



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Весна М. Величковић

**Полифенолни профил и биохемијска
активност екстракта одабраних биљних
врста као извора потенцијалних
природних нутрацеутика**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Vesna M. Veličković

**Polyphenolic profile and biochemical activity of
extracts of selected plant species as a source
of potential natural nutraceuticals**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021.

Аутор
Име и презиме: Весна Величковић
Датум и место рођења: 8.12.1974.
Садашње запослење: Технички факултет у Чачку и Прехрамбено угоститељска школа у Чачку, наставник хемије
Докторска дисертација
Наслов: Полифенолни профил и биохемијска активност екстраката одабраних биљних врста као извора потенцијалних природних нутрацеутика
Број страница: 156
Број слика: 46
Број библиографских података: 318
Установа и место где је рад израђен: дато у докторској дисертацији
Научна област (УДК): Хемија – Биохемија (577.1)
Ментор: др Павле Машковић, ванредни професор
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 06.06.2018.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације:
IV-01-576/6 од 11.07.2018. године.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
др Павле Машковић, ванредни професор Агрономски факултет, Универзитет у Крагујевцу
др Сузана Јовановић Шанта, ванредни професор Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
Др Данијела Костић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу
др Јелена Машковић, ванредни професор Агрономски факултет, Универзитет у Крагујевцу
Др Владимир Михајловић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
др Сузана Јовановић Шанта, ванредни професор Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
Др Данијела Костић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу
Др Владимир Михајловић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Датум одбране дисертације: 2021. Година

Ментор:

др Павле Машковић, ванредни професор
Агрономски факултет,
Универзитет у Крагујевцу

Чланови Комисије:

др Сузана Јовановић Шанта, председник Комисије
Природно-математички факултет,
Универзитет у Новом Саду

Др Данијела Костић, редовни професор,
Природно-математички факултет,
Универзитет у Нишу

Др Владимир Михајловић, доцент,
Природно-математички факултет,
Универзитет у Крагујевцу

ИЗВОД

Ова докторска дисертација је конципирана са циљем да испита полифенолни профил као и потенцијална биохемијска дејства екстракта добијених различитим техникама екстракције (конвенционалним и неконвенционалним) одабраних биљних врста *Lavatera thuringiaca* L., *Erica carnea* L. и *Satureja hortensis* L. Од конвенционалних екстракција су примењене Сокслетова (Soxlet) екстракција и мацерација, а од савремених ултразвучна екстракција, микроталасна екстракција и субкритична екстракција водом. Такође, ова истраживања су усмерена у правцу пружања могућности наведених биљних екстракта као извора потенцијалних природних нутрацеутика. У том смислу, у овој докторској дисертацији су презентирани резултати следећих испитивања:

- квалитативна идентификација компонената екстракта биљних врсти *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.
- квантитативна анализа компонената екстракта биљних врсти *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.
- биохемијска активност екстракта биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.
- одређивање опште токсичности и генотоксичности испитиваних екстракта биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L., како би утврдили могућност примене истих као потенцијалних природних нутрацеутика.

На основу свих спроведених истраживања, екстракти добијени из биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. су од непроцењивог научног значаја. Они представљају смернице за даље проучавање и примену ових биљних врста као извора природних нутрацеутика у превентивне и терапијске сврхе. Уједно допринос научном напретку на пољу биохемије, медицине, фармације, фармакотерапије у виду проширења сазнања о активним састојцима биљака и њиховог позитивног деловања у третману различитих болести, али и у профилакси ради очувања здравља као најважнијег ресурса са којим човек располаже.

Кључне речи: технике екстракције, *Lavatera thuringiaca* L., *Erica carnea* L., *Satureja hortensis* L. полифеноли, нутрацеутици

SUMMARY

This doctoral dissertation is designed to examine the polyphenolic profile as well as the potential biochemical effects of extracts obtained by different extraction techniques (conventional and unconventional) of protected plants of the species *Lavatera thuringiaca* L., *Erica carnea* L. and *Satureja hortensis* L. Also, this research is aimed at providing the possibility of these plant extracts as a source of potential natural nutraceuticals. In that sense, in this doctoral dissertation the results of the following examinations are presented: In this sense, the paper presents the results of the following tests:

- qualitative identification of components of extracts of plant species *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. and *S. hortensis* L,
- • quantitative analysis of components of extracts of plant species *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. and *S. hortensis* L,
- • biochemical activity of extracts of plant species *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. and *S. hortensis* L,
- • determination of general toxicity and genotoxicity of tested extracts of plant species *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. and *S. hortensis* L., in order to determine the possibility of using them as potential natural nutraceuticals.
- Based on all conducted research, extracts were obtained from plant species *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. and *S. hortensis* L. are of inestimable scientific importance. They represent guidelines for further study and application of these plant species as sources of natural nutraceuticals in preventive and therapeutic species. One contribution to scientific progress in biochemistry, medicine, pharmacy, pharmacotherapy in the form of expanding knowledge about the active ingredients of bioca and their positive effects is the beginning of the treatment of a large number of diagnostic tests.

Keywords: extraction techniques, *Lavatera thuringiaca* L., *Erica carnea* L., *Satureja hortensis* L., polyphenols, nutraceuticals

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО	1
2.1. Појам функционалне хране и нутрацеутика	1
2.1.1. Категоризација и порекло нутрацеутика	2
2.1.2. Бенефити примене нутрацеутика	3
2.2. Биљни нутрацеутици	4
2.3. Биљне врсте коришћене у испитивањима	5
2.3.1. <i>Lavatera thuringiaca</i> L.	5
2.3.1.1. Опис и етимологија биљке	5
2.3.2. <i>Erica carnea</i> L.	6
2.3.2.1. Опис и етимологија биљке	6
2.3.3. <i>Satureja hortensis</i> L.	7
2.3.3.1. Опис и етимологија биљке	7
2.4. Секундарни метаболити биљака	9
2.4.1. Фенолна једињења	9
2.4.1.1. Фенолне киселине	10
2.4.1.2. Флавоноиди.....	12
2.4.2.3. Танини	16
2.4.2. Биосинтеза природних фенолних једињења	16
2.4.2.1. Пут шикимске киселине	16
2.4.2.2. Пут синтезе фенилпропаноида.....	22
2.4.2.3. Биосинтеза флавоноида	24
2.5. Фармаколошка својства биљних полифенола.....	26
2.5.1. Антиоксидативно дејство полифенола	26
2.5.1.1. Оксидативни стрес	26
2.5.1.2. Липидна пероксидација	28
2.5.1.3. Антиоксиданси и механизми антиоксидативне заштите	29
2.5.2. Антибактеријско дејство полифенола	34
2.5.3. Антитуморска и цитотоксична активност	36
2.5.3.1. Антитуморско и антикарциномско дејство биљних екстраката.....	38
3. ЕКСТРАКТИВНЕ ТЕХНИКЕ ПРИМЕЊЕНЕ У РАДУ	40
3.1. Конвенционалне екстрактивне методе	41
3.1.1. Мацерација	41
3.1.2. Сокслет (Soxlet) екстракција.....	42

3.2. Неконвенционалне екстрактивне методе	43
3.2.1. Ултразвучна екстракција.....	43
3.2.2. Микроталасна екстракција.....	44
3.2.3. Субкритична екстракција са водом.....	44
4. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА	48
5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА	50
5.1. Биљни материјал.....	50
5.2. Хемикалије, реагенси и апарати.....	50
5.3. Екстракција испитиваних биљних врста	51
5.3.1. Мацерација (МАЦ)	51
5.3.2. Екстракција по Соклету (СЕ).....	51
5.3.3. Ултразвучна екстракција (УАЕ).....	52
5.3.4. Микроталасна екстракција (МАЕ)	52
5.3.5. Субкритична екстракција водом (СЦВ)	52
5.3.6. Принос добијених екстраката	53
5.4. Испитивање полифенолног профила добијених екстраката	53
5.4.1. Одређивање садржаја укупних фенола.....	53
5.4.2. Одређивање садржаја флавоноида	54
5.4.3. Одређивање садржаја кондензованих танина	54
5.4.4. Одређивање садржаја галотанина	55
5.4.5. Одређивање садржаја антоцијана.....	55
5.5. HPLC анализа испитиваних биљних екстраката	56
5.6. Биохемијска активност различитих биљних екстраката <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	57
5.6.1. Одређивање антиоксидативне активности	57
5.6.1.1. Одређивање укупне антиоксидативне активности	58
5.6.1.2. Одређивање антиоксидативне активности мерењем нивоа инхибиције липидне пероксидације.....	58
5.6.1.3. Одређивање антиоксидативне активности мерењем нивоа хидроксил радикала	59
5.6.1.4. Одређивање антиоксидативне активности на нивоу DPPH радикала.....	59
5.6.2. Одређивање антибактеријске активности	60
5.6.2.1. Микроорганизми коришћени у раду	60
5.6.2.2. Припремање суспензије бактеријских ћелија.....	60
5.6.2.3. Одређивање антибактеријске активности испитиваних екстраката биљака микродилуционом методом у <i>in vitro</i> условима	61
5.6.3. Одређивање цитотоксичне активности испитиваних екстраката биљака МТТ тестом у <i>in vitro</i> условима	62

5.6.4. Одређивање опште токсичности и генотоксичности	63
5.7. Статистичка обрада података	63
6. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	64
6.1. Принос екстракта биљних полифенола	64
6.2. Количина полифенолних једињења у екстрактима биљака <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	68
6.3. HPLC анализа испитиваних екстракта биљака	77
6.4. Биохемијска активност различитих екстракта биљних врста <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	90
6.4.1. Антиоксидативни капацитет екстракта биљних врста <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	90
6.4.2. Антибактеријска активност екстракта биљака <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	97
6.4.3. Цитотоксична активност екстракта биљака <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	103
6.4.4. Одређивање опште токсичности и генотоксичности <i>Allium анафазно-</i> <i>телофазним</i> тестом екстракта биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	107
6.5. Статистичка обрада резултата	112
6. ЗАКЉУЧАК	116
ЛИТЕРАТУРА	121
Биографија аутора	141
Библиографија	142

Листа табела

Табела 1.	Примери нутрацеутика груписаних према извору	2
Табела 2.	Подела нутрацеутика према механизму деловања	3
Табела 3.	Биљне врсте као извори нутрацеутика	5
Табела 4.	Класе полифенола	9
Табела 5.	Систем антиоксидативне одбране	32
Табела 6.	Биљни феноли са најачом антибактеријском активношћу	34
Табела 7.	Биоактивна једињења која се могу екстраховати различитим растварачима	42
Табела 8.	Вредности критичних температура и притиска различитих супстанци	45
Табела 9.	Принос екстракције биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L.	64
Табела 10.	Принос екстракције биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	65
Табела 11.	Принос екстракције биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	66
Табела 12.	Садржај укупних фенолних једињења и одређених класа фенолних једињења у екстрактима биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L.	68
Табела 13.	Садржај укупних фенолних једињења и одређених класа фенолних једињења у екстрактима биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	72
Табела 14.	Садржај укупних фенолних једињења, флавоноида, кондензованих танина, галотанина и укупан садржај антоцијана у екстрактима биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	74
Табела 15.	Једначине калибрационе криве стандарда и други аналитички параметри добијени применом HPLC-DAD анализе	77
Табела 16.	Садржај полифенолних једињења у екстрактима биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L.	78
Табела 17.	Садржај полифенолних једињења у екстрактима биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	83
Табела 18.	Садржај полифенолних једињења у екстрактима биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	87
Табела 19.	Антиоксидативни капацитет различитих екстраката биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L.	91
Табела 20.	Укупна антиоксидативна активност екстраката биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	93
Табела 21.	Укупна антиоксидативна активност екстраката биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	95
Табела 22.	Цитотоксична активност екстраката биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L.	103

Табела 23.	Цитотоксична активност екстраката биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	105
Табела 24.	Цитотоксична активност екстраката биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	106
Табела 25.	Број различитих тирова аберација у ћелијама врха корена лука изложена на различитим екстрактима биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L. у различитим концентрацијама	108
Табела 26.	Број различитих тирова аберација у ћелијама врха корена лука изложена на различитим екстрактима биљне врсте <i>E. carnea</i> L. у различитим концентрацијама	110
Табела 27.	Број различитих тирова аберација у ћелијама врха корена лука изложена на различитим екстрактима биљне врсте <i>S. hortensis</i> L. у различитим концентрацијама	111

Листа слика

Слика 1.	<i>Lavatera thuringiaca</i> L.	6
Слика 2.	<i>Erica carnea</i> L.	7
Слика 3.	<i>Satureja hortensis</i> L.	8
Слика 4.	Идентификоване хидроксibenзове киселине у биљним врстама <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	10
Слика 5.	Идентификоване хидроксициметне киселине у биљним врстама <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	11
Слика 6.	Хлоргенска киселина	11
Слика 7.	Рузмаринска киселина	11
Слика 8.	Основна структура флавоноида	12
Слика 9.	Класе флавоноида	13
Слика 10.	Идентификовани флавоноиди у биљним врстама <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	14
Слика 11.	Флавоноли идентификовани у биљним врстама <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	14
Слика 12.	Флаванон (нарингенин) идентификован у испитиваним биљним врстама <i>L. thuringiaca</i> L., <i>E. carnea</i> L. и <i>S. hortensis</i> L.	15
Слика 13.	Структура антоцијанидина	15
Слика 14.	Процес липидне пероксидације [126]	28
Слика 15.	Структуре ВНА и ВНТ	29
Слика 16.	Детоксикација реактивних врста кисеоника ензимским путем	30
Слика 17.	Глутатион	30
Слика 18.	Аскорбинска киселина (витамин С)	31
Слика 19.	Витамин Е	31
Слика 20.	Убихинон CoQ ₁₀ H ₂	31
Слика 21.	Стабилизација феноксил радикала [142]	32
Слика 22.	Антибактеријско дејство једињења из класе флавоноида	35
Слика 23.	Процес настајања туморских ћелија од здравих ћелија у организму	38

Слика 24.	Фазни дијаграм са критичном тачком	45
Слика 25.	Грађење комплекса флавоноида са алуминијумом [232]	54
Слика 26.	Реакција антиоксиданта са 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикалом	59
Слика 27.	Реакција редукције ресазурина до ресоруфина	61
Слика 28.	Реакција редуковања МТТ-а ензимом митохондријална редуктаза (Е)	62
Слика 29.	HPLC хроматограм екстракта биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L. добијеног Сокслетовом екстракцијом	79
Слика 30.	HPLC хроматограм мацерата биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L.	79
Слика 31.	HPLC хроматограм ултразвучног екстракта биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L.	80
Слика 32.	HPLC хроматограм микроталасног екстракта биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L.	80
Слика 33.	HPLC хроматограм екстракта биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L. добијеног поступком субкритичне екстракције са водом	81
Слика 34.	HPLC хроматограм екстракта биљне врсте <i>E. carnea</i> L. добијеног Сокслетовом екстракцијом	84
Слика 35.	HPLC хроматограм мацерата биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	84
Слика 36.	HPLC хроматограм ултразвучног екстракта биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	85
Слика 37.	HPLC хроматограм микроталасног екстракта биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	85
Слика 38.	HPLC хроматограм екстракта биљне врсте <i>E. carnea</i> L. добијеног поступком субкритичне екстракције водом	86
Слика 39.	HPLC хроматограм екстракта биљне врсте <i>S. hortensis</i> L. добијеног Сокслетовом екстракцијом	88
Слика 40.	HPLC хроматограм мацерата биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	88
Слика 41.	HPLC хроматограм ултразвучног екстракта биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	89
Слика 42.	HPLC хроматограм микроталасног екстракта биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	89
Слика 43.	HPLC хроматограм екстракта биљне врсте <i>S. hortensis</i> L. добијеног поступком субкритичне екстракције водом	90

Слика 44.	Пирсонов коефицијент корелације између испитиваних параметара за биљну врсту <i>L. thuringiaca</i> L.	113
Слика 45.	Пирсонов коефицијент корелације између између фенолних једињења за биљну врсту <i>E. carnea</i> L.	114
Слика 46.	Пирсонов коефицијент корелације између између фенолних једињења за биљну врсту <i>S. hortensis</i> L.	115

Листа схема

Шема 1.	Шикимски пут биосинтезе у биљкама	17
Шема 2.	Почетни кораци шикимат-арогенатног пута	18
Шема 3.	Настајање хоризминске киселине шикиматним путем	20
Шема 4.	Једињења која настају трансформацијама хоризминске киселине	21
Шема 5.	Биосинтеза 4-хидроксибензоеве киселине	22
Шема 6.	Биосинтеза хидроксициметних киселина	23
Шема 7.	Биосинтеза флавоноида у биљкама	25

Листа дијаграма

Хистограм 1.	Принос екстракције биљне врсте <i>Lavatera thuringiaca</i> L.	65
Хистограм 2.	Принос екстракције биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	66
Хистограм 3.	Принос екстракције биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	67
Хистограм 4.	Садржај укупних фенолних једињења и одређених класа фенолних једињења у екстрактима биљне врсте <i>Lavatera thuringiaca</i> L.	70
Хистограм 5.	Графички приказ садржаја укупних фенолних једињења и одређених класа фенолних једињења у екстрактима биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	73
Хистограм 6.	Садржај укупних фенолних једињења, флавоноида, кондензованих танина, галотанина и укупан садржај антоцијана у екстрактима биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	76

Хистограм 7.	Антибактеријске активности екстраката биљне врсте <i>Lavatera thuringiaca</i> L.	98
Хистограм 8.	Антибактеријске активности екстраката биљне врсте <i>Erica carnea</i> L.	99
Хистограм 9.	Антибактеријске активности екстраката биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	100
Хистограм 10.	Цитотоксична активност екстраката биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L.	104
Хистограм 11.	Цитотоксична активност екстраката биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	106
Хистограм 12.	Цитотоксична активност екстраката биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	107
Хистограм 13.	Просечна дужина коренчића у анализираним екстрактима биљне врсте <i>L. thuringiaca</i> L.	108
Хистограм 14.	Просечна дужина коренчића у анализираним екстрактима биљне врсте <i>E. carnea</i> L.	109
Хистограм 15.	Просечна дужина коренчића у анализираним екстрактима биљне врсте <i>S. hortensis</i> L.	111

Листа скраћеница и ознака

А-Ш

А - амрацин

АА - еквиваленти скорбинске киселине

ДХФР - дихидрофолат редуктаза

СЕ - екстракција по Сокслет-у (*Soxlet*)

МАЦ - мацерација (енг. *maceration*)

УАЕ - ултразвучна екстракција (енг. *Ultrasound-Assisted Extraction*)

МАЕ - микроталасна екстракција (енг. *Microwave-Assisted Extraction*)

МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолијум бромид

МИЦ - минимална инхибиторна концентрација (енг. *Minimum Inhibitory Concentration*)

НД - није идентификовано

п.н.е. - пре нове ере

П - принос

САД - Сједињене Америчке Државе

СЦВ - субкритична екстракција водом (енг. *Subcritical Water Extraction*)

ФАС-5 - синтаза масних киселина

А-Z

А- амрацин

АА - аскорбинска киселина

АТСС - стандардни сојеви бактерија (енг. „*American Type Culture Collection*“)

АТР- аденозин трифосфат

ВНА - бутиловани хидроксианизол

ВНТ - бутиловани хидрокситолуен

Cis-DDP - *cis*-диаминодихлороплатина

DNK - дезоксирибонуклеинска киселина

D-Ala - D-аланин

DMSO - диметил сулфоксид

DRPH - 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил

DRPH^{*} - 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал

2D-TLC - дводимензионална танкослојна хроматографија (енг. *Two-dimensional thin-layer chromatography*)

EDTA - етилендиамин тетрасирћетна киселина

ЕРК - екстрацелуларним сигналом регулисана киназа

GAE - гална киселина

Her2c - хумана ћелијска линија цервикс карцинома

HPLC - течна хроматографија високих перформанси (енг. *High-Performance Liquid Chromatography*)

HPLC/DAD - течна хроматографија високих перформанси са диодним детектором (енг. *High-performance liquid chromatography (HPLC) with a diode-array detector (DAD)*)

IC₅₀ - вредност је дефинисана као концентрација узорка који се испитује, а која доводи до неутрализације 50% DPPH радикала

L-Tyr - L -тирозин

L-Trp - L-триптофан

L-Phe - L-фенилаланин

L-Gln- L-глутаминска киселина

L2OB - ћелијске линије добијене из фибробласта миша

MBC- минимална бактерицидна концентрација (eng. *minimum inhibitory concentration*)

MDA - малондиалдехид

MIC- минимална инхибиторна концентрација (eng. *minimum inhibitory concentration*)

МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолијум бромид

NAD - никотинамид аденин динуклеотид (енг. *Nicotinamide adenine dinucleotide*)

NAD + - оксидовани облик никотинамид аденин динуклеотида

NADP - Никотинамид аденин динуклеотид фосфат

NADP+ - оксидовани облик никотинамид аденин динуклеотид фосфата

NADPH - редуковани облик никотинамид аденин динуклеотид фосфата

NCI - Амерички национални институт за карциномска обољења (eng. *American National Cancer Institute*)

NMR - нуклеарна магнетна резонанца

ОН - хидроксилна група

PG - пропил галат

r - коефицијент корелације

RD - хумана ћелијска линија добијена од људског рабдомиосаркома

ROS - реактивне кисеоничне врсте (eng. „*Reactive Oxygen Species*“)

RNS - реактивне врсте азота (eng. „*Reactive Nitrogen Species*“)

RNA - рибонуклеинска киселина

RSS - реактивне врсте сумпора RSS (eng. „*Reactive Sulphur Species*“)

RU - рутин

RP-HPLC - течна хроматографија високих перформанси обрнуте фазе (енг. *Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography*)

SD - стандардна девијација

tBHQ - терц-бутилхидрохинон

TLC - танкослојна хроматографија (енг. *Thin-Layer Chromatography*)

USA - Сједињене Америчке Државе

UV - ултраљубичасто

UV- Vis детекција- ултраљубичаста-видљива детекција (енг. *Ultraviolet-Visible detection*)

WHO - светска здравствена организација

1.УВОД

Човеково здравље у великом делу зависи од његовог понашања и односа према себи. Тврђење Хипократа (460-377 г.п.н.е.) „Да нам храна буде лек, а лек храна“ или познатог немачког филозофа Лудвиг Андреас фон Фојербаха (1804-1872) “Човек је оно што једе” данас више него икада има значаја. У зависности од човекове исхране и односа према истој можемо засигурно рећи да свом организму помажемо или одмажемо. Неке врсте хране садрже супстанце попут адитива, конзерванаса, боја, разних вештачких антиоксиданаса који поседују позитивне, али изазивају и нуз ефекте на здравље човека. У данашњем, савременом друштву услед многобројних негативних фактора којима је човек перманентно изложен, забележен је пораст великог броја здравствених поремећаја и болести попут гојазности, артеросклерозе, Паркинсонове и Алцхајмерове болести, дијабетеса, анемије, аутизма, синдрома хроничног умора, депресије, до оних најдрастичнијих као што су различите врсте малигних обољења. Самим тим, неопходно је усмерити пажњу не само на лечење, већ и на превенцију у циљу очувања здравља и заштите организма. Савремени развој човечанства посебно разних грана како произвођачке тако и прерађивачке индустрије довео је до изbacивања и депоновања у природну средину великог броја разних штетних једињења. Нуз производи из ових грана привреде, а потом и хемијски препарати попут пестицида, хербицида, вештачких полимера, тешких метала и других нужно доводе до нарушавања природне равнотеже која се одражава и на људски организам. Не можемо заобићи неадекватну употребу разних медицинских препарата попут антибиотика и великог броја разних врста синтетичких средстава што доводи до одређених последица. Додатни утицај на организам човека има стрес коме су људи свакодневно изложени и он представља негативан фактор и окидач у развоју великог броја болести.

Самим тим човек бива принуђен да се окрене и да посвети пажњу нутрацеутицима - производима који се осим у исхрани могу примењивати и као лек. Нутрацеутски производ је супстанца која доводи до физиолошких користи у организму, а пружа и заштиту од разних хроничних болести. То су производи између хране и лека који испољавају бројне позитивне ефекте на људско здравље тако да их је пожељно уврстити у превенцију, лечење и третман различитих обољења због њихове ефикасности и сигурности [1-4]. Постоје различите врсте и категорије нутрацеутика. За нас су интересантни природни нутрацеутици, посебно они који воде порекло од биљака. Доказано је да биљни нутрацеутици испољавају бројне позитивне ефекте [5,6]. Они успоравају процес старења, учествују у подизању имунолошког обрамбеног система чиме делују превентивно те тиме умањују ризик од бројних обољења, доприносе продужењу човековог животног века и подржавају нормално функционисање организма у целини [5-7]. Поред свих наведених утицаја, нутрацеутици доприносе и смањењу трошкова здравствене неге. Интересовање научне јавности за нутрацеутике је у непрекидном порасту што се да и видети у повећаном броју научних истраживања и студија последњих деценија на овом пољу.

Наша истраживања су усмерена на биљне врсте које су широј научној јавности недовољно познате, *L. thuringiaca* L. *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. Досадашња испитивања биљне врсте *L. thuringiaca* L. су веома оскудна, док су истраживања везана за биљну врсту *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. непотпуна. Хемијске, микробиолошке и фармаколошке активности екстраката наведених биљака нису довољно испитане. Ова докторска дисертација је конципирана са циљем да испита полифенолни профил као и потенцијална биохемијска дејства екстраката добијених различитим техникама екстракције (конвенционалним и неконвенционалним) одабраних биљних врста, *L. thuringiaca* L. *E.*

carnea L. и *S. hortensis* L. Од конвенционалних екстракција су примењене Соклетова (Soxlet) екстракција и мацерација, а од савремених ултразвучна екстракција, микроталасна екстракција и субкритична екстракција водом. Ова истраживања су усмерена у правцу пружања могућности наведених биљних екстраката као извора потенцијалних природних нутрацеутика.

2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1. Појам функционалне хране и нутрацеутика

Исхрани је протеклих деценија несумњиво поклоњена велика пажња широке научне јавности. Уведени су појмови као што су „функционална храна“ и „нутрацеутик“ како би се фокус ставио на проучавање хране са посебним карактеристикама. У прехранбеној и фармацеутској индустрији као и у медицини, производи који припадају категорији нутрацеутика се, уколико су довољно проучени и истражени могу узимати као додатак односно као помоћно средство у терапијској пракси. Ови додаци поседују извесна позитивна својства и делују тако што у првом реду подржавају организам у нормалном функционисању, али и у борби са најразличитијим поремећајима и болестима. Под функционалном храном се подразумева један веома широк појам, заправо концепт и тешко је дати прецизну дефиницију којом би се могло тачно рећи шта она подразумева. Raylog le'i u tome [to што тумачење функционалне хране варира како у зависности од континента, тако и од тржишта и законске регулативе односно законских аката које поједине државе прописују. Према једној дефиницији, функционална храна је храна и састојци хране који пружају здравствену корист поред њене основне нутритивне улоге [8]. Сами почеци концепта се јављају у Јапану осамдесетих година овог века. Иницијатива је покренута у виду пројекта од стране здравствених власти и у том тренутку су вршена испитивања у смислу потенцијалног позитивног деловања хране. Тада се функционална храна (FOSHU) односила на храну која је обogaћена нутријентима за које се очекивало да услед својстава која поседују испоље повољне физиолошке ефекте [9-11]. На европском континенту, наука о функционалној храни се такође развијала. Европска унија је усвојила дефиницију функционалне хране којом се објашњава њено проактивно позитивно дејство на људски организам: „Хранљиви производи се могу сматрати функционалним само уколико заједно са основним хранљивим састојцима поседују утицај који има благотворно дејство на једну или више функција људског организма и тиме побољшава опште и физичке услове и/или врши смањивање ризика од еволуције и развоја болести". [11,12]. У САД је нова дефиниција функционалне хране 2014. дата, по којој је функционална храна „Природна или прерађена храна која садржи позната или непозната биолошки активна једињења, која су дефинисана, ефикасна у нетоксичним количинама, а обезбеђују клинички доказане и документоване користи за здравље, којима се врши спречавање, управљање или третман хроничних болести", при чему је у најновијој верзији дефиниције додат израз "ефективним нетоксичним количинама" да би се нагласио значај количине биоактивних једињења која се налазе у функционалној храни [13]. Биоактивна једињења, њихова врста и количина су веома важни јер је за поједине групе њих утврђено да испољавају и доносе бројне бенефите по људско здравље. Управо ова једињења која потичу из разних извора биљног порекла су предмет проучавања низа научних студија које су уследиле широм света, јер корисни ефекти ових састојака морају бити научно доказани те се одређени кораци пре њихове примене попут анализе фитонутријената, предклиничког скрининга, као и клиничких испитивања њиховог деловања морају предузети. Ти корисни састојци који се налазе у функционалној храни су познати под називом нутрацеутици.

Нутрацеутици су састојци или једињења који показују позитивно дејство и испољавају позитивне ефекте на људско здравље што омогућава да се користе као додаци исхрани како би се обезбедили здравствени бенефити. Међусобно функционална храна и нутрацеутик имају доста сличности, чак их и сматрају за синониме. То је грешка

јер се разликују. Док је функционална храна веома широк, свеобухватан појам дотле су нутрацеутици нешто ужи и они представљају производе који испољавају физиолошку корист или пружају заштиту од хроничних болести [14].

У Јапану, Енглеској и другим земљама, нутрацеутици су постали део исхране почев од деведесетих година. Овај тренд се проширио на остале земље света, тако да су данас нутрацеутици најбрже растући сегмент индустрије, а посебно се на глобалном нутрацеутском тржишту истичу и водеће су земље САД, Велика Британија, Јапан, као и Индија [15].

Термин нутрацеутик потиче од енглеске речи *nutraceutical* која је настала комбиновањем две речи *nutrition*-исхрана и *pharmaceutical*- фармацеутски [16,17]. Односи се на сваку супстанцу која се може сматрати храном или делом хране и пружа медицинску или здравствену заштиту и корист, укључујући превенцију и лечење болести [18]. Дакле, нутрацеутик представља супстанцу који је храна или део хране и повољно утиче на људско здравље тиме што предупредује појаву разних врста болести, а такође се користи за њихов третман и лечење.

2.1.1. Категоризација и порекло нутрацеутика

Постоји више подела нутрацеутика, на основу њихових природних извора, фармаколошких услова, по хемијској конституцији производа и друге.

На основу природног извора из кога потичу нутрацеутици могу бити:

- биљног,
- животињског и
- микробиолошког порекла [19].

У Табели 1. дат је приказ поделе нутрацеутика на основу извора из кога потичу са одређеним представницима.

Табела 1. Примери нутрацеутика груписаних према извору [19].

Нутрацеутици биљног порекла	Нутрацеутици животињског порекла	Нутрацеутици микробиолошког порекла
Аскорбинска киселина	Коњугована линоленска	Различити квасци и
Лутеолин	киселина	одређене бактерије
Лутеин	Докозахексеноична	
Гална киселина	киселина	
Пектин	Сфинголипиди	
Даиздеин	Лецитин	
Глутатион	Калцијум	
Калијум	Кoenзим Q	
β-каротен	Селен	
Ликопен	Цинк	
Лигнин	Креатин	
Капсиацин	Минерали	
Гераниол		
α-токоферол		

Постоји подела нутрацеутика и према њиховом механизму деловања [19].

Табела 2. Подела нутрацеутика према механизму деловања [19].

Антиканцерско дејство	Антиоксидативно дејство	Антиинфламаторно дејство
Капсаицин	Аскорбинска киселина	Линоленска
Генистеин	β -каротен	киселина
Даиздеин	Полифеноли	Капсаицин
<i>Lact. Acidophilus</i>	Токофероли	Кверцетин
Сфинголипиди	α -токоферол	Куркумин
Лимонен	Елагинска киселина	
α -токоферол	Ликопен	
Елагинска киселина	Лутеин	
Лутеин	Глутатион	
Карнизол	Лутеолин	
<i>L. bulgaricus</i>	Катехини	
	Хлорогенска киселина	
	Танини	

Подела према механизму деловања нутрацеутика заснива се на њиховој хемијској природи у молекуларне/елементарне групе [19]:

- изопреноидни деривати (каротеноиди, сапонини, токотриеноли, токофероли, прости терпени),
- фенолна једињења (кумарини, лигнини, танини, антоцијани, изофлавонони, флавонони, флавоноли),
- масне киселине и структурни липиди,
- угљени хидрати и деривати (аскорбинска киселина, олигосахариди),
- супстанце које у основи поседују аминокиселину (аминокиселине, капсаициноиди, изотиоцијанати, индоли, фолат, холин),
- микроби (пробиотици, пребиотици),
- минерали (калцијум, селен, калијум, бакар, цинк).

2.1.2. Бенефити примене нутрацеутика

Употреба доказаних нутрацеутика према великом броју научних студија повољно утиче на човеково здравље. Са здравствене тачке гледишта, веома је мали број нежељених ефеката који се јављају њиховом употребом. Нутрацеутици као додаци исхрани инхибирају многе патолошке процесе: прехладу и кашаљ, депресију, срчана обољења, метаболичке поремећаје, опстипацију, поремећаје спавања, проблеме са варењем, остеопорозу, дијабетес, одржавају хомеостазу холестерола, служе као средства за ублажавање болова и др. [20-25].

Позитивни ефекти које дају нутрацеутици су бројни. Поседују важну улогу у спречавању различитих болести, минимизирају компликацију истих, пружају заштиту од незаразних болести, одлажу процес старења, продужавају очекивани животни век и побољшавају функционисање организма [26]. Нутрацеутици су и приступачни и лако доступни. Учествују у великом броју биолошких процеса који су веома значајни као што су реакције антиоксидативне одбране. Они својим антиоксидативним деловањем спречавају неколико неуродегенеративних болести, укључујући Парконсонову и Алцхајмерову болест, које могу својим деловањем и да инхибирају [27,28].

У оквиру новијих истраживања на пољу пробиотика као нутрацеутика који се користе у лечењу гастроинтестиналних поремећаја, показано је да се добијају позитивни резултати на имуни систем и функције епитела црева, код заразне дијареје код деце и упорне инфекције бактеријом *Clostridium difficile* [29].

2.2. Биљни нутрацеутици

Лечење биљем у модерној медицини заузима високо и важно место и постоји тенденција значајног пораста у његовог коришћења. Оно се рекламира и препоручује као пожељно, док се препоручује смањење примене синтетичких средстава од стране Светске здравствене организације, WHO (2002. год.) [30]. Фармацеутска индустрија сваким даном напредује и ствара све више нових лекова, али се сусрећемо са извесним проблемима у њиховој примени. Доказано је да синтетички антимикуробни агенси испољавају нека негативна својства попут резистенције микроорганизама на њих и последице на човеково здравље [31-33]. Нутритивна једињења која се изолују из екстракта биљака и њихових етарских уља могу се супроставити овим штетним ефектима [34-36]. Биљке су велики извор састојака са потенцијалним веома значајним дејствима. Као нутрацеутици, фитонутријенти и фитоједињења се одликују великим биолошких активности којима учествују у побољшању општег здравственог стања човека, а њихово дејство се заснива на следећим својствима:

- супстрати су за биохемијске реакције,
- кофактори ензимских реакција,
- инхибитори ензимских реакција,
- апсорбенти који се везују и елиминишу нежељене састојке у цревима,
- лиганди који агонизују или антагонизују површину ћелије или унутарћелијске рецепторе,
- чистачи реактивних или токсичних хемикалија,
- једињења која побољшавају апсорпцију и/или стабилност есенцијалних нутријената,
- селективни фактор раста корисних гастроинтестиналних бактерија,
- супстрати за ферментацију за благотворне оралне, желудачне или цревне бактерије
- селективни инхибитори штетних цревних бактерија [37].

Фитоједињења су широка група једињења која припада углавном полифенолима. То су класе једињења као што су флавоноиди, изофлавоноиди, антоцијанидини, терпеноиди и оне имају огроман утицај на систем здравствене заштите и могу пружити здравствене користи, укључујући превенцију и/или лечење болести и физиолошких поремећаја [38]. Биљни феноли у првом реду поседују одлично антиоксидативно дејство [39-42], успешно се супростављају веома штетном процесу липидне пероксидације [43], поседују

антибактеријско, антиинфламаторно дејство, антитуморску, амтиканцерогену и антимуутагену активност [44-50] и бројне друге активности. Све ово их неоспорно сврстава у ред нутрацеутика са великим значајем. Као нутрацеутска једињења доказано су корисни од фенолних једињења и танини. Танини поседују низ позитивних својстава, они „чисте“ штетне слободне радикале и детоксикују канцерске ћелије [51,52].

У табели 3 дат је приказ биљних врста као извора нутрацеутика.

Табела 3. Биљне врсте као извори нутрацеутика

Биолошки назив/фамилија	Део биљке	Активни принцип	Позитивна дејства
<i>Allium ursinum</i> L. (<i>Alliaceae</i>)	цела биљка	алицин	Спазмолитик, антиоксидант, антимикробно дејство на гастроинтестинални систем [53]
<i>Ginkgo biloba</i> (<i>Ginkgoaceae</i>)	листови и семе	гинколид	Побољшава меморијску функцију, антиоксидант [54]
<i>Zingiber officinale</i> (<i>Zingiberaceae</i>)	ризом	зингиберен	Антиоксиданс, антибактеријско дејство [55]
<i>Echinacea purpurea</i> (<i>Asteraceae</i>)	цела биљка (сушена)	алкиламид и ехинацозид	Антивирално, антибактеријско дејство [56]
<i>Hypericum perforatum</i> (<i>Hypericaceae</i>)	надземни део биљке (сушен)	хиперицин и хиперфорин	Антидепресант [57], антивирусно дејство (хепатитис С) [58]
<i>Curcuma Longa</i> (<i>Zingiberaceae</i>)	ризом	куркумин	Антифунгално, антимикробно, хепатопротективно, антидијабетск, антиартритично, антиканцерогено и антисептичко дејство [59]
<i>Valeriana officinalis</i> Linn. (<i>Valerianaceae</i>)	корен (сушен)	валеријанска киселина и валерат	Седатив, анксиолитик и антидепресант [60]
<i>Aloe barbandesis</i> Mill. (<i>Liliaceae</i>)	листови	алоин и алоезин	Антимикробно, антитуморско, хипогликемијско, хиполипидно дејство [61]

2.3. Биљне врсте коришћене у испитивањима

2.3.1. *Lavatera thuringiaca* L.

2.3.1.1. Опис и етимологија биљке

Lavatera thuringiaca L. је вишегодишња зељаста биљка која припада реду *Malvales*, фамилији слезова *Malvaceae* и роду *Lavatera*. Позната је и под називом слез белоружичасти. Фамилија *Malvaceae* или *mallows* (слезови) је породица цветница процењених да садржи 244 родова са 4225 познатих врста зељастих биљака, жбуња и дрвећа дистрибуираних скоро широм света [62].

Lavatera thuringiaca L. је биљка 50-100 cm висока, понекад и до 2 m, усправна, разграната, густо покривена белим звездастим длакама, изузев горњег дела стабљике. Листови при дну стабљике су бубрежасте и плитко прстасто дељени на 5 режњева. Листови при врху стабљике су трорежњасте, цветови крупни, 5-8 cm у промену [63]. Цвета од јуна до септембра, током лета. Плод се састоји из око 20 плодића [64]. Добра је медоносна биљка, пчелама даје нектар и пелуд, а јестиви су млади изданци, листови и цветови (Слика 1.) [65].



Слика 1. *Lavatera thuringiaca* L.

(слике су преузете са:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ed/Lavatera_thuringiaca_Uppsala.jpg/220px-Lavatera_thuringiaca_Uppsala.jpg)

2.3.2. *Erica carnea* L.

2.3.2.1. Опис и етимологија биљке

Erica carnea L. је вишегодишњи зимзелени грм из фамилије Ericaceae (вресови), рода *Erica*. Ботанички је сродна рузмарину и боровници. Још се назива и црњуша или зимоцвет [66]. Овај назив се највероватније доводи у везу са особином коју има биљка, а то је да добро подноси зимске ниске температуре. *Erica carnea* L. је зимзелени полегли жбунић са устајућим гранама, висок 30-40 (-70) cm, густо и fino гранат. Гранчице су голе. Лишће већином по 4 у пршљену, са кратком петелчицом, игличаво, дуго 4-9 mm, често зашиљено, доста круто. Цвета врло рано, док још има снега, отуда назив зимоцвет (око Гоча), од фебруара-априла, често и раније. Цветови у термалним, лиснатим гроздовима, који су већином једнострано орјентисани. Прашника је 8, дужих од крунице [66]. Боја ерике може бити бела, ружичаста и црвена (Слика 2.) [67].

Ова врста на врло стрмим, скелетним, плитким земљиштима, без дрвећа или са ретким дрвећем, чува и везује земљиште стварајући услове за врсте којима је потребно дубље земљиште. Користи се у природној медицини, али с' обзиром да је црњуша веома јако средство, не би се смела употребљавати кувана у црном вину или чак само намочена. Чај лечи реуму, болести бубрега и мехура, бубрежне каменце и песак, прочишћава крв и на тај начин помаже код екцема, кожних осипа и гихта [68]. Они такође имају

антисептичко дејство због присуства арбутина; често се користе у случајевима циститиса, посебно простатских и препоручују се јер су нетоксични [69].



Слика 2. *Erica carnea* L.

(слика је преузета са <https://c8.alamy.com/comp/P5F4GT/na-1-erica-carnea-l-nom-cons-2-calluna-vulgaris-l-hull-original-caption-1-bergheide-erica-carnea-2-gemeine-heide-calluna-vulgaris-1796-johann-georg-sturm-painter-jacob-sturm-522-ericaceae-spp-sturm48-P5F4GT.jpg>)

2.3.3. *Satureja hortensis* L.

2.3.3.1. Опис и етимологија биљке

Satureja hortensis L. (чубар или чубрица, чубрика) (слика 3) је једногодишња ароматична, зачинска и лековита биљка из породице уснатица (Lamiaceae). Ова биљна врста је од давнина коришћена у исхрани [314]. Стабљике су гранате од основе, високе од 30 до 40 cm [315]. Листови су наспрамни, седећи, уски, врло витки, бронзано зелене боје. Љубичасти или љубичасто бели цветови налазе се у горњим чворовима грана [316]. Чашаца је звонаста са 5 скоро једнаких зубаца, често љубичаста. Биљка расте на

стеновитим падинама и каменитим обронцима. Цвета од јула до августа, семе сазрева од августа до септембра и гаји се [315].



Слика 3. *Satureja hortensis* L.

(слика је преузета са са http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Satureja_hortensis_Sturm51.jpg)

Лековиту примену *S. hortensis* L. поседују млади листови или вршни део биљке у цвету. Одсецају се горње половине гранчица пре или за време цветања биљке и суше у танком слоју, мада је забележено да се листови такође могу користити и као сирови или кувани [317]. Ароматичног, помало папреног укуса, користе се у кулинарству углавном као зачин за кувану храну, посебно за теже сварљиву као што је пасуљ, где допуњују укус и смањују надимање [318]. Биљка се користи као карминатив, експекторант и адстрингент, код желучаних поремећаја и анорексије, код хроничног бронхитиса [314]. Такође, користи се и за лечење мучнине, дијареје, загушења бронхија, упале грла и менструалних поремећаја [318].

2.4. Секундарни метаболити биљака

Секундарни метаболизам биљне ћелије чине процеси настајања разноликих органских једињења, секундарних метаболита. Они настају из прекурсора који су настали природним метаболизмом. Отуда потиче њихов уобичајени назив, природна једињења. Њихова важност је велика и огледа се кроз више улога које поседују. То је обрамбена, служе као атрактанти јер путем мириса, боје, укуса привлаче опрашиваче, адаптивне, заштитне и према неким истраживањима биљке су еволуцијом развиле механизме за заштиту од штетног UV зрачења коме су биле изложене синтетишући једињења која ће их штитити [70-73]. Осим наведених, секундарни метаболити налазе примену и користе се у људској исхрани као додаци у виду нутрацеутика. Посебно су интересантни биљни полифеноли из групе секундарних метаболита који пре свега делују заштитно по људско здравље јер поседују изражена антиоксидативна својства [74-76], делују и превентивно код бројних болести као што су кардиоваскуларне, неуродегенеративне и канцерогене болести што потврђују бројне студије [77,78].

2.4.1. Фенолна једињења

Биљке производе велики број једињења која садрже једну или више фенолних група. Биљни полифеноли представљају најзначајнију, веома распрострањену, групу секундарних метаболита биљака. Оно што карактерише ову групу једињења је присуство једног или више ароматичних прстенова у њиховој структури. Прстен (прстенови) су супституисани са бар једном или више хидроксилних супституената (ОН група). Она у молекулу може бити слободна или модификована тако да се фенолна једињења јављају у виду једноставнијих (као што су фенолне киселине) до сложених полимерних једињења [79]. Полифеноли су веома разноврсни и заступљени као слободни, али већином су у везаним облицима. Могу се сврстати у најмање десет различитих класа у зависности од њихове основне структуре [80]. У литератури су присутни многи начини њихове класификације - према броју угљеникових атома, на темељу биолошке активности, биосинтетског пута, физиолошком деловању и др- [81,82]. У табели 4. је приказана подела полифенола на основу њихове структуре.

Табела 4. Класе полифенола [83]

Класа	Број С- атома
Прости феноли	6
Бензохинони	6
Фенолне киселине	8
Ацетофенони	8
Фенилацетилне киселине	8
Хидроксициметне киселине	9
Фенилпропени	9
Кумарини, изокумарини	9
Хромони	9
Нафтохинони	10
Ксантони	13
Стилбени	14
Антрахинони	14
Флавоноиди	15
Лигнани, неолигнани	18
Лигнини	n

Додатно се у ову групу једињења сврставају (осим једињења која поседују ароматични прстен) и велики број једињења која немају ни ароматични прстен, нити фенолне групе, а нису ни полихидроксилни деривати. Оно што их убраја у ову групу једињења је њихово метаболичко порекло. То су једињења попут циметне (нема хидроксилне групе) и хиниске киселине (нема ароматичан прстен).

2.4.1.1. Фенолне киселине

Фенолне киселине су секундарни метаболити биљака, органска једињења која припадају класи карбоксилних киселина. Ова једињења као основу садрже ароматични прстен и карбоксилну групу. Од супституената на бензеновом прстену се могу наћи једна или више више хидроксилних, као и метокси група. Фенолне киселина се могу поделити на:

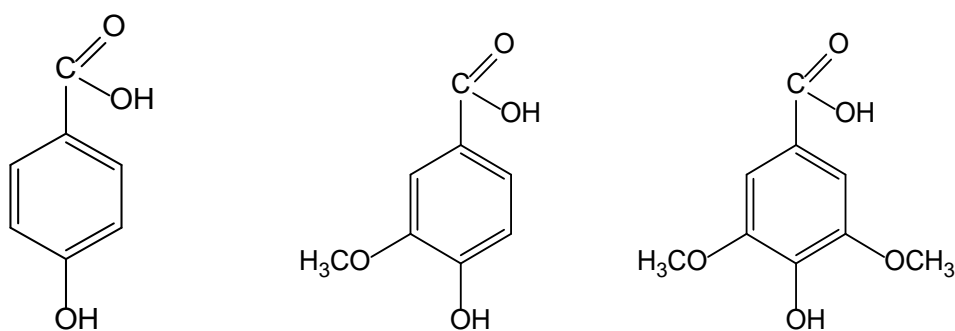
- а) *деривате бензоеве киселине* (p-хидроксibenзоева киселина, протокатехинска киселина, гална киселина, ванилинска киселина, сиригинска киселина, салицилна киселина и генистинска киселина)

Хидроксibenзоеве киселине су основне структуре C₆-C₁. У биљкама се налазе у растворљивим коњугованим облицима, као и везани за ћелијске фракције ћелијске опне (на пример повезани са лигнинима) [85]. Експериментални докази о антиоксидативној, антимикробној, цитопротективној активности фенолних киселина постоје и предмет су проучавања великог броја научника [86-88].

- б) *деривате циметне киселине* [84] (p-кумаринска киселина, кафена киселина, ферулна киселина и синапинска киселина).

Хидроксициметне киселине се ретко јављају у природи слободне, најчешће граде естре са органским киселинама и моносахаридима [88]. Кафена, ферулна и p-кумаринска киселина, су најзаступљеније фенолне киселине [89].

У екстрактима испитиваних биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. у знатним количинама су идентификоване фенолне киселине које су представљене на сликама 4 и 5.

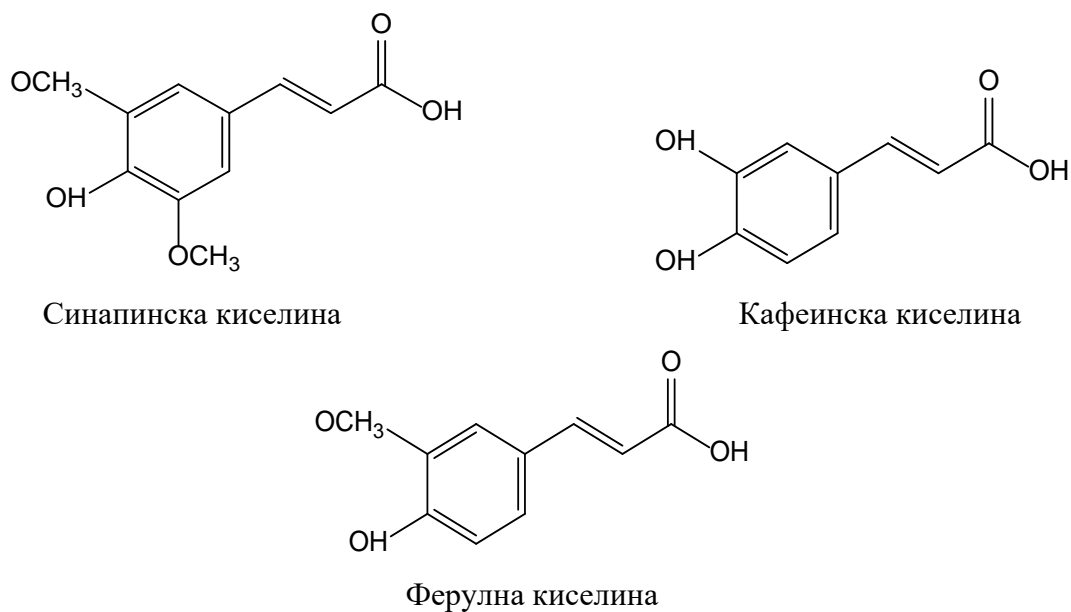


p-хидроксibenзоева киселина

Ванилинска киселина

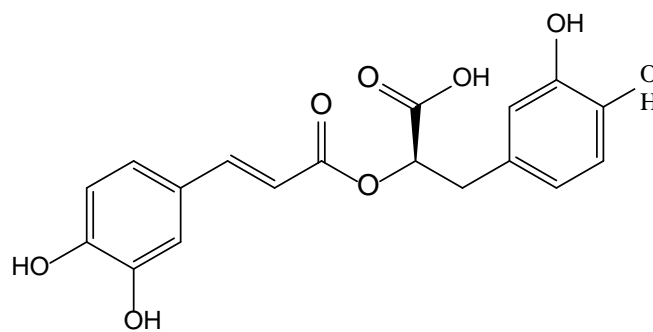
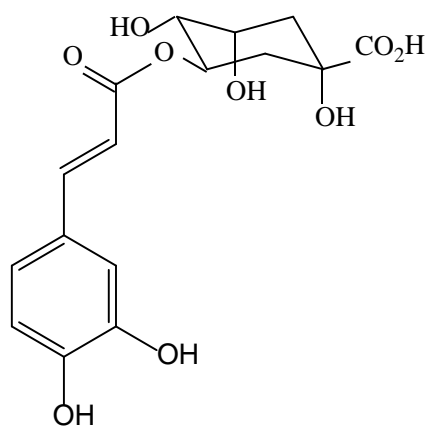
Сиригинска киселина

Слика 4. Идентификоване хидроксibenзоеве киселине у биљним врстама *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.



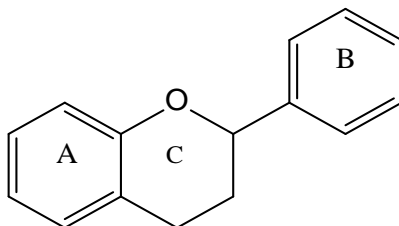
Слика 5. Идентификоване хидроксициметне киселине у биљним врстама *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.

Од деривата фенолних киселина идентификоване су у великим количинама хлоргенска киселина (слика б) и рузмаринска киселина (слика 7).



2.4.1.2. Флавоноиди

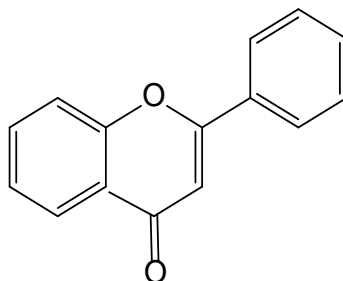
Флавоноиди су велика група природних једињења који се налазе у биљкама, до данас је идентификовано преко 5000 разноврсних флавоноида и тај број наставља да расте [90]. Флавоноиди су деривати 1,3-дифенилпропана чија се основна структура краће обележава С₆-С₃-С₆. Петнаест атома угљеника који чине основну структуру распоређено је у три прстена, од којих су два ароматична, А и В, који су повезани кисеоничним мостом који се налази у склопу трећег (хетероцикличног) прстена С (слика 8).



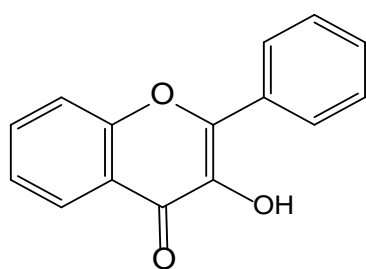
Слика 8. Основна структура флавоноида

У већини случајева је прстен В везан за прстен С у положају 2, али се такође може везати у положају 3 или 4. Различитим нивоом оксидације прстена С добијају се класе флавоноида унутар којих се разликују једињења и по начину супституције тог прстена флавони, флавоноли, флаванони, флаваноли и антоцијанидини [90]. Наведене класе једињења приказане су на слици 9.

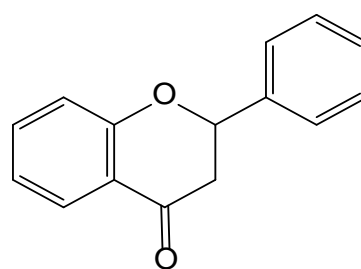
Од структурних карактеристика, степена хидроксилације тј. укупног броја ОН група, супституције функционалних група и њихове саме структуре [91]. Флавоноиди су једињења која се растварају у води, велики број њих обојени су лепом јаком бојом као што су црвена, љубичаста, жута и ружичаста. Јављају се као агликони, гликозиди и као метиловани деривати [91]. Основна структура је агликонског типа (слика 9). Агликон је нешећерна компонента (од њега зависи биолошка активност флавоноида), док је гликон шећерна компонента. Флавоноиди су често хидроксиловани на положајима 3, 5, 7, 2, 3', 4' и 5', а могу да граде и гликозиде, обично се гликозидна веза налази у положајима 3 и 7, од угљених хидрата су заступљени L-рамноза, D-глукоза, глукорамноза, галактоза и арабиноза [91].



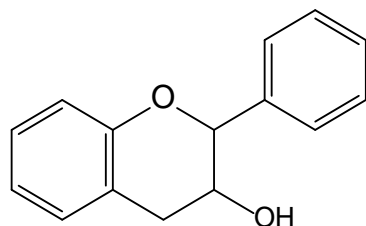
Флавони



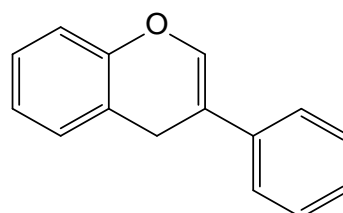
Флавоноли



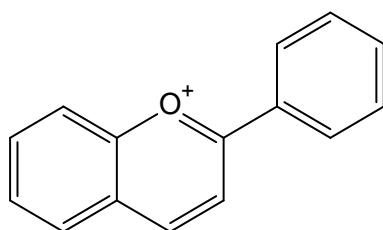
Флавононоли



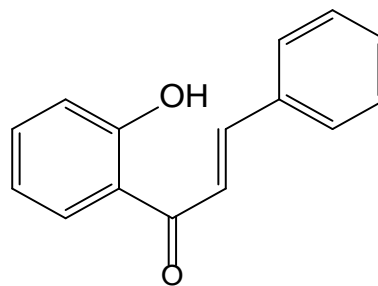
Флаваноли



Изофлаволи



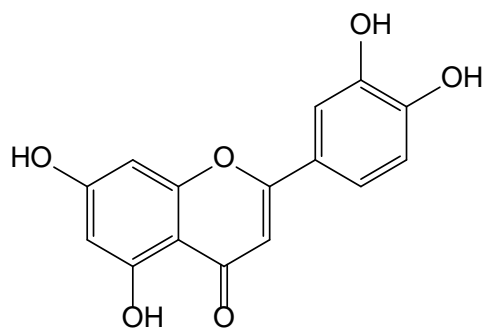
Антоцијанидини



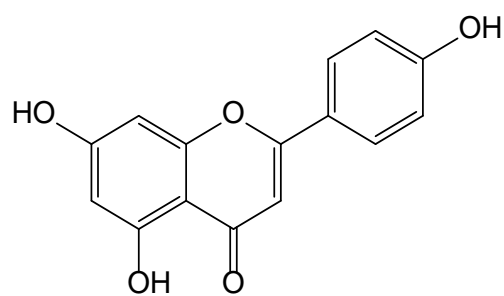
Халкони

Слика 9. Класе флавоноида

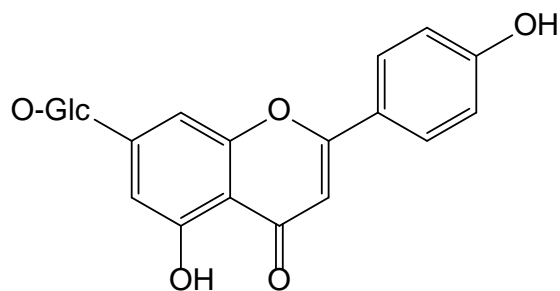
Идентификовани флавоноиди у испитиваним биљним врстама *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. су следећи: од флавона је пронађено присуство у лутеолина и апигенина, а од гликозида у *L. thuringiaca* L. идентификован је апигенин-гликозид (слика 10).



Лутеолин



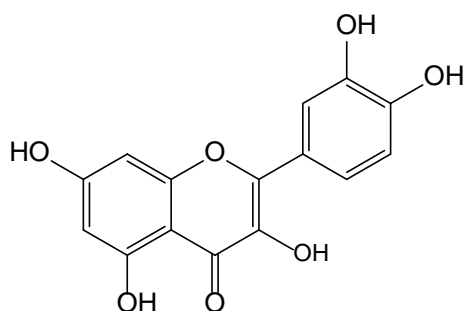
Апигенин



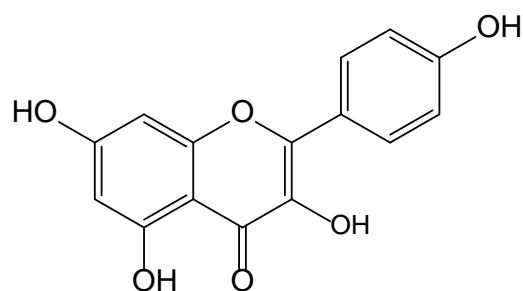
Апигенин-7-О-гликозид

Слика 10. Идентификовани флавоноли у биљним врстама *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.

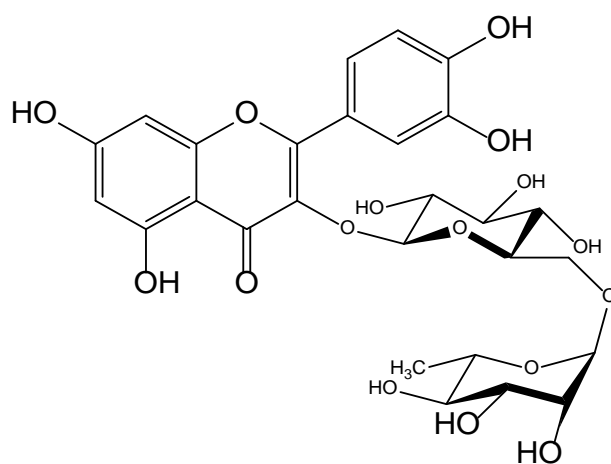
Из класе флавонола потврђено је присуство кверцетина и кемпферола. Рутин (гликозид који се састоји од кверцетина и дисахарида рутинозе, (α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6))- β -D-глукопиранозе) је идентификован у великим концентрацијама, и он је веома заступљен у свим испитиваним екстрактима биљака *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. (слика 11).



Кверцетин



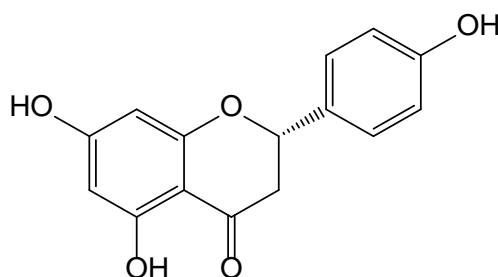
Кемпферол



Рутин

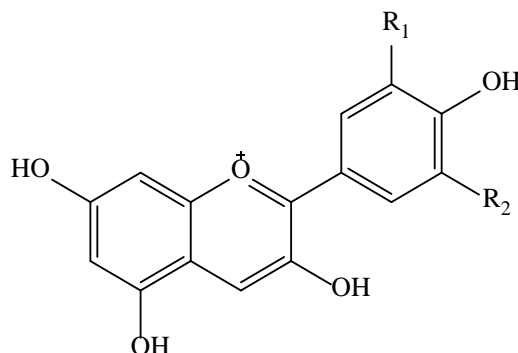
Слика 11. Флавоноли идентификовани у биљним врстама *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.

Од флаванона потврђено је и присуство нарингенина (слика 12).



Слика 12. Флаванон (нарингенин) идентификован у испитиваним биљним врстама *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.

Антоцијани су група од преко 500 различитих хемијска једињења која узрокују црвену, љубичасту и плаву боју многих биљака, посебно воћа, поврћа и житарица [92]. Антоцијанидин је агликон, док је антоцијан у облику гликозида, и у биљним ткивима су у великој мери коњуговани са шећерном компонентом глукозом, галактозом и рамнозом. Постоје подаци у литератури да је познато више од 23 антоцијанидина. Главни представници антоцијанидина у биљкама су: цијанидин ($R_1=H$, $R_2=OH$), пеларгонидин ($R_1=R_2=H$), делфинидин ($R_1=R_2=OH$) и малвидин ($R_1=R_2=OCH_3$) [93]. На слици 13 дата је структура антоцијанидина у општем облику.



Слика 13. Структура антоцијанидина

Разноврсност антоцијана зависи од више фактора попут, броја и позиције OH и метоксил група на базичном цијанидинском скелету, врсте, броја и место на коме се везују шећерне компоненте, степена алкилације шећерна и врсте алкиловања [90].

Антоцијанидини имају доказано корисна својства, антиоксидативна својстава ових једињења у погледу радикала су евидентна те су позитивни резултати забележени у превенцији кардиоваскуларних обољења [94], као и рака и дијабетеса [95,96].

2.4.2.3. Танини

Танини су класа полифенола, једињења која могу да стварају нерастворне комплексе са угљеним хидратима и протеинима. Распрострањени су у природи, налазе се у стаблима и листовима неких биљака, а садрже их и зелени плодови који због тога имају опор укус. Могу се поделити на основу градивних јединица и хемијске природе у три главне групе:

- кондензовани танини (који садрже групу полихидроксифлаван-3-ол олигомера и полимера повезаних уљеник-угљеник везама између флаванол субјединица) [97],
- хидросолубилни танини (гликолизовани молекули галне киселине [98] који се даље у зависности од производа хидролизе деле на галотанине и елагитанине),
- флоротанини (који су присутни само у морским смеђим алгама, људи их не користе у исхрани) [99].

Хидролизујући танини су широко распрострањени. Највише у биљкама фамилија *Ericaceae* којој припада биља врста *E. carnea* L. као и код *Anacardiaceae*, *Geraniaceae*, *Combretaceae*, *Aceraceae* и *Punicaceae* [100].

Кондензовани танини поседују бројна позитивна својства попут антиоксидативне [101], антимицробне [102, 103] и антиканцерогене активности [104].

2.4.2. Биосинтеза природних фенолних једињења

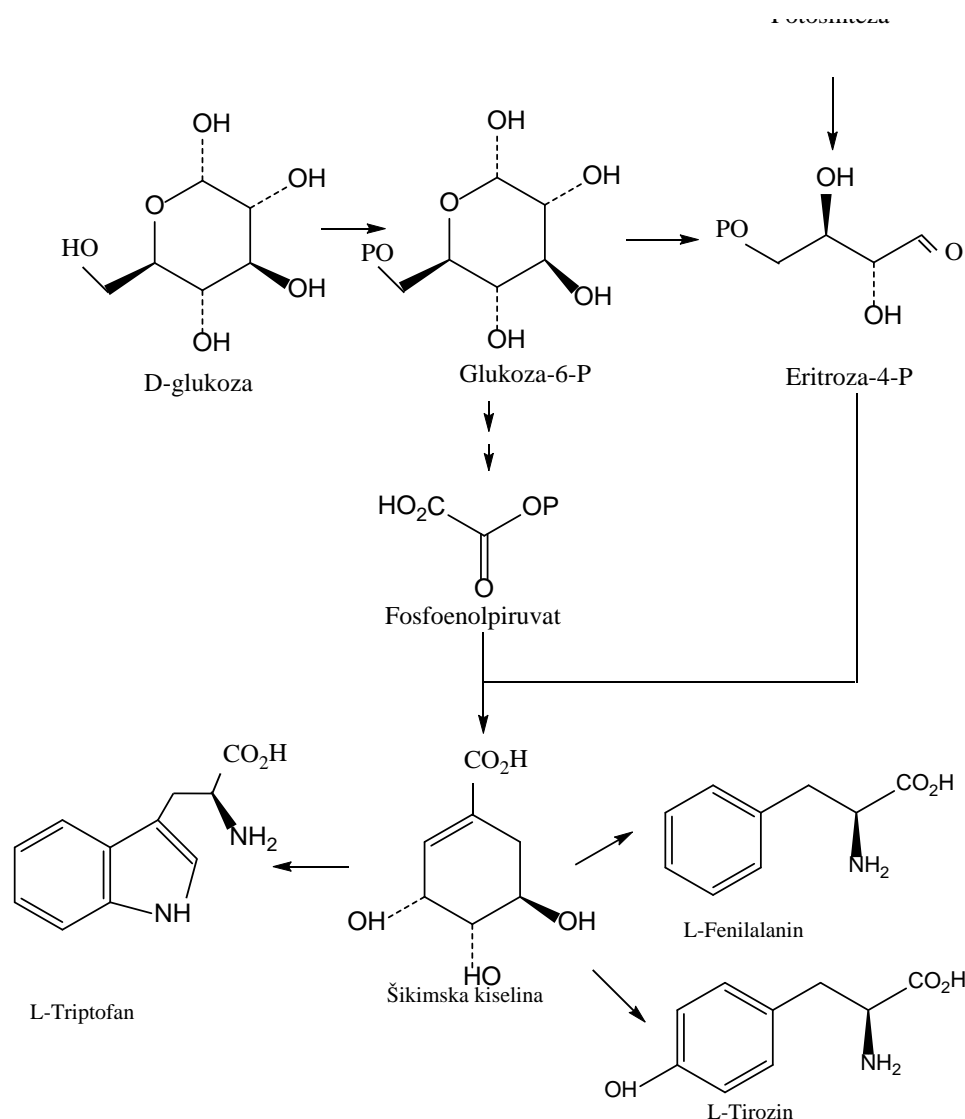
Основна разлика између биоактивних полифенола који се понашају као нутрацеутици и осталих полифенолних једињења који не поседују биоактивност је њихово метаболичко порекло, односно пут којим се добијају.

Биоактивни полифеноли настају следећим биосинтетским путевима:

- шикимски/фенилпропаноидни пут, који директно даје фенилпропаноиде,
- „поликетидни“ ацетатно/мевалонатни пут који даје просте феноле .

2.4.2.1. Пут шикимске киселине

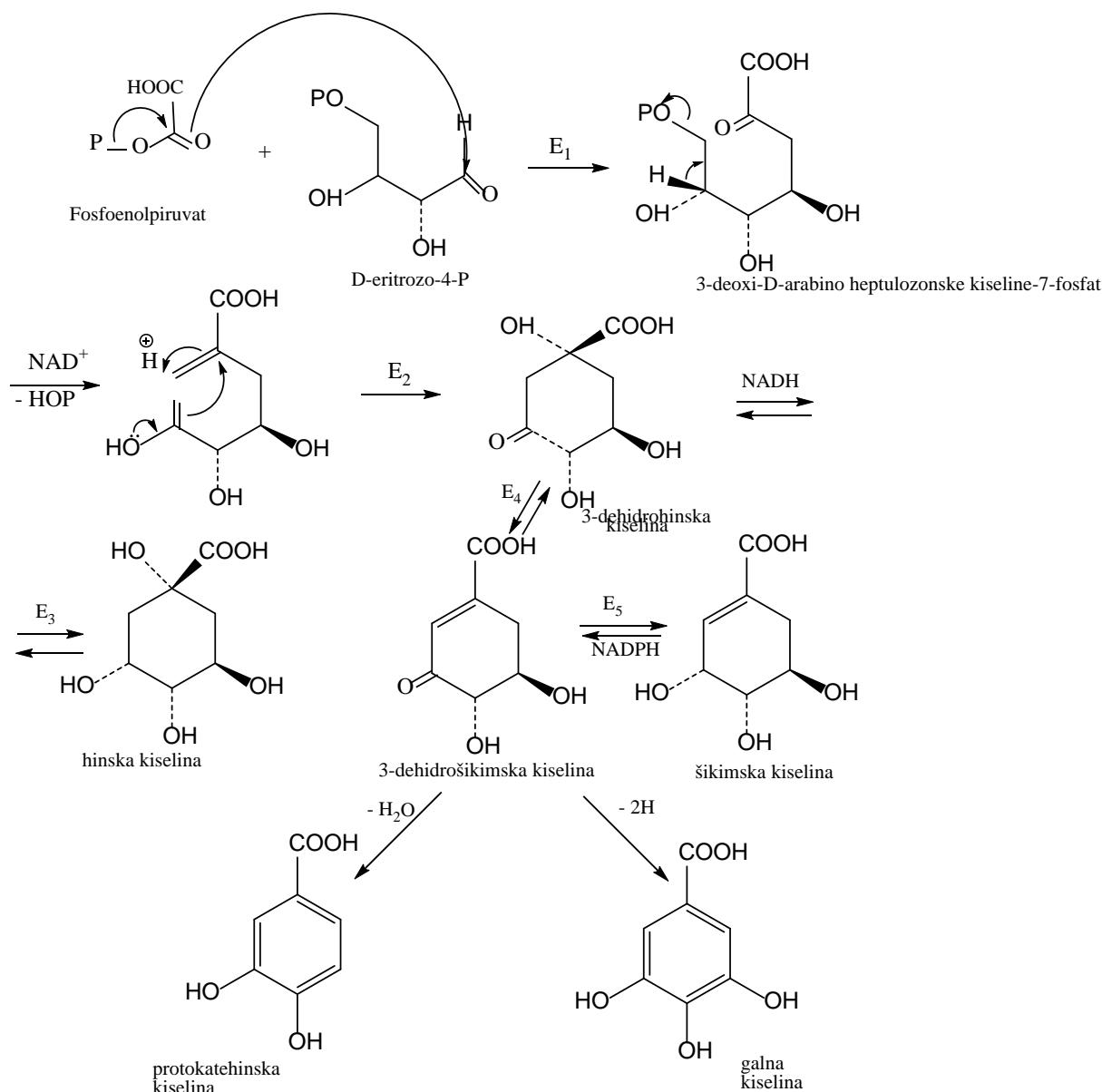
Већина фенолних киселина настаје из пута шикимске киселине (шема 1). Сам назив овог биосинтетичког пута потиче од централног интермедијера који се њиме добија - шикимске киселине, у литератури познатог и као шикимат-арогенатни пут [105].



Шема 1. Шикимски пут биосинтезе у биљкама

Пут шикимске киселине повезује метаболизам угљених хидрата са једне стране и биосинтетисање ароматичних или фенолних једињења у биљкама са друге стране. У низу од седам метаболичких корака, фосфоенолпируват и еритрозни 4-фосфат се претварају у хоризмат, претечу ароматичних аминокиселина и многе ароматичне секундарне метаболите [106]. Сви интермедијари на путу се такође могу сматрати једињењима у граничној тачки која могу послужити као супстрат за друге метаболичке путеве и шикиматски пут се налази само у микроорганизмима и биљкама, никада у животињама [106].

Циклус започиње реакцијом између два полазна једињења фосфоенолпирувата и D-еритрозо-4-фосфата реакцијом која припада реакцијама алдолног типа односно алдолној кондензацији [105].



Шема 2. Почетни кораћи шикимат-арогенатног пута

Ензими: E₁-7-фосфо-2-арабино-хептулозо синтетаза, E₂-3-дехидрохинат синтетаза,
 E₃-хинат дехидрогеназа, E₄-3-дехидрогеназа, E₅-шикимат дехидрогеназа.

Почетна једињења у циклусу, фосфоенолпируват и D-еритрозо-4-фосфат настају примарним метаболизмом. Гликолизмом се добија фосфоенолпируват трансформацијом глукозе у анаеробним условима у млечну киселину, док еритрозо-4-фосфат настаје пентозо-фосфатним путем полазећи од фруктоза-6-фосфата. Низом реакција добија се интермедијер шикимска киселина која се преводи и даје хоризминску киселину (хоризмат) од које се даље низом трансформација добијају ароматична једињења [105].

Шикимска киселина настаје низом реакција, уз каталитичко учешће ензима шикимат дехидрогеназе из 3-дехидрохинске киселине преко 3-дехидрошикимске киселине дехидрацијом и редуцијом. Даљим (шема 3) низом реакција бива преведена у хоризминску киселину, важан прекурсор у шикиматном путу. Хоризмат настаје следећим трансформацијама:

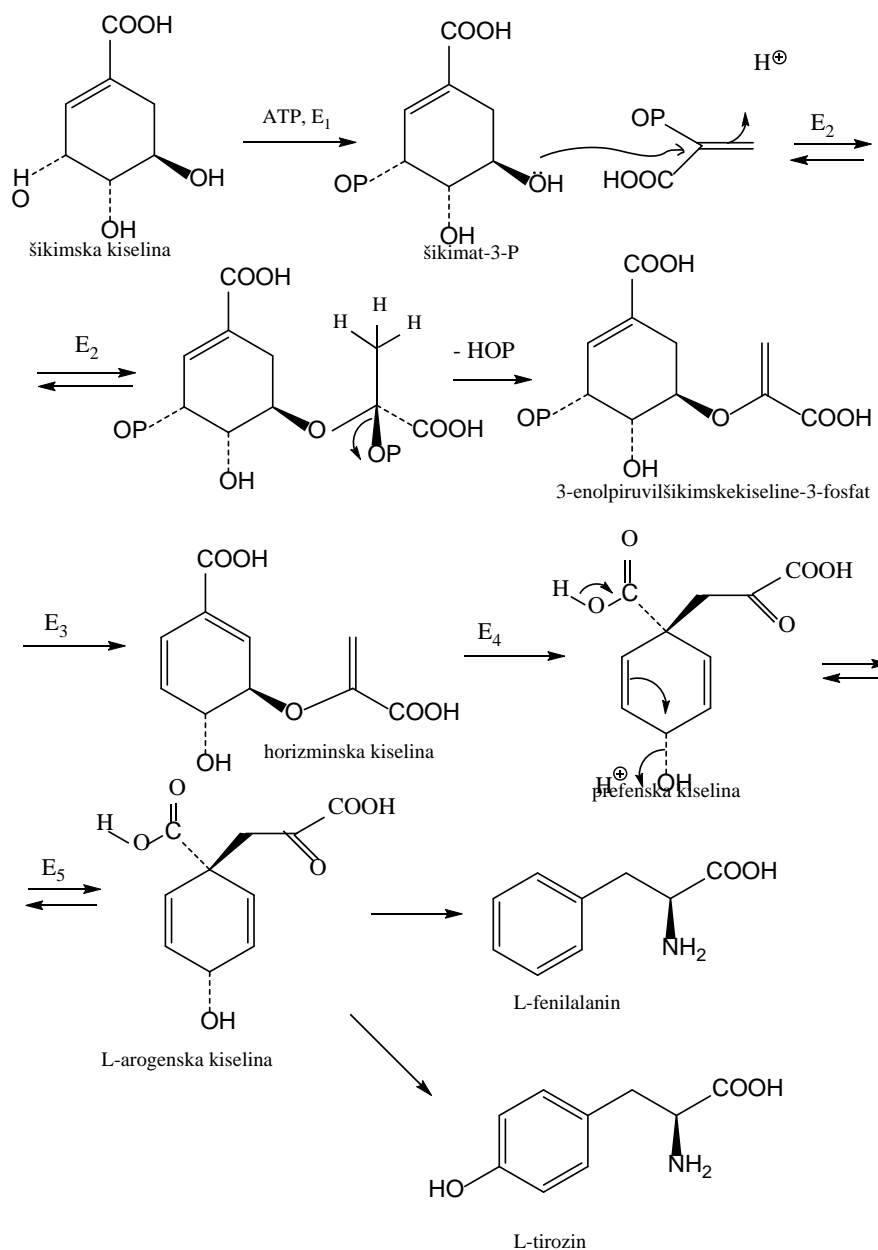
- први адукт је шикимат-3-фосфат који настаје фосфорилацијом шикимске киселине (учешће АТФ-а, процес фосфорилације),
- шикимат 3-фосфат се у следећем кораку једини са фосфоенолпируватом посредством ензима 5-енолпирувилшикимска киселина-3-фосфат синтетазе. Ова адиционо-елиминациона реакција даје интермедијер 3-енолпирувилшикимске киселине-3-фосфат.

Хербицид глифосат, једињење веома актуелно у широј јавности као генетски модификовани производ за који се тврди да се потенцијално успешно може примењивати за сузбијање корова у пољопривреди. Реакција на којој се заснива примена глифосата као хербицида широког спектра лежи у следећем: глифосат је синтетички *N*-(фосфометил) дериват глицина, он је моћан инхибитор управо ензима 5-енолпирувил шикимске киселина-3-фосфат синтетазе што га чини јединственим, идеалним хербицидом [107].

- из 5-енолпируви-шикимат-3-фосфата се елиминацијом, 1,4-елиминацијом фосфорне киселине (мада се сматра да то вероватно није усаглашена елиминација) добија хоризминска киселина [105]. Реакција се врши уз каталитичко дејство ензима хоризмат синтетазе. Хоризминска киселина је веома важан интермедијер у целом процесу, кључна тачка је јер се од ње различитим хемијским реакцијама и трансформацијама даље може добити велики број једињења (шема 4).

Производи који се добијају трансформацијама хоризминске киселине у којима амонијак (који је као производ добијен из глутамин) има улогу нуклеофила су следећи:

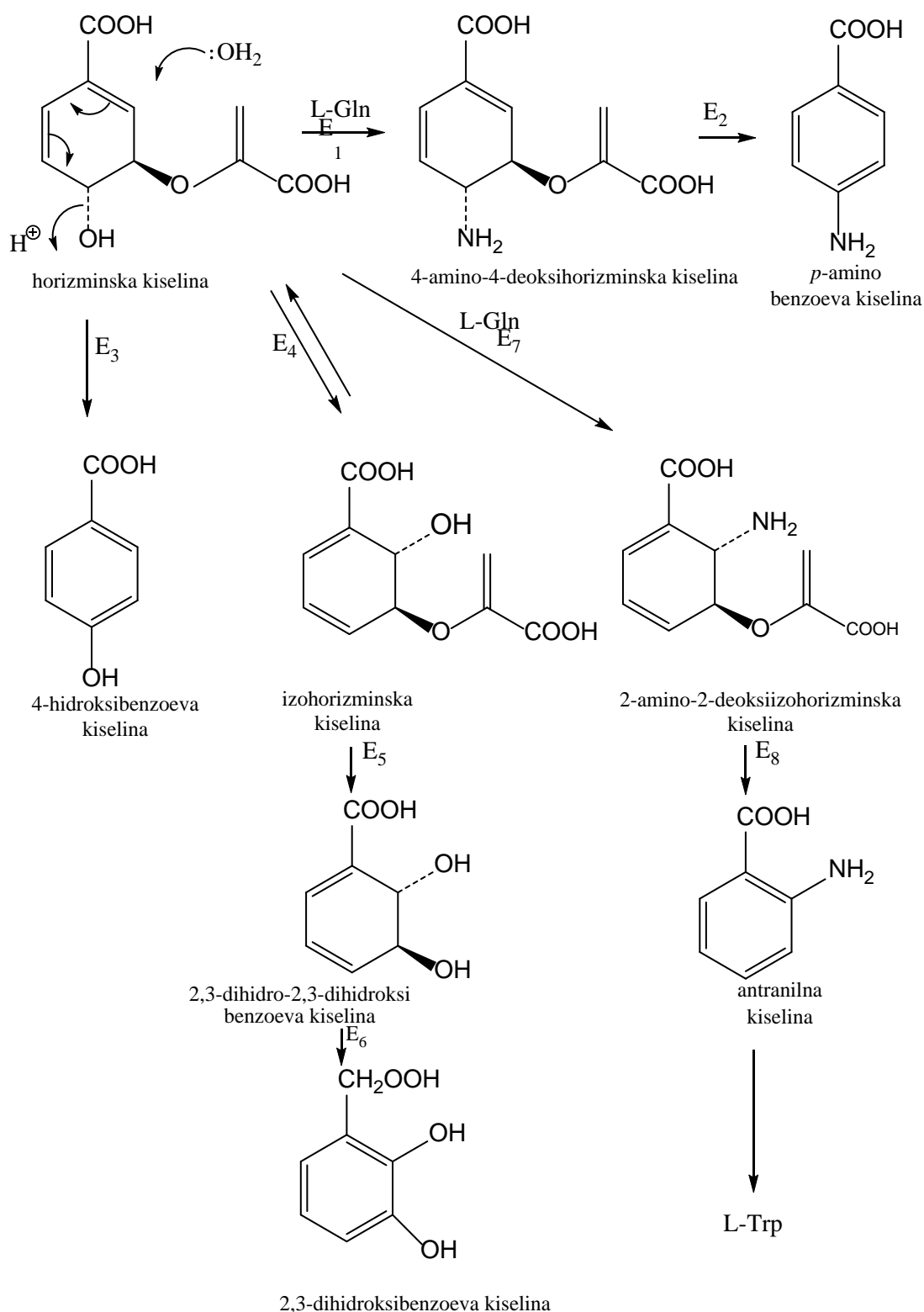
- уколико се врши увођење амино групе на другом угљениковом атому, аминацијом *C*-2 атома добија се 2-амино-2-деоксиизохоризминска киселина која потом прелази у антранилну киселину из које се потом може добити аминокиселина *L*-триптофан (*L-Trp*) као адукт [105].
- уколико се хоризмат пак аминује на четвртном угљениковом атому (аминацијом *C*-4 атома) добива се 4-амино-4-деоксихоризминска киселина. Елиминацијом пируватне киселине она се преводи у *p*-аминобензоеву киселину (или 4-хидроксибензоеву киселину). Она чини једним делом структуру фолне киселине, витамина *B*₉. Фолна киселина је коњугат сачињен од птеридинске јединице, *p*-аминобензоеве киселине и глутаминске киселине [105].



Шема 3. Настајање хоризминске киселине шикиматним путем

Ензими укључени у трансформације: E₁ - шикимат киназа; E₂ - 5-енолпирувилшикимска киселина-3-фосфат синтетаза; E₃ - хоризмат синтетаза; E₄ - хоризмат мутаза, E₅ –префенат аминотрансфераза, E₆ – арогенат дехидратаза, E₇ –арогенат дехидрогеназа

На шеми 4 су представљена једињења која могу настати из хоризминске киселине. Сви пратећи ензими у приликом трансформација хоризмата су представљени на шеми 4. [105].



Шема 4. Једињења која настају трансформацијама хоризминске киселине

Ензими укључени у трансформације: E1-4-амино-4-деоксихоризмат синтетаза, E2-4-амино-4-деоксихоризмат лиаза, E3-хоризмат лиаза, E4-изохоризмат синтаза, E5-изохоризмаза, E6-2,3-дихидро-2,3-дихидроксибензоат дехидрогеназа, E7-2-амино-2-деоксихоризмат синтетаза, E8 - 2-амино-2-деоксихоризмат лиаза, E7 заједно са E8- антранилат синтетаза.

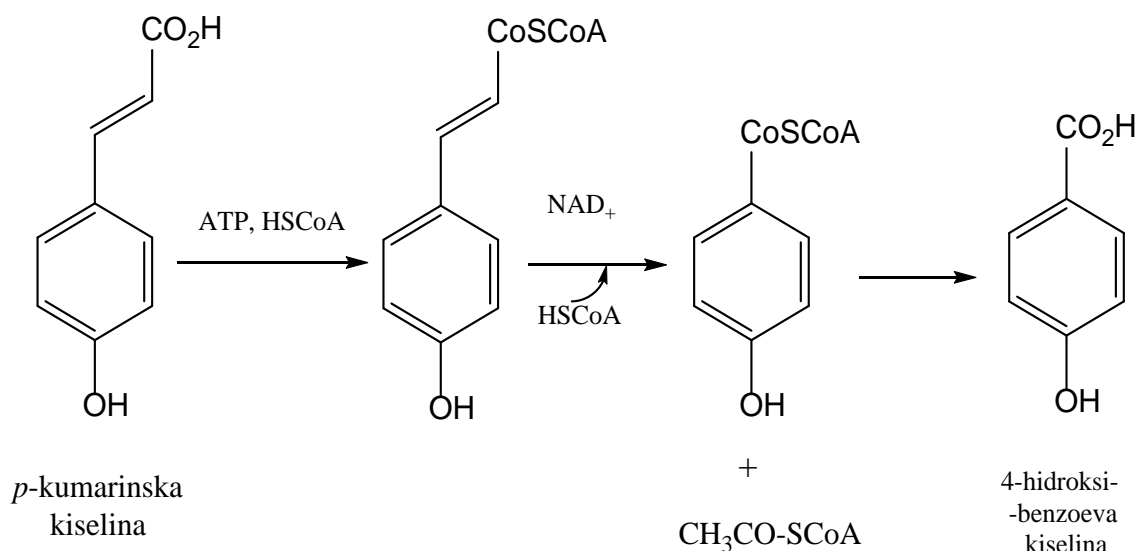
2.4.2.2. Пут синтезе фенилпропаноида

Општи метаболизам фенилпропаноида генерише огроман низ секундарних метаболита заснованих на неколико интермедијара шикиматског пута као језгра. Добијене хидроксициметне киселине и естри се у неколико каскада појачавају комбинацијом редуктаза, оксигеназа и трансфераза да би се добио развојно специфичан образац метаболита, карактеристичан за сваку биљну врсту [108].

Она се одвија тако што се почетно једињење, ароматична аминокиселина L-фенилаланин (*L-Phe*) преводи у различите деривате хидроксициметне киселине што укључује три корака заједничког имена „пут синтезе фенилпропаноида“.

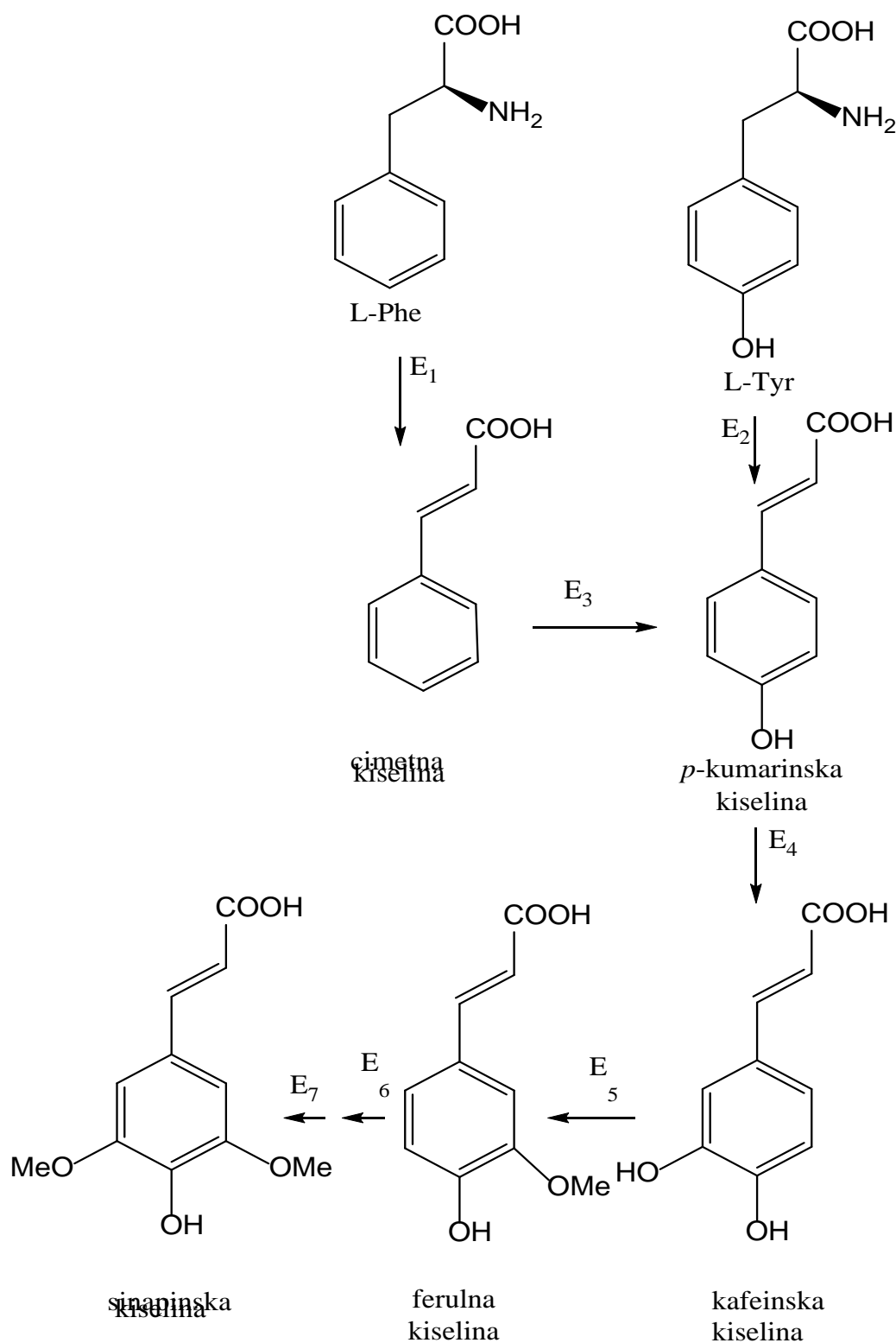
- биосинтеза хидроксибензоевих киселина (шема 5) и
- биосинтеза хидроксициметних киселина (шема 6) [105].

Једноставне хидроксибензоеве киселине (једињења C6-C1) као што је 4-хидрокси бензоева киселина могу се формирати директно од раног интермедијера у шикиматном путу тако што се код деривата циметне киселине раскида двострука веза и губе се два угљеника из бочног ланца. Дакле, 4-кумаринска киселина (*p*-кумаринска киселина) може деловати као прекурсор 4-хидроксибензоеве киселине [105].



Шема 5. Биосинтеза 4-хидроксибензоеве киселине [109]

Биосинтеза хидроксициметних киселина је представљена на шеми 6. Из аминокиселина фенилаланина и тирозина се ензимски катализованим реакцијама добијају кафена, синапинска и ферулна киселина. Први корак је уклањање амонијака из бочног ланца да би настала одговарајућа циметна киселина. У случају тирозина настаје 4-кумарна киселина (*p*-кумарна киселина) из које се потом дејством одговарајућих ензимских система добијају кафена, ферулна и синапинска киселина [105].



Шема 6. Биосинтеза хидроксициметних киселина (модификовано [105])

Ензими укључени у процесе: E₁ – фениламонијум лиаза, E₂ – тирозин амонијум лиаза, E₃ – цинамат 4-хидроксилаза, E₄ – *p*-кумарат 3-хидроксилаза, E₅ – кафеат-5-хидроксиферулат метил трансфераза, E₆ – ферулат-5-хидроксилаза, E₇ – кафеат-5-хидроксиферулат метилтрансфераза [105].

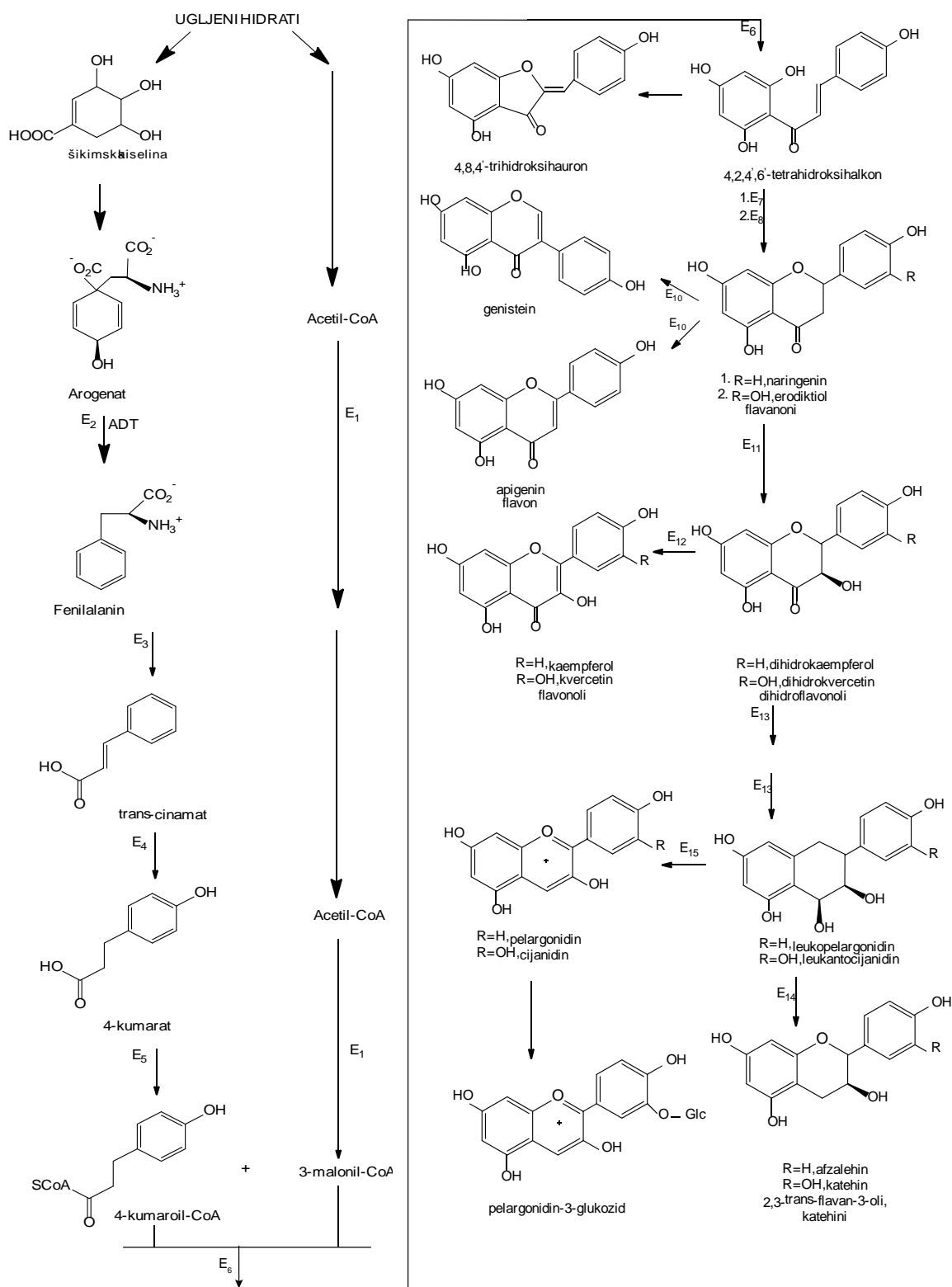
2.4.2.3. Биосинтеза флавоноида

Биосинтетски пут настајања флавоноида је веома познат са изизетком појединих реакција код антоцијана [126]. Биосинтетски пут стварања флавоноида је мешовит, биосинтеза се одвија уз допринос шикимског и ацетатно-малонатног пута. Током шикимског пута стварају се прстен В и прстен С, а током ацетатно-малонатног циклуса се формира прстен А, оба флавоноидна прекурсора настају из угљених хидрата [109]. Од угљених хидрата (шема 7) шикиматним путем настају шикимска киселина, али и ацетил-коензим А (CoA). Гликолитички интермедијер ацетил-CoA и угљен-диоксид у реакцији која се врши под каталитичким дејством ензима ацетил-CoA карбоксилазе (E1) дају малонил-коензим А (CoA). Обезбеђивање 4-кумароил-CoA је много комплексније јер укључује шикиматно/арогенатни пут [109]. Шикимска киселина се трансформацијама преко арогената преводи у аминокиселину фенилаланин (L-Phe) дејством ензима арогенат дехидратазе (E2), који се преводи у цинамат (цинаминску киселину) каталитичким дејством фенилаланин-амонијум-лиаза (E3) која обезбеђује везу између примарног метаболизма и фенилпропаноидног пута. Помоћу цинамат-4-хидроксилазе (E4) врши се ароматична хидроксилација цинамата којом се добија 4-кумарат, који бива трансформисан у 4-кумароил-CoA дејством 4-кумарат-CoA-лигазе (E5). Централни корак у биосинтези флавоноида је кондензација три молекула малонил-CoA и 4-кумароил-коензима А (CoA) када се уз каталитичко дејство ензима халкон синтетазе (E6) ствара поликетид 4,2',4',6'-тетрахидроксиалкон. Настали производ се реакцијом кондензације постепено циклизује чиме долази до стварања флаванона нарингенина као што је приказано на шеми 10. Овај флаванон представља „тачку гранања” јер се од њега даље низом реакција могу добити остале класе флавоноида. Од нарингенина, који припада флаванонима различитим реакцијама могу настати следећа једињења:

- флавоноли - настају нуклеофилним нападом фенолне групе на кетон (*Michael-ov* напад) дејством ензима флавонол синтетазе (E₁₀), као што су генистеин и апигенин [105](апигенин смо идентификовали у наше две испитиване биљне врсте),
- дихидрофлавоноли (дихидрокаемпферол и дихидрокверцетин) дејством ензима флаванон-3-хидроксилазе (E₁₁),
- из дихидрокемпферола односно дихидрокверцетина настају флавоноли (каемпферол и кверцетин) каталитичким дејством ензима флавонол синтетазе (E₁₂) (идентификовани у наше две испитиване биљне врсте),
- из дихидрокемпферола односно дихидрокверцетина такође могу настати флавандиоли или леукоантоцијанидини (леукопеларгонидин или леукоантоцијанидин) дејством ензима дихидрофлавонол-4-редуктазе (E₁₃).

Они даље могу дати:

- 2,3-транс-флаван-3-оле односно катехине афзелехин и катехин дејством ензима леукоцијанидин редуктазе (E₁₄) и
- антоцијанидине дејством ензима антоцијанидин синтетазе (E₁₅), пеларгонидин и цијанидин. Код ових једињења се може извршити везивање шећерног остатка директно на прстену В уместо водониковог (H) атома код пеларгонидина или заменом водониковог (H) атома из хидроксила (OH) групе код цијанидина те тако добити одговарајући глукозиди.



Шема 7. Биосинтеза флавоноида у биљкама (модифик. [105])

Ензими који учествују у процесу: E₁-ацетил-СоА карбоксилаза, E₂-арогенатдехидратаза, E₃- фенилаланинамонијум-лиаза, E₄-цинамат-4-хидроксилаза, E₅-4-кумарат-СоАлигаза, E₆- халкон синтетаза, E₇- нарингенин-халкон синтаза (флаванон синтаза), E₈- халкон изомераза, E₉- флаванон, диоксигеназа, E₁₀- флавор синтетаза, E₁₁- флаванон -3-хидроксилаза, E₁₂- флаворол синтетаза, E₁₃- дихидрофлаворол-4-редуктаза, E₁₄- леукоантоцијанидин редуктаза, E₁₅-антоцијанидин синтетаза [105].

2.5. Фармаколошка својства биљних полифенола

Фенолна једињења испољавају бројне позитивне ефекте у лечењу различитих врста поремећаја, и болести код људи. Захваљујући тим дејствима и лековитим својствима која поседују, полифеноли се као пре свега природна једињења убрајају у нутрацеутике који у последњих година све више у свету налазе примену као додаци исхрани или се користе у сврхе лечења.

2.5.1. Антиоксидативно дејство полифенола

Једна од главних карактеристика биљних фенола је њихова антиоксидативна активност. Неоспорно је да кисеоник поседује велики значај и испољава бројна корисна својства у организму. Молекулски кисеоник у оксидативним процесима врши улогу последњег акцептора електрона. Међутим, кисеоник испољава и негативно дејство. У основном стању поседује два неспарена електрона, они се у аеробним условима у респираторном ланцу могу непотпуно редуковати при чему могу настати кисеонични слободни радикали, веома реактивне врсте са токсичним дејством. Реактивне врсте кисеоника су штетне, а њихово негативно деловање се огледа у томе што могу довести до оксидативног стреса.

2.5.1.1. Оксидативни стрес

У току функционисања људског тела одигравају се велики број биохемијских реакција у организму. У току ових реакција настају и слободни радикали, реактивне врсте који поседују позитивне функције, али и негативне. Негативни аспекти радикала огледају се у томе што они својим дејством изазивају оштећења на ћелијама. Биолошки систем или организам својим обрамбеним механизмима (антиоксидантни систем одбране) у стању је да неутралише дејство слободних радикала. Када је њихов ниво низак, неутралисање је успешније, али у одређеним случајевима, када је производња слободних радикала повећана (чак и неконтролисана), тада антиоксидативни капацитет ћелије бива превазиђен. Оксидативни статус организма се мења, он улази у зону повећаног оксидативног стреса. Оксидативни стрес је стање у коме је равнотежа између прооксиданата и антиоксиданата у ћелији нарушена и померена у правцу прооксиданата [110]. Слободни радикали делују тако што (као веома реактивни) узимају електроне од молекула који су им суседни, својим непосредним деловањем оштећују ћелије и ткива и као последица услед тога се јављају многе патолошке промене и болести [111]. Оксидацијом биомолекула долази до оштећења на њима која могу бити у мањој или у већој мери изражена, формира се биомолекулска основа за појаву одређених обољења тако да можемо рећи да оксидативни стрес директно доводи до појаве кардиоваскуларних болести, атеросклерозе, Паркинсонове, Алцхајмерове болести, вителига, аутизма, синдрома хроничног умора, чак и до појаве карцинома [112-119]. Слободни радикал је атом, молекул или јон који има један или више електрона у последњој орбитали који нису спарени. Код већине једињења у живим организмима електрони су у последњим орбиталама спарени и њихово енергетско стање је окарактерисано као најстабилније. Неспареност тих електрона даје слободним радикалима изузетну реактивност, они лако ступају у реакције са другим молекулима или између себе, јер теже да/и образују хемијске везе чиме ни прешли у ниже енергетско

стање које је стабилније. Сами извори слободних радикала у организму су различити, можемо их сврстати у две групе:

- унутрашње или ендogene и
- спољашње или екзогене.

Унутрашњи извори указују да слободни радикали могу настати приликом одигравања неких биохемијских процеса, као што су оксидативна фосфорилација на нивоу респираторног ланца у митохондријама (непотпуном редукцијом молекулског кисеоника), оксидативна хидроксилација у микрозомима, аутооксидација малих молекула, фагоцитоза малих молекула, реакције оксидо-редукције у присуству метала са променљивом валенцом [120].

У спољне изворе који изазивају повећано стварање слободних радикала у организму спадају: токсични метали и разним другим токсинима из загађене средине тзв. ксенобиотицима, дувански дим, лекови, неки састојци хране, нека терапијска и околна зрачења [120, 121] и други.

Производња реактивних врста кисеоника је посебно деструктивни аспект оксидативног стреса. Реактивне кисеоничне врсте (ROS) обухватају радикале, али и нерадикале [122]:

- | | |
|---|--|
| 1. радикалски облици | 2. нерадикалски облици: |
| а) $O_2^{\cdot -}$, супероксидни анјон радикал | а) водоник пероксид, H_2O_2 |
| б) HO^{\cdot} , хидроксилни радикал | б) хипохлораста киселина, $HClO$ |
| в) HO_2^{\cdot} , хидропероксилни радикал | в) хипобромаста киселина, $HBrO$ |
| г) RO^{\cdot} , алкокси радикал | г) органски пероксиди, $RCOOH$ |
| д) ROO^{\cdot} , алкилпероксилни радикал | д) кисеоник синглет(синглетни кис.), O^{\cdot} |
| ђ) $CO_2^{\cdot -}$, угљендиоксидни радикал | ђ) озон O_3 . |
| е) $CO^{\cdot -}$, угљенмоноксидни радикал | |

Осим ових врста, такође су као изузетно токсичне познате и реактивне врсте азота, RNS, и реактивне врсте сумпора, RSS. У реактивне врсте азота које потичу од азотовог оксида се убрајају [123]:

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1. слободно радикалски облици | 2. нерадикалски облици |
| а) азотмоноксидни радикал NO^{\cdot} | а) азотдиоксидни анјон NO_2^- |
| б) азотдиоксидни радикал NO_2^{\cdot} | б) азотдиоксидни катјон NO_2^+ |
| | в) пероксинитрит, $ONOO^{\cdot}$, |
| | г) пероксинитритна киселина $ONOOH$ |
| | д) алкил пероксинитрит, $ROONO$ |
| | ђ) нитрил хлорид, $NOOCl$. |

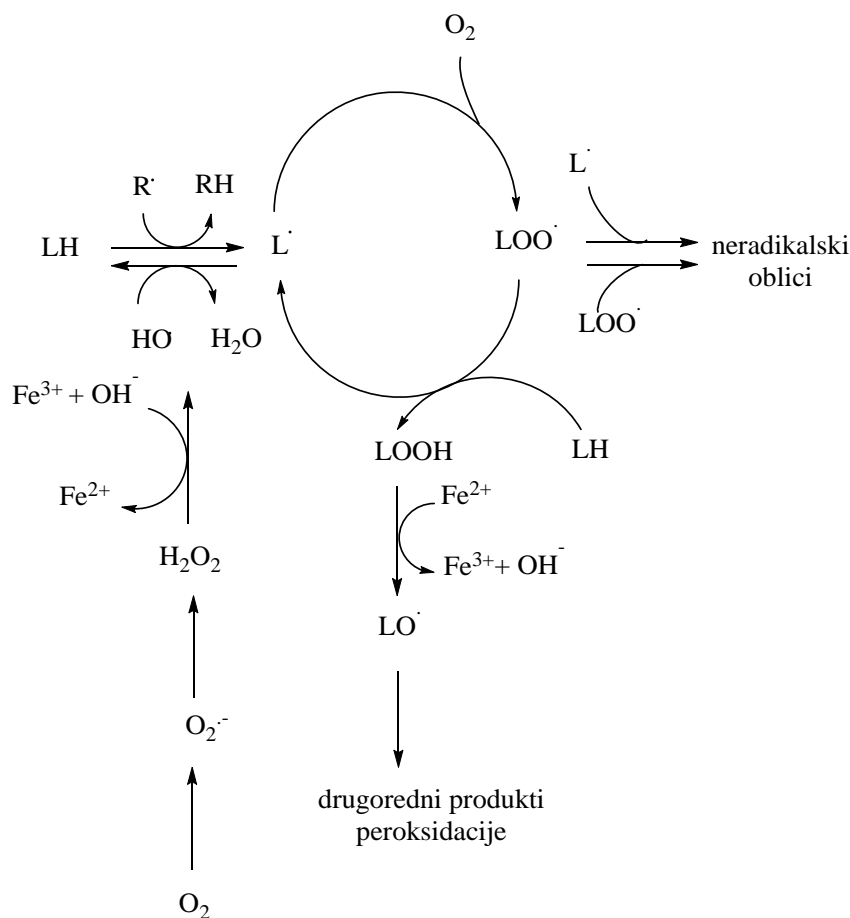
Реактивне врсте сумпора такође се јављају у виду слободних радикала и нерадикалских облика [123].

Слободни радикали изведени из кисеоника су веома важни посредници код ћелијских оштећења и смрти. Не само што су важни у процесу старења, већ су и директно или индиректно укључени су у широки спектар клиничких поремећаја, као што су артеросклероза, реперфузијска повреда, плућна токсичност, дегенерација макуле, катарактогенеза, рак, делују као секундарни извори ћелијских повреда у хроничним запаљенским процесима и неколико поремећаја централног нервног система [124]. Поред тога, велики број лекова и ксеноботика се и сами претварају или стимулишу стварање слободних радикала [124].

2.5.1.2. Липидна пероксидација

Слободни радикали имају веома неповољно дејство, које се огледа у способности да реагују и да оштете примарне биомолекуле као што су угљени хидрати, протеини, липиди, ДНК [125]. Липидна пероксидација је оксидативна разградња липида, процес у којем слободни радикали узимају електроне из липида у ћелијским мембранама, што доводи до оштећења ћелија. Процес је ланчан, а најчешће погађа полинезасићене масне киселине зато што оне садрже више двоструких веза између којих се налазе метиленске (-CH₂-) групе које садрже веома реактиван атом водоника. Сам механизам липидне пероксидације је сложен и одвија се у три фазе:

- I фаза - иницијација,
- II фаза - пропација и
- III фаза - терминација.



Слика 14. Процес липидне пероксидације [126]

OH⁻ - хидроксидни јон, OH[•] - хидроксидни радикал, H₂O₂ - водоник пероксид, LH - молекул липида, L[•] - липидни радикал, LO[•] - липидни алкоксидни радикал, LOO[•] - липидни пероксидни радикал, LOOH - липидни хидропероксид, R[•] - прооксиданс, O₂ - кисеоник, O₂^{•-} - супероксидни радикал [126]

Иницијатор липидне пероксидације је оксиданс који је у стању да одузме атом водоника из CH₂- групе незасићене масне киселине. Када се једном активира реакција се наставља ланчано (слика 14). Након одузимања водониковог атома, на угљениковом атому остаје електрон који није спарен и ствара се алкил-радикал (липидни слободни радикал). Када се врши интрамолекулско распоређивање веза нови перокси радикал

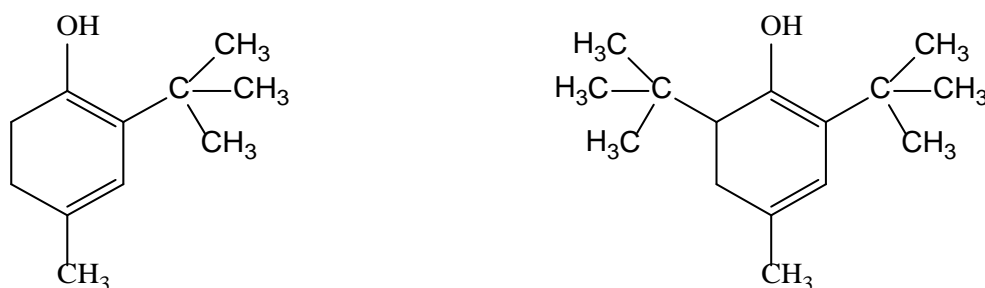
одузима водоник из суседног молекула незасићене масне киселине, при чему се ствара липидни хидропероксид и нови алкил радикал. На овај начин бива покренут процес липидне пероксидације. Први производи липидне пероксидације су липидни хидропероксиди, који су иначе стабилни молекули, али у присуству гвожђа се разграђују и настају пероксил или алкоксил радикали који даљи процес липидне пероксидације започињу. Оксидацијом алкокси радикала настаје дихидропероксид који се спонтано разграђује, даљим низом сложених реакција разградње хидро- и дихидропероксида стварају се продукти који садрже карбонилну групу. Под дејством јона гвожђа или бакра, липидни пероксиди стварају многобројне разградиве производе и то од алдехида, кетона, угљоводоника (етан, етен, пентан), еоксида, до активних радикала [126]. Малондиалдехид (MDA) који се ствара у малим количинама показатељ је пероксидације [126]. Производња малондиалдехида користи се као биомаркер за мерење нивоа оксидативног стреса у организму код многих здравствених проблема као што су рак, психијатријске болести, хронична опструктивна болест плућа, астма или кардиоваскуларне болести [127].

2.5.1.3. Антиоксиданси и механизми антиоксидативне заштите

Људски организам се на различите начине супроставља дејству слободних радикала. Овај вид одбране се врши путем антиоксидативне заштите тј. помоћу антиоксиданаса. Према најшире прихваћеној дефиницији „антиоксиданс је свака супстанца која, када је присутна у малим концентрацијама у односу са супстанцама које се могу оксидовати значајно одлаже или спречава оксидацију тог супстрата“ [128-130]. Могу се поделити на различите начине:

- према пореклу на:
 - а) природне и
 - б) синтетичке .

Главне класе природних антиоксидативних једињења у природи су фенолна једињења, од којих посебно флавоноиди и фенолне киселине у слободном или комплексирајућем облику [131]. Данас се веома користе синтетички антиоксиданти од којих су најпознатији бутиловани хидроксианизол (ВНА), бутиловани хидрокситолуен (ВНТ), пропил галат (PG) и терц-бутилхидрохинон (tBHQ). Бутиловани хидрокситолуен (ВНТ) или 2,6-ди-терц-бутил-4-метилфенол у овоме предњачи јер се веома користи, али и бутиловани хидроксианизол (слика 15).



а) бутиловани хидроксианизол (ВНА)

б) бутиловани хидрокситолуен (ВНТ)

Слика 15. Структуре ВНА и ВНТ

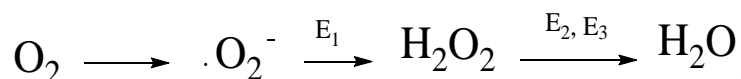
Према најновијим резултатима истраживања синтетички антиоксиданси могу да буду канцерогени [132]. ВНТ може довести до оштећења плућа, док ВНА подстиче деловање неких канцерогена [133]. Услед тих сазнања и да би се избегле ове негативне

појаве долази до пораста у интересовању за природне антиоксиданте, који поседују велики број предности у односу на синтетичке, нису штетни, здравији су, ефикаснији и самим тим сигурнији за употребу [134]. Нека једињења која потичу из биљака на пример су доказано бољи антиоксиданти од ВНА [135].

- Према месту настајања антиоксиданти који су значајни за људски организам деле се на:
 - а) ендогене, који су у људском организму и
 - б) егзогене, који се уносе споља путем хране или лекова (на пример фенолна једињења су најважнији природни егзогени антиоксиданси).
- Према нивоу и начину деловања у организму:
 - а) превентивне,
 - б) као хватачи слободних радикала,
 - в) антиоксидантни ензими који обнављају структуру ћелије [136].

Антиоксидативна заштита организма подразумева ензимску и неензимску антиоксидативну заштиту.

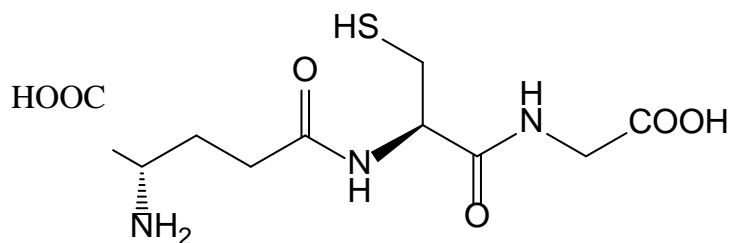
Ензимски антиоксиданси се налазе у здравим артеријама, у ћелијама артеријских зидова. Они чине прву линију антиоксидативне одбране. У њих спадају ензими као што су супероксид-дизмутаза, каталаза, глутатион-пероксидаза, глутатион редуктаза и трансфераза, тиол-дисулфид оксидоредуктаза. Пример антиоксидативног дејства ових ензима видимо у следећој реакцији:



Слика 16. Детоксикација реактивних врста кисеоника ензимским путем

(Ензими који учествују у процесу: E₁-супероксид-дизмутаза, E₂-пероксидаза, E₃- каталаза)

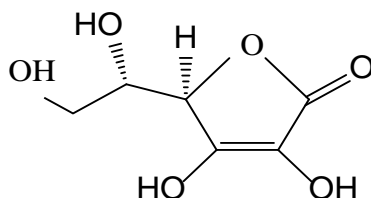
Неензимску антиоксидативну заштиту чине глутатион, витамин С, витамин Е, убихинон (коензим Q) и други. Глутатион (γ-глутамил-цистеинил-глицин) спречава оштећења ћелијских компоненти у људском организму, спречава неспецифичну десатурацију хидролитичким ензимима који нападају нормалну пептидну везу (слика 17) [137].



Слика 17. Глутатион

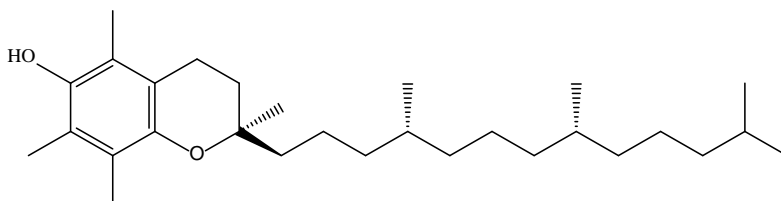
Витамин С (слика 18) је врло јако редукционо средство. У *in vitro* и *in vivo* испитивањима је потврђена његова антиоксидативна активност. Функционише као редокс пуфер који може да смањи, а тиме и да неутралише реактивне врсте кисеоника.

Такође је кофактор ензима који учествују у регулацији фотосинтезе, биосинтезе хормона и регенерацији других антиоксиданата, регулише поделу и раст ћелија, укључен је у трансдукцију сигнала и има улогу у неколико физиолошких процеса као што су имуно стимулација, синтеза колагена, хормона, неуротрансмitera и апсорпција гвожђа, али такође има улогу и у детоксикацији тешких метала из организма [138].



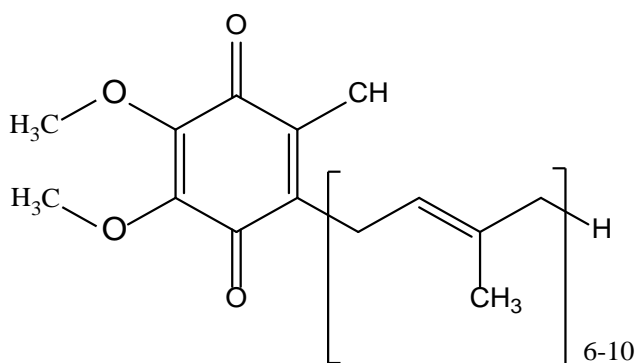
Слика 18. Аскорбинска киселина (витамин С)

Витамин Е (α -токоферол) има снажно антиоксидативно деловање (слика 19). Реагује са липидним пероксил радикалима брзином која је вишег реда од брзине којом се врши ширење пероксил радикала [139].



Слика 19. Витамин Е

Коензим Q10 (слика 20) има важну улогу као примарно средство за уклањање слободних радикала с обзиром да се налази у мембранама у близини ланаца незасићених масних киселина [140].



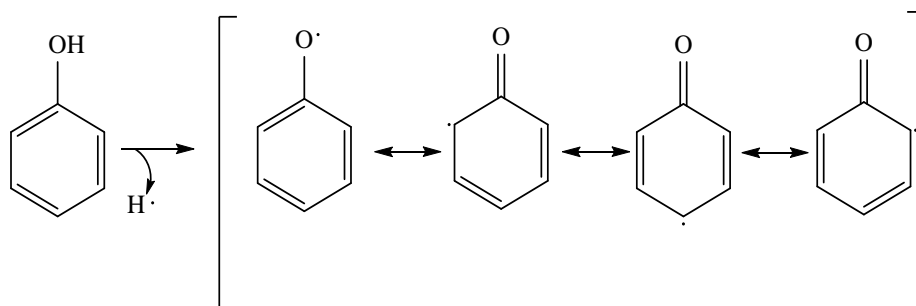
Слика 20. Убихинон CoQ₁₀H₂

У табели 5 је дат систем антиоксидативне одбране [141].

Табела 5. Систем антиоксидативне одбране

	Ендогени антиоксиданси	Дијетарни антиоксиданси	Метал везујући протеини
Ензимски	Супероксид дисмутаза		
	Каталаза		
	Глутатион пероксидаза		
	Глутатион С-трансфераза	Витамин Е (α-токоферол)	
Неензимски Тиоли		Витамин С	Албумин
	Глутатион	β-каротен	Церулоплазмин
	Липоична киселина	Ликопен	Металотионен
	N-ацетил цистеин	Лутеин	Феритин
		Полифеноли	Миоглобин
Остали			Трансферин
	Коензим Q10		
	Уронска киселина		
	Билирубин		

У егзогене антиоксидансе који се у користе ради спречавања ланчаних реакција слободних радикала у организму убрајају се полифенолна једињења. Биљке су веома богате полифенолима тако да служе као извор егзогених антиоксиданата. Механизам антиоксидативног деловања полифенола заснива се на њиховој способности да буду донори водоникових атома и када донирају водоников атом прелазе у феноксил радикал који је слабије реактиван и стабилизован је резонанцијом (слика 21):



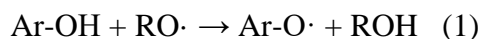
Слика 21. Стабилизација феноксил радикала [142]

Код флавоноида неутралисање или „хватање“ слободних радикала се врши на скоро исти начин. Пошто флавоноиди такође садрже хидроксилне групе од њих се водоников атом предаје радикалу и тиме он бива неутралисан, док флавоноид прелази у слободни радикал. Како флавоноиди лако предају водоник или електрон, то их чини одличним „скевенџерима“ (хватачима) радикала [143]. Колика ће бити антиоксидативна активност флавоноида зависиће од расподеле, врсте и броја функционалних група које се налазе у њему на следећи начин:

- на В прстену орто-дихидрокси структура захваљујући најбољим особинама електрон донора, као и постојања 3'4',-ОН група на прстену В и/или присуство хидроксилне групе 3-ОН [143],
- двострука веза између С-2 и С-3 положаја у коњугацији са 3-ОН групом повећава активност [144].

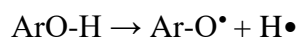
Од појединачних флавоноидних једињења кверцетин (који је иначе детектован у екстрактима наше две испитиване биљне врсте) показује јака антиоксидативна својства, јер он испуњава све наведене услове те се одликује изванредном антиоксидативном способношћу [145]. У групи супстанци која највише обећава са потенцијалном активношћу против Алцхајмерове болести налазе се флавоноиди мирицетин, морин, рутин, каемпферол, апигенин за које се показало да *in vitro* поседују антиамилоидогено дјеловање и фибрил-дестабилизацијско дејство, исто тако добро као што су у стању да делују као хелатори метала и сузбијају оксидативни стрес [146]. Осим флавоноида, деривати флавоноида поседују изванредна антиоксидативна својства. Рутин испољава важна антиоксидативна [147,148], неуропротективна [149], антидијабетска [150] и многа друга позитивна дејства. Рутин (пронађен у знатним количинама у добијеним екстрактима у наше две испитиване биљне врсте) је обећавајући агенс за лечење Алцхајмерове болести [151], такође поседује антиканцерогена својства и показује цитотоксичне ефекте [152,153].

Фенолне киселине су такође познати антиоксиданси. Хидроксibenзоeве киселине и њихови ањони имају фенолне групе које могу да врше трансфер атома водоника на слободан радикал:



Пренос атома водоника се може одвијати преко најмање три различита механизма [154,155]:

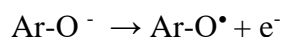
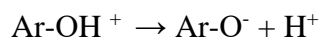
- 1) трансфер атома водоника, који се врши тако атом водоника прелази из фенолног једињења на слободни радикал:



- 2) једноставни електрон трансфер праћен трансфером протона:



- 3) секвенцијални губитак протона трансфером електрона [155]:



Фенолне киселине попут хлорогенске и кафеке киселине које су идентификоване у екстрактима испитиваних биљних врста су познати антиоксиданси. Хлорогенска киселина спречава дијабетес мелитус типа 2 инхибирајући апсорпцију глукозе у цревима [156] и поседује антикарциногене ефекте ублажавајући ефекте канцерогених N-нитрозо једињења и оштећења DNK [157,158]. Хлорогенска киселина заједно са кафеном киселином могу инхибирати стварање мутагених и канцерогених N-нитрозо једињења, јер су *in vitro* инхибитори реакције N-нитрозације [159]. Једињење које је присутно је у високим концентрацијама у свим екстрактима испитиваних биљних врста је рузмаринска киселина. Она се ефикасно супроставља пероксидацији липида. Мала количина рузмаринске киселине у стању је да спонтано улази унутар мембране и ефикасно спречи липидну пероксидацију плазме мембране ћелија сисара [160].

2.5.2. Антибактеријско дејство полифенола

Последњих деценија велику улогу у медицини и фармацији у лечењу заразних болести одиграли су антибиотици. Међутим, услед њихове неадекватне и превише уобичајене употребе новонастала појава резистенције довела је до смањења или чак неефикасности постојећих антибактеријских лекова [161,162]. На пољу проучавања фитохемикалија као састојака биљака дошло се до сазнања о снажној активности ових једињења, тако да су се они почели веома примењивати у случајевима појаве бактеријске резистенције [163,164]. У Табели 6 су представљени биљни феноли који показују изражену антибактеријску активност.

Табела 6. Биљни феноли са најачом антибактеријском активношћу

Једињење	Механизам дејства	Бактеријска врста	Активност	Реф.
Резвератрол	Редукована производња биофилма	<i>Escherichia coli</i>	Смањена вредност МИС	[165]
Лутеолин	Инхибитор раста бактеријске врсте	<i>Helicobacter pylori</i>	Промена оптичке густине спектрофотомет.	[166]
	Инхибиција биофилма	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Смањена вредност МИС и МВС	[167]
Каемпферол	Инхибитор пумпе за одвод	<i>Candida albicans</i>	Смањена вредност МИС	[168]
	Инхибитор пумпе за одвод	<i>Escherichia coli</i>	Смањење формирања бактеријског биофилма	[169]
Рамнетин	Инхибитор пумпе за одвод	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Инхибирање раста мултирезистентних бактерија	[170]
	Инхибитор пумпе за одвод	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	Смањена вредност МИС	[171]
p-кумаринска киселина	Нарушавање мембране и везивање за бактеријску геномску ДНК	<i>Shigella dysenteriae</i>	Смањена вредност МИС	[172]
Апигенин	Инхибитор раста	<i>Helicobacter pylori</i>	Смањење МИС	[173]

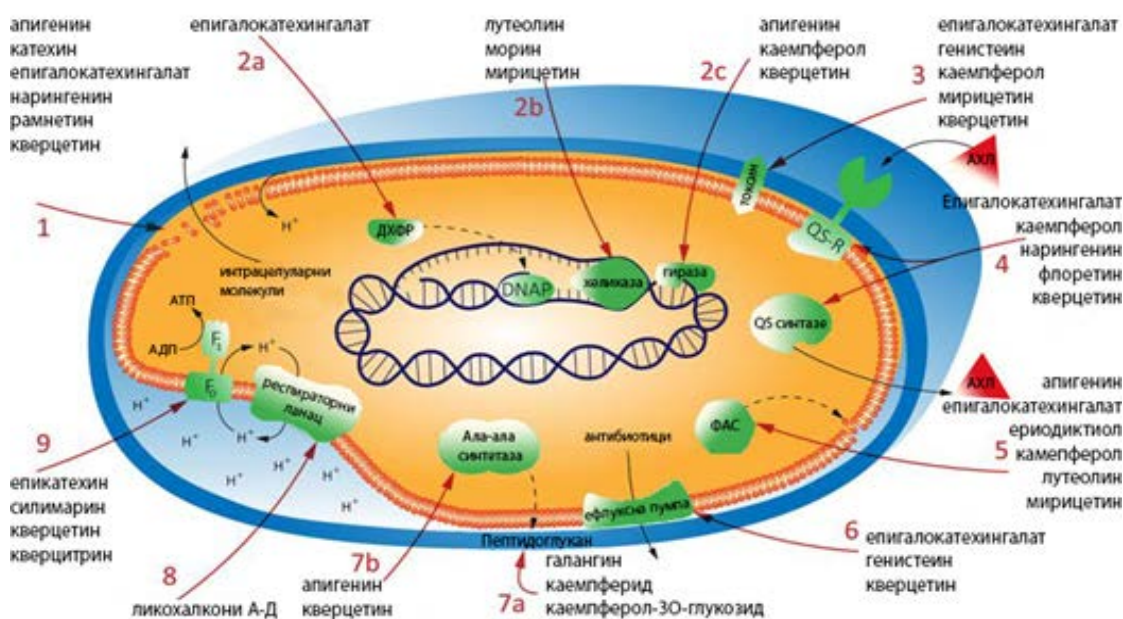
МИС- минимална инхибиторна концентрација, МВС-минимална бактерицидна концентрација.

Антибактеријско деловање биљних фенола не може се приписати само једном механизму. У зависности од једињења које испољава дејство, места на које делује и од бактеријске врсте постоји већи број механизма деловања.

Флавоноиди испољавају антибактеријско дејство на неколико начина:

- нарушавају структуру мембране - што може директно или индиректно изазвати њену дисфункцију и на крају бактеријску смрт. Сматра се да флавоноиди реагују са липидним двослојем на два начина [174]. По првом механизму реагују са више неполярних једињења у унутрашњости хидрофобне мембране, док се по другом формирају водоничне везе између поларних група главних липида и хидрофилних флавоноида на интерфејсу мембране. Потпуни механизам интеракције флавоноид-мембрана није још до краја разјашњен и тема је проучавања великог броја научних студија.
- флавоноиди ометају стварање биофилмова бактерија и на тај начин испољавају успешно антибактеријско дејство [175].
- инхибиција синтезе нуклеинске киселине. Погодна мета антибактеријских средстава је ензим који је одговоран и неопходан за поступке синтезе, репликације, поправке и транскрипције бактеријске ДНК, ензим ДНК гираза [176]. И овде се помоћу два механизма може објаснити антибактеријско дејство флавоноида. По једном флавоноиди делују тако што је везивање њихових хидроксилних група са гиразом боље од повезивања са другим (на пример метокси) групама [177]. Други механизам инхибиције ДНК гиразе предложен је молекуларним студијама према којима флавоноиди инхибирају прекомерно прекривање ДНК конкурентним интеракцијама са АТФ везивним местом В подјединице гиразе [178,179].

На слици 22 је приказано антибактеријско дејство одређених једињења из класе флавоноида, међу којима су и једињења идентификована у испитиваним биљним врстама у овој докторској дисертацији [180].



Слика 22. Антибактеријско дејство једињења из класе флавоноида

ДХФР-дихидро фолат редуктаза, ФАС-5 - синтаза масних киселина, Ала-Ала - дипептид аланин-аланин

На слици 22. су приказана следећа антибактеријска дејства:

- 1) изазивање поремећаја мембране,
- 2) инхибиције синтезе нуклеинске киселине:
 - а) 2а - инхибиција дихидрофолат редуктазе (ДХФР),
 - б) 2б- инхибиције хеликазе
 - ц) 2ц - инхибиције гиразе/топоизомеразе,
- 3) инхибиција бактеријске вируленције и
- 4) смањивање способности да формирају биофилмове,
- 5) инхибиција синтезе ћелијске мембране у ћелији, која укључује инхибицију синтезе масних киселина (ФАС-5),
- 6) инхибиција пумпе за одливање, што може довести до преокретања антимикробне резистенције,
- 7) инхибиција синтезе ћелијске мембране у ћелији која укључује синтезу пептидогликана:
 - а) инхибиција синтезе дипептида Аланин-Аланин,
 - б) инхибицију умрежавања пептидогликана,
- 8) инхибиција активности НАДХ-цитохром с редуктазе у бактеријском респираторном ланцу,
- 9) инхибиција АТП-синтазе.

Открића на пољу антибактеријске активности биљних фенола као нутрацеутика указују да се они могу примењивати као сами или у комбинацији са антибиотцима, да би се на тај начин појачало деловање на велики број бактерија [181,182].

2.5.3. Антитуморска и цитотоксична активност

Када се говори о туморима мисли се на нови, неконтролисани раст ткива који се наставља и по престанку деловања фактора који су тај раст иницирали [183]. Сама реч тумор је латинског порекла и значи оток, тако да се најпре примењивала да опише промене у ткиву које настају током процеса запаљења, али с обзиром на нова сазнања у овом домену данас се у том смислу не користи више.

Тумори се могу поделити по потенцијалном клиничком понашању - на бенигне и малигне и по ткиву од кога потичу - на епителне и мезенхимне [183].

Оно што је заједничко за све типове је да користе различите механизме у циљу стицања основних карактеристика током процеса туморигенезе. Важно је напоменути да нису сви тумори канцерозни; бенигни тумори се не шире на остале делове тела [183]. Општи назив за малигне туморе је канцер (*cancer, lat* - рак), а назив карцином (*carcinoma*) се примењује на малигне туморе епителних ткива [183].

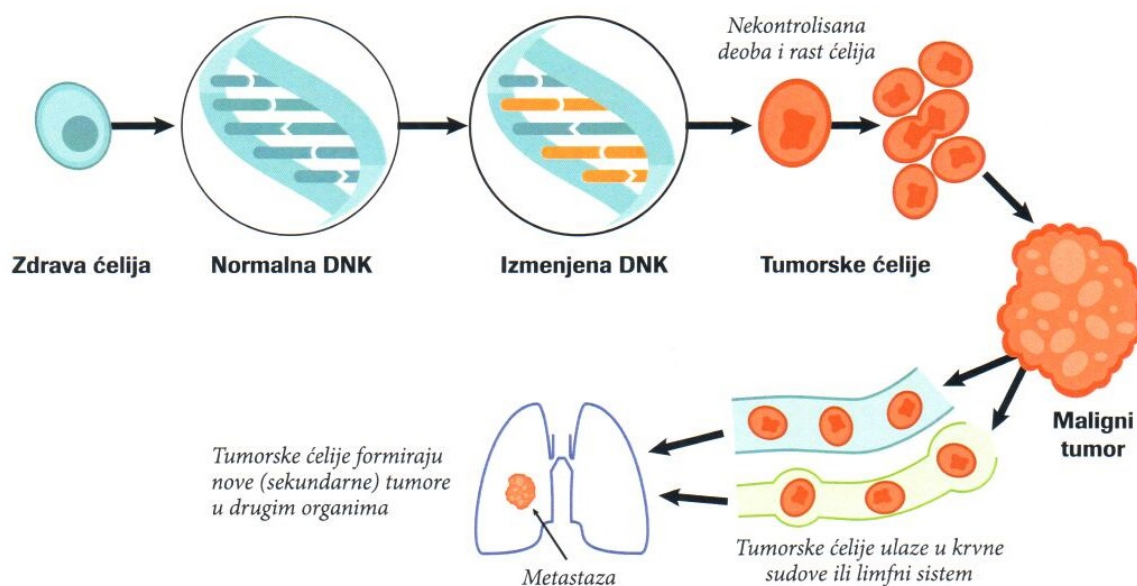
На основу научних доказа, сматра се да малигни тумори настају из једне једине патолошке ћелије, која затим подлеже репликацији у поновљеним деобама, те се формирају клониране туморске ћелије [184]. Прелазак нормалне ћелије у малигну се назива малигна трансформација. Почетни стадијум у настанку патолошке ћелије последица је алтерације односно мутације генетског материјала тј. деоксирибонуклеинске киселине. Ова алтерација може настати спонтано или може бити изазвана егзогеним факторима као на пример експозицијом хемијским канцерогеним материјама или јонизујућем зрачењу. Да ли ће се из ове ћелије касније развити тумор зависи од бројних фактора попут способности ћелије да сама поправи настала оштећења,

затим од присуства ендогених или егзогених агенаса који потпомажу или пак инхибирају развој тумора, али и од ефикасности имунолошког система. Организам је у стању да савлада већину случајева тумора неколико дана, недеља или месеци након откривања његовог постојања, али има случајева да тумор избегне откривање све док не нарасте, а тада већ садржи милионе ћелија. Дешава се да тај процес некада траје чак и до десет година, а онда је организму односно имунолошком систему организма тешко да се ефикасно супростави и организује ефикасну одбрану од тумора. Такође, могућа је и појава да организам не препозна „ненормалну“ ћелију која настане, да она „неприметно“ прође и опет се подели.

Карциногенеза, онкогенеза или туморигенеза је формирање канцера, при чему су нормалне ћелије трансформисане у ћелије рака. Процес карактеришу промене на ћелијском, генетском и епигенетском нивоу и ненормална деоба ћелија. Настанак малигног тумора резултат је губитка контроле над ћелијском деобом и пролиферацијом, процесом који је комплексан и под контролом је неколико група специфичних гена. Да би се нормална ћелија трансформисала у ћелију рака, гени који регулишу раст и диференцијацију ћелија морају бити измењени [185]. Генетске и епигенетске промене могу се догодити на многим нивоима, од добијања или губитка целих хромозома, до мутације која утиче на један DNK нуклеотид, или до пригушивања или активирања микро RNA која контролише експресију од 100 до 500 гена [186,187]. Научна сазнања о процесу канцерогенезе су непотпуна, али се сматра да сам процес има неколико стадијума:

- стадијум иницијације (или покретања),
- стадијум промоције (потпомагање) и
- стадијум прогресије.

Иницијација настаје као последица промене генетског материјала ћелије услед интеракције са канцерогеном материјом. Ова мутација трајно мења фенотип ћелије и ове промене мењају ћелију трајно је преведећи у неопластичну. Промоција се састоји од процеса који омогућавају развој ћелије која је промењена. Она није резултат везивања за DNK, нити доводи до промене DNK. Разноврсни су узроци рака и на овом пољу се још увек ради. Оштећење DNK од стране ROS је широко прихваћен као главни узрок рака, кисеонични радикали могу такође играти главну улогу као ендогени покретачи дегенеративних процеса, попут оштећења и мутације DNK (и промоције), који могу бити повезани са раком, болестима срца и старењем [188]. Клиничка испитивања подржавају запажања до којих се дошло на основу експеримената који указују да антиоксидативни обрамбени системи не могу пружити потпуну заштиту од штетних ефеката ROS, да су оксидативна оштећења на DNK битан фактор у канцерогенези, а оксидативно модификоване DNK има пуно у људским ткивима, посебно туморима [189].



Слика 23. Процес настајања туморских ћелија од здравих ћелија у организму

(слика преузета са: <https://media.atlasklinika.com/2019/11/%C5%A0ta-je-to-karcinom.jpg>)

Сматра се да кумулативна производња ROS/RNS било ендогеним или егзогеним путем се назива оксидативним стресом и уобичајена је за многе типове ћелија карцинома који су повезани са измењеном редокс регулацијом ћелијских сигналних путева [190].

2.5.3.1. Антитуморско и антикарциномско дејство биљних екстраката

Један од најефикаснијих досадашњих третмана карцинома је хемотерапија. Нови лекови који се данас користе мање су инвазивни и терпијске стратегије се континуирано истражују, али и поред тога тренутни статус хемотерапије није уопште задовољавајући [191]. Ефекат хемотерапије је ограничен, а лекови који се користе имају доста штетних нежељених ефеката, ако се хемотерапија користи дуже време то ослабљује имунолошки обрамбени систем организма, што може довести до тога да му прети опасност од више болести и инфекција, чинећи његов организам њима подложен [192]. Са друге стране, природне терапије, као што је употреба биљних производа у лечењу рака, могу смањити нежељене ефекте [193,194].

Фенолна једињења која воде порекло из биљних извора, поседују низ позитивних антикарциномско дејстава [195]. Ова једињења имају значај који је заснован на превасходно антиоксидативној активности коју ти екстракти испољавају. Биљни феноли су познати антиоксиданти који могу да штите ћелију, али и да врше поправку насталих оштећења услед дејства слободних радикала. Антикарциномско дејство биљних фенола је засновано на следећим ефектима:

- доводе до заустављања циклуса у ћелији, инхибирају процес карциногенезе тако што утичу на реакције на молекулском нивоу у фазама иницијације, промоције и прогресије [196].
- приликом пролиферације ћелијских тумора врше модулацију протеинских киназа [197],

- снажно инхибирају настанак слободних радикала и напад реактивних врста кисеоника [198].

Антиканцерогени ефекти фенолних једињења првенствено су резултат способности:

- (а) изазивања заустављања ћелијског циклуса;
- (б) инхибирају онкогене сигналне каскаде које контролишу пролиферацију ћелија, ангиогенезу и апоптозу;
- (ц) модулирају нивое ROS;
- (д) промовишу протеине супресоре тумора као што је P53; и
- (е) побољшати способност диференцијације и трансформације у нормалне ћелије итд [199].

Колико ће одређено фенолно једињење бити ефикасно зависи од више фактора. У првом реду је за то одлучујућа сама структура једињења. Групе које су углавном одговорне за антиоксидативну активност у фенолима су хидроксилне групе. Утврђено је да једињења са већим бројем хидроксилних група показују изражену антиканцерогену активност у односу на једињења која хидроксилне групе не поседују у структури [199]. Гална киселина (која садржи три хидроксилне (ОН) групе) поседује антикарциномску активност и антитуморско деловање у многим ћелијама рака у односу на ди- и монохидрокси бензојеве киселине [199]. Осим ОН група и присуство бочног ланца (незасићеног) појачава дејство фенолног једињења. Циметна киселина која садрже незасићени бочни ланац је добро антитуморско средство [200, 201]. Кафена или хлорогенска киселина инхибирају метастазу плућа изазвану ћелијама карцинома дебелог црева СТ-26 блокирајући фосфорилацију ЕРК- екстрацелуларног сигнала регулисаним киназе (ЕРК) [202]. Кафена киселина индукује апоптозу путем митохондријског апоптотског пута што такође сугерише да ова киселина има снажан антитуморски ефекат и да може бити перспективно хемопревентивно или хемотерапеутско средство [203]. Ефикасност фенолних једињења из биљних извора је забележена код великог броја ћелијских линија канцера. Изоловани полифеноли из јагода укључујући кемпферол, кверцетин, антоцијанине, кумаринску и елагинску киселину су показали да инхибирају раст више врста хуманих ћелијских линија рака дојке (MCF-7), оралног (KB, CAL-27), дебелог црева (HT-29 и HCT-116) и простате (LNCaP и DU-145) [204]. Екстракти бобица такође су процењени због њихове способности да стимулишу апоптозу ћелијске линије карцинома дебелог црева која експримира СОКС-2, HT-29 [204]. Наиме, код екстраката који су добијени из бобичастог воћа је утврђено да имају снажну антитуморску активност, и да уколико садрже већи проценат антоцијана утолико је и јача антитуморска активност [205]. За антоцијане је забележено да неке врсте биљака код којих је садржај антоцијана велики, долази до спречавања мутагенезе и инхибиције процеса развоја карцинома-карценогенезе [205]. Осим тога, у појединим испитивањима забележено је да класе флавоноида као што су флаволи, флавоноли, флаванони, изофлаволи поседују антипролиферативно дејство у различитим ћелијским линијама рака [206]. Шест флавоноида (фисетин, кверцетин, апигенин, флоретин, хесперитин, халкон) инхибира пролиферацију карцинома ћелија јетре [207]. Апигенин инхибира раст ћелија рака панкреаса [208] и хуманог аденома карцинома простате [209].

3. ЕКСТРАКТИВНЕ ТЕХНИКЕ ПРИМЕЊЕНЕ У РАДУ

Екстракти се из полазних сировина биљних матрица различитим техникама екстракције. У нашем раду смо користили екстракцију чврсто-течно (екстракција из чврстог биљног материјала у сувом стању помоћу растварача у течном агрегатном стању) [210]. Биљни материјал који представља екстрактивну супстанцу је у сувом стању и уситњен. У првој фази екстракције се доводи у контакт са растварачем. Тада се врши растварање биљних састојака из полазне биљне матрице у уређају за екстракцију. Када се користи течан растварач, добијени екстракт је такође течан. Уколико се наставком процеса подвргне упаравању у вакуум упаривачу, може се добити получврсти екстракт, а уколико се врши процес сушења чврсти односно суви екстракт [210]. Моделирањем параметара екстракције може се повећати принос екстракције. Такође, на принос и састав екстракта као и на брзину саме екстракције утиче више фактора:

- *полазни биљни материјал,*

Да би се приступило одговарајућој методи екстракције, неопходно је прво припремити биљни материјал за екстракцију. Овај корак је неопходан у циљу очувања активних хемијских једињења и корисних састојака у биљном материјалу. Он се састоји од сушења и млевења. Узорци који се користе могу бити у свежем (сировом), смрзнутом или у сувом стању - осушени узорци, који се у већини случајева користе. Сушењем и млевењем утиче се на очување фитохемикалија у коначним екстрактима [211]. Узорак који је више и боље уситњен обезбеђује бољи контакт растварача са биљним материјалом и боље екстраховање активних састојака. Екстракција се заснива на дифузији корисне компоненте или компоненти из биљног материјала у растварач, који је у сталном додиру са материјалом и који је селективан према корисној компоненти. Величина честица је веома битан фактор како би екстракција била што успешнија. Смањење величине честица повећава површински контакт између узорка и екстракционих растварача [211]. Уситњавање се може вршити механички или применом различитих уређаја као што су дробилице, млинови и други.

- *избор растварача за екстракцију,*

Уситњени делови биљног материјала се доводе у контакт са растварачем у екстрактору, уређају за екстракцију и тип растварача игра важну улогу у овом процесу. Опште је познато да принос екстракције зависи од растварача, односно његове поларности. Избор растварача зависи од степена хидрофилности саме супстанце, с обзиром да се супстанце деле на:

- хидрофилне, тј. оне које су растворне у поларним растварачима
- супстанце растворне у слабо поларним растварачима, као и
- хидрофобне, оне које су растворне у неполарним растварачима,

Избор растварача за екстракцију биће условљен и самим карактеристикама супстанци. Постоји и универзално правило да се „слично раствара у сличном“, па ће се за поларне супстанце узимати поларни растварач и обратно. Као средство за екстракцију се најчешће користи:

- алкохоли различите концентрације (метанол, етанол),
- мање поларни растварачи (ацетон, хексан, етар, етил ацетат и други),
- поларнији растварачи (пропилен гликол, глицерол),
- комбинације растварача.

Растварачи са различитим поларитетима имају значајне ефекте на укупан садржај полифенола [212]. За екстракцију полифенолних једињења најчешће се као растварач користи етанол [213]. Етанол је добар за екстракцију полифенола јер није токсичан, тако да спада у групу безбедних растварача [213].

- *избор технике екстракције*

Екстрактивни процеси се могу водити као:

- Дисконтинуалне или традиционалне (мацерација, Соклет екстракција, дигестија, турбо-екстракција) и
- Континуалне или савремене технике екстракције (перколација, реперколација, циркулациона екстракција, микроталасна, ултразвучна екстракција) [214].

Савремене методе привлаче све већу пажњу јавности у односу на традиционалне поступке екстракције. Наиме, при конвенционалним поступцима добијања екстраката примећено је да, иако дају добре приносе екстраката, ове методе показују извесне недостатке као што су дуго време извођења, велике количине растварача који заостају које је тешко уклонити из екстраката, повлачење из биљних матрица непожељних састојака, деградација биоактивних компонената, високи трошкови и други. Услед ових појава све се више пажње поклања се новим савременим екстрактивним техникама којима би се елиминисали ови неповољни утицаји, као што су ултразвучна екстракција, микроталасна екстракција и суперкритична екстракција.

3.1. Конвенционалне екстрактивне методе

3.1.1. Мацерација

Мацерација је једноставна, једнократна екстракција прописано уситњене дроге прописаним растварачем на собној температури [215]. Процес се изводи тако што се биљни материјал стави у посуду, дода се одређена количина растварача и остави да одстоји затворено на собној температури током одређеног временског периода од најмање 3 дана, уз повремено мућкање. Током тог времена долази до процеса дифузије између састојака који се налазе у биљци и растварача. Током процеса је потребно повремено мућкати раствор. Повремено мућкање у мацерацији олакшава екстракцију на два начина: а) повећава дифузију, б) уклања се концентровани раствор са површине узорка за довођење новог растварача до биљног узорка ради већег приноса екстракције [216].

Пренос масе се јавља током овог процеса, а процес дифузије је одговоран за процес преноса масе јер се молекулска дифузија дешава услед разлике у концентрацијама растворених материја у фазама које су у контакту. Када је у питању растварач, од велике је важности изабрати погодан растварач како би се циљана једињења што боље екстраховала из биљног узорка. Такође, мора водити рачуна о запремини растварача коју користимо. Са повећањем запремине растварача требало би повећати и пропорционално количину екстрахованог материјала. Температура је веома битан фактор при екстракцији јер постоје и термолабилна једињења која желимо да идентификујемо. Предност ове методе је употреба хладног растварача, чиме се смањује разградња активних материја. Процес има и предности које се огледају у томе што је посуда током процеса затворена чиме се спречава испаравање растварача. Процес би се могао би се користити за екстракцију термолабилних компонената [217]. Мацерација је процес са недостатком дугог времена екстракције и мале ефикасности екстракције [217].

Смеша растварача и биљне дроге које се помешају се након неколико дана (може и часова) филтрира како би се одвојио екстракт од нераствореног дела биљног материјала.

3.1.2. Сокслет (Soxlet) екстракција

Од класичних метода као једна од веома примењиваних техника екстракције која се данас користи је Сокслетова (*Soxhlet*) екстракција. То је континуална чврсто-течна екстракција која у односу на друге конвенционалне технике екстракције поседује низ предности, осим у случају када се ради са термолабилним једињењима. Она се типично примењује када се жељено једињење из биљног узорка раствара у растварачу, а да у њему нечистоћа из узорка није растворљива. Сокслетова екстракција се врши у апаратури по Сокслету (*Soxhlet*- у) која се састоји из следећих делова:

- балона за екстракцију,
- екстрактора или средишњег дела апаратуре који у себи има сифонски механизам који периодично празни екстрактор (рефлукс) којим циркулише растварач,
- чауре, хилзне или патроне (обично направљена од дебелог филтер папира) који задржава чврсту масу која се екстрахује, и
- хладњака или кондензатора

Растварачи који се користе, односно сам избор растварача који ће се користити при Сокслетовој екстракцији је веома важан и мора се водити рачуна о његовом одабиру. Неопходно је да растварач испуни следеће услове:

- мора да буде селективан према једињењу које желимо да добијемо из биљке односно екстрахујемо из узорка (овде би требало узети и обзир сам карактер активног принципа који желимо да изолујемо, због јединственог принципа при растварању „слично се раствара у сличном“),
- растварач са активним једињењем које желимо да добијемо из узорка са собом не би требало да раствори нежељене компоненте и једињења или да број таквих једињења буде смањен на што је могућу мању меру у добијеном екстракту,
- не сме да буде токсичан,
- за апаратуру растварач не сме никако да буде агресиван и нагризајући,
- температура кључања растварача би требало да буде ниска.

Као растварачи се углавном користе вода, метанол, етанол, ацетон, бензол, хексан, метилен-хлорид и други у зависности природе узорка чију екстракцију вршимо и хемијских једињења која се у њему налазе, а која желимо да екстрахујемо и у Табели 7 су дати примери неких биоктивних једињења која се могу екстраховати различитим растварачима [216,218].

Табела 7. Биоктивна једињења која се могу екстраховати различитим растварачима

Вода	Етанол	Метанол	Хлороформ	Дихлор-метанол	Етар	Ацетон
Антоци-јани	Танини	Антоци-јани	Терпено-иди	Терпено-иди	Алкало-иди	Флаво-ноиди
Танини	Поли-феноли	Танини	Флавоно-иди		Терпе-ноиди	
Сапонини	Флаво-ноли	Флавони			Кумарини	
Терпе-ноиди	Терпе-ноиди	Полифеноли			Масне киселине	

Сам процес извођења Сокслетове екстракције је једноставан. У порозну чауру или хилзну од филтер папира се стави биљни материјал, а потом се чаура стави у екстракциону комору Сокслет-овог екстрактора. У балон се претходно додаје органски растварач, а затим се екстрактор постави на балон. Растварач у балону се загрева да благо кључа (преко грејног тела), ослобађају се његове паре које пролазе кроз бочну цев апарата до кондензатора. У кондензатору се ове паре растварача кондензују и загрејана течност се враћа на порозну чауру у којој се налази материјал за екстраховање, притом растварајући компоненте из биљног материјала. Растворљиви састојци бивају екстраховани. У унутрашњој цеви Сокслетовог екстрактора ниво растварача се повећава, расте и када достигне превојну тачку на бочној цеви за одвајање раствора растварач се са раствором супстанцом према принципу спојених судова прелива и враћа у балон. Овај процес се аутоматски понавља више пута, све док се не изврши потпуна екстракција супстанце. По завршетку екстракције растварач се одваја од екстракта упаравањем помоћу ротационог вакуум упаривача, а уколико жељено једињење има високу растворљивост у растварачу, раздвајање од нерастворљиве супстанце се може извршити и једноставном филтрацијом. Предност ове методе у поређењу са претходно описаним методама је у томе што се велике количине активне супстанце могу екстраховати са много мањом количином растварача. Ово утиче на огромну економију у погледу времена, енергије и последично финансијских инпута. У малим размерама користи се само као шаржни поступак, али постаје много економичнији и одрживији када се претвори у континуирани поступак екстракције у средњем или великом обиму [210]. Недостаци ове методе екстракције су: растварач заостаје у екстракту у извесној мери чак иако се користи накнадна обрада екстракта у смислу уклањања растварача након извршене екстракције, дуго трајање екстракције и велика потрошња енергије [219].

3.2. Неконвенционалне екстрактивне методе

3.2.1. Ултразвучна екстракција

Једна од савремених метода екстракције је екстракција применом ултразвука. Ултразвук је првобитно коришћен за чишћење или емулговање а данас се он користи и у екстраховању. Ова метода даје бројне предности у односу на конвенционалне технике екстракције. Ултразвучна екстракција обухвата методу екстраховања активних компоненти из узорка употребом ултразвука са фреквенцијом која је у распону од 20 kHz до 2000 kHz. Ово повећава пропусност ћелијских зидова и производи кавитацију [210]. Суштински, метода ултразвучне екстракције као новија метода, своди се на третирање узорка ултразвучним таласима. Таласи проласком кроз медијум стварају различите феномене попут компресије, експанзије, кавитације и других који као крајњи учинак доводе до бржег преноса масе из чврсте у течну фазу. Феномен познат под именом кавитација, значи производња, раст и колапс мехурића. Наиме, када ултразвучни таласи пролазе кроз течну фазу, тада долази до серије компресије и декомпресије мехурова гаса у фази која је течна. Приликом тога настају мехурићи, расту и долази до њихове имплозије, тако да температура и притисак порасту [220]. То се дешава на површини биљног материјала а потом долази до разарања биљне ћелије. Физичка и хемијска својства биљног узорка који је под дејством ултразвука се мењају, нарушава се ћелијска мембрана чиме је олакшано ослобађање једињења и повећан је масовни транспорт растварача у биљне ћелије [220]. Последично, долази до бубрења ћелија и након извесног времена пробијања ћелијских зидова. Заправо оприменом ултразвука је омогућен бржи трансфер масе и растварач брже приступа у ћелијски материјал делова биљке, чиме се

врши испирање састојака. Овај процес је лакши него што је то код других конвенционалних метода екстракције, као што су мацерација или екстракција по Сокслету где растварач самостално, али спорије долази до ћелијског материјала. Позитивне стране ултразвучне екстракције су: смањење времена процеса екстракције, енергије и ограничена употреба растварача, побољшана је ефикасност мешања, висок пренос енергије, смањен термички градијент и температура екстракције, селективно екстраковање, смањена величина опреме, бржи одговор на контролу екстракције процеса, брзо покретање, повећана производња [221].

Процес ултразвучне екстракције има и извесне недостатке, као што је повремено познати штетни ефекат ултразвука енергије преко 20 kHz на активне састојке лековитог биља када се формирају слободни радикали који услед свог деловања доводе до нежељених промена у молекулима [210].

3.2.2. Микроталасна екстракција

Ова метода екстракције се изводи уз примену микроталаса. Микроталасно зрачење по својим карактеристикама је такво да интерагује са диполима поларних и неполаризабилних супстанци. Микроталасна екстракција се одвија тако што се енергија микроталасног зрачења директно преноси тј. предаје се растварачу који се користи и чврстом узорку. Молекули воде који су поларни убрзано апсорбују енергију коју обезбеђује микроталасно зрачење што доводи до драстичног пораста температуре унутар биљних ћелија [222]. Унутар биљних ћелија испарава течност што настаје као последица унутрашњег прегревања, ствара се висок притисак паре који пробија ћелију односно њен ћелијски зид и/или ћелијску мембрану, чиме се ослобађају секундарни метаболити који су углавном ту и сконцентрисани [223]. Предност ове методе је у брзом вршењу процеса загревања уз опрему која је у знатно мањем обиму [224]. Такође је краће време екстракције и мања потрошња растварача [225].

3.2.3. Субкритична екстракција са водом

Велики број компонената се може издвајати из полазних течних или чврстих смеша екстракцијом помоћу растварача чије се вредности притиска и температуре одржавају изнад критичних. Такви процеси познати су као суперкритична екстракција, а флуиди суперкритични флуиди. Суперкритични флуиди су флуиди у суперкритичном стању, а то је стање у коме је температура изнад њихове критичне температуре, притисак је изнад вредности критичног притиска. Примењена температура и притисак који су изнад критичних вредности притиска и температуре за дати флуид, односно изнад тзв. критичне тачке, на фазном дијаграму (слика 24) критични притисак и температура обележавају се као критична тачка. Изнад критичне температуре де даљим повећавањем притиска не може добити течна фаза. Изнад критичне тачке, уколико се врше мале промене притиска и/или температуре, мењају се особине суперкритичног гаса као естрагенса, чиме је омогућена селективна екстракција [215].

Флуиди који су у суперкритичном стању, интегришу добре особине гасова (нижи вискозитет и веће вредности коефицијента дифузије) и течности (повећана запреминска маса и повећана растворљивост) [215].



Слика 24. Фазни дијаграм са критичном тачком

(слика преузета од <https://fizis.rs/wp-content/uploads/2016/01/dijagrami-prelazi-6.jpg>).

Суперкритични флуиди се одликују великом густином која је блиска густини течности што погодује њиховој моћи растварања, а са друге стране, дифузност наткритичних флуида је велика и блиска дифузивности гасова што им омогућава да лакше продру у растворак и његово растварање [215].

Табела 8. Вредности критичних температура и притиска различитих супстанци [226]

Једињење	Критична температура [°C]	Критични притисак [bar]
Водоник	-239.95	12.97
Азот	146.9	33.96
Угљеник(IV)-оксид	31.04	73.8
Етилен	9.3	50.4
Азот (I)-оксид	36.7	72.7
Пропан	96.7	42.5
Амонијак	132.5	112.8
Вода	374	220.5

Предности суперкритичне екстракције у односу на класичну екстракцију су :

- променом притиска и температуре можемо контролисати моћ растварања надкритичног флуида,
- субкритични флуид се лако уклања из екстракта (уколико се снизи притисак),
- може се вршити екстраховање компонената које иначе имају високе температуре кључања на релативно ниским температурама,
- знатно боље се растварају фазе, што рецимо није могуће постићи класичном екстракцијом,

- како се ради на ниским и нижим температурама, могу се екстраховати компоненте које су термолабилне са минималним изменама у њиховој структури,
- наткритични флуид није токсичан [227]

Недостаци суперкритичне екстракције су:

- ради се на релативно високим притисцима;
- сложена регенерација коришћених растварача (када се не користи вода већ други растварачи), што значи и знатне енергетске трошкове,
- за процесну опрему велика инвестициона улагања [227].

Као надкритични флуид највећу примену налази угљеник(IV)-оксид, потом вода, фреон, азот, азот(II)-оксид, амонијак, као и неки од угљоводоника попут метана, етана, пропана, етена, пропена и других.

Ова савремена техника екстракције подразумева коришћење воде као суперкритичног флуида. Специфичне особине које поседује вода су висока тачка кључања (за њену масу), висока диелектрична константа и висока поларност [228]. На слици 44 је дат фазни дијаграм воде који описује њено понашање на различитим температурама и притисцима. Када се вода налази у суперкритичном стању она има другачије битније особине од оних које показује на собној температури и нормалном притиску. Наиме, при обичним условима температуре и притиска вода је поларан растварач, добро раствара поларна једињења, а слабо поларна и неполарна веома слабо или скоро да их не раствара. На вредностима температуре и притиска које су у близини критичне вредности, како се температура повећава ка критичној вредности, повећава се коефицијент дифузије, а вискозитет и површински напон се смањују. Како температура расте, долази до изразитог и систематског смањења пермитивности, повећања брзине дифузије и смањења вискозности и површинског напона те последично, поларнији циљани материјали са високом растворљивошћу у води у амбијенталним условима најефикасније се издвајају при нижим температурама, док умерено поларни и неполарни циљеви захтевају мање поларни медијум изазван повишеном температуром [229]. Додатна предност ове методе огледа се у томе што је могуће финим подешавањем параметара процеса на почетку могуће повећати ефикасност екстракције. Један од најважнијих параметара који утичу на ефикасност субкритичне екстракције водом је температура. Како температура расте, долази до изразитог и систематског смањења пермитивности, повећања брзине дифузије и смањења вискозности и површинског напона [230]. СЦВ (субкритична екстракција водом) се мора изводити на највишој дозвољеној температури, али како повећање температуре екстракције изнад одређене вредности доводи до разлагања једињења која се налазе у есенцијалном уљу мора се унапред одредити максимално дозвољена температура екстракције експерименталним путем. Што се тиче екстракције есенцијалних уља, показало се да ће температуре између 125 и 175°C [230]. Предности суперкритичне екстракција са водом се огледају у следећем:

- један је од најбољих поступака за издвајање активних компоненти из биљних узорака важних за и људску исхрану и фармацеутску индустрију, јер се добијају екстракти без трагова растварача, вода испарава на нижим температурама, што иначе није случај са конвенционалним начинима екстракције ,
- вода није токсично једињење те самим тим у добијеним екстрактима неће долазити до појаве токсичних трагова као што то је случај приликом употребе неких органских растварача, еколошки је значи погодна
- вода је лако доступна и јефтина је (условно речено).

И поред великог броја предности субкритична екстракција са водом има и недостатке:

- процес је током кога се мора водити рачуна о извођењу у смислу знатне контроле јер се сам процес одвија при наткритичној температури и наткритичном притиску чије вредности су високе,
- услед високе вредности температуре, један број једињења (нарочито термолабилна једињења) у узорку се могу разграђивати,
- новчани издаци - релативно велика улагања у погледу материјалних средстава прате овај вид екстракције јер ако се пореде са постројењима која се користе при процесима који се изводе на ниским притисцима ова су знатно сложенија и сам процес то захтева. У одређеним гранама индустрије као што је на пример прехранбена индустрија у постројењима за прераду кафе, чаја или хмеља инвестициони трошкови су донекле ублажени с' обзиром на велике количине материјала који се користи те се и примењује ова екстрактивна техника.

Чињеница да се овом екстрактивном техником добијају производи који се пре свега одликују изузетним квалитетом чине да се технологије које се заснивају на примени надкритичних флуида све више буду примењене у фармацеутској индустрији, али и у прехранбеној индустрији.

4. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Будући да су биљке део наше свакодневнице јер имају примену како у прехранбеној индустрији тако и у терапеутске сврхе, идеја ових истраживања је да се научној јавности предочи полифенолни профил и биохемијска активност екстраката биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S.hortensis* L. добијених различитим типовима (ковенционалним и неконвенционалним) екстракција. Такође, ова истраживања су усмерена у правцу пружања могућности наведених биљних екстраката као извора потенцијалних природних нутрацеутика. У том светлу, предмет ове докторске дисертације је испитивање хемијског састава различитих екстраката биљака *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S.hortensis* L. као и неких видова њихове биохемијске активности у циљу примене наведених као потенцијалних природних нутрацеутика. У том смислу ова докторска теза обухвата пет битних фаза експерименталног рада:

Прва фаза: Припремна фаза

Ова фаза обухвата:

- сакупљање,
- сушење и
- систематизацију биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S.hortensis* L.

Друга фаза: Добијање екстраката биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S.hortensis* L. различитим методама екстракције

У циљу добијања екстраката у овој фази ћемо користити следеће екстрактивне технике:

- екстракција конвенционалним методама
 - мацерација и
 - екстракција по Сокслету (*Soxlet*) и
- екстракција савременим методама:
 - ултразвучна екстракција,
 - микроталасна екстракција и
 - субкритична екстракција водом.

Трећа фаза: Идентификација полифенолних једињења

Овај део истраживања је спроведен вршећи:

- квалитативну анализу екстраката и то
 - одређивање укупног садржаја фенола,
 - одређивање флавоноида,
 - одређивање кондензованих танина,
 - одређивање галотанина,
 - одређивање антоцијана и
- квантитативну анализу екстраката (HPLC/DAD анализа)

Четврта фаза: Испитивања биохемијске активности добијених екстракатау *in vitro* условима

Ова фаза обухвата следећа испитивања:

- Одређивање антиоксидативне активности методама које се базирају на различитим механизмима антиоксидативне активности;
 - одређивање укупне антиоксидативне активности,
 - одређивање антиоксидативне активности мерењем нивоа инхибиције липидне пероксидације,
 - одређивање антиоксидативне активности мерењем нивоа хидроксил радикала,
 - одређивање DPPH („*scavenger*“) активности (DPPH тест).
- Одређивање антибактеријске активности (микродилуционом методом) и
- Одређивање нивоа цитотоксичне активности (МТТ тестом)

Последња фаза ове докторске дисертације подразумева одређивање опште токсичност и генотоксичности испитиваних екстраката биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S.hortensis* L. како би утврдили могућност примене истих као потенцијалних природних нутрацеутика.

5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА

Експериментални део докторске дисертације реализован је у хемијској лабораторији Агрономског факултета у Чачку, Универзитета у Крагујевцу, лабораторији за фармацеутско инжењерство Технолошког факултета у Новом Саду, лабораторији за фармакогнозију фармацеутског факултета у Солуну, лабораторији за физичку хемију Хемијског факултета у Нишу, лабораторији за хемију Прехрамбено угоститељске школе у Чачку и Заводу за јавно здравље у Чачку.

5.1. Биљни материјал

Биљни материјал који је коришћен током експерименталног подразумева две биљне врсте – *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. које су недовољно проучене. У литератури нема довољно података о њихој применљивости и употреби у лековите сврхе, што је био довољан мотив да се посветимо проучавању ових биљних врста.

Сакупљање надземних делова биљака вршено је на територији Републике Србије, у околини Чачка 2011. и 2015. године. Након извршене детерминације, биљке су систематизоване и депоноване у хербаријуму Института за биологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу од стране др Милана Станковића. После идентификације, биљне врсте су природно осушене на ваздуху у танком слоју, без директног утицаја Сунчеве светлости - у хладу, у временском интервалу од месец дана. Након сушења свака биљна врста је пажљиво пренета у одговарајући апарат за ситњење. Уситњени делови биљака пренети су у папирне кесе и остављени на тамном и проветреном месту до употребе.

5.2. Хемикалије, реагенси и апарати

Фенолни реагенс по *Folin-Ciocalteu*, раствор натријум-хидрогенкарбоната, NaHCO_3 ($c=7,5\%$), алуминијум (III)-хлорид AlCl_3 ($c=2\%$ раствор у метанолу), флороглуцинол, $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$, хлороводонична киселина, HCl ($c=1\%$), формалдехид, HCHO (37%), калијум-јодат, KJO_3 , пуфер (pH 1), пуфер $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ (50 mM , pH=7,4, pH 4,5), метанска киселина HCOOH ($c=2\%$), гална киселина $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ($\geq 98\%$ чистоће), стандарди за HPLC анализе - кафена киселина $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$, ванилинска киселина $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$, елагинска киселина, $\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$, кверцетин, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, рутин, $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$, кемпферол, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$, амонијум-молибдат, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ ($c=4\text{ mM}$), сумпорна киселина, H_2SO_4 ($c=0.6\text{ M}$), натријум-фосфат, Na_3PO_4 раствори ($c_1=28\text{ mM}$, $c_2 = 1\text{ mg/mL}$), метанол, CH_3OH (95%), линоленска киселина $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$ (у чврстом стању), емулгатор Tween-20, етил-алкохол $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (75%), гвожђе(II)- хлорид FeCl_2 ($c = 20\text{ mM}$), амонијум тиоцијанат, NH_4CNS ($c=30\%$), аскорбинска киселина, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (водени раствор $c_1 = 1\text{ mg/mL}$, $c_2 = 1,0\text{ mM}$), гална киселина, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ($c = 1\text{ mg/mL}$), α -токоферол, $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ ($c = 1\text{ mg/mL}$), β -хидрокситолуол, ВНТ ($c= 1\text{ mg/mL}$), 2-деокси-D-рибоза $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4$ ($c=5,6\text{ mM}$), гвожђе(III)- хлорид, FeCl_3 ($c = 20\text{ mM}$), етилен диамин тетра сирћетна киселина, EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, водоник-пероксид, H_2O_2 ($c=1,0\text{ mM}$), трихлорсирћетна киселина, TCA, $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ ($c=2,8\%$), TBA, $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($c=1,0\%$), Милер-Хинтонова (*Müller-Hinton*) течна подлога (стерилна; 2 g

хранљивог бујона, 17,5 g хидролизата казеина и 1,5 g штирка се раствори у 11 дестиловане воде и кува докључања), МТТ, 3- [4,5-диметиллтиазол-2-ул]-2,5-дифенилтетразолијум-бромид, раствор антибиотика амрацина, индикатор ресазурин, 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикал, натријум-ацетат CH_3COONa ($c=1\text{M}$). Калијум-јодат, сви стандарди за HPLC анализе употребљени у експерименталном раду и МТТ су били аналитичке чистоће набављени од следећих произвођача: Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) и Alfa aesar, (Karlsruhe, Germany), гална киселина, ванилинска киселина, кемпферол и кверцетин набављени су од Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Немачка), кафена киселина од Merck KGaA (Darmstadt, Немачка), ацетонитрил $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ и фосфорна киселина H_3PO_4 били су HPLC степена чистоће набављени од компаније Tedia Company, USA. Амрацин и *cis*-диаминодихлорплатинум (*cis*-DDP) $\text{Cl}_2\text{H}_4\text{N}_2\text{Pt}$ су набављени од компаније Tedia Company (USA). Етанол $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и метанол CH_3OH су били аналитичке чистоће од произвођача Aldrich Chemical Co, Steinheim, Germany. У раду је коришћена комерцијална бидестилована вода и стерилна вода.

Уређаји које смо користили су следећи: блендер (Braun Combimax 700) ротациони вакуум упаривач марке Devarot, Elektromedicina (Ljubljana, Slovenia), апарат за екстракцију по Сокслету (*Soxhlet*), ултразвучно водено купатило EUP 540A, Euinstruments, (France), комерцијална микроталасна пећница, UV-Vis спектрофотометар марке MA9523-Spekol 211, ISKRA (Horjul, Slovenia), HPLC Agilent-1200 серије са UV-Vis DAD детектором за мулти детекцију таласних дужина, Mikroplate Reader.

5.3. Екстракција испитиваних биљних врста

5.3.1. Мацерација (МАЦ)

Уситњени биљни материјал биљне врсте *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. масе $m=50$ g пренет је ерленмајере запремине од 1000 ml. Узорцима је додато 600 ml етанола као растварача, концентрације 96%. Процес мацерације је извођен на температури од 22°C без директног утицаја Сунчеве светлости у трајању од седам дана. Садржај у ерленмајерима се повремено мућкао како би побољшали процес мацерације. Након седам дана, извршено је филтрирање добијене смеше уз коришћење набраног филтер папира Whatman, N°1. Добијени екстракти су потом концентровани на суву масу употребом ротационог упаривача под вакуумом и осушени на 40°C до константне масе. Суве екстракте смо пренели у стаклене бочице, добро затворили, обележили и оставили у фрижидеру на 4°C до употребе. Овом приликом смо користили тамне стаклене бочице како бисмо избегли неповољан утицај светлости јер би у супротном дошло до оксидативних оштећења добијених екстраката. Исти поступак је примењен за обе испитиване биљне врсте.

5.3.2. Екстракција по Сокслету (СЕ)

Сокслетова (*Soxhlet*) екстракција је извођена у конвенционалном лабораторијском уређају по Сокслету (*Soxhlet*). Претходно су сви делови апаратуре добро опрани, испрани дестилованом водом и потом осушени. Уситњени узорци биљних материјала *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. масе, $m=50$ g стављени су у филтер папир и направљена је чаура или хилзна за екстракцију. Затим је додато 600 mL 96% етанола као растварача. Екстракциони процес је вршен осам сати уз стално загревање на решоу.

Растварач је пресифонирао 12 пута. Добијене екстракте смо процедили користећи набрани филтер папир Whatman N°1, а затим концентровали употребом ротационог упаривача под вакуумом на 40°C до константне масе. Суве екстракте смо пренели у тамне стаклене бочице, обележили и оставили на хладном месту у фрижидеру на 4°C како би спречили и оксидативна и темичка оштећења екстраката до даље употребе. Исти поступак је примењен за обе испитиване биљне врсте.

5.3.3. Ултразвучна екстракција (УАЕ)

Ултразвучна екстракција је изведена са претходно измереним узорцима масе $m=50$ g које смо мерили у балон. Додато је 1000 mL 96% етанола као растварача. Смеша је сонификована у трајању од тридесет минута на фреквенцији од 40 kHz и енергији ултразвука од 90% (снага од 216W). Добијени екстракти су затим филтрирани преко набраног филтер папира Whatman N°1, а затим концентровани употребом ротационог упаривача под вакуумом на 40°C до константне масе. Суви остаци су пренети у тамне стаклене бочице, добро затворени, обележени и остављени у фрижидеру на 4°C до употребе. Исти поступак је примењен за обе испитиване биљне врсте.

5.3.4. Микроталасна екстракција (МАЕ)

Микроталасна екстракција је извођена у отвореном систему користећи сопствену, комерцијалну микроталасну пећницу коју смо претходно модификовали и прилагодили је за ову сврху. Узорак биљног материјала масе $m=50$ g је измерен на аналитичкој ваги, а затим пренешен у балон и преливен са 1000 ml 96% етанола као растварача. Поступак екстракције је извођен уследећем режиму: 1 минут предгревање на 160 W, затим 1 минут предгревање на 320 W, а након тога екстракција у трајању од тридесет минута на 600 W. Добијени екстракти су филтрирани помоћу набраног филтер папира Whatman, N°1, а затим концентровани употребом ротационог упаривача под вакуумом на 40°C до константне масе. Суви остаци су пренети у тамне стаклене бочице, обележени и остављени у фрижидеру на 4°C до даље употребе. Исти поступак је примењен за обе испитиване биљне врсте.

5.3.5. Субкритична екстракција водом (СЦВ)

Екстракција субкритичном водом је изведена у лабораторијском екстрактивном систему. Биљни узорци су измерени на аналитичкој ваги, $m=50$ g. Узорак је прво помешан са 1000 mL бидестиловане воде. Параметри система су подешени, тако да је примењени притисак износио 40 bara, а температура 140 °C. Мешање је побољшано вибрационим покретима платформе на фреквенцији од 3Hz. Оба узорка су екстрахована 30 минута, да би након екстракције процесни суд био брзо охлађен у воденом проточном купатилу на температури од 20°C. Отпуштање или депресиризација система је учињена отварањем вентила и прочишћавањем проласком азота кроз вентил. Добијени екстракти су филтрирани помоћу набраног филтер папира Whatman N°1, а затим концентровани употребом ротационог упаривача под вакуумом на 40°C до константне масе. Суви остаци су пренети у тамне стаклене бочице, обележени и остављени у фрижидеру на 4°C до употребе. Исти поступак је примењен за обе испитиване биљне врсте.

Добијени екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. који су добијени примењеним методама екстракције коришћени су за наредна испитивања.

5.3.6. Принос добијених екстраката

Принос екстракта који је добијен применом различитих техника екстракције је одређен испаравањем добијеног течног екстракта који је узет у запремини од 10 ml под вакуумом, а затим осушен у лабораторијској сушници до константне масе на температури од 80 °C. Принос (П) је изражен у грамима сувог екстракта (g) на 100 грама (g) сувог биљног материјала (g/100 g).

$$П \Leftrightarrow (g/100 g)$$

где је:

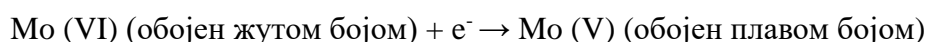
П - принос екстракта

g/100 g - број грама сувог екстракта на 100 g сувог биљног материјала.

5.4. Испитивање полифенолног профила добијених екстраката

5.4.1. Одређивање садржаја укупних фенола

Садржај укупних фенола у екстрактима биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. одређен је спектрофотометријском методом [231]. Ова метода се заснива на примени *Folin-Ciocalteu*-ов реагенса смеше Na_2WO_4 и Na_2MoO_4 и мерења редукујућег капацитета полифенолних једињења. Ова једињења дисоцијацијом дају протон и феноксидни анјон. Феноксидни анјон који је притом настао редукује *Folin-Ciocalteu*-ов реагенс до јона фенол- $MoW_{11}O_{40}^{4-}$ који је плаво обојен. Процес је приказан следећом хемијском реакцијом:



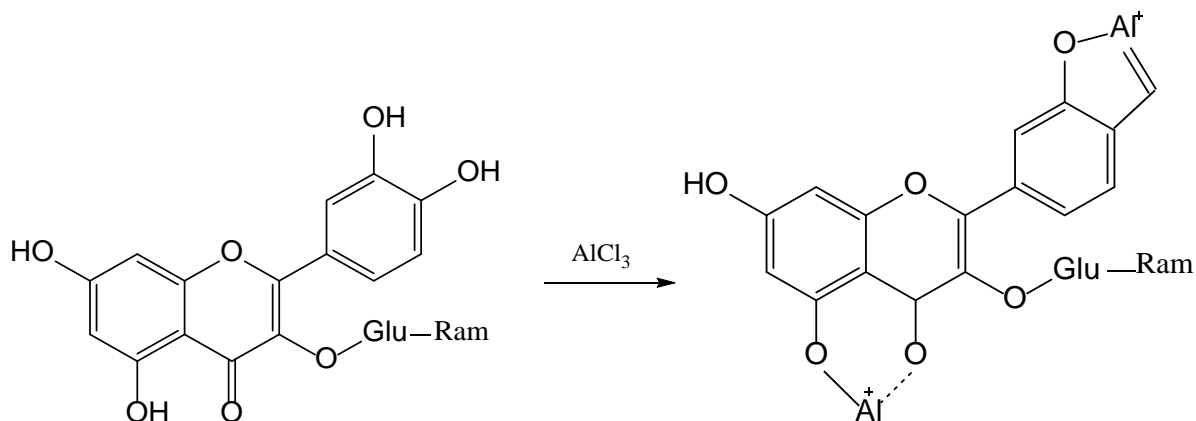
У присуству фенолних једињења врши се редукција *Folin-Ciocalteu*-овог реагенса и притом добија једињење које има плаву боју које показује максимум апсорбанце на таласној дужини од 765 nm.

Поступак рада:

Одмерено је 0,5 ml раствора екстраката помешано је са 2,5 ml *Folin-Ciocalteu*-овог реагенса и 2 ml $NaHCO_3$ (7,5 %). Паралелно је припремљена и слепа проба где је уместо екстракта додато 0,5 ml етанола. Такође, припремљена је и серија стандарних раствора галне киселине (GAE) (0,05-1mg/ml). Припремљена реакциона смеша је остављена 15 минута да одстоји и темперирана је на 45 °C. Апсорбанција је потом мерена на спектрофотометру где је подешена таласна дужина на 765 nm. Вредности очитане за апсорбанцу раствора галне киселине екстраполиране су на графику у функцији зависности од концентрације где је на основу графика одређена једначина калибрационе криве. Резултати су добијени на основу једначине калибрационе криве галне киселине и изражени у милиграмима еквивалента галне киселине по граму суве масе (mg GAE/g \pm SD). Резултат је дат као средња вредност три узастопна мерења за сваки узорак.

5.4.2. Одређивање садржаја флавоноида

Садржај укупних флавоноида у екстрактима одређен је методом по *Brighente*-у [232]. Флавоноиди имају карактеристику да са металима граде метало-комплексе. Од њих је нарочито значајан комплекс са алуминијумом. На слици 25 је представљен један овакав комплекс.



Слика 25. Грађење комплекса флавоноида са алуминијумом [232]

Поступак рада:

Помешана је запремина од 0,5 ml екстракта и 0,5 ml 2% раствора алуминијум-хлорида (AlCl_3). Слепа проба је направљена са етанолом. Након мешања раствора је остављена да одстоји 1 час на собној температури. Потом су вршена мерења апсорбанце на радној таласној дужини од 415 nm. Рутин је коришћен као стандард (10-1000 $\mu\text{g/ml}$). Резултати су добијени на основу једначине калибрационе криве рутина и изражени у милиграмима еквивалента рутина по граму суве масе ($\text{mg RU/g} \pm \text{SD}$). Резултат је дат као средња вредност три узастопна мерења за сваки узорак.

5.4.3. Одређивање садржаја кондензованих танина

Кондензовани танини су одређивани методом по *Vermeris* и *Nicholson* [233]. Принцип ове методе заснива се на реакцији таложења проантоцијанидина, а таложење се врши помоћу раствора формалдехида [233].

Поступак рада:

Након што смо коришћењем *Folin-Ciocalteu*-овог реагенса извршили одређивање садржаја укупних фенола екстракту смо додали флороглуцинол. 0,5 mol еквивалент флороглуцинола додато је сваком еквиваленту галне киселине који се налази у екстракту. Растворе који су нам потребни за даљи ток анализе смо унапред припремили.

Раствор А: водени раствор хлороводоничне киселине у коме је однос $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=2:5$ и

Раствор Б: водени раствор формалдехида, 13 ml 37% формалдехида (HCHO) који је разблажен до 100 ml водом.

У одмерених 2 ml екстракта и израчунату количину флороглуцинола додато је 2 ml претходно направљеног раствора А. Затим смо додали 1 ml припремљеног воденог

раствора Б. Смеша је остављена да одстоји током ноћи на собној температури. Након тога су непреципитирани феноли процеђени и одређени у супернатант, *Folin-Ciocalteu*-овом методом. Талог који смо добили садржи проантоцијанидине, али и познату количину флороглуцинола. Садржај кондензованих танина је изражена као остатак укупних фенола и непреципитариних фенола у одређеној концентрацији. Садржај кондензованих танина је изражен као еквивалент милиграма (mg) галне киселине (GAE) по граму (g) сувог екстракта (mg GAE/g \pm SD). Резултат је дат као средња вредност три узастопна мерења за сваки узорак.

5.4.4. Одређивање садржаја галотанина

Галотанини су квантитативно одређени калијум-јодатним тестом. Принцип одређивања се заснива на реакцији калијум-јодата са галоил естрима [233]. При овој реакцији настаје прво црвено, а на крају реакције једињење жуте боје. Мерење се врши спектрофотометријски на таласној дужини од 550 nm на којој се може одредити концентрација црвеног интермедијера.

Поступак рада:

Запремина од 1,5 ml засићеног раствора калијум-јодата $KJ\text{O}_3$ додата је у 3,5 ml испитиваног екстракта, након чега су екстракти остављени да одстоје 40 минута на 0 °C. Током овог периода инкубације хемијском реакцијом једињења у смеси настаје интермедијер који је црвеног обојења. Гална киселина је коришћена као стандард. Мерењем на спектрофотометру потребно је пратити промену апсорбанце све док се не постигне на таласној дужини од 550 nm њена максимална вредност. Укупну количина галотанина у узорку изражена је као еквивалент галне киселине (mg GAE) по граму (g) сувог екстракта (mg GAE/g екстракта \pm SD). Резултат је дат као средња вредност три узастопна мерења за сваки узорак.

5.4.5. Одређивање садржаја антоцијана

За одређивање садржаја антоцијана коришћена је метода [234] рН „сингл“ и диференцијална метода. Садржај укупних антоцијана одређује се „сингл“ методом, јер је измерена апсорбанца раствора антоцијана при рН 1 пропорционална садржају укупних антоцијана. Одређивање садржаја мономера антоцијана изводи се рН диференцијалном методом, која се заснива на особини мономера антоцијана да су при рН 1 у облику оксонијум јона (када су црвено обојени), док су при рН 4,5 антоцијани у полукеталном облику (тада су безбојни).

Поступак рада:

Суви екстракт испитиваних биљних врста растворен је у дестилованој води у различитим концентрацијама. Одмерена је запремина од по 0,25 ml раствора екстракта и пренета у два одмерна суда од 10 ml. Садржај у њима је затим допуњен пуфером рН 1, односно рН 4,5, да би потом после временског интервала који износи 15 минута измерили апсорбанце на две таласне дужине, 515 nm и 700 nm на спектрофотометру. Мерења су вршена у три понављања.

Концентрација укупних антоцијана у екстракту се израчунава као еквивалент цијанидин-3-гликозида према следећој формули:

$$[\text{укупни антоцијани}] = \frac{A_{uk} \cdot M \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l}$$

где је :

$$A_{uk} = (A_{515} - A_{700})_{pH1}$$

$M = 449.2 \text{ g/mol}$ (молекулска тежина цијанидин-3-гликозида)

$F = 20$ (дилуциони фактор екстракта односно фактор разблажења)

$\varepsilon = 26900 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ (коэффициент моларне екстинкције тј. моларни апсорпциони коэффициент цијанидин-3-гликозида)

$l = 1 \text{ cm}$ (дебљина кивете)

Концентрација неразграђених мономерних антоцијана у екстрактима се израчунава као еквивалент цијанидин-3-гликозида према следећој формули:

$$[\text{мономерни антоцијани}] = \frac{A_{mon} \cdot M \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l}$$

где је:

A_{mon} - апсорбанца разблаженог екстракта.

A_{uk} се рачуна према следећој математичкој формули:

$$A_{uk} = [(A_{515} - A_{700})_{pH1} - (A_{515} - A_{700})_{pH4.5}]$$

Израчунате концентрације укупних и мономерних антоцијана у екстракту представљене су као еквиваленти милиграма (mg) цијанидин-3-гликозида (C₃G) по граму (g) сувог екстракта (mg/g C₃G ± SD). Резултат је дат као средња вредност три узастопна мерења за сваки узорак.

5.5. HPLC анализа испитиваних биљних екстраката

Идентификација и квантификација полифенолних једињења присутних у различитим екстрактима биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. извршена је применом течне хроматографије високих перформанси уз ултраљубичасти детектор са низом диода (HPLC/DAD).

Поступак рада:

Колона је термостатирана на температури од 25°C. Као мобилна фаза коришћене систем растварача:

- растварач А: који се састоји од водеи 2% мравље киселинеи
- растварач В: који садржи 80% ацетонитрила, 2% мравље киселине и воде.

Раздвајање компоненти је извршено применом следећег линеарног градијента:

- од 0 до 10 минута 0% В,
- затим у трајању од 10 до 28 минута повећање на 0-25% В,
- 28 до 30 минута 25% В,
- затим 30 до 35 минута 25-50% В,
- од 35 до 40 минута 50-80 % В и напослетку

ђ) последњих 5 минута 80-0% В.

Проток мобилне фазе је износио 0,8 ml/min. Инјектовано је 5 μ l узорка, аутоматски, коришћењем аутоамплера. Идентификација полифенолних једињења у испитиваним узорцима извршена је поређењем ретенционих времена стандарда и узорача као и уз помоћ апсорпционих спектра, методом спољашњег стандарда. Припремљен је основни раствор стандарда 1,0 mg/ml, растварањем у метанолу. Од овог раствора је припремљена серија разблажених раствора стандарда одговарајућих масених концентрација. Конструисане су калибрационе криве и на основу површине добијених пикова израчуната је укупна количина полифенолних једињења. Резултати су израчунати и у зависности од масене концентрације стандарда. Из добијених једначина линеарне зависности израчунате су масене концентрације компоненти у екстрактима. Садржај полифенолних једињења је изражен у микрограмима (μ g) по граму (g) екстракта (μ g/g).

5.6. Биохемијска активност различитих биљних екстраката *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.

Добијени екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. су у наредној фази рада подвргнути одређивању њихове биохемијске активности. У оквиру биохемијских активности извршена су следећа испитивања:

- одређивање антиоксидативне активности,
- одређивање антибактеријске активности,
- одређивање цитотоксичне активности и
- одређивање опште токсичности и генотоксичности.

За процену антиоксидативног капацитета екстраката испитиваних биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. Коришћена су четири теста која се базирају на различитим механизмима испољавања антиоксидативне активности. Антибактеријска активност је одређена на 15 различитих бактеријских сојева, од којих 8 сојева припада Грам-позитивним (G+), а 7 сојева Грам-негативним (G-) бактеријама. Одређивање је вршено микродилуционом методом. Одређивање цитотоксичне активности екстраката је испитано на три ћелијске линије и то Нер2с ћелије (хумана ћелијска линија карцинома цервикса), RD ћелије (хумана ћелијска линија добијена од људског рабдомиосаркома) и L20В ћелије (ћелијске линије добијене из фибробласта миша) МТТ тестом. Одређивање опште токсичности и генотоксичности је испитано Allium анафазно-телофазним тестом.

5.6.1. Одређивање антиоксидативне активности

У циљу одређивања антиоксидативне активности добијених екстраката биљака коришћене су различите методе и то;

- укупна антиоксидативна активност,
- антиоксидативна активност на нивоу способности инхибиције процеса липидне пероксидације,
- антиоксидативна активност на нивоу хидроксил радикала и
- DPPH „скевинцер“ активност (DPPH тест).

5.6.1.1. Одређивање укупне антиоксидативне активности

Укупна антиоксидативна активност добијених биљних екстраката одређивана је методом по *Prieto et al. (1999)* [235]. Принцип методе се заснива на редукцији јона Мо(VI) до јона Мо(V) при чему настаје фосфат-Мо (V) комплекс у киселој средини у присуству антиоксидативног једињења. Једињење које при томе настаје је зелене боје чија се апсорбанца може мерити на таласној дужини од 695 nm.

Поступак рада:

Након што се помеша 0,3 ml екстраката са 3 ml фосфомолибденовим реагенсом (0,6 M сумпорне киселине, 28 mM натријум-фосфата и 4 mM амонијум-молибдата) реакциона смеша се инкубира 90 минута на температури од 95 °C. За слепу пробу је уместо узорка додато 0,3 ml раствора етанола. Мерена је апсорбанца на таласној дужини од 695 nm. Упоредо је припремљена и серија стандарних раствора аскорбинске киселине (0,1-2 mg/ml) који су третираны на исти начин. На основу једначине калибрационог дијаграма аскорбинске киселине израчунате су вредности укупне антиоксидативне активности. Резултат је изражен у mg AA/g екстракта ± SD. Резултат је дат као средња вредност три узастопна мерења за сваки узорак.

5.6.1.2. Одређивање антиоксидативне активности мерењем нивоа инхибиције липидне пероксидације

Антиоксидативна активност на нивоу инхибиције липидне пероксидације одређена је тиоцијанатном методом по *Hsu et al (2008)* [236].

Поступак рада:

Припремљена емулзија линолеинске киселине (0,2804 g линолеинске киселине, 0,2804 g Tween-20 као емулгатора и запремина од 50 ml 40 mM фосфатног пуфера) се меша док смеша не постане хомогена. Пред крај мешањасе дода 5 ml 40 mM фосфатног пуфера да би подесили рН =7,0. Након тога, раствор се остави у мраку 72 сата на температури од 37 °C. Потом се измери 0,1 ml аликвота реакционог раствора и помеша са 4,7 ml етанола, 0,1 ml FeCl₂ и 0,1 ml амонијум-тиоцијаната. Затим се измери апсорбанца смеше на таласној дужини од 500 nm. Као стандард је коришћена аскорбинска киселина, гална киселина, α-токоферол и β-хидрокситолуол. Како бисмо елиминисали ефекат или утицај растварача коришћен је контролни узорак, који садржи исту количину растварача додат у емулзију линолне киселине у тест узорка и референтног једињења. Резултат је дат као средња вредност три узастопна мерења за сваки узорак. Процент инхибиције пероксидације линолеинске киселине је израчунат коришћењем следеће формуле:

$$[\% \text{ инхибиције}] = \frac{A_k - A_u}{A_k} \times 100$$

где је:

A_k = апсорбанца контроле

A_u = апсорбанца узорка.

IC₅₀ вредност је добијена коришћем софтвера за анализу података Origine 8.

5.6.1.3. Одређивање антиоксидативне активности мерењем нивоа хидроксил радикала

Одређивање антиоксидативне активности на нивоу хидроксил радикала екстракта испитиваних биљних врста рађен је по методи *Hinenburget al* (2006) [237].

Поступак рада:

Реакционој смеси која садржи 100 μ l екстракта раствореног у води додато је 500 μ l 5,6 mM 2-деокси-D-рибозе у KH_2PO_4 -NaOH пуферу (50 mM, pH= 7,4), 200 μ l смеше (100 μ l FeCl_3 и 100 μ l EDTA у односу 1 : 1 v/v раствора), 100 μ l 1,0 mM H_2O_2 и 100 μ l 1,0 mM воденог раствора аскорбинске киселине. Епрувете су потом вортексоване и на температури од 50 $^\circ\text{C}$ остављене да одстоје 30 минута. Након инкубације у сваку епрувету је додато 1 ml 2,8% TCA и 1 ml 1.0% TBA. Узорци су центрифугирани и загревани у воденом купатилу на 50 $^\circ\text{C}$ у трајању од 30 минута. Као стандард је коришћена аскорбинска киселина и β -хидрокситолуол. Затим је вршено мерење апсорбанце на таласној дужини од 532 nm, на основу чега је и извршена процена степена оксидације 2-деоксирибозе. Вредности инхибиције су изражене у процентима из апсорпције контролног и испитиваног узорка, с тим што контролни узорак садржи све реакционе реагенсе осим екстракта-узорка. Резултат је дат као средња вредност три узастопна мерења за сваки узорак. Процент инхибиције на нивоу хидроксил радикала израчунат је коришћењем следећег обрасца:

$$[\% \text{ инхибиције}] = \frac{A_k - A_u}{A_k} \times 100$$

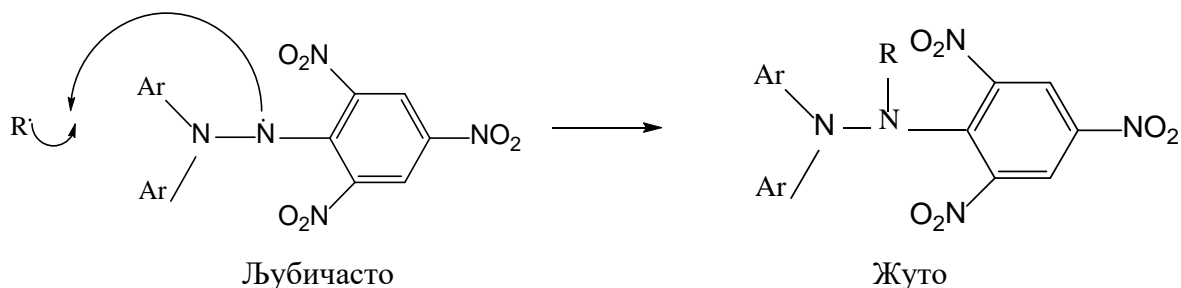
где је:

A_k = апсорбанца контроле

A_u = апсорбанца узорка.

5.6.1.4. Одређивање антиоксидативне активности на нивоу DPPH радикала

DPPH тест се сматра валидном, тачном, лаким и економичном методом за процену активности уклањања радикала антиоксиданаса, јер је једињење радикала стабилно и не мора се генерисати [238]. Тест се заснива на мерењу капацитета уклањања антиоксиданата помоћу α, α -дифенил- β -пикрилхидразил (DPPH) радикала. Неспарени електрон атома азота у DPPH редукује се примањем атома водоника из антиоксиданата у одговарајући хидразин [239]. Активност се манифестује променом боје од љубичасте до жуте (слика 26), која се прати спектрофотометријски.



Слика 26. Реакција антиоксиданта са 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикалом

Пошто се врши промена боје то нам омогућава да се реакција и визуелно прати (љубичаста боја→жуту боју). Колики ће бити степен обезбојења, зависи од редукционе способности и присутних електрона. Што је она већа, већи је и степен обезбојавања. Одређивање антиоксидативне активности на нивоу DPPH радикала испитано је по методи *Takaoet al* уз малу модификацију [240, 241].

Поступак рада:

DPPH (8 mg) се раствори у 100 ml етанола да концентрација износи 80 µg/ml. Полазећи од основног раствора екстракта (1mg/ml) припремљена је серија стандарних раствора. По 2 ml сваког раствора се затим помеша са DPPH (2 ml) и остави да одстоји 30 минута. Након тога, апсорбанција је мерена на 517nm. Аскорбинска киселина (AA), гална киселина (GA) и β-хидрокситолуол (ВНТ) су коришћени као референтни стандарди. Контролни узорак је припремљен тако да садржи исту запремину без тест једињења или референтних антиоксиданаса. Етанол је коришћен као слапа проба. Резултат је дат као средња вредност три узастопна мерења за сваки узорак. Процент неутрализације DPPH је израчунат помоћу следеће формуле:

$$[\% \text{ неутрализације}] = \frac{A_k - A_u}{A_k} \times 100$$

A_k = апсорбанца контроле

A_u = апсорбанца узорка.

IC₅₀ вредност је дефинисана као концентрација узорка који се испитује, а која доводи до неутрализације 50% DPPH радикала. IC₅₀ вредност се изражава у µg/ml екстракта.

5.6.2. Одређивање антибактеријске активности

5.6.2.1. Микроорганизми коришћени у раду

За одређивање антибактеријске активности испитиваних екстраката користили смо 15 сојева различитих бактерија. Коришћено је 8 сојева Грам-позитивних бактерија (*Staphylococcus saprophiticus* ATCC 15035, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Enterococcus faecalis* ATCC 2912, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, *Enterococcus faecium* ATCC 6057) и 7 сојева Грам-негативних бактерија (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Enterobacter aerogenus* ATCC 13048, *Citrobacter freundii* ATCC 43864, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 36659). Стандардни сојеви бактерија (ATCC) потичу из микробиолошке лабораторије Хигијенског завода у Чачку. Први корак у одређивању антибактеријске активности је засејавање културе бактерија, а након тога и њихово пресејавање.

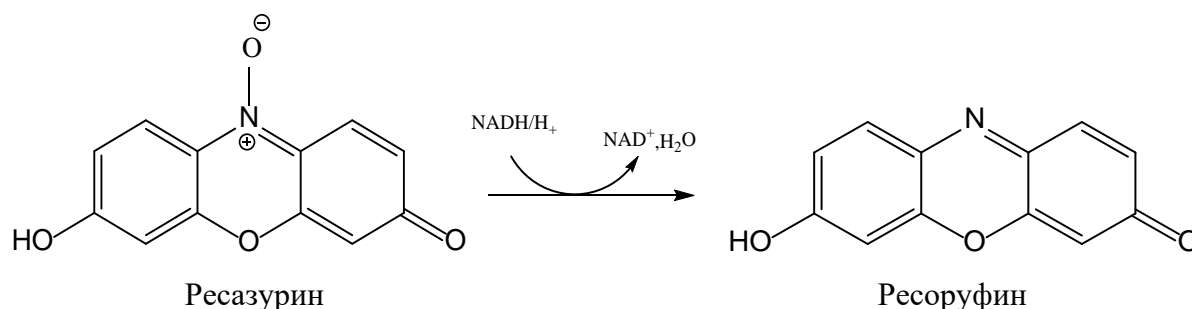
5.6.2.2. Припремање суспензије бактеријских ћелија

У епрувете се сипа хранљива подлога у виду косе подлоге и засеју испитиване бактерије. Након развића бактерија додата јестерилна дестилована вода и трењем епрувете кроз руку добија се раствор суспензије спора. Потом се мери апсорбанца

суспензије спора. Спектрофотометријски се мери оптичка густина на 550 nm, при чему се врши додавање стерилисане дестиловане воде или нативног раствора микроорганизама у циљу добијања $A_{550\text{ nm}} = 0,045$. Опсег измерених апсорбанци се кретао у вредностима апсорбанце од $A = 0,045$ до $A = 0,04$. Опсег се подешава додавањем стерилне дестиловане воде. Густина суспензије спора јебила $5,6 \times 10^6$ CFU/ml. Припремљена суспензија спора чува се у фрижидеру до извођења експеримента.

5.6.2.3. Одређивање антибактеријске активности испитиваних екстраката биљака микродилуционом методом у *in vitro* условима

Антибактеријску активност испитиваних екстраката смо одређивали мерењем Минималне Инхибиторне Концентрације (МИЦ). МИЦ (*Minimum Inhibitory Concentration*- MIC) представља минималну концентрацију једињења која је у стању да инхибира раст и развој микроорганизама. За експеримент су коришћене микротитар плоче са 96 конусних удубљења. Као индикатор користи се ресазурин, оксидо-редукциони индикатор. Принцип одређивања се заснива на реакцији редуковања ресазурина до једињења ресорурфин. Реакција је бојена, почетни индикатор ресазурин мења боју (слика 27). Ова модификована метода ресазурина је једноставна, осетљива, брза и поуздана [245]. Ензими под чијим дејством се реакција одвија потичу из класе оксидоредуктаза, NADH и NADPH дехидрогеназе. Минимална инхибиторна концентрација је концентрација последње јаме у експерименту у којој није дошло до промене боје индикатора.



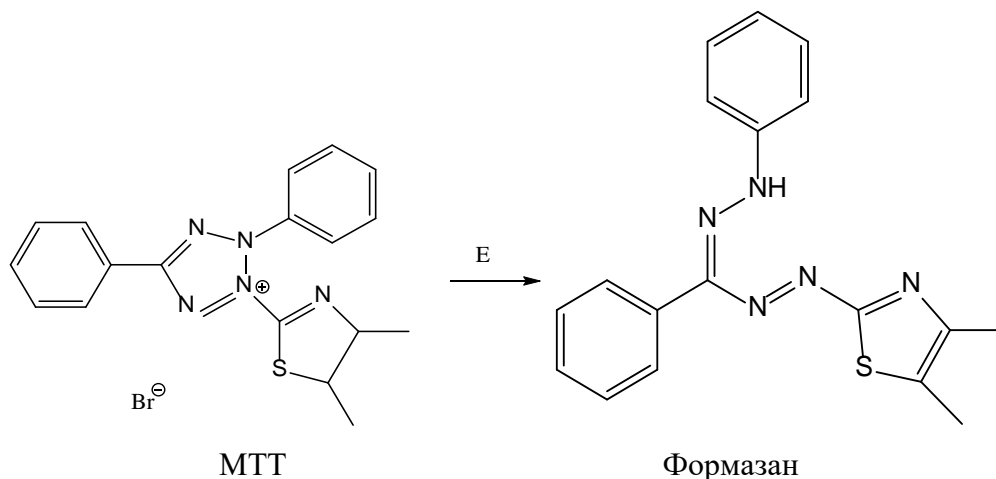
Слика 27. Реакција редуције ресазурина до ресорурфина

Поступак рада:

У микротитар плочу се сипа 50 μl Милер-Хинтонове подлоге (Müller-Hinton) и 50 μl екстракта. Затим се из прве узима 50 μL смеше и пребаци се у другу, из друге 50 μl у трећу и тако се направи серија разблажења. Потом се у свако удубљење додаје по 10 μl ресазурина. Ресазурин је припремљен растварањем таблете од 270 mg у запремини од 40 ml стерилне дестиловане воде. Након додавања ресазурина додали смо затим по 20 μl суспензије спора бактерија. Затим у сваку додајемо још по 20 μl подлоге. Оставити у термостату на 30 °C да стоји временском трајању од 24 часа. Као стандард користили смо антибиотик Амрацин ради контролисања осетљивости тестираних бактеријских сојева. Након 24 часа проверавамо плоче и пратимо промену боје. Уколико је промењена боја индикатора из љубичасте у розе или у безбојну у том случају бележимо је као позитивну. Затим тражимо прво удубљење полазећи од концентрованијег у коме се боја индикатора није променила и ту концентрацију узимамо као минималну инхибиторну концентрацију (МИЦ). Испитивања су вршена у три понављања а добијена вредност узета је као МИЦ за тестирани узорак и стандард [246].

5.6.3. Одређивање цитотоксичне активности испитиваних екстраката биљака МТТ тестом у *in vitro* условима

Цитотоксична активност је одређивана према методи Mosman *et al.* [242]. Испитивања су вршена применивши МТТ тест који почива на способности разлагања тетразолијум соли МТТ од стране животно способних ћелија. МТТ је 3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолијум бромид [243,244]. Разлагање се врши дејством ензима митохондријалне сукцинат дехидрогеназе наведених ћелија при чему се као производ добија формазан који је плаво обојен (слика 28.)



Слика 28. Реакција редуковања МТТ-а ензимом митохондријална редуктаза (Е)

У овом испитивању су коришћене три врсте туморских ћелија:

- Hep2 (подлога: MEM Eagle / 5% FCS) хумана ћелијска линија - *human larynx carcinoma*
- RD (подлога: MEM Eagle / 10% FCS) - хумана ћелијска линија *rhabdomyosarcoma*
- L2OB (подлога: MEM Eagle / 10% FCS) - мишија туморска фибробластна линија.

Поступак рада:

Суспензија ћелија густине 10^4 се засеје у микротитар плоче са 96 отвора, а потом се оставе на температури 37 °C и 5% CO₂ у инкубатору 24 часа. Након истеклог времена медијум се замени са 100 μ l новог медијума коме се овог пута дода узорак (25-1000 μ g/ml) (концентрације различитих екстраката биљних врста). Контролним ћелијама се дода свеж медијум, али без екстракта. Након додавања, узорке смо оставили да одстоје 48 часа, а потом смо одређивали вијабилност ћелија. Тест се заснива на реакцији митохондријалног ензима дехидрогеназе живих ћелија у контакту са МТТ-ом. Након што је извршена инкубација ћелија са екстрактима дода се МТТ тако да његова концентрација износи 5 mg/ml PBS. МТТ је додаван у сваки бунарић, а плочу смо инкубирали у временском интервалу од 2 до 4 h на температури од 37 °C. Притом је створено обојено једињење-формазан у облику кристала, које смо растворили у запремини V=150 μ l растварача. Као растварач смо користили DMSO. Након тога смо приступили мерењу апсорбанце на таласној дужини од 570 nm. Односом апсорбанци третираних и контролних ћелија и множењем са 100 добија се проценат вијабилних ћелија. Резултат је дат као средња вредност три узастопна мерења за сваки узорак.

5.6.4. Одређивање опште токсичности и генотоксичности

Анализа свих узорака извршена је применом Fiskesj-ovog поступка модификованог од стране Ranka и Nielsena (1993), познатог под називом *Allium* анафазно-телофазни тест генотоксичности. Као микроскопски параметар генотоксичности екстракта праћене су анафазне и телофазне промене хромозома. За прављење микроскопских препарата коришћени су вршни меристемски делови корена, који су подвргнути хидролизи са 1М НСl на температури од 60°C у трајању од 12 минута у воденом купатилу. На овај начин се врши омекшавање меристемског ткива корена да би се лакше одвојио од остатка корена. Затим се врши бојење 2 % орцеином. Након тога се на предметно стакло ставља по 5 коренчића, скалпелом се одсеца вршни део корена и наноси кап боје. На крају се препарат прекрива покровним стаклом и фиксира на пламену, па се затим врши сквошовање. Циљ сквошовања је да се спречи заостајање ваздуха и да се материјал распореди у једном слоју. Са сваког микроскопског препарата прегледано је приближно 100 ћелија у анафази/телофази, односно око 600 ћелија по серији (узорку), и детектоване су и пребројане промене у генетичком материјалу. Као тест организам коришћен је лук (*Allium cepa*), масе између 2-4 грама који је претходно био ускладиштен у одговарајућим условима. Претходно одабран лук припремљен је за тест тако што му је уклоњен суви спољашњи омотач. Постављене су серије од по 12 фалкона у које је сипано по 25 ml узорка. Направљена је серија двоструких разблажења узорка. За сваки узорак и две контроле употребљено је по дванаест луковица *Allium cepa*. Луковице су стављане 24 часа у воду стандардног квалитета да исклијају а затим у тест узорке у условима мрака на температури од 25°C. Третман је трајао 48 часова уз замену узорка свака 24 часа. Као позитивна контрола коришћен је метил метан сулфонат – MMS (Sigma M-4016) у концентрацији од 10 µg/l. Негативна контрола је била вода стандардног квалитета. Као контрола растварача употребљен је 0,25% етанол. Ради утврђивања генералне токсичности у свакој групи мерена је дужина коренчића код 10 луковица. Анализиране су следеће аберације: мостови, фрагменти, заостали хромозоми, мултиполарност и ц-митозе.

5.7. Статистичка обрада података

Статистичке анализе су су вршене користећи статистички програм за обраду података Statistica 6.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, US). Сва испитивања су извођена у три понављања, за сваку анализу. Резултати су приказани као средње вредности наведеног броја понављања ± стандардна девијација (SD). Разлике између контролних и експерименталних група дефинисане су на нивоу значајности 0.05 ($p < 0.05$).

6. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

6.1. Принос екстраката биљних полифенола

За екстракцију биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S.hortensis* L. коришћено је пет техника екстракције. Од конвенционалних метода коришћене су технике:

- мацерација (МАЦ) и
- екстракција по Сокслету (СЕ),

а од савремених метода су коришћене следеће технике:

- ултразвучна екстракција (УАЕ),
- микроталасна екстракција (МАЕ) и
- субкритична екстракција са водом (СЦВ).

Поступак извођења сваке појединачне екстракције описан је у поглављу 4.3.

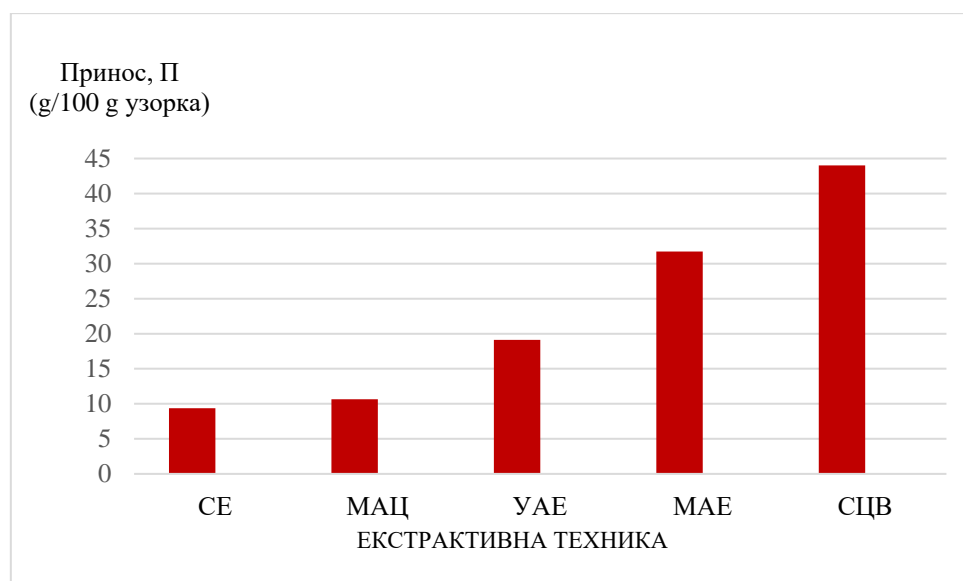
Резултати приноса екстракције биљне врсте *L. thuringiaca* L. су приказани у табели 9. и изражени су у грамама екстракта на 100 грама полазног узорка.

Табела 9. Принос екстракције биљне врсте *L. thuringiaca* L.

Екстрактивна техника	Време екстракције	П (g/100 g узорка)
СЕ	8 сати	9.38
МАЦ	56 сати	10.64
УАЕ	30 мин	19.12
МАЕ	30 мин	31.74
СЦВ	30 мин	44.01

* П-принос, СЕ - Сокслет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ – микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом.

За биљну врсту *L. thuringiaca* L. добијени резултати су се кретали од 9.38 g до 44.01 g сувог екстракта на 100 g сувог биљног материјала у зависности од примењене екстрактивне технике. На основу добијених резултата уочава се да су традиционалним техникама екстракције добијени значајно мањи приноси екстраката. Најнижи принос екстракта добијен је Сокслетовом екстракцијом 9,38 g/100g док јепоступком мацерације добијено 10.64 g/100g. Већи принос екстраката добијен је применом савремених техника екстракције, али се у зависности од врсте екстрактивне технике и он разликује. Техником ултразвучне екстракције добијено је 19.12 g/100g, поступком микроталасне екстракције нешто већи принос у количини од 31.74 g/100g, док је техником субкритичне екстракције са водом принос највећи и износи 44.01 g/100g. На основу резултата приметно је да је техника субкритичне екстракције водом у погледу приноса екстракције ефикаснија у односу на остале савремене методе, али и далеко супериорнија у односу и на примењене конвенционалне технике екстракције. Ово се јасно и лако може уочити на хистограму 1. На принос и количину екстракта (као и на састав) утичу различити фактори и то; полазни биљни материјал, коришћени растварач за екстракцију, начин или процедура саме технике екстракције и тип уређаја који се користи. Ови фактори одређују састав, количину екстракта који ће се добити и брзину којом ће се вршити екстракција [247].



Хистограм 1. Принос екстракције биљне врсте *Lavatera thuringiaca* L.

* СЕ - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом.

За биљну врсту *E. carnea* L. добијени резултати екстракције су приказани у табели 10 и принос је изражен у грамама на 100 грама полазног узорка.

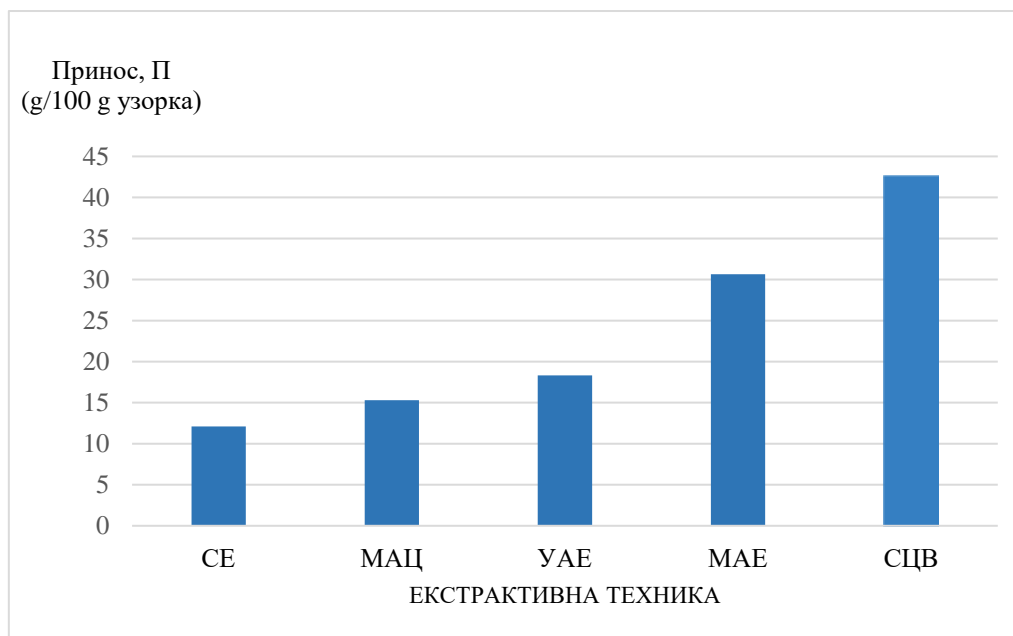
Табела 10. Принос екстракције биљне врсте *E. carnea* L.

Екстрактивна техника	Време екстракције	П (g/100 g узорка)
СЕ	8 сати	12.10
МАЦ	56 сати	15.30
УАЕ	30 мин	18.33
МАЕ	30 мин	30.65
СЦВ	30 мин	42.66

* П-принос, СЕ - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом.

Добијени принос за биљну врсту *E. carnea* L. се кретао од 12,10 g/100g до 42,66 g/100g сувог екстракта у зависности од примењене екстрактивне технике. На основу добијених резултата уочава се да су конвенционалним тј. традиционалним техникама екстракције добијају екстракти у значајно мањем приносу. Техником Соклетове екстракције добијен је принос 12,10 g/100 g сувог биљног материјала док је процесом мацерације добијен нешто већи принос (15,30 g/100 g). Посебно треба нагласити да је потребан дуг временски период и да је континуална екстракција боља јер се за много мањи временски период добија сличан принос. Већи принос екстракта добијен је савременим техникама екстракције, с тим што се у зависности од врсте примењене екстрактивне технике принос разликује. Техником ултразвучне екстракције добијено је 18,33 g/100g екстракта, поступком микроталасне екстракције нешто већи принос у количини која износи 30,65 g/100g, док је техником субкритичне екстракције са водом принос добијен у највећем износу 42,66 g/100g. Посебно треба нагласити да је време екстракције веома кратко а да су приноси већи. На основу ових резултата приметно је да је техника

субкритичне екстракције водом у погледу приноса екстракције супериорнија и ефикаснија у односу на остале савремене методе, али и далеко ефикаснија у односу на примењене конвенционалне технике екстракције. Ово се јасно може уочити на хистограму 2. Такође, резултати истраживања других аутора говоре да техника субкритичне екстракције са водом даје највеће приносе екстраката [248].



Хистограм 2. Принос екстракције биљне врсте *E. carnea* L.

* СЕ - Сокслет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом

За биљну врсту *S. hortensis* L. добијени резултати екстракције су приказани у табели 11 и принос је изражен у грамима на 100 грама полазног узорка.

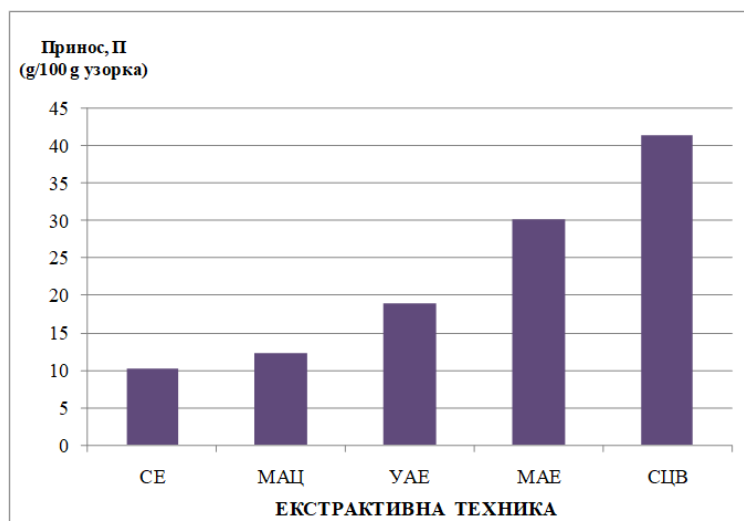
Табела 1. Принос екстракције биљне врсте *S. hortensis* L.

Екстрактивна техника	Време екстракције	П (g/100 g узорка)
СЕ	8 сати	10,24
МАЦ	56 сати	12,31
УАЕ	30 мин	19,01
МАЕ	30 мин	30,26
СЦВ	30 мин	41,45

П-принос, СЕ - Сокслет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом.

Добијени принос за биљну врсту *E. carnea* L. се кретао од 10,24 g/100g до 41,45 g/100g сувог екстракта у зависности од примењене екстрактивне технике. На основу добијених резултата уочава се да су конвенционалним тј. традиционалним техникама екстракције добијају екстракти у значајно мањем приносу. Техником Сокслетове екстракције добијен је принос 10,24 g/100 g сувог биљног материјала док је процесом

мацерације добијен нешто већи принос (12,31 g/100 g). Већи принос екстраката добијен је савременим техникама екстракције, с тим што се у зависности од врсте примењене екстрактивне технике принос разликује. Техником ултразвучне екстракције добијено је 19,01 g/100g екстракта, поступком микроталасне екстракције нешто већи принос у количини која износи 30,26 g/100g, док је техником субкритичне екстракције са водом принос добијен у највећем износу 41,45 g/100g. На основу ових резултата приметно је да је техника субкритичне екстракције водом у погледу приноса екстракције супериорнија и ефикаснија у односу на остале савремене методе, али и далеко ефикаснија у односу на примењене конвенционалне технике екстракције. Ово се јасно може уочити на хистограму 3.



Хистограм 1. Принос екстракције биљне врсте *S. hortensis* L.

СЕ - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом

Анализом резултата који су добијени свим екстрактивним техникама, видимо да је разлика знатна. Наиме, уочава се да је субкритичном екстракцијом водом принос екстраката за око 60% виши у односу на принос екстракта који је добијен поступком мацерације, а за чак 70% виши од приноса екстракта који се добија Соклетовом екстракцијом. Такође, савременим техникама екстракције се добијају знатно већи приноси екстраката за обе биљне врсте. Објашњење налазимо у следећем: за већи принос при ултразвучној екстракцији у односу на мацерацију и екстракцију по Соклету, услед деловања ултразвука, повећава се и додирна површина супстанце, а самим тим ће пренос масе бити већи па и принос реакције [249]. Од свих испитиваних техника, техника субкритичне екстракцијом са водом се посебно истиче као ефикасна и веома успешнија у погледу добијања приноса екстраката како за биљну врсту *L. thuringiaca* L. тако и за *Erica carnea* L. и *S. hortensis* L.

У последњој деценији субкритична екстракција водом је стекла велико интересовање истраживача као успешна зелена метода за екстракцију једињења, посебно полифенолних једињења и есенцијалних уља из различитих материјала [250,251].

Анализом и евалуацијом резултата закључујемо да принос екстракције зависи од примењене технике екстракције као и од биљне врсте. Коришћени растварач (са променљивим поларитетом), рН вредност, температура, време екстракције и састав узорка су фактори који утичу на принос екстраката као и сама техника екстракције.

Поређењем приноса екстраката и компаративном анализом резултата који су добијени свим екстрактивним техникама, видимо да је разлика знатна. Наиме, савременом техником субкритичном екстракцијом са водом (принос износи код *Lavatera thuringiaca* L. 44.01 и 42.66 g *Erica carnea* L. са једне стране и конвенционалном Сокслетовом екстракцијом (принос од 9.38 g *Lavatera thuringiaca* L. и 12.10 g *Erica carnea* L. екстракта) са друге, принос екстракта добијеног субкритичном екстракцијом са водом за око 60% је виши у односу на принос екстракта који је добијен поступком мацерације, а за чак 70% виши од приноса екстракта који се добија Сокслетовом екстракцијом и ту је разлика између конвенционалних и савремених метода у пољеду добијања приноса најбоље уочљива. Такође се савременим техникама добијају знатно већи приноси екстраката обе биљне врсте. Објашњење налазимо у следећем: за већи принос при ултразвучној екстракцији у односу на мацерацију у екстракцију у Сокслету, услед деловања ултразвука, повећава се и додирна површина супстанце, а самим тим ће пренос масе бити већи па и принос реакције [249]. Од свих техника, техника субкритичне екстракцијом са водом се посебно истиче као нарасе ефикасна и то веома успешнија од свих примењених метода екстракције у раду (посебице конвенционалних) за добијање већег приноса екстраката биљних врста *Lavatera thuringiaca* L. и *Erica carnea* L.

У последњој деценији субкритична вода је стекла велико интересовање истраживача као успешна зелена метода за екстракцију једињења, посебно фенолних једињења и есенцијалних уља из различитих материјала [250,251].

Компаративном анализом и евалуацијом резултата закључујемо да принос екстракције зависи од примењене технике екстракције. Коришћени растварач (са променљивим поларитетом), рН вредност, температура, време екстракције и састав узорка су фактори који утичу на принос екстраката, а и сама техника екстракције.

6.2. Количина полифенолних једињења у екстрактима биљака *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L

Након добијања екстраката испитиваних биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. техникама екстракције које су описане у поглављу 4.3. у наредној фази рада испитиван је укупан садржај фенолних једињења, садржај флавоноида, кондензованих танина, галотанина и укупан садржај антоцијана (табела 12., хистограм 4.).

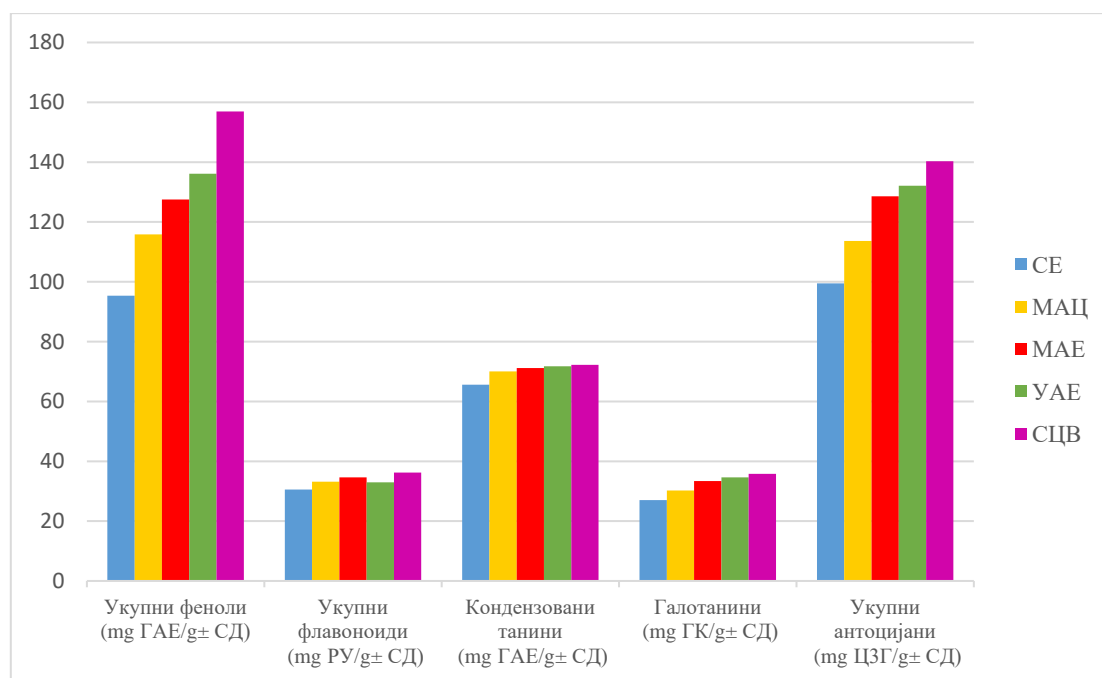
Табела 12. Садржај укупних фенолних једињења и одређених класа фенолних једињења у екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L.

Екстракти	Укупни феноли (mg GAE/g± SD)	Укупни флавоноиди (mg RU/g± SD)	Кондензовани танини (mgGAE/g± SD)	Галотанини (mgGAE/g±SD)	Укупни антоцијани (mg C ₃ G/g± SD)
СЕ	95.36±0.81	30.56±0.38	65.61±0.44	27.02±0.47	99.45±0.47
МАЦ	115.84±0.06	33.16±0.45	70.06±0.37	30.23±0.94	113.67±0.23
МАЕ	127.52±0.57	34.65±0.13	71.15±0.54	33.42±0.12	128.56±0.12
УАЕ	136.12± 0.79	32.94± 0.67	71.78±0.19	34.65± 0,67	132.12± 0,56
СЦВ	156.92±0.23	36.24±0.78	72.23± 0.81	35.78±0.34	140.32± 0.78

* СЕ - Сокслет екстракција, МАЦ –мацерација, МАЕ - микроталасна екстракција, УАЕ - ултразвучна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом

Резултати спектрофотометријског одређивања укупних фенола биљне врсте *L. thuringiaca* L. методом по Folin-Ciocalteu-у су добијени на основу једначине калибрационе криве галне киселине и изражени у милиграмима еквивалента галне киселине по граму суве масе (mg GAE/g \pm SD). Екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције водом садржи највећу количину укупних фенола. Нешто нижа количина фенолних једињења добијена је у екстракту који је добијен техником ултразвучне екстракције, док је техником микроталасне екстракције добијен најнижи садржај укупних фенолних једињења од свих савремених техника екстракција. Код конвенционалних метода резултати у погледу количине укупних фенолних једињења су доста нижи. Садржај укупних фенолних једињења је нешто виши код екстракта који је добијен конвенционалним поступком мацерације у односу на екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом. Уколико упоредимо садржај укупних фенолних једињења у екстрактима добијеним савременим методама екстракције (МАЕ-микроталасна екстракција, УАЕ- ултразвучна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом) и конвенционалним методама екстракције (СЕ - Сокслет екстракција, МАЦ –мацерација) уочавамо видну разлику у корист савремених техника екстракције. Од примењених савремених техника предњачи субкритична екстракција водом. Овом техником се добија за око 26% више укупних фенолних једињења у односу на екстракт који је добијен конвенционалним поступком мацерације и око 39% виши садржај у односу на конвенционалну Сокслетову екстракцију. На основу добијених резултата може се закључити да су у циљу добијања екстракта са већим садржајем укупних фенолних једињења из биљне врсте *L. thuringiaca* L. савремене технике екстракције далеко ефикасније и супериорније у односу на конвенционалне технике. Истраживања других аутора указују да је субкритична екстракција водом обећавајућа техника за успешно изоловање полифенолних једињења из различитих биљних матрица у односу на класичне методе екстракције [252, 253, 254, 255, 256]. Истраживања биљне врсте *L. thuringiaca* L. у погледу хемијског састава су веома оскудна и нема литературних података на основу којих би могли извршити поређење.

Поред садржаја укупних фенолних једињења, у табели 11. и на хистограму 5. дати су и резултати одређивања садржаја флавоноида, кондензованих танина, галотанина и садржај укупних антоцијана у екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L. Концентрација укупних флавоноида у екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L. испитана је помоћу алуминијум хлорида, AlCl₃. Резултати су изражени у милиграмима еквивалентима рутина по граму сувог екстракта (mg RU/g). Веће концентрације флавоноида су заступљене у екстрактима добијеним савременим методама екстракције (субкритичном екстракцијом са водом и мацерацијом) у односу на екстракте добијене конвенционалним методама. Најмањи садржај флавоноида одређен је у екстракту добијеном Сокслетовом екстракцијом. Од савремених метода екстракција, најмања концентрација флавоноида добијена је техником ултразвучне екстракције, нешто већи садржај добијен је микроталасном екстракцијом док је највећи садржај флавоноида добијен поступком субкритичне екстракције водом.



Хистограм 4. Садржај укупних фенолних једињења и одређених класа фенолних једињења у екстрактима биљне врсте *Lavatera thuringiaca L.*

* СЕ - Сокслет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, MAE - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом

Примећено је да се конвенционалном техником мацерације добија приближно исти садржај флавоноида као и савременом техником ултразвучне екстракције. Предпостављамо да је разлог време екстракције (време трајања ултразвучне екстракције је било 30 минута). Поредећи све примењене екстрактивне технике у раду, конвенционалне и савремене, примећујемо да се највећа количина флавоноида налази у екстракту који је добијен поступком субкритичне екстракције водом. Овом техником се из биљне врсте *L. thuringiaca L.* добија екстракт са највећом количином флавоноида у односу на све остале добијене екстракте. Испитујући разлике субкритичне екстракције са водом и осталих примењених техника екстракције у погледу садржаја флавоноида приметимо да се количина флавоноида разликује и то:

- применом конвенционалне технике мацерације је за 8% нижа количина флавоноида, а Сокслетовом екстракцијом 16% нижа количина флавоноида у односу на екстракт који је добијен субкритичном екстракцијом водом,
- применом савремене технике микроталасне екстракције добија се за 4% нижи садржај флавоноида, а техником ултразвучне екстракције 9% нижа количина флавоноида у односу на екстракт који је добијен субкритичном екстракцијом са водом.

Примећујемо да при условима у којима смо изводили субкритичну екстракцију водом у погледу добијања укупних флавоноида код екстраката биљне врсте *L. thuringiaca L.* је ова техника најефикаснија. Овај тренд нам показују и студије других аутора, где је техника субкритичне екстракције водом ефикасна техника екстракције флавоноида [257-259].

Одређиван је садржај кондензованих танина и галотанина у добијеним биљним екстрактима. Добијени резултати су приказани у табели 11. и на хистограму 5. Највећа количина кондензованих танина и галотанина присутна је у екстракту биљне врсте *L.*

thuringiaca L. који је добијен поступком субкритичне екстракције водом. Занемарљиво нижи резултати су добијени применом технике ултразвучне екстракције и микроталасне екстракције. Концентрације кондензованих танина и галотанина су нешто веће у екстрактима који су добијени савременим техникама екстракције у односу на екстракте добијене конвенционалним поступцима. Када количину кондензованих танина и галотанина у екстракту добијеном поступком субкритичне екстракције са водом упоредимо са екстрактима добијеним осталим техникама, процентуално, разлике су занемарљиво мале. Изузетак је екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом који садржи око 25 % нижу концентрацију кондензованих танина и галотанина од екстракта који је добијен субкритичном екстракцијом водом. Танини су делимично растворни у води и боље се растварају у алкохолним растварачима. На основу добијених резултата можемо извести закључак да су савремене методе (нарочито субкритична екстракција водом) ефикасније од конвенционалних метода екстракције у погледу добијања веће количине кондензованих танина у галотанина у екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L. и у погледу дужине трајања екстракције.

Резултати одређивања укупних антоцијана дати су у табели 11. и на хистограму 5. У екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L. нешто веће количине антоцијана су добијене користећи савремене екстрактивне технике у односу на екстракте добијене конвенционалним поступцима. Поступком субкритичне екстракције водом у количини од 140,32 mg C₃G/g је добијена највећа количина антоцијана, нешто нижа поступком ултразвучне екстракције 132,12 mgC₃G/g, а методом микроталасне екстракције незнатно нижа количина антоцијана која износи 128,56 mgC₃G/g. Доказане су ниже количине антоцијана у екстрактима који су добијени конвенционалним поступцима екстракције и то мацерацијом 113,67 mgC₃G/g, док је најмања количина добијена Сокслетовом екстракцијом у износу од 99,45 mgC₃G/g. Поређењем садржаја антоцијана у екстракту добијеном поступком субкритичне екстракције водом и екстрактима који су добијени другим техникама екстракције закључујемо да је садржај антоцијана у екстракту добијеном ултразвучном екстракцијом за 6% нижи, а у екстракту који је добијен поступком Сокслетове екстракције је за 30% нижи. Екстракт добијен поступком субкритичне екстракцијеса водом садржи највећу количину антоцијана 140,32 mgC₃G/g. И у овом случају се показало да су савремене методе ефикасније, од њих субкритична екстракција водом доминира над осталим методама у погледу добијања већег садржаја антоцијана у екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L и у погледу дужине трајања екстракције.

Досадашња истраживања наводе да би субкритична екстракција водом могла бити погодна екстрактивна техника за добијање веће количине проантоцијанидина из биљних узорака [260]. На основу резултата истраживања групе аутора [260], количина укупних антоцијана генерално опада уколико се температура екстракције повећава. Истраживања на овом пољу наводе да субкритична екстракција водом екстрахује највиши ниво укупних антоцијана у температурном опсегу од 100 до 110 °C. Вода екстрахује 70% антоцијана у поређењу са конвенционалним поступком екстракције са метанолом [260]. Температура на којој смо изводили субкритичну екстракцију са водом износила је 140 °C, али смо добили антоцијане у задовољавајућој количини. Ова метода је најефикаснија у односу на остале примењене екстрактивне технике те се овом екстрактивном техником добијају екстракти биљке *L. thuringiaca* L. са највећим садржајем фенола, флавоноида, кондензованих танина, галотанина као и антоцијана и у односу на остале примењене екстракције у овој докторској дисертацији. Овим је показано да нешто виша температура у односу на температуре за које је утврђено да су оптималне за постизање добрих приноса, доноси такође добре резултате у погледу већих

приноса антоцијана у екстрактима биљака. Такође је потврђено да субкритична екстракција са водом даје исти или бољи резултат од екстракције етанолом [261]. Богат састав биљних екстраката даје могућност потенцијалне примене истих као нутрацеутика [44-52].

Резултати спектрофотометријског одређивања садржаја укупних фенола, флавоноида, кондензованих танина, галотанина као и укупан садржај антоцијана у екстрактима биљне врсте *E. carnea* L. су дати у табели 13. и на хистограму 5.

Табела 13. Садржај укупних фенолних једињења и одређених класа фенолних једињења у екстрактима биљне врсте *E. carnea* L.

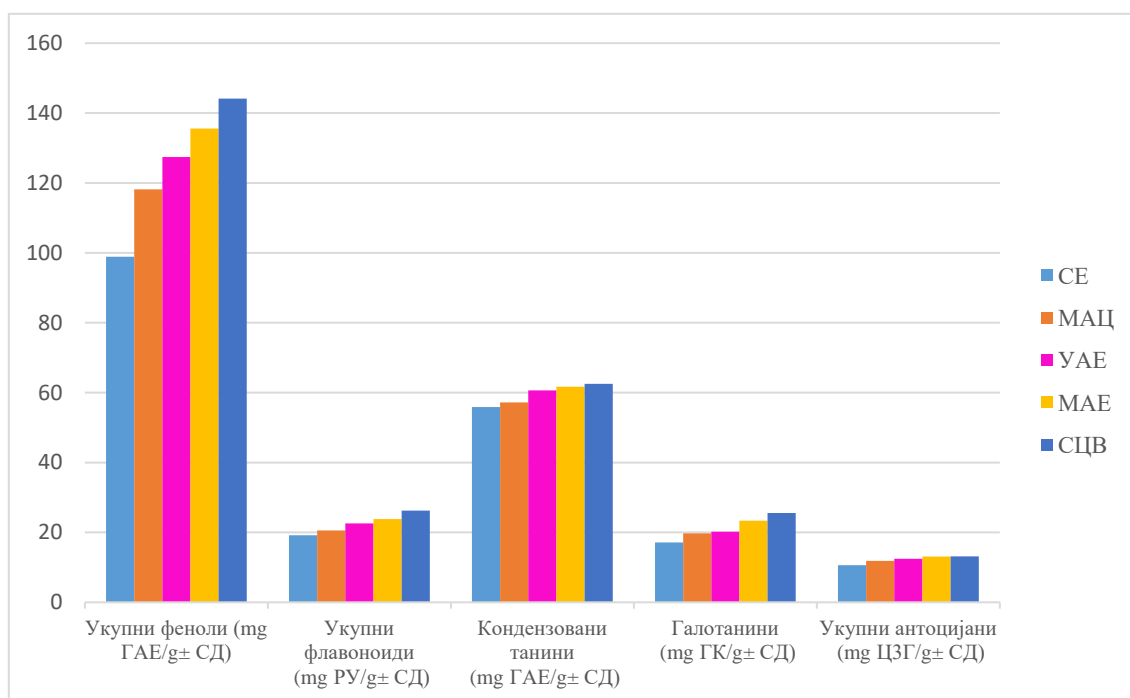
Екстракт	Укупни феноли (mg GAE/g± SD)	Укупни флавоноиди (mg RU/g± SD)	Кондензовани танини (mgGAE/g± SD)	Галотанини (mgGAE/g±SD)	Укупни антоцијани (mg C ₃ I/g± SD)
СЕ	98.86±0.49	19.18±0,37	55.85±0.44	17.13±0.94	10.60±0.40
МАЦ	118.14±0.26	20.57±0,58	57.19±0.37	19.74±0.96	11.86±0.73
УАЕ	127.42± 0.87	22.55± 0.17	60.65±0.54	20.19± 0.42	12.46± 0.19
МАЕ	135.56±0.19	23.81±0.60	61.70±0.19	23.36±0.77	13.07±0.54
СЦВ	144.12±0.23	26.24±0.18	62.53± 0.81	25.56±0.64	13.13± 0.28

* СЕ - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом

Садржај укупних фенола одређен је методом по Folin-Ciocalteu-у и добијени резултати су представљени на основу једначине калибрационе криве галне киселине и изражени у милиграмима еквивалента галне киселине по граму суве масе (mg GAE/g±SD). Екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције водом садржи највећу количину укупних фенола (144,12 mg GAE/g). Нешто нижа количина укупних фенола забележена је у екстракту који је добијен техником микроталасне екстракције, а екстракт који је добијен техником ултразвучне екстракције садржи најмању количину укупних фенола од свих испитиваних савремених техника екстракције. Уколико упоредимо количину укупних фенола екстраката добијених савременим методама екстракције са екстрактима који су добијени конвенционалним методама екстракције приметимо да је количина укупних фенола у екстракту који је добијен савременим поступком субкритичном екстракцијом водом за око 18% садржај виши у односу на екстракт добијен поступком мацерације (118,14 mg GAE/g), а за око 31% је виши у односу на количину у екстракту који је добијен конвенционалном Соклетовом екстракцијом (98,86 mg/g). Анализирањем резултата долазимо до закључка да су савремене технике екстракције ефикасније у односу на конвенционалне технике у циљу добијања већег садржаја укупних фенолних једињења екстраката биљне врсте *E. carnea* L. Од примењених савремених метода екстракције код ове биљне врсте поступак субкритичне екстракције водом у односу на остале технике је најјефикаснији у погледу добијања екстракта са највећом количином фенолних једињења. Око 30% већа количина фенолних једињења се добија овом техником у односу на остале примењене методе. На основу претходних истраживања познато је да је субкритична екстракција са водом обећавајућа техника за припрему и успешну изоловање фенолних једињења из различитих биљних матрица [262]. У поређењу са Соклет екстракцијом, субкритична екстракција са водом је процес који је погоднији за добијање укупних фенола из биљних врста [255]. Испитивањем биљне врсте *E. carnea* L. показано је да је субкритична

екстракција водом погоднији процес за добијање веће количине укупних фенола у односу на конвенционалну Сокслетову технику екстракције.

Количина укупних флавоноида у екстрактима ове биљке испитивана реакцијом са $AlCl_3$ и резултати су изражени у еквивалентима рутина по граму сувог екстракта (mg RU/g). Резултати добијени испитивањем биљне врсте *E. carnea* L. показују да су веће количине укупних флавоноида заступљене у екстрактима који су добијени савременим методама екстракције у односу на екстракте настале применом конвенционалних екстрактивних метода. Код савремених метода највећа количина укупних флавоноида се налази у екстракту добијеном поступком субкритичне екстракције водом (26,24 mg/g), док се нешто мања количина налази у екстрактима добијеним техником микроталасне екстракције (23,81 mg/g) и ултразвучне екстракције (22,55 mg/g). Најмање количине укупних флавоноида налазе се у екстрактима добијеним конвенционалним техникама. Поступком мацерације (20,57 mg RU/g) и поступком Сокслетове екстракције (19,18 mg RU/g) је добијен нижи садржај флавоноида. Резултати неких истраживања су показали да су приноси неких флавоноида попут мирицетина, кверцетина и кемпферола из биљака били максимални на температурама екстракције од 170 °C и 200 °C, и да зависе од броја хидроксилних група које се налазе у структури флавонола, са више оних који имају мање хидроксилних група које се иначе и екстрахују на вишим температурама. Приноси флавонола помоћу екстракције субкритичном водом били су већи и то за 2,0 до 22,7 и 1,8 до 23,6 пута виши од оних који су добијени употребом етанола и метанола при традиционалним методама екстракције [263]. Субкритичном екстракцијом водом и савременим методама екстракције је у нашем истраживању изолована већа количина флавоноида за много краће време у односу на традиционалне методе екстракције.



Хистограм 5. Графички приказ садржаја укупних фенолних једињења и одређених класа фенолних једињења у екстрактима биљне врсте *E. carnea* L.

* СЕ - Сокслет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом.

Велика количина кондензованих танина и галотанина присутна је у екстрактима биљне врсте *E. carnea* L. који су добијени поступком субкритичне екстракције водом 62,23 mg ГАЕ/g екстракта кондензованих танина и 25,56 mg ГАЕ /g екстракта за галотанине. Задовољавајући резултати су постигнути применом и микроталасне и ултразвучне екстракције где је количина кондензованих танина и галотанина нешто нижа. Количине кондензованих танина и галотанина су нешто веће у екстрактима који су добијени савременим техникама екстракције у односу на екстракте добијене конвенционалним поступцима. Мацерацијом је добијено 57,19 mg/g кондензованих танина и 19,74 mg/g галотанина. Сокслетовом екстракцијом је добијено 55,85 mg/g кондензованих танина и 17,13 mg/g галотанина. Савремене методе ефикасније од конвенционалних метода екстракције у погледу добијања веће количине кондензованих танина и галотанина у екстрактима биљне врсте *E. carnea* L. и у погледу дужине трајања екстракције. Поређењем садржаја кондензованих танина и галотанина у екстракту добијеном поступком субкритичне екстракције са водом и екстрактима који су добијени другим техникама екстракције закључујемо да је садржај кондензованих танина у опсегу од 1% до 11% нижи од количина које се налазе у екстракту добијеном поступком субкритичне екстракције с водом а садржај галотанина је нижи од 9% до 33%. Највећа количина укупних антоцијана у екстрактима биљне врсте *E. carnea* L одређена је поступком субкритичне екстракције водом (13,13 mgC₃G/g). Нешто нижа концентрација антоцијана идентификована је поступком микроталасне екстракције (13,07 mg C₃G/g), потом методом ултразвучне екстракције (12,46 mg/g), док је најмањи садржај антоцијана добијен поступцима мацерације (11,86 mg/g) и Сокслетове екстракције (10,60 mg/g). Уколико упоредимо резултате количина укупних антоцијана у екстрактима, закључујемо да је поступком субкритичне екстракције водом добијено за око 19% више количине антоцијана од количине антоцијана добијених Сокслетовом екстракцијом. Садржај антоцијана у овој биљној врсти је далеко мањи него у осталим екстрактима испитиваних биљних врста. Посебно треба имати у виду да је време екстракције савременим методама веома кратко и износи у овом експерименту само 30 мин.

Резултати спектрофотометријског одређивања садржаја укупних фенола, флавоноида, кондензованих танина, галотанина као и укупан садржај антоцијана у екстрактима биљне врсте *S. hortensis* L.. су дати у табели 14. и на хистограму б.

Табела 14. Садржај укупних фенолних једињења, флавоноида, кондензованих танина, галотанина и укупан садржај антоцијана у екстрактима биљне врсте *S. hortensis* L.

Екстракт	Укупни феноли (mg GAE/g± SD)	Укупни флавоноиди (mg RU/g± SD)	Кондензовани танини (mgGAE/g± SD)	Галотанини (mgGAE/g±SD)	Укупни антоцијани (mg C ₃ G/g± SD)
СЕ	119,28 ± 0,50	5,23 ± 0,76	41,74 ± 0,23	12,32 ± 0,34	103,02 ± 0,14
МАЦ	125,34 ± 0,13	16,27 ± 0,34	47,20 ± 0,76	18,54 ± 0,65	115,21 ± 0,95
УАЕ	132,40 ± 0,65	19,68 ± 0,50	52,65 ± 0,30	21,87 ± 0,78	121,59 ± 0,48
МАЕ	147,21 ± 0,15	23,10 ± 0,18	64,43 ± 0,21	25,35 ± 0,59	135,32 ± 0,55
СЦВ	151,54 ± 0,85	28,42 ± 0,29	73,20 ± 0,74	31,50 ± 0,22	144,57 ± 0,38

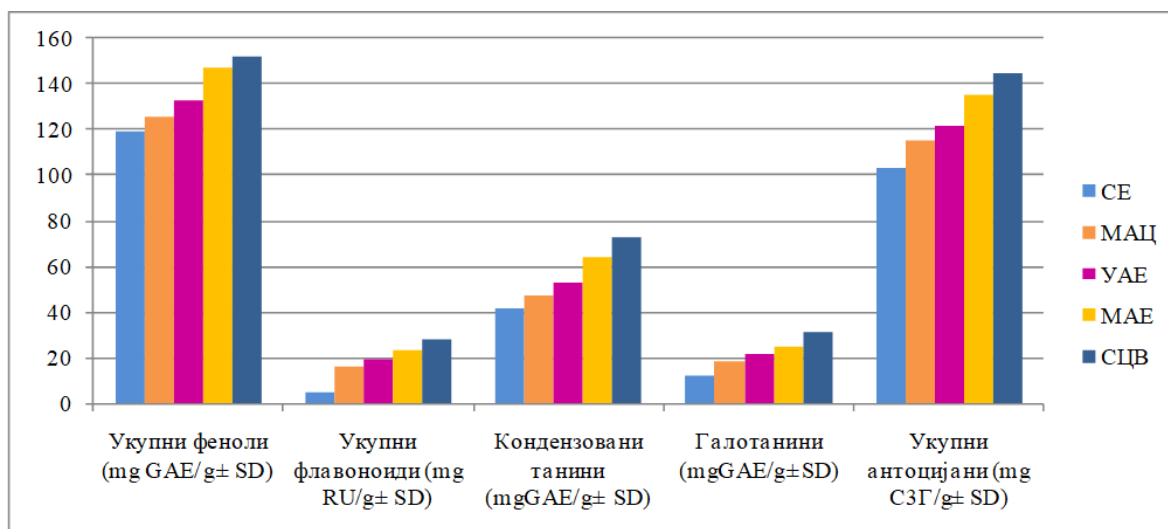
* СЕ - Сокслет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом

Садржај укупних фенола одређен је методом по Folin-Ciocalteu-у и добијени резултати су представљени на основу једначине калибрационе криве галне киселине и изражени у милиграмима еквивалента галне киселине по граму суве масе (mg GAE/g±SD). Екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције водом садржи

највећу количину укупних фенола (151,54 mg GAE/g). Нешто нижа количина укупних фенола забележена је у екстракту који је добијен техником микроталасне екстракције, а екстракт који је добијен техником ултразвучне екстракције садржи најмању количину укупних фенола од свих испитиваних савремених техника екстракције. Уколико упоредимо количину укупних фенола екстраката добијених савременим методама екстракције са екстрактима који су добијени конвенционалним методама екстракције приметимо да је количина укупних фенола у екстракту који је добијен савременим поступком субкритичном екстракцијом водом за око 17% садржај виши у односу на екстракт добијен поступком мацерације (125,34 mg GAE/g), а за око 22% је виши у односу на количину у екстракту који је добијен конвенционалном Сокслетовом екстракцијом (119,28 mg/g). Анализирањем резултата долазимо до закључка да су савремене технике екстракције ефикасније у односу на конвенционалне технике у циљу добијања већег садржаја укупних фенолних једињења екстраката биљне врсте *S. hortensis* L. Од примењених савремених метода екстракције код ове биљне врсте поступак субкритичне екстракције водом у односу на остале технике је најјефикаснији у погледу добијања екстраката са највећом количином фенолних једињења. Око 20% већа количина фенолних једињења се добија овом техником у односу на остале примењене методе. Количина укупних флавоноида у екстрактима ове биљке испитивана реакцијом са $AlCl_3$ и резултати су изражени у еквивалентима рутина по граму сувог екстраката (mg RU/g). Резултати добијени испитивањем биљне врсте *S. hortensis* L. показују да су веће количине укупних флавоноида заступљене у екстрактима који су добијени савременим методама екстракције у односу на екстракте настале применом конвенционалних екстрактивних метода. Код савремених метода највећа количина укупних флавоноида се налази у екстракту добијеном поступком субкритичне екстракције водом (28,42 mg/g), док се нешто мања количина налази у екстрактима добијеним техником микроталасне екстракције (23,10 mg/g) и ултразвучне екстракције (19,68 mg/g). Најмање количине укупних флавоноида налазе се у екстрактима добијеним конвенционалним техникама. Поступком мацерације (16,27 mg RU/g) и поступком Сокслетове екстракције (5,23 mg RU/g) је добијен нижи садржај флавоноида. Субкритичном екстракцијом водом и савременим методама екстракције је у нашем истраживању изолована већа количина флавоноида за много краће време у односу на традиционалне методе екстракције.

Највећа количина кондензованих танина и галотанина присутна је у екстрактима биљне врсте *S. hortensis* L. који су добијени поступком субкритичне екстракције водом 73,20 mg GAE/g екстраката кондензованих танина и 31,56 mg GAE /g екстраката за галотанине. Задовољавајући резултати су постигнути применом и микроталасне и ултразвучне екстракције где је количина кондензованих танина и галотанина нешто нижа. Количине кондензованих танина и галотанина су нешто веће у екстрактима који су добијени савременим техникама екстракције у односу на екстракте добијене конвенционалним поступцима. Мацерацијом је добијено 47,20 mg/g кондензованих танина и 18,54 mg/g галотанина. Сокслетовом екстракцијом је добијено 41,74 mg/g кондензованих танина и 12,72 mg/g галотанина. Савремене методе су ефикасније од конвенционалних метода екстракције у погледу добијања веће количине кондензованих танина и галотанина у екстрактима биљне врсте *S. hortensis* L. и у погледу дужине трајања екстракције. Највећа количина укупних антоцијана у екстрактима биљне врсте *S. hortensis* L. одређена је поступком субкритичне екстракције водом (144,57 mg C₃G/g). Нешто нижа концентрација антоцијана идентификована је поступком микроталасне екстракције (135,32 mg C₃G/g), потом методом ултразвучне екстракције (121,59 mg/g), док је најмањи садржај антоцијана добијен поступцима мацерације (115,21 mg/g) и Сокслетове екстракције (103,02 mg/g). Уколико упоредимо резултате количина укупних антоцијана у екстрактима, закључујемо да је поступком субкритичне екстракције водом

добијено за око 20% више количине антоцијана од количине антоцијана добијених Сокслетовом екстракцијом. Посебно треба имати у виду да је време екстракције савременим методама веома кратко и износи у овом експерименту само 30 мин.



Хистограм 2. Садржај укупних фенолних једињења, флавоноида, кондензованих танина, галотанина и укупан садржај антоцијана у екстрактима биљне врсте *S. hortensis* L.

* CE - Сокслет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом.

Анализом резултата добијених количина укупних фенолних једињења у екстрактима биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. примећујемо да савремене технике предњаче над конвенционалним у погледу количине укупних фенола, флавоноида, кондензованих танина, галотанина и укупних антоцијана. За све класе одређиваних једињења запажен је исти тренд. Поступком субкритичне екстракције водом добија се највећа количина како укупних фенола, тако и осталих класа одређиваних једињења. Применом традиционалних техника, мацерацијом и Сокслетовом екстракцијом добијају се доста нижи садржаји испитиваних једињења од горе поменутих примењених савремених екстрактивних техника. Субкритична екстракција водом у односу на остале примењене екстрактивне технике у раду је неоспорно најефикаснија за добијање веће количине укупних фенола, укупних флавоноида, кондензованих танина, галотанина и укупних антоцијана у екстрактима биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. Посебно треба имати у виду да је време екстракције савременим методама много краће од времена екстракције традиционалним методама. Разлике у садржају појединих класа фенолних једињења у испитиваним биљкама је последица њихове припадности различитим биљним родовима и врстама, које су генетски предиспониране да синтетишу различите количине и врсте фенолних једињења.

6.3. HPLC анализа испитиваних екстраката биљака

Квантитативна идентификација полифенолних једињења присутних у различитим екстрактима биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. *S. hortensis* L. извршена је применом течне хроматографије високих перформанси уз ултраљубичасти детектор са низом диода HPLC-DAD. Идентификација полифенолних једињења у испитиваним узорцима извршена је поређењем ретенционих времена стандарда и узорака као и уз помоћ апсорпционих спектра и литературе. Резултати су израчунати на основу калибрационе криве добијених референтних стандарда. За сваки стандард је конструисана калибрациона крива, а на основу површине пикова израчуната је укупна количина полифенолних једињења. Садржај полифенолних једињења је изражен у микрограмима (μg) по граму (g) екстракта ($\mu\text{g}/\text{g}$).

У табели 15. дате су једначине калибрационе криве, регресиони коефицијент (R^2), распон ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), ретенционо време (RT/min), лимит детекције ($\text{LOD}/\mu\text{g}/\mu\text{l}$) и лимит квантификације ($\text{LOQ}/\mu\text{g}/\mu\text{l}$) за сваки стандард појединачно.

Табела 15. Једначине калибрационе криве стандарда и други аналитички параметри добијени применом HPLC-DAD анализе

Једињење	Калибрациона крива	(R^2)	RT* (min)	LOD** ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	LOQ*** ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Протокатехинска киселина	$y = 13,307.5x + 0.2$	0.9988	12.52	0.004	0.013
<i>p</i> -хидроксибензоевакиселина	$y = 9934.4x + 0.1$	0.9988	17.65	0.003	0.010
Кафена киселина	$y = 32,241.5x - 0.1$	1.0000	21.19	0.009	0.030
Ванилинска киселина	$y = 10,781.0x + 0.5$	0.9995	22.15	0.003	0.010
Хлоргенска киселина	$y = 10,491.8x - 0.5$	0.9998	22.25	0.035	0.116
Сирингинска киселина	$y = 11,253.6x + 0.5$	0.9999	23.88	0.011	0.037
<i>p</i> -кумаринска киселина	$y = 16,239.7x - 0.8$	0.9997	24.83	0.042	0.140
Ферулна киселина	$y = 24,683.7x - 0.7$	0.9998	27.35	0.029	0.097
Синапинска киселина	$y = 13,332.5x + 1.1$	0.9998	29.11	0.032	0.106
Рутин	$y = 4589.0x - 0.7$	0.9999	29.30	0.052	0.173
Лутеолин-Глу	$y = 13,132.5x + 1.0$	0.9998	31.22	0.032	0.106
Апигенин-Глу	$y = 4289.0x - 0.7$	0.9999	32.21	0.052	0.173
Рузмаринска киселина	$y = 5385.2x + 0.7$	0.9998	33.58	0.018	0.060
Кверцетин	$y = 10,336.2x + 0.3$	0.9996	36.50	0.033	0.110
Лутеолин	$y = 15,958.6x - 0.2$	0.9998	37.31	0.030	0.100
Нарингенин	$y = 14,797.5x + 1.0$	1.0000	37.85	0.055	0.183
Каемпферол	$y = 13,636.5x + 0.1$	0.9997	38.29	0.029	0.097
Апигенин	$y = 6229.8x + 1.2$	0.9996	40.10	0.045	0.150

* ретенционо време, ** лимит детекције, *** лимит квантификације

Протокатехинска киселина, *p*-хидроксибензоева киселина, кафена киселина, ванилинска киселина, хлорогенска киселина, сирингинска киселина, *p*-кумаринска киселина, ферулна киселина, синапинска киселина, рутин, лутеолин-гликозид, апигенин-гликозид, рузмаринска киселина, кверцетин, лутеолин, нарингенин, кемпферол, апигенин.

Раздвајање компонената је вршено из мацерата (МАЦ), екстрактима добијеним екстракцијом по Сокслету (СЕ), ултразвучним екстрактима (УАЕ), микроталасним екстрактима (МАЕ) и субкритичним екстрактима са водом (СЦВ) биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.

Редослед елуирања компоненти при описаним хроматографским условима је: 1- протокатехинска киселина, 2- *p*-хидроксибензоева киселина, 3- кафена киселина, 4- ванилинска киселина, 5- хлоргенска киселина, 6- сиригинска киселина, 7- *p*-кумаринска киселина, 8- ферулна киселина, 9- синапинска киселина, 10- рутин, 11- лутеолин-гликозид, 12- апигенин-гликозид, 13- рузмаринска киселина, 14- кверцетин, 15- лутеолин, 16- нарингенин, 17- кемпферол и 18- апигенин. Раздвајање ових компоненти је постигнуто за 45 min.

Квантитативном анализом састава полифенолних једињења екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L. (Табела 16.) утврдили смо присуство: *p*-хидроксибензоеве киселине, кафене киселине, ванилинске киселине, хлорогенске киселине, сиригинске киселине, *p*-кумаринске киселине, ферулне киселине, синапинске киселине, рутина, апигенин-гликозида, рузмаринске киселине, кверцетина, лутеолина, нарингенина, кемпферола и апигенина.

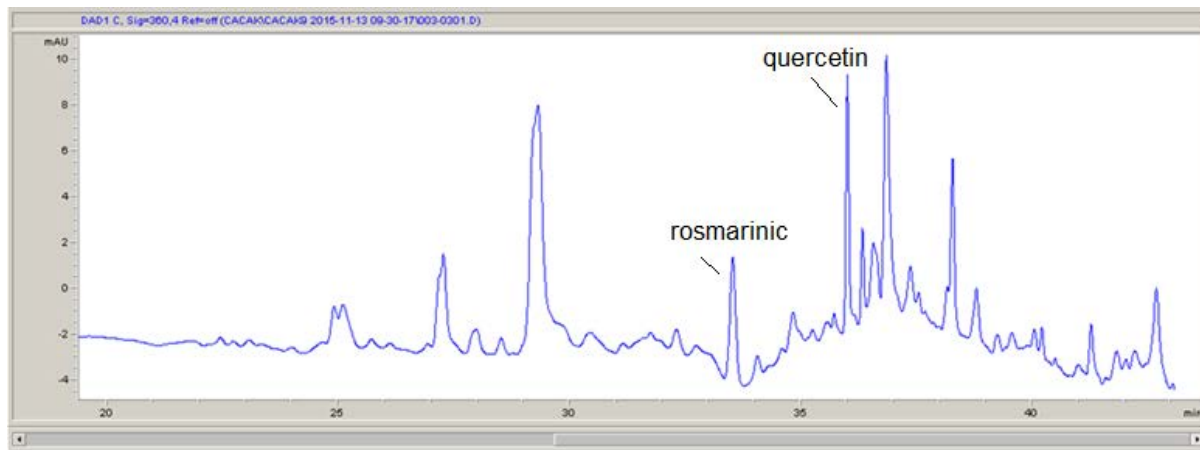
Табела 16. Садржај полифенолних једињења у екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L.

Једињење	Садржај (µg/g)				
	СЕ	МАЦ	УАЕ	МАЕ	СЦВ
Протокатехинска киселина	НД*	НД	НД	НД	НД
<i>p</i> -хидроксибензоева киселина	0.425	0.076	НД	0.228	0.043
Кафена киселина	0.207	НД	НД	0.017	НД
Ванилинска киселина	0.364	0.087	НД	0.067	НД
Хлоргенска киселина	1.190	НД	НД	0.071	НД
Сиригинска киселина	НД	НД	0.014	0.067	0.029
<i>p</i> -кумаринска киселина	0.489	НД	0.014	0.042	0.012
Ферулна киселина	0.071	0.046	0.018	0.026	0.012
Синапинска киселина	0.234	0.197	0.104	0.203	0.107
Рутин	1.107	1.802	0.567	1.555	0.397
Лутеолин-гликозид	НД	НД	НД	НД	НД
Апигенин-гликозид	0.805	НД	0.022	0.112	0.030
Рузмаринска киселина	9.955	0.146	0.020	0.113	0.071
Кверцетин	5.120	0.696	0.122	0.671	0.357
Лутеолин	1.338	0.049	0.033	0.032	0.039
Нарингенин	0.248	0.035	0.017	0.068	0.020
Кемпферол	1.539	0.091	0.020	0.091	0.031
Апигенин	1.742	0.074	0.016	0.184	0.063
Укупно (Σ)	24.834	3.299	0.967	3.547	1.209

*СЕ - Соклет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом.*НД - није детектовано

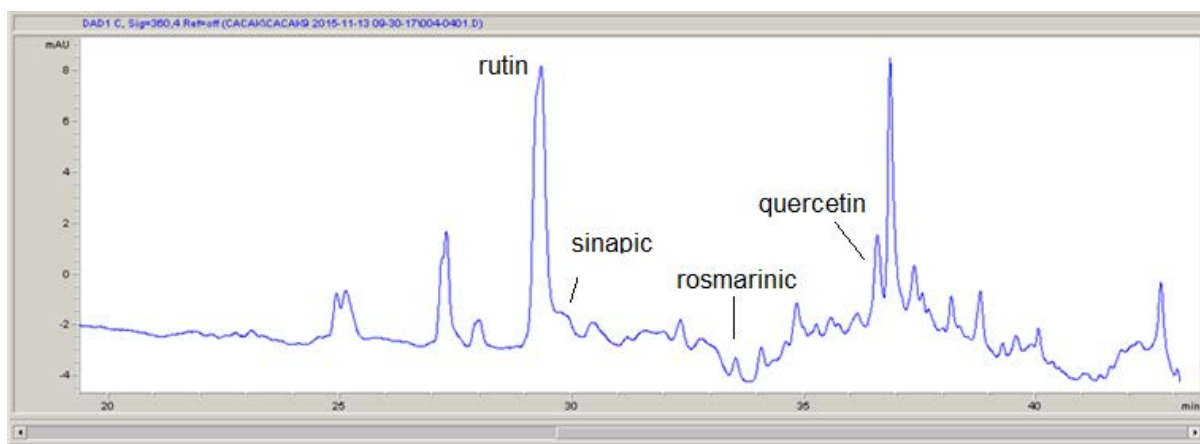
У соклетовом екстракту биљне врсте *L. thuringiaca* L. најдоминантнија компонента која је идентификована је рузмаринска киселина (9,955µg/g) као и кверцетин (5,120 µg/g). У нешто нижим концентрацијама квантификоване су и следеће компоненте; апигенин (1,742µg/g), кампферол (1,539 µg/g), лутеолин (1,338 µg/g), хлорогенска киселина (1,190 µg/g) и рутин (1,107 µg/g). Компоненте попут апигенин гликозида, *p*-хидроксибензоеве киселине, *p*-кумаринске киселине, ванилинске киселине,

нарингенина, синапинске киселине, кафене киселине и ферулне киселине су такође квантификоване у Сокслетовом екстракту биљне врсте *L. thuringiaca* L. али у нижим концентрацијама (табела 16). Концентрација рузмариинске киселине и кверцетина чине око 60% од укупне количине испитиваних полифенолних једињења заступљених у Сокслетовом екстракту биљне врсте *L. thuringiaca* L. На слици 29. дат је хроматограм Сокслетовог екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L.



Слика 29. HPLC хроматограм екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L. добијеног Сокслетовом екстракцијом

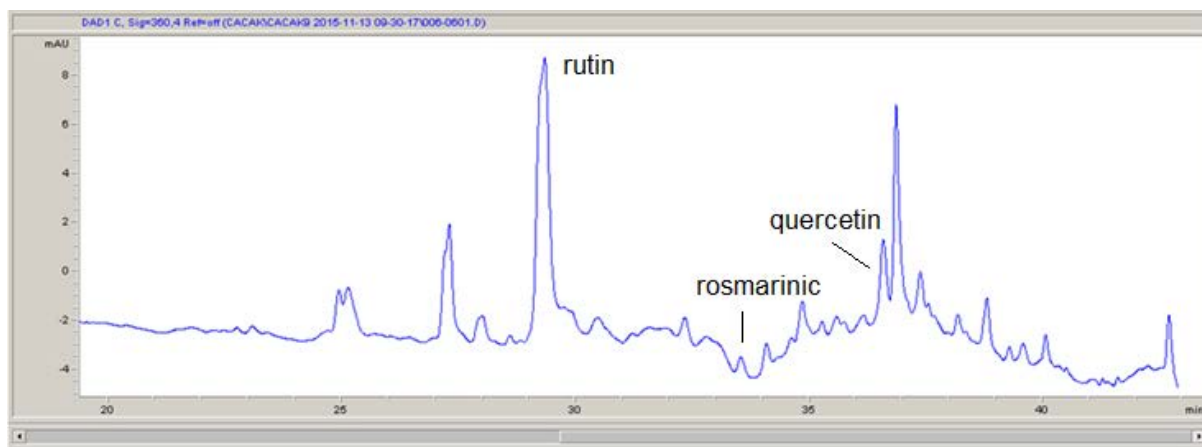
Екстракт биљне врсте *L. thuringiaca* L. који је добијен поступком мацерације као најзаступљеније конституенте садржи рутин (1,802 $\mu\text{g/g}$), кверцетин (0,696 $\mu\text{g/g}$), синапинску киселину (0,197 $\mu\text{g/g}$) и рузмариинску киселину (0,146 $\mu\text{g/g}$) (табела 16.). Поред наведених једињења квантификована су и апигенин, кампферол, лутеолин, нарингенин, *p*-хидроксибензојеве киселине, ванилинска и ферулна киселина у знатно мањим концентрацијама. Укупна концентрација компоненти рутина, кверцетина, синапинске и рузмариинске киселине чине око 86% од укупне количине испитиваних полифенолних једињења заступљених у мацерату биљне врсте *L. thuringiaca* L. На слици 30. дат је хроматограм мацерата биљне врсте *L. thuringiaca* L.



Слика 30. HPLC хроматограм мацерата биљне врсте *L. thuringiaca* L.

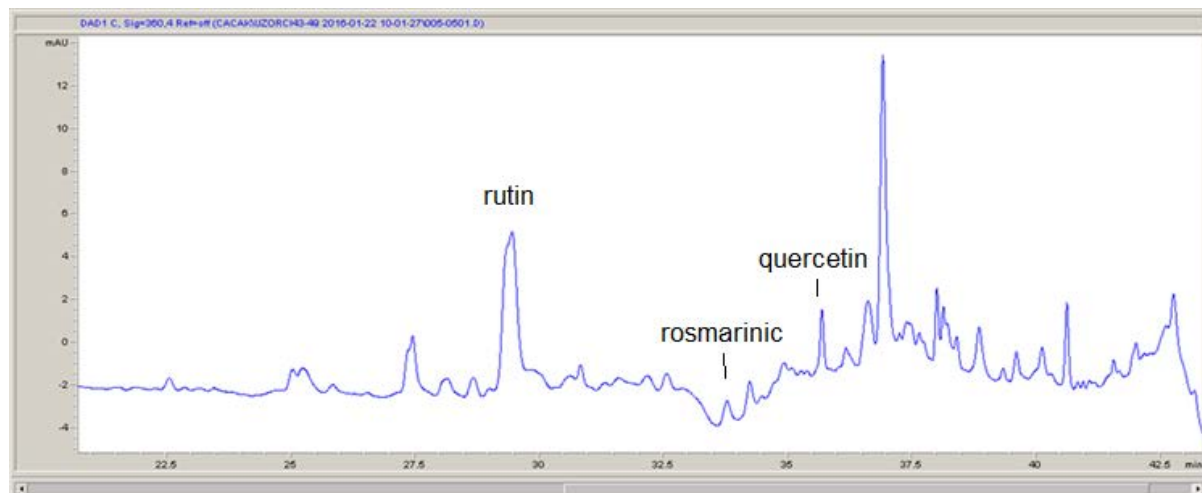
Најдоминантнија компонента која је квантификована у ултразвучном екстракту биљне врсте *L. thuringiaca* L. (табела 14.) је рутин (0,567 $\mu\text{g/g}$). Квантитативном анализом састава полифенолних једињења ултразвучног екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L. утврђено је и присуство: сирингичне киселине, *p*-кумаринске киселине, ферулне киселине, синапинске киселине, апигенин-гликозида, рузмариинске киселине кверцетина,

лутеолина, нарингенина, кампферола и апигенина. Коцентрација рутина, чини око 58% од укупне количине испитиваних полифенолних једињења заступљених у ултразвучном екстракту биљне врсте *L. thuringiaca* L. На слици 31. дат је хроматограм ултразвучног екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L.



Слика 31. HPLC хроматограм ултразвучног екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L.

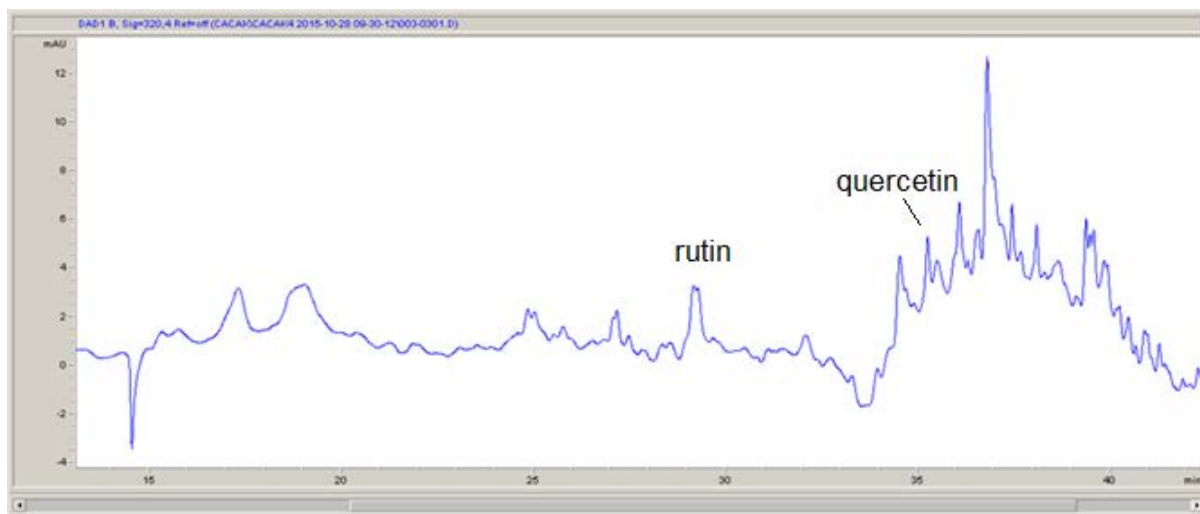
Екстракт биљне врсте *L. thuringiaca* L. који је добијен микроталасном екстракцијом као најдоминантнији конституент садржи рутин ($1,555 \mu\text{g/g}$). У овом екстракту квантификовано је највећи број полифенолних једињења и то; рузмаринска киселина, кверцетин, апигенин, кемпферол, лутеолин, хлорогенска киселина, апигенин гликозид, *p*-хидроксибензоева киселина, *p*-кумаринска киселина, ванилинска киселина, нарингенин, синапинска киселина, кафена киселина, ферулна киселина и сиригинска киселина. Концентрација рутина у екстракту који је добијен микроталасном техником екстракције биљне врсте *L. thuringiaca* L., чини око 44% од укупне количине заступљених испитиваних полифенолних једињења. На слици 32. дат је хроматограм микроталасног екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L.



Слика 32. HPLC хроматограм микроталасног екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L.

У екстракту биљне врсте *L. thuringiaca* L. добијеном поступком субкритичне екстракције са водом идентификована су следећа полифенолна једињења; *p*-хидроксибензоева киселина, сиригинска киселина, *p*-кумаринска, ферулна, синапинска киселина, рузмаринска киселина, лутеолин, нарингенин, кампферол и апигенин, апигенин-гликозид, кверцетин и рутин (табела 16.). Рутин и кверцетин су најдоминантније компоненте у овом екстракту. Ове две компоненте чине око 63 %

укупне количине заступљених испитиваних полифенолних једињења. На слици 33. дат је хроматограм екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L. добијеног поступком субкритичне екстракције водом.



Слика 33. HPLC хроматограм екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L. добијеног поступком субкритичне екстракције са водом

На основу добијених резултата примећујемо да екстракти биљне врсте *L. thuringiaca* L. имају разнолик састав. Једињења попут протокатехинске киселине и лутеолин-гликозида нису идентификована ни у једном испитиваном екстракту. *p*-хидроксибензоева киселина која је квантификована у екстрактима који су добијени поступком мацерације, микроталасне екстракције, као и субкритичне екстракције са водом али није забележено њено присуство у екстракту који је добијен ултразвучном екстракцијом. Кафена киселина је идентификована у Сокслетовом екстракту и екстракту који је добијен микроталасном екстракцијом, а није у екстрактима добијеним поступцима мацерације, ултразвучне екстракције и субкритичне екстракције водом.

Постоје врло штурни подаци о истраживању која се односе на род *Lavatera*. Доказано је присуство *p*-кумарне, ферулне, кафене, кемпферола и кверцетина [264-266]. Група аутора је установила присуство одређених једињења у цветовима биљне врсте из рода *Lavatera* и то кампферол-3-О- β -глукозид, кампферол и кверцетин 3-О-рутинозид, *cis/trans*-тилирозид и *p*-кумаринску киселину [256].

Сматрамо да постоје неколико кључних фактора у погледу разноликости екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L. Поред употребљене различите екстарктивне технике, разлике се односе и на услове при којима се екстракција изводи као што су; време трајања извођења екстракције, температура, употребљени растварач, примена различитих „средстава“ у циљу добијања екстракта као што су ултразвук, микроталаси, притисак и други. Такође, трансфер масе између биљног материјала и примењеног растварача у пратећим условима је допринео овој различитости у погледу састава екстракта. Колико ће супстанце активно прелазити у медијум није исто за све примењене технике екстракције. Растворљивост одређених једињења је различита и поларна једињења показују бољу растворљивост у поларном медијуму [216,218].

Добијени резултати нашег истраживања показују да је екстракцијом по Сокслету добијена највећа количина полифенолних једињења. Са друге стране резултати спектрофотометријског одређивања показују да екстракт који је добијен субкритичном

екстракцијом водом садржи највећу количину укупних фенолних једињења. Како примећујемо постоји извесно неслагање између резултата код екстраката који су добијени овим двама екстрактивним техникама. Сматрамо да се ово одступање јавља услед разлика које испољава *Folin-Ciocalteu*-ов реагенс. Наиме, на основу спроведене студије за испитивање реактивности *Folin-Ciocalteu*-овог реагенса према различитим класама једињења (феноле, тиоле, витамине, аминикиселине, протеине, незасићене масне киселине, угљене хидрате, органске киселине, металне киселине, алдехиде и кетоне) установљено је да су тестирани феноли, протеини и тиоли били реактивни према реагенсу [267]. Према студији Икаве и сарадника у вези са обимом реактивности *Folin-Ciocalteu*-овог реагенса према азотним једињењима резултати су показали да је неколико ових класа показало значајну реактивност према наведеном реагенту и то су класе које су обухватале хидразине, хидроксиламин, гванидине, терцијарне аminer, ароматичне аminer, пироле и индоле [268]. Будући да су нека једињења из ових класа присутна у биљкама, сматра се да би мерење фенола *Folin-Ciocalteu*-овом методом могло дати повећан садржаја фенола [268]. Терцијарни алифатични амини, али не и примарни, секундарни или кватернарни амини, снажно су реаговали са реагенсом, док су примарни, секундарни и терцијарни ароматични амини сви снажно реаговали са реагенсом [268]. Поред евидентно лоше селективности *Folin-Ciocalteu*-овог реагенса, морамо узети у обзир да се неке реакције врше током процеса екстракције. Међу њима су Милардова реакција и карамелисање које доводе до стварања нових једињења која опет могу да реагују са *Folin-Ciocalteu*-овим реагенсом. Сви наведени фактори као последицу доводе до повећања резултата код спектрофотомеријских одређивања услед интерференције других једињења [269].

Претпоставља се да је један од разлога одсуства појединих фенолних киселина у одређеним екстрактима њихова различита растворљивост у датом медијуму. Код субкритичне екстракције са водом молекули са поларним групама попут хидроксилне групе и карбоксилне групе су показали мању растворљивост [257]. Апигенин који има двоструке везе, бива екстрахован добро на вишој температури (190 °C) него нарингенин (170 °C) субкритичном екстракцијом са водом [257]. У нашем истраживању ово је потврђено јер се апигенин налази у већој количини од нарингенина у екстракту добијеном субкритичном екстракцијом водом. Хлорогенска, ванилинска и кафена киселина нису пронађене и није детектовано њихово присуство у екстракту који је добијен субкритичном екстракцијом водом. У овом, као и у случају екстракта добијеног ултразвучном екстракцијом, претпостављамо да се одсуство ових киселина можда може објаснити процесима деградације до којих долази при датим условима.

Генерално, рузмаринска киселина, рутин и кверцетин су компоненте које су најдоминантније у испитиваним екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L. За наведене компоненте је доказано да испољавају низ веома позитивних ефеката на човеков организам, што додатно даје могућност употребе као потенцијалних природних нутрацеутика. Поседују важну улогу у спречавању различитих болести, минимизирају компликацију истих, одлажу процес старења, продужавају очекивани животни век и побољшавају функционисање организма [26]. Учествују у великом броју биолошких процеса који су веома значајни као што су реакције антиоксидативноодбране. Они својим антиоксидативним деловањем спречавају појаву неуродегенеративних болести, укључујући Парконсонову и Алцхајмерову болест, које могу својим деловањем и да инхибирају. Наиме, доказано је да конзумирање намирница богатих рузмаринском киселином, рутином и кверцетином (зелена салата, јабуке, аронија, црно грожђе, шљиве) смањују ризик и од многих кардиоваскуларних обољења [27,28], што додатно потврђује могућност њихове употребе као потенцијалних природних нутрацеутика.

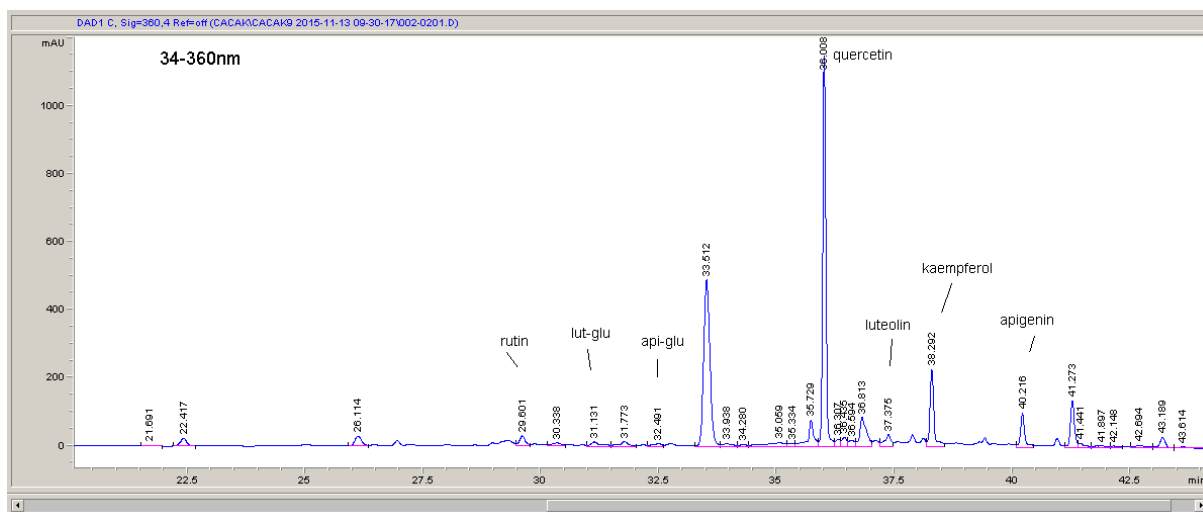
Квантитативном анализом састава полифенолних једињења екстракта биљне врсте *E. carnea L* (Табела 17.) утврдили смо присуство: *p*-хидроксибензојеве киселине, кафене киселине, ванилинске киселине, хлоргенске киселине, сиригинске киселине, *p*-кумаринске киселине, ферулне киселине, синапинске киселине, рутина, апигенин-глукозида, лутеолин-глукозида, рузмаринске киселине, кверцетина, лутеолина, нарингенина, кампферола и апигенина.

Табела 17. Садржај полифенолних једињења у екстрактима биљне врсте *E. carnea L*.

Једињење	Садржај (µg/g)				
	СЕ	МАЦ	УАЕ	МАЕ	СЦВ
Протокатехинска киселина	НД	НД	НД	НД	НД
<i>p</i> -хидроксибензојева киселина	0,102	0,770	НД	0,121	0,148
Кафена киселина	0,287	НД	НД	НД	НД
Ванилинска киселина	0,293	0,129	НД	НД	0,086
Хлоргенска киселина	1,217	0,132	НД	НД	НД
Сиригинска киселина	НД	НД	0,017	0,053	0,048
<i>p</i> -кумаринска киселина	0,553	0,108	0,015	0,044	0,054
Ферулна киселина	0,393	0,113	0,022	0,042	0,032
Синапинска киселина	0,238	0,408	0,123	0,267	0,099
Рутин	1,987	2,159	0,728	0,908	0,397
Лутеолин-гликозид	НД	0,336	НД	НД	0,033
Апигенин-гликозид	0,362	НД	0,016	0,088	0,024
Рузмаринска киселина	11,890	0,746	0,038	0,131	0,036
Кверцетин	7,151	1,895	0,149	1,000	0,282
Лутеолин	0,181	0,559	0,058	0,100	0,016
Нарингенин	0,306	0,055	0,019	0,044	0,013
Кемпферол	0,985	0,074	0,032	0,105	0,023
Апигенин	1,351	0,321	0,018	0,179	0,029
Укупно (Σ)	27,296	7,805	1,235	2,959	1,320

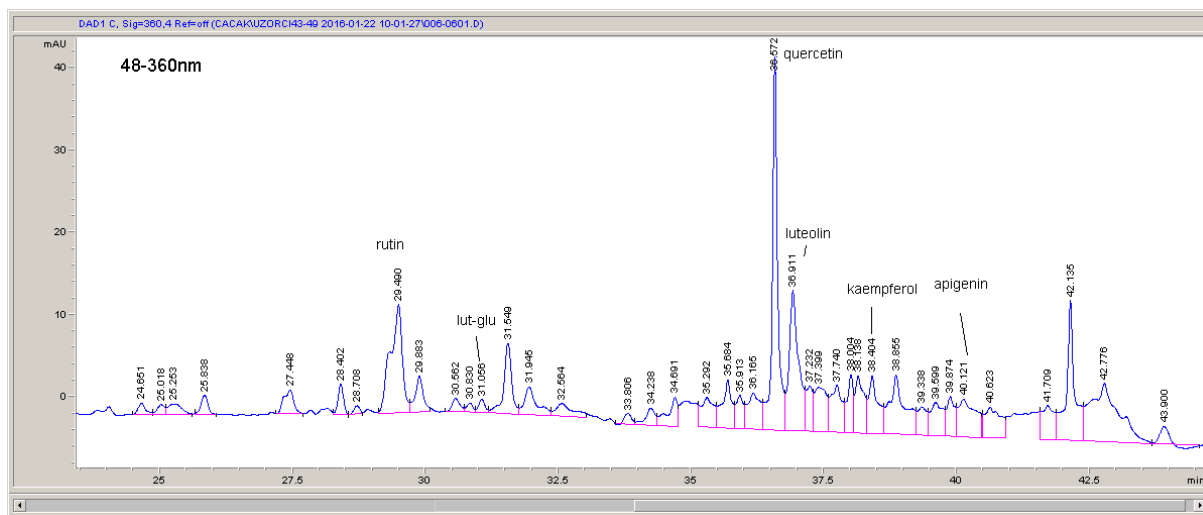
* СЕ - Соклет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом.*НД - није детектовано

У Соклетовом екстракту биљне врсте *E. carnea L* најдоминантније компоненте које су квантификоване су рузмаринска киселина (11,890 µg/g), кверцетин (7,151µg/g), хлорогенска киселина (1,217 µg/g), рутин (1,987 µg/g) и апигенин (1,351 µg/g). У нешто нижим концентрацијама квантификоване су и следеће компоненте: кемпферол (0,985 µg/g) и *p*-кумаринске киселине (0,553 µg/g). Компоненте попут апигенин гликозида, *p*-хидроксибензојеве киселине, ванилинске киселине, нарингенина, синапинске киселине, кафене киселине и ферулне киселине су такође квантификоване у Соклетовом екстракту биљне врсте *E. carnea L*. али у нижим концентрацијама (табела 17). Концентрација рузмаринске киселине, хлорогенске киселине, кверцетина и рутина чине око 86% од укупне количине испитиваних полифенолних једињења заступљених у соклетовом екстракту биљне врсте *E. carnea L*. На слици 34. дат је хроматограм соклетовог екстракта биљне врсте *E. carnea L*.



Слика 34. HPLC хроматограм екстракта биљне врсте *E. carnea* L. добијеног Соклетовом екстракцијом

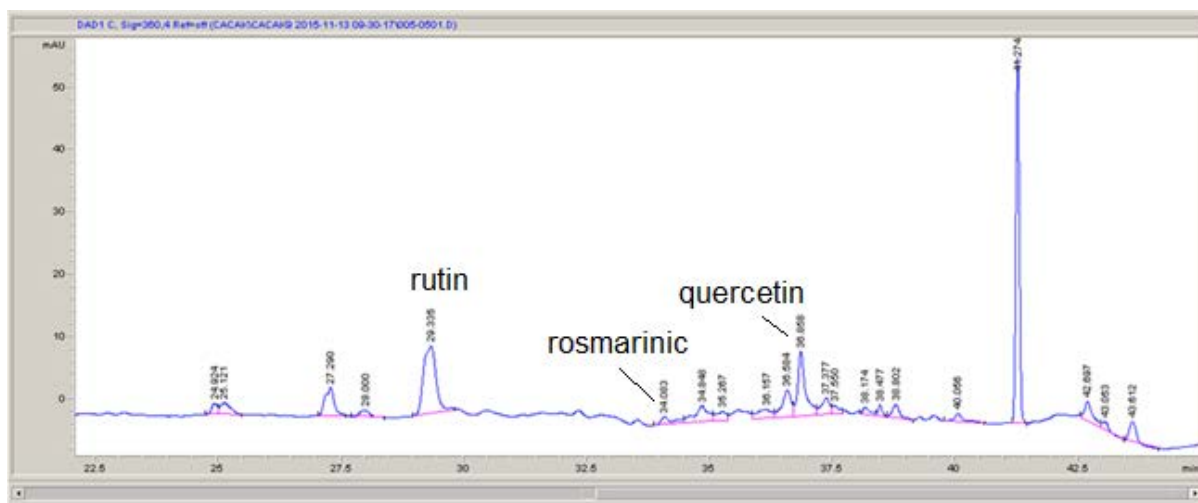
Екстракт биљне врсте *E. carnea* L. који је добијен поступком мацерације као најзаступљеније конституенте садржи рутин (2,159 $\mu\text{g/g}$) и кверцетин (1,895 $\mu\text{g/g}$), (табела 17.). Поред наведених једињења квантификована су и синапинска киселина, рузмаринска киселина, апигенин, кампферол, лутеолин, нарингенин, *p*-хидроксибензоеве киселине, ванилинска, хлорогенска, *p*-кумаринска и ферулна киселина у знатно мањим концентрацијама. Укупна концентрација компоненти рутина и кверцетина чине око 52% од укупне количине испитиваних полифенолних једињења заступљених у мацерату биљне врсте *E. carnea* L. На слици 35. дат је хроматограм мацерата биљне врсте *E. carnea* L.



Слика 1. HPLC хроматограм мацерата биљне врсте *E. carnea* L.

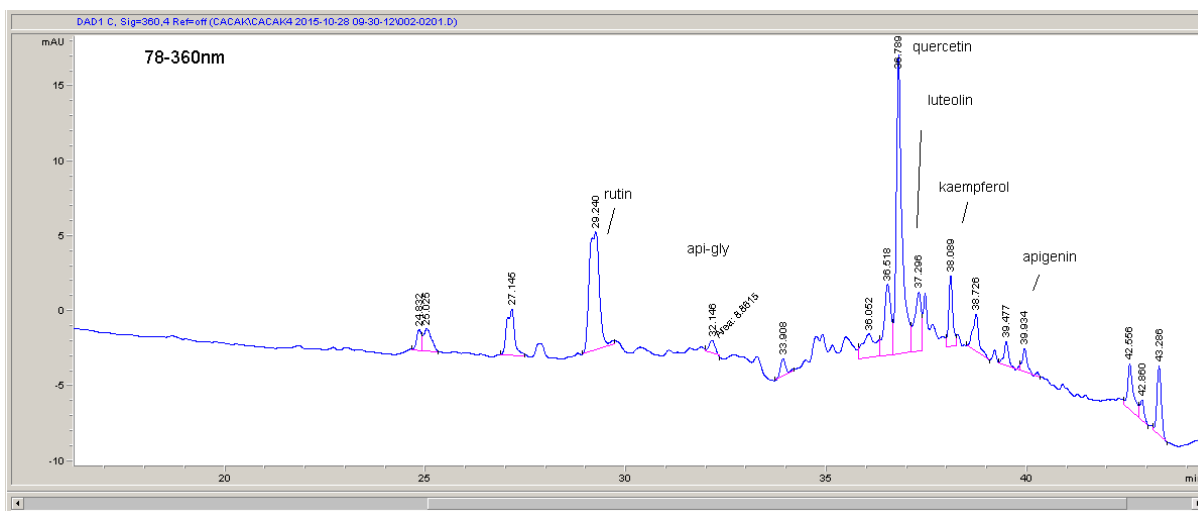
Најдоминантнија компонента која је квантификована у ултразвучном екстракту биљне врсте *E. carnea* L. (табела 17.) је рутин (0,728 $\mu\text{g/g}$). Квантитативном анализом састава полифенолних једињења ултразвучног екстракта биљне врсте *E. carnea* L. утврђено је и присуство: сирингинске киселине, *p*-кумаринске киселине, ферулне киселине, синапинске киселине, апигенин-гликозида, рузмариנסке киселине кверцетина, луолина, нарингенина, кампферола и апигенина. Коцентрација рутина, чини око 59% од укупне количине испитиваних полифенолних једињења заступљених у ултразвучном екстракту

биљне врсте *E. carnea* L. На слици 36. дат је хроматограм ултразвучног екстракта биљне врсте *E. carnea* L.



Слика 2. HPLC хроматограм ултразвучног екстракта биљне врсте *E. carnea* L.

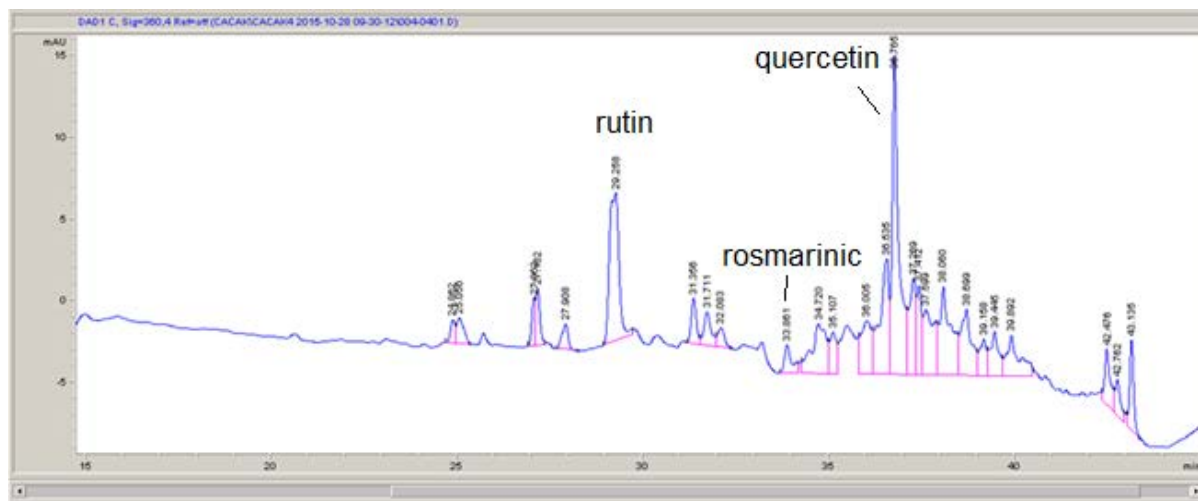
Екстракт биљне врсте *Erica carnea* L. који је добијен микроталасном екстракцијом као најдоминантније конституенте садржи рутин ($0,908 \mu\text{g/g}$) и кверцетин ($1,000 \mu\text{g/g}$). У овом екстракту квантификовано је највећи број полифенолних једињења и то: рузмаринска киселина, кверцетин, апигенин, кемпферол, лутеолин, хлорогенска киселина, апигенин гликозид, *p*-хидроксибензоева киселина, *p*-кумаринска киселина, ванилинска киселина, нарингенин, синапинска киселина, кафена киселина, ферулна киселина и сиригична киселина. Коцентрација рутина и кверцетина у екстракту који је добијен микроталасном техником екстракције биљне врсте *Erica carnea* L, чини око 64% од укупне количине заступљених испитиваних полифенолних једињења. На слици 37. дат је хроматограм микроталасног екстракта биљне врсте *Erica carnea* L.



Слика 3. HPLC хроматограм микроталасног екстракта биљне врсте *E. carnea* L.

У екстракту биљне врсте *E. carnea* L. добијеном поступком субкритичне екстракције са водом идентификована су следећа полифенолна једињења; *p*-хидроксибензоева киселина, ванилинска киселина, сиригична киселина, *p*-кумаринска киселина, ферулна киселина, синапинска киселина, рузмаринска киселина, лутеолин, нарингенин, кампферол, апигенин, апигенин-гликозид, кверцетин и рутин (табела 17.). Рутин и кверцетин су најдоминантније компоненте у овом екстракту. Ове две

компоненте чине преко 51% од укупне количине заступљених испитиваних полифенолних једињења. На слици 38. дат је хроматограм екстрактабилне врсте *E. carnea* L. добијеног поступком субкритичне екстракције водом.



Слика 4. HPLC хроматограм екстракта биљне врсте *E. carnea* L. добијеног поступком субкритичне екстракције водом

Екстракти биљне врсте *E. carnea* L. имају разнолик састав. Предпостављамо да разлог те појаве лежи у постојању различитих механизма који се одигравају при трансферу топлоте и масе, али и исто тако и различитој растворљивости компоненти у растварачу који смо користили. Одсуство фенолних киселина у екстракту добијеном ултразвучном екстракцијом можемо објаснити разлагањем једињења до ког долази током одвијања самог процеса ултразвучне екстракције и изложености ултразвучном зрачењу, као и/или ефектима појачаног загревања, јер забележено је да ултразвучни таласи резултирају разградњом неких фенолних киселина и стварањем високо реактивних хидроксилних радикала унутар мехурића гаса [271]. Са друге стране, до одсуства кафеине и хлоргенске киселине у екстракту добијеном субкритичном екстракцијом са водом сматрамо да је дошло због њихове мале растворљивости под условима при којима се екстракција врши. Добро је познато да поларност воде опада са повећањем температуре. Стога би под датим експерименталним и истраживачким условима мање поларна једињења требало да буду боље екстрахована. Разлике у садржају укупних фенола одређених спектрофотометријском методом и HPLC-DAD методом се могу јавити као последица *Folin-Ciocalteu*-ов реагенса који поседује особину да реагује са доста група једињења и долази до интерференције других једињења што потврђују и радови из ове области [267,269]. Рузмаринска киселина, рутин и кверцетин су компоненте које су најдоминантније у испитиваним екстрактима биљне врсте *E. carnea* L. За наведене компоненте је доказано да испољавају низ веома позитивних ефеката на човеков организам, што додатно даје могућност употребе као потенцијалних природних нутрацеутика. Такође, доказано је да конзумирање намирница богатих рузмаринском киселином, рутином и кверцетином (зелена салата, јабуке, аронија, црно грожђе, шљиве) смањују ризик и од многих кардиоваскуларних обољења [27,28], што додатно потврђује могућност употребе као потенцијалних природних нутрацеутика.

Квантитативном анализом састава полифенолних једињења екстракта биљне врсте *S. hortensis* L. (Табела 18.) утврдили смо присуство: *p*-хидроксибензојеве киселине, кафеине киселине, ванилинске киселине, хлоргенске киселине, сиригинске киселине, *p*-

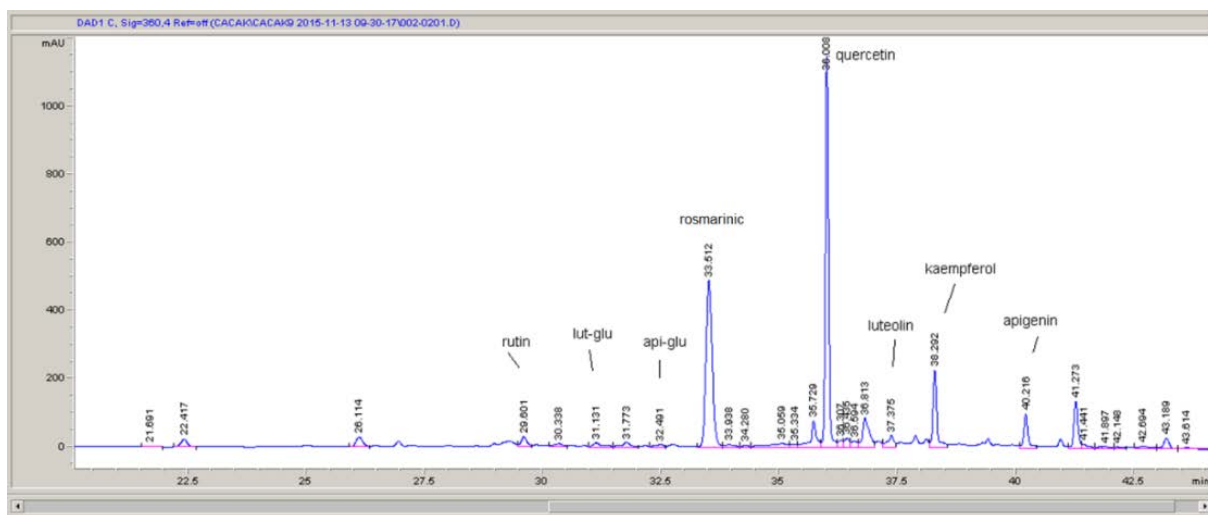
кумаринске киселине, ферулне киселине, синапинске киселине, рутина, апигенин-глукозида, лутеолин-глукозида, рузмаринске киселине, кверцетина, лутеолина, нарингенина, кампферола и апигенина.

Табела 2. Садржај полифенолних једињења у екстрактима биљне врсте *S.hortensis* L.

Једињење	Садржај ($\mu\text{g/g}$)				
	СЕ	МАЦ	УАЕ	МАЕ	СЦВ
Протокатехинска киселина	НД*	НД	НД	НД	НД
<i>p</i> -хидроксibenзова киселина	12,87	2,35	НД	НД	7,58
Кафена киселина	6,27	НД	НД	НД	НД
Ванилинска киселина	11,03	9,02	НД	НД	НД
Хлоргенска киселина	36,06	17,30	НД	НД	НД
Сиригинска киселина	НД	НД	0,56	0,48	НД
<i>p</i> -кумаринска киселина	14,81	2,84	1,08	0,44	НД
Ферулна киселина	2,15	НД	0,9	1,08	0,26
Синапинска киселина	7,09	1,47	4,24	4,88	1,42
Рутин	33,54	10,75	24,04	28,48	16,56
Лутеолин-гликозид	НД	НД	НД	НД	0,22
Апигенин-гликозид	24,39	2,16	0,82	2,62	0,88
Рузмаринска киселина	301,66	287,59	1,34	9,62	2,66
Кверцетин	155,15	1,77	6,42	41,26	11,12
Лутеолин	40,54	1,26	0,82	1,1	0,46
Нарингенин	7,51	0,46	0,32	0,94	0,26
Кемпферол	46,63	11,75	1,24	1,96	1,12
Апигенин	52,78	3,15	1,44	2,36	0,78
Укупно (Σ)	752,54	351,92	43,22	95,22	43,32

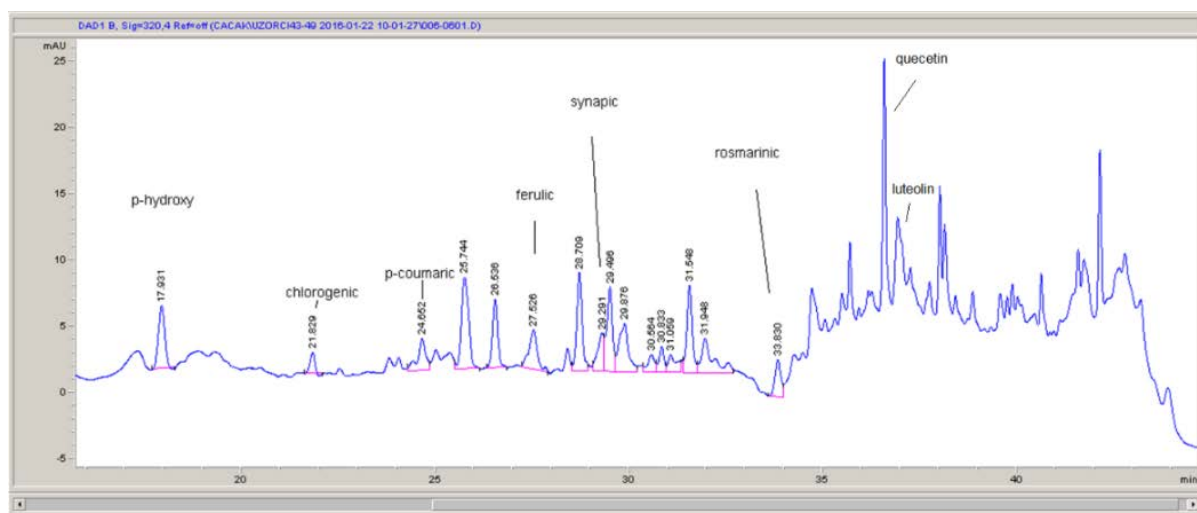
*СЕ - Соклет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом.*НД - није детектовано

У Соклетовом екстракту биљне врсте *S. hortensis* L. најдоминантније компоненте које су квантификоване су рузмаринска киселина (301,66 $\mu\text{g/g}$) и кверцетин (155,15 $\mu\text{g/g}$). У нешто нижим концентрацијама квантификоване су и следеће компоненте: кемпферол, рутин, лутеолин и апигенин. Остале компоненте, наведене у Табели 18., такође су квантификоване у Соклетовом екстракту биљне врсте *S.hortensis* L. али у нижим концентрацијама. Концентрација рузмаринске киселине и кверцетина чине више од 60% од укупне количине испитиваних полифенолних једињења заступљених у соклетовом екстракту биљне врсте *S.hortensis* L. На слици 39. дат је хроматограм соклетовог екстракта биљне врсте *S.hortensis* L.



Слика 5. HPLC хроматограм екстракта биљне врсте *S.hortensis* L. добијеног Сокслетовом екстракцијом

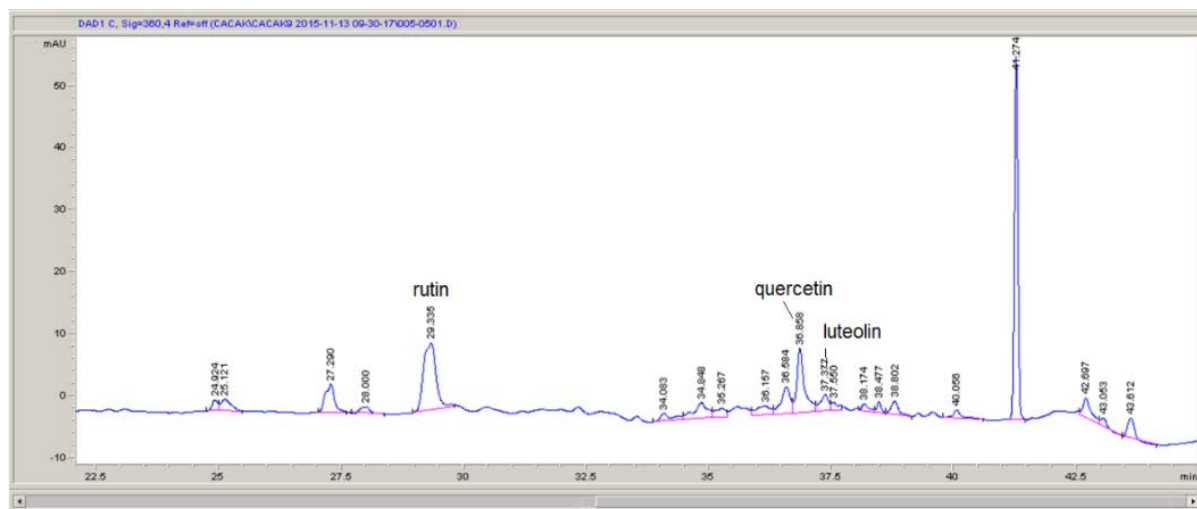
Екстракт биљне врсте *S.hortensis* L. који је добијен поступком мацерације као најзаступљенији конституент садржи рузмаринову киселину ($287,59 \mu\text{g/g}$) (табела 18.). Поред наведених једињења квантификована су и кемпферол, рутин, лутеолин, ванилинска киселина, хлорогенска киселина, синапинска киселина, апигенин гликозид, кверцетин, нарингенин, *p*-кумарна киселина, *p*-хидроксибензојева киселина и апигенин у знатно мањим концентрацијама. Укупна концентрација рузмариновске киселине чине око 82% од укупне количине идентификованих полифенолних једињења заступљених у мацерату биљне врсте *S. hortensis* L. На слици 40. дат је хроматограм мацерата биљне врсте *S. hortensis* L.



Слика 6. HPLC хроматограм мацерата биљне врсте *S. hortensis* L.

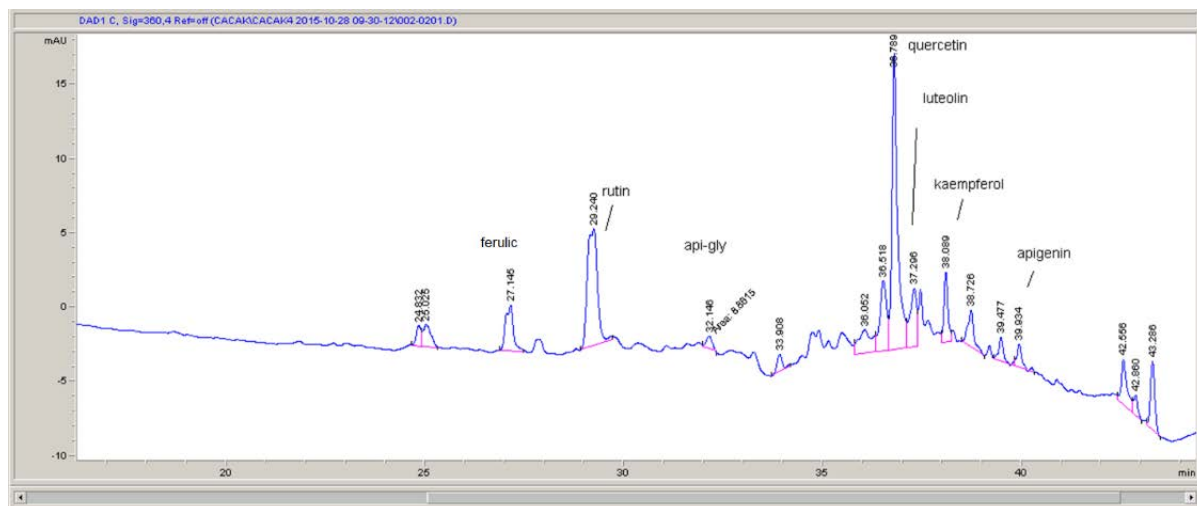
Најдоминантнија компонента која је квантификована у ултразвучном екстракту биљне врсте *S. hortensis* L. (табела 18.) је рутин ($24,04 \mu\text{g/g}$). Квантитативном анализом састава полифенолних једињења ултразвучног екстракта биљне врсте *S. hortensis* L. утврђено је и присуство: синрингине киселине, *p*-кумаринске киселине, ферулне киселине, синапинске киселине, апигенин-глукозида, рузмариновске киселине кверцетина, луолина, нарингенина, кампферола и апигенина. Коцентрација рутина, чини око 56% од укупне количине идентификованих полифенолних једињења заступљених у

ултразвучном екстракту биљне врсте *S. hortensis* L. На слици 41. дат је хроматограм ултразвучног екстракта биљне врсте *S. hortensis* L.



Слика 7. HPLC хроматограм ултразвучног екстракта биљне врсте *S. hortensis* L.

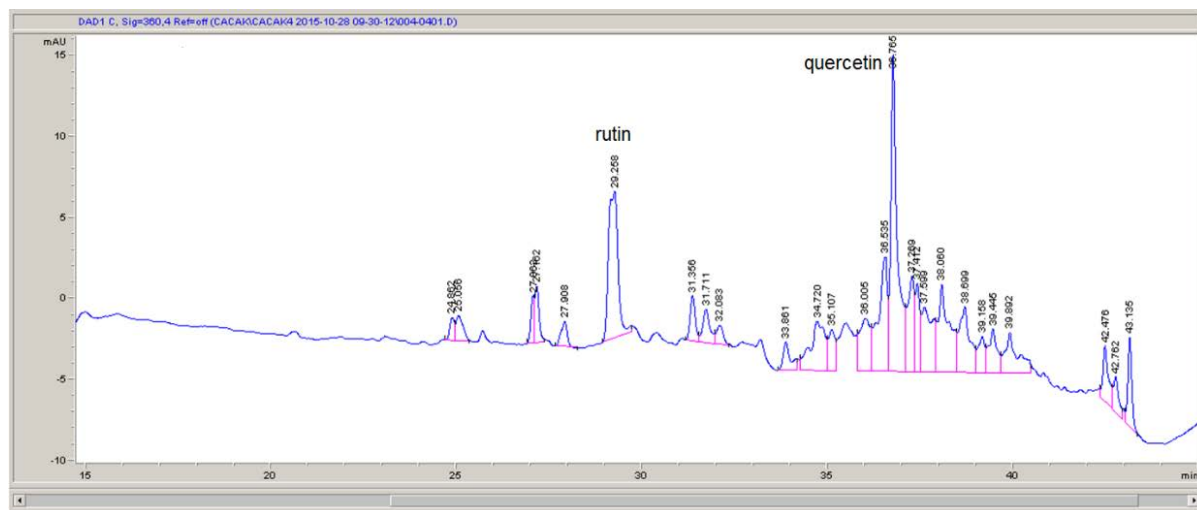
Екстракт биљне врсте *S. hortensis* L. који је добијен микроталасном екстракцијом као најдоминантније конституенте садржи рутин (28,48 $\mu\text{g/g}$) и кверцетин (41,26 $\mu\text{g/g}$). У овом екстракту квантификовано је велики број полифенолних једињења и то: рузмаринска киселина, апигенин, кемпферол, лутеолин, апигенин гликозид, р-кумаринска киселина, нарингенин, синапинска киселина, ферулна киселина и сиригична киселина. Коцентрација рутина и кверцетина у екстракту који је добијен микроталасном техником екстракције биљне врсте *S. hortensis* L., чини око 73% од укупне количине заступљених испитиваних полифенолних једињења. На слици 42. дат је хроматограм микроталасног екстракта биљне врсте *S. hortensis* L.



Слика 8. HPLC хроматограм микроталасног екстракта биљне врсте *S. hortensis* L.

У екстракту биљне врсте *S. hortensis* L. добијеном поступком субкритичне екстракције водом идентификована су следећа полифенолна једињења; *p*-хидроксибензоева киселина, ферулна киселина, синапинска киселина, рузмаринска киселина, лутеолин, нарингенин, кампферол, апигенин, лутеолин-гликозид, апигенин-гликозид, кверцетин и рутин (табела 18.). Рутин и кверцетин су најдоминантније компоненте у овом екстракту. Ове две компоненте чине преко 63% од укупне количине

заступљених испитиваних полифенолних једињења. На слици 43. дат је хроматограм екстракта биљне врсте *S. hortensis* L. добијеног поступком субкритичне екстракције водом.



Слика 9. HPLC хроматограм екстракта биљне врсте *S. hortensis* L. добијеног поступком субкритичне екстракције водом

Екстракти биљне врсте *S. hortensis* L. имају разнолик састав. Рузмаринска киселина, рутин и кверцетин су компоненте које су најдоминантније у испитиваним екстрактима биљне врсте *S. hortensis* L. За наведене компоненте је доказано да испољавају низ веома позитивних ефеката на човеков организам, што додатно даје могућност употребе као потенцијалних природних нутрацеутика. Такође, доказано је да конзумирање намирница богатих рузмаринском киселином, рутином и кверцетином (зелена салата, јабуке, аронија, црно грожђе, шљиве) смањују ризик и од многих кардиоваскуларних обољења [27,28], што додатно потврђује могућност употребе као потенцијалних природних нутрацеутика.

6.4. Биохемијска активност различитих екстраката биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.

Евалуација биохемијске активности добијених екстракта биљних врста *Lavatera thuringiaca* L., *Erica carnea* L. и *S. hortensis* L. обухватала је *in vitro* испитивања антиоксидативног капацитета, антибактеријску активност, цитотоксичну активност као и испитивање опште токсичности и генотоксичности.

6.4.1. Антиоксидативни капацитет екстракта биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.

За процену антиоксидативног капацитета екстраката испитиваних биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. коришћена су четири теста која се базирају на различитим механизмима испољавања антиоксидативне активности. Антиоксидативни потенцијал испитаних екстраката одређен је применом следећих тестова:

- укупна антиоксидативна активност,

- антиоксидативна активност на нивоу инхибиције липидне пероксидације,
- антиоксидативна активност на нивоу хидроксил радикала и
- антиоксидативна активност DPPH тестом.

Резултати антиоксидативног капацитета различитих екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. одређени применом тестова укупне антиоксидативне активности (ТА), антиоксидативне активности на нивоу инхибиције липидне пероксидације (ILP₅₀), антиоксидативне активности на нивоу хидроксил радикала (ОН₅₀) и антиоксидативне активности DPPH тестом (ICP₅₀), дати су у табели 19.

Табела 3. Антиоксидативни капацитет различитих екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L.

Екстракт	ТА (µg AA/g)	ILP ₅₀ (µg/ml)	ОН ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
СЕ	118.56 ± 0.07	30.57 ± 0.04	49.15 ± 0.67	44.77 ± 0.54
МАЦ	149.09 ± 0.65	24.03 ± 0.68	37.29 ± 0.65	39.64 ± 0.56
УАЕ	129.87 ± 0.94	19.35 ± 0.42	25.48 ± 0.22	29.68 ± 0.64
МАЕ	158.26 ± 0.60	22.49 ± 0.57	34.16 ± 0.41	32.15 ± 0.79
СЦВ	164.27 ± 0.18	15.74 ± 0.30	23.83 ± 0.86	24.89 ± 0.34
Гална киселина	-	255.43 ± 11.68	59.14 ± 1.10	3.79 ± 0.69
Аскорбинска киселина	-	>1000.00	160.55 ± 2.31	6.05 ± 0.34
ВНТ	-	1.00 ± 0.23	33.92 ± 0.79	15.61 ± 1.26
α-токоферол	-	0.48 ± 0.05	-	3.79 ± 0.69

*СЕ- Соклет екстракција, МАЦ-мацерација, УАЕ- ултразвучна екстракција, МАЕ- микроталасна екстракција, СЦВ- субкритична екстракција са водом, АА- еквивалент аскорбинске киселине, ВНТ- бутиловани хидрокситолуен, ТА- укупна антиоксидативна активност, ILP₅₀- антиоксидативна активност на нивоу инхибиције липидне пероксидације, ОН₅₀- антиоксидативна активност на нивоу хидроксил радикала, ICP₅₀- антиоксидативне активности DPPH тестом

Одређивање укупне антиоксидативне активности различитих екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. је описано у поглављу 4.6.1.1. Резултате смо изразили у микрограмима (µg) аскорбинске киселине (АА) по граму (g) сувог екстракта. Резултати укупне антиоксидативне активности одређени фосфолибденском методом представљени су у Табели 19. Највећу укупну антиоксидативну активност показује екстракт добијен субкритичном екстракцијом са водом (164,27 ± 0,18 µg AA/g). Незнатно нижу укупну антиоксидативну активност показују микроталасни екстракт (158,26 ± 0,60 µg AA/g) и мацерат (149,09 ± 0,65 µg AA/g), што је у сагласности са укупним садржајем фенолних једињења. Ултразвучни екстракт биљне врсте *L. thuringiaca* L. показује укупну антиоксидативну активност 129,87 ± 0,94 µg AA/g сувог екстракта, док екстракт који је направљен екстракцијом по Соклету показује најнижу укупну антиоксидативну активност (118,56 ± 0,07 µg AA/g). На основу добијених резултата примећујемо да екстракти који су добијени конвенционалним и савременим методама екстракције показују различите нивое укупне антиоксидативне активности. Сматрамо да се варијабилности добијених резултата јављају као последица различитих типова хемијских реакција до којих долази приликом извођења теста као и због различитих реакционих механизма антиоксидативног капацитета. Редослед активности биљака према резултатима за укупну антиоксидативну активност је следећи:

СЦВ > МАЕ > МАЦ > УАЕ > СЕ

што је у потпуној сагласности са научним радовима који указују на корелацију антиоксидативне активности и количине укупних фенолних једињења присутних у

биљном екстракту [272]. Примењени екстракциони поступци имају велики утицај на састав екстракта, а самим тим утичу и на антиоксидативну активност [273]. Различите студије су потврдиле да се субкритична екстракција водом као техника екстракције користи да би се повећала производња полифенолних једињења са високом антиоксидативном активношћу из биљака и да се овом техником добијају екстракти који показују одличну антиоксидативну активност [274]. *Pongnaravane* и група аутора (2006) су поредили субкритичну екстракцију водом са осталим екстрактивним техникама, и резултати њиховог рада показују да екстракти који су добијени субкритичном екстракцијом са водом били ефикаснији у погледу антиоксидативне активности [275, 276].

Резултати одређивања антиоксидативне моћи испитиваних екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. на нивоу инхибиције липидне пероксидације (ILP₅₀), антиоксидативне активности на нивоу хидроксил радикала(OH₅₀) и антиоксидативне активности DPPH тестом (IC₅₀), представљени су у табели 17. Резултати одређивања антиоксидативне моћи наведеним тестовима су изражени као концентрације тестираног једињења (µg/ml) које смањују полазну концентрацију слободне радикалске врсте за 50% (ILP₅₀, OH₅₀ и ICP₅₀).

Нижа ILP₅₀ вредност указује на већу односно бољу способност инхибирања штетног процеса липидне пероксидације у ћелијама. На основу резултата антиоксидативне активности одређене на нивоу инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. (ILP₅₀), може се констатовати да најјачу моћ инхибиције липидне пероксидације поседује екстракт који је добијен субкритичном екстракцијом са водом (ILP₅₀=15,74 ± 0,30 µg/ml). Нешто слабију моћ инхибиције липидне пероксидације показао је ултразвучни екстракт (ILP₅₀=19,35±0,42µg/ml), микроталасни екстракт биљне врсте *L. thuringiaca* L. (ILP₅₀=22,49±0,57 µg/ml) и мацерат (ILP₅₀=24,03±0,68 µg/ml) а најслабију антиоксида-тивну активност на нивоу инхибиције липидне пероксидације показао је екстракт добијен Сокслетовом екстракцијом (ILP₅₀=30,57±0,04 µg/ml). Сви испитивани екстракти биљне врсте *L. thuringiaca* L. показују високу способност инхибиције липидне пероксидације. Висок антиоксидативни потенцијал ових екстракта је у корелацији са високим садржајем фенола и флавонола у испитиваним екстрактима. Антиоксидативна активност екстраката компарирана је са синтетичким антиоксидансима, галном киселином, аскорбинском киселином, ВНТ-ом и α-токоферолом, при чему је запажено да су екстракти ове биљне врсте показали већи стерен инхибиције липидне пероксидације (мање ICP₅₀ вредности) од галне киселине и аскорбинске киселине, а знатно слабију активност од ВНТ-а и α-токоферола. Способност полифенола да продру у ћелијски липидни двослој је несумњиво од кључног значаја за заштиту од оксидације. За полифеноле који партиципирају у неполарном региону двослоја, установљено је да могу да инхибирају пропацију липидне оксидације помоћу два механизма који дезорганизује и омета пропацију радикала [277]. Према истраживањима других аутора, способност поларних једињења да инхибирају оксидацију липида у храни је следећи; ферулна киселина > кумарна киселина > пропилен галат > гална киселина > аскорбинска киселина, док је редослед неполарних једињења розмаринска киселина > бутилирани хидрокситолуен > терц-бутилхидрокинон > алфа-токоферол [278]. Од једињења која су наведена ферулна киселина и рузмаринска киселина се налазе у знатним количинама у добијеним екстрактима.

Нижа OH₅₀ вредност показује да испитивано једињење поседује бољу способност неутралисања хидроксил радикала. Добијени резултати показују да се OH₅₀ вредности испитиваних екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. крећу од 23.83 µg/ml за екстракт

који је добијен субкритичном екстракцијом са водом до 49.15 $\mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом. Екстракт добијен субкритичном екстракцијом са водом као и ултразвучни екстракт биљне врсте *L. thuringiaca* L. у поређењу са синтетичким антиоксидансима (галне киселине и аскорбинске киселине) показују већу способност неутралисања хидроксил радикала док у поређењу са ВНТ-ом показују мању активност.

Нижа ICP_{50} вредност показује да испитивано једињење поседује бољу способност неутралисања DPPH радикала и самим тим је антиоксидативна активност једињења већа. Добијени резултати показују да се IC_{50} вредности испитиваних екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. крећу од 24.89 $\mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен субкритичном екстракцијом са водом, до 44.77 $\mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом. Савремене методе екстракције показују веома јачу способност неутралисања DPPH радикала. Знатно су више IC_{50} вредности за екстракте који су добијени конвенционалним методама и крећу се од 39.64 $\mu\text{g/ml}$ колико износи вредност IC_{50} екстракта који је добијен процесом мацерације до 44.77 $\mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом. Најјачу активност неутралисања DPPH радикала показао је екстракт биљне врсте *L. thuringiaca* L. који је добијен субкритичном екстракцијом са водом док Сокслетов екстракт показује најслабију способност неутралисања DPPH радикала. Такође, може се закључити да код DPPH активност уклањања слободних радикала екстракти биљне врсте *L. thuringiaca* L. поседују слабију активност од синтетичких антиоксиданаса, ВНТ-а а аскорбинске и галне киселине, α -токоферола и галне киселине.

Резултати антиоксидативног капацитета различитих екстраката биљне врсте *E. carnea* L. одређени применом тестова укупне антиоксидативне активности (ТА), антиоксидативне активности на нивоу инхибиције липидне пероксидације (ILP_{50}), антиоксидативне активности на нивоу хидроксил радикала (OH_{50}) и антиоксидативне активности DPPH тестом (ICP_{50}), дати су у табели 20.

Табела 4. Укупна антиоксидативна активност екстраката биљне врсте *E. carnea* L.

Екстракт	ТА ($\mu\text{g AA/g}$)	ILP_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	OH_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	ICP_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
СЕ	112.34 \pm 0.43	31.35 \pm 0.42	33.51 \pm 0.88	46.68 \pm 1.01
МАЦ	119.92 \pm 0.48	30.73 \pm 0.08	30.15 \pm 0.93	37.83 \pm 0.98
УАЕ	134.71 \pm 0.29	28.57 \pm 0.44	26.83 \pm 0.77	36.47 \pm 0.69
МАЕ	159.09 \pm 0.82	27.56 \pm 0.81	24.41 \pm 0.81	30.60 \pm 0.99
СЦВ	171.32 \pm 0.87	21.71 \pm 0.45	20.63 \pm 0.94	23.73 \pm 0.53
Гална киселина	-	255.43 \pm 11.68	59.14 \pm 0.10	3.79 \pm 0.69
Аскорбинска Киселина	-	>1000.00	160.55 \pm 2.31	6.05 \pm 034
ВНТ	-	1.00 \pm 0.23	33.92 \pm 0.79	15.61 \pm 1.26
α - токоферол	-	0.48 \pm 0.05	-	3.79 \pm 0.69

*СЕ- Сокслет екстракција, МАЦ-мацерација, УАЕ- ултразвучна екстракција, МАЕ- микроталасна екстракција, СЦВ- субкритична екстракција са водом, АА– еквивалент аскорбинске киселине, ВНТ- бутиловани хидрокситолуен, ТА- укупна антиоксидативна активност, ILP_{50} - антиоксидативна активност на нивоу инхибиције липидне пероксидације, OH_{50} - антиоксидативна активност на нивоу хидроксил радикала, ICP_{50} - антиоксидативне активности DPPH тестом

Одређивање укупне антиоксидативне активности различитих екстраката биљне врсте *E. carnea* L. је описано у поглављу 4.6.1.1. Резултате смо изразили у микрограмима (μg) аскорбинске киселине (АА) по граму (g) сувог екстракта. Резултати укупне

антиоксидативне активности одређени фосфомолибденском методом представљени су у Табели 20. Највећу укупну антиоксидативну активност показује екстракт добијен субкритичном екстракцијом са водом ($171,32 \pm 0,87 \mu\text{g AA/g}$). Незнатно нижу укупну антиоксидативну активност показују микроталасни екстракт ($159,09 \pm 0,82 \mu\text{g AA/g}$) и ултразвучни екстракт ($134,71 \pm 0,29 \mu\text{g AA/g}$), што је у сагласности са резултатима укупне количине фенолних једињења. Мацерат биљне врсте *E. carnea* L. показује укупну антиоксидативну активност у количини $119,92 \pm 0,48 \mu\text{g AA/g}$ сувог екстракта, док Сокслетов екстракт показује најнижу укупну антиоксидативну активност ($112,34 \pm 0,43 \mu\text{g AA/g}$).

На основу добијених резултата примећујемо да екстракти који су добијени конвенционалним и савременим методама екстракције показују различите нивое укупне антиоксидативне активности. Сматрамо да се варијабилности добијених резултата јављају као последица различитих типова хемијских реакција до којих долази приликом извођења теста као и због различитих реакционих механизма антиоксидативног капацитета. Примењени екстракциони поступци имају велики утицај на састав екстракта, а самим тим утичу и на антиоксидативну активност [273].

Резултати одређивања антиоксидативне активности испитиваних екстраката биљне врсте *E. carnea* L. на нивоу инхибиције липидне пероксидације (ILP_{50}), антиоксидативне активности на нивоу хидроксил радикала (OH_{50}) и антиоксидативне активности DPPH тестом (ICP_{50}), представљени су у табели 20.

Резултати одређивања антиоксидативне активности наведеним тестовима су изражени као концентрације тестираног једињења ($\mu\text{g/ml}$) које смањују полазну концентрацију слободне радикалске врсте за 50% (ILP_{50} , OH_{50} и IC_{50}). На основу резултата антиоксидативне активности одређене на нивоу инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката биљне врсте *E. carnea* L. (ILP_{50}), може се констатовати да најјачу моћ инхибиције липидне пероксидације поседује екстракт који је добијен субкритичном екстракцијом водом ($ILP_{50}=21,71 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$). Нешто слабију моћ инхибиције липидне пероксидације показао је микроталасни екстракт ($ILP_{50}=27,56 \pm 0,81 \mu\text{g/ml}$), ултразвучни екстракт биљне врсте *E. carnea* L. ($ILP_{50}=28,57 \pm 0,44 \mu\text{g/ml}$) и мацерат ($ILP_{50}=30,73 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$) а најслабију антиоксидативну активност на нивоу инхибиције липидне пероксидације показао је екстракт добијен Сокслетовом екстракцијом ($ILP_{50}=31,35 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$). Сви испитивани екстракти биљне врсте *E. carnea* L. показују високу способност инхибиције липидне пероксидације. Висок антиоксидативни потенцијал ових екстракта може се довести у везу са високим садржајем фенола и флавонола у испитиваним екстрактима. Антиоксидативна активност екстраката компарирана је са синтетичким антиоксидансима, галном киселином, аскорбинском киселином, ВНТ-ом и α -токоферолом, при чему је запажено да су екстракти ове биљне врсте показали већи степен инхибиције липидне пероксидације (мање IC_{50} вредности) од галне киселине и аскорбинске киселине, а знатно слабију активност од ВНТ-а и α -токоферола.

Незнатно јачу антиоксидативну активност на нивоу инхибиције липидне пероксидације показују екстракти биљне врсте *L. thuringiaca* L. у односу на екстракте биљне врсте *E. carnea* L. Нижа OH_{50} вредност показује да испитивано једињење поседује бољу способност неутралисања хидроксил радикала. Добијени резултати показују да се OH_{50} вредности испитиваних екстраката биљне врсте *E. carnea* L. крећу од $20,63 \mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен субкритичном екстракцијом водом до $33,51 \mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом. Екстракт добијен субкритичном екстракцијом са водом ($OH_{50}=20,63 \pm 0,94 \mu\text{g/ml}$), микроталасни екстракт биљне врсте *E.*

carnea L. ($OH_{50}=24,41\pm 0,81\mu\text{g/ml}$), ултразвучни екстракт ($OH_{50}=26,83\pm 0,77\mu\text{g/ml}$), мацерат ($OH_{50}=24,41\pm 0,81\mu\text{g/ml}$) и екстракт биљне врсте *E. carnea* L. добијен Сокслетовом екстракцијом ($OH_{50}=33,51\pm 0,88\mu\text{g/ml}$) у поређењу са синтетичким антиоксидансима (галне киселине, аскорбинске киселине и ВНТ-а) показују већу способност неутралисања хидроксил радикала.

Добијени резултати показују да се ICP_{50} вредности испитиваних екстраката биљне врсте *E. carnea* L. крећу од $23,73\mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен субкритичном екстракцијом водом, до $46,68\mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом. Савремене методе екстракције омогућавају добијање екстраката који показују јачу способност неутралисања DPPH радикала. Знатно су више ICP_{50} вредности за екстракте који су добијени конвенционалним методама и крећу се од $37,83\mu\text{g/ml}$ колико износи вредност ICP_{50} екстракта који је добијен процесом мацерације до $46,68\mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом. Најјачу активност неутралисања DPPH радикала показао је екстракт биљне врсте *E. carnea* L. који је добијен субкритичном екстракцијом са водом док Сокслетов екстракт показује најслабију способност неутралисања DPPH радикала. Такође, може се закључити да код DPPH активност уклањања слободних радикала екстракти биљне врсте *E. carnea* L. поседују слабију активност од синтетичких антиоксиданаса, ВНТ-а, а аскорбинске и галне киселине и α -токоферола. Исти тренд се запажа као и код екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L.

Резултати антиоксидативног капацитета различитих екстраката биљне врсте *S. hortensis* L одређени применом тестова укупне антиоксидативне активности (ТА), антиоксидативне активности на нивоу инхибиције липидне пероксидације (ILP_{50}), антиоксидативне активности на нивоу хидроксил радикала (OH_{50}) и антиоксидативне активности DPPH тестом (ICP_{50}), дати су у табели 21.

Табела 5. Укупна антиоксидативна активност екстраката биљне врсте *S. hortensis* L.

Екстракт	ТА ($\mu\text{g AA/g}$)	ILP_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	OH_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	ICP_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
СЕ	$114,12 \pm 0,14$	$34,33 \pm 0,55$	$37,30 \pm 0,54$	$51,79 \pm 0,47$
МАЦ	$121,56 \pm 0,42$	$27,49 \pm 0,02$	$27,22 \pm 0,87$	$45,13 \pm 0,95$
УАЕ	$132,43 \pm 0,69$	$23,50 \pm 0,88$	$22,69 \pm 0,39$	$38,54 \pm 0,33$
МАЕ	$157,05 \pm 0,85$	$17,76 \pm 0,43$	$15,54 \pm 0,45$	$32,87 \pm 0,60$
СЦВ	$163,39 \pm 0,44$	$15,23 \pm 0,17$	$12,21 \pm 0,09$	$23,33 \pm 0,48$
Гална киселина	-	$255,43\pm 11,68$	$59,14\pm 0,10$	$3,79\pm 0,69$
Аскорбинска Киселина	-	$>1000,00$	$160,55\pm 2,31$	$6,05\pm 0,34$
ВНТ	-	$1,00\pm 0,23$	$33,92\pm 0,79$	$15,61\pm 1,26$
α -токоферол	-	$0,48\pm 0,05$	-	$3,79\pm 0,69$

*СЕ- Сокслет екстракција, МАЦ-мацерација, УАЕ- ултразвучна екстракција, МАЕ- микроталасна екстракција, СЦВ- субкритична екстракција са водом, АА– еквивалент аскорбинске киселине, ВНТ-бутиловани хидрокситолуен, ТА- укупна антиоксидативна активност, ILP_{50} - антиоксидативна активност на нивоу инхибиције липидне пероксидације, OH_{50} - антиоксидативна активност на нивоу хидроксил радикала, ICP_{50} - антиоксидативне активности DPPH тестом

Одређивање укупне антиоксидативне активности различитих екстраката биљне врсте *S. hortensis* L. је описано у поглављу 4.6.1.1. Резултате смо изразили у микрограмима (μg) аскорбинске киселине (АА) по граму (g) сувог екстракта. Резултати укупне антиоксидативне активности одређени фосфомолибденском методом

представљени су у Табели 21. Највећу укупну антиоксидативну активност показује екстракт добијен субкритичном екстракцијом са водом ($163,39 \pm 0,44 \mu\text{g AA/g}$). Незнатно нижу укупну антиоксидативну активност показују микроталасни екстракт ($157,05 \pm 0,85 \mu\text{g AA/g}$) и ултразвучни екстракт ($132,43 \pm 0,69 \mu\text{g AA/g}$), што је у сагласности са резултатима укупне количине фенолних једињења. Мацерат биљне врсте *S. hortensis* L. показује укупну антиоксидативну активност у количини $121,56 \pm 0,42 \mu\text{g AA/g}$ сувог екстракта, док Сокслетов екстракт показује најнижу укупну антиоксидативну активност ($114,12 \pm 0,14 \mu\text{g AA/g}$).

На основу добијених резултата примећујемо да екстракти који су добијени конвенционалним и савременим методама екстракције показују различите нивое укупне антиоксидативне активности. Сматрамо да се варијабилности добијених резултата јављају као последица различитих типова хемијских реакција до којих долази приликом извођења теста као и због различитих реакционих механизма антиоксидативног капацитета. Примењени екстракциони поступци имају велики утицај на састав екстракта, а самим тим утичу и на антиоксидативну активност [273].

Резултати одређивања антиоксидативне активности испитиваних екстраката биљне врсте *S. hortensis* L. на нивоу инхибиције липидне пероксидације (ILP_{50}), антиоксидативне активности на нивоу хидроксил радикала (OH_{50}) и антиоксидативне активности DPPH тестом (ICP_{50}), представљени су у табели 21.

Резултати одређивања антиоксидативне активности наведеним тестовима су изражени као концентрације тестираног једињења ($\mu\text{g/ml}$) које смањују полазну концентрацију слободне радикалске врсте за 50% (ILP_{50} , OH_{50} и IC_{50}). На основу резултата антиоксидативне активности одређене на нивоу инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката биљне врсте *S. hortensis* L. (ILP_{50}), може се констатовати да најјачу моћ инхибиције липидне пероксидације поседује екстракт који је добијен субкритичном екстракцијом водом ($ILP_{50}=15,23 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$). Нешто слабију моћ инхибиције липидне пероксидације показао је микроталасни екстракт ($ILP_{50}=17,76 \pm 0,43 \mu\text{g/ml}$), ултразвучни екстракт биљне врсте *S. hortensis* L. ($ILP_{50}=23,50 \pm 0,88 \mu\text{g/ml}$) и мацерат ($ILP_{50}=27,49 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$) а најслабију антиоксидативну активност на нивоу инхибиције липидне пероксидације показао је екстракт добијен Сокслетовом екстракцијом ($ILP_{50}=34,33 \pm 0,455 \mu\text{g/ml}$). Сви испитивани екстракти биљне врсте *S. hortensis* L. показују високу способност инхибиције липидне пероксидације. Висок антиоксидативни потенцијал ових екстракта може се довести у везу са високим садржајем фенола и флавонола у испитиваним екстрактима. Антиоксидативна активност екстраката компарирана је са синтетичким антиоксидансима, галном киселином, аскорбинском киселином, ВНТ-ом и α -токоферолом, при чему је запажено да су екстракти ове биљне врсте показали већи степен инхибиције липидне пероксидације (мање IC_{50} вредности) од галне киселине и аскорбинске киселине, а знатно слабију активност од ВНТ-а и α -токоферола.

Незнатно јачу антиоксидативну активност на нивоу инхибиције липидне пероксидације показују екстракти биљних врста *S. hortensis* L. и *Lavatera thuringiaca* L. у односу на екстракте биљне врсте *E. carnea* L. Нижа OH_{50} вредност показује да испитивано једињење поседује бољу способност неутралисања хидроксил радикала. Добијени резултати показују да се OH_{50} вредности испитиваних екстраката биљне врсте *S. hortensis* L. крећу од $12,21 \mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен субкритичном екстракцијом водом до $37,30 \mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом. Екстракт добијен субкритичном екстракцијом водом ($OH_{50}=12,21 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$), микроталасни екстракт биљне врсте *S. hortensis* L. ($OH_{50}=15,54 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$),

ултразвучни екстракт ($OH_{50}=22,69\pm 0,39 \mu\text{g/ml}$), мацерат ($OH_{50}=27,22\pm 0,87 \mu\text{g/ml}$) и екстракт биљне врсте *S. hortensis* L. добијен Сокслетовом екстракцијом ($OH_{50}=37,30\pm 0,54 \mu\text{g/ml}$) у поређењу са синтетичким антиоксидансима (галне киселине, аскорбинске киселине и ВНТ-а) показују већу способност неутралисања хидроксил радикала.

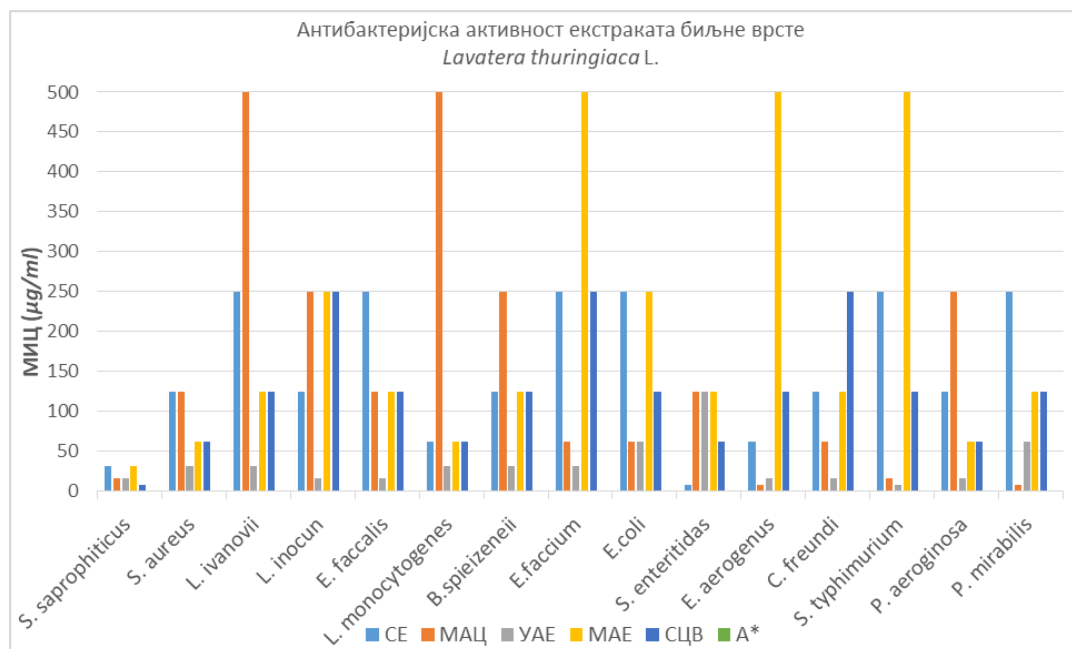
Добијени резултати показују да се ICP_{50} вредности испитиваних екстраката биљне врсте *S. hortensis* L. крећу од $23,33 \mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен субкритичном екстракцијом водом, до $51,79 \mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом. Савремене методе екстракције омогућавају добијање екстраката који показују јачу способност неутралисања DPPH радикала. Знатно су више ICP_{50} вредности за екстракте који су добијени конвенционалним методама и крећу се од $45,13 \mu\text{g/ml}$ колико износи вредност ICP_{50} екстракта који је добијен процесом мацерације до $51,79 \mu\text{g/ml}$ за екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом. Најјачу активност неутралисања DPPH радикала показао је екстракт биљне врсте *S. hortensis* L. који је добијен субкритичном екстракцијом водом док Сокслетов екстракт показује најслабију способност неутралисања DPPH радикала. Такође, може се закључити да код DPPH активност уклањања слободних радикала екстракти биљне врсте *S. hortensis* L. поседују слабију активност од синтетичких антиоксиданаса, ВНТ-а, а аскорбинске и галне киселине и α -токоферола. Исти тренд се запажа као и код екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. и *E. carnea* L.

Екстракција компонената које поседују антиоксидативна својства из полазног матрикса који је сложеног састава утврђено је да зависи од растворљивости екстрактанта, примењеног растварача, присуства других супстанци које могу да конкуришу екстракцијом процесу, и самим примењеним процесом екстракције [279]. За исказивање антиоксидативне активност сматрамо да су одговорна једињења која се налазе у испитиваним екстрактима, попут флавоноида и њихових деривата. На основу ранијих истраживања, међу тестираним флавоноидним једињењима доказано је да кверцетин и рутин поседују и показују веома високу антиоксидативну активност [280-286]. Рузмаринска киселина, рутин и кверцетин су компоненте које су најдоминантније у испитиваним екстрактима биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. За наведене компоненте је доказано да испољавају низ веома позитивних ефеката на човеков организам, што додатно даје могућност употребе као потенцијалних природних нутрацеутика. Они својим антиоксидативним деловањем спречавају појаву неуродегенеративних болести, укључујући Парконсонову и Алцхајмерову болест, које могу својим деловањем и да инхибирају. Такође, доказано је да конзумирање намирница богатих рузмаринском киселином, рутином и кверцетином (зелена салата, јабуке, аронија, црно грожђе, шљиве) смањују ризик и од многих кардиоваскуларних обољења [27,28], што додатно потврђује могућност употребе као потенцијалних природних нутрацеутика.

6.4.2. Антибактеријска активност екстракта биљака *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L

Антибактеријску активност добијених екстраката испитиваних биљних врста испитивана је по методи описаној у поглављу 4.6.3. Тестирања су вршена на 15 различитих бактеријских сојева, од којих 8 сојева припада Грам-позитивним (Г+), а 7 сојева Грам-негативним (Г-) бактеријама. Одређивање је вршено микродилуционом методом. Резултати су изражени преко минималне инхибиторне концентрације МИЦ

(„*minimal inhibitory concentration*“) која представља најмању концентрацију једињења која је у стању да инхибира раст микроорганизама. МИЦ се изражава у $\mu\text{g/ml}$. Као једињење која нам служи за поређење антибактеријске активности добијених екстраката узели смо референтни антибиотик амрацин (А). На хистограму 7. дати су резултати антибактеријске активности екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L.



Хистограм 3. Антибактеријске активности екстраката биљне врсте *Lavatera thuringiaca* L.

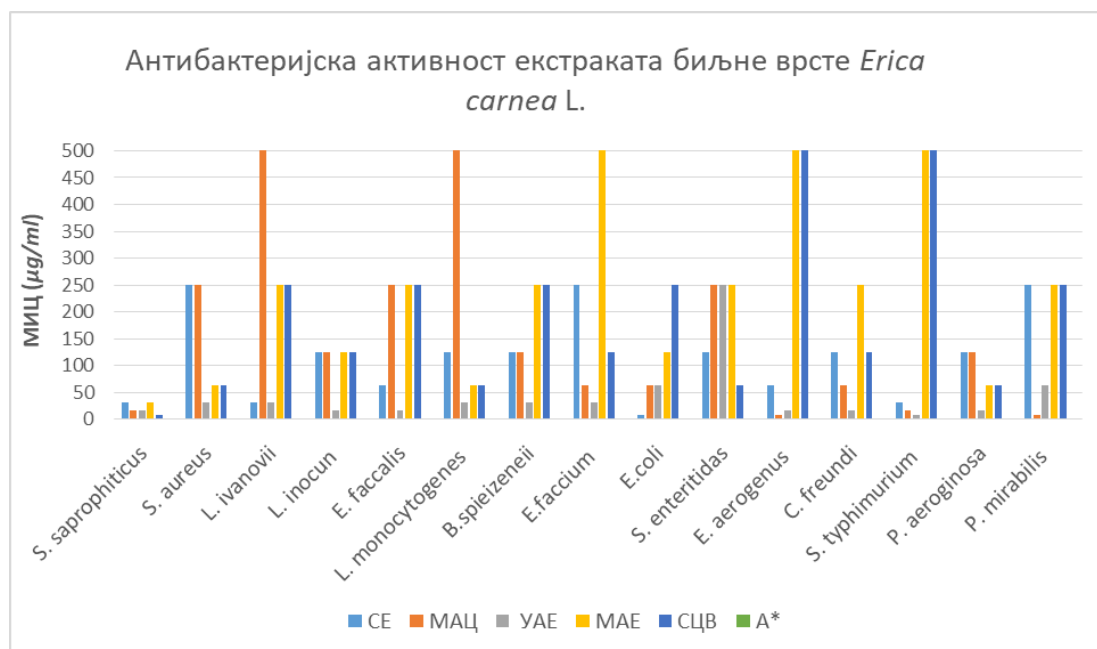
МИЦ – минимална инхибиторна концентрација изражена у $\mu\text{g/ml}$ за екстракте биљака, Г- бактеријска врста по Граму, СЕ - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом, А - амрацин

За биљну врсту *L. thuringiaca* L. добијени резултати показују да екстракти који су добијени различитим техникама екстракције показују дејство испољено у већој или мањој мери према одређеним бактеријским врстама. Сматрамо да до ове разноликости долази услед разноврсности у хемијском профилу екстраката који су добијени различитим екстрактивним техникама. Генерално посматрано можемо уочити да су екстракти биљке *L. thuringiaca* L. који су добијени савременим техникама екстракције показали бољу антибактеријску активност од екстраката који су добијеним класичним, конвенционалним методама.

Добијени резултати испитивања нам указују да најснажнију активност показују екстракти биљне врсте *L. thuringiaca* L. добијени техником ултразвучне екстракције. Екстракт биљне врсте *L. thuringiaca* L. који је добијен методом ултразвучне екстракције најјаче дејство испољава према врсти *S. typhimurium* (АТСС 14028) са вредношћу МИЦ која износи $7.81 \mu\text{g/ml}$, док умерено дејство са вредношћу МИЦ од $15.82 \mu\text{g/ml}$ испољава на бактеријске врсте *S. saprothiticus* (АТСС 15035), *L. inocun* (АТСС 33090), *E. faccalis* (АТСС 2912), *E. aerogenus* (АТСС 13048), *C. freundi* (АТСС 43864) и *P. aeroginosa* (АТСС 27853). Екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције са водом показује веома добру антибактеријску активност. Најјаче дејство овог екстракта је испољено према бактеријској врсти *S. saprothiticus* (АТСС15035) са вредностима МИЦ-а $7.81 \mu\text{g/ml}$. Екстракти добијени конвенционалним методама, у првом реду мацерацијом према бактеријама *E. aerogenus* (АТСС 13048) и *P. mirabilis* (АТСС 36659) показује веома јако

инхибиторно антибактеријско дејство, са вредностима МИЦ од 7.81 $\mu\text{g/ml}$ и умерено инхибиторно антибактеријско дејство на сојеве бактерија *S. saprothiticus* (ATCC 15035) и *S. typhimurium* (ATCC 14028) са МИЦ од 15.82 $\mu\text{g/ml}$. Екстракт добијен Сокслетовом екстракцијом показује веома јаку инхибиторну антибактеријску активност на бактеријску врсту *S. enteritidas* (ATCC 13076) (МИЦ=7.81 $\mu\text{g/ml}$) док према осталим испитиваним бактеријским сојевима показује умерену антибактеријску активност. Узимајући у обзир све добијене резултате, примећујемо да су све бактеријске врсте у мањој или већој мери биле подложне дејству добијених екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L., а најаче антибактеријско дејство забележено је код екстракта који је добијен савременом техником ултразвучне екстракције. Такође, поређењем свих антибактеријске активности свих екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L., са стандарним антибиотиком амрацином, може се закључити да екстракти показују веома јаку до умерену антибактеријску активност. Дакле, сви испитивани екстракти биљне врсте *L. thuringiaca* L. испољавају веома јаку до умерену антибактеријску активност према испитиваним сојевима бактерија.

Резултати антибактеријске активности различитих екстраката биљне врсте *E. carnea* L. према одабраним сојевима бактерија дати су на хистограму 8.



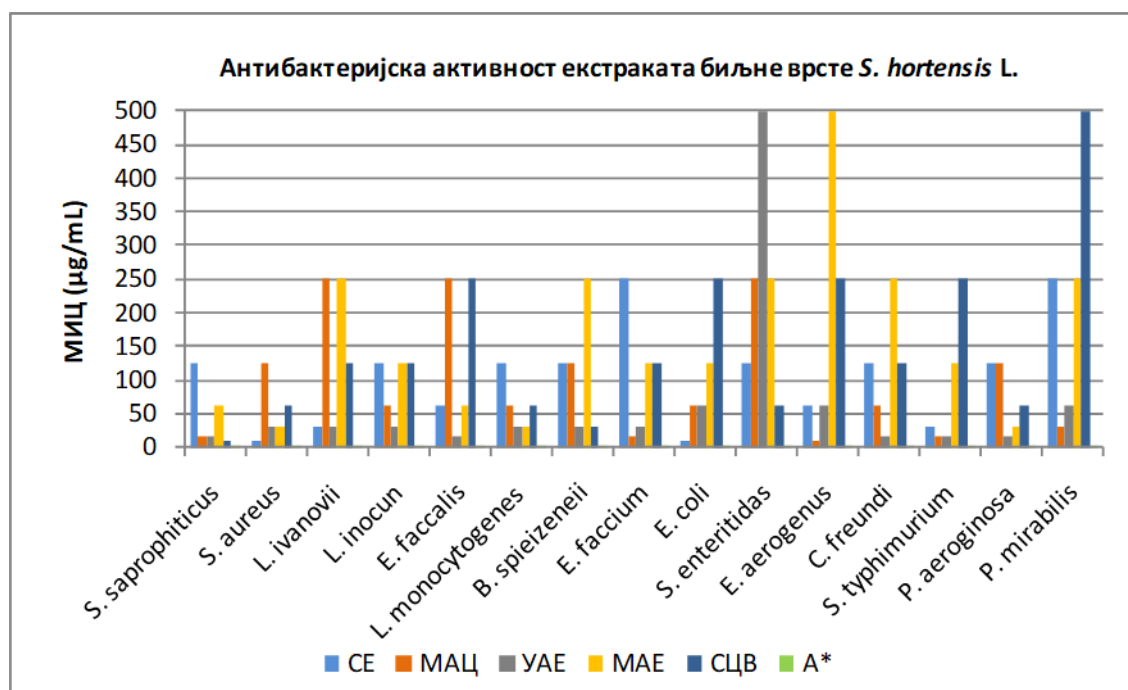
Хистограм 4. Антибактеријске активности екстраката биљне врсте *Erica carnea* L.

МИЦ – минимална инхибиторна концентрација изражена у $\mu\text{g/mL}$ за екстракте биљака, Г- бактеријска врста по Граму, СЕ - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом, А - амрацин

Екстракти биљне врсте *E. carnea* L. показују извесне сличности са антибактеријском активношћу екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. Екстракт који је добијени савременом техником екстракције ултразвучне екстракције у овом случају показују јачу антибактеријску активност према одабраним сојевима бактерија од екстраката који су добијени конвенционалним методама. Такође и у односу на екстракте добијене другим двема савременим методама микроталасном и субкритичном екстракцијом са водом. Најснажније антибактеријско дејство показује екстракт *E. carnea* L. који је добијен техником ултразвучне екстракције. Екстракт биљне врсте који је добијен овом методом најаче дејство испољава према бактеријској врсти *S. typhimurium*

(ATCC 14028) где је вредност МИЦ-а $7.81 \mu\text{g/ml}$. Умерено дејство екстракта УАЕ испољено је према врстама *S. saprothiticus* (ATCC 15035), *L. innocu* (ATCC 33090), *E. faecalis* (ATCC 2912), *E. aerogenus* (ATCC 13048), *C. freundii* (ATCC 43864) и *P. aeruginosa* (ATCC 27853) са вредности МИЦ-а $15.82 \mu\text{g/ml}$. Екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције са водом не показује израженију антибактеријску активност на испитиване сојеве бактерија, осим у случају бактеријске врсте *S. saprothiticus* (ATCC 15035), на коју највише делује овај екстракт са вредности МИЦ-а $7.82 \mu\text{g/ml}$. Уопштено, екстракти који су добијени конвенционалним техникама екстракције показују слабију антибактеријску активност од екстракта који је добијен савременом екстрактивном техником ултразвучне екстракције. Екстракт добијен мацерацијом (МАЦ) према бактеријским врстама *E. aerogenus* (ATCC 13048) и *P. mirabilis* (ATCC 36659) показује веома јаку антибактеријску моћ са вредности МИЦ-а $7.81 \mu\text{g/ml}$, а умерено јако дејство према бактеријским врстама *S. saprothiticus* (ATCC 15035) и *S. typhimurium* (ATCC 14028) (МИЦ= $15.82 \mu\text{g/ml}$). Екстракт биљне врсте *E. carnea* L. који је добијен Сокслетовом екстракцијом показује сличну антибактеријску активност као екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције са водом. Овај екстракт веома јако делује на бактеријску врсту *E. coli* (ATCC 25922), (МИЦ= $7.81 \mu\text{g/ml}$).

Резултати антибактеријске активности различитих екстраката биљне врсте *S. hortensis* L. према одабраним сојевима бактерија дати су на хистограму 9.



Хистограм 5. Антибактеријске активности екстраката биљне врсте *S. hortensis* L.

МИЦ – минимална инхибиторна концентрација изражена у $\mu\text{g/mL}$ за екстракте биљака, Г- бактеријска врста по Граму, СЕ - Сокслет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом, А - амрацин

Екстракти биљне врсте *S. hortensis* L. показују извесне сличности са антибактеријском активношћу екстраката биљне врсте *E. carnea* L. и *L. thuringiaca* L. Екстракт који је добијени савременом техником екстракције ултразвучне екстракције у овом случају показују јачу антибактеријску активност према појединим одабраним сојевима бактерија од екстраката који су добијени конвенционалним методама. Такође,

и у односу на екстракте добијене другим двома савременим методама микроталасном и субкритичном екстракцијом са водом. Најснажније антибактеријско дејство показује екстракт *S. hortensis* L. који је добијен техником ултразвучне екстракције. Екстракт биљне врсте који је добијен овом методом најјаче дејство испољава према бактеријској врсти *S. typhimurium* (АТСС 14028) где је вредност МИЦ-а 15,82 µg/ml. Умерено дејство екстракта УАЕ испољено је према врстама *S. saprohiticus* (АТСС 15035), *L. inocun* (АТСС 33090), *E. faccalis* (АТСС 2912), *E. aerogenus* (АТСС 13048), *C. freundii* (АТСС 43864) и *P. aeruginosa* (АТСС 27853) са вредности МИЦ-а 15.82 µg/ml. Екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције водом не показује израженију антибактеријску активност на испитиване сојеве бактерија, осим у случају бактеријске врсте *S. saprohiticus* (АТСС 15035), на коју највише делује овај екстракт са вредности МИЦ-а 7.82 µg/ml. Уопштено, екстракти који су добијени конвенционалним техникама екстракције показују слабију антибактеријску активност од екстракта који је добијен савременом екстрактивном техником ултразвучне екстракције. Екстракт добијен мацерацијом (МАЦ) према бактеријским врстама *E. aerogenus* (АТСС 13048) и *P. mirabilis* (АТСС 36659) показује веома јаку антибактеријску моћ са вредности МИЦ-а 7.81 µg/ml, а умерено јако дејство према бактеријским врстама *S. saprohiticus* (АТСС 15035) и *S. typhimurium* (АТСС 14028) (МИЦ=15.82µg/ml). Екстракт биљне врсте *S. hortensis* L. који је добијен Сокслетовом екстракцијом показује сличну антибактеријску активност као екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције са водом. Овај екстракт веома јако делује на бактеријске врсте *E.coli* (АТСС 25922) и *S. aureus* (АТСС 25923) са вредношћу МИЦ-а од 7.81 µg/ml.

Антибактеријско дејство екстраката биљака које смо установили према различитим сојевима бактерија може се приписати њиховој структури односно једињењима која се налазе у добијеним екстрактима биљака. У испитиваним екстрактима, обе биљне врсте, према квантитативној анализи доминантне компоненте су рутин, кверцетин и рузмаринска киселина за која је познато да испољавају антибактеријско дејство. Ова једињења су предмет антибактеријског проучавања великог броја студија [296-298]. Како фенолним једињењима припада велики број једињења разврстаних у различите класе, навешћемо нека од њих који су са аспекта нашег рада интересантни, а која су идентификована у екстрактима испитиваних биљних врста *L.thuringiaca* L., *Erica carnea* L. и *S. hortensis* L.

Од фенолних једињења у биљкама, утврђено је да флавоноиди поседују антибактеријску активност [299,300]. Екстракт биљне врсте *L. thuringiaca* L који је добијен техником ултразвучне екстракције показује најснажнију антибактеријску активност и то посебно у односу на бактеријску врсту *S. typhimurium* (АТСС 14028) а умерено дејство на сојеве *E. faccalis* (АТСС 2912), *P. aeruginosa* (АТСС 27853). Овај екстракт у себи садржи у највећим количинама кверцетин, рутин, апигенин, кампферол, нарингенин, Једињења попут кампферола, кверцетина, рутина и нарингенина показују успешно антибактеријско дејство на више бактеријских сојева [301]. Кверцетин и апигенин показују инхибиторну активност на ДНА гиразу бактеријске врсте *Escherichia coli* [302,303].

Екстракт добијен Сокслетовом екстракцијом показује изузетну антибактеријску активност на бактеријску врсту *S. enteritidas* (АТСС 13076) са вредношћу МИЦ-а од 7.81 µg/ml. Такође, овај тренд се односи и на биљну врсту *Erica carnea* L. Најснажнија антибактеријска активност забележена код екстракта УАЕ и испољена је пре свега на бактеријску врсту *S. typhimurium* (АТСС 14028), а умерено дејство екстракта испољено је на сојеве *E. faccalis* (АТСС 2912),и *P. aeruginosa* (АТСС 27853), али такође и на *S. saprohiticus* (АТСС 15035), *L. inocun* (АТСС 33090), *E. aerogenus* (АТСС 13048), *C.*

freundi (АТСС 43864). Овај екстракт садржи такође кемпферол, кверцетин, апигенин, лутеолин, нарингенин у знатним количинама. Према истраживањима кверцетин инхибира развој биофилма низа бактеријских патогена попут *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* [304]. Екстракт добијен Сокслетовом екстракцијом показује сличну антибактеријску активност као екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције са водом. Овај екстракт веома јако делује на бактеријску врсту *E.coli*(АТСС 25922) (МИЦ=7.81 mg/ml). Овај екстракт садржи велику количину кверцетина али и осталих једињења попут, рутина, кампферола, апигенина, лутеолина, нарингенина. У нашем истраживању је позитивно дејство екстраката биљака на бактеријске врсте *S.aureus*, *P. aeruginosa* и *E.coli*. Познато је синергијско дејство рутина, морина и кверцетина управо на бактеријску врсту *Staphylococcus aureus* [305]. Утврђено је да када се флавоноиди користе у комбинацији са антибиотцима међусобно повећавају активност против тестираних бактерија. Флавоноиди сами или у комбинацији такође општењу мембрану бактеријских ћелија, а анализе скрининга на антибиотике и флавоноиде указивале су на активност флаваноида против тести раних бактерија, кверцетин је био најефикаснији флавоноид, док се комбинација морин + рутин + кверцетин показала најефикаснијом [305]. Такође, лутеолин, нарингин, кверцетин и рутин ефикасно инхибирају раст бактерија *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus* [306]. Приликом испитивања антибактеријског дејства екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. резултати нам показују да најснажнију активност испољавају екстракти који су добијени техником ултразвучне екстракције. Екстракт биљке који је добијен методом ултразвучне екстракције испољава најаче дејство према врсти *S. typhimurium* (АТСС 14028), умерено јако дејство на бактеријску врсту *P. aeruginosa* (АТСС 27853), али и бактеријске врсте *L. innocu* (АТСС 33090) и *E. faecalis* (АТСС 2912), *E. aerogenus* (АТСС 13048) и *C. freundii* (АТСС 43864). Екстракт добијен мацерацијом (МАЦ) према бактеријама *E. aerogenus* (АТСС 13048) и *P. mirabilis* (АТСС 36659) показује веома јаку антибактеријску активност са МИЦ 7.81 mg/ml, а умерено јако и МИЦ од 15.82 mg/ml на врсту *S. typhimurium* (АТСС 14028). Уколико пратимо количину кверцетина, кемпферола и апигенина у екстрактима, примећујемо да овај екстракт садржи кверцетин у количини која је друга по величини од највеће количине у екстракту добијеном Сокслетовом екстракцијом од 5.120 mg/g, а у екстракту добијеном ултразвучном екстракцијом кверцетин се налази са 0.696 mg/g, као и кемпферол и апигенин који су присутни у одређеним количинама. Екстракт добијен Сокслетовом екстракцијом показује изузетну антибактеријску активност на бактеријску врсту *S. enteritidis* (АТСС 13076) са вредношћу МИЦ од 7.81 mg/ml, а на основу добијених резултата примећујемо да овај екстракт садржи највећу количину кверцетина од свих пет екстраката 5.120 mg/g, као и апигенина (1.742 mg/g,) и кемпферола (1.539 mg/g) чиме бисмо могли објаснити успешно дејство у тој мери на ову бактеријску врсту. Умерено дејство екстракта УАЕ испољено је на врсте *S. saprothiticus* (АТСС 15035), *L. innocu* (АТСС 33090), *E. faecalis* (АТСС 2912), *E. aerogenus* (АТСС 13048), *C. freundii* (АТСС 43864) и *P. aeruginosa* (АТСС 27853), с обзиром да овај екстракт садржи малу количину кверцетина од свега 0.122 mg/g, кемпферола 0.020 mg/g, а апигенина 0.016 mg/g. Екстракт који је добијен мацерацијом према бактеријским врстама *E. aerogenus* (АТСС 13048) и *P. mirabilis* (АТСС 36659) показује веома успешно антибактеријско дејство са вредношћу МИЦ од 7.81 mg/mL, а умерено дејство МИЦ је 15.82 mg/mL на врсту *S. saprothiticus* (АТСС 15035) и *S. typhimurium* (АТСС 14028). Количина кверцетина у овом екстракту је 0.696 mg/g, друга највећа количина одмах иза највеће количине кверцетина у Сокслетовом екстракту од 5.120 mg/g. Екстракт који је добијен Сокслетовом екстракцијом показује сличну антибактеријску активност као екстракт који је добијен поступком субкритичне

екстракције са водом. Овај екстракт веома јако делује на бактеријску врсту *E.coli* (АТСС 25922) са вредношћу МИЦ 7.81 mg/ml. Овај екстракт садржи највећу количину кверцетина од свих пет екстраката 7.151 mg/g, много већу него у Сокслетовом екстракту биљне врсте *L. thuringiaca* L. (где износи 5.120 mg/g) те претпостављамо да се у прилог овако успешном антибактеријском дејству на бактеријску врсту *E.coli* може приписати и дејство кверцетина. Екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E.carnea* L. и *S. hortensis* L. генерално показују јаку до умерену антибактеријску моћ на испитиване сојеве микрорганизама. Осим флавоноида, веома изражено антибактеријско дејство поседују и деривати фенолних киселина попут рузмаринске киселине, која је идентификована у свих пет екстраката у високим концентрацијам. Резултати других аутора показују њено успешно антибактеријско дејство на сојеве грам позитивних и грам негативних бактерија [307,308]. Сматрамо да услед присуства наведених фенолних једињења (флавоноида и деривата фенолних киселина) испитивани екстракти испољавају веома високу активност према већини примењених бактеријских сојева.

6.4.3. Цитотоксична активност екстракта биљака *L. thuringiaca* L., *E.carnea* L. и *S. hortensis* L.

Одређивање цитотоксичне активности је извршено методом која је описана у поглављу 4.6.2. Цитотоксична активност различитих екстраката биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. испитан је на три ћелијске линије:

- Hep2c ћелије (хумана ћелијска линија карцинома цервикса),
- RD ћелије (хумана ћелијска линија добијена од људског рабдомиосаркома) и
- L2OB ћелије (ћелијске линије добијене из фибробласта миша).

Добијени резултати су изражени преко IC₅₀ вредности. Као критеријум веома добре цитотоксичне активности узет је критеријум Америчког националног института за карцином (енг. *American National Cancer Institute, NCI*), према коме је за биљне екстракте IC₅₀ < 30 µg/ml [285]. Као референтно једињење при одређивању користили смо цисплатину, *cys-* [Pt (NH₃)₂Cl₂].

Табела 6. Цитотоксична активност екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L.

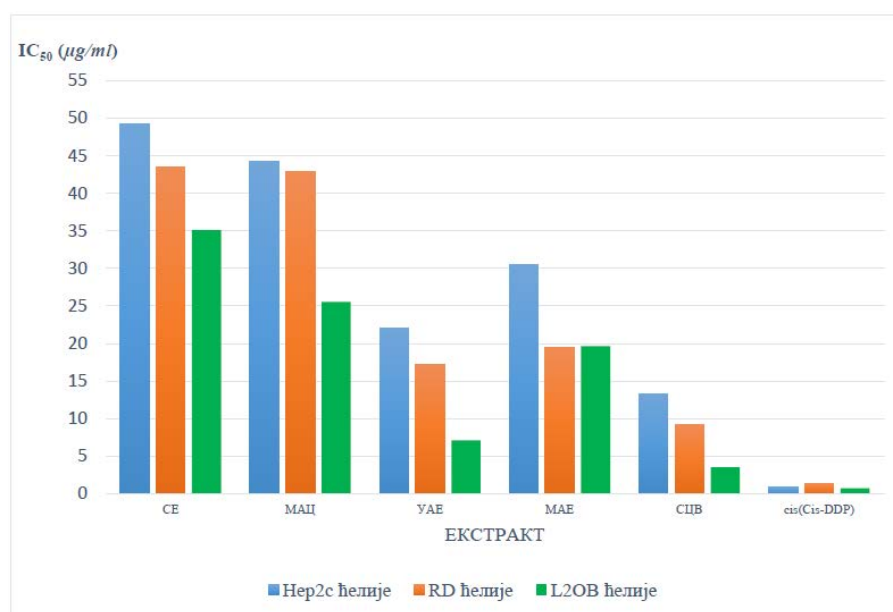
Екстракт	IC ₅₀ (µg/ml)		
	Hep2c ћелије	RD ћелије	L2OB ћелије
СЕ	49,26 ± 0,27	43,43 ± 0,46	35,09 ± 0,73
МАЦ	44,29 ± 0,49	42,84 ± 0,28	25,51 ± 0,99
УАЕ	21,98 ± 0,92	17,23 ± 0,79	7,09 ± 0,37
МАЕ	30,54 ± 1,02	19,54 ± 0,48	19,63 ± 0,79
СЦВ	13,34 ± 0,75	9,27 ± 0,35	3,51 ± 0,92
Cis-DDP	0,94 ± 0,55	1,40 ± 0,97	0,72 ± 0,64

СЕ - Сокслет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом, Hep2c ћелије (хумана ћелијска линија карцинома цервикса), RD ћелије (хумана ћелијска линија добијена од људског рабдомиосаркома) и L2OB ћелије (ћелијске линије добијене из фибробласта миша)

Цисплатина је један од најчешће коришћених антитуморских лекова. Међутим, клиничка ефикасност цисплатине ограничена је токсичним нежељеним ефекатима, посебно нефротоксичношћу. Старији пацијенти са раком плућа могу бити изложени

повећаном ризику од нефротоксичности цисплатина због коморбидитета који доводе до убрзаног старења бубрега [286,287,288]. Услед тога, тежи се испитивању биљних састојака који би без нуз ефеката могли показати успешно антитуморско деловање. У табели 22. дати су резултати испитивања цитотоксичне активности екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. на изабране ћелијске линије.

Најјачу цитотоксичну активност биљне врсте *L. thuringiaca* L. испољава екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције водом. Он несумњиво поседује најјачу цитотоксичну активност. Цитотоксична активност екстракта добијеног субкритичном екстракцијом са водом биљне врсте *L. thuringiaca* L. на изабране три ћелијске линијесе креће од 3,51 $\mu\text{g/ml}$ до 13,34 $\mu\text{g/ml}$. Примећујемо да је нарочито изражена и висока цитотоксична активност овог екстракта према ћелијама *L2OB* која износи 3,51 $\mu\text{g/ml}$. Такође високу ефикасност према истим ћелијама показује екстракт добијен ултразвучном екстракцијом где измерена вредност износи 7,09 $\mu\text{g/ml}$. Екстракт добијен микроталасном екстракцијом показује веома јаку цитотоксичну активност са вредношћу од 19,63 $\mu\text{g/ml}$, као и екстракт добијен поступком мацерације (25,51 $\mu\text{g/ml}$). На *Hep2c* ћелије, највеће дејство показује екстракт добијен поступком субкритичне екстракције са водом (13,34 $\mu\text{g/ml}$), као и екстракт добијен ултразвучном екстракцијом (21,98 $\mu\text{g/ml}$). Према ћелијама *RD* највећу цитотоксичност после екстракта добијеног поступком субкритичне екстракције са водом (9,27 $\mu\text{g/ml}$), најјачу активност показује екстракт добијен ултразвучном екстракцијом (17,23 $\mu\text{g/ml}$). Уочено је да цисплатина испољава јаке цитотоксичне ефекте односно показује високу цитотоксичну активност на све три ћелијске линије које смо користили. Најснажнији цитотоксични ефекат цисплатина је испољила на ћелијама *L2OB* ћелије са IC_{50} вредношћу од 0,72 $\mu\text{g/ml}$, затим следе ћелије *Hep2c* (0,94 $\mu\text{g/ml}$), а потом на *RD* ћелије (1,4 $\mu\text{g/ml}$) где је забележена најнижа вредност. Ради прегледнијег приказа резултата цитотоксичне активности екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L., исти су дати на хистограму 10.



Хистограм 6. Цитотоксична активност екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L.

CE - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом, Hep2c ћелије (хумана ћелијска линија карцинома цервикса), RD ћелије (хумана ћелијска линија добијена од људског рабдомиосаркома) и L2OB ћелије (ћелијске линије добијене из фибробласта миша)

У табели 23. и хистограму 11. приказани су резултати цитотоксичне активности екстракта биљне врсте *E. carnea* L.

Табела 7. Цитотоксична активност екстракта биљне врсте *E. carnea* L.

Екстракт	IC ₅₀ (µg/ml)		
	Hep2c ћелије	RD ћелије	L2OB ћелије
СЕ	34.26 ± 0.37	32.43 ± 0.46	33.09 ± 0.65
МАЦ	32.28 ± 0.44	30.84 ± 0.28	28.51 ± 0.14
УАЕ	31.70 ± 0.89	23.54 ± 0.48	22.63 ± 0.49
МАЕ	27.54 ± 0.32	19.23 ± 0.79	20.09 ± 0.60
СЦВ	11.54 ± 0.55	16.17 ± 0.35	18.51 ± 0.52
Cis-DDP	0.94 ± 0.55	1.4 ± 0.97	0.72 ± 0.64

СЕ - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом, Hep2c ћелије (хумана ћелијска линија карцинома цервикса), RD ћелије (хумана ћелијска линија добијена од људског рабдомиосаркома) и L2OB ћелије (ћелијске линије добијене из фибробласта миша)

Добијени резултати за биљну врсту *E. carnea* L. испољавају да најјачу цитотоксичну активност према ћелијским линијама испољава екстракт добијен поступком субкритичне екстракције са водом. У зависности од ћелијске линије цитотоксична активност овог екстракта се креће од 11,54 µg/ml до 18,51 µg/ml. Екстракт биљне врсте *E. carnea* L. добијен поступком субкритичне екстракције водом испољава јаку цитотоксичну активност према ћелијама Hep2c (11,54 µg/ml). Такође, високу цитотоксичну активност према истим ћелијама показује екстракт добијен микроталасном екстракцијом (27,54 µg/ml). RD ћелије су најосетљивије према екстракту добијеном поступком субкритичне екстракције са водом (16,17 µg/ml), као и микроталасном екстракцијом (19,23 µg/ml). L2OB ћелије показују велику осетљивост према екстракту добијеном поступком субкритичне екстракције са водом (18,51 µg/ml) и према екстракту добијеном микроталасном екстракцијом (20,09 µg/ml). Екстракт добијен ултразвучном екстракцијом показује значајну цитотоксичну активност према RD ћелијама (19,23 µg/ml) и L2OB ћелијама (20,09 µg/ml). Биоактивна једињења која доказано испољавају анти туморско дејство су полифенолна једињења [289]. Међу њима флавоноиди заузимају посебно место. Сматрамо да су ова једињења одговорна за испољавање управо цитотоксичних ефеката које показују испитивани екстракти. За неке од флавоноида, попут кверцетина који се налази у екстрактима испитиваних биљних врста, познато је да врше инхибицију раста малигних ћелија. Кверцетин може значајно смањити активност пролиферације ћелијске линије леукемије HL-60 [290]. Резултати неких аутора указују да је кверцетин у стању да суштински инхибира пролиферацију HepG2 ћелија и да индукује очигледну морфолошку промену ћелија [291]. Он такође поседује корисне антипролиферативне ефекте на аденокарцинома дебелог црева [292]. Осим кверцетина, многим студијама је показано и да апигенин ефикасно инхибира пролиферацију у више врста ћелија карцинома, укључујући карцином простате, дојке и леукемију [293-295]. Генерално, сви испитивани екстракти задовољавају критеријум Америчког националног института за карцином (енг. *American National Cancer Institute, NCI*), према коме за биљне екстракте износи IC₅₀ < 30 µg/ml. У поређењу са референтним стандардом ,Cis-DDP, екстракти испољавају умерену цитотоксичну активност. С обзиром да екстракти садрже ова једињења очекивано је испољавање цитотоксичних

ефеката. Овакав ефекат испитиваних екстракта потврђује могућу потенцијалну примену као нутрацеутика.



Хистограм 7. Цитотоксична активност екстракта биљне врсте *E. carnea* L.

СЕ - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом, Hep2c ћелије (хумана ћелијска линија карцинома цервикса), RD ћелије (хумана ћелијска линија добијена од људског рабдомиосаркома) и L2OB ћелије (ћелијске линије добијене из фибробласта миша)

У табели 24. и на хистограму 12 дати су резултати испитивања цитотоксичне активности екстракта биљне врсте *S. hortensis* L. на изабране ћелијске линије.

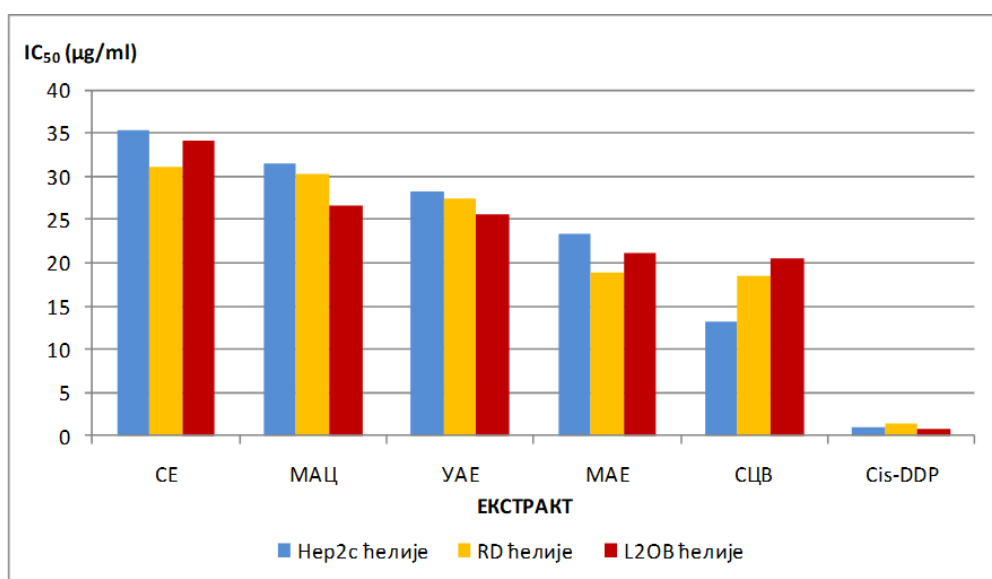
Табела 8. Цитотоксична активност екстракта биљне врсте *S. hortensis* L.

Екстракт	IC ₅₀ (µg/ml)		
	Hep2c ћелије	RD ћелије	L2OB ћелије
СЕ	35,29 ± 0,35	31,03 ± 0,76	34,09 ± 0,67
МАЦ	31,39 ± 0,49	30,17 ± 0,34	26,51 ± 0,45
УАЕ	28,15 ± 0,65	27,32 ± 0,54	25,63 ± 0,09
МАЕ	23,43 ± 0,35	18,87 ± 0,87	21,09 ± 0,66
СЦВ	13,23 ± 0,19	18,43 ± 0,30	20,51 ± 0,24
Cis-DDP	0,94 ± 0,55	1,40 ± 0,97	0,72 ± 0,64

СЕ - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом, Hep2c ћелије (хумана ћелијска линија карцинома цервикса), RD ћелије (хумана ћелијска линија добијена од људског рабдомиосаркома) и L2OB ћелије (ћелијске линије добијене из фибробласта миша)

Најјачу цитотоксичну активност биљне врсте *S. hortensis* L. испољава екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције водом. Он несумњиво поседује најјачу цитотоксичну активност. Цитотоксична активност екстракта добијеног субкритичном екстракцијом водом биљне врсте *S. hortensis* L. на изабране три ћелијске линије се креће од 13,23 µg/ml до 20,51 µg/ml. Примећујемо да је нарочито изражена и висока цитотоксична активност овог екстракта према ћелијама Hep2c која износи 13,23

$\mu\text{g/ml}$. Такође високу ефикасност према истим ћелијама показује екстракт добијен микроталасном екстракцијом где измерена вредност износи $23,43 \mu\text{g/ml}$ према ћелијама *Hep2c* и $18,87 \mu\text{g/ml}$ према ћелијама *RD*. Екстракт добијен ултразвучном екстракцијом показује умерено јаку цитотоксичну активност са вредношћу од $25,63 \mu\text{g/ml}$ према *L2OB* ћелијама. Све три испитиване ћелијске линије испољиле су према екстрактима добијеним мацерацијом и сокслетовом екстракцијом приближно исте резултате. Уочено је да цисплатина испољава јаке цитотоксичне ефекте односно показује високу цитотоксичну активност на све три ћелијске линије које смо користили. Најснажнији цитотоксични ефекат цисплатина је испољила на ћелијама *L2OB* ћелије са IC_{50} вредношћу од $0,72 \mu\text{g/ml}$, затим следе ћелије *Hep2c* ($0,94 \mu\text{g/ml}$), а потом на *RD* ћелије ($1,4 \mu\text{g/ml}$) где је забележена најнижа вредност. Ради прегледнијег приказа резултата цитотоксичне активности екстраката биљне врсте *S. hortensis* L. исти су дати на хистограму 12.



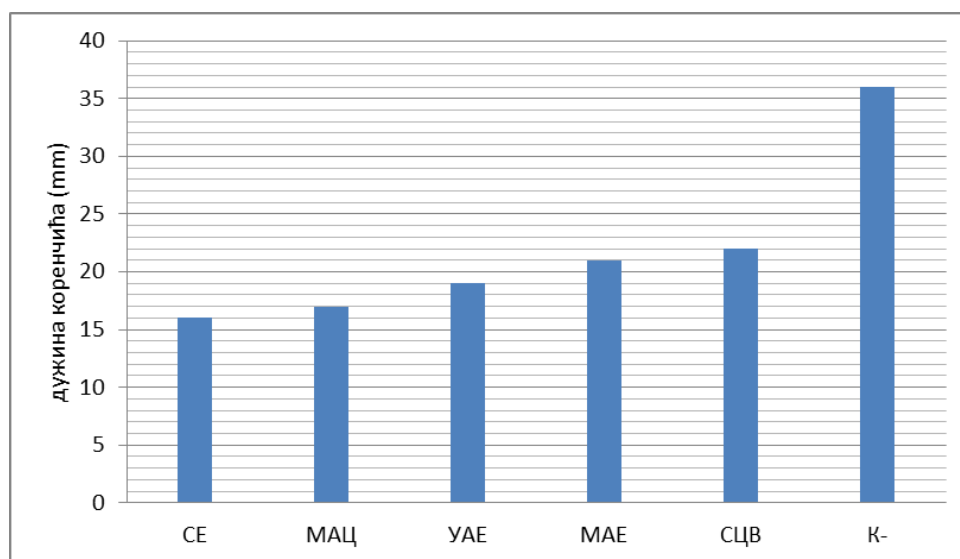
Хистограм 8. Цитотоксична активност екстраката биљне врсте *S. hortensis* L.

CE - Сокслет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом, Hep2c ћелије (хумана ћелијска линија карцинома цервикса), RD ћелије (хумана ћелијска линија добијена од људског рабдомиосаркома) и L2OB ћелије (ћелијске линије добијене из фибробласта миша)

6.4.4. Одређивање опште токсичности и генотоксичности *Allium анафазно-мелофазним* тестом екстракта биљне врсте *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L.

Стерен токсичности испитиваних узорака је оцењен помоћу средње дужине раста корена у односу на негативну контролу. Значајна инхибиција раста у односу на негативну контролу (хистограм 13.) је примећена код свих испитиваних екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. Екстракти биљне врсте *L. thuringiaca* L. немају повећан ниво генотоксичног потенцијала. Пошто екстракти немају повећан ниво генотоксичног потенцијала, још увек су далеко од мутагености добијене за позитивну контролу. У анализи су детектована два типа аберација. Први тип је резултат поремећаја деобног вретена и обухвата заостале хромозоме, мултиполарне конфигурације и ц-митозу, док је други тип настао деловањем на хромозоме и укључује мостове и фрагменате. Оба типа се јављају у неким ћелијама истовремено. У аберантним ћелијама је много учесталија

прва група аберација што указује да тестирани узорци претежно делују на тај начин што нарушавају деобна вретена.



Хистограм 9. Просечна дужина коренчића у анализираним екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L.

CE - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом, (К-) - негативна контрола,

У табели 25. дати су резултати различитих тирова аберација у ћелијама врха корена лука изложена на различитим екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L. у концентрацијама 125 mg/ml, 62,5 mg/ml и 31,25 mg/ml за сваки испитивани екстракт.

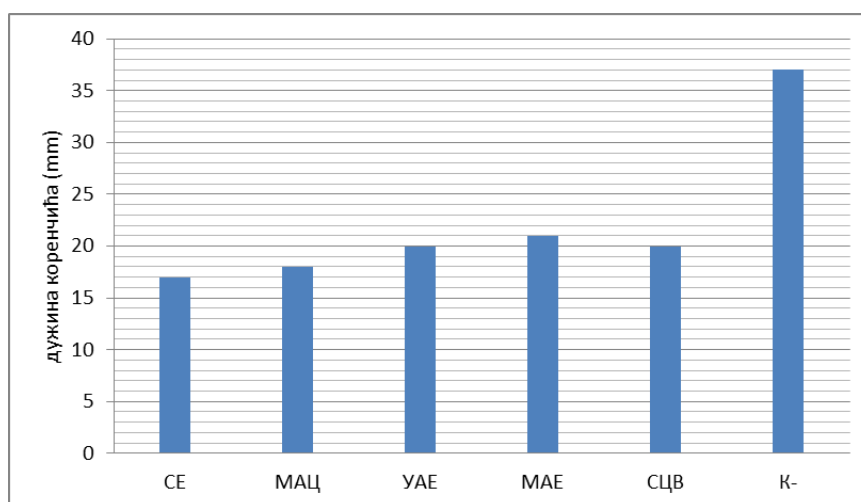
Табела 9. Број различитих тирова аберација у ћелијама врха корена лука изложена на различитим екстрактима биљне врсте *L. thuringiaca* L. у различитим концентрацијама

Екстракт	узорак	BR	FR	MP	Vch	Сm	МА	Укупан број анализираних ћелија	Ненормалне ћелије (%)
CE	I (125 mg/ml)	1	1	23	21	1	7	610	8,8
	II (62,5 mg/ml)	3	-	24	15	2	6	615	8,1
	III (31,25 mg/ml)	6	-	17	13	-	3	620	6,3
	К-	3	-	11	5	-	1	635	3,1
	К+	23	3	11	23	6	24	551	16,3
МАЦ	I (125 mg/ml)	1	-	19	20	1	8	605	8,0
	II (62,5 mg/ml)	2	-	22	14	1	7	632	7,3
	III (31,25 mg/ml)	4	-	12	11	-	2	618	4,7
	К-	1	-	9	4	-	1	628	2,4
	К+	21	4	15	22	7	26	601	15,8
УАЕ	I (125 mg/ml)	1	-	18	17	-	5	602	6,8
	II (62,5 mg/ml)	2	-	22	12	-	5	621	6,3
	III (31,25 mg/ml)	3	-	10	7	-	2	613	3,6
	К-	1	-	8	4	-	1	628	2,2

Екстракт	узорак	BR	FR	MP	Vch	Сm	МА	Укуран број анализираних ћелија	Ненормалне ћелије (%)
МАЕ	К+	19	2	14	19	4	27	576	14,1
	I (125 mg/ml)	1	-	17	14	1	6	623	6,3
	II (62,5 mg/ml)	1	-	20	9	-	4	635	5,4
	III (31,25 mg/ml)	1	-	19	5	-	1	606	4,3
	К-	1	-	5	3	-	1	619	1,6
СЦВ	К+	21	3	17	21	3	28	595	15,6
	I (125 mg/ml)	1	-	14	13	1	4	631	5,3
	II (62,5 mg/ml)	1	-	18	9	1	2	638	4,9
	III (31,25 mg/ml)	1	-	16	4	-	1	619	3,6
	К-	1	-	4	2	-	1	621	1,3
	К+	21	3	17	21	3	30	603	15,8

(К-)- негативна контрола, (К +)- позитивна контрола, BR- мостови, FR - фрагменти, MP – мултиполарност, Vch - лутајући хромозоми, Сm - ц митози, МА - ћелија са више аберација, *СЕ - Соклет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом.

Стерен токсичности испитиваних узорак биљне врсте *E. carnea* L. је оцењен помоћу средње дужине раста корена у односу на негативну контролу (хистограм 14). Екстракти биљне врсте *E. carnea* L. немају повећан ниво генотоксичног потенцијала. Пошто екстракти немају повећан ниво генотоксичног потенцијала, још увек су далеко од мутагености добијене за позитивну контролу. У анализи су детектована два тира аберација. Први тип је резултат поремећаја деобног вретена и обухвата заостале хромозоме, мултироларне конфигурације и ц-митозу, док је други тип настао деловањем на хромозоме и укључује мостове и фрагменте. Оба типа се јављају у неким ћелијама истовремено. У аберантним ћелијама је много учесталија прва група аберација што указује да тестирани узорци претежно делују на тај начин што нарушавају деобна вретена.



Хистограм 10. Просечна дужина коренчића у анализираним екстрактима биљне врсте *E. carnea* L.

СЕ - Соклет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом, (К-)- негативна контрола,

У табели 26. дати су резултати различитих тирова аберација у ћелијама врха корена лука изложена на различитим екстрактима биљне врсте *E. carnea* L. у концентрацијама 125 mg/ml, 62,5 mg/ml и 31,25 mg/ml за сваки испитивани екстракт.

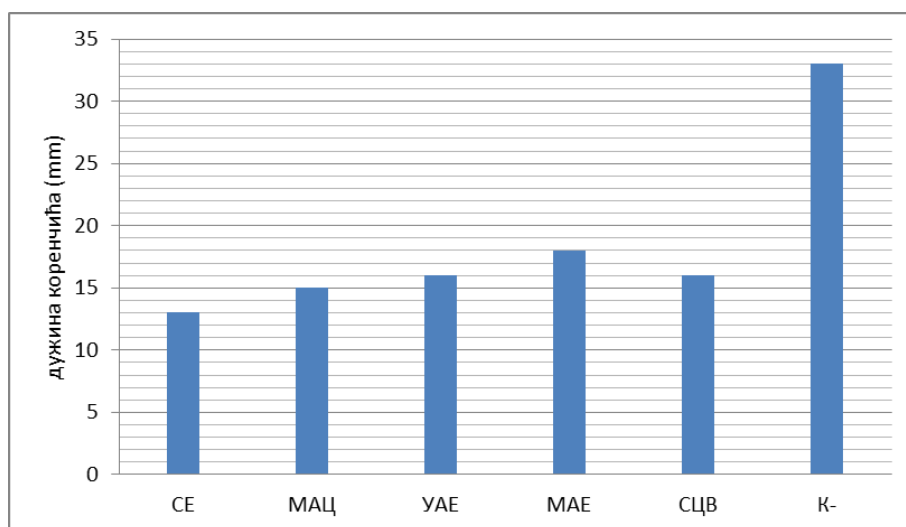
Табела 10. Број различитих тирова аберација у ћелијама врха корена лука изложена на различитим екстрактима биљне врсте *E. carnea* L. у различитим концентрацијама

Екстракт	узорак	BR	FR	MP	Vch	Сm	МА	Укупан број анализираних ћелија	Ненормалне ћелије (%)
СЕ	I (125 mg/ml)	2	2	25	27	3	9	621	11
	II (62,5 mg/ml)	3	-	21	15	2	7	618	7,8
	III (31,25 mg/ml)	5	1	16	14	1	5	620	6,8
	K-	1	-	15	6	-	1	629	3,7
	K+	24	5	17	24	6	23	565	17,5
МАЦ	I (125 mg/ml)	3	1	17	20	1	5	622	7,6
	II (62,5 mg/ml)	2	1	20	14	1	6	639	6,9
	III (31,25 mg/ml)	1	-	16	13	1	2	631	5,2
	K-	1	-	9	5	1	2	625	2,9
	K+	21	4	19	26	9	27	595	17,8
УАЕ	I (125 mg/ml)	1	-	10	19	1	7	613	10,9
	II (62,5 mg/ml)	1	1	21	12	1	3	629	6,2
	III (31,25 mg/ml)	3	-	10	7	-	2	625	3,5
	K-	1	-	6	3	1	1	632	1,9
	K+	15	1	24	18	3	25	615	14
МАЕ	I (125 mg/ml)	2	1	19	11	1	5	558	7,0
	II (62,5 mg/ml)	3	-	21	7	1	3	630	5,6
	III (31,25 mg/ml)	1	1	17	3	-	1	615	3,7
	K-	1	-	3	4	-	1	622	1,4
	K+	23	4	15	21	4	22	601	14,8
СЦВ	I (125 mg/ml)	1	1	10	11	2	2	565	4,8
	II (62,5 mg/ml)	-	-	14	9	1	1	601	4,2
	III (31,25 mg/ml)	1	1	12	4	-	1	622	3,1
	K-	1	-	3	2	-	1	617	1,1
	K+	22	3	13	21	3	28	553	16,3

(K-) - негативна контрола, (K+) - позитивна контрола, BR - мостови, FR - фрагменти, MP - мултиполарност, Vch - лутајући хромозоми, Cm - ц митози, MA - ћелија са више аберација, SE - Соклет екстракција, MAC - мацерација, UAE - ултразвучна екстракција, MAE - микроталасна екстракција, SCV - субкритична екстракција са водом.

Стерен токсичности испитиваних узорака биљне врсте *S. hortensis* L. је оцењен помоћу средње дужине раста корена у односу на негативну контролу. Значајна инхибиција раста у односу на негативну контролу (хистограм 15.) је примећена код свих испитиваних екстраката биљне врсте *S. hortensis* L. Екстракти биљне врсте *S. hortensis* L. немају повећан ниво генотоксичног потенцијала и још увек су далеко од мутагености добијене за позитивну контролу. У анализи су детектована два типа аберација. Први тип је резултат поремећаја деобног вретена и обухвата заостале хромозоме, мултиполарне

конфигурације и ц-митозу, док је други типнастаоделовањем на хромозоме и укључује мостове и фрагменте. Обатипа се јављају у неким ћелијама истовремено. У аберантним ћелијама је много учесталија прва група аберација што указује да тестирани узорци претежно делују на тај начин што нарушавају деобна вретена.



Хистограм 11. Просечна дужина коренчића у анализираним екстрактима биљне врсте *S. hortensis* L.

CE - Соклет екстракција, МАЦ - мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција водом, (K-) - негативна контрола,

У табели 27. дати су резултати различитих тирова аберација у ћелијама врха корена лука изложена на различитим екстрактима биљне врсте *S. hortensis* L. у концентрацијама 125 mg/ml, 62,5 mg/ml и 31,25 mg/ml за сваки испитивани екстракт.

Табела 11. Број различитих тирова аберација у ћелијама врха корена лука изложена на различитим екстрактима биљне врсте *S. hortensis* L. у различитим концентрацијама

екстракт	узорак	BR	FR	MP	Vch	Cm	MA	Укупан број анализираних ћелија	Ненормалне ћелије (%)
CE	I (125 mg/ml)	1	-	22	19	-	5	605	7,7
	II (62,5 mg/ml)	1	-	20	15	1	4	610	6,7
	III (31,25 mg/ml)	2	-	16	13	-	3	625	5,4
	K-	3	-	10	7	-	1	628	3,3
	K+	21	2	14	22	4	25	555	15,8
МАЦ	I (125 mg/ml)	1	1	18	17	-	6	552	7,8
	II (62,5 mg/ml)	1	-	20	12	-	4	612	6,0
	III (31,25 mg/ml)	2	-	9	9	-	1	602	3,5
	K-	1	-	7	5	-	1	613	2,3
	K+	20	3	17	21	5	23	609	14,6
УАЕ	I (125 mg/ml)	1	-	14	15	-	4	543	6,3
	II (62,5 mg/ml)	1	-	19	13	-	5	632	6,0
	III (31,25 mg/ml)	2	-	11	6	-	2	607	3,5
	K-	1	-	7	2	-	1	631	1,7

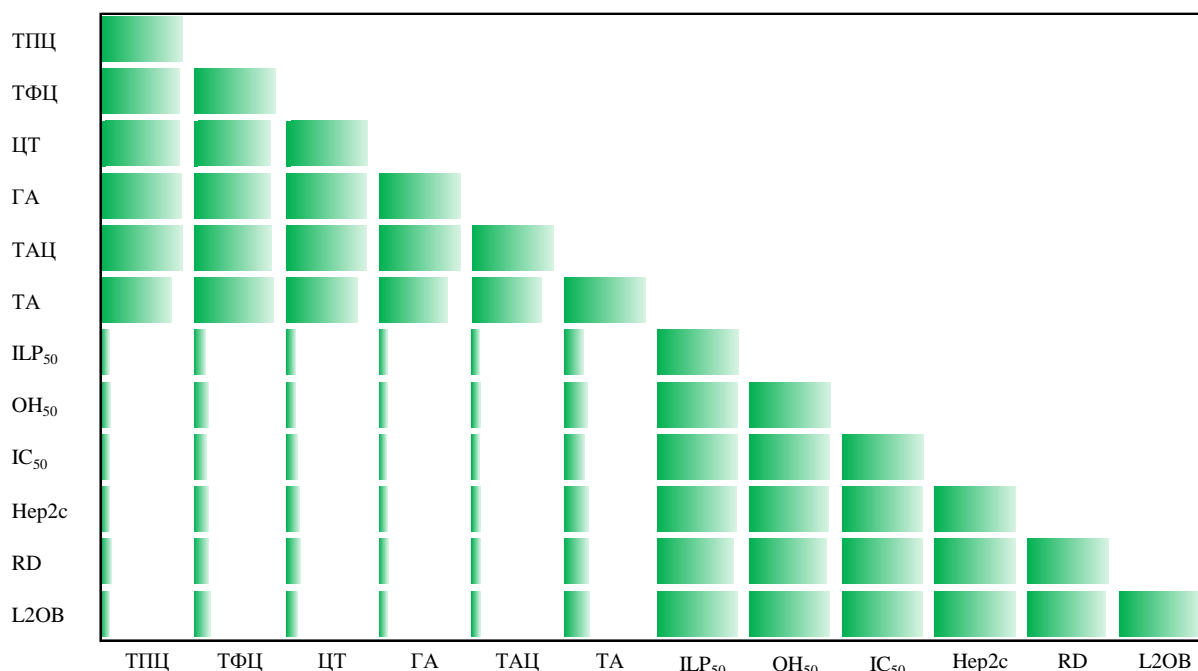
екстракт	узорак	BR	FR	MP	Vch	Сm	МА	Укупан број анализираних ћелија	Ненормалне ћелије (%)
МАЕ	К+	15	1	12	20	6	24	509	10,6
	I (125 mg/ml)	1	-	16	15	1	7	619	6,5
	II (62,5 mg/ml)	1	-	21	7	-	5	639	5,3
	III (31,25 mg/ml)	1	1	17	4	-	1	611	3,9
	К-	1	1	5	2	-	1	620	1,6
СЦВ	К+	20	2	18	20	2	25	587	14,8
	I (125 mg/ml)	1	1	13	12	1	5	624	5,3
	II (62,5 mg/ml)	1	1	17	8	1	3	639	4,8
	III (31,25 mg/ml)	1	-	17	5	-	1	635	3,8
	К-	1	-	5	1	-	1	628	1,3
	К+	19	4	18	19	3	26	605	14,7

(К-)- негативна контрола, (К +)- позитивна контрола, BR- мостови, FR - фрагменти, MP – мултиполарност, Vch - лутајући хромозоми, Cm - ц митози, МА - ћелија са више аберација, *СЕ - Соклет екстракција, МАЦ -мацерација, УАЕ - ултразвучна екстракција, МАЕ - микроталасна екстракција, СЦВ - субкритична екстракција са водом.

Испитивани екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. не показују повећане генотоксичне ефекте. За све испитиване екстракте код обе биљне врсте у концентрацијама већим од 125 mg/ml треба бити обазрив да би се избегли могући нус ефекти. На основу добијених резултата за испитивање опште токсичности и генотоксичности може се закључити да испитивани екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. не делују токсично и генотоксично. Ради потпуне безбедне примене испитиваних екстраката биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. препоручују се концентрације ниже од 125 mg/ml. Сви испитивани екстракти су још увек далеко од мутагености добијене за позитивну контролу, што заправо даје могућност употребе истих као потенцијалне природне нутрацеутике.

6.5. Статистичка обрада резултата

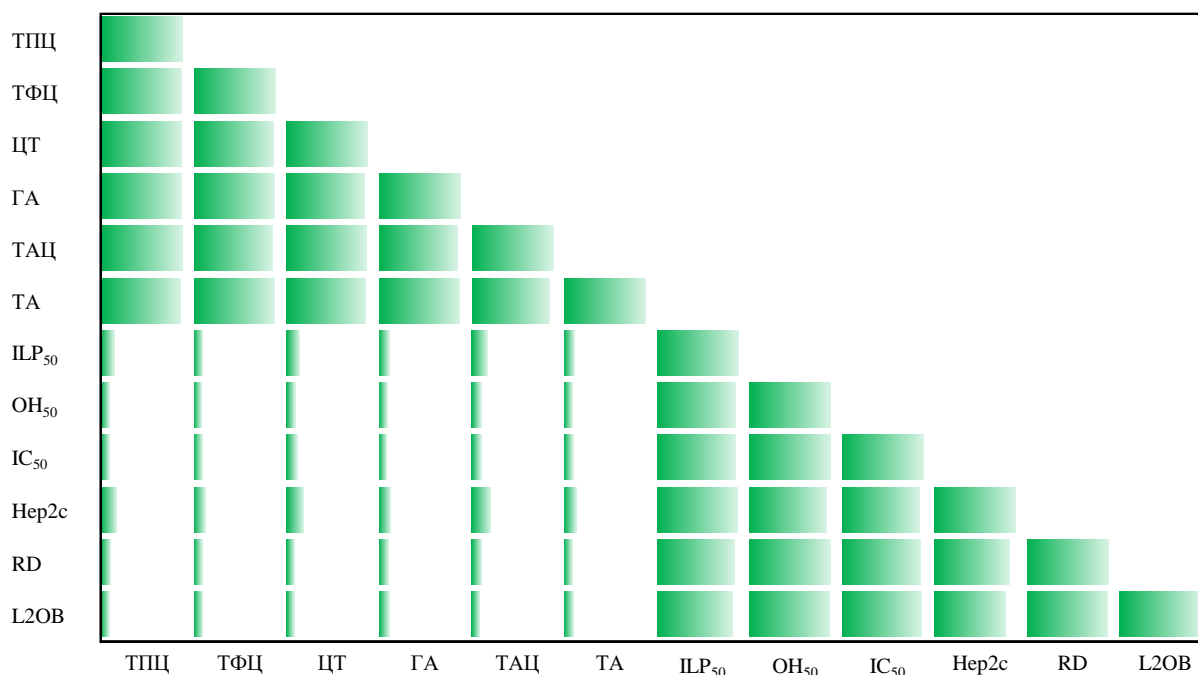
Коефицијент корелације по Пирсону (*Pearson*) између укупних фенола, укупних флавоноида, кондензованих танина, галотанина, укупних антоцијана, вредности IP_{50} , OH_{50} , IC_{50} , Her_{2c} , RD и $L2OB$ за биљну врсту *L. thuringiaca* L. су приказани на слици 44. Коефицијент корелације се може окарактерисати као изузетно висок ($r > 0.9$), висок ($0.9 > r > 0.7$), средњи ($0.7 > r > 0.5$) и слабе корелације ($r < 0.5$).



Слика 10. Пирсонов коефицијент корелације између испитиваних параметара за биљну врсту *L. thuringiaca* L.

На основу презентираних коефицијаната са слике 44. примећујемо да је већина коефицијената била висока и/или посебно висока. Коефицијент корелације је виши од 0,8 док је коефицијент између укупних фенола, OH₅₀, RD и L2OB, исто тако као између кондензованих танина и ТА био висок ($0.8 > r > 0.7$). Корелација између ТА и укупних фенола, галотанина и укупних антоцијана, исто као и између ТА и антиоксидативних тестова и цитотоксичних активности су биле средње ($0.7 > r > 0.5 <$). Негативна корелација између укупних фенола, укупних флавоноида, кондензованих танина, галотанина, укупних антоцијана и антиоксидативних и цитотоксичних активности одређују да је активност повећана уколико се ова једињења налазе присутна у екстракту. Са друге стране, позитивна и висока корелација између антиоксидативних и цитотоксичних тестова индицира да исте класе једињења би можда могле бити одговорне за биолошку активност.

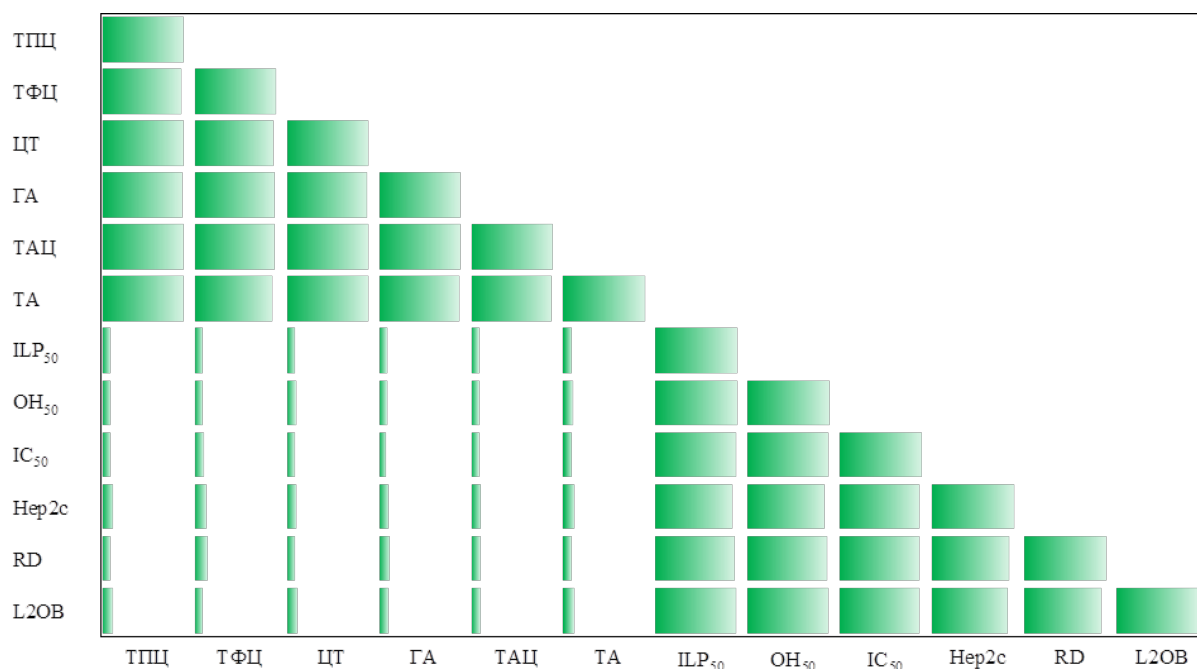
За биљну врсту *E. carnea* L. коефицијент корелације по Пирсону (*Pearson*) између укупних фенола, укупних флавоноида, кондензованих танина, галотанина, укупних антоцијана, вредности ILP₅₀, OH₅₀, IC₅₀, Hep2c, RD и L2OB приказан је на слици 45.



Слика 11. Пирсонов коефицијент корелације између између фенолних једињења за биљну врсту *E. carneae* L.

Коефицијент корелације се може окарактерисати као изузетно висок ($r > 0.9$), висок ($0.9 > r > 0.7$), средњи ($0.7 > r > 0.5$) и слабе корелације ($r < 0.5$). Корелативне анализе показују да је корелација између већине тестираних параметара била посебно висока ($r > 0.9$). Корелације између укупних фенола и ILP₅₀, Нер2с и укупних флавоноида, галотанина, укупних антоцијана, OH₅₀, IC₅₀ и RD, исто као и између L2OB и ILP₅₀, су били високи са $0.8 > r > 0.7$ што можда може бити прихваћено као добра корелација, док је корелација између Нер2с и укупних антоцијана била средња ($r = 0.6792$).

Коефицијент корелације по Пирсону (*Pearson*) између укупних фенола, укупних флавоноида, кондензованих танина, галотанина, укупних антоцијана, вредности ILP₅₀, OH₅₀, IC₅₀, Нер2с, RD и L2OB за биљну врсту *S. hortensis* L. су приказани на слици 46. Коефицијент корелације се може окарактерисати као изузетно висок ($r > 0.9$), висок ($0.9 > r > 0.7$), средњи ($0.7 > r > 0.5$) и слабе корелације ($r < 0.5$).



Слика 12. Пирсонов коефицијент корелације између између фенолних једињења за биљну врсту *S. hortensis* L.

На основу презентираних коефицијаната са слике 46. примећујемо да је већина коефицијената била висока и/или посебно висока. Коефицијент корелације је виши од 0,8 док је коефицијент између укупних фенола, OH_{50} , RD и L2OB, исто тако као између кондензованих танина и ТА био висок ($0.8 > r > 0.7$). Корелација између ТА и укупних фенола, галотанина и укупних антоцијана, исто као и између ТА и антиоксидативних тестова и цитотоксичних активности су биле средње ($0.7 > r > 0.5$). Негативна корелација између укупних фенола, укупних флавоноида, кондензованих танина, галотанина, укупних антоцијана и антиоксидативних и цитотоксичних активности одређују да је активност повећана уколико се ова једињења налазе присутна у екстракту. Са друге стране, позитивна и висока корелација између антиоксидативних и цитотоксичних тестова индицира да исте класе једињења би можда могле бити одговорне за биолошку активност.

Резултатима приказаним у овој докторској дисертацији показала се веома висока корелација између састојака једињења и биолошке активности екстраката. Корелација између обављених тестова, као и компоненте присутне у екстрактима указују на блиску конекцију па слободно можемо рећи да између полифенолних једињења и показаних биолошких активности припремљених екстраката постоји висока корелација. Из свега наведеног закључујемо да сви испитивани биљни екстракти садрже компоненте за које је доказано да се користе и као храна и као лек па отуда и асоцијација да исти могу наћи примену као потенцијални природни нутрацеутици.

6. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације извршена је фитохемијска и биохемијска карактеризација екстраката биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. који су добијени помоћу пет екстрактивних техника. У раду су примењене две конвенционалне и три савремене технике екстракције. Од конвенционалних екстракција су примењене Сокслетова (*Soxlet*) екстракција и мацерација, а од савремених ултразвучна екстракција, мироталасна екстракција и субкритична екстракција са водом. На основу резултата које смо добили након извршених анализа можемо извести следеће закључке:

- испитивањем екстраката биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. добијених помоћу пет екстрактивних техника спектрофотометријским методама показано је да сви екстракти садрже фенолна једињења у великим количинама. Највећу количину фенолних једињења поседују екстракти добијени савременим техникама екстракције- ултразвучном, микроталасном и субкритичном екстракцијом са водом. Ови екстракти садрже фенолна једињења у знатно вишим количинама од оних које се налазе у екстрактима који су добијени конвенционалним методама- Сокслетовом екстракцијом и мацерацијом. Од савремених техника екстракције техника која је доминантна у односу на остале је субкритична екстракција са водом - овом екстрактивном техником се добија највећа количина полифенола у екстрактима испитиваних биљака.
- екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. који су добијени савременим техникама екстракције су богатији флавоноидима од екстраката који су добијени конвенционалним методама. Такође, исти тренд запажен је и у случају кондензованих танина, галотанина и антоцијана. Наведена једињења су у знатно већој количини у екстракту добијеном савременом техником субкритичне екстракције са водом у односу на остале екстракте добијене осталим примењеним екстрактивним како савременим, тако и конвенционалним техникама.
- у погледу приноса екстракта у истраживању, према добијеним резултатима закључујемо да на принос екстраката веома утиче примењена техника екстракције. Разлика је приметна између конвенционалних и савремених метода. Већи принос је добијен код свих екстраката биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. када су у питању савремене технике екстракције. Највећи принос екстраката добијен је поступком субкритичне екстракције водом која је супериорнија у односу на остале три савремене, али и далеко ефикаснија у односу на примењене конвенционалне технике екстракције. Техником микроталасне екстракције се добија нешто мањи, али задовољавајући принос у односу на технику субкритичне екстракције са водом.
- хроматографским испитивањима у екстрактима биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. установљено је постојање великог броја полифенолних једињења. Ова фенолна једињења припадају различитим класама, почев од фенолних киселина, флавоноида, танина, антоцијана, као и разних других једињења која су деривати наведених класа једињења попут естара, гликозида и др

Од фенолних киселина идентификоване су:

- а) од деривата циметне киселине; *p*-кумаринска киселина, кафеинска киселина, ферулна и синапинска киселина,
- б) од деривата бензоеве киселине; *p*-хидроксибензоева киселина, ванилинска киселина и сиригинска киселина.

Од једињења из класе флавоноида потврђено је присуство следећих једињења:

- а) из подкласе флавона лутеолин и апигенин,
- б) од флавонола; кверцетин и кемпферол,
- в) од флаванона; нарингенин.

Од деривата фенолних киселина, потом деривата флавоноида у екстрактима су детектована следећа једињења:

- а) од гликозида; рутин (кверцетин- гликозид), лутеолин-гликозид, апигенин-гликозид,
- б) од естара; у великим количинама естар кафеинске киселине рузмаринска киселина која је квантификовано доминантно једињење и налази се у великим количинама нарочито у екстракту добијеном Сокслетовом екстракцијом и хлоргенска киселина.

Испитивања биохемијске активности биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. која су вршена у погледу антиоксидативних, цитотоксичних и антибактеријских активности у *in vitro* условима довела су нас до следећих закључака:

- 1) у погледу антиоксидативне активности екстраката испитиваних биљака установљено је да у *in vitro* условима екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. испољавају изузетан антиоксидативни потенцијал. Резултати који су добијени при истраживању за биљну врсту *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. нам указују да изузетну антиоксидативну активност показује екстракт који је добијен савременом техником екстракције, субкритичном екстракцијом водом. Уколико упоредимо екстракте који су добијени двома конвенционалним начинима екстракције - Сокслетовом и поступком мацерације приметна је сличност у активности ова два екстракта што се тиче укупне антиоксидативне активности екстраката наших биљака, теста инхибиција липидне пероксидације и одређивања антиоксидативне активности на нивоу хидроксил радикала. Антиоксидативна моћ екстраката који су добијени савременим поступцима екстракције, субкритичном екстракцијом водом и микроталасном екстракцијом је јако велика. Када се резултати одређивања антиоксидативне активности различитим методама упореде са резултатима синтетичких антиоксиданаса, може се рећи да ови екстракти обећавају примену као потенцијални природни нутрацеутици. Разлог овако успешног антиоксидативног дејства можемо приписати присуству фенолних једињења (фенолних киселина, флавоноида и деривата ових једињења) за која велики број научних студија и радова потврђује ефикасност као изузетно добрих антиоксиданаса, што додатно потврђује примену као потенцијални природни нутрацеутици.
- 2) у погледу цитотоксичне активности добијени резултати нас наводе на следеће закључке:

За биљну врсту *L. thuringiaca* L. цитотоксичност према одабраним линијама ћелија на којима смо вршили тестирања као што су RD ћелије (хумана ћелијска линија добијена од људског рабдомиосаркома), Нер2с ћелије (хумана ћелијска линија карцинома цервикса) и L2ОВ ћелије (ћелијске линије добијене из фибробласта миша) највећу ефикасност показује екстракт биљне врсте који је добијен поступком субкритичне екстракције водом. Овај екстракт несумњиво показује најјачу активност на све третиране ћелијске линије. Екстракти добијени микроталасном и ултразвучном екстракцијом такође показују добру активност према свим ћелијским

линијама, док екстракт добијен конвенционалном методом мацерације показује изражену активност према L20B ћелијској линији.

Добијени резултати за биљну врсту *E. carnea* L. показују да највећу ефикасност испољава екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције водом. Овај екстракт несумњиво поседује најјачу активност независно од дате три коришћене ћелијске линије. Екстракти добијени микроталасном и ултразвучном екстракцијом показују сличну активност, док екстракт добијен конвенционалном методом Сокслетове екстракције показује најмању активност.

Добијени резултати за биљну врсту *S. hortensis* L. показују да највећу ефикасност испољава екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције водом. Овај екстракт несумњиво поседује најјачу активност независно од дате три коришћене ћелијске линије. Екстракти добијени микроталасном и ултразвучном екстракцијом показују сличну активност, док екстракт добијен конвенционалном методом Сокслетове екстракције показује најмању активност.

На основу ових резултата можемо закључити да се добијени екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. могу примењивати као помоћни реагенси код онколошких пацијената, заједно са другим/конвенционалним видовима терапије. Када кажемо „употреба“, првенствено мислимо на помоћно средство које би могло побољшати перформансе организма у борби са слободним радикалима који узрокују оксидативни стрес и болести које из њега произилазе.

- 3) у погледу антибактеријског дејства закључујемо да су екстракти биљака *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. испољили веома добру антибактеријску активност, нарочито екстракти који су добијени савременом техником ултразвучне екстракције.

Екстракти биљке *L. thuringiaca* L. који су добијени савременим техникама екстракције показали су бољу антибактеријску активност од екстраката који су добијеним класичним, конвенционалним методама. Најјснажнију активност показују екстракти добијени техником ултразвучне екстракције. Екстракт биљке који је добијен методом ултразвучне екстракције најјаче дејство испољава према врсти *S. typhimurium* (АТСС 14028), док умерено дејство испољава на бактеријске врсте *S. saprohiticus* (АТСС 15035), *L. innocua* (АТСС 33090), *E. faecalis* (АТСС 2912), *E. aerogenus* (АТСС 13048), *C. freundii* (АТСС 43864) и *P. aeruginosa* (АТСС 27853). Екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције са водом најјаче дејство испољава према бактеријској врсти *S. saprohiticus* (АТСС 15035). Бактеријски сојеви који су осетљиви на дејство екстраката добијених конвенционалним методама у првом реду мацерацијом (МАЦ) су *E. aerogenus* (АТСС 13048) и *P. mirabilis* (АТСС 36659), *S. saprohiticus* (АТСС 15035) и *S. typhimurium* (АТСС 14028), а на екстракт добијен Сокслетовом екстракцијом су осетљиви сојеви бактеријске врсте *S. enteritidis* (АТСС 13076).

За биљну врсту *E. carnea* L. на основу добијених резултата закључујемо да екстракти ове биљне врсте показују извесне сличности са антибактеријском активношћу екстраката биљне врсте *L. thuringiaca* L. и *S. hortensis* L. Екстракт који је добијен савременом техником ултразвучне екстракције у овом случају показује бољу антибактеријску активност према одабраним сојевима бактерија у односу на екстракте који су добијени другим двама савременим методама микроталасном екстракцијом и субкритичном екстракцијом са водом, али и у односу на екстракте који су добијени конвенционалним методама. Најјснажније антибактеријско дејство показује екстракт *E. carnea* L. који је добијен техником ултразвучне екстракције. Овај екстракт најјаче дејство испољава према бактеријској врсти *S. typhimurium* (АТСС

14028), умерено делује на врсте *S. saprophiticus* (ATCC 15035), *L. inocun* (ATCC 33090), *E. faecalis* (ATCC 2912), *E. aerogenus* (ATCC 13048), *C. freundii* (ATCC 43864) и *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Екстракт који је добијен поступком субкритичне екстракције са водом најјаче делује на бактеријску врсту *S. saprophiticus* (ATCC 1503). Бактеријске врсте које испољавају највећу осетљивост према екстрактима добијеним конвенционалним методама су *E. aerogenus* (ATCC 13048) и *P. mirabilis* (ATCC 36659) које су јако осетљиве према екстракту добијеном мацерацијом, а умерену осетљивост показују бактеријски сојеви *S. saprophiticus* (ATCC 15035) и *S. typhimurium* (ATCC 14028). Бактеријска врста *E. coli* (ATCC 25922) је показала да је веома осетљива на екстракт добијен Сокслетовом екстракцијом.

Испитивани екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. не показују повећане генотоксичне ефекте. За све испитиване екстракте код обе биљне врсте у концентрацијама већим од 125 mg/ml треба бити обазрив да би се избегли могући нуз ефекти. На основу добијених резултата за испитивање опште токсичности и генотоксичности може се закључити да испитивани екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. не продукују токсичне и генотоксичне ефекте. Ради потпуне безбедне примене испитиваних екстраката биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. препоручују се концентрације ниже од 125 mg/ml. Сви испитивани екстракти су још увек далеко од мутагености добијене за позитивну контролу, што заправо даје могућност употребе истих као потенцијалне природне нутрацеутике.

На основу истраживања, добијених и презентираних резултата који су проистекли из рада у оквиру ове дисертације у коме смо проучавали екстракте добијене од две биљне врсте *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. можемо закључити да нам ова докторска дисертација даје већи број података од постојећих а веома оскудних који се односе на две недовољно истражене биљне врсте *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. Истраживања су вршена у циљу одговора на питање да ли се екстракти ове две биљне врсте могу употребити као потенцијални извори природних нутрацеутика ради примене у терапеутске сврхе, за лечење али исто тако и за превенцију великог броја болести са којима се човек данас свакодневно суочава.

На основу добијених резултата можемо закључити да биљне врсте *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. показују веома висок биолошки потенцијал и на основу састава екстраката знамо да садрже компоненте које служе и као лек и као храна, те самим тим могу послужити и могу се искористити као извор природних нутрацеутика. Извршена испитивања и резултати који проистичу из бројних тестирања на њима нам указују да ове две биљне врсте садрже високу концентрацију активних једињења као што су феноли, фенолне киселине, флавоноиди, танини, галотанини, антоцијани, као и њихових деривата за која је одраније познато да испољавају бројне позитивне ефекте обезбеђујући тиме бенефите по људско здравље. Статистичка анализа коју смо користили је показала високу корелацију између садржаја испитиваних класа једињења и биолошке активности припремљених екстраката односно, оне су потврдиле допринос позитивном дејству присутних једињења у добијеним екстрактима биљака. Позитивно дејство ових једињења је проучавано у смислу одређивања њихове потенцијалне антиоксидативне, антипролиферативне и антибактеријске активности путем више различитих тестова, на различите ћелијске линије канцера као и на бактеријске сојеви. Такође, екстракти нису токсични а не показују ни да су генотоксични у одређеним концентрацијама. На основу добијених резултата, закључујемо да екстракти који су добијени помоћу пет екстрактивних техника показују високу антиоксидативну, цитотоксичну и антибактеријску активност а садрже и велику количину полифенолних

једињења. Тестови у оквиру анализирања активности сваког појединачног екстракта добијеног Сокслетовом екстракцијом, мацерацијом, микроталасном екстракцијом, ултразвучном екстракцијом и субкритичном екстракцијом са водом указују на доминацију субкритичне екстракције са водом као савремене технике екстракције. Субкритична екстракција са водом као екстрактивна техника се може успешно применити за добијање екстраката из биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. који у себи садрже високу концентрацију жељених биолошки активних једињења из полазних биљних извора која доказано у бројним ранијим студијама поседују веома изражена антиоксидативна, цитотоксична и антибактеријска својства. Остале неконвенционалне методе као што су микроталасна и ултразвучна екстракција се такође могу употребити у ову сврху али како дају слабије резултате у погледу добијања веће количине биолошки активних компонената у екстрактима у односу на технику субкритичне екстракције са водом која је доминантна у односу на све остале примењене екстрактивне технике. Додатно спроведеним анализама које смо извршили смо потврдили резултате претходно изведених научних студија да количина једињења која ће се наћи у екстракту зависи од примењене екстрактивне технике, њених основних карактеристика и параметара који је карактеришу, почев од избора самог растварача који се користи до осталих као што су експериментални услови под којима се екстракција изводи.

Екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. су извори великог броја биолошки активних једињења која могу активно учествовати у циљу обезбеђења и доприноса великом броју позитивних ефеката по људско здравље. Они могу послужити као одлични борци против слободних радикала у организму, разних стања индукованих оксидативним стресом, затим као успешни антибактеријски агенси у борби са различитим сојевима грампозитивних и грамнегативних бактерија данас веома раширених. Такође, испољавају пролиферативно дејство према одабраним ћелијским линијама хуманог карцинома што их сврстава у ред потенцијално интересантних једињења у домену фармацеутике и медицине као успешних агенаса у борби са различитим врстама канцера. Екстракти биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. се на основу свега претходно изнетог могу користити у превентивне и терапијске сврхе као потенцијални природни извор нутрацеутика. Али, потребно је додатно напоменути да добијени резултати у оквиру испитивања на ове две биљне врсте ради даље првенствено безбедне употребе морају пратити и даља додатна истраживања и додатне анализе као даљу допуну проучавања великог потенцијала екстраката ових биљних врста. Ова напомена је првенствено у превентивне сврхе, како бисмо били сигурни да неће бити нежељених реакција и нежељених дејстава на организам на коме се примењују. Дакле, наставак на пољу испитивања ове две биљне врсте би био очекиван чиме би самим и научни напредак на научном пољу биохемије и фитотерапије био евидентан.

Добијени подаци о полифенолном профили и биохемијском потенцијалу који смо утврдили испитивањем антиоксидативног, антибактеријског и цитотоксичног деловања екстраката добијених из биљних врста *L. thuringiaca* L., *E. carnea* L. и *S. hortensis* L. су од непроцењивог научног значаја. Они представљају смернице за даље проучавање и примену ових биљних врста као извора природних нутрацеутика у превентивне и терапијске сврхе. Уједно допринос научном напретку на пољу биохемије, медицине, фармације, фармакотерапије у виду проширења сазнања о активним састојцима биљака и њиховог позитивног деловања приликом третмана великог броја дијагностицираних обољења у терапији, али и у профилакси је ради остварења јединственог циља, очувања здравља као најважнијег ресурса са којим човек располаже.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wildman R.E.C., Kelley M.. Nutraceuticals and Functional Foods. Taylor & Francis Group, LLC. United States of America.(2007); Ch1-22 .
2. Andlauer W., Fürst P. Nutraceuticals: A piece of history, present status and outlook. Food Research International.(2002);35(2-3):171-176
3. Lockwood B.. Nutraceuticals A guide for healthcare professional, Second edition, Pharmaceutical Press. Great Britain. (2007); (1):9-15
4. Biesalski H.K. Nutraceuticals,the link between nutrition and medicine, in health and diseases prevention. New York. Marcel Dekker Inc. (2001); 1: 2-23.
5. Chauhan B., Kumar G., Kalam N., Ansari S.H. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review.. J .Adv. Pharm. Technol. Res.(2013);4:4–8.
6. Rafieian-Kopaei M. Medicinal plants and the human needs, Journal of Herbmед Pharmacology (2012); 1(1):1-2
7. Rafieian-Kopaei M., Baradaran A. Plants antioxidants: From laboratory to clinic, J. Nephrothology. (2013);2:152–3.
8. Functional Foods: Opportunities and Challenges, IFT Expert Report (2005); 1: 1–66.
9. Kubomara, K. Japan redefines functional foods, Prepared Foods B.(1998); 167, 129–32.
10. Hardy G. (2000). Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. Nutrition. (2000); 16, 688–697.
11. Siro I., Kapolna E., Kapolna B., Lugasi A.Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. Appetite (2008);51(3): 456-467
12. Diplock A. T., Aggett P. J., Ashwell M., Borne F., Fern E. B., Roberfroid, M. B. Scientific concepts of functional foods in Europe: Concensus document. British Journal of Nutrition. (1999). 81(suppl. 1), S1–S27.
13. Martirosyan D.M.,Jaishree Singh J.. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?, Functional Foods in Health and Disease. (2015); 5(6):209-223., pg. 215.
14. Health Canada Web site (2006); <http://www.hc-sc.gc.ca>
15. Das L., Bhaumik E., Raychaudhuri U., Chakraborty R. Role of nutraceuticals in human health, J. Food Sci Technol. (2012); 49(2): 173–183.
16. De Felice S.L.The nutraceutical revolution, its impact on food industry. Trends in Food Sci. and Tech. (1995); 6(2): 59-61.
17. Kalra E.K. Nutraceutical - Definition and Introduction. AAPS Pharm.Sci. (2003); 5 (3): Article 25
18. De Felice, S.L. What is a true nutraceutical? And what is the nature and size of the U.S. Market? (1994)

19. Robert E. C. W., Kelley M. Nutraceuticals and Functional Foods. 2nd Edition, pg.5, 2007 by Taylor & Francis Group. LLC. United States of America. (2007), Ch1, 5.
20. Saika D., Deka S.C., Cereals: From staple food to nutraceuticals. *Int. Food. Res. J.* (2011); 18:21-30.
21. Kaur G., Mukundan S., Wani V., Kumar M.S. Nutraceuticals in the management and prevention of metabolic syndrome. *Austin J. Pharmacol. Ther.* (2015); 3:1-6.
22. Das L., Bhaumik E., Raychaudhuri U., Chakraborty R. Role of nutraceuticals in human health. *Journal of food science and technology.* (2012); 49(2):173–183.
23. Pandey M, Verma RK, Saraf SA. Nutraceuticals: new era of medicine and health. *Asian J. Pharm. Clin Res.* (2010); 3:11–15.
24. Labs S.-pioneer in nutraceuticals Aug 05, 2002. *The Hindu Newspaper*; Available from: <http://www.hinduonnet.com/thehindu/biz/2002/08/05/stories/2002080500040200.htm>
25. Patil C.S. Current trends and future prospective of nutraceuticals in health promotion. *Bioinfo Pharmaceutical Biotechnology.* (2011); 1(1),1-7.
26. Dutta S. , Ali K.M , Dash S.K. Giri B. Role of nutraceuticals on health promotion and disease prevention: a review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics.* (2018); 8(4):42-47.
27. Kelsey N.A., Wilkins H.M., Linseman D.A. Nutraceuticals antioxidant as novel neuroprotective agents. *Molecules* (2010); 15:7792-7814.
28. Klatte ET, Scharre DW, Nagaraja HN, Davis RA, Beversdorf DQ. Combination therapy of donepezil and Vitamin E in Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorder* (2003); 17(2):113-116.
29. Penner R., Richard N. Fedorak, Karen L. Madsen, Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Current Opinion in Pharmacology.* (2005); 5(6): 596-603.
30. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Cataloguing-in-Publication (CIP) data. CIP data are available at <http://apps.who.int/iris>.
31. Fournier, P.E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., Claverie, J.M. (2006): Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *P.Lo.S. Genet.* (2006); 2(1):e7.
32. Sá, J.M., Chong, J.L., Wellems, T.E., 2011. Malaria drug resistance: new observations and developments. *Essays Biochem.* (2011); 51, 137–60.
33. Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., Elseviers, M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: A cross-national database study. *Lancet* (2005); 365, 579–587.
34. Solórzano-Santos F. , Guadalupe M., Novales M. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents, *Current Opinion in Biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol.* (2012); 23(2):136-41.

35. Charles, C.H., Pan, P.C., Sturdivant, L., Vincent, J.W. In Vivo Antimicrobial Activity of an Essential Oil-Containing Mouthrinse on Interproximal Plaque Bacteria. *J. Clin. Dent.* (2000);11, 94–97.
36. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiol.* (2008);124, 91–97.
37. Dillard C.J., German B.J. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* (2000);80:1744-1756.
38. Prajakta S.P., Kajal N. P., Trupti D.D., Shriniwas K. M., Chandrakant S. M., A Review On : Phytochemicals as Nutraceuticals. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology.* (2016); 2 (2)256.
39. Gheldof H., Wang X., Engeseth N. J. Identification and quantification of antioxidant component of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002); 50(21), 5870-5877.
40. Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K.; Kujala T.S., Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* (1999); 47(10), 3954-62.
41. Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing* (2011); 89 (3), 217-233.
42. Bors, W., Heller W., Michel C., Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* (1990); 186:343-55.
43. Fahlman B.M., Krol E.S, Inhibition of UVA and UVB radiation-induced lipid oxidation by quercetin, *J. Agric. Food Chem.* (2009); 24;57(12):5301-5.
44. Harborne J. B., Williams C. A., Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* (2000); 55, 481–504.
45. Havsteen B., Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochem. Pharmacol.*(1983);32 1141–1148.
46. Pathak D., Pathak K., Singla A.K., Flavonoids as medicinal agents—Recent advances, *Fitoter.* (1991);62 371–389.
47. Senatore, F.; Rigano, D.; Formisano, C.; Grassia, A.; Basile, A. & Sorbo, S. Phytogrowth-Inhibitory and Antibacterial Activity of *Verbascum sinuatum*. *Fitoterapia.* (2007); 78(3), 244-247.
48. Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M.. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (1999); 47 (10), 3954-3962.
49. Huang M.-T., Ferraro T. Phenolic Compounds in Food and Cancer Prevention. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II.* ACS Symposium Series.(1992);507(2): 8-34.
50. Brglez Mojzer E., Knez Hrnc M., Škerget M., Knez Ž., Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules.* (2016) ; 21: 1 - 38.

51. Kolečkar V., Kubikova K. Rehakova Z., Kuca K., Jun D., Jahodar L., Opletal L., Tannins as Antioxidants Influencing the Health, Mini Reviews in Medicinal Chemistry. (2008); 8 (5): 436-447(12)
52. Li H. , Wang Z., Liu Y., Review in the studies on tannins activity of cancer prevention and anticancer, Zhong Yao Cai. (2003);26(6):444-8.
53. Pavlović R.D. , Veljković M., Stojanović N.M., Gočmanac-Ignjatović M., Mihailov-Krstev T., Branković S., Sokolović D., Marčetić M., Radulović N., Radenković M., Influence of different wild-garlic (*Allium ursinum*) extracts on the gastrointestinal system: spasmolytic, antimicrobial and antioxidant properties. (2017); 69 (9); 1208-1218 .
54. Yoshitake T, Yoshitake S, Kehr J. The *Ginkgo biloba* extract EGb 761(R) and its main constituent flavonoids and *Ginkgolides* increase extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. Br. J. Pharmacol. (2010);159:659–68.
55. Gurdip S., I.P.S. Kapoor, Pratibha S., Carola S. de Heluani, P. de Lampasona M., r A.N. Catalan C., Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinal*, Food and Chemical Toxicology. (2008); 46 (10), 3295-3302 .
56. Eichler F. and Krüger, GRF Effects of nonspecific immunostimulants (Echinacin, isoprinosine, and thymus factors) on the infection and antigen expression in herpes virus- 6 exposed human lymphoid cells. In Vivo. (1994); 8: 565–576 .
57. Kasper S., Gastpar M., Müller W.E., Volz H.P., Dienel A., Kieser M., Möller H.J. Efficacy of St. John’s Wort extracts WS® 5570 in acute treatment of mild depression: a reanalysis of data from controlled clinical trials. Eur. Arch. Psychiatr. Clin. Neurosci.(2008); 258: 59–63 .
58. Jacobson J.M., Feinman L., Liebes L., Ostrow N., Koslowski V., Tobia A. , Cabana B.E., Dong-Hun Lee, Spritzler J., Prince A.M. Pharmacokinetics, Safety, and Antiviral Effects of Hypericin, a Derivative of St. John’s Wort Plant, in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection, Antimicrobial agents and chemotherapy. (2001); 45 (2):517–24 .
59. Nasri H., Sahinfard N., Rafieian M., Rafieian S., Rafieian M., Shirzad. Turmeric: A spice with multifunctional medicinal properties. J. Herbmed. Pharmacol. (2014); 3(1):5-8.
60. Hendriks H, Bos R, Allersma DP, Malingré TM, Koster AS. Pharmacological screening of valeranal and some other components of essential oil of *Valeriana officinalis*. Planta Med (1981);42:62-8 .
61. M.D. Boudreau, F.A. Beland, J.A. Nichols, M. Pogribna, Toxicology and carcinogenesis studies of a noncolorized whole leaf extract of *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water study), Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser (2013); 1-266 .
62. Christenhusz, M. J. M.; Byng, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. Phytotaxa. (2016);261 (3): 201–217.
63. Umeljić V. U svijetu cveća i pčela: atlas medonosnog bilja, Split, (2004). ISBN: 953-98822-2-2
64. Srpska Akademija nauka i umetnosti, odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Flora RSrbije III, ur. Mladen Josifović. Naučno delo., Beograd, (1972), 522-523

65. Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, Zagreb. (1990); August Cesarec B (1990) ISBN: 86-393-0172-7
66. Srpska Akademija nauka i umetnosti, odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Flora RSrbije III .ur. Mladen Josifović. Naučno delo., Beograd, (1972). 463-464 .
67. Kremer D., Kruščić Tomaić I. Od sjemenke do ploda, Zagreb: Javna ustanova „Nacionalni park Sjeverni Velebit“. (2015). ISBN: 978-953-7552-08-+4
68. www.Crnjuša biljka koja može izlečiti reumu- Narodni lijek (5.mart.2018.)
69. Treben M. Health from the Pharmacy of the Lord, Advice and experience with medicinal herbs, Ennsthaler Publisher. (2000); STRANE
70. Mazid M, Khan TA, Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*. (2011); 3(2):232-249.)
71. Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G., *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, (Eds.). American Society of Plant Physiologists. (2000); 1250-1316.
72. Brnnet R.N., Wallsgrove R.M., Secondary metabolites in plant defense Mechanisms. *New Phytol.* (1994); 127:617-633.
73. Takshak S., Agrawal S.B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. (2019); 193: 51-88.
74. Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. (2010); 15(10):7313–7352.
75. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Bolwell, P.G.; Bramley, P.M.; Pridham, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* (1995); 22: 375–383.
76. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* (1996); 20:933–956.
77. Rasmussen, S.E.; Frederiksen, H.; Struntze Krogholm, K.; Poulsen, L. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.* (2005); 49:159-174.
78. Cole, G.M.; Lim, G.P.; Yang, F.; Teter, B.; Begum, A.; Ma, Q.; Harris-White, M.E.; Frautsch, S.A. Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. *Neurobiol. Aging* (2005); 26 Suppl. 1:133-136.
79. Balasundram N., Sundram K., Samman S., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*. (2006); 99 (1):191-203.
80. Harborne J.B. *Methods in plant biochemistry, I : plant phenolics*. London, Academic press (1989), fali strane.
81. Harborne, J.B., Simmonds, N.W. Natural distribution of the phenolic aglycones. (In: *Byochemistry of Phenolic Compounds* (Harborne, J.B., ed.). London: Academic Press. (1964); 77-128.

82. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. (2010); 2:1231-1246
83. Bravo L.. Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutrition Reviews*. (1998); 56 (11):318 .
84. Robbins, R.J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agr. Food Chem.* (2003); 51(10): 2866-2887.
85. Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. (2013); 18: 2328-2375
86. Stacewicz-Sapuntzakis M., Bowen P.E., Hussain E.A. , Damayanti-Wood B., Farnsworth N.R. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food?. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2001); 41:251-286
87. Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Martín- Alvarez P.J., Bills G., Vicente M.F., Basilio A., Rivas C.L., Requena T., Rodríguez J.M. , Bartolomé B. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res. Microbiol.* (2010); 161 :372-382
88. Rocha L.D., Monteiro M.C., Teodoro A.J., Anticancer properties of hydroxycinnamic acids - a review. *Cancer Clin. Oncol.*(2012); 1 :109-121
89. Seong-Gene Lee, The Cytoprotective Effects of Hydroxycinnamic Acid are Mediated by Its Antioxidant Activity, *Coffee in Health and Disease Prevention*. (2015); 913-920
90. Tanwar B., Modgil R., Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. *Spatula DD*. (2012); 2(1):59-68 .
91. Middleton E. The flavonoids. *Trends in Pharmacological Sciences*. (1984); 5:335–338.
92. Wrolstad R.E. Anthocyanin Pigments- Bioactivity and Coloring Properties, *Journal of Food Science*. (2004); 69: 419-425
93. Khoo H. E., Azlan A., Tang S. T., & Lim, S. M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*, (2017);61(1), 1361779.
94. Alvarez-Suarez J.M, Giampieri F., Tulipani S., et al. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *J. Nutr. Biochem.* (2014);25(3):289-294.
95. Malik M., Zhao C., Schoene N., et al. Anthocyanin-rich extract from *Aronia melanocarpa* E. induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutr. Cancer*. 2003; 46(2):186-196.
96. Li D., Zhang Y., Liu Y., Sun R., Xia M. Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity and prevents insulin resistance in diabetic patients. *The Journal of Nutrition* (2015);145(4):742-748.
97. Hemingway, R.W.; Karchesy, J.J. *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*; Plenum: New York, NY, USA, 1989.
98. Khanbabaee K., Van Ree T. Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* (2001);18,641–649.

99. Regan M.A., Glombitza K., Phglorotannins: brown algal polyphenols. *Prog. Phycol. Res.* (1986); 4:177-241.
100. Kišgeci J., Lekovito bilje Gajenje, sakupljanje, upotreba, „Partenon“, Beograd, 2002.
101. Kolečkar V., Kubikova K., Rehakova Z., Kuca K., Jun D., Jahodar L., Opletal L., Tannins as Antioxidants Influencing the Health, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry.* (2008); 8 (5), 436-447(12).
102. Scalbert A., Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry.* (1991); 30 (12): 3875-3883.
103. Akiyama H, Fujii K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K., Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* (2001) 48 (4):487–491.
104. Haixia Li, Zhao Wang, Yanze Liu, Review in the studies on tannins activity of cancer prevention and anticancer, *Zhong Yao Cai*, (2003);26(6):444-8. ČASOPIS FALI
105. Dewick, P.M. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*, John Wiley & Sons Ltd. (2009); Ch.4:121-151.
106. Herrmann K.M., Weaver L.M., The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* (1999); 50:1, 473-503
107. Duke S.O., Powles S.B. Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* (2008); 64:319–325
108. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant.* (2010); 3(1):2-20.
109. Heller W., Forkmann G. *Byosynthesis.*(1988);Ch.11:399.
110. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Press, Oxford, (1985).
111. Diplock, A. T., J. L. Charleaux, at al., *Functional Food Science and Defence Against ROS.* (1998); *Nutr.* 80
112. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr.* . (2012);70:257-65.
113. Manoharan S., Guillemin G.J., Abiramasundari R.S., Essa M.M., Akbar M., Akbar M.D. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxid Med Cell Longev.*(2016); 2016: 8590578.
114. Huang, W., Zhang, X., Chen, W."Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review)". *Biomedical Reports* 4.5 (2016): 519-522.
115. Dasari K., Madu C.O., Lu Y. The Role of Oxidative Stress in Cancer. *Nov Appro in Can Study.* (2020); 4(2), 350-355 .
116. He F, Zuo L. Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* (2015);16(11):27770-27780.
117. Napoli E, Wong S, Giulivi C. Evidence of reactive oxygen species-mediated damage to mitochondrial DNA in children with typical autism. *Mol Autism.* 2013 Jan 25;4(1):2. doi: 10.1186/2040-2392-4-2. PMID: 23347615; PMCID: PMC3570390.
118. Glassman S.J. ROS and Vitiligo. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants.* (2014); 3677-3695

119. Ross S.D., Estok R.P., Frame D., Stone L.R., Ludensky V., Levine C.B. Disability and Chronic Fatigue Syndrome: A Focus on Function. *Arch. Intern. Med.* (2004);164(10):1098–1107.
120. Tododrović T., Dožić I. Opšta i oralna biohemija (2012); str.65, Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet, Beograd.
121. Hoyt A. Luukkonen J. Juutilainen J. Naarala J. Title Proliferation, Oxidative Stress and Cell Death in Cells Exposed to 872 MHz Radiofrequency Radiation and Oxidants. *Journal Radiat. Res.* (2008);170 (2) :235-243.
122. Đukić M.M., Oksidativni stres - slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi. (2008), Mono i Manjana, Beograd.
123. Gruhlke M.C., Slusarenko A.J. The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiol Biochem.* (2012);59:98-107.
124. Knight J.A., Diseases related to oxygen-derived free radicals, *Ann Clin Lab Sci.* (1995); 25(2):111-21.
125. Young I.S., Woodside J.V., Antioxidants in health and disease, *J. Clin. Pathol.* (2001); 54:176–186.
126. Štefan L., Tepšić T., Zavidović T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R., Lipidna peroksidacija uzroci i posljedice. *Medicina* (2007);43:84-93 .
127. Khoubnasabjafari M., Ansarin K., Jouyban A., Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *Bioimpacts.* (2015);5(3):123–127.
128. Halliwell B., Aeschbach R., Loliger J., Aruoma O.I., The Characterization of Antioxidants. *Fd. Chem. Tox.* (1995); 33 (7):601-617 .
129. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications.* (1990); 9: 1-32
130. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 2nd Ed. Clarendon Press, Oxford.(1989).
131. Ruberto G., Randa A., Daquino C., Amico V., et al., Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars, *Food Chemistry.* (2007); 100, 203-210.
132. Ito, N., M. Hirose, S. Fukushima, H. Tsuda, T. Shirai, and M. Tatematsu, Studies on Antioxidants: Their Anticarcinogenic and Modifying Effects on Chemical Carcinogenesis, *Food Chem. Toxicol.* (1986); 24:1099–1102 .
133. Hocman G., Chemoprevention of cancer: phenolic antioxidants (BHT, BHA), *The International Journal of Biochemistry.* (1988); 20(7):639-651
134. Chu Y.H., Hsu H.F. Effects of antioxidants on peanut oil stability. *Food Chem.* (1999); 66: 29-34.
135. Richheimer S.L., Bernart M.W., King G.A., Kent M.C., Bailey D.T. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1996); 73(4): 507-14

136. Shi H., Noguchi N., Niki E., Introducing natural antioxidants, In: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., Woodhead Publishing Limited, EDS., Cambridge, England.(2001); 22-70.
137. Pompella A. Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A.F V; (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist.Biochemical Pharmacology (2003); 66 (8): 1499-503
138. Pehlivan F.E. Vitamin C: An Antioxidant Agent, Vitamin C, Amal H. Hamza, IntechOpen, (2017). DOI: 10.5772/intechopen.69660. Available from: <https://www.intechopen.com/books/vitamin-c/vitamin-c-an-antioxidant-agent>
139. Tucker J.M., Townsend D.M. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease, Biomed Pharmacother. (2005); 59(7): 380–387.
140. Prakash S., Sunitha J., Hans M. Role of coenzyme Q₁₀ as an antioxidant and bioenergizer in periodontal diseases. Indian J. Pharmacol. (2010); 42(6): 334-337.
141. Roleira, F.M.F., Tavares-da-Silva, E.J., Varela, C.L., Costa, S.C., Silva, T., Garrido, J., Borges, F., Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties, Food Chemistry (2015), 36, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.039>
142. Mišan A. Antioksidantna svojstva lekovitog bilja u hrani, (2009); Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Departmant za hemiju, Novi Sad.
143. Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D., Trinajstić N., Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids, Croatica chemica acta ccaaa. (2003); 76 (1) 55-61
144. Van Acker S.A., van den Berg D.J., Tromp M.N., Griffioen D.H., Van Bennekom W.P., Van der Vijgh W.J., Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radic Biol Med. (1996);20(3):331-342.
145. Victor A., David A., Arulmoli R., Parasuraman S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid, Pharmacogn. Rev. (2016); 10(20): 84–89.
146. Simunkova M., Alwasel S.H. , Alhazza I.M., Jomova K., Kollar V., Rusko M. & Valko M., Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. Archives of Toxicology. (2019); 93, 2491–2513 .
147. Javed H., Khan M.M., Ahmad A., Vaibhav K., Ahmad M.E., Khan A., Ashafaq M., Islam F., Siddiqui M.S., Safhi M.M., Islam F. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. Neuroscience. (2012);17:340–352.
148. La Casa C., Villegas I., Alarcón de la Lastra C., Motilva V., Martín Calero M.J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. J. Ethnopharmacol. (2000);71(1–2):45–53.
149. Tongjaroenbuangam W., Ruksee N., Chantiratikul P., Pakdeenarong N., Kongbuntad W., Govitrapong P. Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice. Neurochem. Int. (2011); 59:677–685.
150. Hsu C.Y., Shih H.Y., Chia Y.C., Lee C.H., Ashida H., Lai Y.K., Weng C.F. Rutin potentiates insulin receptor kinase to enhance insulin-dependent glucose transporter 4 translocation. Mol. Nutr. Food Res. (2014) ;58(6):1168–1176.

151. Xu P.X., Wang S.W., Yu X.L., Su Y.J., Wang T., Zhou W.W., et al. Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A β oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. *Behav Brain Res.*(2014); 264:173-80.
152. Marcarini J. C., Ferreira Tsuboy M.S., Cabral Luiz R., Regina Ribeiro L., Beatriz Hoffmann-Campo C., Sérgio Mantovani M. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* (2011); 63(5):459–465.
153. Lin J.P., Yang J.S., Lin J.J., Lai K.C., Lu H.F., Ma C.Y., Sai-Chuen Wu R., Wu K.C., Chueh F.S., Gibson Wood W., Chung J.G. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model *in vivo*. *Environ. Toxicol.* (2012); 27(8):480–484.
154. Wright J.S, Johnson ER, DiLabio GA. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* (2001);123 (6): 1173-1183
155. Musialik M., Litwinienko G., Scavenging of dpph^{*} Radicals by Vitamin E Is Accelerated by Its Partial Ionization: the Role of Sequential Proton Loss Electron Transfer, *Org. Lett.* (2005); 7 (22) :49
156. Higdon JV, et al. Coffee and health: a review of recent human research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2006); 46:101–123.
157. Kasai H, et al. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem. Toxicol.* (2000); 38:467–471.
158. Kono Y, et al. The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. *Biochem. J.* (1995); 312:947–953.
159. Kono Y.,Shibata H., Kodama Y., Sawa Y. The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid.*Biochem. J.*(1995); B312:947-953
160. Fadel O., El Kirat K.E., Morandat S., The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation *in situ*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* (2011); 1808(12): 2973-2980 .
161. WHO. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance, vol. 2014. Geneva: WHO; 2014.
162. Baym M., Stone L.K., Kishony R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science.* (2016) ;351(6268):aad3292.
163. Khameneh B., Diab R., Ghazvini K., Bazzaz B.S. F., Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog.* (2016); 95:32–42.
164. Cowan M.M.. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* (1999); 12(4):564–82.
165. Lee J.-H., Cho H.S., Joo S.W., Chandra Regmi S., Kim J.-A., Ryu C.-M. Diverse plant extracts and *trans*-resveratrol inhibit biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* O157: H7. *Biofouling*(2013); 29: 1189-1203

166. Chung J.G., Hsia T.C., Kuo H.M., Li Y.C., Lee Y.M., Slin S.S., Hung C.F. Inhibitory actions of luteolin on the growth and arylamine *N*-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer patients. *Toxicology in Vitro*. (2001); 15 (3): 191-198
167. Weidong Q. , Miao L., Yuting F., Jianing Z., Wanting L., Jingyuan L., Xiang L., Yongdong L, Ting W. Antimicrobial mechanism of luteolin against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* and its antibiofilm properties. *Microbial Pathogenesis*. (2020); Vol.142, 104056 .
168. Shao J., Zhang M., Wang T., Li Y., Wang C. The roles of CDR1, CDR2, and MDR1 in kaempferol-induced suppression with fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Pharm Biol*. 2016;54(6):984-992.
169. Rodríguez-Pérez C., Quirantes-Piné R. , Uberos J. , Jiménez-Sánchez C., Peña A., Segura-Carretero A., Antibacterial activity of isolated phenolic compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against *Escherichia coli*. *Food Funct*.(2016);7, 1564-1573 .
170. Xu H.X., Lee S.F., Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytotherapy research*. (2001);15(1):39-43
171. Jaisinghani R.N.K., Antibacterial properties of quercetin. *Microbiology research*. (2017); 8(1):6877, 13-15.
172. Lou Z., Wang H., Rao S., Sun J., Ma C., Li J. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food control*. (2012); 25 (2):550-554.
173. Kuo C.-H., Weng B.-C., Wu C.-C., Yang S.-F., Wu D.-C., Wang Y.-C. Apigenin has anti-atrophic gastritis and anti-gastric cancer progression effects in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Journal of Ethnopharmacology*. (2014); 151 (3) 1031–1039 .
174. Tsuchiya H. Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants. *Molecules*. (2015); 20:18923–18966.
175. El-Adawi H. Inhibitory effect of grape seed extract (GSE) on cariogenic bacteria. *J Med. Plants Res*. (2012); 6:4883–4891.
176. Maxwell A. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol*. (1997); 5(3):102–9.
177. Wu T., Zang X., He M., Pan S., Xu X. Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *J. Agric. Food Chem*. (2013); 61:8185–8190 .
178. Fang Y., Lu Y., Zang X., Wu T., Qi X., Pan S., Xu X. 3D-QSAR and docking studies of flavonoids as potent *Escherichia coli* inhibitors. *Sci. Rep*. (2016); 6:23634 .PROVERI
179. Plaper A., Golob M., Hafner I., Oblak M., Solmajer T., Jerala R. Characterization of quercetin binding site on dna gyrase. *Biochem Biophys Res Commun*. (2003); 30:6:530-536.
180. (модификовано од: Górnjak I., Bartoszewski R., Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*(2019); 18 (1):241–272.

181. Bazzaz B.S F., Sarabandi S., Khameneh B., Hosseinzadeh H., Effect of Catechins, green tea extract and Methylxanthines in combination with gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-combination therapy against resistant bacteria. *J. Pharmacopuncture.* (2016);19(4):312–8.
182. Betts J.W., Wareham D.W. In vitro activity of curcumin in combination with epigallocatechin gallate (EGCG) versus multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* (2014); 14:172.
183. Atanacković M., Bacetić D., Basta Jovanović G., Begić-Janeva A., Boričić I., Brašanac D., Cvetković Jožić D., Dožić S., Oklobdžija M. *Patologija. Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu. Katedra za patologiju.* Beograd. (2011).
184. Vidaković A., *Medicina rada II, Institut za medicinu rada i radiološku zaštitu „dr Dragomir Karajović“.* Beograd. (1997).
185. Croce C.M. Oncogenes and cancer. *The New England Journal of Medicine.* (2008);358 (5): 502–11.
186. Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engele P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel D.P., Linsley P.S., Johnson J.M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* (2005); 433(7027): 769-73.
187. Balaguer F., Link A., Lozano J.J., Cuatrecasas M., Nagasaka T., Boland C.R., Goel A. Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Research.* (2010); 70 (16): 6609–18.
188. Ames B.N., Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* (1983); 221:1256-64.
189. Loft S., Poulsen H.E., Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* (1996); 74:297-312.
190. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., & Mazur M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160 (2006); 1–40
191. Caponigro F., Basile M., de Rosa V., Normanno N. New drugs in cancer therapy. National Tumor Institute. Naples, 17–18 June 2004. LWW; 2005.
192. Khan J., Qadir M.I., Casuarinin effects on cancer chemoprevention: Progress, potential and promise. *International Journal of Pharmacological Research.* (2017); 7(09): 175-180.
193. Desai A.G., Qazi G.N., Ganju R.K., El-Tamer M., Singh J., Saxena A.K. Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Current Drug Metabol.* (2008);9:581-91
194. Bilecova-Rabajdova M., Birkova A., Urban P., Gregova K., Durovcova E., Marekova M. Naturally occurring substances and their role in chemo-protective effects. *Central Eur. J. Public Health.*(2013);21:213-9
195. Arts I.C., Hollman P.C., Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* (2005);81:317S–25S.
196. Yang C.S., Landau J.M., Huang M.T., Newmark H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review. Nutrition.* (2001): 21: 381-406.

197. Wadsworth T.L., Koop D.R.. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW macrophages *Biochemical Pharmacology*. (1999); 57 (8): 941-949.
198. Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E. , Haubner R., Spiegelhalder B., Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*.(2000); 36 (10): 1235-1247 .
199. Anantharaju P.G., Gowda P.C., Vimalambike M.G., Madhunapantula S.R.V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancer. *Nutrition Journal*. (2016); 15: 99.
200. Lee Y.J., Liao P.H., Chen W.K., Yang C.Y. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett.*(2000);153:51-6
201. Chan M., Meng H., Zhao Y., Chen F., Yu S., Antioxidant and in vitro cancer activities of phenolics isolated from sugar beet molasses, *BMC. Complement Altern. Med.* (2015); 15:313
202. Kang N.J., Lee K.W., Kim B.H., Bode A.M., Lee H.J., Heo Y.S., Boardman L., Limburg P., Lee H.J., Dong Z., Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. *Carcinogenesis*. (2011);32:921–8.
203. Chang W.C., Hsieh C.H., Hsiao M.W., Lin W.C., Hung Y.C., Ye J.C., Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. *Taiwan J.Obstet Gynecol.* (2010);49:419–24.
204. Seeram, N.P. Adams, L.S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H.S.; Heber, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*(2006); 54, 9329-9339.238.
205. Ovando A.C., Hernandez L.P., Hernandez E.P., Rodriguez J.A., Galan-Vidal C.A..Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*.(2009);113, 859-871 .
206. Kuntz S., U Wenzel U., Daniel H.. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines.*Eur. J. Nutr.* (1999);38(3):133-142 .
207. Zhang M.,Zhang J.P.,Ji H.T.,Wang J.S.,Qian D.H.Effect of six flavonoids on proliferation of hepatic stellate cells *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica*. (2000); 21(3):253-25,
208. Ujiki M.B. Ding X.-Z. Salabat M.R., Bentrem D.J. , Golkar L., Milam B., Talamonti M.S., Bell Jr R.H., Iwamura T. Adrian T.E. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Molecular Cancer*. (2006); 5(1):76.
209. Gupta, S. Afaq, F.Mukhtar, H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(2001);287:914-920.
210. Handa S.S, Suman Preet Singh Khanuja S.P.S. Longo G. Rakesh D.D. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. Trieste.(2008); pg.22 .

211. Azwanida, N.N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants.*(2015); 4: 196.
212. Xu, B.J.; Chang, S.K. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.* (2007);72, S159-166.
213. Metivier, R.P.; Francis, F.J.; Clydesdale, F.M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J. Food Sci.* (1980);45, 1099-1100.
214. V. Gordana, J. Milić, M. Primorac, S. Savić (2012): *Framaceutska tehnologija I, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.*
215. Savić Lj. Metode ekstrakcije biljnih materijala: uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. *Lek Sirov.* 2014; 34 (34): 93-103.
216. J. Azmir , I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman , K.M. Sharif , A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul , K. Ghafoor , N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering* 117 (2013); 426–436.
217. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med.* (2018);13:20.
218. Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* (1999);12 (4), 564–582.
219. MussattoS.I. Chapter 11 - Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin. *Coffee in Health and Disease Prevention.* (2015); 93-106.
220. Mason, T. J., Peters, D. *Practical sonochemistry: Power ultrasound uses and applications.* Woodhead Publishing.(2002);
221. Chemat F, Tomao V, Viot M. In: Otlés, S. (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments. Ultrasound Assisted Extraction in Food Analysis.* CRC Press.(2008); 85-94.
222. M. Simić V.M. Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenolnih jediwewa iz ploda aronije (*Aronia melanocarpa* L.), doktorska disertacija, fakultet, Leskovac, 2018.
223. Zhang, H.-F., Yang, X.-H., Wang, Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions. *Trends in Food Science and Technology.* (2011); 22: 672–688.
224. Barba F.J., Galanakis C.M., Esteve M.J., Frigola A., Vorobiev E. (2015), Potential use of pulsed electric technologies and ultrasounds to improve the recovery of high-added value compounds from blackberries. *Journal of Food Engineering.* (2015); 167 (Part A), 38-44.
225. Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A.* (2004); 1043, 323–327.
226. Brdička R. *Osnove fizikalne kemije. Školska knjiga. Zagreb.* (1969). Ch. III (3.3), pg. 213 .

227. Sovilj M. Difuzione operacije. Tehnološki fakultet. Novi Sad (2004), poglavlje X, pg.120-50
228. King J.W, Grabiell R.D., Isolation of polyphenolic compounds from frutis or vegetables utilizing sub-critical water extraction. US Patent 7. (2007); 208,181, B1.
229. Smith R.M.. Superheated water: The ultimate green solvent for separation science. Anal. Bioanal. Chem.(2006); 385(3), 419.
230. Haghghi A.A., M. Khajenoori M. In book: Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modelin. (2013); pp.29, Ch.17: 459-487 .
231. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phopshomolybdic-phopshotungstic acid reagents. Am.J.Enol.Vitic.(1965); 16:144-158 .
232. Brighente I.M.C., Dias M., Verdi L.G., Pizzolatti M.G. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. Pharmaceutical Biology. (2007); 45:2, 156-161.
233. Vermeris W., Nicholson R. Phenolic Compound Biochemistry. Springer. Netherlands, Dordrecht, (2006).
234. Vulic J. , Tumbas V., Savatović S., Djilas S., Cetkovic G. Canadanovic-Brunet J., Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts. Acta Period Technol.(2011); 27: 1-27(9).
235. Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex specific application to the determination of vitamin E. Anal.Biochem. (1999); 269: 337-341.
236. Hsu C.K. , Chiang B.-H., Chen Y.-S., Yang J.H., Liu C.L, Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricm Gaertn*) sprout with trace lement water. Food Chem. (2008); 108: 633-641.
237. Hinenburg I., Damien Dorman H.J., Hiltunen R.Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and species. Food Chem. (2006); 97:122-129 .
238. Kedare S.B., Singh R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J. Food Sci. Technol. (2011); 48(4): 412–422.
239. Contreras-Guzman E.S., Strong F.C. Determination of tocopherols (Vitamin E) by reduction of cupric ion. Journal of the Association of Official Analytical Chemists (USA) (1982);65:1215-1222.
240. Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K. A Simple Screening Method for Antioxidants and Isolation of Several Antioxidants Produced by Marine Bacteria from Fish and Shellfish. Bioscience, biotechnology and biochemistry. (1994); 58:10, 1780-1783.
241. Kumarasamy Y., Byres M., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D. Screening seeds of some Scottish plants for free-radical scavenging activity. Phytother. (2007); 21: 615-621
242. Radojković M., Zeković Z., Mašković P., Vidović S., Mandić A., Mišan A., Đurović S. Biological activities and chemical composition of *Morus* leaves extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. J.SuperCrit. Fluids. (2016); 117: 50-58.

243. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. (1983); 65: 55-63.
244. Baviskar B.A. , Khadabadi S.S., Deore S.L., Shiradkar M.R. Synthesis of clubbed Triazolyl Indeno[1,2-C]Isoquinolines as an Novel Anticancer Agent. *Pelagia Research Library Der Pharmacia Sinica*. (2012); 3 (1):24-30 .
245. Sarker S.D., Nahar L., Kumarasamy Y. 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*. (2007);42(4):321-4.
246. P. Mašković, J. D. Maksimović, V. Maksimović, J. Blagojević, M. Vujošević, N. T. Manojlović, M. Radojković, M. Cvijović, S. Solujić, Biological activities of phenolic compounds and ethanolic extract of *Halacsya sendmeri* (Boiss). *Dörfer, Open Life Sci.*7 (2012);7: 327-333 .
247. S. Stanišić. Tehnološkeoperacije I, Tehnološkifakultet, Novi Sad. (1987).
248. Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Mašković P., Savić S., Nikolić L. 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*. (2015); 65: 582-591.
249. Chemat F., Rombaut N., Sicaire A. G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A. S., Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*. (2017);34, 540-560.
250. Smith R. M. Extractions with superheated water. *J. Chromatogr. A*. (2002);975, 31-46 .
251. Teo C. C., Tan S. N., Yong J. W. H., Hew C. S. Ong E. S. Pressurized hot water extraction (PHWE). *J. Chromatogr. A* (2010);1217(16): 2484-94 .
252. Rodríguez-Meizoso I., Marin F.R., Herrero M., Señorans F.J., Reglero G., Cifuentes A., Ibáñez E. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2006);41:1560–1565.
253. Xu H., Wang W., Jiang J., Yuan F., Gao Y. Subcritical water extraction and antioxidant activity evaluation with on-line HPLC-ABTS·+ assay of phenolic compounds from marigold (*Tagetes erecta L.*) flower residues. *J. Food Sci. Technol.* (2014);52:1–9.
254. Shitu A., Izhar S., Tahir T. M. Sub-critical water as a green solvent for production of valuable materials from agricultural waste biomass: a review of recent work. *Global Journal of Environmental Science and Management*. (2015); 1(3), 255-264.
255. N. Mokhtar, M. F. M. Nordin, N. A. Morad. Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content and Radical Scavenging Activity from *Zingiber zerumbet* Rhizome using Subcritical Water Extraction. *International Journal of Engineering*. (2018); 31(8): 1421-1429.
256. Matławska I., Sikorska M., and Bylka W. Flavonoid compounds in *Lavatera thuringiaca L. (Malvaceae)* flowers. *Acta Polon. Pharm.* (1999);56: 453-458.

257. Ko M.J., Cheigh C.-I., Chung, M.-S. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chem.* (2014);143: 147–155.
258. Hartonen K., Parshintsev J., Sandberg K., Bergelin E., Nisula L., Riekkola M.L. Isolation of flavonoids from aspen knotwood by pressurized hot water extraction and comparison with other extraction techniques. *Talanta.* (2007); 74: 32-38.
259. Aliakbarian B., Fathi A., Perego P., Dehghani F. Extraction of antioxidants from winery using subcritical water. *The journal of Supercritical Fluids.*(2012); 65: 18-24.
260. Rice L., Howard L. R. Subcritical water and carbonated water extraction of anthocyanins from grape pomace. *Discovery, The Student Journal of Dale Bumpers College of Agricultural, Food and Life Sciences. University of Arkansas System Division of Agriculture.* (2008); 9:82-90.
261. King, J. W., Grabiell, R. D., Wightman, J. D. Subcritical water extraction of anthocyanins from fruit berry substrates. In *Proceedings of the 6th Int. Symposium on Supercritical Fluids.* (2003); 1: 28-30.
262. Singh P.P., Saldaña M.D. Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International.* (2011); 44: 2452-2458.
263. Cheigh C-I., Yoo S-Y., Ko M-J., Chang P-S., Chung M-S. Extraction characteristics of subcritical water depending on the number of hydroxyl group in flavonols. *Food Chem.* (2015);168:21-6.
264. Matławska I., Sikorska M., Bylka W. Phytochemical investigation of *Lavatera trimestris* L. (*Malvaceae*). In: *Proceedings of the 6th Conference on the Application of Chromatographic Methods and Phytochemical and Biochemical Research.* Medical Academy of Lublin, Faculty of Pharmacy. (1997); 12-19 June.
265. Główniak K., Skalicka K., Ludwiczuk A., Jop K. Phenolic compounds in the flowers of *Lavatera trimestris* L. (*Malvaceae*), *J. Planar. Chromatogr.* (2005); 18, 264-268.
266. Skalicka-Woźniak K., Melliou E., Gortzi O., Główniak K. Chemical Constituents of *Lavatera trimestris* L. - Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Zeitschrift für Naturforschung C.* (2007); 62(11-12):797-800.
267. Everette J. D., Bryant Q. M., Green A. M., Abbey Y. A., Wangila G. W., Walker R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of agricultural and food chemistry.* (2010); 58(14): 8139-8144.
268. Ikawa M., Schafer T., Dollard C., Sasner J. Utilization of Folin-Ciocalteu reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. Food Chem.* (2003);51(7):1811–1815.
269. Neveu V., Perez-Jimenez J., Vos F, Crespy V., Du Chaffaut L., Mennen L., Knox C., Eisner R., Cruz J., Wishart D., Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database.*(2010); 1-9.
270. Radovanović B.C., Milenković Anđelković A.S., Radovanović A.B., Anđelković M.Z. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits grown in Southeast Serbia. *Trop. J Pharmac. Res.*(2013); 12 (5), 813-819 .
271. Jitan S.A., Alkhoori S.A., Yousef L.F. Chapter 13 - Phenolic Acids From Plants:

- Extraction and Application to Human Health. *Studies in Natural Products Chemistry*. (2018); 58: 389-417.
272. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*. (1997); 16: 33– 50.
273. Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L.R., Gardner P.T., Heinonen M.I., Huynh-Ba A.H., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L.H., Tijburg L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur. Food Res. Technol.* (2001); 212: 319– 28 .
274. Kim D. S., Kim M. B., , S. B. (2017). Enhancement of Phenolic Production and Antioxidant Activity from Buckwheat Leaves by Subcritical Water Extraction. *Preventive nutrition and food science*.(2017); 22(4), 345–352.
275. Pongnaravane B., Goto M., Sasaki M., Anekpankul T., Pavasant P., Pavasant P., Shotipruk A. Extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by pressurized hot water: *The Journal of Supercritical Fluids*. (2006); 37 (3): 390-396
276. Plaza M., Amigo-Benavent M., Del Castillo M.D., Ibáñez E. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extractio, *Food Research International*. (2010); 43(10):2341-2348
277. Oteiza P.I., Erlejman A.G., Verstraeten S.V., Keen C.L., Fraga C.G. Flavonoid–membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface?, *Clin. Dev. Immunol.*(2005); 12(1): 19–25
278. Alamed J., Chaiyasit W., McClements D.J., Decker E.A. Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods., *J. Agric. Food Chem.*(2009); 57(7):2969-2976
279. Brewer M.S. Natural Antioxidants: sources, compounds, mechanism of action, and potential applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* (2011); 10 (4): 221-47 .
280. Xu D., Hu M.-J. , Wang Y.-Q. Cui Y.-L. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*.(2019); 24, 1123.
281. Enogieru A.B., Haylett W., Hiss D.C., Bardien S., Ekpo O.E. Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxid. Med. Cell Longev.*(2018);2018:6241017.
282. Pourreza N. Phenolic compounds as potential antioxidant. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* 2013;8(4):149-150. d
283. Pannala A.S., Chan T.S., O'Brien P.J., Rice-Evans, C.A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001); 282, 1161–1168
284. Shahidi F., P. K. Janitha P.K., Wanasundara P.D. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (2009); 32(1):67-103
285. Itharat A., Houghton P.J., Eno-Amooquaye E., Burke P.J. Sampson J.H. Raman A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J. Ethnopharmacol.* (2004); 90(1):33-8.
286. Máthé C., Bohács A., Duffek L., Lukácsovits J., Komlosi Z.I., Szondy K., Horváth I., Müller V., Losonczy G. Cisplatin nephrotoxicity aggravated by cardiovascular

- disease and diabetes in lung cancer patients. *European Respiratory Journal*. (2011); 37(4): 888-894.
287. Duan Z., Cai G., Li J., Chen X. Cisplatin-induced renal toxicity in elderly people. *Ther Adv Med Oncol*. (2020);12:1758835920923430.
288. Manohar S., Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J. Nephrol*. (2018);31(1):15-25.
289. Plaza M., Turner C. Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trends in Analytical Chemistry*. (2015);71: 39-54 .
290. Yuan Z., Long C., Junming T., Qihuan L., Youshun Z., Chan Z. Quercetin-induced apoptosis of HL-60 cells by reducing PI3K/Akt. *Mol. Biol. Rep*. (2012);39(7):7785-93.
291. Zhou J., Li L.U., Fang L.I., Xie H., Yao W., Zhou X., Xiong Z., Wang L.I., Li Z., Luo F. Quercetin reduces cyclin D1 activity and induces G1 phase arrest in HepG2 cells. *Oncol Lett*. (2016);12(1):516-522.
292. Refolo M.G., D'Alessandro R., Malerba N., Laezza C., Bifulco M., Messa C., Caruso M.G., Notarnicola M., Tutino V. Anti Proliferative and Pro Apoptotic Effects of Flavonoid Quercetin Are Mediated by CB1 Receptor in Human Colon Cancer Cell Lines. *J. Cell Physiol*. (2015) ;230(12):2973-80.
293. Zhu Y, Wu J, Li S, Wang X, Liang Z, Xu X, Xu X, Hu Z, Lin Y, Chen H, Qin J, Mao Q, Xie L. Apigenin inhibits migration and invasion via modulation of epithelial mesenchymal transition in prostate cancer. *Mol. Med. Rep*. (2015);11:1004–1008.
294. Yin F, Giuliano AE, Law RE, Van Herle AJ. Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Res*. (2001);21:413–420.
295. Wang I.K., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K. Induction of apoptosis by lovastatin through activation of caspase-3 and DNase II in leukaemia HL-60 cells. *Pharmacol Toxicol*. (2000);86:83–91.
296. Bouarab-Chibane L. , Forquet V. , Lantéri P., Clément Y. , Léonard-Akkari L., Oulahal N. , Pascal Degraeve P. ,Bordes C. Antibacterial Properties of Polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models. *Front. Microbiol*. (2019); 10,Art. 829: 1-23.
297. Xie Y., Chen J., Xiao A, Liu L. Antibacterial Activity of Polyphenols: Structure-Activity Relationship and Influence of Hyperglycemic Condition. *Molecules* (2017); 22(11):1913
298. Othman L., Sleiman A., Abdel-Massih R.M. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Front. Microbiol*. (2019); 10, Art. 911: 1-28.
299. Cushnie T.T.P., Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. (2005); 26 (5): 343-356.
300. Farhadi F., Khameneh B., Iranshahi M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. (2019); 33(1):13-40.
302. K. A. Ohemeng, C. F. Schwender, K. P. Fu, and J. F. Barrett, “DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. (1993); 3(2): 225–230.

303. Nitiema L.W., Savadogo A., Simpore J., Dianou D., Traore A.S. In vitro Antimicrobial Activity of Some Phenolic Compounds (Coumarin and Quercetin) Against Gastroenteritis Bacterial Strain. *International Journal of Microbiological Research*. (2012); 3 (3): 183-187.
304. Memariani H., Memariani M., Ghasemian A. An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. *World J. Microbiol Biotechnol*. (2019); 35:143
305. Amin M.U., Khurram M., Khattak B. Khan J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Altern Med*. (2015); 15, 59.
306. Gutiérrez-Venegas G., Gómez-Mora J. A., Meraz-Rodríguez M. A., Flores-Sánchez M. A., Ortiz-Miranda L. F. Effect of flavonoids on antimicrobial activity of microorganisms present in dental plaque. *Journal List Heliyon*.(2019);5(12).
307. Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition, *Free Radical Research*. (2006); 40 (2):223-31
308. Rožman T., Jaršek B., Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*. (2009); 93(1):51-58.

Биографија аутора

Весна Величковић је рођена 8.12.1974. године у Чачку. Основну школу „Милица Павловић“ у Чачку је завршила 1989. године. Средњу техничку школу у Чачку, смер хемијско технолошки техничар, завршила је са одличним успехом 1993. године. Школске 1993/1994. године уписала је Природно-математички факултет у Крагујевцу, одсек хемија, смер истраживање и развој. Основне академске студије завршила је 2001. године, са просечном оценом 7.82 (седам осамдесет два). Специјалистичке студије из биохемије уписала је 2002. године, и завршила их 2010. године чиме стиче стручни назив специјалисте хемијских наука, смер биохемија. Даље академско усавршавање наставила је уписивањем докторских академских студија, модул биохемија, школске 2012/2013. године, на Природно-математичком факултету под менторством ванредног професора биохемије др Павла Машковића. У оквиру докторских студија положила је све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 9.83 (девет осамдесет три). Након завршеног факултета Весна Величковић је радила у Фабрици резног алата у Чачку на пословима водећег хемијског инжењера у хемијској лабораторији. Затим почиње да ради у Медицинској школи у Чачку као професор хемије а потом и у Техничкој школи у Чачку. С обзиром да целокупна хемијска струка бива премештена у новоосновану Прехрамбено-угоститељску школу, прелази у нову школу где ради и данас као професор хемије и стручних предмета на смеру техничар за заштиту животне средине. У току рада постиже запажене резултате са ученицима-освојено друго место из хемије у појединачном и прво месту у екипном пласману на такмичењу средњих стручних школа. Такође узима активно учешће у раду новооснованог Регионалног центра за усавршавање и професионални развој просветних радника-Чачак, чији је потпредседник Управног одбора у периоду од оснивања у току прве четири године. Од 2017. године ради и као предавач хемије на Високој школи струковних студија у Чачку који је данас у склопу Факултета техничких наука у Чачку, Универзитета у Крагујевцу. Бави се истраживачким радом из области биохемије. Предмет њеног истраживања је биохемијска активност одабраних биљних врста. До сада има три објављена рада у врхунским часописима од међународног значаја (M₂₁) и четири рада са међународне конференције, међународних и научно стручних скупова. Члан је Српског хемијског друштва и активни је учесник у раду Подружнице Српског хемијског друштва у Чачку.

Библиографија

The Journal of Supercritical Fluids 128 (2017) 331–337



Contents lists available at ScienceDirect

The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/supflu

Application of conventional and non-conventional extraction approaches for extraction of *Erica carnea* L.: Chemical profile and biological activity of obtained extracts



Vesna Veličković^a, Saša Đurović^{b,*}, Marija Radojković^b, Aleksandra Cvetanović^b, Jaroslava Švarc-Gajić^{cb}, Jelena Vujić^a, Srećko Trifunović^a, Pavle Z. Mašković^{cc,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Novi Sad, Faculty of Technology, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia

^c University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Department of Food Technology, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Erica carnea L.
Extraction
Chemical composition
HPLC-DAD analysis
Biological activity

ABSTRACT

Erica carnea L. or spring heath, is a perennial evergreen shrub, which belongs to the *Ericaceae* botanical family, which plant species are known for their biological activity and medical application. Despite the wide range of biological activity and medical application, *Erica carnea* L. has not been studied. This study deals with the application of conventional and non-conventional extraction approaches for isolation of bioactive compounds from the plant. Obtained extracts was tested regarding their chemical profile (total phenolics, flavonoids, condensed tannins, gallotannins and anthocyanins contents) and biological activity (antioxidant, cytotoxic and antibacterial activities). Phenolic profile of extracts was established using HPLC-DAD analysis where rosmarinic acid and rutin were dominant compounds. Results of antioxidant and cytotoxic activities demonstrated the domination of subcritical water extract, while ultrasound-assisted extract exhibited the highest total antibacterial activity. Presented results demonstrated that plant *Erica carnea* L. might be used as a potential source of biologically compounds.

1. Introduction

Erica carnea L. or spring heath, is a perennial evergreen shrub, which belongs to the *Ericaceae* botanical family and *Erica* genus [1]. This plant may grow up to 50 cm in height, leaves are in the form of thick, short and narrow needles, flowers are grouped into clusters of blossoms, usually longer on one side, while fruits are in the shape of capsule with the seeds inside it [2]. The plant itself is growing in Central and Southern Europe and South Africa in the mountains, in deciduous, coniferous or mixed forests, while in Serbia it grows in the Tara mountain [3]. Plant species of this family exert wide range of biological activities such as antioxidant [4,5], antidiabetic [6], anti-inflammatory [7], antibacterial [8] and analgesic [9]. Species of this botanical family have also found their application in medicine for the treatment of urinary tract infection [10].

Phenolic compounds, which are the product of secondary metabolism of plants, are one the most investigated class of natural products due to their wide range of biological activities, such as antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, anti-inflammatory, antiulcer, antispasmodic,

antiviral and many other activities [11–13]. There are over 8000 compounds which belong to one of the following group: simple phenolic, phenolic acids, stilbenes, flavonoids, coumarins, tannins and others [14,15]. For isolation of these and other compounds from their natural sources, many different approaches may be applied. Among them are conventional extraction techniques such as maceration and Soxhlet extraction and non-conventional techniques such as ultrasound-assisted, microwave-assisted and subcritical water extraction techniques [16–18]. Every technique possesses certain advantages and disadvantages and they are usually combined to obtain improved results.

Soxhlet extraction represents one of the conventional techniques which applies mainly toxic and environmental non-friendly solvents such as hexane and methylene chloride, but is also standard technique and main reference for evaluation of other extraction techniques performances [17]. To overcome usage of such approaches together with toxic solvents, and to increase total extraction yield and selectivity of the process as well, new and more environmental friendly extraction techniques such as ultrasound-assisted (UAE), microwave-assisted

* Corresponding authors.

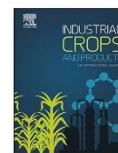
E-mail addresses: sasatfns@uns.ac.rs (S. Đurović), pavlemaskovic@yahoo.com (P.Z. Mašković).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.023>

Received 12 January 2017; Received in revised form 25 March 2017; Accepted 27 March 2017

Available online 28 March 2017

0896-8446/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



Research paper

Summer savory extracts prepared by novel extraction methods resulted in enhanced biological activity



Pavle Mašković^c, Vesna Veličković^a, Milan Mitić^{d,*}, Saša Đurović^b, Zoran Zeković^b, Marija Radojković^b, Aleksandra Cvetanović^b, Jaroslava Švarc-Gajić^b, Jelena Vujić^c

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000, Kragujevac, Serbia

^b University of Novi Sad, Faculty of Technology, Bulevar Cara Lazara 1, 21000, Novi Sad, Serbia

^c University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Cara Dušana 34, 32000, Čačak, Serbia

^d University of Niš, Faculty of Science and Mathematics, Višegradska 33, 18000, Niš, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Summer savory
Extract preparation
Chemical analysis
HPLC-DAD analysis
Biological activity

ABSTRACT

Satureja hortensis L. (summer savory) is herb from *Lamiaceae* plant family known by its usage in folk medicine and cooking. Despite these facts, this plant was not well studied regarding the application of nonconventional extraction techniques and utilization of prepared extracts. Thus, aim of this study was to prepare extract using conventional (maceration and Soxhlet) and non-conventional (ultrasound-assisted, microwave-assisted and subcritical water) approaches, to establish their chemical profile and biological activity using different assays and methods. Results confirmed the domination of subcritical water approach for isolation of natural compounds, following by microwave-assisted extraction. High performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-PDA) analysis confirmed the presence and domination of rosmarinic acid in conventionally prepared extracts, while rutin and quercetin dominated in non-conventionally prepared ones. Antioxidant and cytotoxic assays followed the trends of previous analysis, where the highest activity was exhibited by subcritical extract. Thus, results showed that extracts may be applied in food and pharmaceutical industries for utilization.

1. Introduction

Genus *Satureja* belongs to the *Lamiaceae* family of aromatic plants and comprises more than 30 species of herbs and shrubs, which are widely distributed over the Mediterranean region (Valizadeh et al., 2014). *Satureja hortensis* L. (summer savory) is one of the herb from this plant family known by its usage in folk medicine and cooking in several regions (Momtaz and Abdollahi, 2010). Aerial parts of the plant possesses a distinctive taste a may be used as a seasoning, while flowers and leaves found their application as a tea and in traditional medicine for treatment of cramps, muscle pain, nausea, indigestion, diarrhea, and infectious diseases (Dorman and Hiltunen, 2004; Güllüce et al., 2003). Beside these applications, plant exhibits antispasmodic, antidiarrheal, antioxidant, sedative, and antimicrobial activities (Deans and Svoboda, 1989; Güllüce et al., 2003; Hajhashemi et al., 2000; Madsen et al., 1996). It has been shown that plant leaves are rich in phenolic compounds, especially rosmarinic acid and flavonoids, which are one of the most potent antioxidants (Exarchou et al., 2002; Kemertelidze et al., 2004), while carvacrol and γ -terpinene have been reported to be the

main compounds of essential oil (Góra et al., 1996).

Although, there are many studies regarding summer savory, they were usually dealing with the essential oil (Boyraz and Ozcan, 2006; Góra et al., 1996; Güllüce et al., 2003; Hajhashemi et al., 2002; Kemertelidze et al., 2004; Saeidi and Shahab-Ghayoor, 2015; Valizadeh et al., 2014) and application of conventional extraction approaches (Dorman and Hiltunen, 2004; Exarchou et al., 2002; Hajhashemi et al., 2002; Şahin et al., 2003). However, traditional extraction technique possess some drawbacks such as: thermal degradation of compounds of interest, occurrence of hydrolysis and residue of organic solvents in obtained extract (Zeković et al., 2016). Usually used organic solvents could express negative impact on environment or on human health, or can even be toxic (Wang and Weller, 2006; Veličković et al., 2017). This imply the necessity of further purification making the process of isolation of bioactive compounds more complicated, which can, in the end, increases the price of final products. Also, traditional techniques are very time-consuming and require relatively large quantities of solvents (Luque de Castro and Garcia-Ayuso, 1998).

On the other hand, during last years significant progress was made

* Corresponding author.

E-mail address: milanmitic83@yahoo.com (M. Mitić).

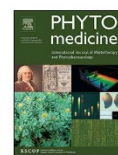
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.063>

Received 13 July 2017; Received in revised form 25 September 2017; Accepted 28 September 2017
0926-6690/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phyomed

Original Article

Biological activity and chemical profile of *Lavatera thuringiaca* L. extracts obtained by different extraction approaches



Pavle Z. Mašković^{a,*}, Vesna Veličković^b, Saša Đurović^{c,d,**}, Zoran Zeković^c, Marija Radojković^c, Aleksandra Cvetanović^c, Jaroslava Švarc-Gajić^c, Milan Mitić^e, Jelena Vujić^f

^a University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Department of Food Technology, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia

^b University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^c University of Novi Sad, Faculty of Technology, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia

^d Institute of General and Physical Chemistry, Studenski trg 12/V, 11158 Serbia

^e University of Niš, Faculty of Science and Mathematics, Višegradska 33, 18000 Niš, Serbia

^f University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Department of Chemistry and Chemical Engineering, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Lavatera thuringiaca L.

Extraction

Chemical composition

HPLC-DAD analysis

Biological activity

ABSTRACT

Background: *Lavatera thuringiaca* L. is herbaceous perennial plant from *Malvaceae* family, which is known for its biological activity and richness in polyphenolic compounds. Despite this, the information regarding the biological activity and chemical profile is still insufficient.

Purpose: Aim of this study was to investigate biological potential and chemical profile of *Lavatera thuringiaca* L., as well as influence of applied extraction technique on them.

Study design and methods: Two conventional and four non-conventional extraction techniques were applied in order to obtain extracts rich in bioactive compound. Extracts were further tested for total phenolics, flavonoids, condensed tannins, gallotannins and anthocyanins contents using spectrophotometric assays. Polyphenolic profile was established using HPLC-DAD analysis. Biological activity was investigated regarding antioxidant, cytotoxic and antibacterial activities. Four antioxidant assays were applied as well as three different cell lines for cytotoxic and fifteen bacterial strain for antibacterial activity.

Results and conclusion: Results showed that subcritical water extraction (SCW) dominated over the other extraction techniques, where SCW extract exhibited the highest biological activity. Study indicates that plant *Lavatera thuringiaca* L. may be used as a potential source of biologically compounds.

Introduction

During the last few decades, consumption of the plants and its products is in constant growth. Main reasons are expensiveness of synthetic products and their unfavorable effects on human health (Uysal et al., 2016). Natural products based on the plant materials are conquering the market in Europe and USA with more than 150 prescribed drugs until 2005 (Balunas and Kinghorn, 2005; Zengin et al., 2017). Conducted studies showed that several classes of compounds presented in these plants are responsible for their biological activity. Among them are phenolic compounds which represent the class of

compounds that are tested for years, even decades, due to their multiple positive and useful effects in human body, primarily as fighters against various diseases. It has been shown that these compounds express wide range of activities such as antioxidant, antimicrobial, antiviral, anti-allergic, anti-inflammatory, cytotoxic as well as many other activities (Mocan et al., 2016; Zengin et al., 2017). Additionally, consumption of plant as food, which contained high content of those compounds, primarily flavonoids, is often associated with a reduced risk of occurrence of many human diseases, which has been confirmed through several studies (Mishra et al., 2013). One of the most investigated biological activities is an antioxidant activity, which was proved using a number

Abbreviations: DPPH, 2,2-diferyl-1-picrylhydrazyl; SE, Soxhlet extraction; MAC, maceration; UAE, ultrasound-assisted extraction; MAE, microwave-assisted extraction; SCW, subcritical water extraction; TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoids content; CT, condensed tannins; GA, gallotannins; TAC, Total anthocyanins content; TA, total antioxidant capacity; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; RD, human rhabdomyosarcoma cell line; Hep2c, human cervix carcinoma cell line; L2OB, murine fibroblast cell line; cis-DDP, cis-diamminedichloroplatinum; A, amracin

* Corresponding author.

** Co-Corresponding author at: Department of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia.

E-mail addresses: pavlem@kg.ac.rs (P.Z. Mašković), sasatfns@uns.ac.rs (S. Đurović).

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.11.010>

Received 31 January 2017; Received in revised form 1 September 2017; Accepted 29 November 2017
0944-7113/© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Весна М. Величковић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Полифенолни профил и диокемијска активност екстракта садржаног дијетних врста као извори фенолујалних природних нутрацевтика

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

у Крагујевцу, 8.2.2021 године,

В. Величковић
потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Весна М. Величковић, дозвољавам не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Тримернолни профил и динамичка активност,
експликација динамичких симбола као избора
појених симбола природне Аудиовизуелна
која је одбрањена на Природно-Математичком факултету

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем преузимања.

Овом Изјавом такође

 дозвољавам не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у Жратурвцу, 8.2.2021 године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org/rs/>