties of sour cherries (*Prunus cerasus* L.): Role of colorless phytochemicals from the methanolic extract of ripe fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1928-1935.
- Picerno, P., Mencherini, T., Sansone, F., Gaudio, P.D., Granata, I., Porta, A., Aquino, R.P. (2011). Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: Composition and antioxidant and antifungal activities, *Journal of Ethnopharmacology*, **138**, 705-712.
- Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S.H. (2017). Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options, *Drug Discovery Today*, **22**, 282-298.
- Pinkernell, U., Nowack, B., Gallard, H., von Gunten, U. (2000). Methods for the photometric determination of reactive bromine and chlorine species with ABTS, *Water Research*, **34**, 4343-4350.
- Pinto, N. de C.C., Campos, L.M., Evangelista, A.C.S., Lemos, A.S.O., Silva, T.P., Melo, R.C.N., de Lourenço, C.C., Salvador, M.J., Apolônio, A.C.M., Scio, E., Fabri, R.L. (2017). Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Industrial Crops and Products*, **107**, 332-340.
- Piska, K., Gunia-Krzyżak, A., Koczurkiewicz, P., Wójcik-Pszczola, K., Pękala, E. (2018). Piperlongumine (piplartine) as a lead compound for anticancer agents – Synthesis and properties of analogues: A mini review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **156**, 13-20.
- Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **97**, 55-74.
- Plaza, M., Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **71**, 39-54.



- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M.D., Ibáñez, E., Herrero, M. (2010). Neof ormation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions, *Food Research International*, **43**, 1123-1129.
- Plotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., Namieśnik, J. (2015). Miniaturized solid-phase extraction techniques, *Trends in Analytical Chemistry*, **73**, 19-38.
- Plotka-Wasyłka, J., Owczarek, K., Namieśnik, J. (2016). Modern solutions in the field of microextraction using liquid as a medium of extraction, *Trends in Analytical Chemistry*, **85**, 46-64.
- Popović, Đ.S. (2016). Značaj adiponektina u proceni kardiometaboličkog profila i rizika za razvoj tipa 2 šećerne bolesti kod gojaznih osoba, *Doktorska disertacija*, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Poskrobko, S., Król, D., Gozdur, A.B. (2016). Gasification of waste wood biomass, *Drewno*, **59**, 241-248.
- Prado, J.M., Follegatti-Romero, L.A., Forster-Carneiro, T., Rostagno, M.A., Filho, F.M., Meireles, M.A.A. (2014a). Hydrolysis of sugarcane bagasse in subcritical water, *The Journal of Supercritical Fluids*, **86**, 15-22.
- Prado, J.M., Forster-Carneiro, T., Rostagno, M.A., Follegatti-Romero, L.A., Filho, F.M., Meireles, M.A.A. (2014b). Obtaining sugars from coconut husk, defatted grape seed, and pressed palm fiber by hydrolysis with subcritical water, *The Journal of Supercritical Fluids*, **89**, 89-98.
- Predojević, Z.J. (2010). Postupci pripreme lignocelulozne sirovine za dobijanje bioetanol, *Hemijska industrija*, **64**, 283-293.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E, *Analytical Biochemistry*, **269**, 337-341.
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.C., Wu, Y.T., Prina, M. (2015). *World Alzheimer report 2015: The global impact of dementia – An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*, Alzheimer's Disease International (ADI), London, United Kingdom.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia*, **82**, 513-523.
- Prvulović, D., Popović, M., Malenčić, Đ., Ljubojević, M., Ognjanov, V. (2011). Phenolic compounds in sweet cherry (*Prunus avium* L.) petioles and their antioxidant properties, *Research Journal of Agricultural Science*, **43**, 198-202.

- Pugh, S., McKenna, R., Halloum, I., Nielsen, D.R. (2015). Engineering *Escherichia coli* for renewable benzyl alcohol production, *Metabolic Engineering Communications*, **2**, 39-45.
- Puig-Arnabat, M., Bruno, J.C., Coronas, A. (2010). Review and analysis of biomass gasification models, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**, 2841-2851.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries, *Journal of Applied Microbiology*, **90**, 494-507.
- Qian, L., Wang, S., Xu, D., Guo, Y., Tang, X., Wang, L. (2016). Treatment of municipal sewage sludge in supercritical water: A review, *Water Research*, **89**, 118-131.
- Radojković, M. (2012). Ekstrakti duda (*Morus spp.*, *Morasceae*), sastav, delovanje i primena, *Doktorska disertacija*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Raffa, D., Maggio, B., Raimondi, M.V., Plescia, F., Daidone, G. (2017). Recent discoveries of anticancer flavonoids, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **142**, 213-228.
- Rajarajan, G., Irshad, A., Raghunath, B.V., Mahesh kumar, G., Punnagairasi, A. (2016). Utilization of cheese industry whey for biofuel-ethanol production, In: *Integrated waste management in India* (Prashanthi M., Sundaram R., eds.), Environmental Science and Engineering Springer, Cham.
- Rangsriwong, P., Rangkadilok, N., Satayavivad, J., Goto M., Shotipruk, A. (2009). Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. fruits, *Separation and Purification Technology*, **66**, 51-56.
- Rasheeda, K., Bharathy, H., Fathima, N.N. (2018). Vanillic acid and syringic acid: Exceptionally robust aromatic moieties for inhibiting *in vitro* self-assembly of type I collagen, *International Journal of Biological Macromolecules*, **113**, 952-960.
- Rathod, M.C., Das, N., Dhale, D.A. (2015). Antifungal activity of two medicinal plants against fungus *Candida albicans*, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **6**, 701-706.
- Ravishankar, D., Rajora, A.K., Greco, F., Osborn, H.M.I. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **45**, 2821-2831.
- Reed, T.T. (2011). Lipid peroxidation and neurodegenerative disease, *Free Radical Biology & Medicine*, **51**, 1302-1319.
- Ren, B., Xia, B., Li, W., Wu, J., Zhang, H. (2009). Two novel phenolic compounds from *Stenoloma chusanum* and their antifungal activity, *Chemistry of Natural Compounds*, **45**, 182-186.

- Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.R.M., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A*, **1116**, 1-9.
- Rezaee, M., Yamini, Y., Faraji, M. (2010). Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *Journal of Chromatography A*, **1217**, 2342-2357.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research*, **22**, 375-383.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, **2**, 152-159.
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation, *Analytical Chemistry*, **68**, 1033-1039.
- Richter, P., Toral, M.I., Toledo, C. (2006). Subcritical water extraction and determination of nifedipine in pharmaceutical formulations, *Journal of AOAC International*, **89**, 365-368.
- Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., de Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P., van Zanden, J.J., van der Woude, H., Alink, G.M., Koeman, J.H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **11**, 321-333.
- Rios, M., L., V., González, A.M., Lora, E.E.S., del Olmo, O.A.A. (2018). Reduction of tar generated during biomass gasification: A review, *Biomass and Bioenergy*, **108**, 345-370.
- Rizvi, S.S.H. (2010). *Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, United Kingdom.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, **66**, 401-436.
- Roy, P., Dias, G. (2017). Prospects for pyrolysis technologies in the bioenergy sector: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **77**, 59-69.
- Rubilar, M., Pinelo, M., Shene, C., Sineiro, J., Nuñez, M.J. (2007). Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: Almond hulls and grape pomace, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 10101-10109.
- Russo, D., Valentão, P., Andrade, P.B., Fernandez, E.C., Milella, L. (2015). Evaluation of antioxidant, antidiabetic and anticholinesterase activities of *Smilax sonchifolius* landraces and correlation with their phytochemical profiles, *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 17696-17718.

- Rutkowska, M., Dubalska, K., Konieczka, P., Namieśnik, J. (2014). Microextraction techniques used in the procedures for determining organomercury and organotin compounds in environmental samples, *Molecules*, **19**, 7581-7609.
- Rynjah, C.V., Devi, N.N., Khongthaw , N., Syiem, D., Majaw, S. (2018). Evaluation of the antidiabetic property of aqueous leaves extract of *Zanthoxylum armatum* DC. using *in vivo* and *in vitro* approaches, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **8**, 134-140.
- Rzechonek, D.A., Dobrowolski, A., Rymowicz, W., Mirończuk, A.M. (2019). Aseptic production of citric and isocitric acid from crude glycerol by genetically modified *Yarrowia lipolytica*, *Bioresource Technology*, **271**, 340-344.
- Saadi, W., Rodríguez-Sánchez, S., Ruiz, B., Souissi-Najar, S., Ouederni, A., Fuente, E. (2019). Pyrolysis technologies for pomegranate (*Punica granatum L.*) peel wastes. Prospects in the bioenergy sector, *Renewable Energy*, **136**, 373-382.
- Saeedi, M., Eslamifar, M., Khezri, K. (2019). Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **110**, 582-593.
- Saha, R., Ghosh, A., Saha, B. (2013). Kinetics of micellar catalysis on oxidation of *p*-anisaldehyde to *p*-anisic acid in aqueous medium at room temperature, *Chemical Engineering Science*, **99**, 23-27.
- Sahin, S.C. (2018). The potential of *Arthrospira platensis* extract as a tyrosinase inhibitor for pharmaceutical or cosmetic applications, *South African Journal of Botany*, **119**, 236-243.
- Said, Z.B.O.S., Haddadi-Guemghar, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Rigou, P., Remini, H., Adjaoud, A., Khoudja, N.K., Madani, K. (2016). Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits, *Industrial Crops and Products*, **89**, 167-175.
- Saikia, N., Mertens, G., Balen, K.V., Elsen, J., Gerven, T.V., Vandecasteele, C. (2015). Pre-treatment of municipal solid waste incineration (MSWI) bottom ash for utilisation in cement mortar, *Construction and Building Materials*, **96**, 76-85.
- Saiyasombati, P., Kasting, G.B. (2003). Disposition of benzyl alcohol after topical application to human skin *in vitro*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **92**, 2128-2139.
- Sallam, A., Mira, A., Ashour, A., Shimizu, K. (2016). Acetylcholine esterase inhibitors and melanin synthesis inhibitors from *Salvia officinalis*, *Phytomedicine*, **23**, 1005-1011.
- Samarin, A.M., Poorazarang, H., Hematyar, N., Elhamirad, A. (2012). Phenolics in potato peels: Extraction and utilization as natural antioxidants, *World Applied Sciences Journal*, **18**, 191-195.

- Samiran, N.A., Jaafar, M.N.M., Ng, J.H., L.S.S., Chong, C.T. (2016). Progress in biomass gasification technique – With focus on Malaysian palm biomass for syngas production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **62**, 1047-1062.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science and Technology International*, **8**, 121-137.
- Sanders, H.J., Keag, H.F., McCullough, H.S. (1953). Acetophenone, *Industrial and Engineering Chemistry*, **45**, 2-14.
- Sang, Z., Pan, W., Wang, K., Ma, Q., Yu, L., Yang, Y., Bai, P., Leng, C., Xu, Q., Li, X., Tan, Z., Liu, W. (2017). Design, synthesis and evaluation of novel ferulic acid-*O*-alkylamine derivatives as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **130**, 379-392.
- Santarpia, L., Grandone, I., Contaldo, F., Pasanisi, F. (2013). Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: A review of the literature, *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, **4**, 31-39.
- Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A. (2010). Liquid-phase microextraction, *Trends in Analytical Chemistry*, **29**, 1-14.
- Saraji, M., Boroujeni, M.K. (2014). Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **406**, 2027-2066.
- Saraji, M., Javadian, S. (2019). Single-drop microextraction combined with gas chromatography-electron capture detection for the determination of acrylamide in food samples, *Food Chemistry*, **274**, 55-60.
- Sarikurcu, C., Ozer, M.S., Tepe, B., Dilek, E., Ceylan, O. (2015). Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of acetone, methanol and water extracts of *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* L., *Industrial Crops and Products*, **76**, 961-966.
- Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals, *Methods*, **42**, 321-324.
- Sarkhosh, M., Mehdinia, A., Jabbari, A., Yamini, Y. (2011). Single drop microextraction of biphenyl and biphenyl oxide in aqueous samples by gas chromatography-flame ionization detection, *American Journal of Analytical Chemistry*, **2**, 689-696.
- Scherz-Shouval, R., Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: Physiology and pathology, *Trends in Biochemical Sciences*, **36**, 30-38.

- Selvaraj, S., Krishnaswamy, S., Devashya, V., Sethuraman, S., Krishnan, U.M. (2014). Flavonoid-metal ion complexes: A novel class of therapeutic agents, *Medicinal Research Reviews*, **34**, 677-702.
- Sena, L.C.S., Matos, H.R., Dórea, H.S., Pimentel, M.F., de Santana, D.C.A.S., de Santana, F.J.M. (2017). Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop and high-performance liquid chromatography to the analysis of cocaine's major adulterants in human urine, *Toxicology*, **376**, 102-112.
- Senica, M., Stampar, F., Veberic, R., Mikulic-Petkovsek, M. (2017). Fruit seeds of the *Rosaceae* family: A waste, new life, or a danger to human health?, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**, 10621-10629.
- Serra, A.T., Seabra, I.J., Braga, M.E.M., Bronze, M.R., de Sousa, H.C., Duarte, C.M.M. (2010). Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds, *The Journal of Supercritical Fluids*, **55**, 184-191.
- Sesta, A., Cassarino, M.F., Tapella, L., Castelli, L., Cavagnini, F., Giraldi, F.P. (2016). Effect of retinoic acid on human adrenal corticosteroid synthesis, *Life Sciences*, **151**, 277-280.
- Sharifi, V., Abbasi, A., Nosrati, A. (2016). Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction techniques in analytical toxicology, *Journal of Food and Drug Analysis*, **24**, 264-276.
- Sharma, N., Sharma, V.K., Seo, S.Y. (2005). Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity, *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, 453-456.
- Shekhar, C., Kumar, S. (2015). Dual-cholinesterase inhibition by an aqueous extract of *Emblica officinalis* fruit and its mode of inhibition by kinetic study, *Advances in Biomedicine and Pharmacy*, **2**, 7-12.
- Sharma, K.V., Sisodia, R. (2014). Radioprotective efficacy of *Prunus avium* fruit in mice brain with reference to *in-vitro* and *in-vivo* studies, *International Journal of Radiation Research*, **12**, 21-31.
- Shettar, A.K., Sateesh, M.K., Kaliwal, B.B., Vedamurthy, A.B. (2017). *In vitro* antidiabetic activities and GC-MS phytochemical analysis of *Ximenia americana* extracts, *South African Journal of Botany*, **111**, 202-2011.
- Shi, C., Sun, Y., Zheng, Z., Zhang, X., Song, K., Jia, Z., Chen, Y., Yang, M., Liu, X., Dong, R., Xia, X. (2016). Antimicrobial activity of syringic acid against *Cronobacter sakazakii* and its effect on cell membrane, *Food Chemistry*, **197**, 100-106.

- Shi, Q., Godschalk, R.W.L., van Schooten, F.J. (2017). Inflammation and the chemical carcinogen benzo[a]pyrene: Partners in crime, *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, **774**, 12-24.
- Shirey, R.E. (2012). SPME commercial devices and fibre coatings, In: *Handbook of solid phase microextraction* (Pawliszyn, J., ed.), Elsevier Inc, London, United Kingdom.
- Sibiya, P., Cukrowska, E., Jönsson, J.Å., Chimuka, L. (2013). Hollow-fibre liquid-phase microextraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Johannesburg Jukskei river, South Africa, *Chromatographia*, **76**, 427-436.
- Siddiqui, I.A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1348**, 20-31.
- Sindhu, E.R., Preethi, K.C., Kuttan, R. (2010). Antioxidant activity of carotenoid lutein *in vitro* and *in vivo*, *Indian Journal of Experimental Biology*, **48**, 843-848.
- Sing, P.P., Saldaña, M.D.A. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel, *Food Research International*, **44**, 2452-2458.
- Singh, V.K., Soni, A.B., Kumar, S., Singh, R.K. (2014). Pyrolysis of sal seed to liquid product, *Bioresource Technology*, **151**, 432-435.
- Singh, B., Kumar, A., Malik, A.K. (2017a). Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **38**, 820-832.
- Singh, S.B., Young, K., Silver, L.L. (2017b). What is an „ideal“ antibiotic? Discovery challenges and path forward, *Biochemical Pharmacology*, **133**, 63-73.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144-158.
- Sithara, T., Dhanya, B.P., Arun, K.B., Sini, S., Dan, M., Vasu, R.K., Nisha, P. (2018). Zerumbone, a cyclic sesquiterpene from *Zingiber zerumbet* induces apoptosis, cell cycle arrest, and antimigratory effects in SW480 colorectal cancer cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 602-612.
- Soguel, L., Durocher, F., Tchernof, A., Diorio, C. (2017). Adiposity, breast density, and breast cancer risk: Epidemiological and biological considerations, *European Journal of Cancer Prevention*, **26**, 511-520.
- Söğüt, O.Ö., Kipçak, E., Akgün, M. (2011). Treatment of whey wastewater by supercritical water oxidation, *Water Science & Technology*, **63**, 908-916.

- Şöhretoğlu, D., Sari, S., Barut, B., Özel, A. (2018). Tyrosinase inhibition by some flavonoids: Inhibitory activity, mechanism by *in vitro* and *in silico* studies, *Bioorganic Chemistry*, **81**, 168-174.
- Sood, A., Gupta, M. (2015). Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel, *Food Bioscience*, **12**, 100-106.
- Sosnowska, D., Podsędek, A., Redzyna, M., Kucharska, A.Z. (2018). Inhibitory effect of black chokeberry fruit polyphenols on pancreatic lipase – Searching for most active inhibitors, *Journal of Functional Foods*, **49**, 196-204.
- Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., Namieśnik, J. (2013). Understanding solid-phase microextraction: Key factors influencing the extraction process and trends in improving the technique, *Chemical Reviews*, **113**, 1667-1685.
- Stipančić, G. (2003). MODY-Dijabetes, *Paediatrica Croatica*, **47** (Supl 1), 147-150.
- Stojanović, J., Milošević, D., Antović, I., Sekulić, G., Beljić-Živković, T. (2012). Uticaj različitih režima insulinske terapije na kvalitet života obolelih od dijabetesa melitusa tipa 1, *Vojnosanitetski Pregled*, **69**, 560-575.
- Stroo, H.F., Ward, C.H. (2010). *In situ remediation of chlorinated solvent plumes*, Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA.
- Su, T.R., Lin, J.J., Tsai, C.C., Huang, T.K., Yang, Z.Y., Wu, M.O., Zheng, Y.Q., Su, C.C., Wu, Y.J. (2013). Inhibition of melanogenesis by gallic acid: Possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in B16F10 cells, *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 20443-20458.
- Sun, W., Qu, S., Du, Z. (2014). Hollow fiber liquid-phase microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of naloxone, buprenorphine and norbuprenorphine in human plasma, *Journal of Chromatography B*, **951-952**, 157-163.
- Šaponjac, V.T., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Pajin, B., Đilas, S., Petrović, J., Lončarević, I., Stajčić, S., Vulić, J. (2016). Sour cherry pomace extract encapsulated in whey and soy proteins: Incorporation in cookies, *Food Chemistry*, **207**, 27-33.
- Švarc-Gajić, J. (2009). *General toxicology*, Nova Science Publishers, Inc., New York, USA.
- Švarc-Gajić, J. (2012). *Sampling and sample preparation in analytical chemistry*, Nova Science Publishers, Inc., New York, USA.
- Švarc-Gajić, J., Cvetanović, A., Segura-Carretero, A., Linares, I.B., Mašković, P. (2017). Characterisation of ginger extracts obtained by subcritical water, *The Journal of Supercritical of Fluids*, **123**, 92-100.



- Švarc-Gajić, J., Cerdà, V., Clavijo, S., Suárez, R., Mašković, P., Cvetanović, A., Delerue-Matos, C., Carvalho, A.P., Novakov, V. (2018a). Bioactive compounds of sweet and sour cherry stems obtained by subcritical water extraction, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **93**, 1627-1635.
- Švarc-Gajić, J., Clavijo, S., Suárez, R., Cvetanović, A., Cerdà, V. (2018b). Simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction derivatisation and gas chromatography mass spectrometry analysis of subcritical water extracts of sweet and sour cherry stems, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **410**, 1943-1953.
- Tafesh, A., Najami, N., Jadoun, J., Halahlih, F., Riepel, H., Azaizeh, H. (2011). Synergistic antibacterial effects of polyphenolic compounds from olive mill wastewater, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2011**, 1-9.
- Tanaka, T., Shimizu, M., Kochi, T., Moriwaki, H. (2013). Chemical-induced carcinogenesis, *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, **5**, 203-209.
- Tang, S., Qi, T., Ansah, P.D., Fouemina, J.C.N., Shen, W., Basheer, C., Lee, H.K. (2018). Single-drop microextraction, *Trends in Analytical Chemistry*, **108**, 306-313.
- Teinkela, J.E.M., Noundou, X.S., Fannang, S., Meyer, F., Vardamides, J.C., Mpondo, E.M., Krause, R.W.M., Azebaze, A.G.B., Nguedia, J.C.A. (2017). *In vitro* antimicrobial activity of the methanol extract and compounds from the wood of *Ficus elastica* Roxb. ex Hornem. aerial roots, *South African Journal of Botany*, **111**, 302-306.
- Thakur, A., Chun, Y.S., October, N., Yang, H.O., Maharaj, V. (2019). Potential of South African medicinal plants targeting the reduction of A $\beta$ 42 protein as a treatment of Alzheimer's disease, *Journal of Ethnopharmacology*, **231**, 363-373.
- Tian, Y., Puganen, A., Alakomi, H.L., Uusitupa, A., Saarela, M., Yang, B. (2018). Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants, *Food Research International*, **106**, 291-303.
- Todd, R., Baroutian, S. (2017). A techno-economic comparison of subcritical water, supercritical CO<sub>2</sub> and organic solvent extraction of bioactives from grape marc, *Journal of Cleaner Production*, **158**, 349-358.
- Trinh, B.T.D., Quach, T.T.T., Bui, D.N., Staerk, D., Nguyen, L.H.D., Jäger, A.K. (2017). Xanthones from the twigs of *Garcinia oblongifolia* and their antidiabetic activity, *Fitoterapia*, **118**, 126-131.
- Trujillo-Rodríguez, M.J., Rocío-Bautista, P., Pino, V., Afonso, A.M. (2013). Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **51**, 87-106.

- Truong, X.T., Park, S.H., Lee, Y.G., Jeong, H.Y., Moon, J.H., Jeon, T.I. (2017). Protocatechuic acid from pear inhibits melanogenesis in melanoma cells, *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, 1809.
- Tunchaiyaphum, S., Eshtiaghi, M.N., Yoswathana, N. (2013). Extraction of bioactive compounds from mango peels using green technology, *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, **4**, 194-198.
- Ubwa, S.T., Asemave, K., Oshido, B., Idoko, A. (2013). Preparation of biogas from plants and animal waste, *International Journal of Science and Technology*, **2**, 480-485.
- Vakalis, S., Sotiropoulos, A., Moustakas, K., Malamis, D., Vekkos, K., Baratieri, M. (2017). Thermochemical valorization and characterization of household biowaste, *Journal of Environmental Management*, **203**, 648-654.
- Valcárcel, M., Cárdenas, S., Lucena, R. (2014). Microextraction techniques, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **406**, 1999-2000.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, **160**, 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**, 44-84.
- Vanzolini, K.L., Jiang, Z., Zhang, X., Vieira, L.C.C., Corrêa, A.G., Cardoso, C.L., Cass, Q.B., Moaddel, R. (2013). Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: A new tool for plant extract ligand screening, *Talanta*, **116**, 647-652.
- Vennerås, C. (2013). Eosinophil Trafficking, In: *Eosinophils in health and disease* (Lee, J.J., Rosenberg, H.F., eds.), Academic Press, London, United Kingdom.
- Vergara-Salinas, J.R., Cuevas-Valenzuela, J., Pérez-Correa, J.R. (2015). Pressurized hot water extraction of polyphenols from plant material, In: *Biotechnology of bioactive compounds: Sources and applications* (Gupta, V.K., Tuohy, M.G., Lohani, M., O'Donovan, A., eds.), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom.
- Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I., Alborés, S. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology, *The Journal of Supercritical Fluids*, **133**, 58-64.

- Vilela, A.F.L., Seidl, C., Lima, J.M., Cardoso, C.L. (2018). An improved immobilized enzyme reactor-mass spectrometry-based label free assay for butyrylcholinesterase ligand screening, *Analytical Biochemistry*, **549**, 53-57.
- Vladić, J. (2017). Savremene metode ekstrakcije rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.), hemijski sastav i biološka aktivnost odabranih ekstrakata, *Doktorska disertacija*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Vlaisavljević, S. (2014). Hemijska, biohemijska i mikrobiološka karakterizacija *Trifolium pratense* L., *Doktorska disertacija*, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Vukelić, Đ., Boskovic, N., Agarski, B., Radonic, J., Budak, I., Pap, S., Sekulic, M.T. (2018). Eco-design of a low-cost adsorbent produced from waste cherry kernels, *Journal of Cleaner Production*, **174**, 1620-1628.
- Wagle, A., Seong, S.H., Jung, H.A., Choi, J.S. (2019). Identifying an isoflavone from the root of *Pueraria lobata* as a potent tyrosinase inhibitor, *Food Chemistry*, **276**, 383-389.
- Wahyudiono, W., Machmudah, S., Goto, M. (2013). Utilization of sub and supercritical water reactions in resource recovery of biomass wastes, *Engineering Journal*, **17**, 1-12.
- Wang, H.C., Chen, C.R., Chang, C.J. (2001). Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides, *Food Chemistry*, **72**, 505-509.
- Wang, N.Y., Yang, H.J., Su, J.F., Kong, F., Zhang, M.X., Dong, H.Q., Zhang, X.Q., Jia, J.P., Han, D.M. (2007). Hearing impairment in senile dementia of Alzheimer's type, *Journal of Otology*, **2**, 14-17.
- Wang, H.B., He, F., Lu, M.B., Zhao, C.F., Xiong, L., Yu, L.J. (2014). High-quality lycopene overaccumulation via inhibition of  $\gamma$ -carotene and ergosterol biosyntheses in *Blakeslea trispora*, *Journal of Functional Foods*, **7**, 435-442.
- Wang, M., Jiang, N., Wang, Y., Jiang, D., Feng, X. (2017a). Characterization of phenolic compounds from early and late ripening sweet cherries and their antioxidant and antifungal activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**, 5413-5420.
- Wang, X., Li, Y., Cai, F., Qing, Q., Yuan, K., Chen, B., Luan, T. (2017b). Fully automatic single-drop microextraction with one-step extraction and derivatization and its application for rapid analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in seawaters, *Talanta*, **164**, 727-734.
- Wang, N., Zhang, G., Wang, L., Li, J., An, Q., Ji, S. (2017c). Pervaporation dehydration of acetic acid using NH<sub>2</sub>-UiO-66/PEI mixed matrix membranes, *Separation and Purification Technology*, **186**, 20-27.

- Wani, M.C., Horwitz, S.B. (2014). Nature as a remarkable chemist: A personal story of the discovery and development of Taxol<sup>®</sup>, *Anticancer Drugs*, **25**, 482-487.
- Wen, L., Zhao, Y., Jiang, Y., Yu, L., Zeng, X., Yang, J., Tian, M., Liu, H., Yang, B. (2017). Identification of a flavonoid C-glycoside as potent antioxidant, *Free Radical Biology and Medicine*, **110**, 92-101.
- WHO (2003). *Dichloromethane in drinking-water*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO (2016). *Global report on diabetes*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wiboonsirikul, J., Adachi, S. (2008). Extraction of functional substances from agricultural products or by-products by subcritical water treatment, *Food Science and Technology Research*, **14**, 319-328.
- Wilce, M.C.J., Parker, M.W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1205**, 1-18.
- Wilkins, H.M., Swerdlow, R.H. (2017). Amyloid precursor protein processing and bioenergetics, *Brain Research Bulletin*, **133**, 71-79.
- Wojdyło, A., Nowicka, P., Laskowski, P., Oszmiański, J. (2014). Evaluation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) fruits for their polyphenol content, antioxidant properties, and nutritional components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 12332-12345.
- Worsztynowicz, P., Napierała, M., Białas, W., Grajek, W., Olkowicz, M. (2014). Pancreatic  $\alpha$ -amylase and lipase inhibitory activity of polyphenolic compounds present in the extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.), *Process Biochemistry*, **49**, 1457-1463.
- Wu, B., Dong, D. (2012). Human cytosolic glutathione transferases: Structure, function, and drug discovery, *Trends in Pharmacological Sciences*, **33**, 656-668.
- Wu, Y., Huang, M., Song, N., Hu, W. (2014). Electrochemical detection of guaiacol in bamboo juice based on the enhancement effect of RGO nanosheets, *Analytical Methods*, **6**, 2729-2735.
- Wünsch, A., Hormaza, J.I. (2002). Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences, *Heredity*, **89**, 56-63.
- Xiao, Q., Hu, B., He, M. (2008). Speciation of butyltin compounds in environmental and biological samples using headspace single drop microextraction coupled with gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1211**, 135-141.

- Xie, S.S., Wang, X., Jiang, N., Yu, W., Wang, K.D.G., Lan, J.S., Li, Z.R., Kong, L.Y. (2015). Multi-target tacrine-coumarin hybrids: Cholinesterase and monoamine oxidase B inhibition properties against Alzheimer's disease, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **95**, 153-165.
- Xie, S.S., Lan, J.S., Wang, X., Wang, Z.M., Jiang, N., Li, F., Wu, J.J., Wang, J., Kong, L.Y. (2016). Design, synthesis and biological evaluation of novel donepezil-coumarin hybrids as multi-target agents for the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **24**, 1528-1539.
- Xie, P.J., Huang, L.X., Zhang, C.H., Ding, S.S., Deng, Y.J., Wang, X.J. (2018). Skin-care effects of dandelion leaf extract and stem extract: Antioxidant properties, tyrosinase inhibitory and molecular docking simulations, *Industrial Crops & Products*, **111**, 238-246.
- Xiong, J., Hu, B. (2008). Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection, *Journal of Chromatography A*, **1193**, 7-18.
- Xu, H., Wang, W., Liu, X., Yuan, F., Gao, Y. (2015a). Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water, *Industrial Crops and Products*, **76**, 946-954.
- Xu, M., Gu, X., Lu, S., Qiu, Z., Sui, Q., Miao, Z., Zang, X., Wu, X. (2015b). Degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution in the thermally activated persulfate system, *Journal of Hazardous Materials*, **286**, 7-14.
- Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T.R., Kohli, S., Rana, V. (2004). Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques – a review, *Bioresource Technology*, **95**, 1-10.
- Yan, L.Y., Teng, L.T., Jhi, T.J. (2006). Antioxidant properties of guava fruit: Comparison with some local fruits, *Sunway Academic Journal*, **3**, 9-20.
- Yancheva, D., Velcheva, E., Glavcheva, Z., Stamboliyska, B., Smelcerovic, A. (2016). Insights in the radical scavenging mechanism of syringaldehyde and generation of its anion, *Journal of Molecular Structure*, **1108**, 552-559.
- Yang, Y., Chen, J., Shi, Y.P. (2010). Determination of aconitine, hypaconitine and mesaconitine in urine using hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, **878**, 2811-2816.

- Yang, C., Wang, J., Li, D. (2013). Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review, *Analytica Chimica Acta*, **799**, 8-22.
- Yang, B., Cheng, Z., Yuan, T., Gao, X., Tan, Y., Ma, Y., Shen, Z. (2018a). Temperature sensitivity of nitrogen-containing compounds decomposition during supercritical water oxidation (SCWO), *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **93**, 31-41.
- Yang, G., Wang, D., Yang, Q., Zhao, J., Liu, Y., Wang, Q., Zeng, G., Li, X., Li, H. (2018b). Effect of acetate to glycerol ratio on enhanced biological phosphorus removal, *Chemosphere*, **196**, 78-86.
- Yang, J., Wang, S., Li, Y., Zhang, Y., Xu, D. (2019a). Novel design concept for commercial-scale plant for supercritical water oxidation of industrial and sewage sludge, *Journal of Environmental Management*, **233**, 131-140.
- Yang, B., Cheng, Z., Shen, Z. (2019b). Decomposition of 14 organophosphate flame retardants during supercritical water oxidation, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **95**, 40-47.
- Yildiz, F. (2010). *Advances in food biochemistry*, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, USA.
- Yilmaz, C., Gökmen, V. (2013). Compositional characteristics of sour cherry kernel and its oil as influenced by different extraction and roasting conditions, *Industrial Crops and Products*, **49**, 130-135.
- Yoshida, H., Tavakoli, O. (2004). Sub-critical water hydrolysis treatment for waste squid entrails and production of amino acids, organic acids, and fatty acids, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **37**, 253-260.
- Yuan, X., Li, L., Sun, H., Sun, S., Zhang, Z. (2017). Optimization of subcritical water extraction polysaccharides from *Inonotus Obliquus* and their antioxidant activities, *International Journal of Biology*, **9**, 38-50.
- Zakić, D. (2001). Uticaj dodataka polipropilenskih vlakana na atheziju maltera za podlogu, *Materijali i konstrukcije*, **44**, 39-46.
- Zeković, Z., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cvejin, A., Elgndi, M.A., Pavlić, B. (2014). Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology, *The Journal of Supercritical Fluids*, **95**, 560-566.
- Zengin, G., Sarikurkcü, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to

- Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes, *Industrial Crops and Products*, **53**, 244-251.
- Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A. (2015). Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: A phytochemical study, *Industrial Crops and Products*, **70**, 1-6.
- Zengin, G., Nithiyantham, S., Locatelli, M., Ceylan, R., Uysal, S., Aktumsek, A., Selvi, P.K., Mašković, P. (2016). Screening of *in vitro* antioxidant and enzyme inhibitory activities of different extracts from two uninvestigated wild plants: *Centranthus longiflorus* subsp. *longiflorus* and *Cerintho minor* subsp. *auriculata*, *European Journal of Integrative Medicine*, **8**, 286-292.
- Zengin, G., Bulut, G., Mollica, A., Haznedaroglu, M.Z., Dogan, A., Aktumsek, A. (2017). Bioactivities of *Achillea phrygia* and *Bupleurum croceum* based on the composition of phenolic compounds: *In vitro* and *in silico* approaches, *Food and Chemical Toxicology*, **107**, 597-608.
- Zengin, G., Llorent-Martínez, E.J., Fernández-de Córdova, M.L., Bahadori, M.B., Mocan, A., Locatelli, M., Aktumsek, A. (2018). Chemical composition and biological activities of extracts from three *Salvia* species: *S. blepharochlaena*, *S. euphratica* var. *leiocalycina*, and *S. verticillata* subsp. *amasiaca*, *Industrial Crops and Products*, **111**, 11-21.
- Zengin, G., Aumeeruddy, M.Z, Diuzheva, A., Jekő, J., Cziáky, Z., Yildiztugay, A., Yildiztugay, E., Mahomoodally, M.F. (2019). A comprehensive appraisal on *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. flower extracts with HPLC-MS/MS profiles, antioxidant and enzyme inhibitory properties, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **164**, 581-589.
- Zhang, Y., Herman, B. (2002). Ageing and apoptosis, *Mechanisms of Ageing and Development*, **123**, 245-260.
- Zhang, T., Gao, Y., Mao, Y., Zhang, Q., Lin, C., Lin, P., Zhang, J., Wang, X. (2012). Growth inhibition and apoptotic effect of alpha-eleostearic acid on human breast cancer cells, *Journal of Natural Medicines*, **66**, 77-84.
- Zhang, H., Zhou, Q., Cao, J., Wang, Y. (2013). Mechanism of cinnamic acid-induced trypsin inhibition: A multi-technique approach, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **116**, 251-257.
- Zhang, R., Wang, H., You, Z., Jiang, X., Yang, X. (2017). Optimization of bio-asphalt using bio-oil and distilled water, *Journal of Cleaner Production*, **165**, 281-289.

- Zhou, W., Xie, H., Xu, X., Liang, Y., Wei, X. (2014). Phenolic constituents from *Isodon lophanthoides* var. *graciliflorus* and their antioxidant and antibacterial activities, *Journal of Functional Foods*, **6**, 492-498.
- Zhu, G.Y., Zhu, X., Wan, X.L., Fan, Q., Ma, Y.H., Qian, J., Liu, X.L., Shen, Y.J., Jiang, J.H. (2010). Hydrolysis technology and kinetics of poultry waste to produce amino acids in subcritical water, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **88**, 187-191.
- Zhu, Y., Bai, Z., Phuan, W.C., Ghaida, F.A., Hosmane, N.S., Ding, J. (2018). Catalytic conversion of vanillic acid to catechol by palladium acetate/bis(aminomethyl)-nido-dicarbaborane (11) system, *Journal of Organometallic Chemistry*, **865**, 58-64.
- Zichová, S., Brisudová, A., Hrouzková, S. (2018). Present state and applications of single drop microextraction for the determination of harmful organic compounds and pollutants, *Nova Biotechnologica et Chimica*, **17**, 1-15.