



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLINIČKA MEDICINA

**BIOLOŠKI POTENCIJAL I
HEMIJSKA ANALIZA VRSTA RODA
SALIX L. (SALICACEAE) SA
TERITORIJE REPUBLIKE SRBIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Doc. dr Nevena Grujić-Letić

Kandidat: Emilia Gligorić

Novi Sad, 2018. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Emilia Gligorić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Nevena Grujić-Letić, docent
Naslov rada: NR	Biološki potencijal i hemijska analiza vrsta roda <i>Salix</i> L. (Salicaceae) sa teritorije Republike Srbije
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2018
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21 000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 7/ stranica 145/ slika 18/ grafikona 58/ referenci 156/ priloga -)
Naučna oblast: NO	Farmacija
Naučna disciplina: ND	Farmaceutska hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Salix</i> ; lekovito bilje; fenoli; kora biljaka; analitičke hemijske metode; antioksidansi; biljni ekstrakti; flavonoidi; listovi biljaka
UDK	615.322.07:582.623(497.11) 543.544.5
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Rod <i>Salix</i> pripada porodici Salicaceae i obuhvata oko 450 vrsta širom sveta, od kojih u Republici Srbiji raste oko 18. Kora vrbe ispoljava antiinflamatorno, antireumatsko, analgetičko i antipiretičko delovanje sinergističkim efektom njenih glavnih aktivnih supstanci – glikozida salicina, fenolnih i flavonoidnih jedinjenja.</p> <p>Ciljevi ovog rada bili su ispitivanje uticaja klasične i savremenih metoda ekstrakcije na hemijski sastav i biološke aktivnosti ekstrakata različitih vrsta vrba, utvrđivanje razlika u sadržaju aktivnih komponenti i biološkom potencijalu između ekstrakata kore i ekstrakata lista iste vrste vrbe, kao i utvrđivanje razlika u sadržaju sekundarnih metabolita i antioksidantnoj aktivnosti kod ekstrakata različitih vrsta vrba. Ispitivanja su uključivala analizu 92 ekstrakta kore i lista osam predstavnika roda <i>Salix</i>, dobijenih različitim metodama (maceracija, ultrazvučna i mikrotalasna ekstrakcija) i pri različitim uslovima ekstrakcije (rastvarač, vreme, veličina čestica). Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, kao i antioksidativna aktivnost određeni su spektrofotometrijski. Hemijska karakterizacija ekstrakata vršena je primenom visokofikasne tečne hromatografije (HPLC). Metodom <i>in silico</i> molekularnog dokinga ispitan je inhibitorski potencijal sastojaka ekstrakata prema enzimima ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2) i acetilholinesterazi (AChE).</p> <p>Savremenim metodama ekstrakcije izolovan je</p>

	<p>veći broj pojedinačnih komponenata u najvećoj koncentraciji i dobijeni su ekstrakti sa jačim potencijalom neutralizacije hidroksilnih radikala. Klasična metoda maceracije 70% etanolom (v/v) bila je pogodnija za dobijanje ekstrakata sa jačim antioksidativnim potencijalom prema DPPH radikalu kod gotovo svih ispitivanih <i>Salix</i> vrsta. Kod većine <i>Salix</i> vrsta jači antioksidantni potencijal prema DPPH radikalu ispoljili su ekstrakti kore. Kod polovine ispitivanih vrsta ekstrakti lista su inhibisali hidroksilne radikale u većoj meri. Veći sadržaj pojedinačnih jedinjenja u ekstraktima kore ili lista zavisio je od same vrste vrbe. Najjaču antioksidantu aktivnost ispoljila je vrsta <i>S. alba</i>, dok je u pogledu hemijskog sastava najraznovrsnija vrsta bila <i>S. fragilis</i>. <i>In silico</i> analizom metodom molekularnog dokinga utvrđen je jak inhibitorni potencijal flavonoidnih jedinjenja kvercetina, naringenina i epikatehina, kao i hlorogenske kiseline među fenolnim kiselinama prema enzimima COX-1 i COX-2. Epikatehin, salicin i hlorogenska kiselina ispoljili su značajno inhibitorno delovanje na enzim AChE u doking studijama.</p> <p>Dobijeni rezultati ukazuju da pored kore i list vrbe ima veliki potencijal primene kao izvor značajnih fitokomponenta, kao i na mogućnost eksploatacije vrsta vrba koje nisu u komercijalnoj upotrebi kao lekovitih sirovina za izolovanje antioksidanasa i farmakološki aktivnih supstanci.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	21.04.2016.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: dr Ružica Igić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu</p> <p>član: dr Nevena Grujić-Letić, docent, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu</p> <p>član: dr Branislava Srđenović-Čonić, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu</p> <p>član: dr Ljilja Torović, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu</p> <p>član: dr Veljko Krstonošić, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu</p>

University of Novi Sad
Faculty of Medicine
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	
Author: AU	Emilia Gligorić
Mentor: MN	PhD Nevena Grujić-Letić, assistant professor
Title: TI	Biological potential and chemical analysis of species from the genus <i>Salix</i> L. (Salicaceae) from the territory of Republic of Serbia
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Number of chapters 7 / pages 145 / pictures 18 / graphicons 58/ references 156 /
Scientific field SF	Pharmacy
Scientific discipline SD	Pharmaceutical chemistry
Subject, Key words SKW	<i>Salix</i> ; Plants, Medicinal; Phenols; Plant Bark; Chemistry Techniques, Analytical; Antioxidants; Plant Extracts; Flavonoids; Plant Leaves
UC	615.322.07:582.623(497.11) 543.544.5
Holding data: HD	Library of the Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	<p>The genus <i>Salix</i> belongs to the family Salicaceae and comprises about 450 species worldwide, out of which 18 grow in the Republic of Serbia. Willow bark exhibits anti-inflammatory, anti-rheumatic, analgesic and antipyretic effects through synergistic action of its main ingredients -glycosidesalicin, phenolic and flavonoid compounds.</p> <p>Aims of this paper were to analyse the impact of classical and modern extraction methods on chemical composition and biological activities of extracts of different willow species, determine the differences in the amount of active compounds and biological potential between bark and leaf extracts within the same willow species, as well as between extracts of various species.</p> <p>The analysis included 92 bark and leaf extracts of eight species from the genus <i>Salix</i>, obtained by different extraction methods (maceration, ultrasound and microwave assisted extraction) and conditions (solvent, time, particle size). Total phenolics and flavonoids content, as well as antioxidant activity were determined spectrophotometrically. Chemical characterization was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC). Cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) and acetylcholine esterase (AChE) inhibitory potential of compounds isolated from the extracts was examined by <i>in silico</i> method of molecular docking.</p> <p>Greater number of individual components in highest concentration, as well as extracts with stronger hydroxyl radical scavenging potential were obtained by modern extraction methods. Classical method of maceration with 70% ethanol (v/v) was</p>

	<p>more suitable for obtaining extracts with higher DPPH radical scavenging activity in the vast majority of tested species. In half of the analysed species leaf extracts inhibited hydroxyl radicals more than bark. Higher amount of individual compounds in bark or leaf extracts depended on the species itself. <i>S. alba</i> exhibited the strongest antioxidant activity, whereas <i>S. fragilis</i> had the most diverse chemical composition. Strong COX-1 and COX-2 inhibitory potential of flavonoids quercetin, naringenin and epicatechin, as well as chlorogenic acid among phenolic acids was determined by <i>in silico</i> molecular docking analysis. Molecular docking studies also demonstrated the inhibitory activity of epicatechin, salicin and chlorogenic acid toward AChE.</p> <p>The obtained results indicate that not only bark, but willow leaf as well could be used as source of significant phytochemicals and also the possibility of exploitation of willow species that are not commercially used as medicinal raw material for isolation of antioxidants and pharmacologically active substances.</p>
Accepted on Senate on: AS	21.04.2016.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Ružica Igić, PhD, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>member: Nevena Grujić-Letić, PhD, Assistant Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Branislava Srđenović-Čonić, PhD, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Ljilja Torović, PhD, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Veljko Krstonošić, PhD, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p>

Zahvalnica

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki doc. dr Neveni Grujić-Letić na nesebičnom trudu i zalaganju, predanosti i pruženom znanju tokom celokupnog rada na doktorskoj disertaciji, kao i na bezrezervnoj pomoći, iskrenoj podršci i ukazanom poverenju tokom svih ovih godina.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Ružici Igić na podršci, dragocenim savetima prilikom pisanja doktorske disertacije, kao i na zavođenju biljnog materijala u Herbarijum Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu..

Srdačno se zahvaljujem prof. dr Branislavi Srđenović Čonić, prof. dr Ljilji Torović i prof. dr Veljku Krstonošiću na korisnim savetima i podršci tokom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Biljani Božin i prof. dr Goranu Anačkovu na prikupljanju i determinaciji biljnog materijala.

Hvala mojim najdražim prijateljima što su me podržavali i verovali u mene od početka.

Beskrajnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, roditeljima, bratu, supruhu i ćerkici na bezuslovnoj ljubavi i podršci koju mi u životu pružaju i koji svaki moj uspeh čine potpunim.

Emilia Gligorić

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Rod <i>Salix</i>	3
2.2. Karakteristike vrsta	4
2.2.1. <i>Salix alba</i> L.....	4
2.2.2. <i>Salix amplexicaulis</i> Bory. (syn. <i>Salix purpurea</i> subsp. <i>amplexicaulis</i>).....	5
2.2.3. <i>Salix babylonica</i> L.....	6
2.2.4. <i>Salix eleagnos</i> Scop.	7
2.2.5. <i>Salix fragilis</i> L.	7
2.2.6. <i>Salix purpurea</i> L.....	8
2.2.7. <i>Salix triandra</i> L.	8
2.3. Upotreba vrbe kroz istoriju	9
2.4. Droga i osnovne aktivne komponente	10
2.5. Delovanja	16
2.5.1. Analgetsko delovanje	16
2.5.2. Antiinflamatorna aktivnost	17
2.5.3. Antipiretičko delovanje	20
2.5.4. Antikarcinogena aktivnost.....	20
2.5.5. Antimikrobno delovanje	21
2.5.6. Antiholinesterazna aktivnost	22
2.5.7. Profilaksa migrene	23
2.5.8. Gubitak telesne težine i poboljšanje sportskih performansi	23
2.5.9. Antioksidantno delovanje	24
2.6. Ekstrakcija.....	29
2.6.1. Mikrotalasna ekstrakcija.....	31
2.6.2. Ultrazvučna ekstrakcija	33
3. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE.....	34
3.1. Ciljevi.....	34

3.2. Radne hipoteze	34
4. EKSPERIMENTALNI DEO	35
4.1. Biljni materijal.....	35
4.2. Hemikalije	36
4.3. Aparatura.....	37
4.4. Ekstrakcija kore i lista različitih vrsta roda <i>Salix</i>	37
4.4.1. Maceracija etanolom.....	38
4.4.2. Mikrotalasna ekstrakcija.....	38
4.4.3. Ultrazvučna ekstrakcija	38
4.5. <i>In vitro</i> određivanje antioksidativnog delovanja dobijenih ekstrakata.....	39
4.5.1. DPPH test	39
4.5.2. Inhibicija hidroksilnih radikala (OH)	40
4.6. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	40
4.7. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	41
4.8. Validacija analitičke metode za određivanje hlorogenske kiseline (5-kafeoilhine kiseline) u ekstraktima vrbe	42
4.8.1. Selektivnost (specifičnost).....	42
4.8.2. Linearnost	43
4.8.3. Limit detekcije i limit kvantifikacije	43
4.8.4. Tačnost i prinos	44
4.8.5. Ponovljivost (preciznost).....	44
4.8.6. Robustnost	44
4.8.7. Uslovi HPLC analize za određivanje hlorogenske kiseline.....	45
4.8.8. Izrada rastvora za kalibraciju.....	45
4.9. Hemijska karakterizacija visokoefikasnom tečnom hromatografijom (HPLC).....	46
4.9.1. Izrada rastvora za kalibraciju.....	47
4.10. <i>In silico</i> ispitivanje inhibicije enzima ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2) i acetilholinesteraze (AChE)	51
4.10.1. Priprema liganada za doking	51
4.10.2. Priprema makromolekula za doking.....	52
4.10.3. Molekularni doking	52

4.11. Statistička obrada podataka.....	53
5. REZULTATI I DISKUSIJA REZULTATA	54
5.1. Efikasnost ekstrakcije.....	54
5.2. Rezultati antioksidantne aktivnosti	58
5.3. Rezultati ukupnih fenola	68
5.4. Rezultati ukupnih flavonoida	72
5.5. Validacija analitičke metode za određivanje sadržaja 5-CQA u ekstraktima vrbe	75
5.5.1. Ispitivanje sadržaja 5-CQA u ekstraktima lista i kore	79
5.6. Hemijska karakterizacija visokoefikasnom tečnom hromatografijom (HPLC).....	80
5.6.1. Salicin	83
5.6.2. Galna kiselina	87
5.6.3. Hlorogenska kiselina	89
5.6.4. <i>P</i> -hidroksibenzojeva kiselina.....	93
5.6.5. Vanilinska kiselina	95
5.6.6. Siringinska kiselina.....	96
5.6.7. Kafena kiselina	98
5.6.8. Epikatehin	99
5.6.9. <i>P</i> -kumarinska kiselina	101
5.6.10. Rutin	103
5.6.11. Kvercetin	105
5.6.12. Trans-cimetna kiselina.....	107
5.6.13. Naringenin	109
5.7. <i>In silico</i> ispitivanje inhibitornog delovanja izolovanih komponenti na enzime COX-1 i COX-2	111
5.7.1. Pravila Lipinskog.....	111
5.7.2. Molekularni doking	112
5.8. <i>In silico</i> ispitivanje inhibitornog delovanja dominantnih komponenti na enzim acetilholinesterazu	117
6. ZAKLJUČAK	123
7. LITERATURA	127

LISTA SKRAĆENICA

AChE – acetilholinesteraza

Ala – alanin

Arg – arginin

Asn – asparagin

Asp – asparaginska kiselina

COX – ciklooksigenaza

5-CQA – 5-kafeoilhina kiselina

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal

FC – Folin-Ciocalteu reagens

GAE – ekvivalent galne kiseline

ΔG_b – energija vezivanja

Gln – glutamin

Glu – glutaminska kiselina

Gly – glicin

His – histidin

HPLC – visokoefikasna tečna hromatografija

IC₅₀ – koncentracija potrebna za inhibiciju 50% slobodnih radikala

Ile – izoleucin

Ki – konstanta inhibicije

LD – limit detekcije

Leu – leucin

LQ – limit kvantifikacije

MT – mikrotalas

Met – metionin

NSAIL – nesteroidni antiinflamatorni lekovi

OH – hidroksil radikal

PDB – proteinska banka podataka (engl. *Protein data bank*)

Phe – fenilalanin

QE – ekvivalent kvercetina

RSC – kapacitet hvatanja slobodnih radikala (engl. *radical scavenging capacity*)

RSD – relativna standardna devijacija

Rt – retenciono vreme

s.e. – suvi ekstrakt

Ser – serin

Thr - treonin

Trp – triptofan

Tyr – tirozin

UZ – ultrazvuk

UV – ultraljubičasto zračenje

Val – valin

1. UVOD

Upotreba biljaka u lečenju stara je koliko i čovečanstvo. Brojne lekovite biljke su poslužile kao prirodne sirovine za razvoj mnogih danas široko primenjivanih lekova. Kora vrbe (*Salix* sp.) se često smatra jednim od prvih primera savremenog razvoja lekova iz lekovite biljke. Hemijska oksidacija salicina, sastojka kore vrbinog drveta, dovela je do otkrića nove supstance – salicilne kiseline. Acetilovani derivat salicilne kiseline (acetilsalicilna kiselina, Aspirin®) postao je jedan od najuspešnijih lekova u istoriji medicine [1]. Otkrićem aspirina i drugih nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) upotreba vrbe u terapijske svrhe se smanjuje, da bi se u novije vreme ponovo našla u žiži interesovanja. Terapija zapaljenskih bolesti, kao što su reumatoidni artritis, osteoartritis, zahteva dugotrajnu primenu NSAIL, čime se opasnost od mogućih ozbiljnih neželjenih delovanja povećava. Stoga, sve se veća pažnja usmerava na pronalazak efikasnih, a bezbednijih alternativa prirodnog porekla [2].

Kora vrbe ispoljava antiinflamatorno, analgetičko i antipiretičko delovanje [3]. Koristi se u terapiji različitih vrsta bolova, uključujući reumatski bol, bol u leđima, zubobolju i menstrualne grčeve. Takođe se koristi za ublažavanje bolova u grlu, groznice i glavobolje povezane sa infekcijama gornjeg dela respiratornog trakta i gripom [4].

Mnoge vrste roda *Salix*, uprkos širokoj rasprostranjenosti u prirodi, do danas su nedovoljno ispitane. Osim toga, ne postoje podaci o hemijskom sastavu i biološkim aktivnostima vrba sa teritorije Republike Srbije. Sadržaj sekundarnih metabolita od farmakološkog značaja varira među različitim vrstama, ali i unutar iste vrste vrbe u

zavisnosti od brojnih činilaca [5-8]. Sadržaj hemijskih supstanci u biljkama uslovljen je kako genetskim tako i faktorima sredine. Biljke iste vrste koje rastu u prirodnom okruženju mogu da se razlikuju u sadržaju aktivnih supstanci. Koncentracije sekundarnih metabolita određuju farmaceutsku i terapijsku primenljivost biljnog materijala i izolovanih komponenti [9]. Kako svako geografsko područje ima svoje specifičnosti, uočen je značaj ispitivanja vrsta vrba čije se prirodno stanište nalazi na teritoriji naše zemlje.

Postojeća istraživanja se uglavnom odnose na koru vrbe, koja je oficinalna droga prema farmakopeji, dok se list kao otpadni produkt uglavnom odbacuje nakon sakupljanja kore. Stoga su podaci o hemijskom sastavu i sadržaju aktivnih komponenti u listu oskudni. Nusproizvodi prerade biljaka predstavljaju veoma perspektivne izvore supstanci visoke vrednosti, sa posebnim naglaskom na pronalaženje bioaktivnih i tehnološki važnih sekundarnih metabolita [10].

U novije vreme, razvijene su savremene metode za brzu i efikasnu ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz čvrstog matriksa, među kojima mikrotalasna i ultrazvučna ekstrakcija imaju najveći potencijal kada je u pitanju izolovanje prirodnih proizvoda. Mikrotalasna ekstrakcija se zasniva na upotrebi mikrotalasne energije za zagrevanje rastvarača koji je u kontaktu sa uzorkom, dok se prednosti ultrazvučne ekstrakcije pripisuju mehaničkom efektu kavitacije. U brojnim studijama na lekovitim biljkama obe metode su značajno skratile vreme i povećale prinos ekstrakcije [11-14]. U literaturi postoji mali broj podataka o ekstrakciji aktivnih principa kore i lista vrbe klasičnim i drugim metodama ekstrakcije. Kako je adekvatan postupak ekstrakcije osnova za dobijanje kvalitetnih ekstrakata, uočen je značaj njenog ispitivanja.

2. OPŠTI DEO

2.1. Rod *Salix*

Rod *Salix* pripada porodici Salicaceae i obuhvata oko 450 vrsta koje su rasprostranjene širom sveta, pre svega u severnoj hemisferi. Prevažodno se mogu naći u umerenom toplotnom pojasu i u arktičkom pojasu, a prisutne su i u subtropskom i tropskom toplotnom pojasu. Geografska lokalizacija vrba podrazumeva sve kontinente izuzev Antarktika i Australije [15-17]. Naziv roda *Salix* potiče od keltske reči *sallis*, što znači blizu vode. Vrbe su prilagođene širokom rasponu staništa, iako, kao što i samo ime roda sugeriše, uglavnom rastu na vlažnim područjima, uz reke ili na močvarnim mestima [18]. U planinama Južne Evrope i umerene klimatske zone Azije neke vrste se penju i do 3000 m nadmorske visine. Vrbe se mogu javiti u formi visokog drveća, kao što su *Salix alba* i *Salix fragilis*, malog drveća poput *Salix daphnoides*, velikog grmlja kao što je *Salix purpurea* ili patuljastog grmlja poput *Salix retusa*, ali i kao niske puzeće drvenaste biljke, kao što je arktička vrsta *Salix herbacea*, koja maksimalno doseže visinu od 6cm [15, 19].

Drvo je meko i uglavnom savitljivo. Listovi su karakteristično izduženi, mogu biti okruglog do ovalnog oblika, uglavnom zašiljeni na vrhu, često sa nazubljenim ivicama, tamno zelene boje sa lica, a nešto svetlijeg naličja, goli ili dlakavi, na kratkim lisnim peteljka. Vrbe su uglavnom dvodome biljke, sa jednopolnim cvetovima. Listići cvetnog omotača su redukovani. Muške cvetove čine 2-5 prašnika u pazuhu brakteje, a

ženske tučak u pazuhu brakteje. Cvetovi su skupljeni u cvasti – mace. Plod je čaura sa velikim brojem semena [20].

U Republici Srbiji raste 18 vrsta vrba. Najčešće se javljaju kraj voda ili na vlažnijim mestima, bez veće vezanosti za određenu geološku podlogu [21].

Taksonomski položaj roda *Salix* prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Taksonomija roda *Salix* [22].

Carstvo (<i>regnum</i>)	Plantae
Razdeo (<i>divisio</i>)	Tracheophyta
Podrazdeo (<i>subdivisio</i>)	Spermatophytina
Klasa (<i>class</i>)	Magnoliopsida
Nadred (<i>superordo</i>)	Rosanae
Red (<i>ordo</i>)	Malpighiales Bercht. & J. Presl
Porodica (<i>familia</i>)	Salicaceae Mirb.
Rod (<i>genus</i>)	<i>Salix</i> L.

2.2. Karakteristike vrsta

2.2.1. *Salix alba* L.

Jedna od najpoznatijih i najviših vrba, dostižući visinu od 30 m i 1 m ili više u prečniku, bela vrba se karakteriše gracioznom krošnjom sa vrhovima grana savijenim prema dole. Njene grančice, pupoljci i uski listovi su gusto prekriveni svilenkastim

dlačicama, dajući joj srebrni izgled lako uočljiv iz daljine – otuda potiče njen naziv. Prirodno je rasprostranjena je širom Evrope (izuzev nordijskih zemalja), Male Azije i zapadnog Sibira, a prisutna je i u severnoj Africi. Može se naći od nivoa mora pa čak do 2400 m nadmorske visine. *S. alba* je vrsta kojoj pogoduje umerena klima sa blagim zimama, toplim letima i kratkotrajnom letnjom sušom. Povremene snežne padavine mogu da oštete grane i krošnju. Međutim, ima visok stepen tolerancije na polusuvu klimu i relativno hladne zime. Nastanjuje rečne doline i močvarna područja, sa preferencijom ka peskovitim, silikatnim, karbonatnim ili čak relativno siromašnim zemljištima. Jedna je od glavih vrsta na obalama reka, gde često formira šumarke protežući se kilometrima. Bela vrba je široko kultivisana i prostire se daleko izvan svog prirodnog staništa, stoga je teško proceniti obim prirodnih područja. Tokom sedamdesetih godina prošlog veka najznačajnije populacije su se nalazile u dolini reke Dunav i njenim pritokama, prostirući se na teritoriji bivše Jugoslavije i Rumunije.

U mnogim oblastima, to je jedna od najčešćih biljaka koje se gaje u parkovima, na imanjima, stambenim zonama i obalama reka [23].

2.2.2. *Salix amplexicaulis* Bory. (syn. *Salix purpurea* subsp. *amplexicaulis*)

Vrsta *Salix amplexicaulis* je žbun visine 2-5 m [24]. Listovi su sedeći ili skoro sedeći, srcaste ili koso odrezane osnove, naspramno raspoređeni [21] (Slika 1). Rasprostranjena je na zapadnom Balkanu, u Italiji, Francuskoj i Turskoj. Naseljava vlažne obale reka i obode jezera [25].



Slika 1. *Salix amplexicaulis* Bory

(© Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste by Andrea Moro,

Licence CC BY-SA 4.0; Preuzeto sa <http://dbiodbs.units.it/carso/cercapiante01>)

2.2.3. *Salix babylonica* L.

Salix babylonica (žalosna vrba) je listopadno drvo, poreklom iz Kine, koje dostiže visinu od 20 m. Ima otvorenu krošnju i duge viseće grane. Kora je sivo-crna. Listovi su lancetasti do linearno lancetasti, 9-16 cm dugi i 0,5-1,5 cm široki, po obodu nazubljeni, blago sjajni, tamno zeleni sa lica i sivo-zeleni sa naličja. Lisna drška je pubescentna i duga 5-10 mm. Cvetovi su dvopolni, u obliku visećih resa, pojavljuju se u aprilu-maju istovremeno sa lišćem. Žalosnoj vrbi pogoduje vlažna sredina i najčešće se javlja uz obalu reka, jezera, na peskovitim i močvarnim staništima. Dobro podnosi plavljenje. *S. babylonica* je vrsta koja zahteva sunčevu svetlost, tako da teško opstaje u zaseni. Iako je relativno osetljiva na zimske hladnoće, i dalje je jedno od najšire kultivisanih drveća širom sveta [23, 26].

2.2.4. *Salix eleagnos* Scop.

Žbun ili malo drvo visine do 10 m, glatke sive kore. Grančice su tanke i lomljive. Listovi su lancetasti do linearni, dužine 5-12 cm i širine 0,5-1 cm, sa blago talasastim ili podvijenim obodom, prema vrhu su sitno testerasti, pri osnovi i ka vrhu postepeno zašiljeni (Slika 2). Rasprostranjena je u srednjoj i južnoj Evropi i Maloj Aziji. U Republici Srbiji je naročito česta kraj rečnih tokova u zapadnom delu zemlje [21].



Slika 2. *Salix eleagnos* Scop.

(© Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste by Andrea Moro,

Licence CC BY-SA 4.0; Preuzeto sa <http://dbiodbs.units.it/carso/cercapiante01>)

2.2.5. *Salix fragilis* L.

Drvo visine do 25 m sa širokom krošnjom. Kora starog stabla je uzdužno ispucala. Grančice su savitljive i pri osnovi se lako lome uz karakterističan zvuk. Listovi su lancetasti do eliptični, dugi 5-16 cm i široki 2-4 cm, nazubljeni po obodu. Mladi listovi

su svilenkasto maljavi, starenjem postaju glatki. Zreli listovi su tamnozeleni i sjajni sa lica, svetliji i bez sjaja sa naličja. Rasprostranjena je u Evropi, Maloj Aziji, Iranu i zapadnom Sibiru. Raste na vlažnim mestima, uz reke i potoke. Široko rasprostranjena u Republici Srbiji [21, 23].

2.2.6. *Salix purpurea* L.

Osrednji do visoki žbun ili malo drvo visine 1-2 m, doseže i do 4 m. Prirodno rasprostranjena u Evropi i severnoj Africi, raste uz obalu reka i potoka, vlažnim livadama i vlažnom pesku. Grane purpurne vrbe su duge, tanke, smeđe do maslinasto zelene i 0,6-1,5 cm debele. Grančice su crvenkasto smeđe do maslinaste, potpuno gole, glatke i sjajne. Ispod kore je svetlo žuto drvo. Listovi su promenljive veličine sa veoma kratkim drškama. Nektarije su većinom svetlo ljubičaste. Filamenti u muškim cvetovima povezani su sa ljubičastim prašnicama, odakle i potiče naziv vrste. *S. purpurea* se uzgaja širom Evrope. Jedna je od najprilagodljivijih vrsta vrba, otporna na ekstremnu toplotu, vlagu i sušu [23].

2.2.7. *Salix triandra* L.

Salix triandra (bademolisna vrba) je široko rasprostranjena u Evroaziji. Raste na obalama reka i potoka, a povremeno i na sekundarnim staništima kao što su jarci i vododerine. Njena vertikalna distribucija seže od nizija do umerenih planinskih visina; na Pirinejima se penje do 1700 m. Bademolisna vrba je visoki žbun ili ređe, manje drvo visine do 10 m, kratkog stabla i široke krošnje. Kora je glatka, sivkasta, otpada u vidu

ljuspa. Grančice su gole, zelenkaste ili crvenkasto-smeđe. Listovi su promenljivog oblika i veličine, 3,5 – 7,5 puta duži nego što su široki. Usko cilindrične i pomalo povijene rese nalaze se na dugoj dršci. Muški cvetovi sadrže tri prašnika [21, 23, 27].

U Republici Srbiji rasprostranjena je u ravničarskim predelima uz obalu reka i potoka ili močvarnim staništima, ređe u brdskim predelima. Pored reke se javlja i na preko 1000 m nadmorske visine [21].

2.3. Upotreba vrbe kroz istoriju

Upotreba vrbe kao lekovitog sredstva datira iz daleke prošlosti. Asirci i Sumeri su koristili koru vrbe još 4000 godina p.n.e. protiv bolova u mišićima kao i za snižavanje povišene telesne temperature. Drevni Egipćani (1300 god. p.n.e.) su koristili koru bele vrbe u lečenju bola i upale, a lišće vrbe je našlo upotrebu kao antipiretik, protiv bolova u zglobovima i za smanjenje bola i upale kod rana. Hipokrat (400 god. p.n.e.) i Dioskorid (100. godina) su preporučivali upotrebu kore vrbe kao leka kod reumatskog oboljenja zglobova, za ublažavanje porođajnih bolova i groznice, ali se njena upotreba značajno smanjila u toku srednjeg veka [28].

Godine 1763. Edvard Stoun je opisao terapijsku upotrebu praha kore vrbe za lečenje malarijske groznice. Francuski farmaceut, Henri Leroux izolovao je salicin 1826. godine, a 1838. godine Rafael Piria je otkrio strukturu salicina kao glikozida salicil alkohola i oksidacijom salicil alkohola sintetisao salicilnu kiselinu. 1899. godine je nemačka kompanija Bayer zaštitila acetilsalicilnu kiselinu pod nazivom „Aspirin“ [28-30].

Danas je kora vrbe jedan od mnogih sastojaka biljnih lekova i dijetetskih suplemenata koji ispoljavaju analgetičko, antipiretičko i antiinflamatorno delovanje, a deo su čak i preparata za pospešivanje gubitka telesne težine [31]. Nemačka Komisija E propisuje preparate na bazi kore vrbe za lečenje febrilnih stanja, reumatskih tegoba i glavobolje u dnevnoj dozi od 60-120 mg ukupnog salicina [32]. Monografija Evropske naučne kooperacije za fitoterapiju (ESCOP) preporučuje ekstrakte odgovarajućih *Salix* vrsta za simptomatsku terapiju febrilnih stanja, blagih reumatskih tegoba i bolova, uključujući i glavobolju u dozi do 240 mg salicina dnevno [33].

2.4. Droga i osnovne aktivne komponente

Prema šestoj Evropskoj Farmakopeji (2007) oficinalna droga je kora vrbe - *Salicis cortex*. Droga se definiše kao cela ili fragmentisana osušena kora mladih grana ili celi osušeni delovi grančica iz tekuće godine različitih vrsta roda *Salix* uključujući *S. purpurea* L., *S. daphnoides* Vill. i *S. fragilis* L. Droga treba da sadrži najmanje 1,5% ukupnih salicilnih derivata, izraženih preko salicina, računatih u odnosu na masu osušene droge [34].

Vrbe stvaraju i akumuliraju širok spektar sekundarnih metabolita. Najznačajnije komponente pripadaju različitim grupama fenolnih jedinjenja, pre svega derivatima salicilnog alkohola, flavonoidima, jednostavnim fenilpropanoidima i proantocijanidinima [35]. Salicin i njegovi derivati su hemotaksonomski markeri roda *Salix* i smatraju se odgovornim za farmakološku aktivnost *Salix* vrsta [36]. Međutim, rezultati kliničkih studija su pokazali da salicilni derivati nisu jedine komponente odgovorne za lekovita svojstva vrbe, već da i druge prisutne supstance kao što su polifenoli (flavonoidi, flavan-

3-oli) i jednostavni fenoli (fenolne kiseline) doprinose ukupnom terapijskom efektu kore vrbe [31, 37, 38]. Pretpostavlja se da je ovaj efekat rezultat sinergističke interakcije između fenolnih jedinjenja i salicina [39]. U Tabeli 2 dat je literaturni pregled hemijskog sastava kore *S. purpurea*.

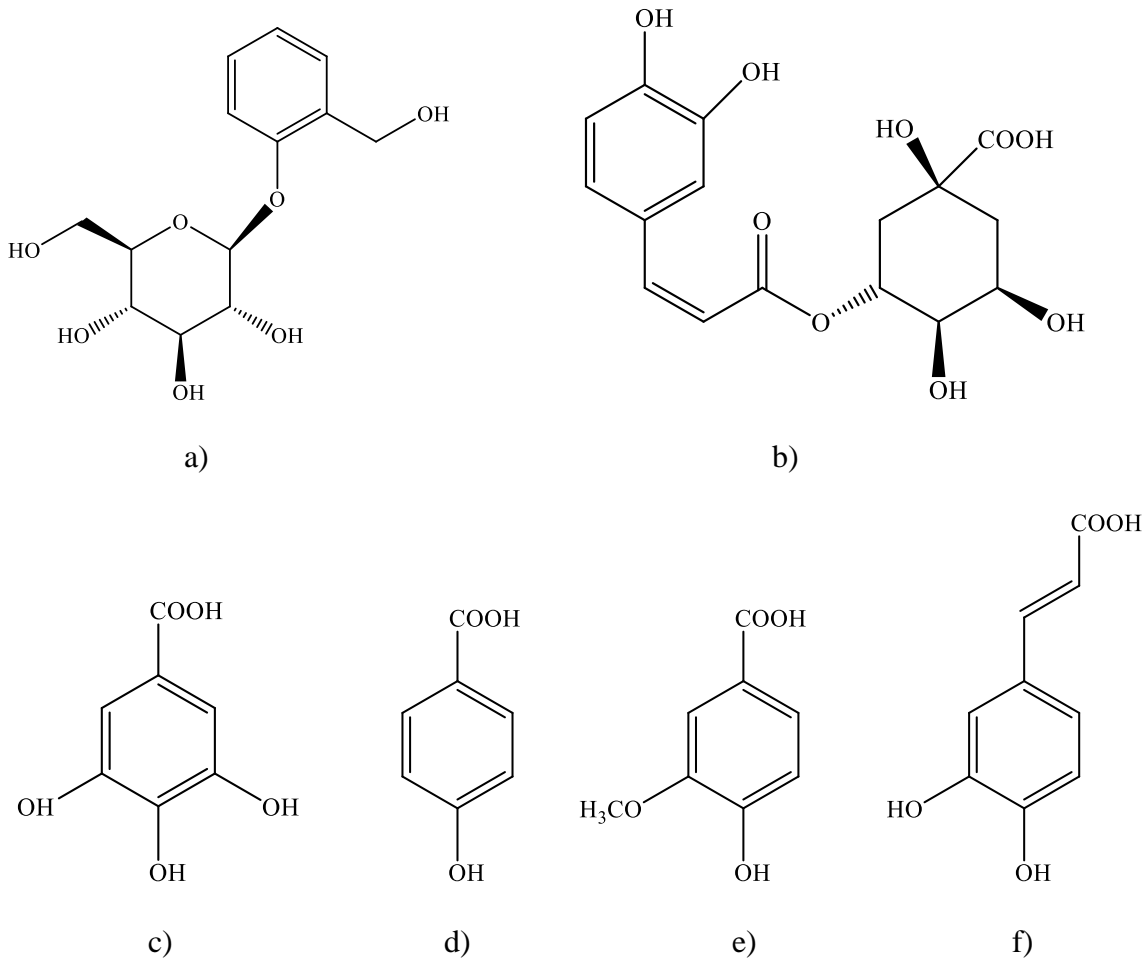
Tabela 2. Literaturni pregled hemijskog sastava kore vrste *Salix purpurea*

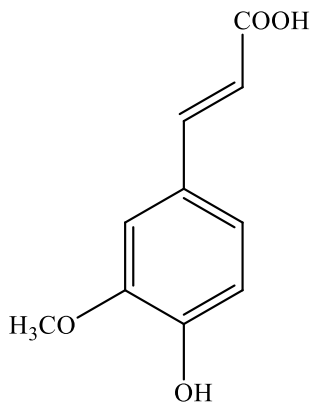
Klasa	Komponenta	Reference
Salicilni glikozidi	Salicin	[9, 32, 40-49]
	Salikortin	
	Tremulacin	
	2'-O-acetilsalicin	
	2'-O-acetilsalikortin	
	Salirepozid	
	Fragilin	
	Populin	
	Saliciloilsalicin	
	Saliciloiltremuloidin	
Fenolni glikozidi	Tremuloidin	[9, 32, 40-49]
	Purpurein	
	Siringin	
	Ampelopsin	
	Vimalin	
Flavoni	Apigenin-7-O-glikozid	[9, 32, 40-49]
Flavanoni	Eriodiktiol-7-glikozid	
	(+) i (-) – naringenin-5-glikozid	
Flavonoli	Naringenin	[9, 32, 40-49]
	Rutin	
	Kvercetin	
	Miricetin	
	Izokvercitrin	
	Kemferol-3-O-glikozid	
Flavan-3-oli	Kemferol-3-O-ramnozid	[9, 32, 40-49]
	Galokatehin	
	Katehin	
	Epikatehin	
	Katehin-3-O-(1-hidroksi-6-okso-2-cikloheksen-1-karboksilna kiselina)-estar	
Fenolne kiseline	Galna kiselina	[9, 32, 40-49]
	Hlorogenska kiselina	
	Siringinska kiselina	

	Salicilna kiselina Protokatehinska kiselina α -rezorcinolna kiselina
Procijanidini	B1 (epikatehin-(4 β →8)-katehin) B3 (katehin-(4 α →8)-katehin) Epikatehin-(4 β →8)-katehin-(4 α →8)-katehin Epikatehin-(4 β →8)-epikatehin-(4 β →8)- katehin
Halkoni	Izosalipurpozid

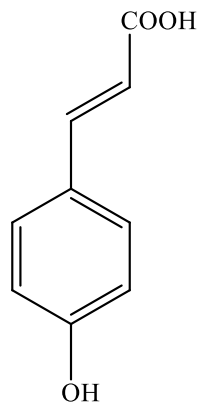
Salicilati se nalaze u mnogim vrstama roda *Salix* (*S. nigra*, *S. daphnoides*, *S. purpurea*, *S. fragilis*...) koje su česta zamena za koru bele vrbe (*Salix alba*) u komercijalnim proizvodima. Sadržaj salicilata je viši u kori *S. fragilis* (1-10%), u kori *S. purpurea* (4-8%), u lišću *S. repens* (5-12%) i u lišću *S. rosmarinifolia* (7-10%) a niži je u kori bele vrbe (0,5%). Koncentracija salicilata i njihova dostupnost takođe variraju unutar vrste u zavisnosti od lokaliteta, životnih uslova, gajenja i obrade [4, 32]. Salicin i salikortin su primarni salicilati kore bele vrbe [50]. Za razliku od acetilsalicilne kiseline dobijene sintetskim putem, prirodni sastojak salicin (prekursor salicilne kiseline) ne dovodi do ireverzibilne inhibicije agregacije trombocita što smanjuje rizik od krvarenja. Pored toga, ne izaziva ni iritaciju sluznice želuca [51-53]. Salicin i salikortin se metabolišu dejstvom crevne flore do saligenina, koji se apsorbuje u krvotok i dalje se u jetri metaboliše u salicilnu kiselinu. Eliminacija se prevashodno odvija putem bubrega. Preko 80% salicina se apsorbuje nakon oralne primene. Zbog vremena koje je potrebno za metabolisanje salicilata vrbine kore, terapijski efekat je sporiji nego pri primeni sintetskih salicilata. Salicilnu kiselinu je odobrila FDA za topikalnu primenu u tretmanu bradavica, žuljeva, kurjih očiju i u okviru nekih lekova koji se izdaju bez lekarskog recepta u terapiji akni [32, 54].

Pored derivata salicina, fenolne kiseline su važni konstituenti vrba, među kojima su posebno značajne kafena, ferulna, hlorogenska, galna, cimetna, vanilinska, kumarinska, p-hidroksibenzojeva kiselina. Takođe je značajno i prisustvo flavonoidnih jedinjenja, kao što su rutin, kvercetin, miricetin, katehin, epikatehin, naringenin i dr. (Slika 3). Smatra se da fenolne kiseline i flavonoidi svojim antioksidativnim potencijalom doprinose ukupnom antiinflamatornom i analgetičkom delovanju vrba [31, 55-58]. Pored prethodno pomenutih klasa jedinjenja, vrbe se odlikuju i visokim sadržajem kondenzovanih tanina [3, 59].

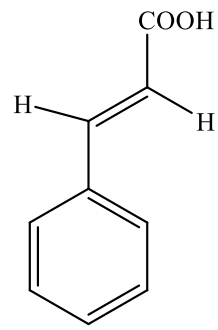




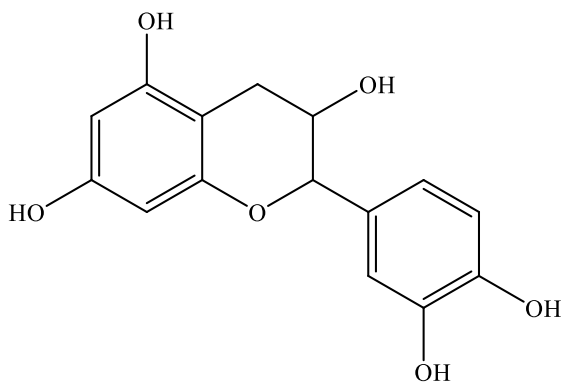
g)



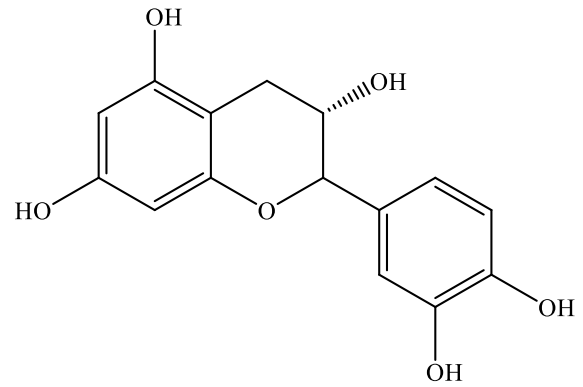
h)



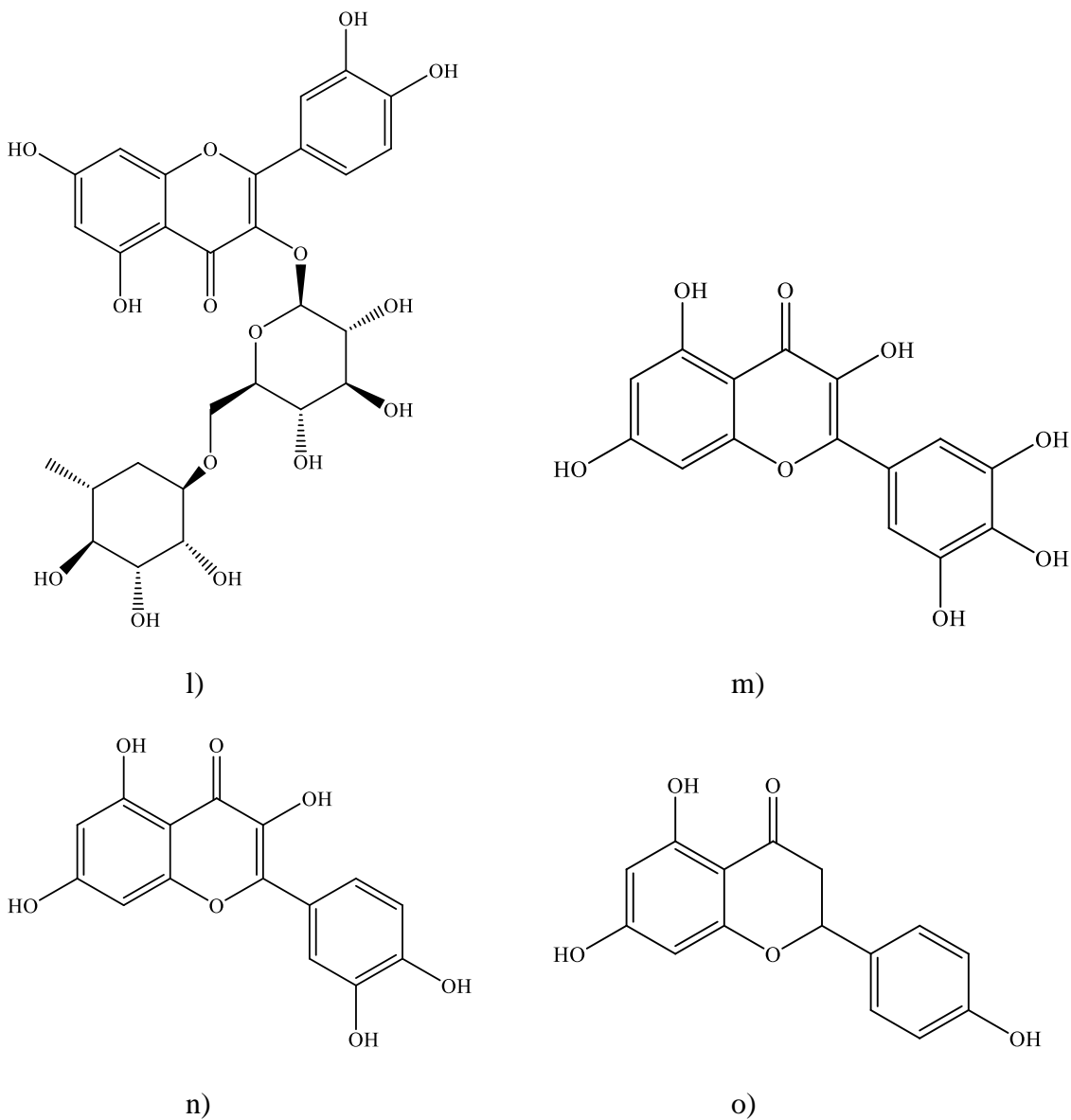
i)



j)



k)



Slika 3. Strukture fenolnih i flavonoidnih jedinjenja: a) salicin; b) hlorogenska kiselina; c) galna kiselina d) *p*-hidroksibenzojeva kiselina; e) vanilinska kiselina; f) kafena kiselina; g) ferulna kiselina; h) *p*-kumarinska kiselina; i) trans-cimetna kiselina; j) epikatehin; k) katehin; l) rutin; m) miricetin; n) kvercetin; o) naringenin.

2.5. Delovanja

Brojne farmakološke studije su dokazale da je klinička efikasnost preparata vrbine kore zasnovana na njenim analgetskim, antiinflamatornim, antipiretičkim i antioksidativnim svojstvima. Osim toga, dokazan je i efekat zaštite hrskavice [60].

2.5.1. Analgetsko delovanje

Terapijska efikasnost preparata na bazi kore vrbe za smanjenje bolova u leđima i bolova uzrokovanih osteoartritisom potvrđena je u više kliničkih studija.

Chrubasik i saradnici su ispitivali sposobnost ekstrakta kore vrbe da ublaži hronični bol u donjem delu leđa. U randomizovanoj, dvostruko slepoj studiji na 210 pacijenata sa pogoršanjem hroničnih bolova u leđima, četvoronedeljna terapija ekstraktom kore vrbe u dnevnoj dozi kojoj odgovara 120 mg ili 240 mg salicina dovela je do značajnog smanjenja bolovau odnosu na placebo. U poslednjoj nedelji terapije bez bolova je bilo 39% ispitanika koji su primali višu dozui 21% koji su dobijali nižu dozu, dok je svega 6% bilo u placebo grupi. Štaviše, efekat primene ekstrakta sa višom dozom salicina je bio uočljiv već nakon prve nedelje. Osim toga, značajno manjem broju pacijenata u ekstraktom tretiranim grupama (4% i 14%) je bio potreban dodatno tramadol u odnosu na placebo grupu (47%). Kod jednog pacijenta je uočena alergijska reakcija [61].

U ispitivanju na 228 pacijenata sa akutnim pogoršanjem hroničnog bola u leđima, ekstrakt kore vrbe u dnevnoj dozi ekvivalentnoj 240 mg salicina pokazao se jednako efikasnim kao i inhibitor COX-2, rofekoksib (12,5 mg/dan) [62].

Efikasnost ekstrakta kore vrbe u terapiji bolova izazvanih osteoartritisom pokazana je u randomizovanom, dvostruko slepom kliničkom istraživanju Schmidta i saradnika. Istraživanje u trajanju od 2 nedelje obuhvatilo je 78 pacijenata sa osteoartritisom, kojima je dodeljen placebo ili ekstrakt kore vrbe u dozi od 240 mg salicina dnevno. Osećaj bola se smanjio za 14% kod ispitanika koji su primali ekstrakt, dok se u kontrolnoj grupi povećao za 2%. Rezultati studije su pokazali da ekstrakt kore vrbe ima umereni analgetički efekat u terapiji osteoartritisa i dobru podnošljivost [63].

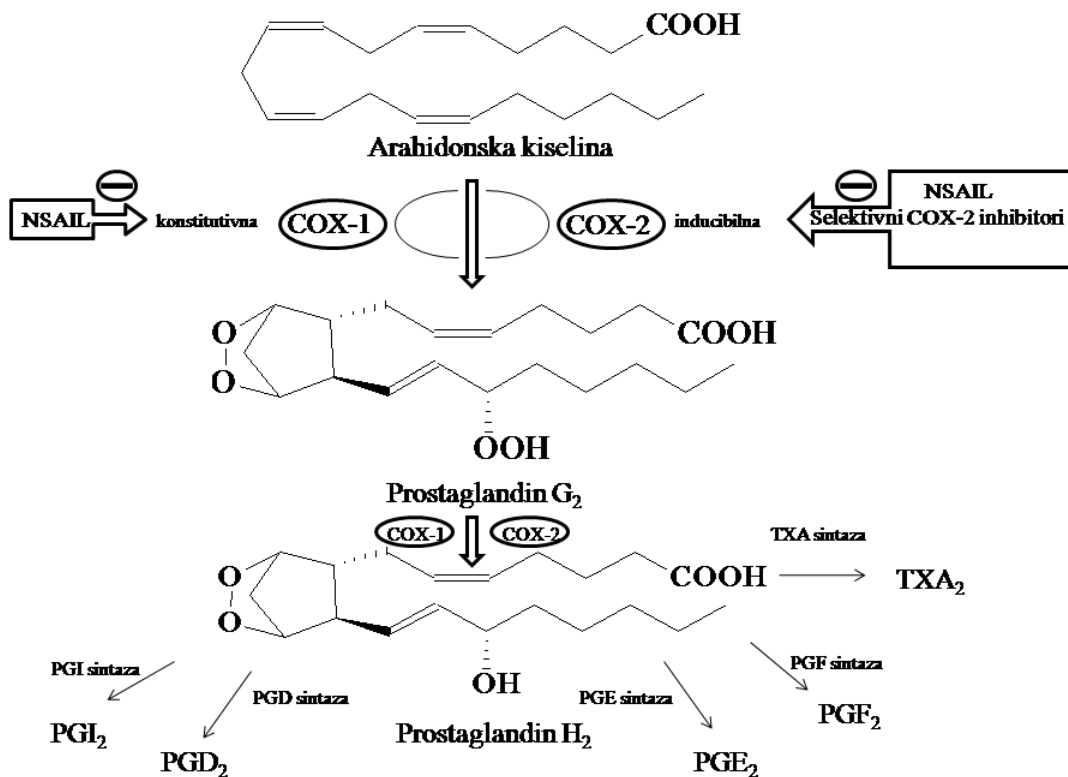
Efikasnost ekstrakta kore vrbe potvrđena je i u studiji na 333 pacijenata sa sindromom lumbalne i vratne kičme ili gonartrozom. Kod dve trećine pacijenata efikasnost je bila uporediva sa ibuprofenom ili diklofenakom [60].

Efikasnost i podnošljivost ekstrakta kore vrbe ispitivane su u otvorenoj, multicentričnoj opservacionoj studiji u trajanju od 6 nedelja na pacijentima sa artrozom kolena i kuka. Rezultati studije su doveli do zaključka da je ekstrakt kore vrbe jednako efikasan kao i standardna terapija za ove indikacije, uz mnogo bolju podnošljivost. Zbog dobre tolerancije, naročita korist primene ekstrakta kore vrbe je potvrđena kod hroničnih bolesnika koji su na dugotrajnoj terapiji [64].

2.5.2. Antiinflamatorna aktivnost

Khayyal i saradnici su ispitivali antiinflamatorno delovanje standardizovanog vodenog ekstrakta kore vrbe na dva modela inflamacije u poređenju sa antiinflamatornom dozom acetilsalicilne kiseline, kao neselektivnog COX inhibitora, i celekoksibom, kao selektivnog COX-2 inhibitora. Na bazi mg/kg, ekstrakt je bio najmanje toliko efikasan kao acetilsalicilna kiselina u redukciji inflamatornih eksudata i inhibiciji infiltracije

leukocita, kao i u sprečavanju porasta nivoa citokina. Ekstrakt kore vrbe je bio efektivniji od acetilsalicilne kiseline u supresiji leukotriena, a jednako efikasan u inhibiciji prostaglandina. Ekstrakt je ispoljio jače dejstvo na COX-2 od acetilsalicilne kiseline. Rezultati su pokazali da vodeni ekstrakt kore vrbe značajno podiže nivo radukovanog oblika glutationa, koji igra značajnu ulogu u sprečavanju lipidne peroksidacije. Efekat ekstrakta je bio jači u poređenju i sa acetilsalicilnom kiselinom i sa celokoksibom. Veće doze ekstrakta su takođe smanjile nivo malonilaldehida i pokazale određenu superiornost u odnosu na acetilsalicilnu kiselinu i celekoksib u zaštiti orgnizma od oksidativnog stresa [37]. Na Slici 4 šematski je prikazano učešće enzima ciklooksigenaze u biosintezi prostaglandina [65].



Slika 4. Mehanizam biosinteze prostaglandina

In vitro ispitivanja Bonaterra i saradnika su pokazala da ekstrakt kore vrbe i njegova vodena frakcija ispoljavaju značajnu antiinflamatornu aktivnost preko inhibicije proinflamatornih citokina (TNF- α), COX-2 i translokacije nuklearnog transkripcionog faktora (NF- κ B) u aktiviranim humanim monocitima [66].

U studiji Freischmidt i saradnika ispitivana je sposobnost komercijalnog ekstrakta kore vrbe *S. purpurea* da inhibiše TNF- α indukovanu ekspresiju intracelularnog adhezionog molekula-1, kao mere antiinflamatorne aktivnosti u humanim mikrovaskularnim endotelnim ćelijama. Rezultati su naveli na zaključak da antiinflamatornoj aktivnosti kore vrbe doprinose i katehin i flavonoidi, a ne samo salicin [67].

Ishikado i saradnici su pokazali da je frakcija ekstraktakore vrbe bez salicina indukovala antioksidantne enzime i prevenirala oksidativni stres preko aktivacije nuklearnog faktora eritroid-2 povezanog faktora 2 (Nrf-2) u endotelnim ćelijama humane pupčane vene. Ove studije su doprinele dodatnom saznanju o mehanizmu delovanja kore vrbe da su za aktivnost zaslužne i komponente mimo salicina [68].

Ispitivanje Shakibaei i saradnika je pokazalo da ekstrakt kore vrbe ispoljava antiinflamatorni i anabolički efekat na artikularnim hondrocitima pasa preko kompleksnog mehanizma nishodne regulacije COX-2 i metaloproteinaza [69].

Vodeni ekstrakt kore vrbe je ispoljio jače antiinflamatorno delovanje na smanjenje produkcije interleukina-6 i TNF- α od apigenina, kvercetina i salicilne kiseline u makrofagima humane akutne monocitne leukemije [70]. Ispitivanje uticaja etanolnog ekstrakta vrbe na oslobađanje inflamatornih medijatora *in vitro* su pokazala da je ekstrakt

inhibisao lipopolisaharidom indukovano oslobađanje interleukina-1 β i interleukina-6 iz humanih monocita [71].

Ispitivanje analgetskog i antiinflamatornog delovanja metanolnog ekstrakta *S. alba* na albino miševima je pokazalo da ekstrakt ispoljava sličan, čak i jači efekat od aspirina. Osim toga, intraperitonealna aplikacija ekstrakta u dozi od 100 mg/kg je izazvala antiinflamatorno delovanje preko smanjenja edema šapica miševa [72].

2.5.3. Antipiretičko delovanje

Antipiretička aktivnost ekstrakta kore vrbe ispitana je u različitim modelima inflamacije u odnosu na acetilsalicilnu kiselinu i čisti salicin. Ekstrakt se pokazao jednako efikasnim kao acetilsalicilna kiselina, iako je 100 mg ekstrakta sadržavao količinu salicina koja je ekvivalentna dozi od samo 15,4 mg acetilsalicilne kiseline, što je navelo na zaključak da i drugi sastojci vrbine kore doprinose antipiretičkom efektu [60].

2.5.4. Antikarcinogena aktivnost

Ekstrakt kore vrbe i njegove različite frakcije suprimirale su *in vitro* rast i indukovale apoptozu humanih malignih ćelija debelog creva i pluća. Antiproliferativnu aktivnost su ispoljile salicinska, flavonoidna i proantocijanidinska frakcija [73].

U drugoj studiji ispitivana je antineoplastična aktivnost vodenog ekstrakta lista vrbe na tri različite ćelije karcinoma *in vivo* i *in vitro*. Oralna primena ekstrakta vrbe produžila je život i redukovala rast tumora na miševima nakon intraperitonealne injekcije ćelija Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma. *In vitro*, ekstrakt je ubio 75-80% malignih ćelija

limfoblastne leukemije i akutne mijeloidne leukemije uzetih od pacijenata. Nisu identifikovane pojedinačne komponente ekstrakta odgovorne za ova delovanja. Frakcija ekstrakta lista vrbe dobijena polarnim organskim rastvaračima (voda i 70% etanol) ispoljila je najjači inhibitorski efekat na maligne ćelije pomenutih karcinoma. Fenolna jedinjenja, uglavnom glikozidi, i mnoge vrste tanina su rastvorljivi u vodi i etanolu, pa se pretpostavlja da se u ovoj grupi jedinjenja nalazi glavni aktivni sastojak odgovoran za uništenje kancerskih ćelija. Salicin je primarna komponenta u listovima vrbe koja je rastvorna u vodi i etanolu. Moguće je da je salicin glavna komponenta koja ispoljava antitumorsko delovanje, ali i druge prisutne supstance mogu da pojačaju efekat vrbinog ekstrakta u poređenju sa čistim salicinom [74]. Istraživanja grupe autora iz Koreje su pokazala da salicin dozno-zavisno inhibiše angiogenu aktivnost endotelne ćelije, da smanjuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i aktivaciju ekstracelularnim signalom regulisane kinaze, kao i da suprimira rast i angiogenezu tumora [75].

2.5.5. Antimikrobno delovanje

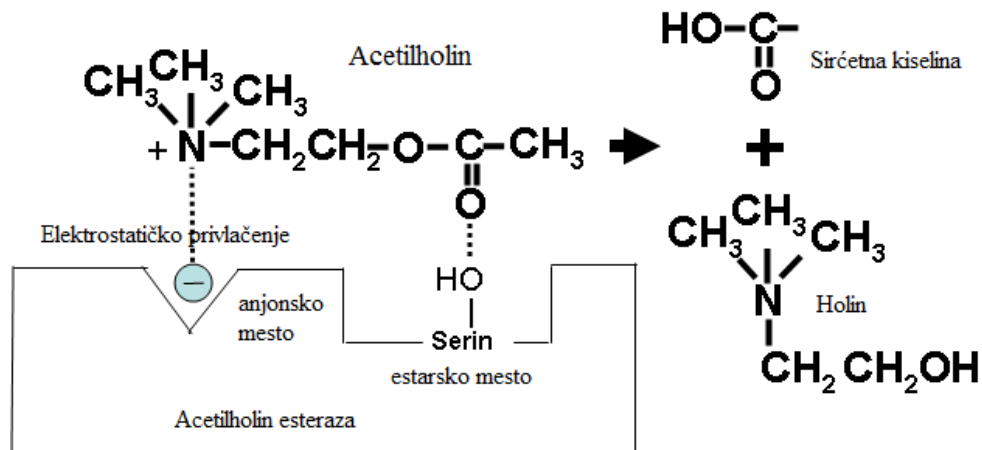
Semi-kvantitativno ispitivanje antimikrobne aktivnosti zakišljenog vodenog ekstrakta kore *Salix alba* na agarnoj ploči pokazalo je da ekstrakt deluje inhibitorski na bakterije *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, pri čemu je efekat najizraženiji na prve dve bakterije, dok na *Salmonella enteritis* nije delovao. Kvantitativno određivanje antibakterijskog delovanja ekstrakta kore bele vrbe u tečnom medijumu je imalo za rezultat 100% inhibitorski efekat tokom 24 časa inkubacije na sve pomenute bakterijske vrste, a naročito na *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*. Kao zaključak ovog istraživanja se navodi mogućnost primene

ekstrakata kore bele vrbe u prehrambenoj industriji kao prirodnog konzervansa i biološkog dezinficijensa protiv širokog spektra bakterija, koje mogu da kontaminiraju prehrambene proizvode [76].

U drugom ispitivanju antimikrobnog delovanja različitih koncentracija etanolnog ekstrakta kore *Salix alba* difuzionom metodom, inhibitorni efekat je bio najjači na *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, redom, pri koncentraciji ekstrakta od 80 µg/ml. Etanolni ekstrakt kore bele vrbe nije uticao na rast *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumonia* [77].

2.5.6. Antiholinesterazna aktivnost

Metanolni ekstrakti različitih granulometrijskih klasa praha kore *Salix alba* ispoljili su sposobnost inhibicije enzima acetilholinesteraze, koja je u snažnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja. Visoko značajna korelacija između antiholinesterazne aktivnosti i bioaktivnih komponenata salicina, katehina, galokatehina, procijanidina B1, B2, C1 i hlorogenske kiseline navela je na zaključak da ova jedinjenja doprinose pomenutom delovanju. Inhibicija acetilholin esteraze ekstraktima *Salix alba* bila je bliska efektima galantamina, ukazujući na potencijal primene ekstrakata praha kore kao mogućeg sastojka prirodnog leka u terapiji Alchajmerove bolesti [78]. Na Slici 5 prikazan je mehanizam delovanja acetilholinesteraze.



Slika 5. Mehanizem delovanja acetilholinesteraze

(Preuzeto sa <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=5>)

2.5.7. Profilaksa migrene

Salix alba i *Tanacetum parthenium* bilo pojedinačno ili u kombinaciji ispoljili su snažno inhibitorno delovanje na 5-HT_{2A/2C} receptore, dok je samo *Salix alba* delovala i na 5-HT_{1D} receptore. Pretpostavljeno je da *Salix alba* u kombinaciji sa *Tanacetum parthenium* pruža superiorniju profilaksu migrene. Prospektivna, otvorena studija na 12 pacijenata sa dijagnozom migrene bez aure u trajanju od 12 nedelja pokazala je izuzetnu efikasnost kombinacije ova dva fitopreparata u smanjenju učestalosti napada migrene, intenziteta bola i njene dužine trajanja [79].

2.5.8. Gubitak telesne težine i poboljšanje sportskih performansi

Ekstrakt kore vrbe i salicilati se široko koriste u preparatima za mršavljenje i pospešivanje sportskih performansi. Međutim, nedovoljan je broj dobro kontrolisanih

studija koje procenjuju specifične efekte ekstrakta kore vrbe i salicina na gubitak telesne težine i sportski učinak. Njihovi pozitivni efekti se mogu pripisati povećanju tolerancije na bol, kao i antioksidativnom i antiinflamatornom delovanju. S obzirom na to da gojaznost i intenzivne fizičke vežbe ukuljučuju inflamatorne procese, smanjenje bolova povećava pokretljivost, izdržljivost i potrošnju energije [80].

2.5.9. Antioksidantno delovanje

Poslednjih godina posebna pažnja se posvećuje bolestima koje su povezane sa oksidativnim stresom, među kojima vodeće mesto zauzimaju kardiovaskularna, neurodegenerativna, metabolička i maligna oboljenja [81]. Istraživanja pokazuju da postoji obrnuta veza između unosa hrane bogate antioksidansima i incidencije bolesti ljudi. Sintetski antioksidansi kao što su butilovani hidroksitoluen (BHT) i butilovani hidroksianizol (BHA) se široko koriste kao antioksidansi u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji [82]. Međutim zbog postojanja sumnje u potencijalnu toksičnost i kancerogenost ovih derivata, sve je veće interesovanje za izolovanje i upotrebu prirodnih antioksidanasa [83, 84]. Antioksidansi prirodnog porekla imaju veliki potencijal primene zahvaljujući visokoj kompatibilnosti sa dijetarnim unosom bez štetnih efekata po ljudski organizam, kao i niskim troškovima [82].

Slobodni radikali su nestabilne, visoko reaktivne molekulske vrste koje sadrže nesparene elektrone u atomskoj orbitali. Imaju sposobnost da oštećuju biološki značajne makromolekule u jezgri i ćelijskoj membrane. Za pravilnu funkciju organizma neophodno je postojanje ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidanata. Ukoliko stvaranje slobodnih radikala nadmašuje sposobnost organizma da ih neutrališe, nastaje

stanje poznato kao oksidativni stres. Slobodni radikali nastaju u normalnim metaboličkim procesima u ljudskom organizmu ili pod uticajem spoljašnjih faktora, kao što su zračenje, duvanski dim, zagađivači životne sredine i hemikalije [82].

Antioksidansi su supstance koje u malim koncentracijama odlažu, sprečavaju ili uklanjaju oštećenja nastala oksidacijom molekula DNK, proteina, lipida i ugljenih hidrata [85, 86]. Antioksidansi imaju sposobnost da direktno hvataju slobodne radikale, indirektno pospeše antioksidativnu odbranu organizma ili spreče stvaranje slobodnih radikala [87]. Antioksidansi postoje u enzimskom i ne-enzimskom obliku u intra- i ekstracelularnoj sredini. Organizam se štiti od slobodnih radikala preko enzimskih antioksidantnih mehanizama. Enzimski antioksidansi (superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza kao najznačajniji) razgrađuju i uklanjaju slobodne radikale na taj način što pretvaraju štetne produkte oksidacije u vodonik peroksid, a zatim u vodu, u višestepenom procesu koji se odvija u prisustvu kofaktora kao što su bakar, cink, mangan i gvožđe. Ne-enzimski antioksidansi prekidaju slobodno radikalske lančane reakcije. Neki od primera ne-enzimskih antioksidanasa su vitamin C, vitamin E, biljni polifenoli, karotenoidi i glutathion [88].

Studije su pokazale da ekstrakti kore vrbe smanjuju oksidativni stres i povišavaju nivo glutathiona u nekoliko artritičnih životinjskih modela. Smatra se da ekstrakti kore vrbe smanjuju oksidativni stres hvatanjem slobodnih radikala i indukcijom antioksidantnih enzima [89]. Suplementacija ekstraktom kore *S. alba* je efikasno smanjila oksidativni stres u srcu i plućima hiperholesterolemičnih zečeva preko pospešivanja aktivnosti enzima superoksid dismutaze i katalaze, povećanja nivoa redukovanog glutathiona i NO, i smanjenja nivoa malondialdehida. Ovaj efekat ekstrakta kore bele vrbe

se može pripisati njegovom polifenolnom sadržaju i antioksidantnoj aktivnosti. Ekstrakt kore *S. alba* je pokazao značajnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala koja je bila koncentracijski zavisna [90].

Najefikasniji su oni antioksidansi koji prekidaju slobodno radikalsku lančanu reakciju. Ovi antioksidansi najčešće sadrže aromatični ili fenolni prsten, a deluju tako što predaju H^\bullet slobodnim radikalima nastalim tokom oksidacije, pri čemu i sami formiraju radikal. Nastali radikal ne podleže daljoj oksidaciji jer je rezonantno stabilizovan delokalizacijom elektrona unutar prstena i formiranjem hinonske strukture [87].

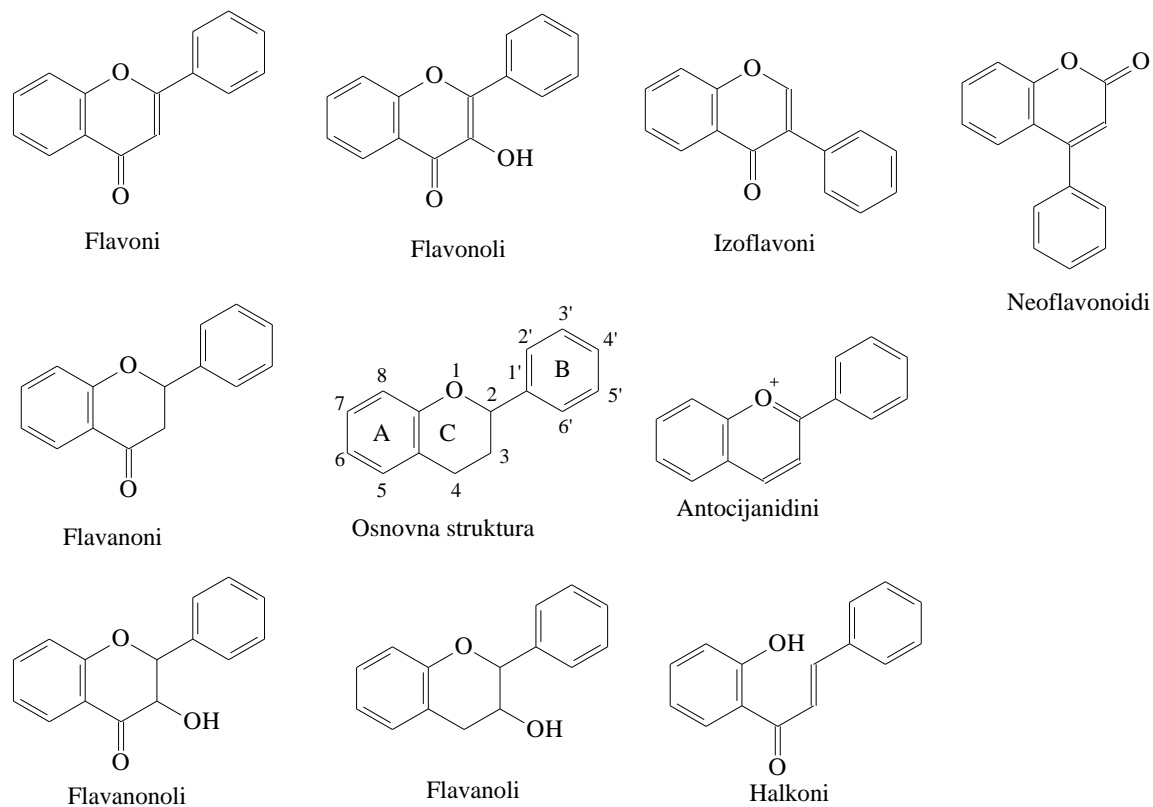
Prirodni antioksidansi koji se nalaze u lekovitim biljkama su uglavnom fenolna jedinjenja, karotenoidi i vitamini. Ovi prirodni antioksidansi, naročito fenoli ispoljavaju širok spektar bioloških efekata, kao što su antiinflamatorno, antibakterijsko, antiviralno i antikancerogeno [89].

Glavni antioksidativni biljni fenoli se mogu podeliti u četiri grupe:

1. fenolne kiseline
2. flavonoidi
3. fenolni diterpeni
4. etarsko ulje [87]

Fenolne kiseline se dele na derivate hidroksibenzojeve (C_6C_1) i derivate hidroksicimetne kiseline (C_6C_3) [91]. Antioksidantna aktivnost fenolnih kiselina zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilnu. Antioksidantna aktivnost se povećava sa porastom stepena hidroksilacije, što je slučaj kod trihidroksilovane galne

kiseline, koja ispoljava jako antioksidantno delovanje. Derivati hidroksicimetne kiseline ispoljavaju jaču antioksidantnu aktivnost od odgovarajućih derivata hidoksibenzojeve kiseline [92]. Fenolne kiseline ispoljavaju antioksidantno delovanje hvatanjem slobodnih radikala, dok su flavonoidi i hvatači slobodnih radikala i helatori metala [87]. Kompleks flavonoida sa jonima bakra ili gvožđa sprečava stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta i štiti DNK od oštećenja uzrokovanih hidroksilnim radikalima [88]. Zajednička karakteristika flavonoida je osnovna flavanska struktura sastavljena od 15 C-atoma ($C_6C_3C_6$), koji su raspoređeni u tri prstena (A, B i C) [87]. Flavonoidi se dele u različite podgrupe u zavisnosti od ugljenikovog atoma prstena C na koji je vezan prsten B i stepena nezasićenosti i oksidacije prstena C. Flavonoidi kod kojih je prsten B vezan u položaju 3 prstena C nazivaju se izoflavoni. Oni čiji prsten B je vezan u položaju 4 su neoflavonoidi, dok se flavonoidi čiji je prsten B vezan u položaju 2 dalje dele u nekoliko klasa u zavisnosti od strukturnih karakteristika prstena C. Klase su: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli, anticijanidini i halkoni [93] (Slika 6).



Slika 6. Klasifikacija flavonoida

Individualne komponente unutar klase razlikuju se po supstuentima u prstenovima A i B, čiji raspored utiče na stabilnost fenoksil radikala i antioksidantna svojstva supstance. Sposobnost prirodnih polifenolnih jedinjenja da hvataju slobodne radikale zavisi od broja i položaja slobodnih hidroksilnih grupa na flavonoidnom skeletu. Flavonoidi sa većim brojem hidroksilnih grupa imaju jače antioksidantno delovanje od onih sa jednom. Prisustvo orto-3,4-dihidroksi strukture u prstenu B pojačava antioksidantnu aktivnost [87]. Ovo se objašnjava time što orto-dihidroksi struktura u prstenu B omogućava veću stabilnost radikalskog oblika i učešće u delokalizaciji elektrona. Antioksidantno delovanje potencira i dvostruka veza između položaja 2 i 3 u konjugaciji sa 4-okso funkcijom u prstenu C, jer omogućava delokalizaciju elektrona iz

prstena B. Pri reakciji sa slobodnim radikalom nastaje fenoksil radikal koji je stabilizovan rezonantnim efektom aromatičnog jezgra. Za maksimalni potencijal hvatanja slobodnih radikala neophodno je prisustvo 3- i 5-OH grupa sa 4-okso funkcijom u prstenovima A i C [94].

Antioksidativno delovanje biljnog ekstrakta u mnogome zavisi od samog postupka ekstrakcije, koji utiče na sastav ekstrakta [87]. Antioksidativni potencijal fenolnih jedinjenja direktno zavisi od vrste rastvarača upotrebljenog za ekstrakciju, ali i od porekla biljke, uslova njenog rasta/uzgajanja, berbe i skladištenja [81].

2.6. Ekstrakcija

Čvrsto-tečna ekstrakcija je proces u toku kojeg jedna ili više komponenata iz čvrstog materijala prelaze u tečni rastvarač. Do ekstrakcije dolazi tako što u kontaktu čvrstog poroznog materijala i tečnog rastvarača, rastvarač prodire u pore čvrstog materijala. U opštem slučaju, ekstrakcija se sastoji iz tri odvojena procesa:

1. promena faznog sastava rastvorene komponente (rastvorak) njenim rastvaranjem u rastvaraču;
2. difundovanje rastvorka kroz rastvarač koji se nalazi u porama čvrstog materijala na površinu čvrste čestice;
3. prenošenje rastvorka iz rastvora, koji je u kontaktu sa čvrstim materijalom u masu rastvarača.

Na prenos mase u sistemu čvrsto-tečno utiču brojni faktori kao što su: oblik i veličina čestica, hemijski sastav komponenata čvrstog materijala, njegova unutrašnja struktura, kao i veličina i oblik pora. Prinos i sastav ekstrakta, kao i brzina ekstrakcije zavisi od

polaznog biljnog materijala, rastvarača koji se koristi za ekstrakciju, procedure izrade i aparature [95].

Bioaktivne sastojke iz biljnog materijala moguće je ekstrahovati različitim klasičnim tehnikama. Većina ovih tehnika se zasniva na ekstrakcionoj moći rastvarača i upotrebi toplote i/ili mešanja. Klasične tehnike ekstrakcije obuhvataju Soksletovu ekstrakciju, maceraciju i hidrodestilaciju [96].

Soksletova ekstrakcija se široko primenjuje za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz različitih prirodnih izvora. Koristi se kao standard sa kojim se porede nove alternativne tehnike ekstrakcije [96]. Glavni nedostatak Soksletove ekstrakcije je dugo vreme potrebno za ekstrakciju i velika količina utrošenog rastvarača, koja osim većih troškova za odlaganje predstavlja i dodatan ekološki problem. Takođe nepogodna je za ekstrakciju termolabilnih supstanci, jer se ekstrakcija izvodi na temperaturi ključanja rastvarača u toku dužeg vremenskog perioda što može dovesti do njihove razgradnje [97].

Maceracija predstavlja jednokratnu ekstrakciju propisano usitnjene droge odgovarajućim rastvaračem pri sobnoj temperaturi [95]. Hidrodestilacija je tradicionalna metoda za ekstrakciju etarskog ulja i bioaktivnih komponenata iz biljaka. Ne uključuje upotrebu organskih rastvarača, a vruća voda i vodena para su glavni faktori za oslobađanje aktivnih materija iz biljnog tkiva. Zbog visoke temperature na kojoj se izvodi ekstrakcija nepogodna je za izolovanje termolabilnih supstanci [96].

Efikasnost ekstrakcije svih konvencionalnih metoda najviše zavisi od izbora rastvarača. Polarnost željenih komponenti je glavni faktor za odabir rastvarača. Osim toga, treba uzeti u obzir i molekularni afinitet između rastvorka i rastvarača, transfer

mase, upotrebu korastvarača, toksičnost i bezbednost za ljude i životnu sredinu, kao i finansijsku isplativost [96].

Za dobijanje biljnih ekstrakata u farmaceutskoj industriji teži se pronalaženju što efikasnijih metoda ekstrakcije, koje su oslobođene toksičnih rastvarača. Razvijaju se metode koje koriste biorazgradive i netoksične rastvarače poput vode i etanola.

2.6.1. Mikrotalasna ekstrakcija

Mikrotalasi su elektromagnetno zračenje frekvencije između 0,3 i 300 GHz. Mikrotaladni uređaji koji se koriste u industriji i domaćinstvu najčešće rade pri frekvenciji od 2,45 GHz [98]. Mikrotalasna ekstrakcija je relativno nova tehnika ekstrakcije i predstavlja kombinaciju mikrotalasa i tradicionalne ekstrakcije rastvaračima [99]. Za ekstrakciju aktivnih komponenata iz biljaka, mikrotalasna ekstrakcija je efikasnija u poređenju sa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije poput Soksletove ekstrakcije, ekstrakcije uz refluks i maceracije. Njene prednosti se ogledaju u kraćem vremenu ekstrakcije, smanjenoj upotrebi rastvarača, dobijanju većih prinosa i kvalitetnijih ekstrakata [98, 100, 101].

Ekstrakcija pod dejstvom mikrotalasa se zasniva na sposobnosti materije da apsorbuje energiju mikrotalasa i prevede je u toplotu pomoću dva istovremena procesa: jonske provodljivosti i dipolne rotacije. Jonska provodljivost podrazumeva migraciju naelektrisanih čestica (najčešće jona) pod uticajem električnog polja koje stvara mikrotalas. Nastalo trenje između pokretnih jona i medijuma dovodi do stvaranja toplote. Dipolna rotacija nastaje usled težnje dipolnih molekula da se orijentišu shodno električnom polju, što dovodi do sudara između dipola i okolnih molekula i sledstvenog

stvaranja toplote [102]. Zagrevanje ketanjem jona je mnogo jače od zagrevanja koje potiče od polarizacije dipola [103].

U toku mikrotalasne ekstrakcije sekundarnih metabolita iz biljaka, dolazi do predavanja energije mikrotalasa rastvaraču i biljnom matriksu. Molekuli vode unutar biljnog matriksa efikasno apsorbuju ovu energiju dovodeći do drastičnog povećanja temperature unutar biljne ćelije. Unutrašnje pregrevanje može prouzrokovati isparavanje tečnosti unutar ćelija i dovesti do ruptur ćelijskog zida i/ili plazmine membrane. S obzirom na to da se mnoštvo sekundarnih metabolita biljaka prirodno nalazi u ćelijskom zidu ili citoplazmi, oštećenje ćelije olakšava transfer mase, odnosno difuziju rastvarača u biljni materijal i sekundarnih metabolita u rastvarač, čime je omogućena efikasna ekstrakcija [102, 104].

Na mikrotalasnu ekstrakciju aktivnih komponenata iz biljaka utiču brojni faktori kao što su sastav rastvarača, odnos rastvarača i uzorka, temperatura na kojoj se izvodi ekstrakcija, vreme trajanja ekstrakcije, snaga mikrotalasa, sadržaj vlage i veličina čestica biljnog materijala. Rastvarač se smatra jednim od najvažnijih parametara mikrotalasne ekstrakcije od koga zavisi rastvorljivost komponenata od interesa i apsorpcija mikrotalasa [102]. Etanol, metanol i voda su rastvarači koji dobro apsorbuju mikrotalase. Pri odabiru rastvarača, njegova toksičnost se takođe mora uzeti u obzir. Voda je potencijalni rastvarač i za polarne i nepolarne supstance, pri čemu je proces i ekološki prihvatljiv [100, 105].

Mikrotalasna ekstrakcija je najširu primenu našla za izolovanje polifenolnih jedinjenja, prvenstveno flavonoida i to u pogledu povećanja prinosa, kvaliteta ekstrakata i selektivnosti [105].

2.6.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija je jednostavna, jeftina i efikasna alternativa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije. Glavna prednost upotrebe ultrazvuka u čvrsto-tečnoj ekstrakciji je povećanje prinosa i kinetike ekstrakcije [98]. Veći prinos i efikasnost ekstrakcije se ostvaruju zahvaljujući mehaničkom efektu ultrazvuka odn. delovanju kavitacija koje dovodi do:

1. smanjenja veličine čestica biljnog materijala i povećanja dodirne površine između čvrste i tečne faze;
2. oštećenja ćelijskog zida biljnog materijala olakšavajući time pristup rastvarača ćelijskom sadržaju i ispiranje aktivnih principa, čime je pospešen prenos mase [106-108].

Ultrazvučna ekstrakcija se uspešno primenjuje za dobijanje većih prinosa za kraće vreme u poređenju sa konvencionalnim metodama poput Soksletove pri ekstrakciji fenolnih jedinjenja, antioksidanasa, etarskog ulja, prirodnih boja i pigmenata, masti i proteina iz raznih biljaka [107]. Dodatna prednost ultrazvučne ekstrakcije je mogućnost njene primene za poboljšanje ekstrakcije u vodenoj sredini i zamene organskih rastvarača sa manje toksičnim, odn. onima koji su generalno priznati kao sigurni [106].

3. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE

3.1. Ciljevi

1. Utvrditi uticaj klasične i savremenih metoda ekstrakcije na biološki potencijal i hemijski sastav dobijenih ekstrakata različitih vrsta vrba.
2. Utvrditi razlike u biološkoj aktivnosti i sadržaju aktivnih komponenata ekstrakata kore i ekstrakata lista kod iste vrste vrbe.
3. Utvrditi razlike u antioksidantnoj aktivnosti i sadržaju sekundarnih metabolita od farmakološkog značaja kod ekstrakata različitih vrsta vrba.

3.2. Radne hipoteze

1. Ekstrakti različitih vrsta vrba dobijeni savremenim metodama ekstrakcije pokazuju veći biološki potencijal i bogatiji hemijski sastav u odnosu na ekstrakte dobijene klasičnom metodom ekstrakcije.
2. Ekstrakti kore poseduju veću biološku aktivnost i sadržaj aktivnih sastojaka u odnosu na ekstrakte lista iste vrste vrbe.
3. Ekstrakti različitih vrsta vrba pokazuju različitu antioksidantnu aktivnost i sadržaj sekundarnih metabolita od farmakološkog značaja.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Biljni materijal

Kora i list 8 predstavnika roda *Salix* su prikupljeni sa različitih lokaliteta na teritoriji Republike Srbije, determinisani su do nivoa vrste i vaučeri su deponovani u Herbarijumu BUNS (Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu) (Tabela 3). Biljni materijal je čuvan na suvom i tamnom mestu, u dvostrukim papirnim vrećama do momenta ispitivanja.

Tabela 3. Ispitivane vrste vrba

Vrsta	Lokalitet i vreme sakupljanja
<i>Salix alba</i> L. 1753	Pečenjevce, jun 2014.
<i>Salix amplexicaulis</i> Bory. 1838	Vlasinsko jezero, jul 2013.
<i>Salix amplexicaulis</i> Bory. 1838	Pečenjevce, jun 2014.
<i>Salix babylonica</i> L. 1753	Bosut, Morović, septembar 2013.
<i>Salix eleagnos</i> Scop. 1772 subsp. <i>eleagnos</i>	Klisura Belog Rzava, jul 2013.
<i>Salix fragilis</i> L. 1753	Vrdnik, jun 2013.
<i>Salix purpurea</i> L. 1753 subsp. <i>purpurea</i>	Deli Jovan, avgust 2013.
<i>Salix triandra</i> L. 1753	Vlasinsko jezero, jul 2013.

4.2. Hemikalije

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Alfa Aesar (Nemačka);
- 2M Folin-Ciocalteu (FC) reagens, Merck (Darmstadt, Nemačka);
- absolutni etanol, orto-fosforna kiselina, metanol (HPLC čistoće), acetonitril (HPLC čistoće), sirćetna kiselina (HPLC čistoće), tetrahidrofuran (HPLC čistoće) J. T. Baker (Holandija);
- natrijum-karbonat, 95% metanol, p.a., POCH (Gliwice, Poljska);
- aluminijum-hlorid, Sigma Co. - St. Louis (SAD);
- galna kiselina ($\geq 97\%$), hlorogenska kiselina ($\geq 95\%$), p-hidroksibenzojeva kiselina ($\geq 99\%$), kafena kiselina ($\geq 98\%$), vanilinska kiselina ($\geq 97\%$), siringinska kiselina ($\geq 95\%$), sinapinska kiselina ($\geq 98\%$), rutin ($\geq 94\%$), naringenin ($\geq 95\%$), epikatehin ($\geq 98\%$), *trans*- cimetna kiselina ($\geq 99\%$), Sigma – Aldrich, St. Louis (SAD); p-kumarinska kiselina ($\geq 98\%$) Fluka (Švajcarska); kvercetin ($\geq 99\%$) Extrasynthese, Genay Cedex (Francuska); salicin ($\geq 90\%$) Carl Roth GmbH (Nemačka);
- gvožđe (II)-sulfat heptahidrat, Centrohem (Srbija)
- vodonik peroksid (35%, v/v), J. T. Baker (Holandija)
- natrijum-salicilat, Lach-Ner, s.r.o. (Češka Republika)
- dejonizovana voda.

4.3. Aparatura

- električni mlin Bosch (Nemačka)
- sito Retsch GmbH and Co KG (Nemačka)
- analitička vaga
- mikrotalasna pećnica Midea (Kina)
- ultrazvučna kupatilo Labsonic Falc (Italija)
- Spektrofotometrijska merenja su rađena na spektrofotometru Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System (Nemačka)
- Kvalitativno i kvantitativno određivanje fenolnih i flavonoidnih jedinjenja u ekstraktima vrba vršeno je primenom visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC), korišćenjem tečnog hromatografa HPLC-DAD model Agilent HP 1100 sistema sa autosemplem injektorom (Nemačka)

4.4. Ekstrakcija kore i lista različitih vrsta roda *Salix*

Osušena kora i listovi vrba su najpre usitnjeni električnim mlinom. Veličina čestica je određena pomoću sita ($d = 0,35$ mm, a kod vrste *S. amplexicaulis* (2014) i $d = 2$ mm). Ekstrakcija droge propisanog stepena usitnjenosti je vršena sledećim tehnikama:

1. Maceracija etanolom
2. Mikrotalasna ekstrakcija
3. Ultrazvučna ekstrakcija

4.4.1. Maceracija etanolom

Maceracija je vršena prelivanjem 0,5 g droge sa 5 ml rastvarača, u trajanju od 30 min i 48 sati, zaštićeno od svetlosti. Kao ekstragens korišćena je smeša etanola i vode (30% i 70% etanol). Nakon isteka predviđenog vremena ekstrakcije, tečni ekstrakti su filtrirani i upareni do suva. Nakon što su ostavljeni 24 h u eksikatoru, izmerena je masa suvih ekstrakata i izračunat je ukupan prinos ekstraktibilnih materija.

4.4.2. Mikrotalasna ekstrakcija

Mikrotalasna ekstrakcija je vršena u mikrotalasnoj pećnici u trajanju od 5 minuta (0,5 g droge preliveno sa 100 ml destilovane vode), nakon čega su ekstrakti profiltrirani i upareni do suva. Nakon 24 h sušenja u eksikatoru, izmerena je masa suvi ekstrakata i izračunat ukupan prinos ekstrakcije.

4.4.3. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija je vršena u ultrazvučnoj kadi tokom 30 min (0,5 g droge preliveno sa 50 ml destilovane vode). Nakon isteka predviđenog vremena ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani i upareni do suva. Upareni filtrati su ostavljeni u eksikatoru da se suše 24 h, a potom su izmerene mase suvih ekstrakata i izračunat je prinos ekstrakcije.

Od dobijenih suvih ekstrakata pripremljeni se metanolni ekstrakti rastvaranjem suvog ekstrakta u 95% (v/v) metanolu u željenoj koncentraciji. Pripremljeni metanolni

ekstrakti su dalje korišćeni za određivanje antioksidantne aktivnosti, sadržaja ukupnih fenolnih i flavonoidnih jedinjenja.

4.5. *In vitro* određivanje antioksidativnog delovanja dobijenih ekstrakata

4.5.1. DPPH test

Antioksidantna aktivnost dobijenih ekstrakata je određena pomoću DPPH metode [109]. Za svaki metanolni ekstrakt je pravljena serija od pet različitih koncentracija datog ekstrakta koje su dalje korišćene za određivanje procenta neutralizacije DPPH radikala (RSC vrednosti). Postupak se zasniva na tome da se u epruveti pomeša određena zapremina prethodno pripremljenih metanolnih rastvora ekstrakata (10-100 µl) sa 1 ml 90 µmol/dm³ rastvora DPPH i dopuni sa 95% metanolom do 4 ml. Apsorbance uzorka i kontrole (1 ml DPPH i 3 ml metanola) dobijene su spektrofotometrijskim merenjem na talasnoj dužini od 515 nm nakon 30 minuta, uz 95% metanol kao referentni rastvor. Vrednost RSC izračunata je na osnovu jednačine:

$$\%RSC=100 \times ((A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorka}}) / A_{\text{kontrola}})$$

Iz vrednosti RSC određene su IC₅₀ vrednosti, putem regresione analize, na osnovu linearne zavisnosti RSC vrednosti od različitih koncentracija ispitivanih ekstrakata.

4.5.2. Inhibicija hidroksilnih radikala (OH)

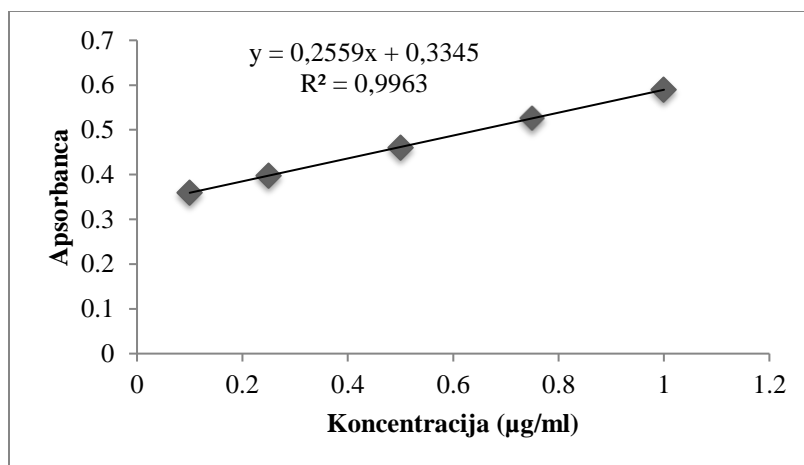
Sposobnost dobijenih ekstrakata kore i lista vrsta roda *Salix* da inhibišu OH radikale određena je prema ranije opisanoj metodi uz manje modifikacije [110]. Reakciona smeša (2,5 ml) je sadržala 0,5 ml gvožđe (II)-sulfata (1,5 mM), 0,7 ml vodonik-peroksida (6 mM), 0,3 ml natrijum-salicilata (20 mM) i 1 ml metanolnog ekstrakta različite koncentracije. Smeša je inkubirana 1h na temperature od 37°C, nakon čega je merena apsorbancu hidroksilovanog salicilatnog kompleksa na 562 nm. RSC vrednost je izračunata prema jednačini:

$$\text{RSC (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right)$$

gde A_0 predstavlja apsorbancu kontrole, A_1 apsorbancu sa uzorkom, a A_2 apsorbancu kontrole bez natrijum-salicilata.

4.6. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je metodom po Folin-Ciocolteu. Postupak: U 0,1 ml ispitivanog ekstrakta odgovarajuće koncentracije dodato je 0,5 ml 0,2 M FC reagensa (deset puta razblažen komercijalni FC reagens). Nakon 5 minuta mućkanja, u epruvetu je dodato 0,4 ml prethodno pripremljenog 7,5% rastvora natrijum-karbonata. Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 30 minuta, a zatim je očitana apsorbancu na 760 nm. Kao slepa proba je korišćena destilovana voda. Sve analize su rađene u tri ponavljanja. Rezultat je izražen kao mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suvog ekstrakta (GAE/g s.e.), korišćenjem standardne krive galne kiseline [111] (Grafikon 1).



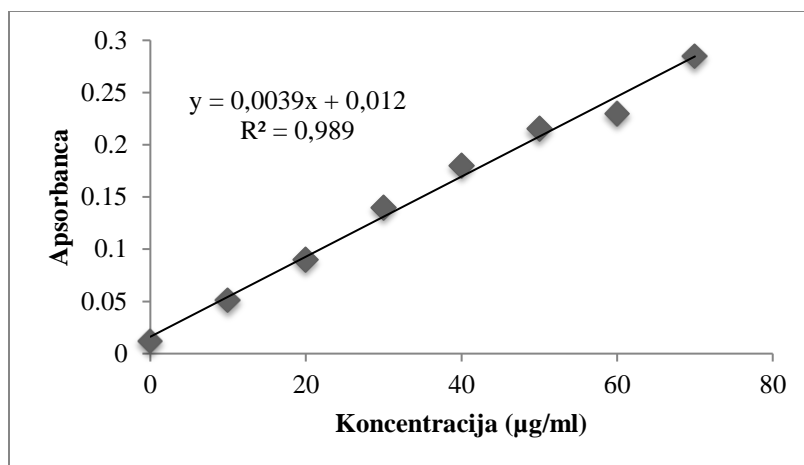
Grafikon 1. Kalibraciona kriva izrađena pomoću standardnog rastvora galne kiseline različitih koncentracija

4.7. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida se zasniva na osobini flavonoida da sa Al^{3+} jonima grade žuto obojen kompleks. Postupak: radna proba (RP) je pripremljena mešanjem 1 ml metanalnog ekstrakta odgovarajuće koncentracije sa 1 ml 2% AlCl_3 , dok je kontrolna proba (K) pripremljena mešanjem 1 ml ispitivanog ekstrakta sa 1 ml metanola. Nakon 15 min inkubacije na sobnoj temperaturi izmerene su apsorbance radne i kontrolne probe na 430 nm [112]. Kao slepa proba upotrebljena je destilovana voda. Iz razlike apsorbanci radne i kontrolne probe izračunate su apsorbance za svaki ispitivani ekstrakt prema formuli:

$$A_E = A_{RP} - A_K$$

Rezultat je izražen kao mg ekvivalenata kvercetina po gramu suvog ekstrakta (mg QE/g s.e.), pomoću standardne krive kvercetina (Grafikon 2).



Grafikon 2. Kalibraciona kriva izrađena pomoću standardnog rastvora kvercetina različitih koncentracija

4.8. Validacija analitičke metode za određivanje hlorogenske kiseline (5-kafeoilhine kiseline) u ekstraktima vrbe

Pri validaciji metode visokoeфикаsne tečne hromatografije (HPLC) za određivanje hlorogenske kiseline u ekstraktima vrbe određeni su sledeći parametri: selektivnost (specifičnost), linearnost, limit detekcije, limit kvantifikacije, tačnost (prinos), ponovljivost (preciznost) i robustnost.

4.8.1. Selektivnost (specifičnost)

Selektivnost predstavlja sposobnost metode za tačno određivanje analita u prisustvu drugih komponenata u uzorku [113]. U cilju određivanja selektivnosti HPLC metode za određivanje hlorogenske kiseline snimljen je hromatogram test rastvora koji sadrži hlorogensku kiselinu u poznatoj koncentraciji.

4.8.2. Linearnost

Linearnost analitičke metode predstavlja mogućnost konstruisanja pravilnih rezultata koji su direktno ili preko tačno definisanih matematičkih parametara linearno proporcionalni koncentraciji analita u određenom koncentracionom opsegu. Linearnost se procenjuje merenjem najmanje pet uzoraka različitih koncentracija unutar odgovarajućeg opsega [113]. Koeficijent R^2 pokazuje da li i u kojoj meri postoji korelacija između merenog signala (odgovora detektora) i koncentracije rastvora. Vrednost $R^2 > 0,99$ se smatra kao dokaz prihvatljive linearnosti. Linearnost metode je određena konstruisanjem dijagrama zavisnosti površina ispod krivih na hromatogramu, dobijenih propuštanjem serije radnih standardnih rastvora hlorogenske kiseline, i koncentracije hlorogenske kiseline (0,1-1,01 mg/ml).

4.8.3. Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limit detekcije je najmanja količina analizirane supstance koja može da se detektuje određenom metodom, odnosno ona količina supstance koja daje odgovor detektora 3 puta veći od signala šuma. Limit kvantifikacije je najmanja količina analita koja se može tačno kvantifikovati. U hromatografiji je to količina koja daje pik najmanje 10 puta veći od signala šuma [113].

4.8.4. Tačnost i prinos

Tačnost se definiše kao stepen slaganja rezultata dobijenih analizom sa teorijskim vrednostima. Kada se konkretna HPLC metoda koristi za određivanje analita u kompleksnim matriksima, potrebno je odrediti vrednost prinosa. Određivanje ove vrednosti omogućava ispitivanje uticaja svih komponenata matriksa na separaciju, detekciju i kvantifikaciju ispitivanog analita. Prinos je određen poređenjem vrednosti koncentracija hlorogenske kiseline dobijene eksperimentalno sa teorijskom vrednošću [113].

4.8.5. Ponovljivost (preciznost)

Ponovljivost (preciznost) analize je mera bliskog slaganja rezultata dobijenih za više merenja istog uzorka. Ponovljivost upoređuje sve operacije na uzorku od strane jednog analitičara pod istim radnim uslovima u kratkom vremenskom periodu. Ponovljivost (preciznost) metode je ispitana analizom tri različite koncentracije hlorogenske kiseline u šest ponavljanja [113].

4.8.6. Robustnost

Robustnost (postojanost) metode pokazuje koliko su tačnost i preciznost stabilne u odnosu na male promene njenih parametara, kao što su npr. temperatura, protok, sastav mobilne faze i dr. [113]. Robustnost metode je određena ispitivanjem uticaja neznatno

promenjenih uslova hromatografije: različite temperature kolone ($\pm 1^\circ\text{C}$), protok ($\pm 0,05$ ml/min) i talasna dužina detekcije (± 3 nm).

4.8.7. Uslovi HPLC analize za određivanje hlorogenske kiseline

U Tabeli 4 dati su uslovi HPLC analize za određivanje hlorogenske kiseline u uzorcima vrbe.

Tabela 4. Uslovi HPLC analize za određivanje hlorogenske kiseline

<i>Kolona:</i>	Zorbax C-18 (4,6mm x 150mm, i.d., 5 μ m veličina čestica)
<i>Mobilna faza:</i>	1.5% sirćetna kiselina:metanol = 85:15
<i>Protok:</i>	0,8 ml/min
<i>Temperatura:</i>	25 $^\circ\text{C}$
<i>Detekcija:</i>	UV-240 nm
<i>Ukupno vreme trajanja:</i>	15 min

4.8.8. Izrada rastvora za kalibraciju

Standardni rastvor hlorogenske kiseline: 100,1 mg hlorogenske kiseline je rastvoreno u metanolu u normalnom sudu od 10 ml, dajući rastvor koncentracije 10,1 mg/ml.

Radni standardni rastvori: dobijeni su uzimanjem alikvota standardnog rastvora od 0,1; 0,3; 0,6; 0,8 i 1 ml i dopunjavaju u normalnom sudu do 10 ml metanolom. Ovi rastvori

odgovaraju koncentracijama hlorogenske kiseline od 0,101; 0,303; 0,606; 0,808 i 1,01 mg/ml.

4.9. Hemijska karakterizacija visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom (HPLC)

Hemijska karakterizacija ekstrakata kore i lista ispitivanih vrsta roda *Salix* vršena je odgovarajućim HPLC metodama. Sadržaj salicina u ispitivanim ekstraktima određen je primenom ranije opisane metode uz manje modifikacije [115]. Separacija salicina izvršena je na koloni Zorbax C-18 (4,6mm x 150mm, i.d., 5 μ m veličina čestica) na 25°C primenom izokratske elucije. Kao mobilna faza korišćeni su bidestilovana voda, tetrahidrofuran i ortofosforna kiselina u odnosu (97,7 : 1,8 : 0,5) (v/v/v), a njen protok je iznosio 1 ml/min. Injektovano je 10 μ l uzorka. Detekcija salicina vršena je na 270 nm u toku 12 min.

Fenolne kiseline i flavonoidi u ispitivanim ekstraktima određeni su primenom HPLC metode, čiji uslovi su prikazani u Tabeli 5.

Tabela 5. Uslovi HPLC analize za određivanje fenolnih kiselina i flavonoida

<i>Kolona:</i>	Zorbax C-18 (4,6mm x 150mm, i.d., 5 μ m veličina čestica)
<i>Mobilna faza:</i>	A: 0,1% Sirćetna kiselina u dejonizovanoj vodi B: 0,1% Sirćetna kiselina u acetonitrilu,

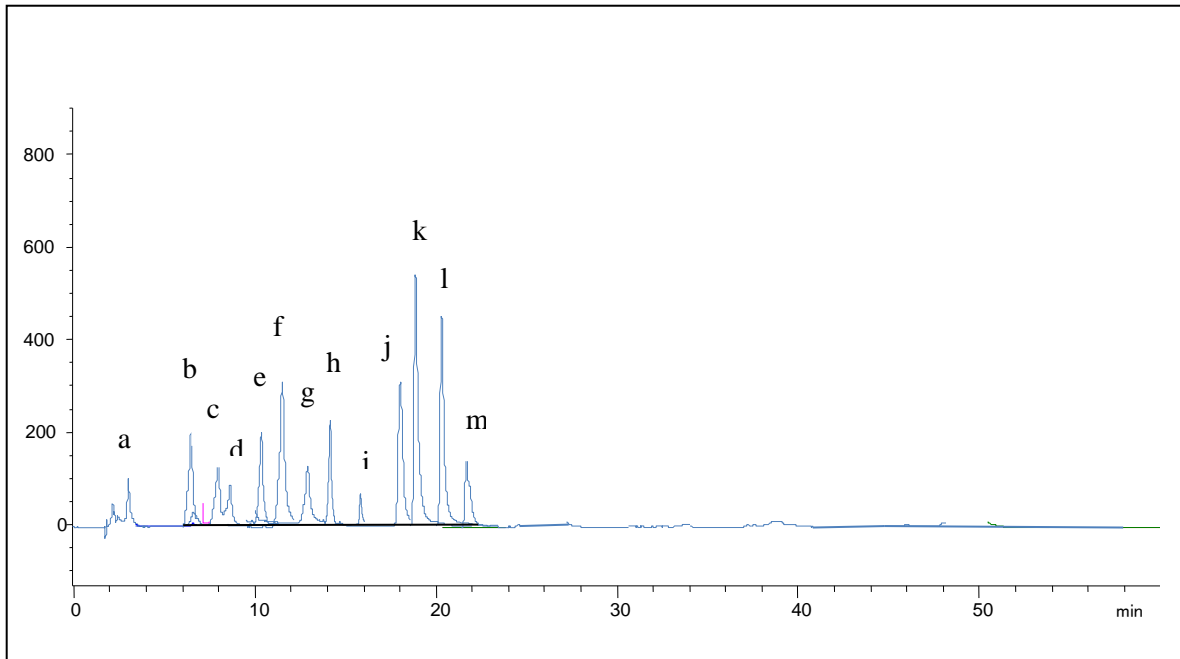
<i>Gradijentna elucija:</i>	3,25 min – 10% B; 8 min – 12% B, 15 min – 25% B, 15,8 min – 30% B, 25min – 90% B, 25,4min – 100% B.
<i>Injektovanje:</i>	10 µl
<i>Protok:</i>	1 ml/min
<i>Temperatura:</i>	25°C
<i>Pritisak:</i>	134 bar
<i>Detekcija:</i>	280 nm
<i>Ukupno vreme trajanja:</i>	30 min

4.9.1. Izrada rastvora za kalibraciju

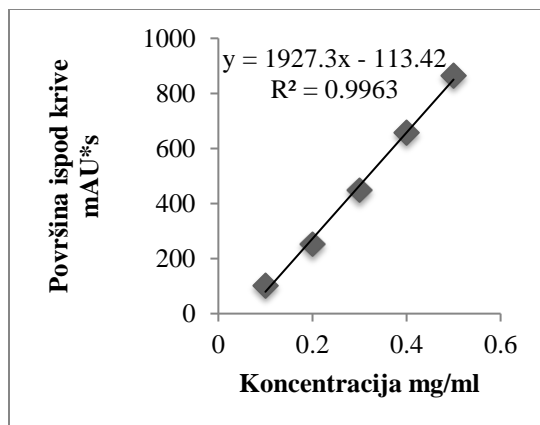
Osnovni standardni rastvori: 0,1 mg/ml kumarinske i trans-cimetne kiseline; 0,5 mg/ml salicina, galne, hlorogenske, *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske, siringinske, kafene kiseline, epikatehina, rutina, kvercetina i naringenina. Pripremljeni su tačnim odmeravanjem 2,5 mg odnosno 12,5 mg standarnih supstanci koje su kvantitativno prenesene u normalni sud od 25 ml. Kao rastvarač se koristio metanol (95%, v/v).

Radni standardni rastvori: dobijeni su uzimanjem 1, 3, 5, 7 ml osnovnog standardnog rastvora, prenošenjem u normalni sud od 10 ml i dopunjavanjem istim rastvaračem do crte u cilju dobijanja rastvora koncentracija od 0,01-0,1 mg/ml za kumarinsku i trans-cimetnu kiselinu, odnosno 0,05-0,5 mg/ml za ostale standardne rastvore.

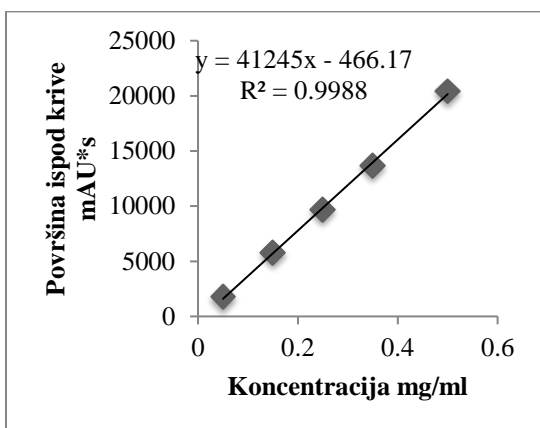
Izrada kalibracione krive: 10 μ l radnih standardnih rastvora je injektovano u HPLC sistem. Na slici 7 prikazan je hromatogram smeše standarda. Na osnovu dobijenih površina ispod pikova na hromatogramu konstruisane su kalibracione krive i date su regresione jednačine (koeficijenti pravca) (Grafikoni a-m).



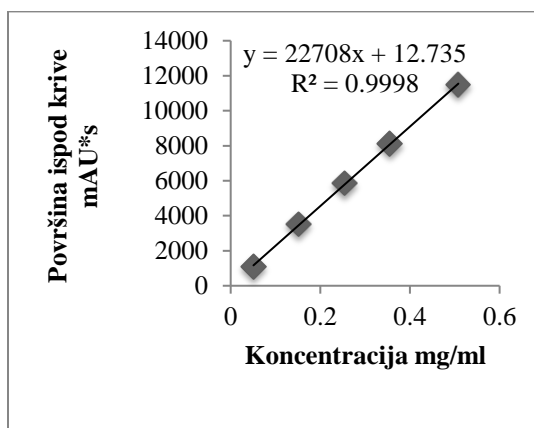
Slika 7. HPLC hromatogram smeše standarda: a) galna kiselina; b) hlorogenska kiselina; c) *p*-hidroksibenzojeva kiselina; d) vanilinska kiselina; e) siringinska kiselina; f) kafena kiselina; g) epikatehin; h) kumarinska kiselina; i) rutin; j) rozmarinska kiselina; k) kvercetin; l) trans-cimetna kiselina; m) naringenin.



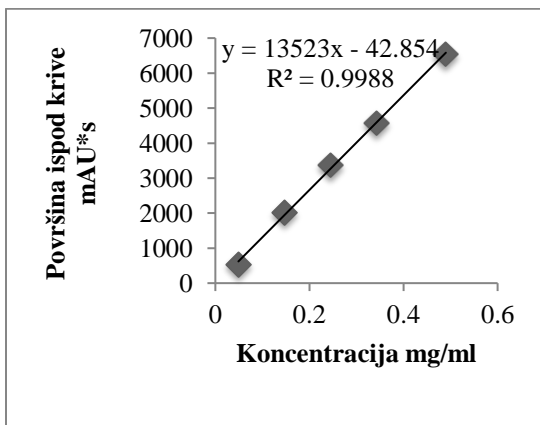
a)



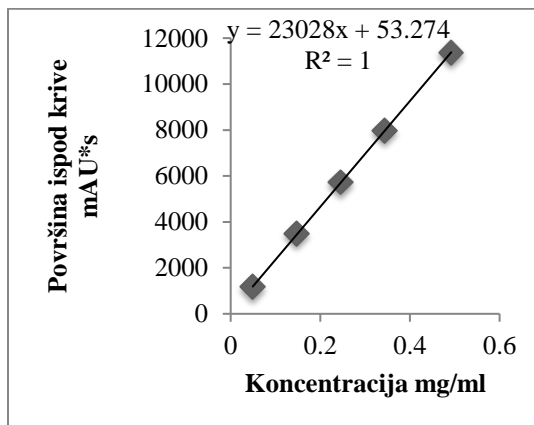
b)



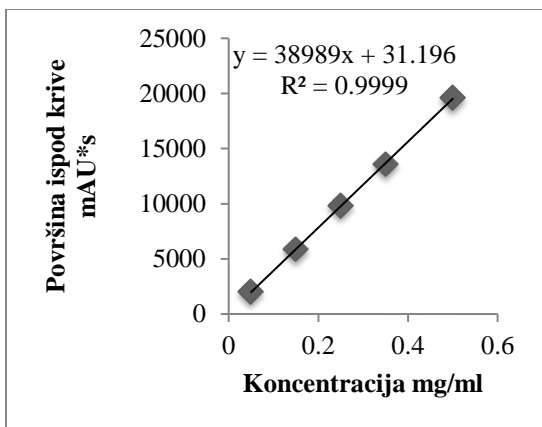
d)



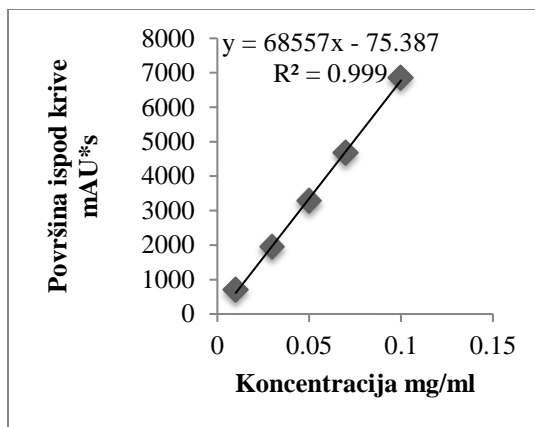
c)



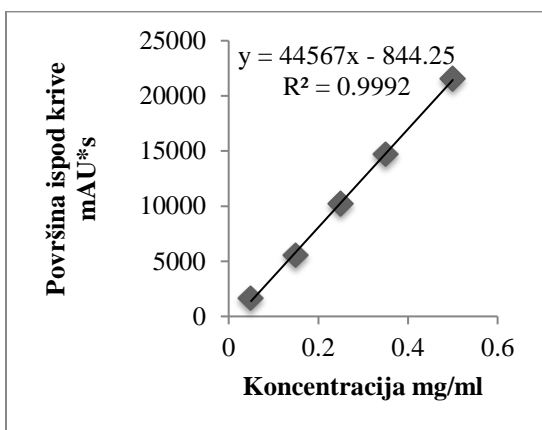
e)



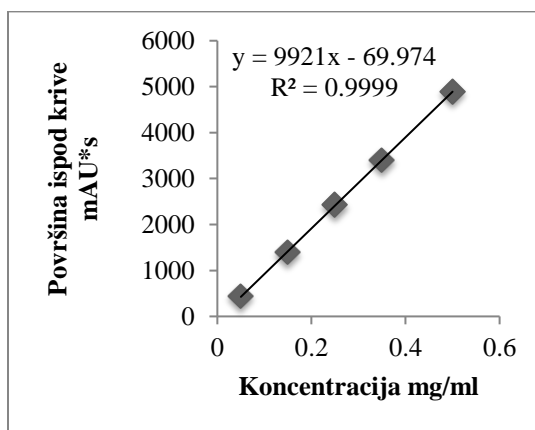
f)



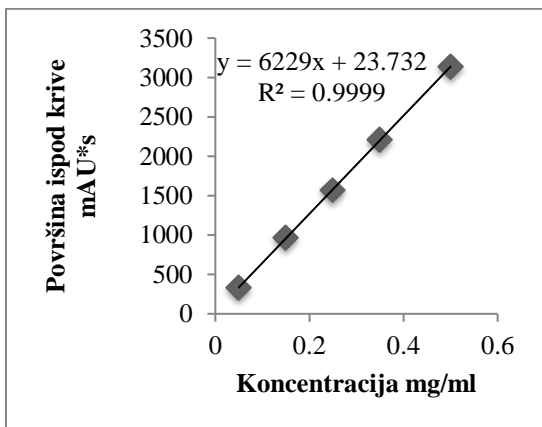
i)



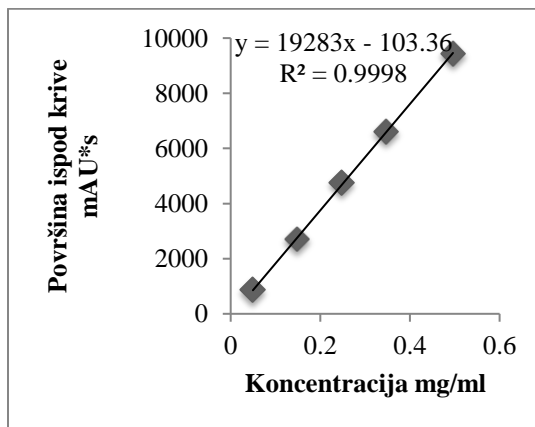
g)



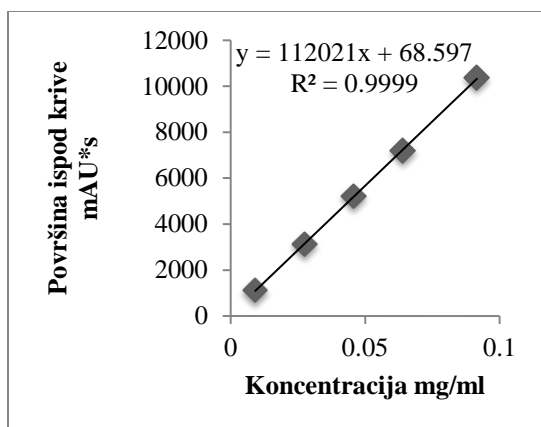
j)



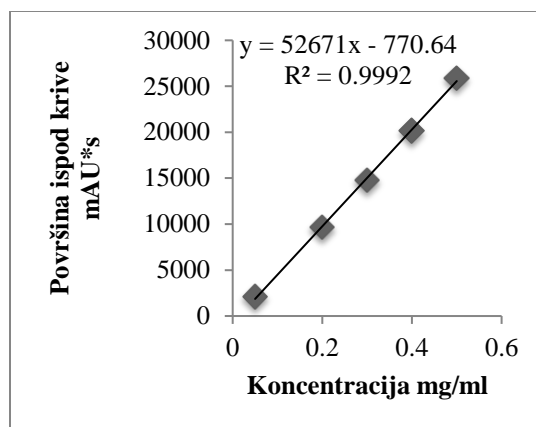
h)



k)



l)



m)

Grafikoni a-m. Dijagram zavisnosti površina ispod krivih od različitih koncentracija

- a) salicina, b) galne kiseline, c) hlorogenske kiseline, d) *p*-hidroksibenzojeve kiseline, e) vanilinske kiseline, f) siringinske kiseline, g) kafene kiseline, h) epikatehina, i) *p*-kumarinske kiseline, j) rutina, k) kvercetina, l) trans-cimetne kiseline, m) naringenina

4.10. *In silico* ispitivanje inhibicije enzima ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2) i acetilholinesteraze (AChE)

4.10.1. Priprema liganada za doking

Sve molekulske strukture korišćene u ovom radu preuzete su iz *PubChem* baze podataka (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Molekuli koji zadovoljavaju pravila Lipinskog [116] podvrgnuti su doking ispitivanjima.

4.10.2. Priprema makromolekula za doking

Trodimenzionalne struktura makromolekula preuzete su iz *Protein Data Bank* (PDB) baze podataka (<http://www.rcsb.org/>). Korišćeni su kompleks COX-1 sa flurbiprofenom, pdb kod: 1CQE [117], kompleks COX-2 sa indometacinom, pdb kod: 4COX [118] i kompleks AChE sa fascikulinom II, glikoziliranim proteinom, pdb kod: 1B41 [119]. *AutoDock Tools* i *Discovery Studio Visualiser 4.5* programski paketi korišćeni su za pripremu makromolekula za doking sledećom procedurom: iz prethodno navedenih kompleksa obrisani su ligandi i lanci B, C i D, u slučaju izoenzima ciklooksigenaze, odnosno lanac B kod AChE, a zatim su uklonjeni molekuli vode, dodeljeni polarni vodonikovi atomi i izračunato je naelektrisanje Gastejgerovim metodom.

4.10.3. Molekularni doking

Doking je vršen pomoću programskog paketa *AutoDock 4.2.3*, metodom Lamarkovog genetskog algoritma [120], po standardnoj doking proceduri za rigidni receptor i fleksibilni ligand, sa 25 nezavisnih ponavljanja po ligandu. Rešetka je podešena na veličinu od 60 tačaka u x , y i z pravcu, a rastojanje između tačaka rešetke iznosilo je $0,375\text{\AA}$. Ostalim parametrima nisu menjana automatska podešavanja. Konformacije dokovanih struktura sa najnižom energijom vezivanja su smatrane za najpogodnije. Conformations of docked structures with the lowest binding energy were considered as the most favorable docking pose. Rezultati dokinga su grafički ispitani pomoću *AutoDock Tools* i *Discovery Studio Visualiser 4.5*.

4.11. Statistička obrada podataka

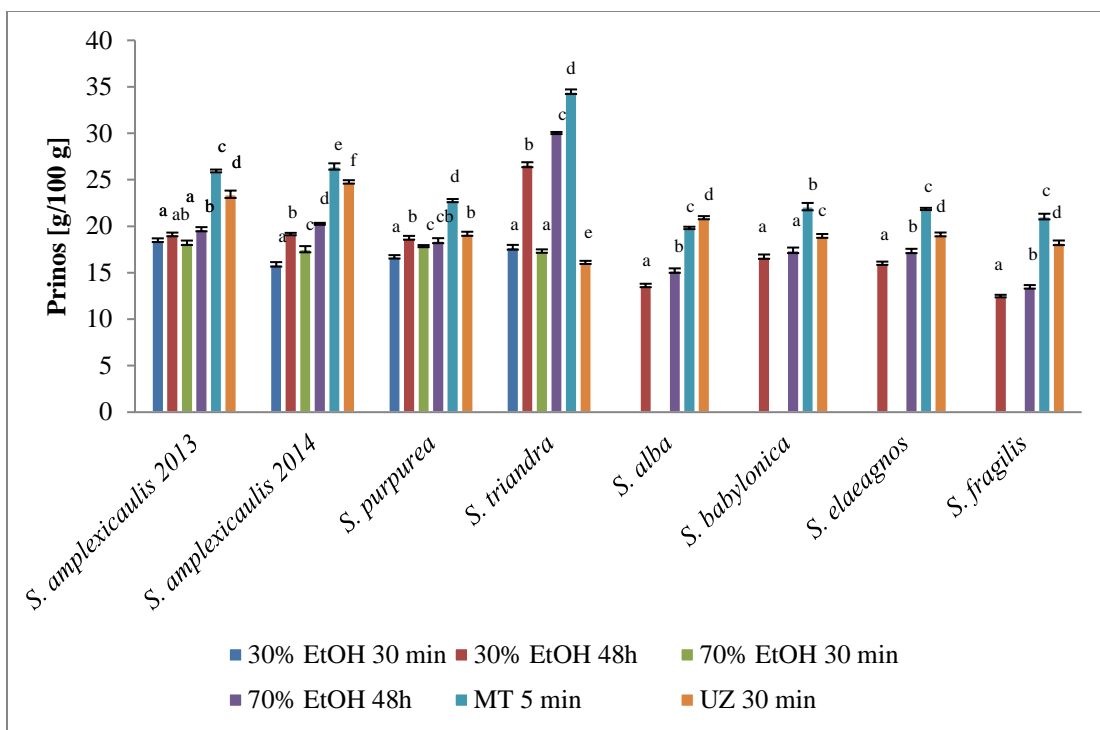
Podaci dobijeni u ovom radu su obrađeni pomoću softverskih paketa Microsoft Office Excel for Windows v. 2010 i IBM SPSS Statistics v. 22 operacijama deskriptivne, univarijantne i test metodama statistike. Kao mera srednje vrednosti neke grupe podataka određena je aritmetička sredina, a mera varijacije među podacima izražena je standardnom devijacijom. Nivo verovatnoće $p < 0,05$ je smatran statistički značajnim.

5. REZULTATI I DISKUSIJA REZULTATA

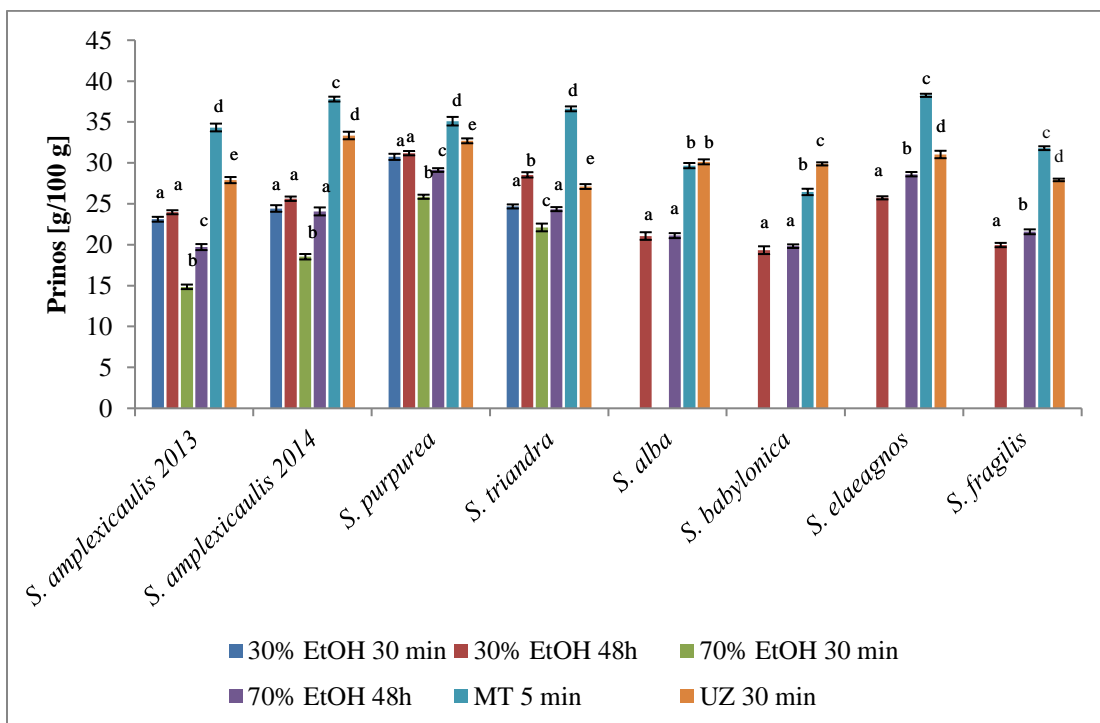
5.1. Efikasnost ekstrakcije

Efikasnost ekstrakcije zavisi od brojnih faktora, poput vrste rastvarača, njegove koncentracije, temperature, vremena ekstrakcije, veličine čestica biljnog materijala i dr. [121, 122]. Ispitan je uticaj maceracije, kao primera konvencionalne metode i mikrotalasne i ultrazvučne ekstrakcije, kao savremenih metoda ekstrakcije, na količinu ekstrahovanih materija iz kore i lista različitih predstavnika roda *Salix*. Na stopu ekstrakcije bilo koje konvencionalne metode najviše utiče izbor rastvarača, odnosno njegova polarnost [123]. Smeše etanola i vode su pogodni rastvarači za ekstrakciju, budući da mogu da rastvaraju širok spektar fenolnih komponenti i prihvatljivi su za ljudsku upotrebu [124]. U okviru maceracije ispitan je uticaj dve različite koncentracije etanola (30% i 70%, v/v) na ukupan prinos ekstrakcije u toku dva vremenska intervala (30 min i 48h). Smatra se da se rastvorljivost fenolnih jedinjenja može modifikovati promenom koncentracije etanola, koja utiče na osobine ekstragensa, kao što su gustina, dielektrična konstanta, itd. [10].

Na Grafikonima 3 i 4 prikazani su rezultati ukupnog prinosa dobijenog različitim tehnikama i pri različitim uslovima ekstrakcije kore i lista 8 predstavnika roda *Salix*.



Grafikon 3. Prinos ekstrakcije kore različitih vrsta roda *Salix* [g s.e./100 g droge]

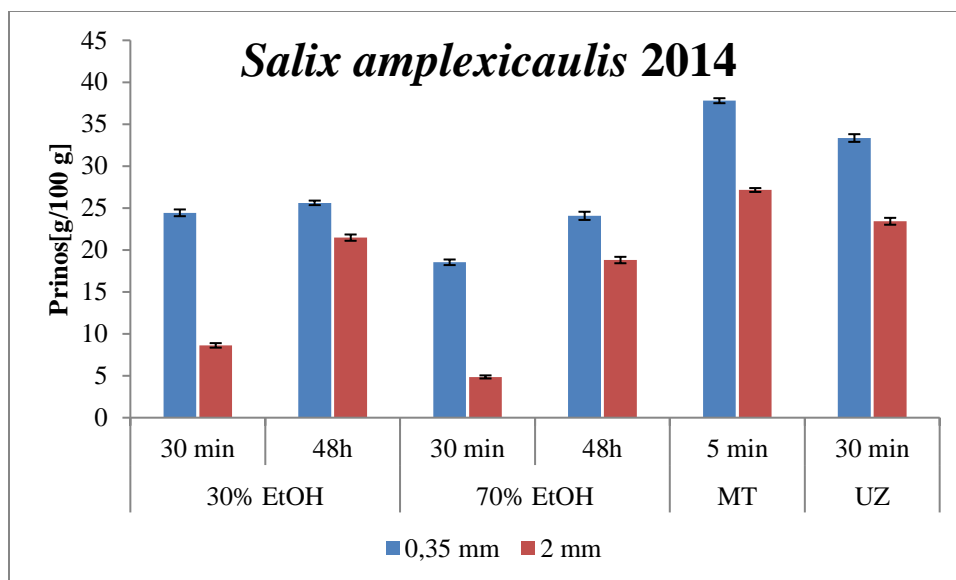


Grafikon 4. Prinos ekstrakcije lista različitih vrsta roda *Salix* [g s.e./100 g droge]

Ukupan prinos ekstrakcije kore kretao se u opsegu od 12,49-34,47 g s.e./100 g droge, a lista od 14,85-38,26 g s.e./100 g droge. Najveći prinos ekstrakcije i kore i lista gotovo svih *Salix* vrsta dobijen je mikrotalasnom ekstrakcijom. Visoki prinosi ekstrakcije obe droge većine vrsta vrba dobijeni su i ultrazvučnom tehnikom. Prinosi ultrazvukom potpomognute ekstrakcije uporedivi su sa onima dobijenim mikrotalasnom ekstrakcijom, što potvrđuje prednost savremenih tehnika ekstrakcije za postizanje većih prinosa za kraće vreme u odnosu na konvencionalne metode kao što je maceracija [125].

Poređenjem rezultata maceracije etanolom različitih koncentracija, kod kore je ostvaren veći prinos kada je kao ekstragens korišćen 70% (v/v) etanol, dok je u slučaju lista veći prinos dobijen maceracijom 30% (v/v) etanolom, što ukazuje na veći sadržaj polarnih ekstraktibilnih komponenti u listu. Kada je u pitanju dužina trajanja maceracije, bolji prinosi i kore i lista se ostvaruju nakon 48h ekstrakcije nego nakon 30 min, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima da se sa porastom vremena ekstrakcije povećava i prinos ekstraktibilnih materija kada se kao rastvarač primenjuje etanol [126].

Na uzorku lista vrste *Salix amplexicaulis* (2014) ispitan je uticaj dva različita stepena usitnjenosti droge (sito 0,35 i 2 mm) na ukupan prinos ekstrakcije i dobijeni rezultati su prikazani na Grafikonu 5.



Grafikon 5. Ukupan prinos ekstrakcije lista *S. amplexicaulissa* dva stepena usitnjenosti

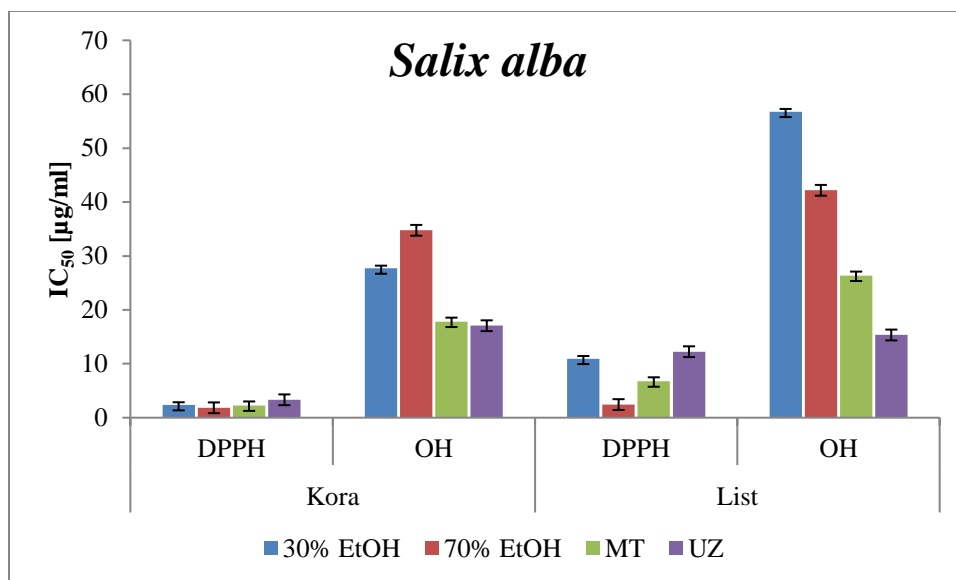
Ako poredimo ukupan prinos ekstrakcije lista različitog stepena usitnjenosti, značajno veći prinosi se dobijaju pri ekstrakciji droge većeg stepena usitnjenosti (0,35 mm), što je i očekivano, jer se sa porastom stepena usitnjenosti povećava specifična površina biljnog materijala i omogućava intenzivniji kontakt sa ekstragensom. Razlika je posebno uočljiva kod ekstrakata dobijenih maceracijom etanolom u trajanju od 30 min. Takođe, može se primetiti da se približne vrednosti prinosa ekstrakcije dobijaju kod droge stepena usitnjenosti 0,35 mm i vremena ekstrakcije 30 min i droge stepena usitnjenost 2 mm i vremena ekstrakcije 48h. Dobijeni rezultati pokazuju da se smanjenjem veličine čestica biljnog materijala može značajno skratiti vreme ekstrakcije i poboljšati njena efikasnost, što je u saglasnosti sa literaturom [127].

5.2. Rezultati antioksidantne aktivnosti

DPPH je stabilan slobodni radikal, ljubičasto obojen u etanolnom rastvoru, koji u prisustvu antioksidanasa prelazi u žutu. Jedna od specifičnosti ove metode je da omogućava testiranje i lipofilnih i hidrofilnih jedinjenja, što je svrstava među najrasprostranjenije metode za određivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata. Hidroksilni radikal se generiše u Fentonovoj reakciji i jedan je od najmoćnijih slobodnih radikala koji je direktno uključen u nepovratnu štetu nastalu oksidativnim stresom. Ukupni efekat hidroksilnih radikala izaziva mutagenezu, karcinogenezu i starenje [128].

Rezultati inhibicije 50% DPPH i OH radikala ekstraktima kore i lista ispitivanih *Salix* vrsta, kao i uticaj različitih tehnika ekstrakcije na antioksidantnu aktivnost prikazani su na Grafikonima 4-11. Što je vrednost IC_{50} niža, to je antioksidantna aktivnost ekstrakta veća. Rezultati pokazuju da svaki od ispitivanih ekstrakata poseduje antioksidativnu aktivnost. Može se uočiti da postupak ekstrakcije, vrsta vrbe, kao i biljni organ (kora ili list) unutar iste vrste značajno utiču na antioksidativni potencijal.

Kod vrste *Salix alba* koncentracije ekstrakata kore koje su dovele do inhibicije 50% DPPH radikala kretale su se u opsegu od 1,83 – 3,32 $\mu\text{g/ml}$, a lista od 2,43 - 12,24 $\mu\text{g/ml}$ (Grafikon 6).

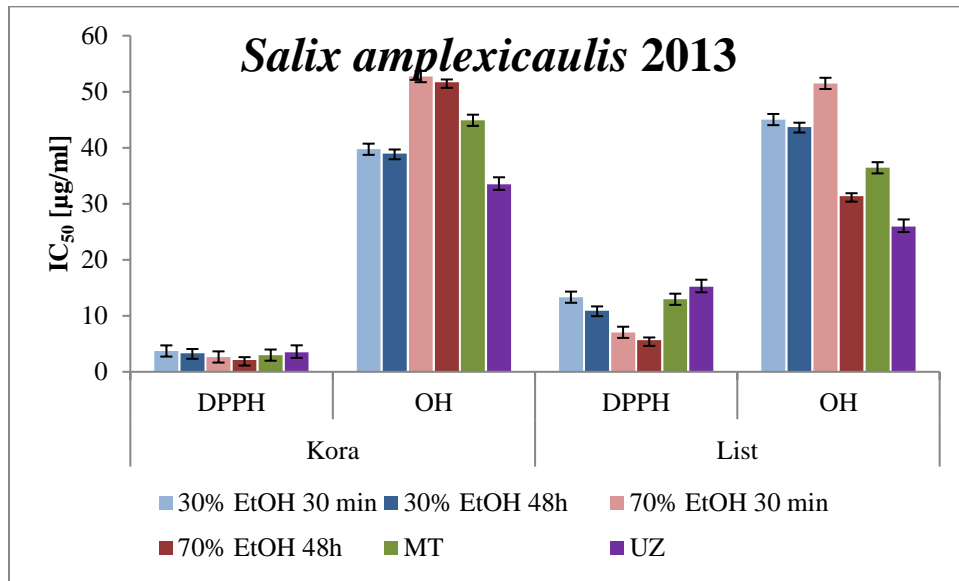


Grafikon 6. Rezultati antioksidantne aktivnosti kore i lista *Salix alba* [µg/ml]

Ekstrakti i kore i lista dobijeni maceracijom 70% etanolom pokazuju najjaču aktivnost prema DPPH radikalu, pri čemu je ona izraženija kod kore bele vrbe. Antioksidantna aktivnost ispitivanih ekstrakata jača je od antioksidantne aktivnosti kore *S. alba* (15,5 µg/ml) dobijene u istraživanju koje je sprovedeno u Alžiru, gde je ekstrakcija biljnog materijala vršena metanolom [129], što ukazuje na veću selektivnost 70% (v/v) etanola za ekstrakciju antioksidantnih materija.

Koncentracije ekstrakata i kore i lista *S. alba* potrebne za inhibiciju 50% hidroksilnih radikala su više od prethodno navedenih za inhibiciju DPPH radikala i kretale su se u intervalu od 17,06 – 34,76 µg/ml i 15,34 – 56,77 µg/ml, kod kore i lista redom. Ekstrakti i kore i lista dobijeni ultrazvučnom tehnikom inhibisali su OH radikale u najvećoj meri u odnosu na ostale ekstrakte.

Koncentracije ekstrakata kore i lista vrste *Salix amplexicaulis* (2013), dobijenih različitim postupcima ekstrakcije, koje su inhibisale 50% DPPH radikala bile su u rasponu od 2,12 – 3,72 $\mu\text{g/ml}$ (kora) i od 5,63 – 15,19 $\mu\text{g/ml}$ (list) (Grafikon 7).

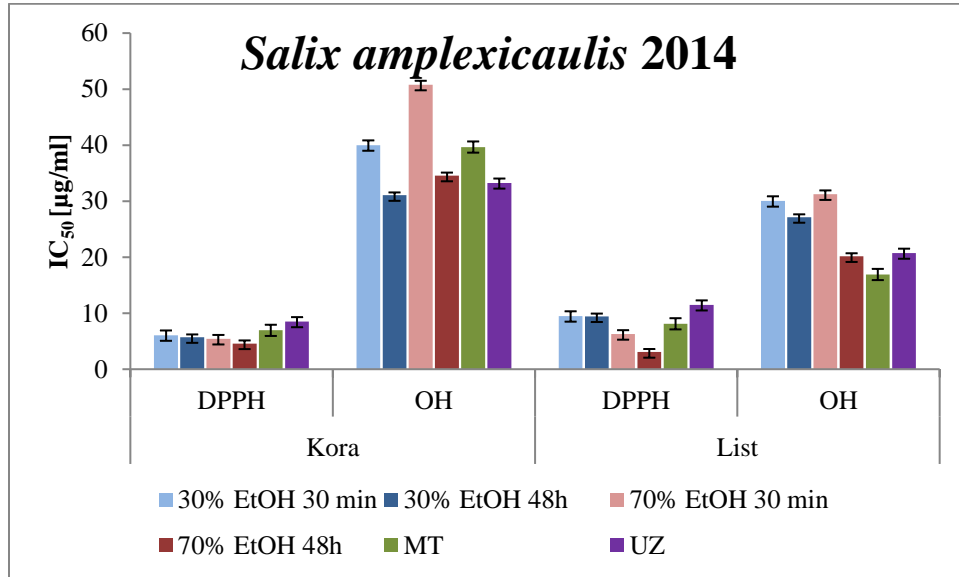


Grafikon 7. Rezultati antioksidantne aktivnosti kore i lista *Salix amplexicaulis* 2013

[$\mu\text{g/ml}$]

Maceracija 70% etanolom je omogućila dobijanje ekstrakata i kore i lista sa najjačom sposobnošću inhibicije DPPH radikala, s tim što je ona izraženija kod ekstrakta kore *S. amplexicaulis* (2013). Sa produženjem vremena maceracije rasla je i antioksidativna moć ekstrakata. IC₅₀ vrednosti neutralizacije OH radikala ekstraktima kore kretale su se u opsegu od 33,48-52,70 $\mu\text{g/ml}$, dok su ekstraktima lista od 25,95 – 51,49 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrakti i kore i lista dobijeni ultrazvučnom tehnikom ispoljili su najveću antioksidantnu aktivnost u OH-test sistemu.

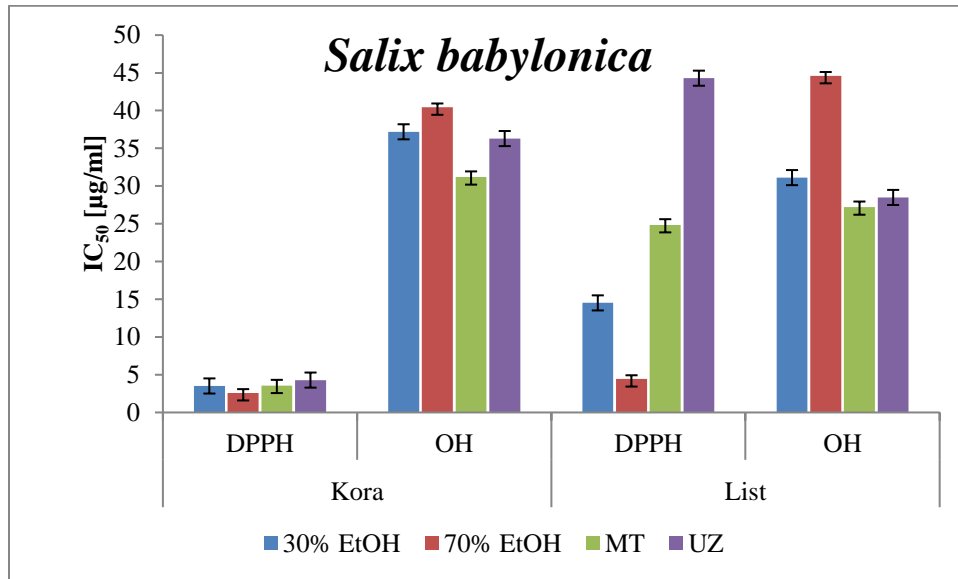
IC₅₀ vrednosti inhibicije DPPH radikala ekstraktima kore *S. amplexicaulis* (2014) bile su u intervalu od 4,59 – 6,94 μg/ml, dok su ekstraktima lista od 3,06 – 11,49 μg/ml (Grafikon 8).



Grafikon 8. Rezultati antioksidantne aktivnosti kore i lista *Salix amplexicaulis* 2014 [μg/ml]

Maceracija 70% etanolom omogućila je dobijanje ekstrakata i kore i lista sa najvećom sposobnošću neutralizacije DPPH radikala, pri čemu je ona jača kod lista. Sa povećanjem dužine trajanja ekstrakcije, rastao je i antioksidantni potencijal etanolnih ekstrakata. Koncentracije ekstrakata koje su inhibisale 50% OH radikala kretale su se u rasponu od 31,06 – 50,79 μg/ml kada je u pitanju kora, a 16,91 – 31,22 μg/ml kada je list. Maceracija 30% etanolom u trajanju od 48 sati omogućila je dobijanje ekstrakta kore sa najvećim inhibitornim potencijalom prema OH radikalu, dok je u slučaju lista to bila mikrotalasna ekstrakcija. Ekstrakti lista *S. amplexicaulis* (2014) dobijeni svim primenjenim postupcima ekstrakcije pokazali su jače antioksidativno delovanje prema OH radikalu u odnosu na ekstrakte kore iste vrste.

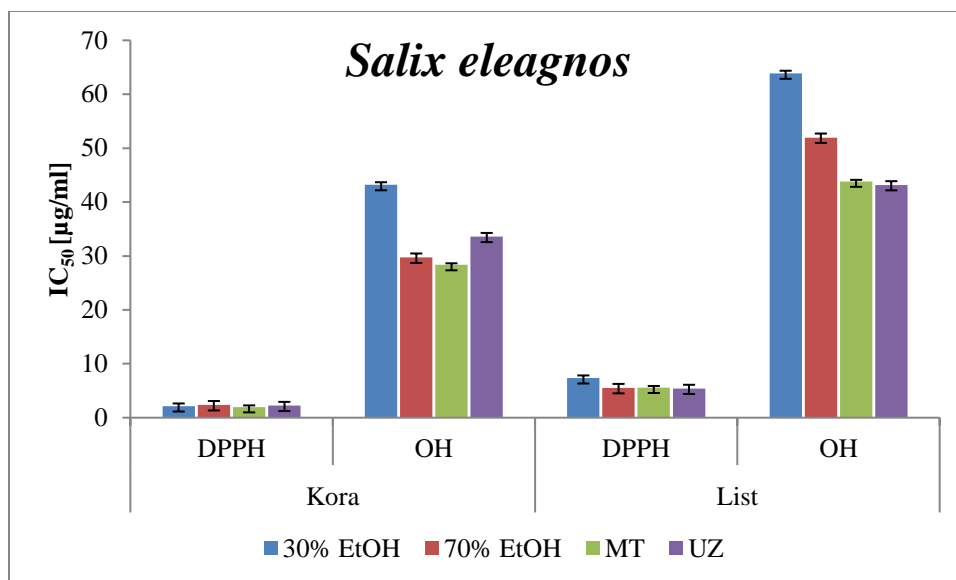
Koncentracije ekstrakata kore *Salix babylonica* koje su neutralisale 50% DPPH radikala bile su u intervalu od 2,59 – 4,29 $\mu\text{g/ml}$, a lista 4,43 – 44,29 $\mu\text{g/ml}$ (Grafikon 9).



Grafikon 9. Rezultati antioksidantne aktivnosti kore i lista *Salix babylonica* [$\mu\text{g/ml}$]

Najjaču inhibiciju DPPH radikala ispoljili su 70% etanolni ekstrakti i kore i lista, pri čemu je efekat daleko izraženiji kod kore. IC_{50} vrednosti neutralizacije OH radikala kretale su se u opsegu od 31,19 – 40,44 $\mu\text{g/ml}$ kada je u pitanju kora i 27,20 – 44,61 $\mu\text{g/ml}$ kada je ispitivan list *S. babylonica*. Najjači antioksidantni potencijal prema OH radikalu pokazali su ekstrakti dobijeni mikrotalasnom tehnikom i kore i lista.

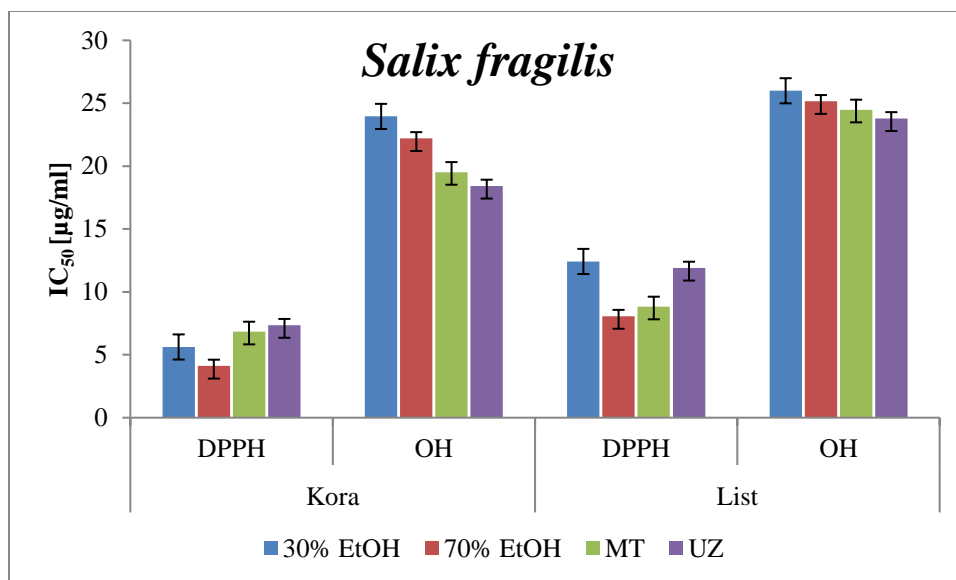
IC_{50} vrednosti inhibicije DPPH radikala ekstraktima kore *Salix eleagnos* bile su u intervalu 1,98 – 2,34 $\mu\text{g/ml}$, dok su ekstraktima lista 5,40 – 7,34 $\mu\text{g/ml}$ (Grafikon 10).



Grafikon 10. Rezultati antioksidantne aktivnosti kore i lista *Salix eleagnos* [µg/ml]

Koncentracije ekstrakata kore koje su neutralisale 50% OH radikala kretale su se u opsegu od 28,34 – 43,18 µg/ml, a ekstrakata lista od 43,17 – 63,86 µg/ml. Među ekstraktima kore najjaču aktivnost prema DPPH i OH radikalima pokazao je mikrotalasni ekstrakt, dok je među ekstraktima lista to bio ultrazvučni ekstrakt.

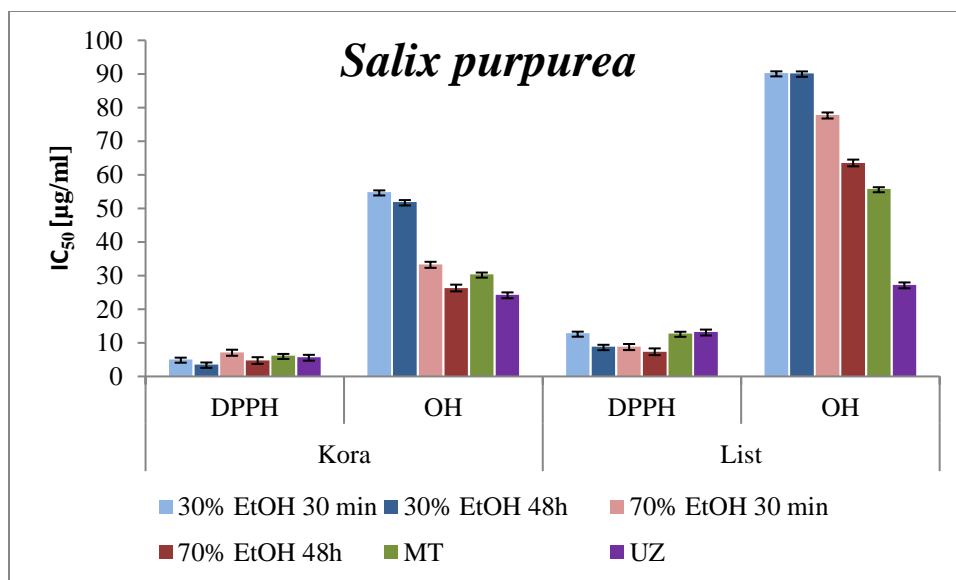
Koncentracije ekstrakata kore *Salix fragilis* koje su inhibisale 50% DPPH radikala bile su u rasponu od 4,11 – 7,35 µg/ml, a lista od 8,07 – 12,42 µg/ml (Grafikon 11).



Grafikon 11. Rezultati antioksidantne aktivnosti kore i lista *Salix fragilis* [µg/ml]

Najizraženiju antioksidantnu aktivnost prema DPPH radikalumu ispoljili su ekstrakti dobijeni maceracijom 70% etanolom i kore i lista. IC₅₀ vrednosti neutralizacije OH radikala kretale su se u intervalu od 18,42 – 23,95 µg/ml i 23,79 – 25,99 µg/ml, za ekstrakte kore i lista redom. Ekstrakti i kore i lista *S. fragilis* dobijeni ultrazvučnom tehnikom pokazali su najjaču antioksidantnu aktivnost u OH testu.

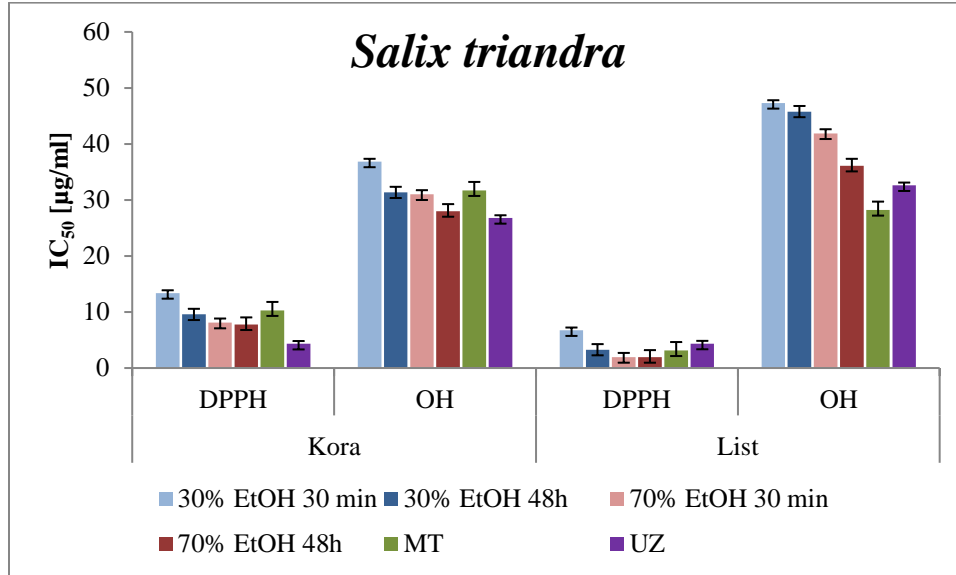
Kod vrste *Salix purpurea* koncentracije ekstrakata kore koje su dovele do inhibicije 50% DPPH radikala kretale su se u opsegu od 3,55 – 7,15 µg/ml, a lista od 7,34 – 13,19 µg/ml (Grafikon 12).



Grafikon 12. Rezultati antioksidantne aktivnosti kore i lista *Salix purpurea* [µg/ml]

Ekstrakt kore sa najvećim potencijalom neutralizacije DPPH radikala dobijen je 48-časovnom maceracijom 30% etanolom, dok je u slučaju lista to bila ekstrakcija 70% etanolom. IC₅₀ vrednosti inhibicije OH radikala ekstraktima kore *S. purpurea* bile su u intervalu od 24,26 – 54,85 µg/ml, dok su ekstraktima lista bile u rasponu od 27,22 – 90,27 µg/ml. Najizraženiji antioksidanti potencijal prema OH radikalu pokazali su ultrazvučni ekstrakti i kore i lista *S. purpurea*. Sposobnost ekstrakata *S. purpurea* da neutrališu OH radikale u ovom radu je značajno veća u poređenju sa rezultatima inhibicije OH radikala ekstraktima *S. purpurea* (≈15 mg/ml) u ranije publikovanoj studiji [130].

Koncentracije ekstrakata kore *Salix triandra* koje su neutralisale 50% DPPH radikala bile su u intervalu od 4,32 – 13,38 µg/ml, a lista od 1,95 – 6,73 µg/ml (Grafikon 13).

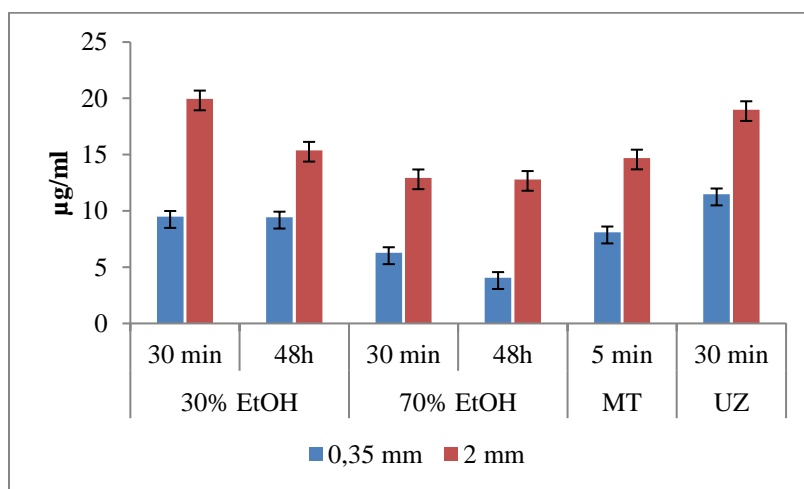


Grafikon 13. Rezultati antioksidantne aktivnosti kore i lista *Salix triandra* [µg/ml]

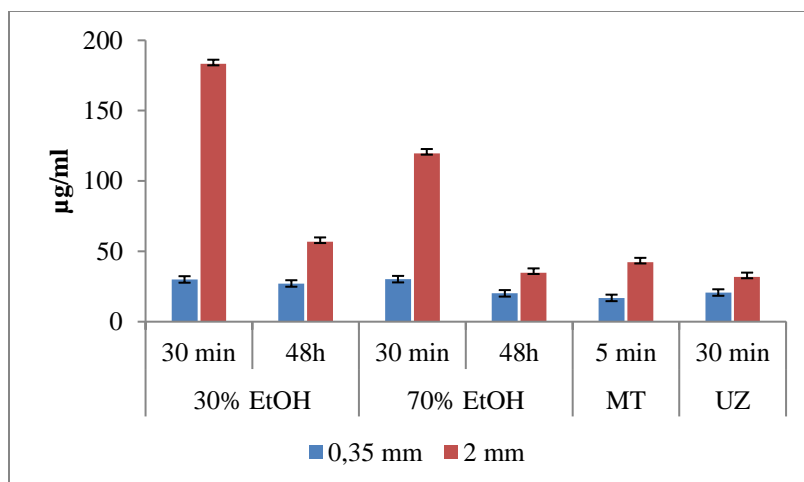
Među ekstraktima kore *S. triandra* najjaču antiradikalisku aktivnost prema DPPH ispoljio je ultrazvučni ekstrakt, dok su u slučaju lista to 70% etanolni ekstrakti. Ekstrakti lista su pokazali jači antioksidantni potencijal u DPPH testu od ekstrakata kore *S. triandra*. IC₅₀ vrednosti inhibicije OH radikala ekstraktima kore *S. triandra* bile su u opsegu od 26,77 – 36,85 µg/ml, dok su se u ekstraktima lista kretale od 28,21 – 47,31 µg/ml. Najveću sposobnost neutralizacije OH radikalima među ekstraktima kore ima ultrazvučni ekstrakt, dok među ekstraktima lista to ekstrakt dobijen mikrotalasnom tehnikom.

Uticaj stepena usitnjenosti (sito 0,35 i 2 mm) na antioksidantni potencijal ekstrakata dobijenih različitim postupcima ekstrakcije ispitan je na uzorku lista vrste *S. amplexicaulis* (2014) i prikazan je na grafikonima 14 i 15. Može se uočiti da je inhibicija i DPPH (Grafikon 14) i OH radikala (Grafikon 15) veća što je droga usitnjenija nezavisno

od tehnike ekstrakcije. Što su čestice biljnog materijala sitnije, to je veća kontaktna površina sa rastvaračem i ekstrakcija antioksidantnih materija je intenzivnija, što je u saglasnosti sa literaturom [131]. Razlika je naročito izražena kod inhibicije OH radikala etanolnim ekstraktima dobijenim pri kraćem vremenu maceracije. Antiradikalni potencijal ekstrakta lista stepena usitnjenosti 0,35 mm je 4 do 6 puta jači od antioksidantnog delovanja droge stepena usitnjenost 2 mm kod ekstrakata dobijenih maceracijom 70% i 30% etanolom u toku 30 minuta, redom.

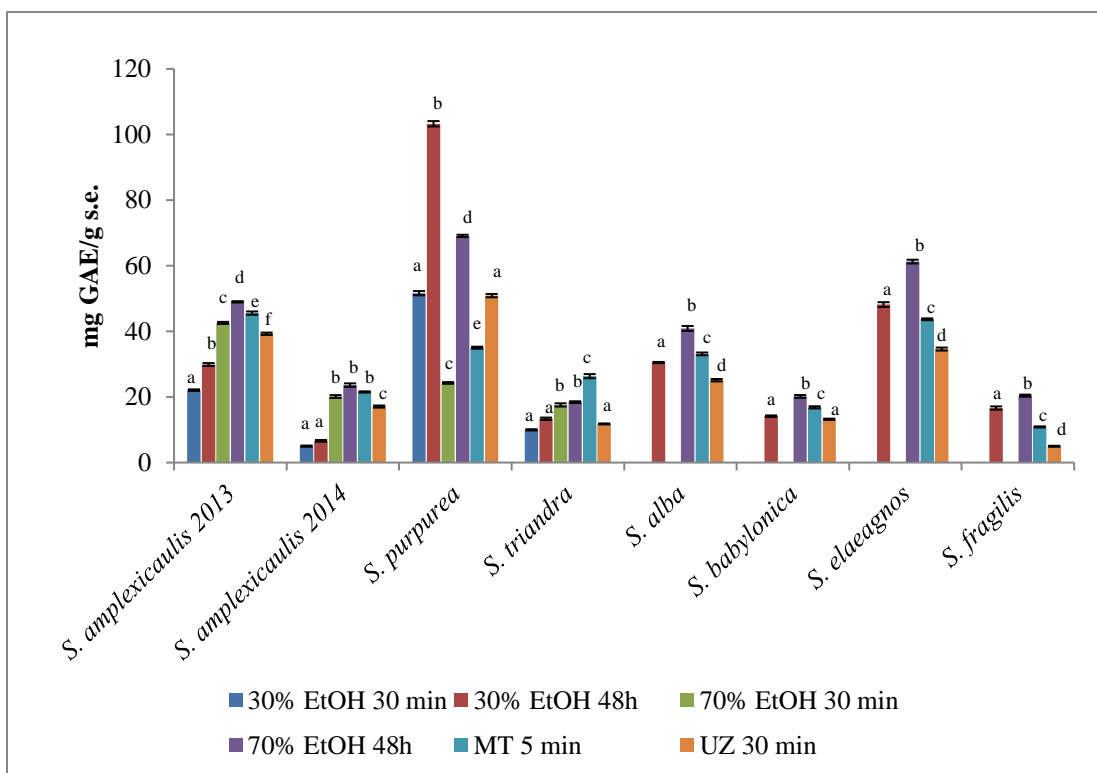


Grafikon 14. Inhibicija DPPH radikala ekstraktima lista *S. amplexicaulis* (2014) dva stepena usitnjenosti

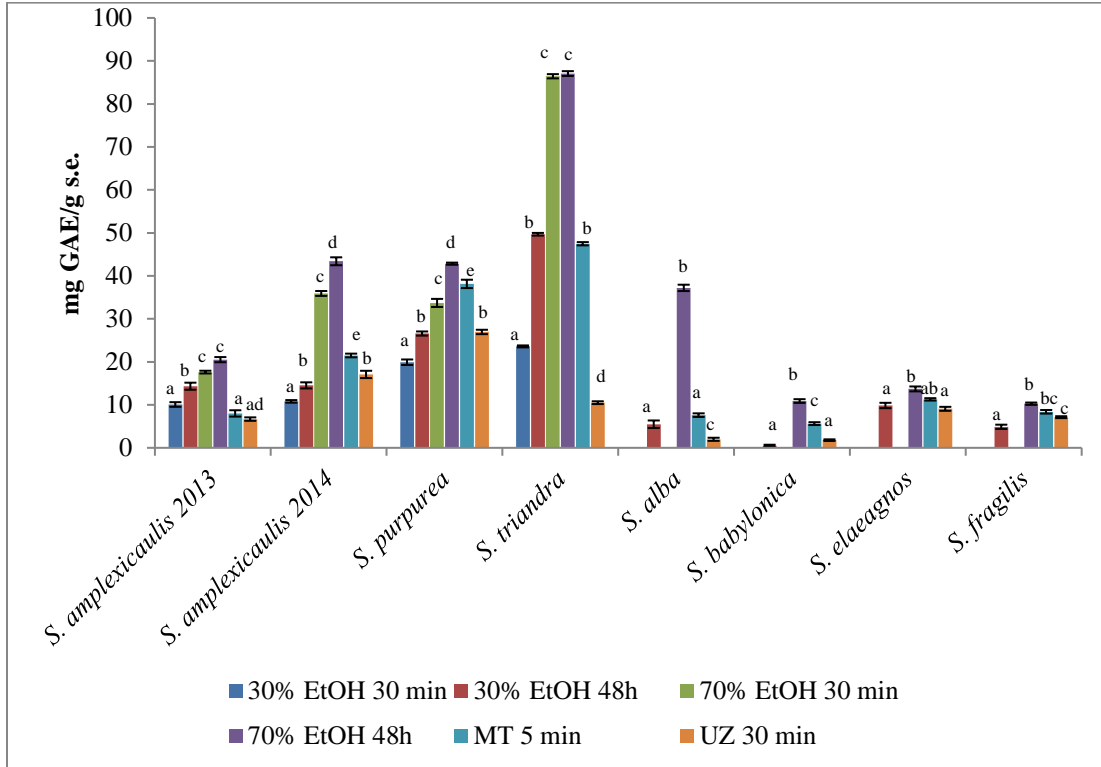


Grafikon 15. Inhibicija OH radikala ekstraktima lista *S. amplexicaulis* (2014) dva stepena usitnjenosti

5.3. Rezultati ukupnih fenola



Grafikon 16. Ukupni fenoli u ekstraktima kore različitih *Salix* vrsta [mg GAE/g s.e.]



Grafikon 17. Ukupni fenoli u ekstraktima lista različitih *Salix* vrsta [mg GAE/g s.e.]

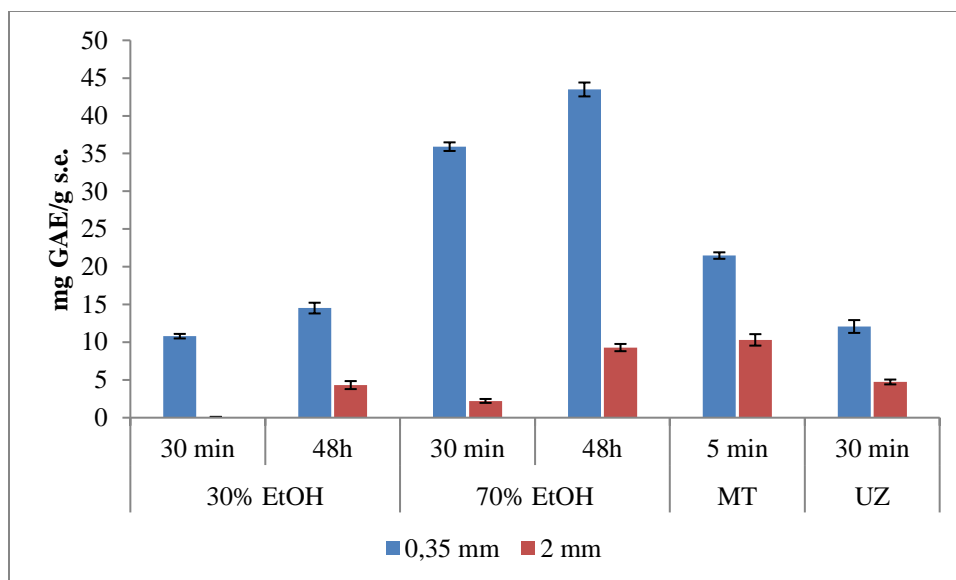
Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima kore i lista ispitivanih vrsta vrba, dobijenim različitim tehnikama ekstrakcije, prikazani su na Grafikonima 16 i 17.

U ekstraktima kore količina ukupnih fenola kretala se u opsegu od 4,97– 103,27 mg GAE/g s.e. Najveći sadržaj ukupnih fenolnih komponenti dobijen je u 30% etanolnom ekstraktu kore *S. purpurea* nakon 48h maceracije. Među ekstraktima kore svih ispitivanih vrsta vrba, izuzev *S. purpurea* i *S. triandra*, najveća količina ukupnih fenola dobijena je 48-časovnom maceracijom 70% etanolom, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima da sa povećanjem vremena ekstrakcije i koncentracije etanola, raste i prinos ukupnih fenolnih jedinjenja [10]. U poređenju sa sadržajem ukupnih fenola u kori *S. alba* iz ispitivanja gde je ekstrakcija vršena 70% metanolom [129] i 80% metanolom [132],

dobijene vrednosti u ekstraktima kore u ovom radu su znatno niže, što potvrđuje da su polarniji rastvarači pogodniji za ekstrakciju fenolnih jedinjenja [133]. Uzimajući u obzir toksičnost metanola, etanol kao rastvarač ima prednost u odnosu na metanol jer je bezbedan za ljudsku upotrebu [134]. Količina ukupnih fenola u vrstama vrba ispitivanim u ovom radu je niža od sadržaja ukupnih fenola u vrsti *S. aegyptiaca* [55], što se može pripisati različitom postupku ekstrakcije, ali i genetskim faktorima i uslovima rasta različitih vrsta vrba.

U ekstraktima lista sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja bio je u rasponu od 0,49 – 87,06 mg GAE/g s.e. Ekstrakt lista vrste *S. triandra* dobijen 48-časovnom maceracijom 70% etanolom je najbogatiji ukupnim fenolnim komponentama. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u 70% etanolnom ekstraktu lista vrsta *S. alba*, *S. amplexicaulis*, *S. purpurea* i *S. triandra* je veći u odnosu na vrednost ukupnih fenola (27,5 mg GAE/g s.e.) dobijene istraživanjem u kome je ekstrakcija lista *S. alba* vršena 70% (v/v) acetonom uz magnetnu mešalicu [132], ukazujući na veću selektivnost 70% etanola za izolovanje fenola iz ovih vrsta vrba.

Uticaj stepena usitnjenosti droge na sadržaj ukupnih fenola u listu *S. amplexicaulis* prikazan je na grafikonu 18.

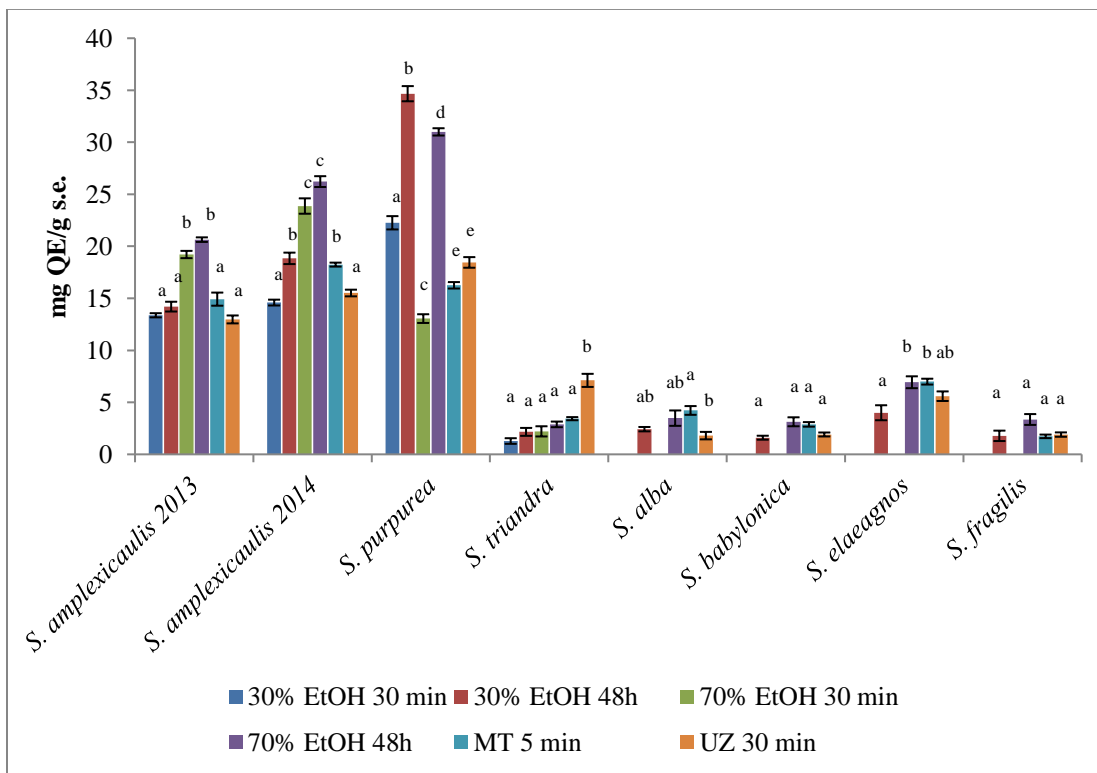


Grafikon 18. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima lista *S. amplexicaulis* (2014) sa dva stepena usitnjenosti

Rezultati pokazuju da se veći sadržaj fenolnih jedinjenja dobija što je droga većeg stepena usitnjenosti bez obzira na primenjenu tehniku ekstrakcije. Sadržaj ukupnih fenola u drogi stepena usitnjenosti 0,35 mm je veći 2-2,5 puta od sadržaja fenola u drogi stepena usitnjenosti 2 mm kada je ekstrakcija vršena mikrotalasnom i ultrazvučnom tehnikom, dok je razlika još izraženija kod maceracije etanolom gde je veći i 3 do čak 154 puta. Najveća razlika u količini ukupnih fenola se uočava kod ekstrakata dobijenih maceracijom 30% etanolom u toku 30 min. Rezultati pokazuju da se smanjenjem veličine čestica biljnog materijala, čime se povećava specifična površina i skraćuje razdaljina za prenos mase, može značajno poboljšati efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja, što je u skladu sa literaturom [127].

5.4. Rezultati ukupnih flavonoida

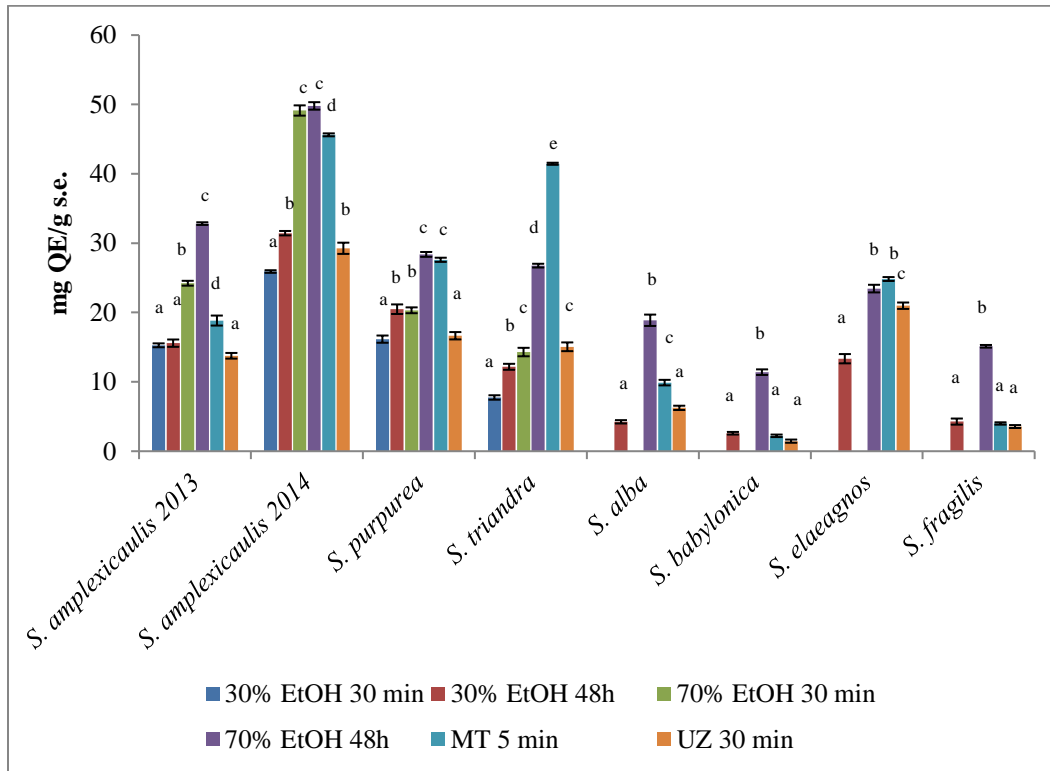
Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima kore i lista u ispitivanim vrstama roda *Salix*, dobijenim različitim tehnikama, prikazani su na Grafikonima 19 i 20.



Grafikon 19. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima kore različitih *Salix* vrsta [mg QE/g s.e.]

U ekstraktima kore količina ukupnih flavonoidnih komponenti bila je u rasponu od 1,28 – 34,67 mg QE/g s.e. (Grafikon 17). Ekstrakt kore vrste *S. purpurea* dobijen 48-časovnom maceracijom 30% etanolom je sadržao najveću količinu ukupnih flavonoida. Pored kore vrste *S. purpurea* značajna koncentracija ukupnih flavonoidnih jedinjenja nalazi se i u kori vrste *S. amplexicaulis*, dok u kori ostalih vrsta vrba količina flavonoida dostiže maksimalno oko 7 mg QE/g s.e.

U ekstraktima lista ispitivanih *Salix* vrsta koncentracija ukupnih flavonoida bila je nešto viša nego u kori i kretala se u intervalu od 1,45 - 49,79 mg QE/g s.e.(Grafikon 18).



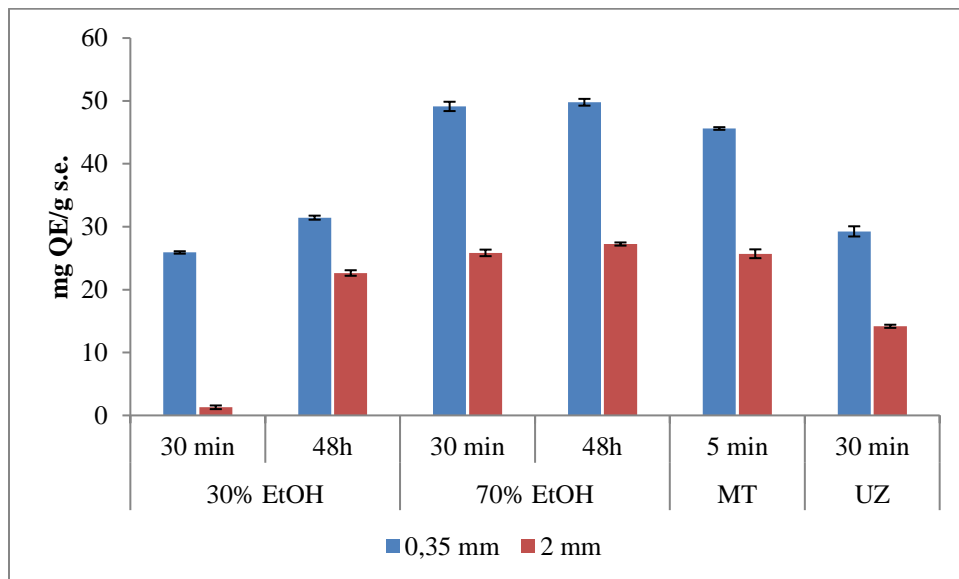
Grafikon 20. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima lista različitih *Salix* vrsta [mg QE/g s.e.]

Najbogatiji ukupnim flavonoidima je 70% etanolni ekstrakt lista vrste *S. amplexicaulis* (2014). Pored vrste *S. amplexicaulis* i ekstrakti lista *S. purpurea* i *S. triandra* se ističu visokim sadržajem flavonoidnih jedinjenja. U listu većine vrsta najveća količina ukupnih flavonoida ostvarena je maceracijom 70% etanolom, dok se mikrotalasna tehnika pokazala kao efikasnija za izolovanje flavonoidnih jedinjenja iz lista *S. triandra* i *S. eleagnos*.

Ako posmatramo ekstrakte dobijene klasičnim postupkom maceracije etanolom, uočava se da sa povećanjem koncentracije etanola od 30% do 70% raste i sadržaj ukupnih flavonoida. Izuzetak je kora *S. purpurea* gde se veći sadržaj ostvaruje ekstrakcijom 30% etanolom, ukazujući na veći udeo polarnih komponenti u dobijenom ekstraktu. Takođe, sa povećanjem dužine trajanja maceracije, raste i koncentracija ekstrahovanih flavonoidnih jedinjenja.

Količina ukupnih flavonoida u ekstraktima i kore i lista svih ispitivanih vrsta vrba u ovom radu veća je u odnosu na sadržaj flavonoida (1,13 mg QE/g ekstrakta) u kori *S. alba* koji je dobijen u istraživanju gde je ekstrakcija vršena 70% (v/v) metanolom [129].

Na grafikonu 21 prikazan je uticaj stepena usitnjenosti na sadržaj ukupnih flavonoida u listu *S. amplexicaulis* (2014).

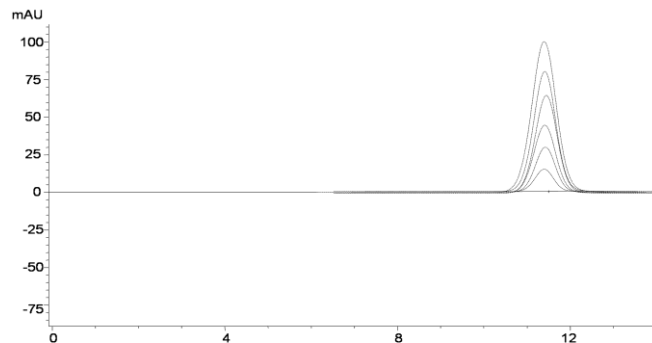


Grafikon 21. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima lista *S. amplexicaulis* (2014) sa dva stepena usitnjenosti

Koncentracija ukupnih flavonoidnih jedinjenja je značajno veća što je biljna droga usitnjenija, nezavisno od tehnike ekstrakcije. Razlika je najizraženija pri maceraciji 30% etanolom u trajanju od 30 min, gde je sadržaj ukupnih flavonoida 20 puta veći u drogi većeg stepena usitnjenosti. Smanjenjem veličine čestica biljnog materijala pre ekstrakcije povećava se dodirna površina, što poboljšava prenos mase aktivnih principa iz biljne droge u rastvarač [131].

5.5. Validacija analitičke metode za određivanje sadržaja 5-CQA u ekstraktima vrbe

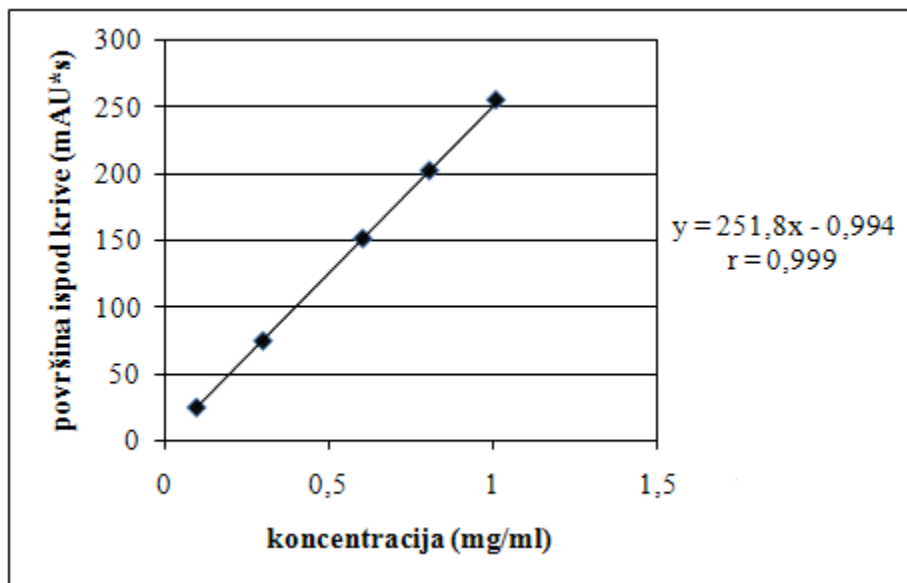
Procedure koje su korišćene za validaciju HPLC metode za određivanje 5-CQA u uzorcima kore i lista vrbe su opisane u literaturi [135-138]. Pri datim hromatografskim uslovima injektovani su i propuštani kroz kolonu radni standardni rastvori hlorogenske kiseline. Na osnovu dobijenih površina ispod krivih na hromatogramu (Slika 8) konstruisan je dijagram zavisnosti površine ispod krive (mAU*s) i koncentracije (mg/ml) hlorogenske kiseline i data regresiona jednačina (Tabela 6, Grafikon 22).



Slika 8. HPLC hromatogram različitih koncentracija standarda hlorogenske kiseline

Tabela 6. Retenciono vreme i površine različitih koncentracija hlorogenske kiseline pri HPLC-analizi

Redni broj standarda	Rt [min]	Površina ispod krive [mAU*s]	Koncentracija [mg/ml]
1	13,324	25,1911	0,101
2	13,428	74,8446	0,303
3	13,378	151,1112	0,606
4	13,511	201,6691	0,808
5	13,355	254,3282	1,010



Grafikon 22. Dijagram zavisnosti površina ispod signala od različitih koncentracija hlorogenske kiseline

Visoka vrednost koeficijenta $r=0,999$ pokazuje da postoji dobra korelacija između koncentracije hlorogenske kiseline i površina ispod krivih. Statističkom obradom podataka

dobijeni su i limit detekcije (LD=0,0026 mg/ml) i limit kvantifikacije (LQ=0,0087 mg/ml).

Poređenjem vrednosti koncentracija hlorogenske kiseline dobijene eksperimentalno sa teorijskom vrednošću dobijene su vrednosti za prinos, na osnovu kojih se može reći da razrađeni postupak određivanja hlorogenske kiseline u uzorcima vrbe ima dobru tačnost (Tabela 7).

Tabela 7. Rezultati tačnosti određivanja hlorogenske kiseline

Teorijske koncentracije hlorogenske kiseline (mg/ml)	Eksperimentalno određene koncentracije hlorogenske kiseline (mg/ml)	Prinos (%)
0,101	0,0991 ± 0,0009	98,12
0,303	0,2889 ± 0,0014	95,35
0,606	0,6001 ± 0,0016	99,03
0,808	0,8151 ± 0,0022	100,88
1,010	0,9655 ± 0,0009	95,59
Prinos ± 2SD (%)		97,79 ± 4,68

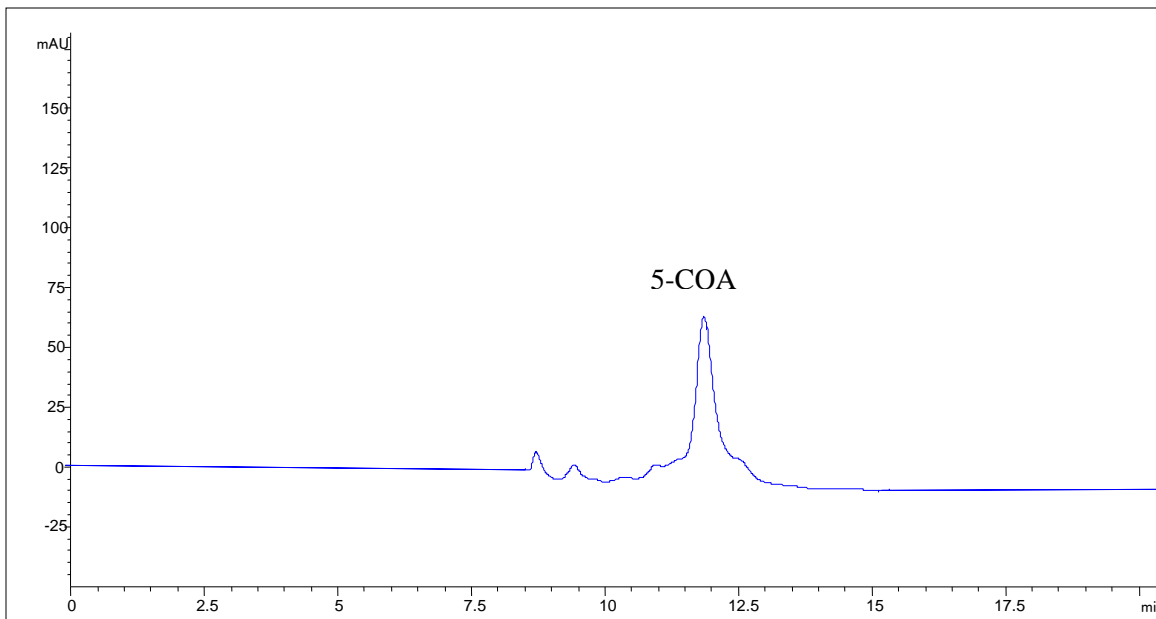
Preciznost – ponovljivost metode je ispitana analizom tri različite koncentracije u šest ponavljanja (Tabela 8).

Tabela 8. Rezultati preciznosti-ponovljivosti određivanja hlorigenske kiseline

Teorijske koncentracije (mg/ml)	Retenciono vreme (min)	Površina ispod pika (mAu*s)
0,101	13,323 ± 0,009	25,222 ± 0,154
0,606	13,382 ± 0,006	151,188 ± 0,228
1,01	13,359 ± 0,004	254,389 ± 0,435
RSD (%)	0,029-0,067	0,15-0,61

Vrednosti relativnih standardnih devijacija (RSD) za površine ispod signala i retenciona vremena ($\leq 1,2\%$) pokazuju da metoda ima zadovoljavajuću ponovljivost.

Poređenjem hromatograma standarda hlorigenske kiseline i hromatograma uzoraka vrbe i proverom spektara dobijenih signala, ustanovljeno je da nema drugih signala čija retenciona vremena odgovaraju retencionom vremenu standarda hlorigenske kiseline, što navodi na zaključak da je metoda selektivna/specifična (Slika 9). Ispitivanjem uticaja neznatno promenjenih uslova hromatografije, kao što su različite temperature kolone ($\pm 1^\circ\text{C}$), protok ($\pm 0,05$ ml/min) i talasna dužina detekcije (± 3 nm), potvrđena je postojanost metode.



Slika 9. HPLC hromatogram ultrazvučnog ekstrakta lista *S. triandra*

5.5.1. Ispitivanje sadržaja 5-CQA u ekstraktima lista i kore

Sadržaj 5-CQA određen primenom validovane metode u odabranim ekstraktima kore i lista vrba prikazan je u Tabeli 9.

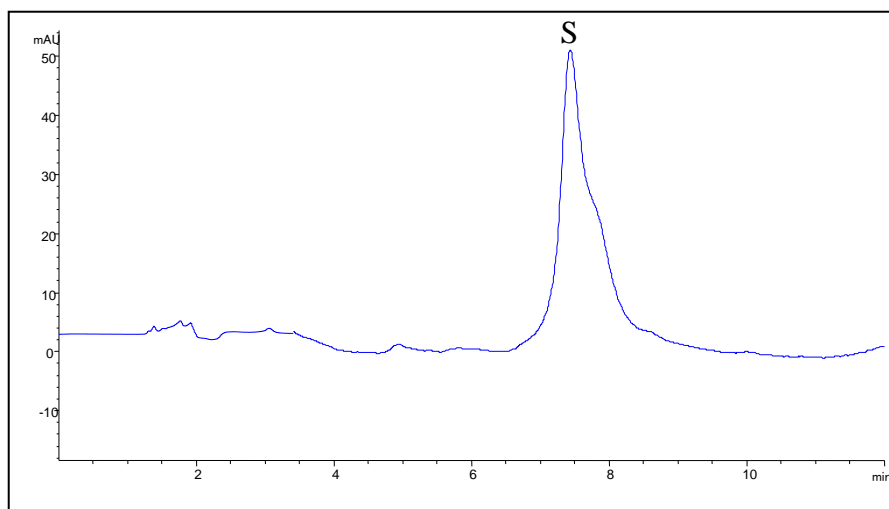
Tabela 9. Sadržaj hlorogenske kiseline u ekstraktima kore i lista vrba

Ekstrakt	5-CQA [g/100 g droge]
<i>S. eleagnos</i> kora (UZ)	4,72 ± 0.20 ^d
<i>S. eleagnos</i> list (UZ)	2,41 ± 0.25 ^c
<i>S. fragilis</i> kora (MT)	1,15 ± 0.03 ^b
<i>S. fragilis</i> list (UZ)	1,03 ± 0.03 ^b
<i>S. triandra</i> kora (MT)	0,61 ± 0.01 ^a
<i>S. triandra</i> list (UZ)	8,89 ± 0.34 ^e

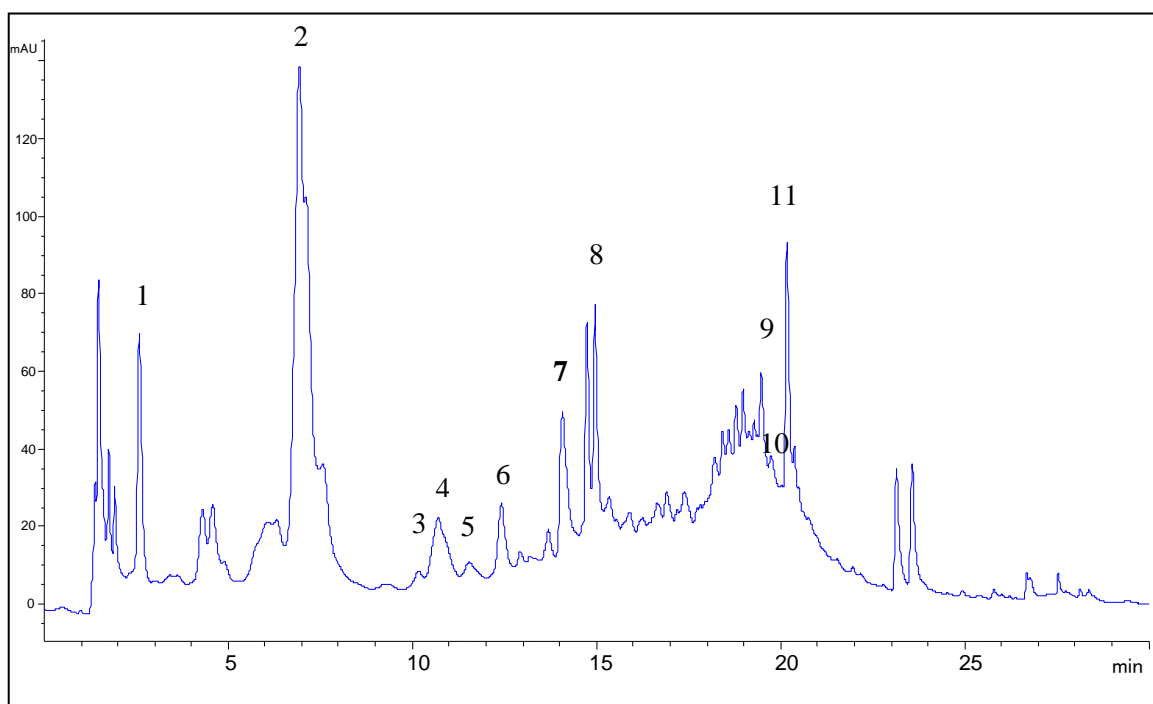
Rezultati prikazani u Tabeli 9 pokazuju značajnu varijabilnost sadržaja hlorogenske kiseline u ispitivanim ekstraktima u zavisnosti od vrste vrbe, kao i biljne droge unutar iste vrste. Najveća količina 5-CQA određena je u ultrazvučnom ekstraktu lista vrste *S. triandra*, dok je najmanja u mikrotalasnom ekstraktu kore iste vrste. *S. triandra* je ujedno i vrsta vrbe u kojoj je najizraženija razlika u sadržaju hlorogenske kiseline između ekstrakata kore i lista, pri čemu je količina 5-CQA u kori 14,5 puta veća u listu nego u kori. Koncentracija 5-CQA je približno jednaka u ekstraktima kore i lista *S. fragilis*, dok je kod vrste *S. eleagnos* ona oko 2 puta viša u ekstraktu kore nego u listu.

5.6. Hemijska karakterizacija visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom (HPLC)

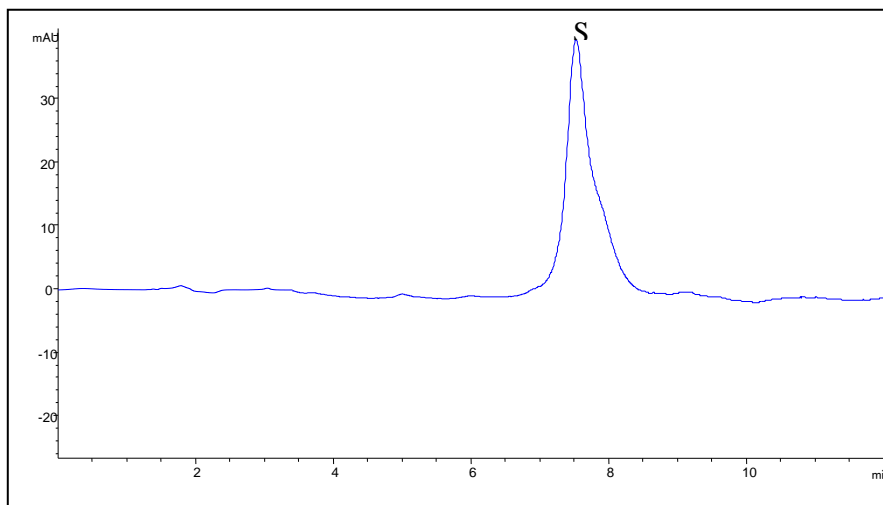
Hemijski sastav ekstrakata kore i lista ispitivanih vrsta roda *Salix*, dobijenih različitim postupcima ekstrakcije, određen je HPLC analizom. Prisutne komponente bile su salicilni glikozid – salicin, fenolne kiseline - galna, hlorogenska, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, kafena, *p*-kumarinska i trans-cimetna kiselina, kao i flavonoidna jedinjenja - epikatehin, rutin, kvercetin i naringenin. Na Slikama 10-13 prikazani su reprezentativni hromatogrami ekstrakata lista i kore vrbe.



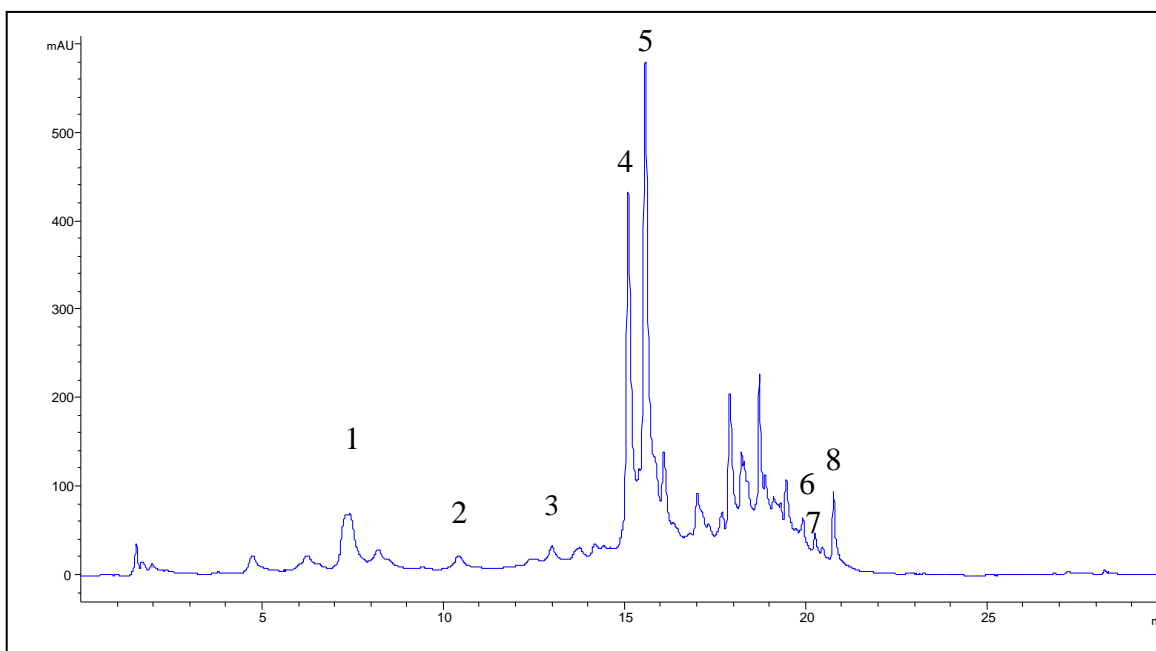
Slika 10. Hromatogram ultrazvučnog ekstrakta lista *S. amplexicaulis* (2014): S – salicin.



Slika 11. Hromatogram ultrazvučnog ekstrakta lista *S. fragilis*: 1 – galna kiselina; 2 – hlorogenska kiselina; 3 – vanilinska kiselina; 4 – siringinska kiselina; 5 – kafena kiselina; 6 – epikatehin; 7 – *p*-kumarinska kiselina; 8 – rutin; 9- kvercetin; 10 – trans-cimetna kiselina; 11 – naringenin



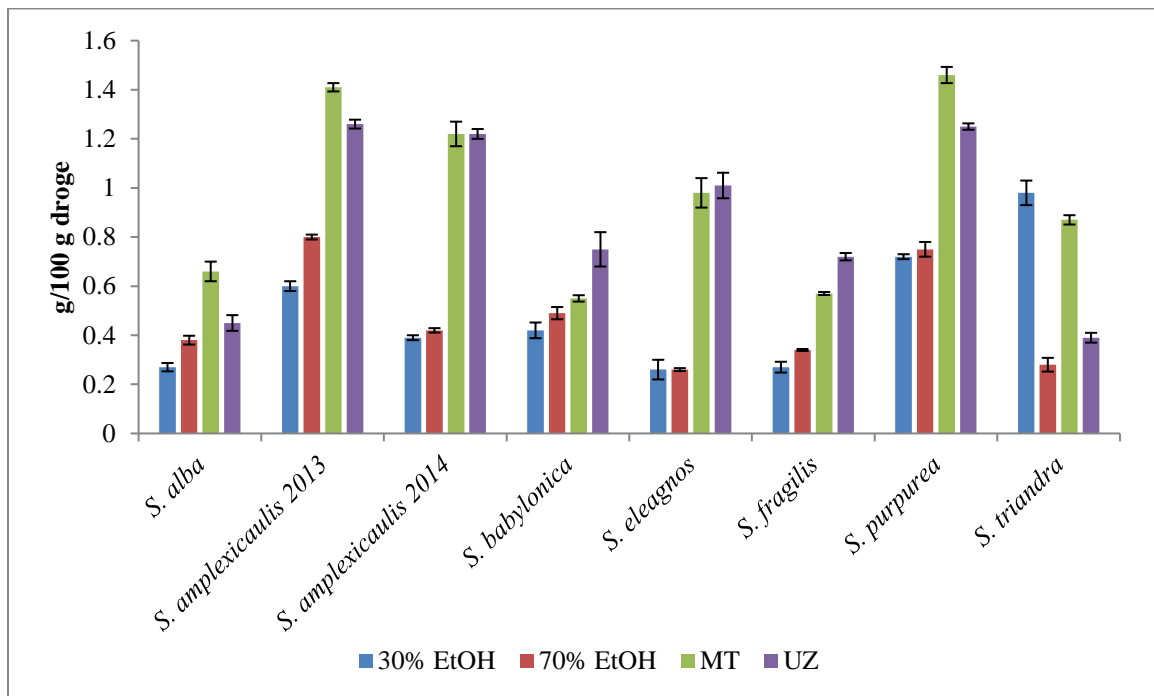
Slika 12. Hromatogram mikrotalasnog ekstrakta kore *S. purpurea*: S – salicin.



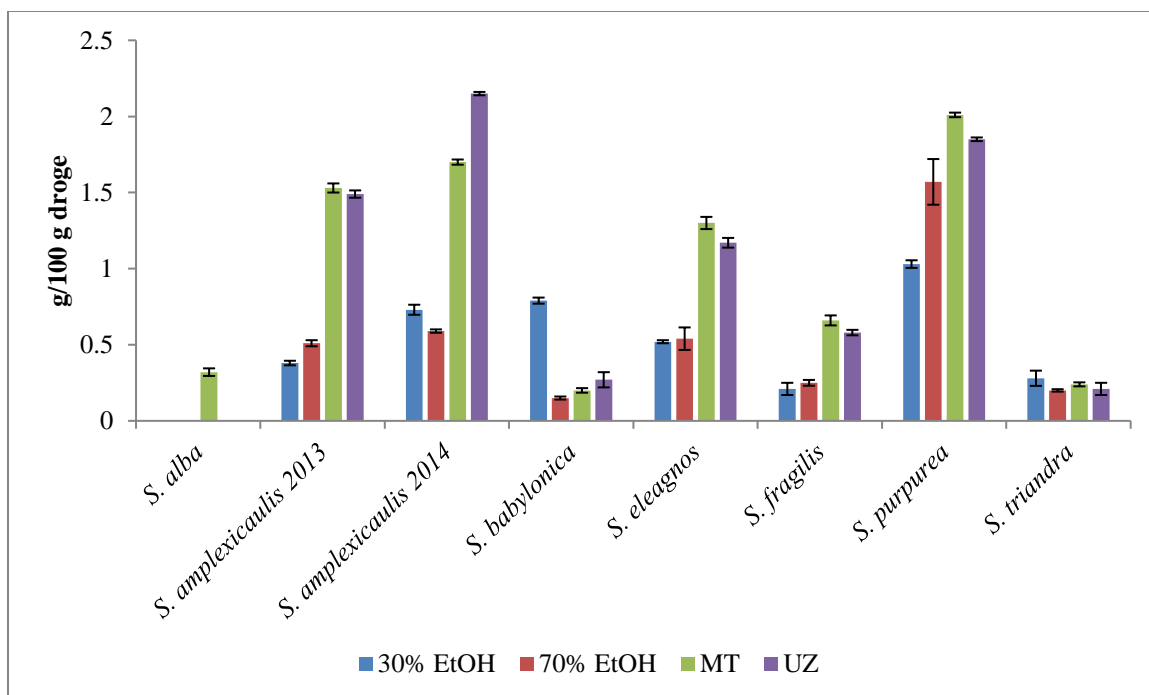
Slika 13. Hromatogram mikrotalasnog ekstrakta kore *S. purpurea*: 1 - hlorogenska kiselina; 2 - kafena kiselina; 3 - epikatehin; 4 - *p*-kumarinska kiselina; 5 – rutin; 6 – kvercetin; 7 – trans-cimetna kiselina; 8 – naringenin.

Aktivne komponente ekstrakata identifikovane su poređenjen njihovih retencionih vremena i UV spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda svake komponente. Kvantitativna analiza sadržaja identifikovanih supstanci vršena je metodom spoljašnjeg standarda.

5.6.1. Salicin



Grafikon 23. Sadržaj salicina u ekstraktima kore ispitivanih vrsta roda *Salix*



Grafikon 24. Sadržaj salicina u ekstraktima lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

Salicin i njegovi derivati su taksonomski markeri roda *Salix* [115]. Salicin je detektovan i u kori i u listu svih ispitivanih *Salix* vrsta, ali je primetna varijabilnost sadržaja između vrsta, unutar iste vrste u zavisnosti od dela biljke i primenjene tehnike ekstrakcije. Koncentracije salicina u ekstraktima kore i lista ispitivanih vrsta vrba dobijene različitim tehnikama ekstrakcije prikazane su na Grafikonima 23 i 24. U ekstraktima kore sadržaj salicina kretao se u opsegu od 0,26 – 1,46 g/100 g suve droge, dok je u listu bio u rasponu od 0,15 – 2,15 g/100 g suve droge. Najveća količina salicina detektovana je u ekstraktu lista vrste *S. amplexicaulis* (2014) dobijenom ultrazvučnom tehnikom, a visok sadržaj pomenute komponente u listu date vrste ostvaren je i mikrotalasnom ekstrakcijom. Ove vrednosti su bliske rezultatima ranije publikovanog istraživanja u kome je sadržaj salicina u listu vrste *S. amplexicaulis* muškog pola iznosio 1,72% [115]. Visokom koncentracijom salicina ističu se i ekstrakti lista vrste *S. purpurea*

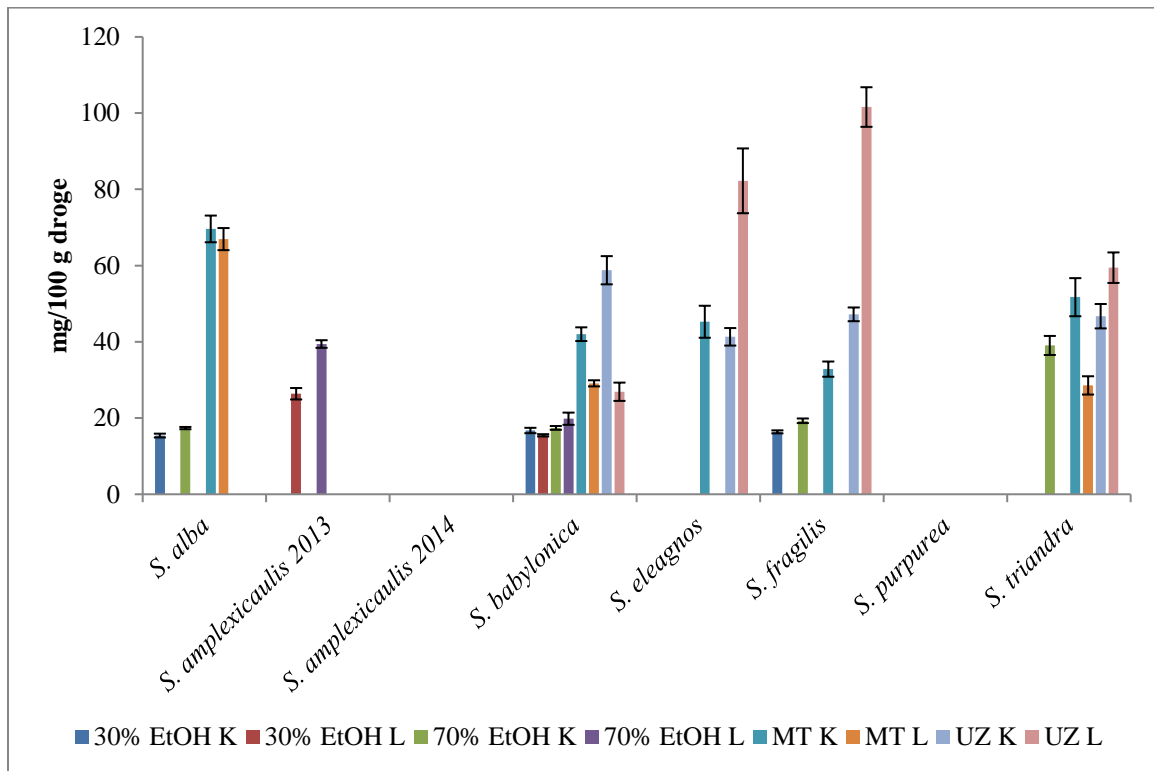
pripremljeni mikrotalasnom i ultrazvučnom tehnikom, a značajna količina je prisutna i u 70% etanolnom ekstraktu. Rezultati dobijeni za pomenute ekstrakte su viši u odnosu na ranije publikovan sadržaj salicina u lišću *S. purpurea* iz Centralne Evrope (0,1 – 1,6%) [139]. S druge strane, dobijene vrednosti su slične ili nešto niže u odnosu na ranije ispitivanje gde se sadržaj salicina u listu *S. purpurea* kretao od 2 - 4%, dok su rezultati kvantifikacije salicina u kori ove vrste u saglasnosti sa ranijim studijama [140]. Sadržaj salicina u listu ostalih ispitivanih vrsta opada redosledom *S. amplexicaulis* (2013) > *S. eleagnos* > *S. babylonica* > *S. fragilis* > *S. alba* > *S. triandra*. U listu vrste *S. alba* salicin je prisutan samo u mikrotalasnom ekstraktu, dok u etanolnim i ultrazvučnom ekstraktu nije detektovan. Njegova količina je viša u odnosu na istraživanje gde je list *S. alba* ekstrahovan acetonom [141], ukazujući na prednost mikrotalasne tehnike. Nizak sadržaj salicina je određen u kori iste vrste, a mikrotalasna tehnika se i u ovom slučaju pokazala kao najefikasnija. Količina salicina u ekstraktu kore *S. alba* je u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja u kojima uzorci kore ove vrste sadrže od 0,1-1% (w/w) [142] i od 0,57-0,66% salicina [143]. Međutim, koncentracije salicina u ekstraktima kore *S. alba* niže su u odnosu na drugo ispitivanje u kome je sadržaj salicina u kori ove vrste bio u rasponu od 1,29 – 1,87% [144]. Kada posmatramo koncentraciju salicina u kori ispitivanih *Salix* vrsta, ona je najviša u mikrotalasnom ekstraktu *S. purpurea* i *S. amplexicaulis* (2013), a zatim u ultrazvučnim ekstraktima ovih vrsta. Količina salicina u kori *S. amplexicaulis* niža je u odnosu na ranije istraživanje u kome je sadržaj salicina bio 1,75% i 2,05% (ekstrakcija vršena metanolom) [115], a viša u odnosu na ispitivanje u kome je koncentracija ove fenolne kiseline bila 0,66% u kori iste vrste, pri čemu je i u ovom slučaju kao ekstragens korišćen metanol [145]. Mikrotalasna i ultrazvučna

ekstrakcija bile su najpogodnije tehnike za izolovanje salicina iz kore i lista većine ispitivanih vrsta roda *Salix*, sa izuzetkom lista *S. babylonica* i kore i lista *S. triandra* gde je maceracija 30% etanolom omogućila izdvajanje najveće količine salicina. Koncentracija salicina u kori *S. triandra* bliska je vrednostima (0,66-0,86%) dobijenim u ispitivanju sprovedenom u Poljskoj [146], a viša je u odnosu na istraživanje gde je sadržaj salicina u kori ove vrste bio < 0,1% [140]. Rezultati kvantifikacije salicina u ekstraktima lista su u suprotnosti sa ranijom studijom gde salicin nije bio prisutan u listu *S. triandra* [140]. Međutim, dobijeni sadržaj salicina u ekstraktima lista *S. triandra* viši je u odnosu na drugo istraživanje u kome je koncentracija salicina bila 0,07% i 0,089% u listu ove vrste [115]. Rezultati dobijeni za ekstrakte kore i lista *S. fragilis* odgovaraju ranije publikovanim, gde se sadržaj salicina u kori i listu ove vrste kretao od 0,1-1% [140].

Evropska farmakopeja propisuje da se kao droga koristi kora mladih grana ili izdanci vrsta roda *Salix*, uključujući *S. purpurea* L., *S. daphnoides* Vill. i *S. fragilis* L. Droga treba da sadrži najmanje 1,5% salicilnih derivata izraženih preko salicina [34]. Rezultati su pokazali da nijedan od dobijenih ekstrakata kore ispitivanih *Salix* vrsta ne zadovoljava ovaj kriterijum. Koncentracija salicina u mikrotalasnom ekstraktu kore vrste *S. purpurea* je blizu granične vrednosti, ali je ipak ne prelazi, dok je u ekstraktima kore *S. fragilis* dva do pet puta manja od potrebne. Pored vrste vrbe, na sadržaj sekundarnih metabolita utiču brojni faktori kao što su pol biljke, njena starost, klimatski uslovi i doba dana kada je sakupljena [5]. Poznato je da količina fenolnih jedinjenja u biljnim tkivima može da varira u zavisnosti od doba dana, tako da su vrednosti više rano ujutru, a da opadaju u toku dana. Uočeno je da se koncentracija fenola u vrsti *S. fragilis* u toku dana smanjuje za 20%, a u vrsti *S. purpurea* za čak 40%. Takođe, sa starošću biljke dolazi do

promene u stvaranju fenolnih jedinjenja, pa se tako kod *S. purpurea* smanjuje ukupna koncentracija fenolnih komponenti što je starija [140]. Nasuprot kori, mikrotalasni ekstrakti lista vrste *S. amplexicaulis* (2013 i 2014), ultrazvučni ekstrakti lista *S. amplexicaulis* (2014) i mikrotalasni, ultrazvučni i 70% etanolni ekstrakti lista *S. purpurea* ispunjavaju zahteve farmakopeje u pogledu sadržaja salicina. Dobijeni rezultati ukazuju na potencijal primene lista odgovarajućih *Salix* vrsta kao lekovite sirovine i izvora salicina.

5.6.2. Galna kiselina

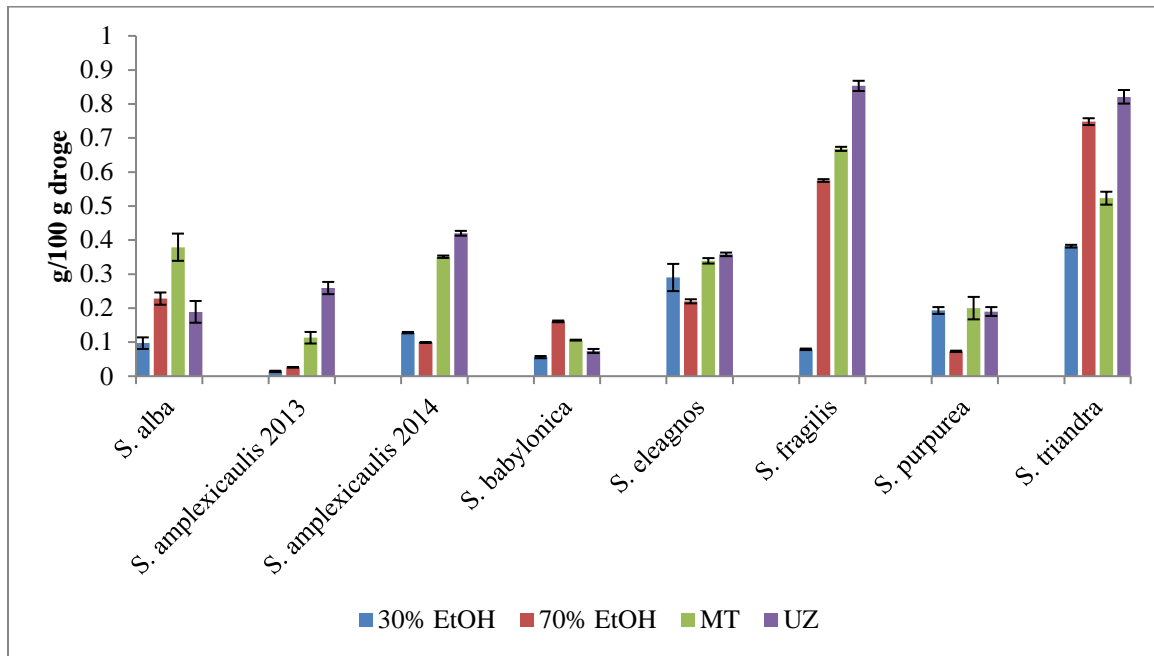


Grafikon 25. Sadržaj galne kiseline u ekstraktima kore i lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

Rezultati kvantitativnog određivanja galne kiseline u ekstraktima kore i lista ispitivanih *Salix* vrsta prikazani su na Grafikonu 25. Sadržaj galne kiseline u ekstraktima kore kretao se u rasponu 15,4 – 69,62 mg/100 g suve droge, dok je u ekstraktima lista bio u intervalu 15,46 – 101,6 mg/100 g droge. Najveća koncentracija galne kiseline je određena u ultrazvučnom ekstraktu lista *S. fragilis*. Ultrazvučna ekstrakcija je ujedno i jedina tehnika kojom je galna kiselina izolovana iz listova *S. fragilis*. S druge strane, ultrazvučnom tehnikom galna kiselina nije ekstrahovana iz kore i lista *S. alba*. U slučaju lista *S. alba*, pomenuta fenolna kiselina je određena samo u mikrotalasnom ekstraktu. Analogno listu *S. fragilis*, i kod lista *S. eleagnos* ultrazvučna tehnika je jedina omogućila ekstrakciju galne kiseline iz ove droge. Pored ultrazvučne, galna kiselina je ekstrahovana i mikrotalasnom tehnikom iz kore *S. eleagnos*, dok maceracijom etanolom različitih koncentracija ova fenolna kiselina nije izolovana ni iz kore ni iz lista pomenute vrste vrbe. U kori i listu vrsta *S. amplexicaulis* (2014) i *S. purpurea* galna kiselina nije detektovana, kao ni u kori *S. amplexicaulis* (2013). Kada je u pitanju list vrste *S. amplexicaulis* (2013), ova fenolna kiselina bila je prisutna u etanolnim ekstraktima, dok u mikrotalasnim i ultrazvučnim nije. Nasuprot tome, u listu vrste *S. triandra* galna kiselina je detektovana u mikrotalasnom i ultrazvučnom ekstraktu, dok u etanolnim nije. Iz kore *S. triandra* galna kiselina jedino nije ekstrahovana 30% etanolom. *S. babylonica* je jedina vrsta iz koje je ova fenolna kiselina izolovana pomoću svih primenjenih tehnika ekstrakcije, pri čemu je njena koncentracija veća u ekstraktima dobijenim nekonvencionalnim metodama u odnosu na ekstrakte dobijene maceracijom. U ekstraktima svih ispitivanih vrsta vrba u kojima je galna kiselina kvantifikovana, njen

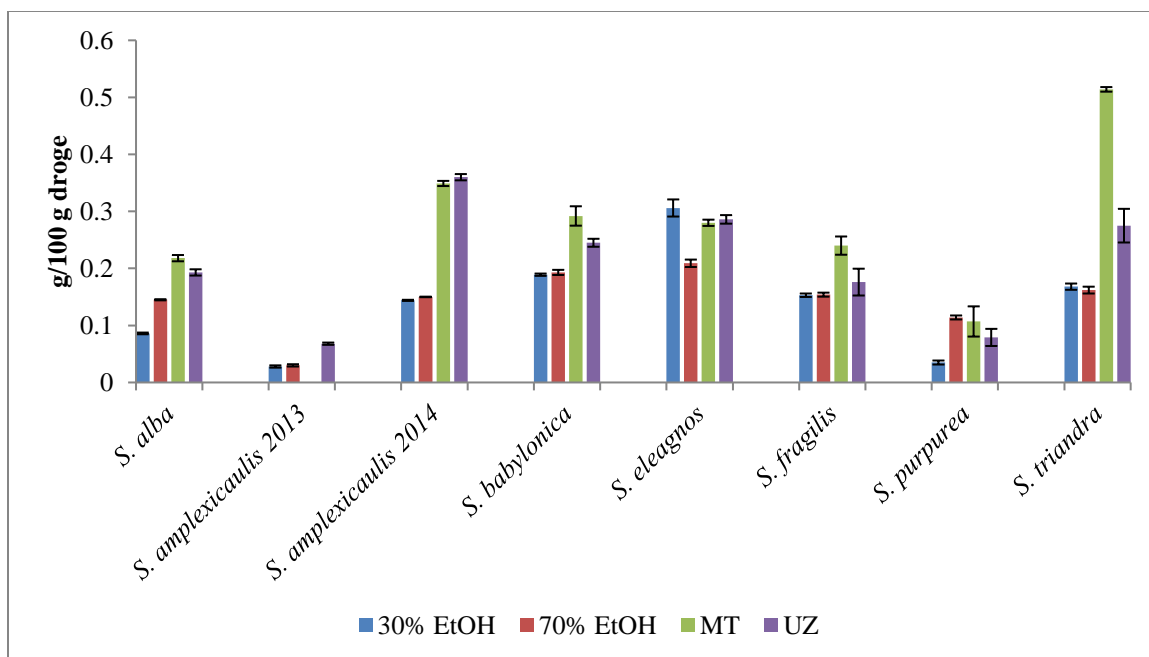
sadržaj je veći nego u kori (0,69 mg/g s.e.) i listu (0,04 mg/g s.e.) vrste *S. aegyptiaca* [55].

5.6.3. Hlorogenska kiselina



Grafikon 26. Sadržaj hlorogenske kiseline u ekstraktima kore i ispitivanih vrsta roda

Salix



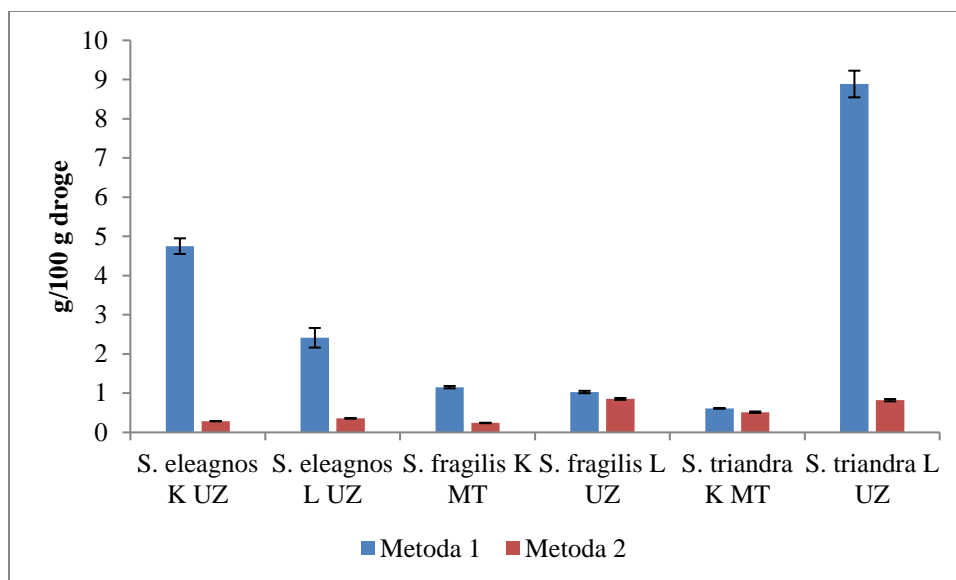
Grafikon 27. Sadržaj hlorogenske kiseline u ekstraktima lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

Rezultati kvantifikacije hlorogenske kiseline u ekstraktima kore i lista ispitivanih vrba, dobijenim različitim postupcima ekstrakcije prikazani su na Grafikonima 26 i 27. Može se uočiti da količina hlorogenske kiseline varira u zavisnosti od primenjene tehnike ekstrakcije, analiziranog dela biljke, kao i vrste vrbe. Sadržaj hlorogenske kiseline u kori ispitivanih *Salix* vrsta kretao se u intervalu od 0,028 – 0,514 g/100 g suve droge, dok je u listu bio u rasponu od 0,014 - 0,853 g/100 g suve droge. Najveća koncentracija hlorogenske kiseline u kori nalazi se u mikrotalasnom ekstraktu vrste *S. triandra*, dok se među uzorcima lista u ultrazvučnom ekstraktu vrste *S. fragilis*. Savremene tehnike ekstrakcije, bilo mikrotalasna bilo ultrazvučna, pokazale su se kao najefikasnije za izolovanje najveće količine hlorogenske kiseline iz gotovo svih ispitivanih vrsta vrba. Izuzetak su kora *S. eleagnos* gde je maceracija 30% etanolom dala najbolji prinos ove

fenolne kiseline, kao i list *S. babylonica* i kora *S. purpurea* gde je to bila ekstrakcija 70% etanolom. Veći sadržaj hlorogenske kiseline u kori nego u listu dobijen je u vrstama *S. babylonica*, *S. purpurea* (osim 70% etanolnog ekstrakta), etanolnim ekstraktima *S. amplexicaulis* (2013 i 2014) i 30% etanolnim ekstraktima vrsta *S. eleagnos* i *S. fragilis*. Viša koncentracija hlorogenske kiseline u listu u odnosu na koru utvrđena je u vrstama *S. alba*, *S. triandra*, mikrotalasnim i ultrazvučnim ekstraktima *S. amplexicaulis* (2013 i 2014) i preostalim ekstraktima vrsta *S. eleagnos* i *S. fragilis*.

Dobijena vrednost za sadržaj hlorogenske kiseline u ultrazvučnom ekstraktu lista *S. fragilis* u saglasnosti je sa koncentracijom ove fenolne kiseline u listu pomenute vrste iz Finske, dok u istom istraživanju hlorogenska kiselina nije detektovana u listovima vrsta *S. purpurea* i *S. triandra* [147]. Sadržaj hlorogenske kiseline u ekstraktima lista *S. triandra*, *S. fragilis*, mikrotalasnim i ultrazvučnim ekstraktima *S. eleagnos* i *S. amplexicaulis* (2014), kao i mikrotalasnom ekstraktu *S. alba* nalazi se u opsegu koncentracija hlorogenske kiseline u listovima vrste *S. myrsinifolia* [148].

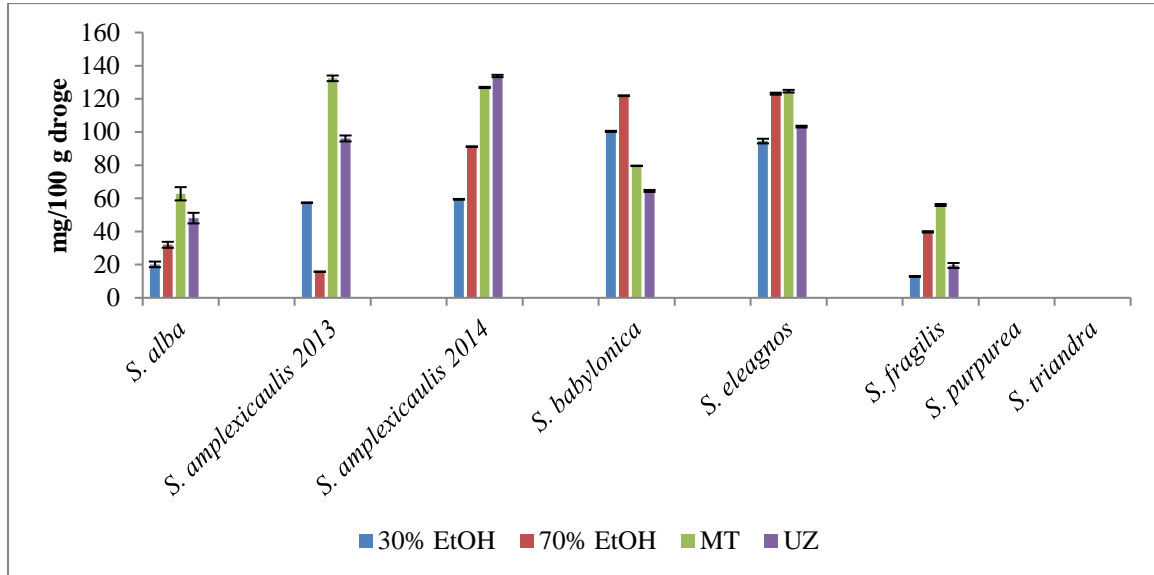
Na Grafikonu 28 dat je uporedni prikaz sadržaja hlorogenske kiseline u odabranim ekstraktima kore i lista vrba dobijen validovanom metodom za određivanje 5-CQA (Metoda 1) i metodom za određivanje fenolnih jedinjenja (Metoda 2).



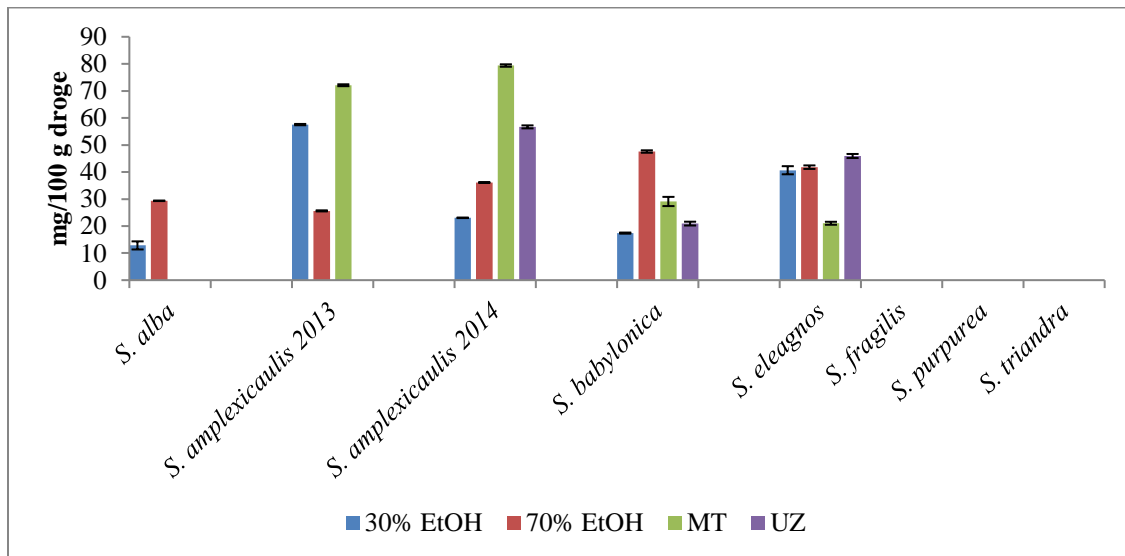
Grafikon 28. Uporedni prikaz sadržaja hlorogenske kiseline u ekstraktima vrba određen pomoću dve različite metode

Rezultati prikazani na Grafikonu 28 pokazuju da je značajno veći sadržaj hlorogenske kiseline u svim analiziranim ekstraktima vrba dobijen validovanom metodom za određivanje 5-CQA u odnosu na metodu gde je hlorogenska kiselina određena zajedno sa drugim fenolnim jedinjenjima, što potvrđuje veću selektivnost validovane metode za datu komponentu. Razlike u koncentracijama hlorogenske kiseline dobijenim primenom dve metode su najizraženije kod ekstrakata lista *S. triandra* i kore *S. eleagnos*, gde je sadržaj 10 i 16,5 puta viši kada je korišćena validovana metoda.

5.6.4. *p*-hidroksibenzojeva kiselina



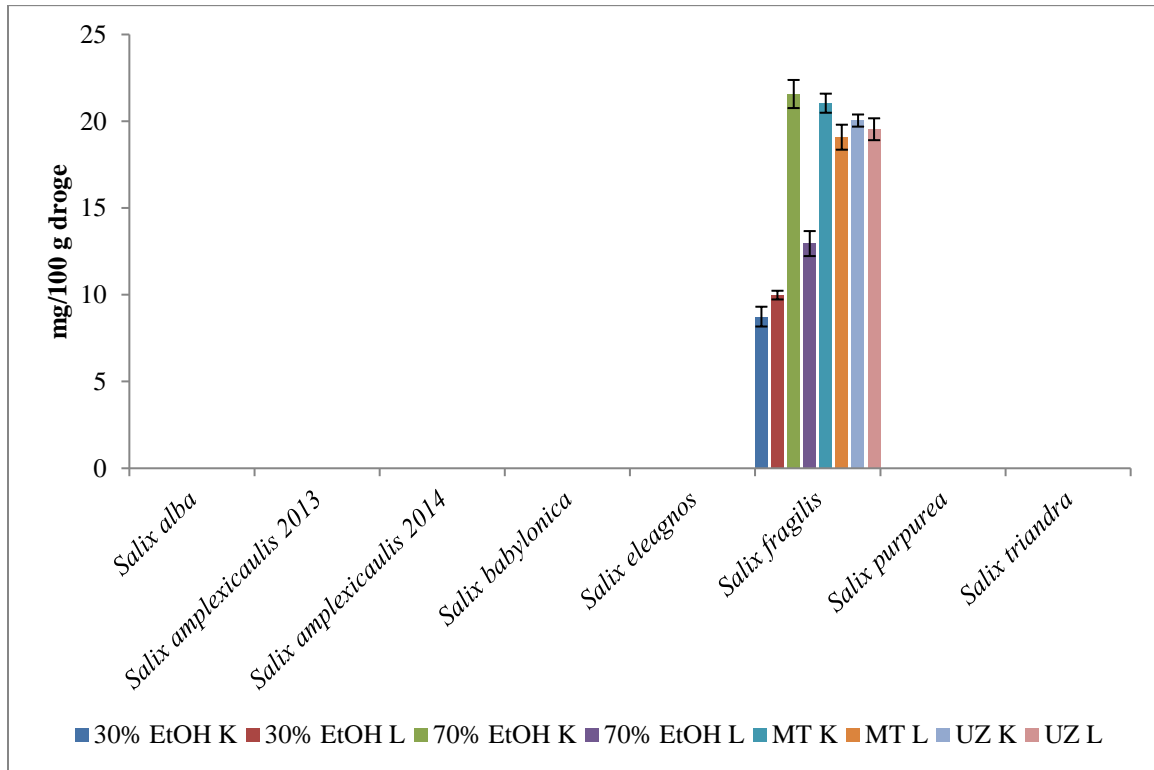
Grafikon 29. Sadržaj *p*-hidroksibenzojeve kiseline u ekstraktima kore ispitivanih vrsta roda *Salix*



Grafikon 30. Sadržaj *p*-hidroksibenzojeve kiseline u ekstraktima lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

Rezultati kvantifikacije *p*-hidroksibenzojeve kiseline u ispitivanim vrstama roda *Salix* prikazani su na Grafikonima 29 i 30. Koncentracije ove fenolne kiseline u kori vrba bile su u opsegu 12,87 – 133,76 mg/100 g droge, dok su se u listu kretale od 12,85 – 79,38 mg/100 g droge. Najviši sadržaj date fenolne kiseline u kori je određen u ultrazvučnom ekstraktu *S. amplexicaulis* (2014), a u listu u mikrotalasnom ekstraktu iste vrste. U vrstama *S. purpurea* i *S. triandra* *p*-hidroksibenzojeva kiselina nije detektovana ni u kori ni u listu, a nije prisutna ni u listu *S. fragilis*. U slučaju kore vrsta *S. alba*, *S. amplexicaulis* (2013), *S. eleagnos* i *S. fragilis* mikrotalasna tehnika se pokazala kao najefikasnija za izolovanje *p*-hidroksibenzojeve kiseline, dok je kod kore *S. babylonica* maceracija etanolom različitih koncentracija imala prednost u odnosu na nekonvencionalne tehnike ekstrakcije. Kada je u pitanju list, mikrotalasna tehnika je dala najveći prinos *p*-hidroksibenzojeve kiseline kod vrste *S. amplexicaulis* (2013), ultrazvučna kod *S. eleagnos*, dok je maceracija 70% etanolom bila najpogodnija kod vrsta *S. alba* i *S. babylonica*. Iz lista *S. alba* *p*-hidroksibenzojeva kiselina nije izolovana mikrotalasnom i ultrazvučnom tehnikom ekstrakcije. Na osnovu ranijih istraživanja je poznato da se *p*-hidroksibenzojeva kiselina javlja u drvetu vrsta *S. nigra*, *S. babylonica* i *S. eriocephala*, a njeno prisustvo je potvrđeno i u kori više vrsta roda *Salix* [31]. U literaturi nisu pronađeni podaci o sadržaju ove fenolne kiseline u listovima *Salix* vrsta.

5.6.5. Vanilinska kiselina

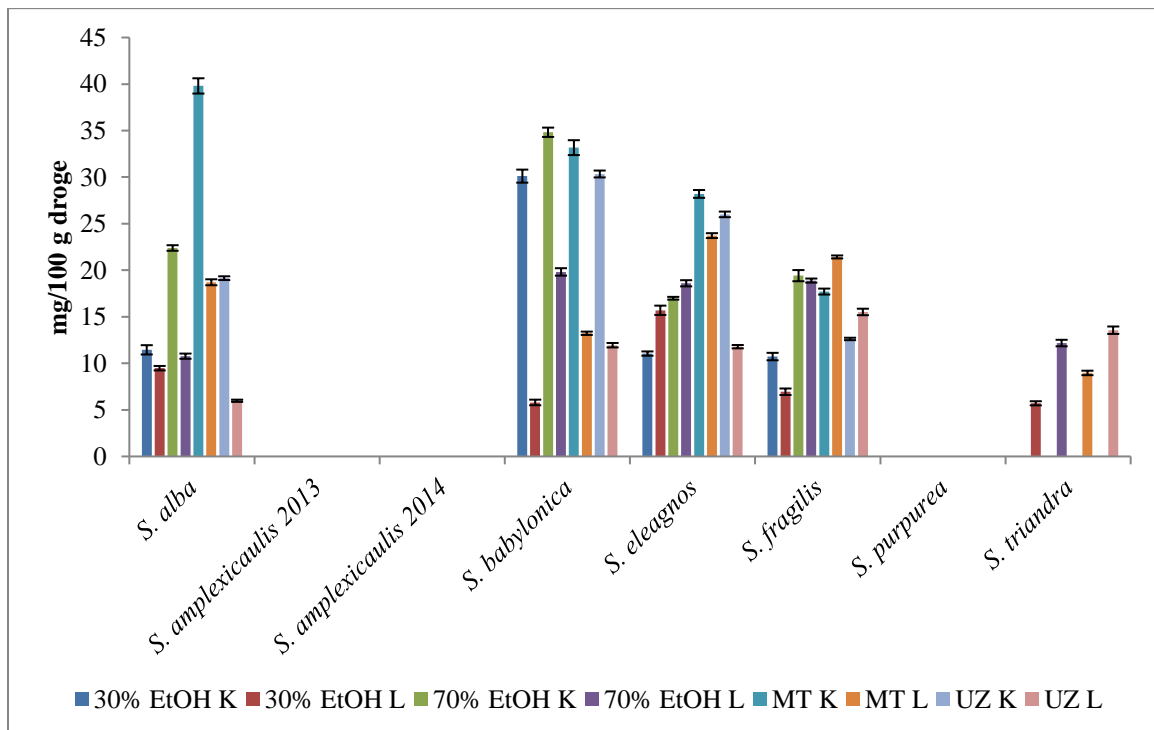


Grafikon 31. Sadržaj vanilinske kiseline u ekstraktima kore i lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

Vanilinska kiselina je detektovana u ekstraktima kore i lista vrste *S. fragilis*, dok u ostalim ispitivanim vrstama vrba nije bila prisutna. Rezultati kvantitativnog određivanja vanilinske kiseline prikazani su na grafikonu 31. Sadržaj ovog fenolnog jedinjenja u ekstraktima kore *S. fragilis* bio je u rasponu od 8,74 – 21, 57 mg/100 g droge, dok je u ekstraktima lista od 9,98 – 19,54 mg/100 g droge. Najveća koncentracija date komponente u kori dobijena je u 70% etanolnom ekstraktu, što je 2,5 puta više u odnosu na 30% etanolni ekstrakt. Mikrotalasnom ekstrakcijom kore izdvojena je količina vanilinske kiseline koja je nešto niža, ali bliska sadržaju u 70% etanolnom ekstraktu, za značajno kraće vreme. Najveći sadržaj date fenolne supstanceu listu ostvaren je u

ultrazvučnom ekstraktu, što je 1,5 i 2 puta više u odnosu na količinu u 70% i 30% etanolnom ekstraktu, redom. Količina vanilinske kiseline veća je u kori u odnosu na list, izuzev kod ekstrakata pripremljenih postupkom maceracije 30% etanolom. Sadržaj date komponente u etanolnim ekstraktima kore i lista približna je količini vanilinske kiseline u drvetu vrste *S. caprea* (0,1 mg/g suvog drveta) [149], dok je u ekstraktima dobijenim savremenim tehnikama ekstrakcije i do 2 puta viši. Vanilinska kiselina je detektovana i u drvetu vrsta *S. nigra*, *S. babylonica* i *S. eriocephala*, kao i u kori *S. daphnoides* i *S. sachalinensis* [31].

5.6.6. Siringinska kiselina



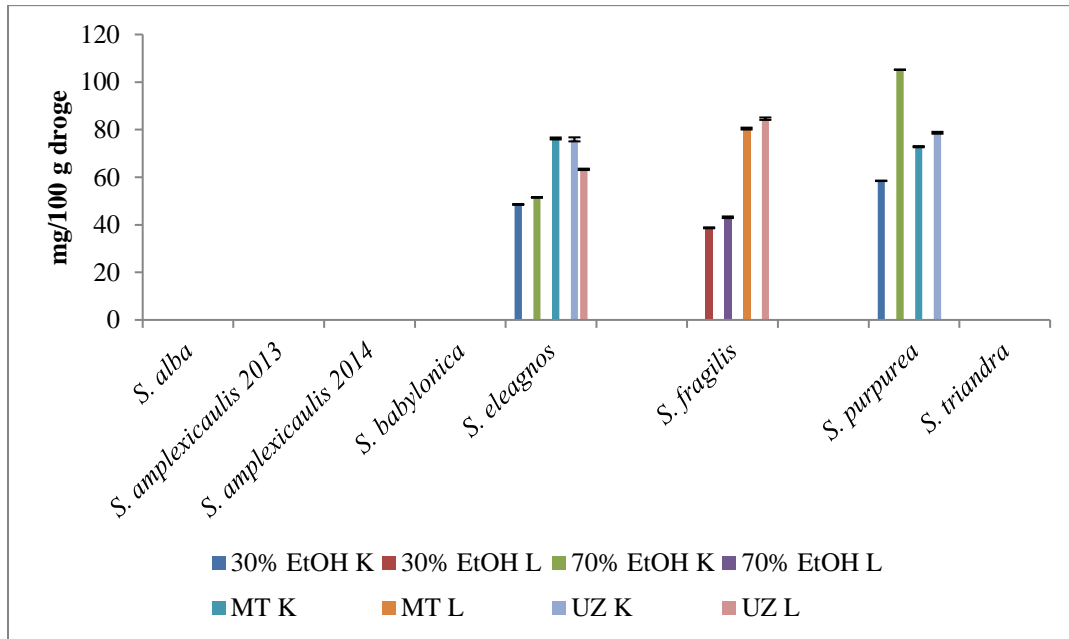
Grafikon 32. Sadržaj siringinske kiseline u ekstraktima kore i lista ispitivanih vrsta roda

Salix

Rezultati određivanja sadržaja siringinske kiseline u ekstraktima ispitivanih *Salix* vrsta dobijenih različitim tehnikama prikazani su na Grafikonu 32. Siringinska kiselina je detektovana u niskim koncentracijama u kori i listu vrsta *S. alba*, *S. babylonica*, *S. eleagnos*, *S. fragilis* i listu *S. triandra* i kretala se u rasponu od 10,73 – 39,80 mg/100 g droge i od 5,71 – 23,72 mg/100 g droge, u ekstraktima kore i lista redom. Najveća količina siringinske kiseline dobijena je mikrotalasnom ekstrakcijom kore *S. alba*. Među ekstraktima lista najveća koncentracija siringinske kiseline bila je prisutna u ekstraktu vrste *S. eleagnos* dobijenom mikrotalasnom tehnikom. Ova tehnika ekstrakcije se pokazala kao najefikasnija i u slučaju kore *S. eleagnos* i lista *S. fragilis*. Veća koncentracija siringinske kiseline u kori nego u listu detektovana je u vrstama *S. alba* i *S. babylonica* nezavisno od tehnike ekstrakcije. U vrstama *S. eleagnos* i *S. fragilis* tip ekstrakcije određuje u kojoj drogi je sadržaj siringinske kiseline dominantniji. U ekstraktima dobijenim maceracijom etanolom različitih koncentracija, količina siringinske kiseline je veća u listu u odnosu na koru *S. eleagnos*, dok je u mikrotalasnom i ultrazvučnom ekstraktu sadržaj veći u kori. Nasuprot tome, kod vrste *S. fragilis* veći sadržaj siringinske kiseline u kori dobijen je postupkom maceracije, a savremenim tehnikama u listu.

Iz kore i lista *S. amplexicaulis* (2013 i 2014), *S. purpurea* i kore *S. triandra* pomenuta fenolna kiselina nije izolovana. Siringinska kiselina je prisutna u drvetu vrsta *S. nigra*, *S. babylonica* i *S. eriocephala* [31].

5.6.7. Kafena kiselina

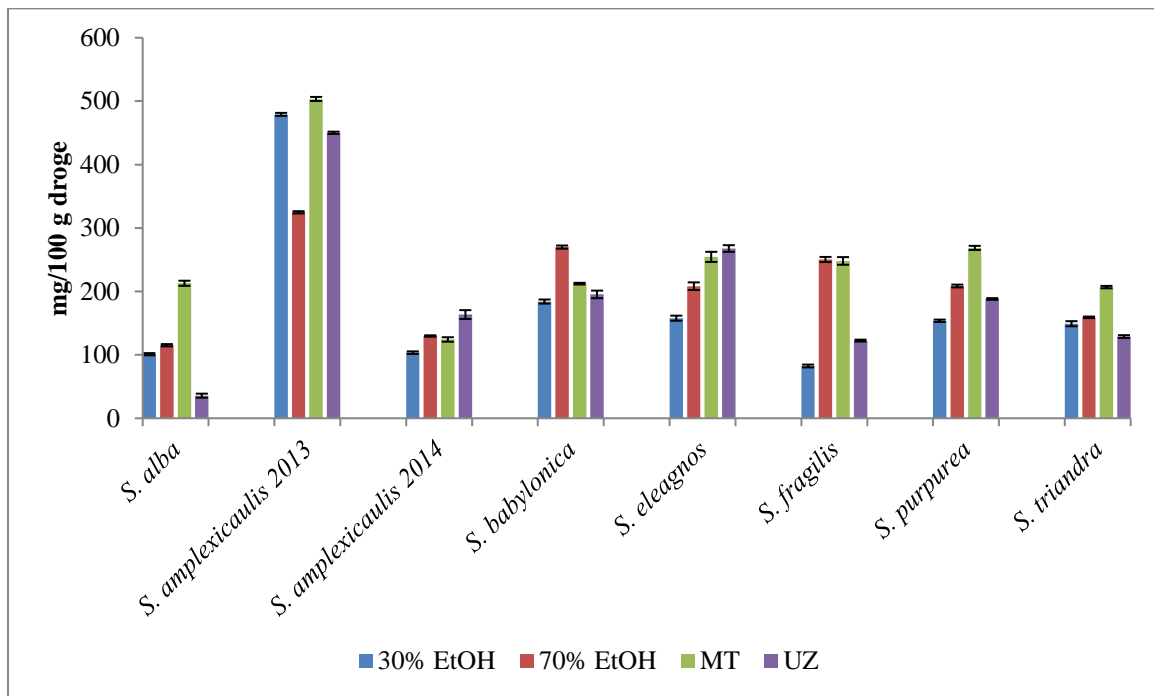


Grafikon 33. Sadržaj kafene kiselineu ekstraktima kore i lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

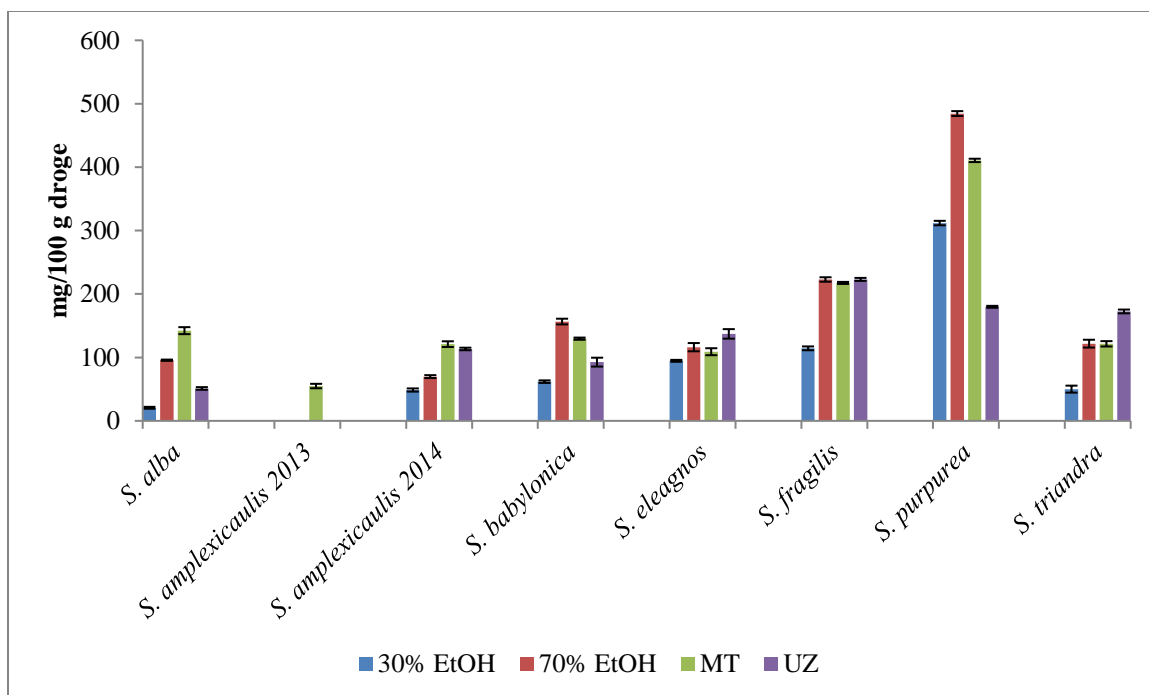
Rezultati kvantifikacije kafene kiseline u ekstraktima ispitivanih vrsta roda *Salix*, dobijenim različitim tehnikama prikazani su na Grafikonu 33. Kafena kiselina nije detektovana ni u kori ni u listu vrsta *S. alba*, *S. amplexicaulis* (2013 i 2014), *S. babylonica* i *S. triandra*, kao ni u kori *S. fragilis* ni u listu *S. purpurea*. Pomenuta fenolna kiselina nije izlovena ni iz lista *S. eleagnos* maceracijom etanolom različitih koncentracija, a ni mikrotalasnom tehnikom. Koncentracija kafene kiseline u ekstraktima kore u kojima je detektovana kretala se u intervalu od 48,54 – 105,19 mg/100 g droge. Najveći sadržaj kafene kiseline dobijen je u 70% etanolnom ekstraktu kore *S. purpurea*. U ekstraktima lista *S. fragilis* i kore *S. eleagnos* veća količina kafene kiseline dobijena je mikrotalasnom i ultrazvučnom tehnikom u odnosu na maceraciju etanolom. Koncentracije kafene kiseline u ekstraktima kore i lista određene u vrstama *S. eleagnos*,

S. fragilis i *S. purpurea* daleko su veće u odnosu na njen sadržaj u kori i listu *S. aegyptiaca* [55]. Nedostatak kafene kiseline u vrsti *S. babylonica* u suprotnosti je sa rezultatima ranijeg istraživanja u kome je ova fenolna kiselina kvantifikovana u listu pomenute vrste [150]. Prisustvo kafene kiseline potvrđeno je i u kori šest vrsta roda *Salix* [31].

5.6.8. Epikatehin



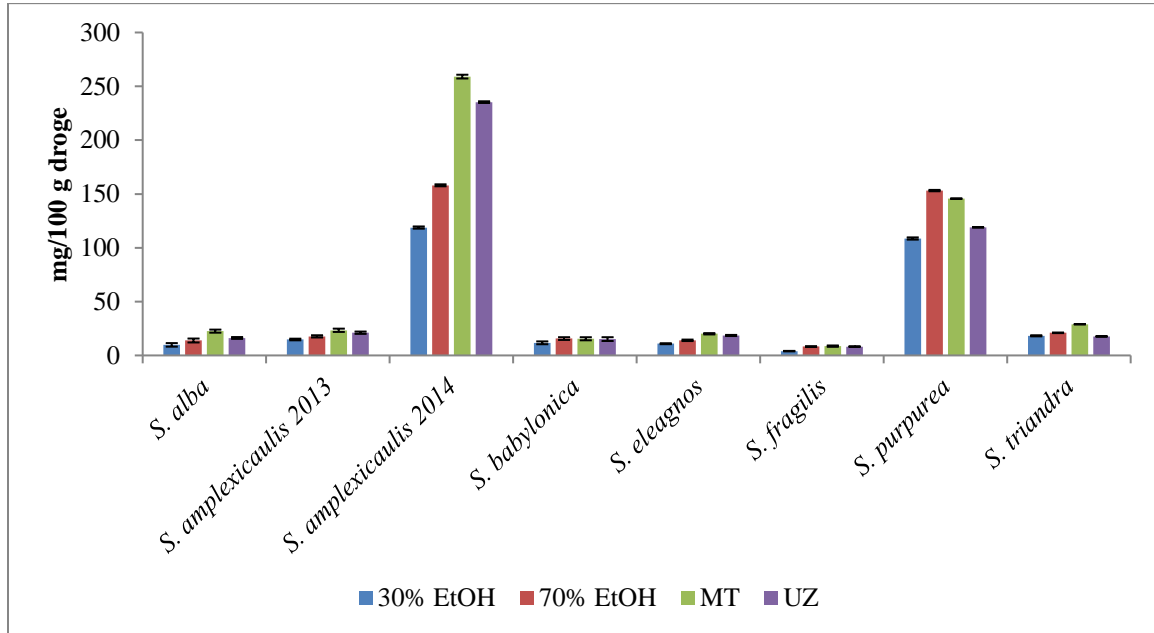
Grafikon 34. Sadržaj epikatehina u ekstraktima kore ispitivanih vrsta roda *Salix*



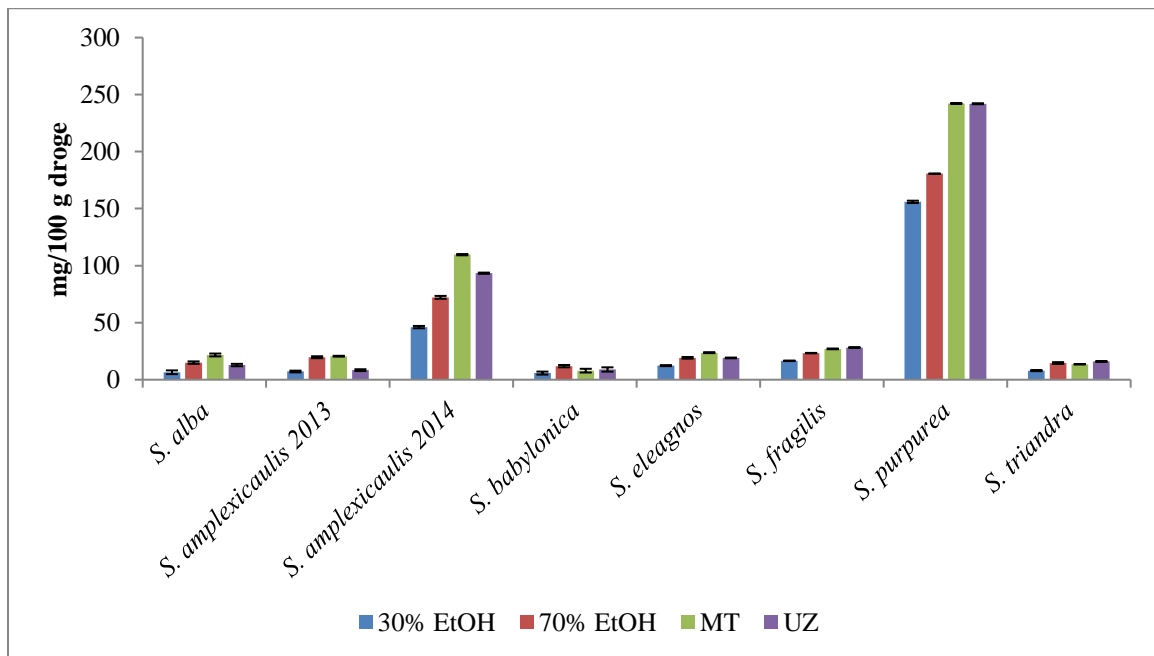
Grafikon 35. Sadržaj epikatehina u ekstraktima lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

Rezultati kvantifikacije epikatehina u ekstraktima kore i lista ispitivanih *Salix* vrsta, dobijenim različitim ekstrakcionim tehnikama prikazani su na Grafikonima 34 i 35. Sadržaj epikatehina u ekstraktima kore bio je u intervalu od 35,59 – 503,43 mg/100 g suve droge, a u ekstraktima lista od 20,64 – 484,49 mg/100 g droge. Najniža koncentracija ovog flavonoidnog jedinjenja detektovana je u 30% etanolnom ekstraktu lista vrste *S. alba*, dok je najviša u mikrotalasnom ekstraktu kore *S. amplexicaulis* (2013). Iza mikrotalasnog, ekstrakti kore *S. amplexicaulis* (2013) dobijeni maceracijom 30% etanolom i ultrazvučnom tehnikom sadrže najveću količinu epikatehina u poređenju sa ekstraktima kore ostalih ispitivanih vrsta. Za razliku od kore *S. amplexicaulis* (2013), epikatehin je iz lista ove vrste izolovan jedino mikrotalasnom tehnikom ekstrakcije i to u desetostruko nižoj koncentraciji. Visokim sadržajem ovog flavan-3-ola ističu se i 70% etanolni i mikrotalasni ekstrakt lista vrste *S. purpurea*.

5.6.9. *P*-kumarinska kiselina



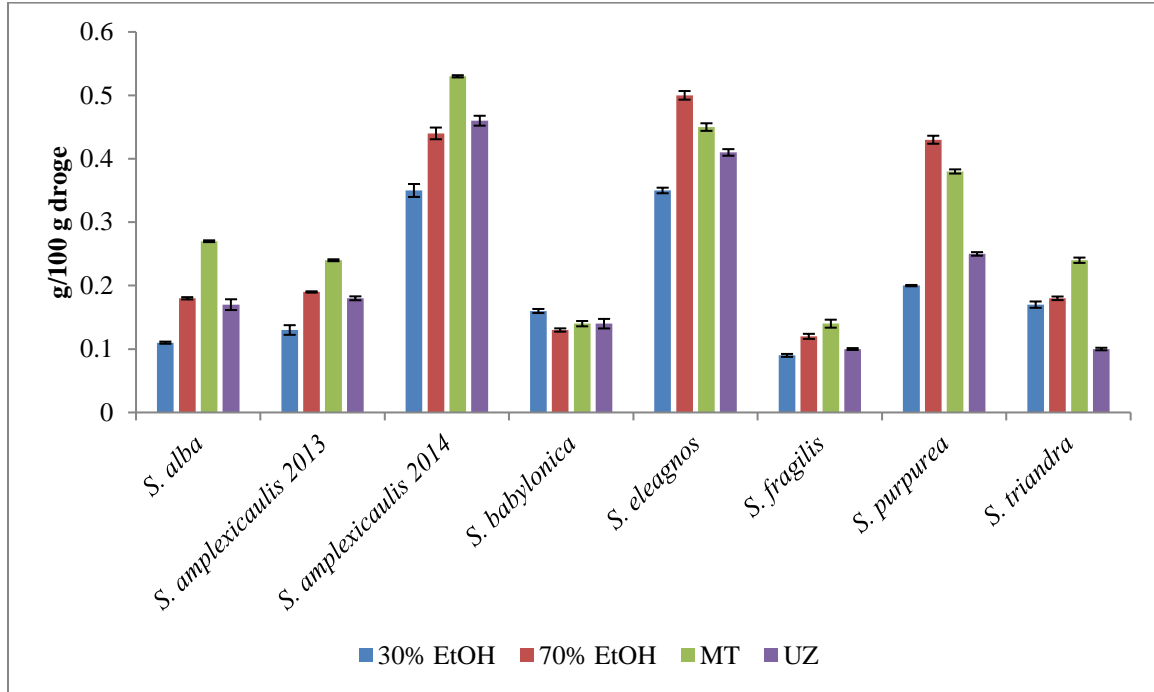
Grafikon 36. Sadržaj *p*-kumarinske kiseline u ekstraktima kore ispitivanih vrsta roda *Salix*



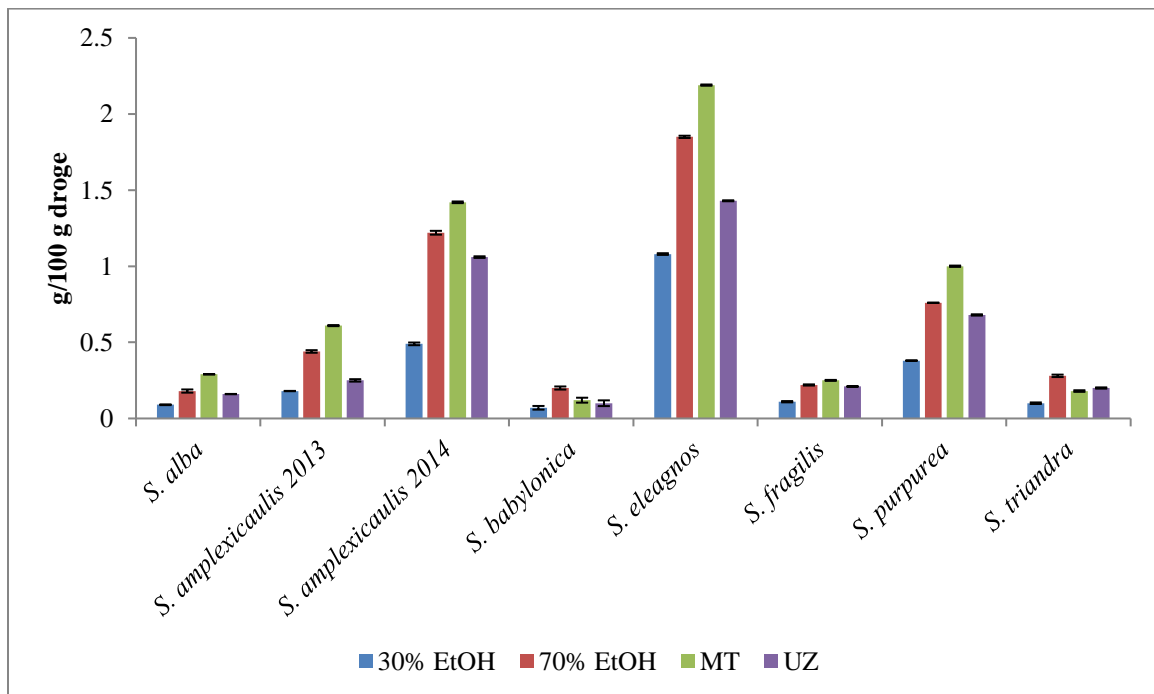
Grafikon 37. Sadržaj *p*-kumarinske kiseline u ekstraktima lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

Rezultati određivanja sadržaja *p*-kumarinske kiseline u ekstraktima kore i lista ispitivanih vrsta roda *Salix*, dobijenim različitim ekstrakcionim tehnikama prikazani su na Grafikonima 36 i 37. Koncentracija *p*-kumarinske kiseline u ekstraktima kore kretala se u intervalu od 4 – 259,01 mg/100 g suve droge, a u ekstraktima lista od 5,80 – 242,19 mg/100 g droge. Među ekstraktima kore najveća količina ove fenolne kiseline detektovana je u mikrotalasnom ekstraktu vrste *S. amplexicaulis* (2014), dok je među ekstraktima lista u mikrotalasnom ekstraktu *S. purpurea*. Takođe, ako posmatramo sadržaj *p*-kumarinske kiseline u kori različitih vrsta dobijen istom tehnikom ekstrakcije, najveća količina je izolovana iz vrste *S. amplexicaulis* (2014) svakim pojedinačnim postupkom ekstrakcije, a najmanja iz kore vrste *S. fragilis*. Kada je u pitanju koncentracija *p*-kumarinske kiseline u listu, među svim ispitivanim vrstama najveća je dobijena u listu *S. purpurea* svim ekstrakcionim tehnikama, dok je najniža u listu *S. babylonica*. Mikrotalasna tehnika se pokazala kao najefikasnija za ekstrakciju *p*-kumarinske kiseline i iz kore i iz lista gotovo svih ispitivanih vrsta vrba, sa izuzetkom lista *S. triandra*, gde je ultrazvučna ekstrakcija, kao i kore i lista *S. babylonica* i kore *S. purpurea* gde je maceracija 70% etanolom omogućila izdvajanje najveće količine ove fenolne kiseline. U poređenju sa sadržajem *p*-kumarinske kiseline u kori i listu vrste *S. aegyptiaca* [55], viši je dobijen u kori i listu *S. purpurea* i *S. amplexicaulis* (2014), približno jednak u kori *S. alba*, *S. amplexicaulis* (2013), *S. babylonica*, *S. eleagnos*, dok je niži u ekstraktima lista navedenih vrsta. Koncentracija *p*-kumarinske kiseline je niža i u kori vrste *S. fragilis*, dok je u listu slična vrednosti dobijenoj u vrsti *S. aegyptiaca* [55]. Prisustvo *p*-kumarinske kiseline je potvrđeno i u kori drugih predstavnika roda *Salix* [31].

5.6.10. Rutin



Grafikon 38. Sadržaj rutina u ekstraktima kore ispitivanih vrsta roda *Salix*



Grafikon 39. Sadržaj rutina u ekstraktima lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

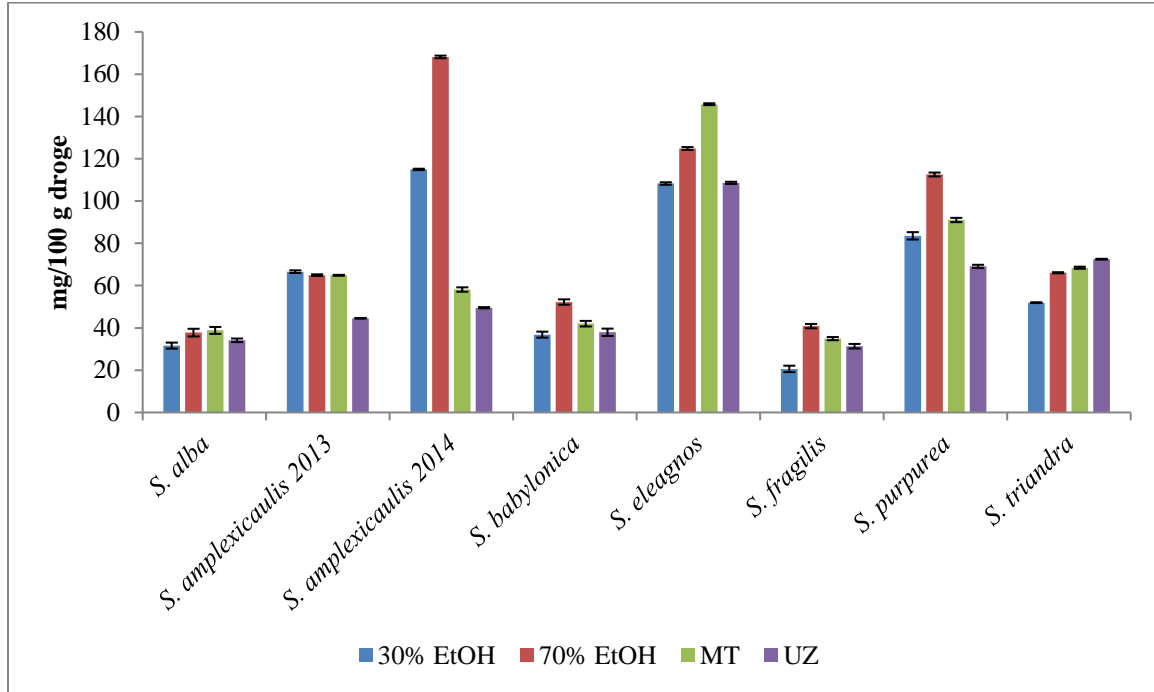
Rezultati kvantitativnog određivanja rutina u ekstraktima kore i lista različitih vrsta roda *Salix* prikazani na Grafikonima 38 i 39. Koncentracija rutina u ekstraktima kore kretala se u opsegu od 0,09 – 0,53 g/100 g droge, dok je u ekstraktima lista bila u intervalu od 0,07 – 2,19 g/100 g droge. Najveći sadržaj rutina detektovan je u mikrotalasnom ekstraktu lista vrste *S. eleagnos*. U poređenju sa ostalim vrstama, rutin je iz lista pomenute vrste vrbe izolovana u najvećoj količini svakom ekstrakcionom tehnikom.

Kod većine vrsta roda *Salix* mikrotalasna ekstrakcija je omogućila izdvajanje najvećeg sadržaja rutina i iz kore i iz lista, izuzev kod vrste *S. babylonica*, gde prednost ima maceracija etanolom, što je slučaj i kod kore *S. eleagnos* i lista *S. triandra*.

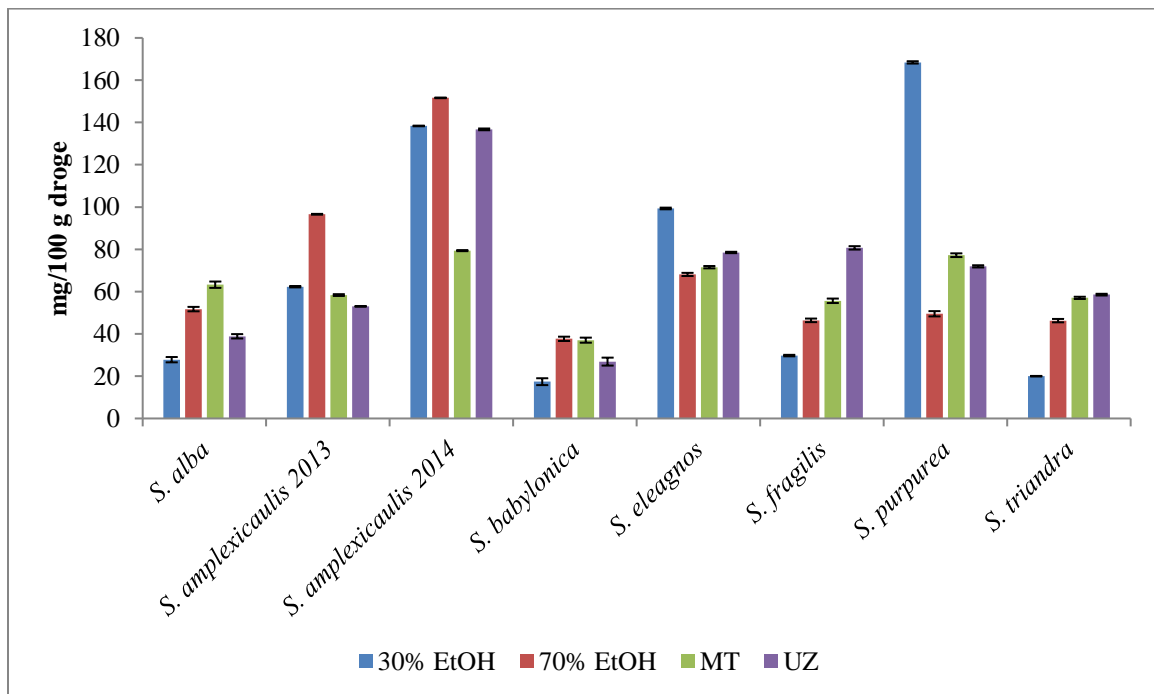
Ako se posmatra koncentracija rutina u ekstraktima kore i ekstraktima lista iste vrste vrbe, uočava se da je ona viša u ekstraktima lista vrsta *S. amplexicaulis* (2013, 2014), *S. elaeagnos*, *S. fragilis* i *S. purpurea*, skoro jednaka kod vrste *S. alba*, dok je viša u ekstraktima kore *S. babylonica*. Kod vrste *S. triandra* veći sadržaj je dobijen u kori kada je ekstrakcija vršena 30% etanolom i mikrotalasnom tehnikom, dok je veća koncentracija u listu ostvarena maceracijom 70% etanolom i ultrazvučnom ekstrakcijom.

Pored vrste *S. eleagnos*, visokim sadržajem rutina ističu se i *S. amplexicaulis* (2014) i *S. purpurea*. Vrbe ispitivane u ovom radu sadrže veću količinu rutina u odnosu na vrstu *S. aegyptiaca* (4,59 mg/g s.e.), pri čemu u listu pomenute vrste rutin nije ni detektovan [55].

5.6.11. Kvercetin



Grafikon 40. Sadržaj kvercetina u ekstraktima kore ispitivanih vrsta roda *Salix*



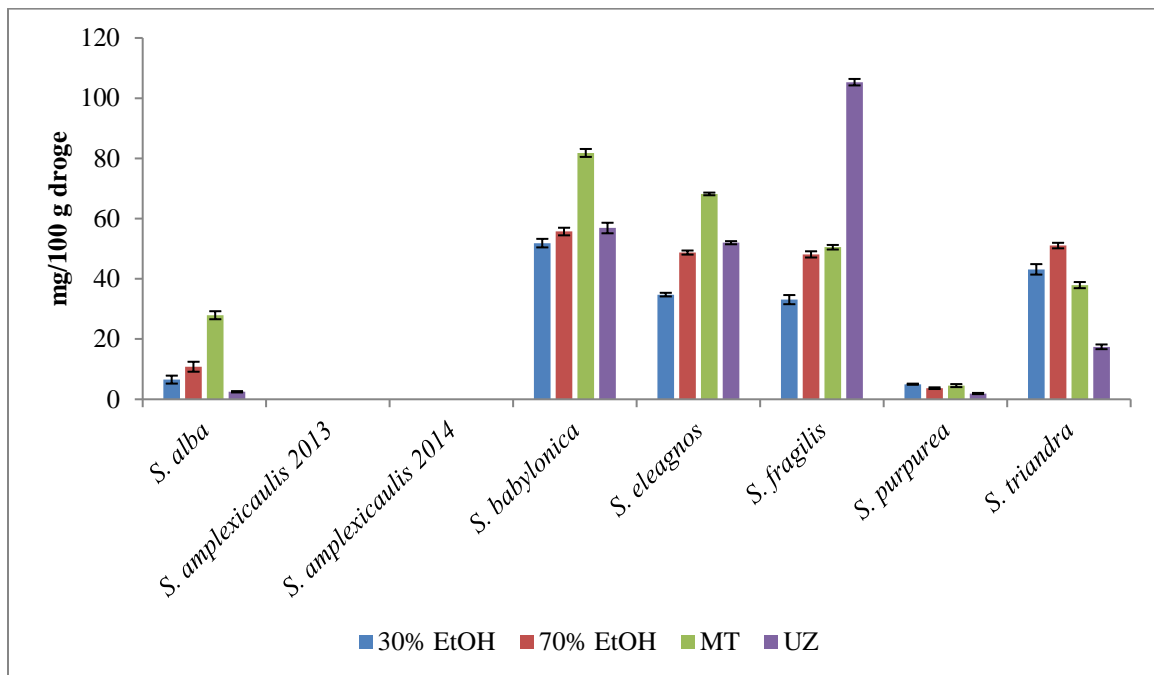
Grafikon 41. Sadržaj kvercetina u ekstraktima lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

Rezultati kvantifikacije kvercetina u ekstraktima kore i lista ispitivanih *Salix* vrsta, dobijenim različitim postupcima ekstrakcije prikazani su na Grafikonima 40 i 41. Može se uočiti da količina kvercetina varira u zavisnosti od primenjene tehnike ekstrakcije, od vrste vrbe i biljne droge. Mikrotalasna ekstrakcija ima prednost u odnosu na ostale tehnike za izolovanje kvercetina iz kore i lista *S. alba*, kore *S. eleagnos* i lista *S. fragilis*. Ultrazvučna i mikrotalasna tehnika su efikasnije od maceracije etanolom za ekstrakciju kvercetina iz kore i lista vrste *S. triandra*. Ekstrakcija 70% etanolom je omogućila izdvajanje najveće količine kvercetina u odnosu na ostale tehnike iz lista *S. amplexicaulis* (2013), kore i lista *S. amplexicaulis* (2014) i *S. babylonica*, kore *S. fragilis* i *S. purpurea*, dok je 30% etanolom iz kore *S. amplexicaulis* (2013), lista *S. eleagnos* i *S. purpurea*. Koncentracije kvercetina u ekstraktima kore bile su u rasponu od 20,61 – 168,16 mg/100 g droge, dok su u ekstraktima lista bile u intervalu od 17,40 – 168,42 mg/100 g droge. Među ekstraktima kore, najveća količina kvercetina prisutna je u 70% ekstraktu kore *S. amplexicaulis* (2014), a zatim u 70% ekstraktima kore *S. eleagnos* i *S. purpurea*. Među ekstraktima lista, kvercetinom je najbogatiji 30% ekstrakt lista vrste *S. purpurea*, a visokim koncentracijama ovog flavonoida ističu se i ekstrakti lista *S. amplexicaulis* (2013) i *S. eleagnos*. Ako posmatramo sadržaj kvercetina u kori i listu iste vrste vrbe, uočavamo da je on veći u kori *S. alba* (osim kod 30% ekstrakata), *S. babylonica*, *S. eleagnos* i *S. triandra*. List vrste *S. amplexicaulis* (2014) i *S. fragilis* sadrži više kvercetina od kore, dok kod vrsta *S. amplexicaulis* (2013) i *S. purpurea* sadržaj u kori i listu varira u zavisnosti od primenjene tehnike ekstrakcije.

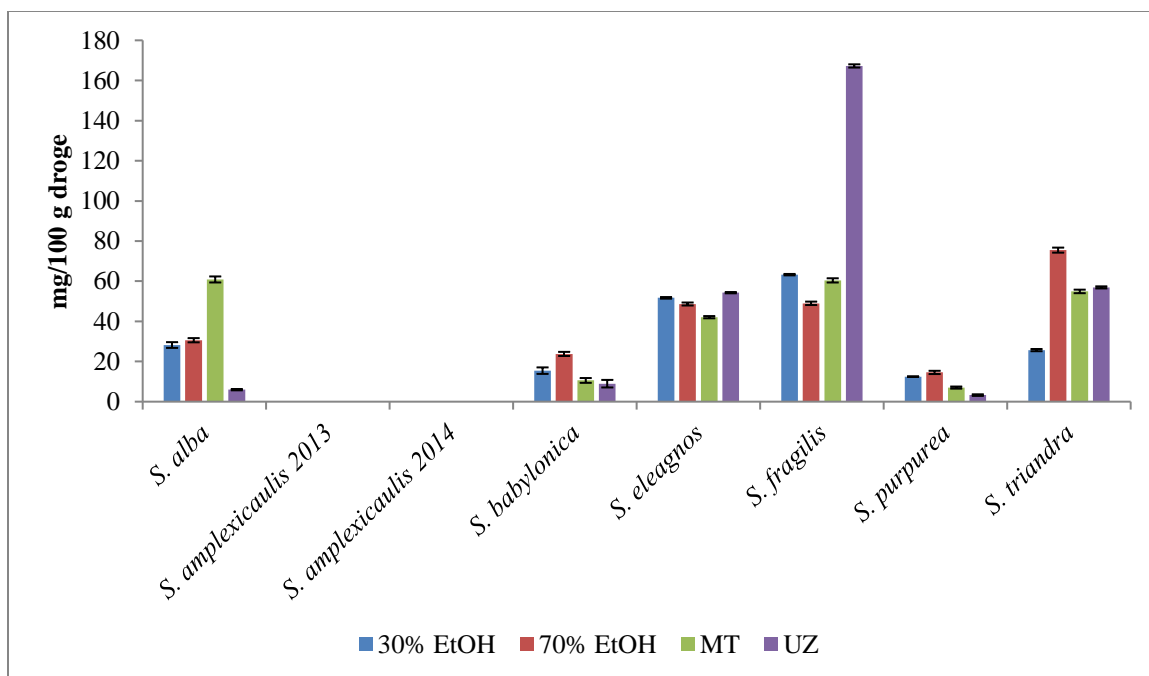
Količina kvercetina u ekstraktima kore i lista ispitivanih vrsta vrba veća je u odnosu na koncentraciju ovog flavonoidnog jedinjenja u kori vrste *S. aegyptiaca* (1,47 mg/g s.e.)

[55]. Za razliku od lista *S. aegyptiaca*, kvercetin je detektovan u svim ekstraktima lista *Salix* vrsta ispitivanih u našem radu.

5.6.12. Trans-cimetna kiselina



Grafikon 42. Sadržaj trans-cimetne kiseline u ekstraktima kore ispitivanih vrsta roda *Salix*



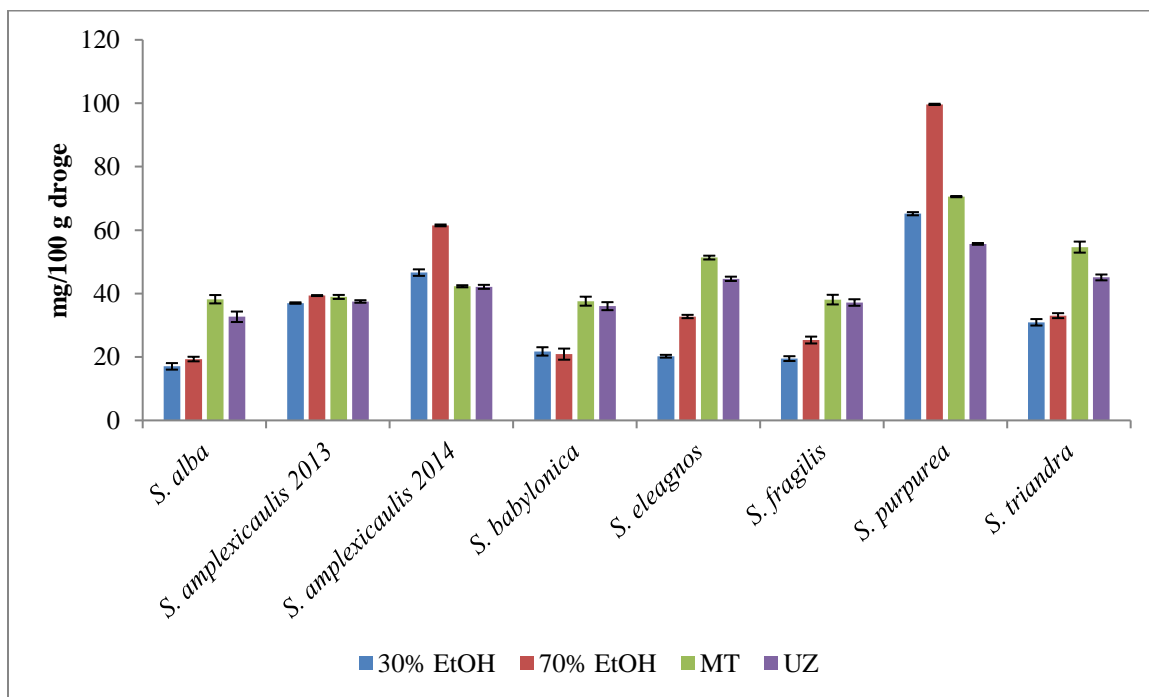
Grafikon 43. Sadržaj trans-cimetne kiseline u ekstraktima lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

Rezultati kvantitativnog određivanja trans-cimetne kiseline u ekstraktima kore i lista ispitivanih vrsta vrba prikazani su na Grafikonima 42 i 43. Može se uočiti da primenjena tehnika ekstrakcije značajno utiče na sadržaj ove fenolne kiseline u dobijenim ekstraktima. Postupak ekstrakcije koji omogućava izolovanje najveće količine trans-cimetne kiseline zavisi kako od ispitivane vrste roda *Salix*, tako i od vrste biljne droge. Koncentracija trans-cimetne kiseline u ekstraktima kore bila je u rasponu od 1,92-105,31 mg/100 g droge, dok je u ekstraktima lista bila u intervalu od 3,27-167,24 mg/100 g droge. Nezavisno od primenjene tehnike ekstrakcije najniža količina trans-cimetne kiseline nalazi se u vrsti *S. purpurea*. Najveći sadržaj ove fenolne kiseline je dobijen u ultrazvučnom ekstraktu lista i kore vrste *S. fragilis*. Ultrazvučna ekstrakcija je omogućila dobijanje najvećeg sadržaja trans-cimetne kiseline i iz lista *S. eleagnos*, a i kore i lista *S.*

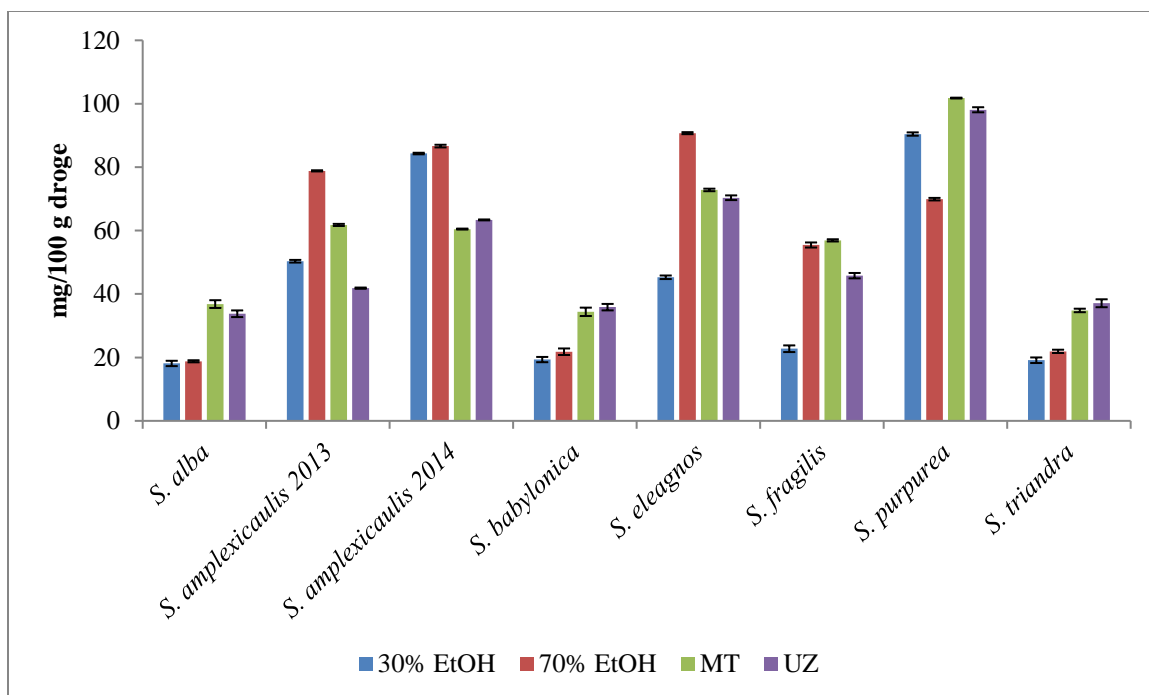
fragilis u poređenju sa ostalim postupcima ekstrakcije. Mikrotalasna tehnika je najpogodnija kod kore i lista vrste *S. alba*, kao i kore vrsta *S. babylonica* i *S. eleagnos*. Maceracija 70% etanolomse pokazala najpodesnijom metodom kod lista *S. babylonica*, kore *S. purpurea*, kao i kore i lista *S. triandra*, dok je 30% etanolom kod lista *S. purpurea*.

Veći sadržaj u listu nego u kori utvrđen je u vrstama *S. alba*, *S. eleagnos* (izuzev pri mikrotalasnoj ekstrakciji), *S. fragilis*, *S. purpurea* i *S. triandra* (osim pri maceraciji 30% etanolom). Veća koncentracija ove fenolne kiseline u kori nego u listu određena je u vrsti *S. babylonica*. U vrsti *S. amplexicaulis* trans-cimetna kiselina nije detektovana ni u kori ni u listu.

5.6.13. Naringenin



Grafikon 44. Sadržaj naringenina u ekstraktima kore ispitivanih vrsta roda *Salix*



Grafikon 45. Sadržaj naringenina u ekstraktima lista ispitivanih vrsta roda *Salix*

Sadržaj naringenina u ekstraktima kore i lista ispitivanih vrsta roda *Salix*, dobijenim različitim postupcima ekstrakcije prikazani su na Grafikonima 44 i 45. Iz dobijenih rezultata može se uočiti da tehnika ekstrakcije značajno utiče na količinu ove flavonoidne supstance. Mikrotalasna i ultrazvučna ekstrakcija su najpogodnije za izolovanje naringenina iz vrsta *S. alba*, *S. babylonica* i *S. triandra*. Mikrotalasna tehnika je najefikasnija za ekstrakciju novog flavanona iz kore *S. eleagnos*, kore i lista *S. fragilis*, kao i lista *S. purpurea*. Maceracija 70% etanolom je najpodesnija za dobijanje najveće količine naringenina iz kore i lista vrste *S. amplexicaulis* (2013, 2014), lista *S. eleagnos* i kore *S. purpurea*. Koncentracije naringenina u ekstraktima kore bile su u rasponu od 17,04 – 99,65 mg/100 g droge, dok su u ekstraktima lista bile u opsegu od 18,11 – 101,79 mg/100 g droge. Najveći sadržaj ispitivanog flavanona i u kori i u listu dobijen je u vrsti *S. purpurea*. Količina ovog flavonoidnog jedinjenja veća je u listu nego u kori u vrstama

S. amplexicaulis (2013, 2014), *S. eleagnos*, *S. fragilis* i *S. purpurea* (izuzev 70% ekstrakta). Veći sadržaj naringenina u kori u odnosu na list nalazi se u *S. babylonica* i *S. triandra*, dok su koncentracije približne u obe droge vrste *S. alba*.

Naringenin je karakterističan sastojak kore *S. alba* [151]. Priustvo naringenina potvrđeno je i u kori *S. purpurea* [9]. U ranije publikovanoj studiji sadržaj naringenina u drvetu i čvorovima vrste *S. caprea* kretao se u intervalu od 0,5-1,5 mg/g suvog drveta [149].

5.7. In silico ispitivanje inhibitornog delovanja izolovanih komponenti na enzime COX-1 i COX-2

5.7.1. Pravila Lipinskog

Sličnost leku („druglikeness“) komponenti izolovanih iz kore i lista analiziranih vrsta roda *Salix* ispitana je prema pravilim Lipinskog i prikaz njihovih osobina dat je u Tabeli 10. Jedan molekul je sličan leku ukoliko ima molekulsku masu manju od 500 Da, podeoni koeficijent oktanol-voda $\log P \leq 5$, broj akceptora vodonika manji od 10, a donora atoma vodonika manji od 5 [116]. Od analiziranih komponenti ekstrakata kore i lista vrsta roda *Salix* pravila Lipinskog ne zadovoljava jedino rutin i on je isključen iz dalje doking studije.

Tabela 10. Svojstva Lipinskog komponenata ekstraktata kore i lista vrba (vrednosti koje ne zadovoljavaju pravila Lipinskog su zatamnjene)

Komponente	logP	Mr (Da)	Akceptori vodonika	Donori vodonika
Hlorogenska kiselina	-0,4	354,31	9	6
<i>P</i> -hidroksibenzojeva kiselina	1,6	138,12	3	2
Siringinska kiselina	1,0	198,17	5	2
Kafena kiselina	1,2	180,16	4	3
Epikatehin	0,4	290,27	6	5
<i>P</i> -kumarinska kiselina	1,5	164,16	3	2
Rutin	-1,3	610,52	16	10
Kvercetin	1,5	302,24	7	5
Trans-cimetna kiselina	2,1	148,16	2	1
Naringenin	2,4	272,26	5	3
Salicin	-1,2	286,28	7	5

5.7.2. Molekularni doking

Rezultati doking analize komponenti koje zadovoljavaju pravila Lipinskog sa COX-1 predstavljeni su u Tabeli 11, a sa COX-2 u Tabeli 12. Vrednosti energije vezivanja (ΔG_b) i konstante inhibicije (Ki) očitane su programom AutoDock Tools, dok su međumolekulske interakcije grafički prikazane pomoću programa Discovery Studio Visualiser.

Tabela 11. Rezultati doking analize komponenata ekstrakata kore i lista vrba i makromolekula COX-1

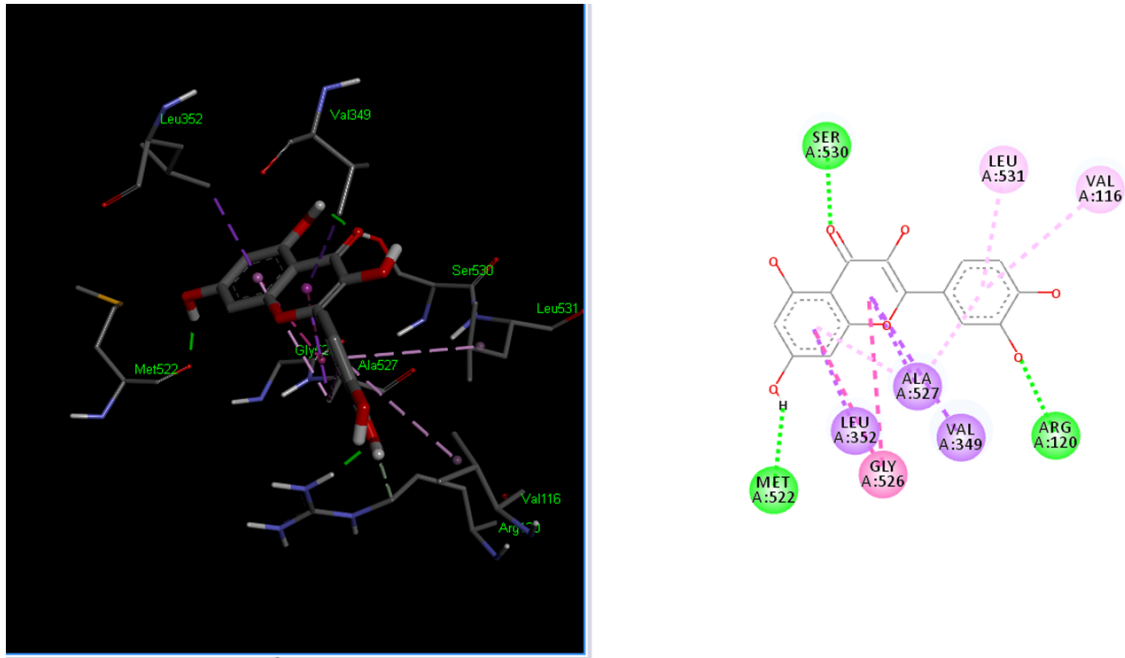
Ligand	ΔG_b [kcal/mol]	K_i	Vodonične veze
Hlorogenska kiselina	-5,29	132,54 μ M	Arg120; Tyr385
<i>P</i> -hidroksibenzojeva kiselina	-4,39	602,75 μ M	Met522; Ser530
Siringinska kiselina	-4,51	494,94 μ M	Ile523; Ser530; Tyr385
Kafena kiselina	-5,46	98,75 μ M	Tyr355; Tyr385; Ser530
Epikatehin	-7,38	3,87 μM	Tyr355; Met522
<i>P</i> -kumarinska kiselina	-4,89	260,27 μ M	Arg120; Tyr355; Met522
Kvercetin	-6,56	15,62 μM	Arg120; Met 522; Ser530
Trans-cimetna kiselina	-4,94	240,23 μ M	Tyr355
Naringenin	-7,97	1,44 μM	Arg120; Tyr355; Met522
Salicin	-5,57	82,44 μ M	Tyr385; Met522; Ile523; Ser530

Tabela 12. Rezultati doking analize komponenata ekstrakata kore i lista vrba i makromolekula COX-2

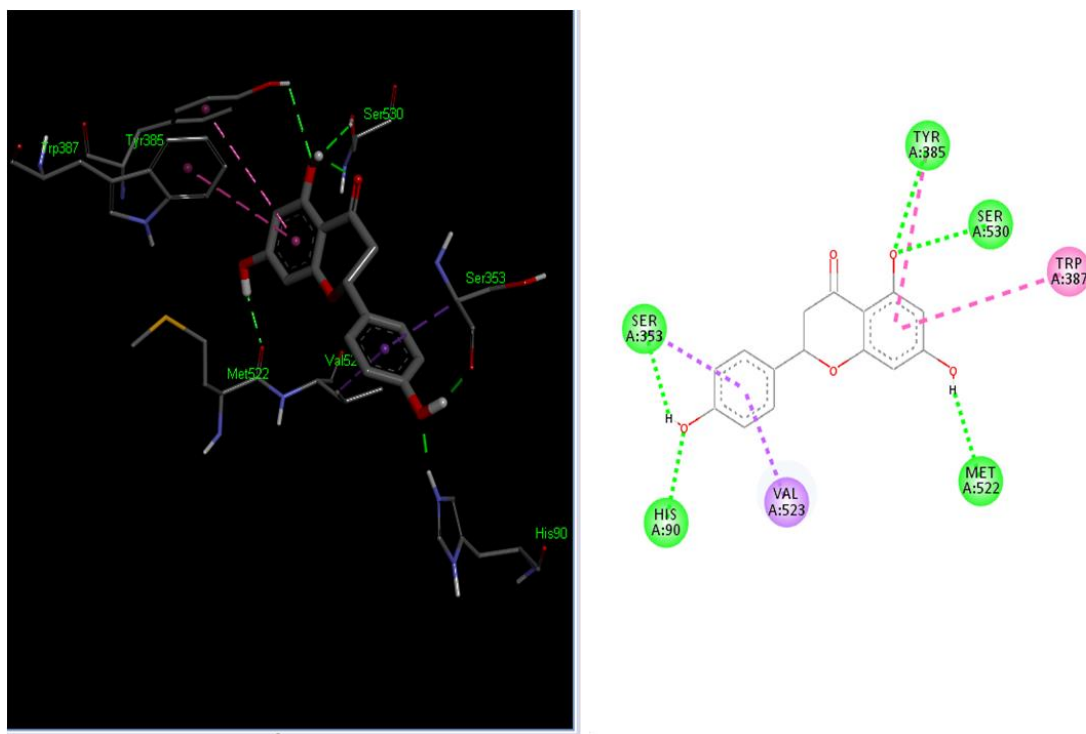
Ligand	ΔG_b [kcal/mol]	K_i	Vodonične veze
Hlorogenska kiselina	-6,69	12,53 μM	His90; Gln192; Trp387; Phe518; Met522
<i>P</i> -hidroksibenzojeva kiselina	-5,08	190,04 μ M	Tyr385; Met522; Ser530
Siringinska kiselina	-5,45	101,06 μ M	Tyr385; Met522; Ser530
Kafena kiselina	-5,73	63,17 μ M	Arg120; Tyr355; Ser530
Epikatehin	-7,78	1,99 μM	Leu352; Ser353; Val523
<i>P</i> -kumarinska kiselina	-5,31	127,25 μ M	Arg120; Tyr355; Ser530
Kvercetin	-8,76	380,78 nM	His 90; Gln192; Val349; Leu352; Ser353; Met522; Ser530
Trans-cimetna kiselina	-5,52	89,35 μ M	Ser530
Naringenin	-8,4	693,73 nM	His90; Ser353; Tyr385; Met522; Ser530
Salicin	-5,22	150,37 μ M	Arg120; Met522; Val523; Ser530

Ispitivana su jedinjenja fenolne strukture izolovana iz kore i lista analiziranih vrsta roda *Salix* u cilju određivanja glavnih komponenti odgovornih za inhibiciju COX-1 i COX-2. Analizom rezultata molekularnog dokinga prikazanih u Tabelama 11 i 12

uočava se da svi ispitivani sastojci ekstrakata kore i lista vrba ostvaruju interakciju sa izoenzimima ciklooksigenaze. Od ispitivanih jedinjenja najveći potencijal inhibicije ostvaruju flavonoidi kvercetin, naringenin i epikatehin. Primećuje se da ove komponente nisu selektivni inhibitori, a da ostvaruju neznatno jaču inhibiciju izoenzima COX-2. Posebno se ističe inhibitorni potencijal kvercetina i naringenina prema COX-2. Na Slikama 14 i 15 prikazane su interakcije kvercetina i naringenina sa ispitivanim makromolekulima.



Slika 14. Levo: trodimenzionalni (3D) prikaz interakcije ligand-receptor kvercetina sa COX-1. Desno: šematski dvodimenzionalni (2D) prikaz. Isprekidanim zelenim linijama predstavljene su vodonične veze, dok su ljubičastom i ružičastom bojom prikazane Van der Valsove interakcije.



Slika 15. Levo: 3D prikaz interakcije ligand-receptor naringenina sa COX-2. Desno: šematski 2D prikaz. Isprekidanim zelenim linijama predstavljene su vodonične veze, dok su ljubičastom i ružičastom bojom prikazane Van der Valsove interakcije.

Najvažnije aminokiselinske rezidue na kompleksu COX-1-kvercetin su Val 116, Arg 120, Val 349, Leu 352, Met 522, Gly 526, Ala 527, Ser 530 and Leu 531. Većina ovih interakcija je hidrofobna i aromatična po prirodi, izuzev interakcija Arg 120, Met 522 i Ser 530 koje sa kvercetinom grade vodonične veze. Relevantne aminokiseline u kompleksu COX-2-naringenin su His 90, Ser 353, Tyr 385, Trp 387, Met 522, Val 523 i Ser 530. Većina interakcija se ostvaruje preko vodonične veze, dok su veze sa Trp 387 i Val 523 hidrofobne. Većina ovih aminokiselinskih rezidua je utvrđena za jedinjenja koja

ostvaruju snažne interakcije sa izoenzimima ciklooksigenaze i odgovaraju aktivnom mestu vezivanja nesteroidnih antiinflamatornih lekova [152-154].

Osim flavonoida, veliki potencijal inhibicije poseduje i hlorogenska kiselina, koja postiže niske vrednosti energije vezivanja sa ispitivanim izoenzimima, dok su ostale komponente ekstrakata slabi inhibitori COX-1 i COX-2.

Dobro poznata dejstva salicina, kao proleka salicilne kiseline, u literaturi se objašnjavaju uticajem salicilne kiseline na ekspresiju gena za sintezu ciklooksigenaze, te su i rezultati doking studije u kojima salicin ne ostvaruje jaku inhibiciju aktivnog mesta izoenzima ciklooksigenaze u skladu sa navedenom teorijom [155].

S obzirom na činjenicu da postoji određen stepen nepouzdanosti *in silico* metoda, dobijene rezultate potrebno je potvrditi *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima. Tačno definisanje delujućih komponenti moglo bi dovesti do formulacije novih farmaceutskih preparata na bazi flavonoida i drugih polifenola kao farmaceutski aktivnih supstanci. Pored mehanizma inhibicije COX enzima, drugim ispitivanjima potvrđen je antiinflamatorni efekat flavonoida različitim ćelijskim mehanizmima [66, 67, 69, 70].

5.8. *In silico* ispitivanje inhibitornog delovanja dominantnih komponenti na enzim acetilholinesterazu

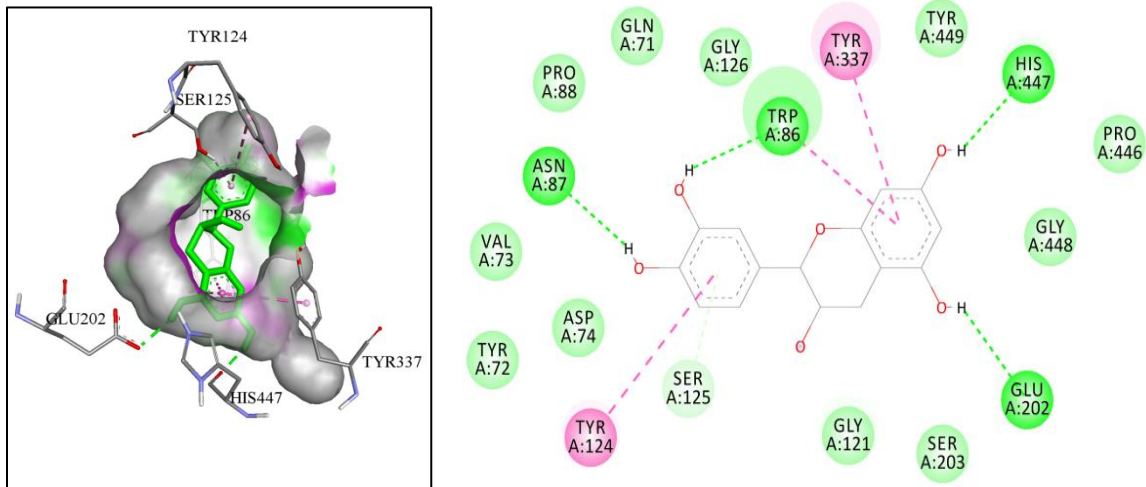
Primenom metode molekularnog dokinga ispitane su interakcije i afinitet vezivanja dominantnih komponenata ekstrakata kore i lista vrbe prema enzimu acetilholinesterazi. Rezultati doking analize su prikazani u Tabeli 13.

Tabela 13. Rezultati doking analize dominantnih komponenata ekstrakata kore i lista vrba i enzima AChE

Ligand	ΔG_b [Kcal/mol]	Ki	Interakcije
Epikatehin	-8.54	551.1 nM	Asp 74, Trp 86, Asn 87, Gly 121, Tyr 124, Ser 125, Glu 202, Ser 203, Tyr 337, His 447
Salicin	-7.33	4.23 μ M	Asp 74, Thr 83, Trp 86, Asn 87, Gly 121, Gly 122, Tyr 124, Ser 125, Glu 202, Ser 203, Tyr 337, Phe 338, His 447
Hlorogenska kiselina	-6.74	11.54 μ M	Gln 71, Tyr 72, Asp 74, Trp 86, Asn 87, Gly 121, Tyr 124, Ser 125, Tyr 133, Glu 202, Ser 203, Tyr 337, Tyr 341, His 447
Donepezil	-7.63	2.53 μ M	

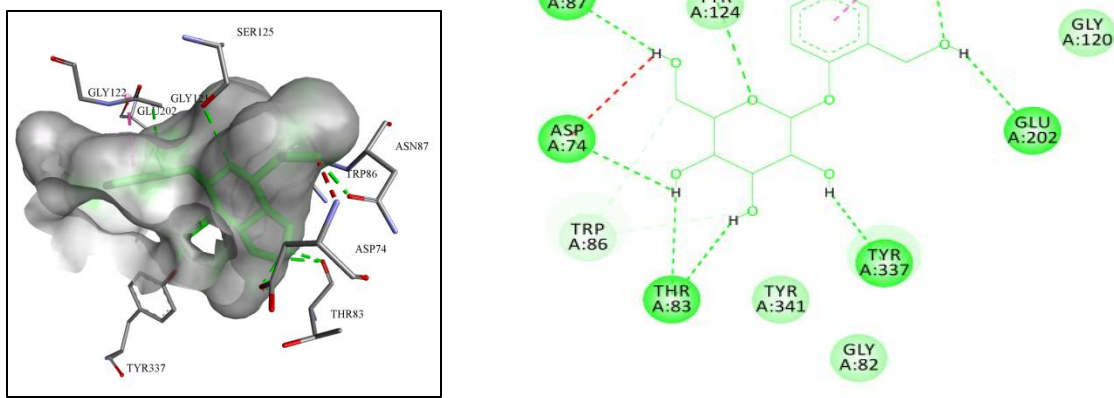
Epikatehin, salicin i hlorogenska kiselina su pokazali dobar afinitet prema acetilholinesterazi u poređenju sa standardnim inhibitorom donepezilom. Među ispitivanim ligandima, epikatehin ima najnižu energiju vezivanja. Takođe, ova tri liganda ostvaruju interakcije sa važnim aminokiselinskim reziduama na aktivnom mestu acetilholinesteraze kao što su Asp 74, Trp 86, Gly 121, Tyr 124, Ser 125, Glu 202, Ser

203, Tyr 337 i His 447 [156]. Na Slikama 16-18 dat je trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz interakcija ligandada sa aktivnim mestom acetilholinesteraze.



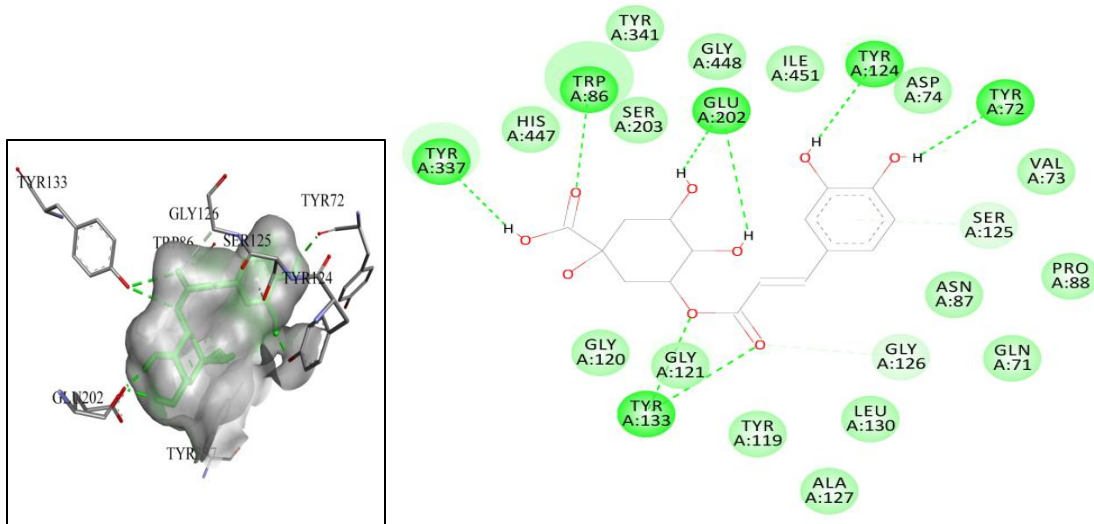
Slika 16. Levo: 3D prikaz interakcije ligand-receptor epikatehina sa AChE. Desno: šematski 2D prikaz. Isprekidanim zelenim linijama predstavljene su vodonične veze, dok su hidrofobne interakcije prikazane ostalim bojama.

Epikatehin ostvaruje više vodoničnih veza sa istaknutim aminokiselinskim reziduama anjonskog mesta acetilholinesteraze, a to su Trp 86, Ser 125 i Glu 202. Interakcije epikatehina sa Ser 203 i His 447, značajnim aminokiselinskim reziduama katalitičkog mesta acetilholinesteraze, su hidrofobne i preko vodoničnog vezivanja, redom. Dodatno, epikatehin pokazuje hidrofobne interakcije sa nekima od važnih aminokiselinskih rezidua perifernog anjonskog mesta acetilholinesteraze, poput Gln 71, Tyr 72 i Asp 74.



Slika 17. Levo: 3D prikaz interakcije ligand-receptor salicina sa AChE. Desno: šematski 2D prikaz. Isprekidanim zelenim linijama predstavljene su vodonične veze, dok su hidrofobne interakcije prikazane ostalim bojama.

Najniži energetski konformer salicina ostvaruje hidrofobne interakcije sa aminokiselinskim reziduama katalitičkog mesta, Ser 203 i His 447. Većina interakcija između salicina i značajnih aminokiselinskih rezidua anjonskog mesta acetilholinesteraze, kao što su Trp 86, Ser 125 and Tyr 337, ostvarene su preko vodoničnih veza, dok su interakcije između salicina i Phe 338 hidrofobne. Takođe, salicin gradi vodonične veze sa Tyr 72 i Asp 74, kao i hidrofobne veze sa Tyr 124, koje su sve važne aminokiseline perifernog anjonskog mesta.



Slika 18. Levo: 3D prikaz interakcije ligand-receptor hlorogenske kiseline sa AChE. Desno: šematski 2D prikaz. Isprekidanim zelenim linijama predstavljene su vodonične veze, dok su hidrofobne interakcije prikazane ostalim bojama.

Hlorogenska kiselina ostavljuje više vodoničnih veza sa značajnim aminokiselinskim reziduama anjonskog mesta acetilholinesteraze, a to su Trp 86, Ser 125, Tyr 133, Glu 202 i Tyr 337. Interakcije hlorogenske kiseline sa istaknutim aminokiselinskim reziduama katalitičkog mesta, Ser 203 i His 447, su po prirodi hidrofobne. Većina interakcija između hlorogenske kiseline i važnih aminokiselinskih rezidua perifernog anjonskog mesta, kao što su Gln 71, Asp 74 i Tyr 341, je hidrofobna, dok sa Tyr 72 gradi vodoničnu vezu. Dobijeni rezultati su u saglanosti sa zaključcima Zaitera i saradnika (2016), koji su utvrdili značajnu *in vitro* inhibitornu aktivnost ekstrakata kore *S. alba* prema enzimu acetilholinesterazi i dobru korelaciju između antiholinesterazne aktivnosti i bioaktivnih

komponentata salicina, katehina, galokatehina, procijanidina B1, B2, C1 i hlorogenske kiseline, potvrđujući ulogu ovih supstanci u pomenutom delovanju [78].

6. ZAKLJUČAK

- Uslovi (vreme ekstrakcije, polarnost rastvarača i stepen usitnjenosti), kao i tehnika ekstrakcije pokazuju značajan uticaj na ukupan prinos ekstrakcije, antioksidativnu aktivnost i sadržaj ukupnih fenolnih i flavonoidnih jedinjenja u ekstraktima kore i lista osam predstavnika roda *Salix*.
- Klasična metoda maceracije 70% etanolom (v/v) bila je pogodnija od ultrazvučne i mikrotalasne za dobijanje ekstrakata sa jačim antioksidativnim potencijalom prema DPPH radikalu kod gotovo svih ispitivanih *Salix* vrsta, sa izuzetkom *S. eleagnos* gde su prednost imale savremene ekstrakcione tehnike.
- Jaču inhibiciju hidroksilnog radikala ispoljili su ekstrakti dobijeni ultrazvučnom i mikrotalasnom metodom u odnosu na klasičnu maceraciju kod svih analiziranih vrsta vrba.
- Prinos ekstrakcije i sadržaj ukupnih fenola i flavonoida je rastao sa porastom vremena ekstrakcije kao i sa stepenom usitnjenosti biljnog materijala jer je veća kontaktna površina sa rastvaračem i ekstrakcija antioksidantnih materija je intenzivnija.
- Razvijena je brza i pouzdana analitička metoda određivanja sadržaja hlorogenske kiseline (5-CQA) u biljnim ekstraktima primenom HPLC i pokazala je visoku selektivnost, linearnost, tačnost, preciznost, ponovljivost i postojanost. Ispitivanjem sadržaja 5-CQA u odabranim ekstraktima vrba može se zaključiti da je najveća količina 5-CQA određena u ultrazvučnom ekstraktu lista vrste *S. triandra*, dok je najmanja u mikrotalasnom ekstraktu kore iste vrste.

- U svim ekstraktima ispitivanih vrsta vrba identifikovan je i kvantifikovan širok spektar fenolnih jedinjenja. Prisutne fenolne kiseline bile su galna, hlorogenska, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, kafena, *p*-kumarinska i trans-cimetna kiselina, flavonoidi epikatehin, rutin, kvercetin i naringenin, kao i salicilni glikozid – salicin. Hemijski sastav i sadržaj sekundarnih metabolita u različitim vrstama vrba varirao je u zavisnosti od primenjene tehnike ekstrakcije. Iz svake analizirane vrste veći broj pojedinačnih komponenata u najvišoj koncentraciji izolovan je mikrotalasnom i ultrazvučnom ekstrakcijom u poređenju sa maceracijom etanolom.
- Utvrđene su razlike u biološkoj aktivnosti između ekstrakata kore i ekstrakata lista iste vrste vrbe. Antioksidantno delovanje ekstrakata kore i lista zavisilo je od vrste radikala koju su neutralisali. Kod većine *Salix* vrsta jači antioksidantni potencijal prema DPPH radikalu ispoljili su ekstrakti kore, dok su kod vrsta *S. amplexicaulis* (2014) i *S. triandra* to bili ekstrakti lista. Ekstrakti lista vrsta *S. alba*, *S. amplexicaulis* (2013, 2014) i *S. babylonica* inhibisali su hidroksilne radikale u većoj meri nego ekstrakti kore istih vrsta, dok su kod vrsta *S. eleagnos*, *S. fragilis*, *S. purpurea* i *S. triandra* dominantniji bili ekstrakti kore.
- Utvrđene su razlike u sadržaju aktivnih sastojaka između ekstrakata kore i ekstrakata lista iste vrste vrbe. Veći sadržaj pojedinačnih jedinjenja u ekstraktima kore ili lista zavisio je od same vrste vrbe. Komponente prisutne u većoj količini u listu nego u kori u svim ispitivanim vrstama roda *Salix* bile su rutin, a sa izuzetkom vrste *S. babylonica* i hlorogenska kiselina. U kori vrsta u kojima je

- detektovana, koncentracija *p*-hidroksibenzojeve kiseline i epikatehina (sa izuzetkom *S. purpurea*) bila je veća nego u listu.
- Utvrđene su razlike u antioksidantnoj aktivnosti i sadržaju sekundarnih metabolita od farmakološkog značaja kod ekstrakata različitih vrsta vrba. Sposobnost inhibicije DPPH radikala među ekstraktima različitih vrsta opadala je redosledom: *S. alba*>*S. triandra*>*S. eleagnos*>*S. amplexicaulis* (2013) > *S. babylonica*>*S. amplexicaulis* (2014) >*S. purpurea*>*S. fragilis*. Potencijal ekstrakata različitih vrsta da neutrališu hidroksilne radikale smanjivao se redosledom: *S. alba*>*S. amplexicaulis* (2014) >*S. fragilis*>*S. purpurea*>*S. amplexicaulis* (2013) >*S. triandra* >*S. babylonica*>*S. eleagnos*. U pogledu hemijskog sastava najraznovrsnija vrsta bila je *S. fragilis*. U pomenutoj vrsti sadržaj galne, hlorogenske, vanilinske i trans-cimetne kiseline bio je najveći u poređenju sa ostalim analiziranim vrstama roda *Salix*. Koncentracija *p*-hidroksibenzojeve, *p*-kumarinske kiseline, kvercetina i salicina bila je najviša u vrsti *S. amplexicaulis* (2014), dok je epikatehina bila u *S. amplexicaulis* (2013). U vrsti *S. purpurea* količina kafene kiseline i naringenina veća je u odnosu na ostale vrste vrba. Sadržaj rutina je bio najveći u vrsti *S. eleagnos*, a siringinske kiseline u *S. alba*.
 - *In silico* analizom utvrđena je antiinflamatorna aktivnost ekstrakata kore i lista vrba i glavne komponente odgovorne za inhibiciju izoenzima ciklooksigenaze. Flavonoidne komponente kvercetin, naringenin i epikatehin, kao i hlorogenska kiselina među fenolkarbonskim kiselinama, ostvaruju najniže energije vezivanja sa COX-1 i COX-2, ukazujući na jak inhibitorni potencijal prethodno navedenih jedinjenja.

- Rezultati analize metodom molekularnog dokinga pokazali su da dominantne komponente ekstrakata kore i lista vrba poseduju inhibitornu aktivnost prema enzimu acetilholinesterazi. Epikatehin, salicin i hlorogenska kiselina ostvaruju niz jakih vodoničnih veza i hidrofobnih interakcija sa značajnim aminokiselinskim reziduama na aktivnom mestu acetilholinesteraze, čime se može objasniti potentnost ovih jedinjenja.

7. LITERATURA

1. Schmid B, Lüdtke R, Selbmann HK, Kötter I, Tschirdewahn B, Schaffner W, et al. Wirksamkeit und Verträglichkeit eines standardisierten Weidenrindenextraktes bei Arthrose-Patienten: Randomisierte, Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie. *Z. Rheumatol.* 2000; 59, 314-20.
2. Maroon JC, Bost JW, Maroon A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surg Neurol Int.* 2010;1:80. doi: 10.4103/2152-7806.73804.
3. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. *Herbal Medicines*, 3rd edition. London: Pharmaceutical Press; 2007.
4. Highfield ES, Kemper KJ. *White Willow Bark (Salix alba)*. Longwood Herbal Task Force: 1999.
5. Förster N, Ulrichs C, Zander M, Kätzel R, Mewis I. Factors influencing the variability of antioxidative phenolic glycosides in *Salix* species. *J Agric Food Chem.* 2010;58(14):8205–10.
6. Julkunen Tiitto R. Phenolic constituents of *Salix*: A chemotaxonomic survey of further Finnish species. *Phytochemistry.* 1989; 28(8): 2115-25.
7. Nyman T, Julkunen-Tiitto R. Chemical variation within and among six northern willow species. *Phytochemistry* 2005; 66(24), 2836–2843.
8. Sulima P, Prinz K, Przyborowski JA. Genetic Diversity and Genetic Relationships of Purple Willow (*Salix purpurea* L.) from Natural Locations. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 105.

9. Sulima P, Krauze-Baranowska M, Przyborowski JA. Variations in the chemical composition and content of salicylic glycosides in the bark of *Salix purpurea* from natural locations and their significance for breeding. *Fitoterapia*. 2017; 118: 118-25.
10. Mylonaki S, Kiassos E, Makris DP, Kefalas P. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chem*. 2008; 392: 977-85.
11. Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chem Cent J*. 2007; 1: 13.
12. Li H, Deng Z, Wu T, Liu R, Loewen S, Tsao R. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem*. 2012; 130: 928–36.
13. Ince AE, Sahin S, Sumnu G. Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *J Food Sci Technol*. 2014;51(10):2776-2782.
14. Bucar F, Wubea A, Schmid M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Nat Prod Rep*. 2013; 30: 525-45.
15. Kuzovkina YA, Quigley MF. Willows beyond wetlands: uses of *Salix* L. species for environmental projects. *Water, Air Soil Pollut*. 2005;162:183–204.
16. Kuzovkina YA, Volk TA. The characterization of willow (*Salix* L.) varieties for use in ecological engineering applications: Co-ordination of structure, function and autecology. *Ecol Eng*. 2009;35: 1178–89.

17. Lauron-Moreau A , Pitre FE , Argus GW , Labrecque M, Brouillet L. Phylogenetic Relationships of American Willows (*Salix* L., Salicaceae). PLoS ONE. 2015; 10(4): e0121965.
18. Nigel G. Halford, Angela Karp. Energy Crops. Royal Society of Chemistry: 2011.
19. Jančić R. Botanika farmaceutika, drugo dopunjeno izdanje. Beograd: Službeni list SCG; 2004.
20. Igić R, Vukov D. Praktikum iz sistematike viših biljaka. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet; 2000.
21. Jovanović B, Tucović A. Salicaceae, u: Josifović M, Flora SR Srbije III, Srpska akademija nauka i umetnosti, odeljenje prirodno matematičkih nauka, Beograd: 1972.
22. Uotila P. (2011): Salicaceae. – In: Euro+Med PlantBase – the information resource forEuro-Mediterranean plant diversity. Published on the Internet <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/> [accessed 12.6.2018.]
23. Isebrands JG, Richardson J. Poplars and willows: trees for society and the environment. The Food and Agriculture Organization of the United Nations and CABI; 2014.
24. Cronk Q, Ruzzier E, Belyaeva I, Percy D. *Salix* transect of Europe: latitudinal patterns in willow diversity from Greece to arctic Norway. Biodivers Data J. 2015;(3):e6258.
25. Kavak S. *Salix amplexicaulis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T19620246A19621256.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T19620246A19621256.en>. Downloaded on 27 March 2018.

26. Orwa C, Mutua A, Kindt R , Jamnadass R, Anthony S. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. 2009. (<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>)
27. Rechinger KH, Akeroyd JR. *Salix* L. In: Tutin TG, Burges NA, Chater AO, Edmondson JR, Heywood VH, Moore DM, et al., editors. *Flora Europaea*, Volume 1, 2nd edition. Cambridge: Cambridge University Press, 1993, p. 53-64.
28. Mahdi J. Medicinal potential of willow. A chemical perspective of aspirin discovery. *J Saudi Chem Soc.* 2010;14(3): 317-22.
29. Miner J. The Discovery of Aspirin's Antithrombotic Effects. *Texas Hear Inst J.* 2007;179–86.
30. Mahdi JG, Mahdi AJ, Mahdi AJ, Bowen ID. The historical analysis of aspirin discovery , its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. *Cell Prolif.* 2006; (44):147–55.
31. Poblócka-Olech L, Krauze-Baranowska M, Głód D, Kawiak A, Łojkowska E. Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus *Salix*. *Phytochem Anal.* 2010;21(5):463–9.
32. European Medicines Agency. Assessment report on *Salix* [various species including *S. purpurea* L., *S. daphnoides* Vill., *S. fragilis* L.], cortex.. EMEA: London; 2017.
33. European Scientific Cooperative on Phytotherapy. *Salicis cortex* (willow bark). Fascicule 4. Devon, UK: ESCOP; 1997.
34. European Pharmacopoeia 6.0. Council of Europe: Strasbourg; 2007.

35. Wiesneth S, Aas G, Heilmann J, Jürgenliemk G. Investigation of the flavan-3-ol patterns in willow species during one growing-season. *Phytochemistry*. 2018; 145: 26-39.
36. Pobłocka-Olech L, van Nederkassel A-M, Vander Heyden Y, Krauze-Baranowska M, Glód D, Baczek T. Chromatographic analysis of salicylic compounds in different species of the genus *Salix*. *J Sep Sci*. 2007;30(17):2958–66.
37. Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Abdallah DM, Okpanyi SN, Kelber O, Weiser D. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of a standardized willow bark extract. *Arzneimittelforschung*. 2005;55:677–87.
38. Nahrstedt A, Schmidt M, Jäggi R, Metz J, Khayyal MT. Willow bark extract: the contribution of polyphenols to the overall effect. *Wien med Wochenschr*. 2007; 157(13-14):348–51.
39. Gawlik-Dziki U, Sugier D, Dziki D, Sugier P. Bioaccessibility In Vitro of Nutraceuticals from Bark of Selected *Salix* Species. *Scientific World Journal*. 2014; 2014, Article ID 782763, 10 pages.
40. Pearl IA, Darling SF. Purpurein, a new glycoside from the bark of *Salix purpurea*. *Phytochemistry*. 1970; 9: 853-6.
41. Pearl IA, Darling SF. Phenolic extractives of *Salix purpurea* bark. *Phytochemistry*. 1970; 9:1277-81.
42. Pearl IA, Darling SF. Structures of salicortin and tremulacin. *Phytochemistry*. 1971;10: 3161-6.
43. Jürgenliemk G, Petereit F, Nahrstedt A. Flavan-3-ols and procyanidins from the bark of *Salix purpurea* L. *Pharmazie*. 2007; 62: 231-4.

44. Förster N, Ulrichs C, Zander M, Kätzel R, Mewis I. Influence of the season on the salicylate and phenolic glycoside contents in the bark of *Salix daphnoides*, *Salix pentandra*, and *Salix purpurea*. *J Appl Bot Food Qual.* 2008; 82: 99 – 102.
45. Förster N, Ulrichs C, Zander M, Kätzel R, Mewis I. Salicylatreiche Weiden für die Arzneimittelherstellung. *Gesunde Pflanz.* 2009; 61: 129-34.
46. Boeckler GA, Gershenzon J, Unsicker SB. Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry.* 2011; 72: 1497–1509
47. Krauze-Baranowska M, Poblocka-Olech L, Glod D, Wiwart M, Zielinski J, Migas P. HPLC of flavanones and chalcones in different species and clones of *Salix*. *Acta Pol Pharm.* 2013; 70 (1): 27-34.
48. Freischmidt A, Untergehrer M, Ziegler J, Knuth S, Okpanyi S, Müller J, et al. Quantitative analysis of flavanones and chalcones from willow bark. *Pharmazie.* 2015; 70 (9):565-8.
49. Poblocka-Olech L, Glod D, Krol-Kogus B, Krauze-Baranowska M. 2D LC heart cutting on-line of phenolic compounds from three species of the genus *Salix*. *Acta Pol Pharm.* 2016; 73(4): 885-94
50. Julkunen-Tiitto R, Meier B. The enzymatic decomposition of salicin and its derivatives obtained from Salicaceae species. *J Nat Prod.* 1992; 55:1204-12.
51. Vlachojannis JE, Cameron M, Chrubasik S. A Systematic Review on the Effectiveness of Willow Bark for Musculoskeletal Pain. *Phytother Res.* 2009; 23: 897-900.
52. Vlachojannis J, Magora F, Chrubasik S. Willow species and aspirin: Different mechanism of actions. *Phytother Res.* 2011; 25: 1102-4.

53. Vlachojannis C, Magora F, Chrubasik-Hausmann S. Pro and Contra Duration restriction of treatment with willow bark extract. *Phytother Res.* 2014; 28: 148-9.
54. Schmid B, Kötter I, Heide L. Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardization willow bark extract. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001;57:387-91.
55. Enayat S, Banerjee S. Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. *Food Chem.* 2009;116(1):23–8.
56. Kovačević N. *Osnovi farmakognozije, treće izdanje.* Beograd: Srpska školska knjiga; 2004.
57. Uehleke B, Müller J, Stange R, Kelber O, Melzer J. phymed Willow bark extract STW 33-I in the long-term treatment of outpatients with rheumatic pain mainly osteoarthritis or back pain. *Phytomedicine.* 2013;20: 980–984 .
58. Durak A, Gawlik-Dziki U. The Study of Interactions between Active Compounds of Coffee and Willow (*Salix* sp.) Bark Water Extract. *BioMed Res Int.* 2014; 2014, Article ID 386953, 11 pages.
59. Tegelberg R, Veteli T, Aphalo PJ, Julkunen-Tiitto R. Clonal differences in growth and phenolics of willows exposed to elevated ultraviolet-B radiation. *Basic Appl. Ecol.* 2003; 4: 219–228.
60. Keusgen M, Allgäuer-Lechner, C. Weidenrindenextrakt. Vielstoffgemisch gegen Entzündungen und Schmerzen. *Pharm. Ztg.* 2007; 8: 16–22.
61. Chrubasik S, Eisenberg E, Balan E, Weinberger T, Luzzati R, Conradt C. Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study. *Am J Med.* 2000;109(1): 9–14.

62. Chrubasik S, Künzel O, Model A, Conradt C, Black A. Treatment of low back pain with herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain. *Rheumatol*. 2001; 40(12): 1388-93.
63. Schmid B, Ludtke R, Selbmann HK, Kotter I, Tschirdewahn B, et al. Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: randomized placebo-controlled, double blind clinical trial. *Phytother Res*. 2001; 15: 344–50.
64. Beer AM, Wegener T. Willow bark extract (*Salicis cortex*) for gonarthrosis and coxarthrosis – Results of a cohort study with a control group. *Phytomedicine*. 15 (2008) 907–13.
65. Rowley AF, Vogan CL, Taylor GW, Clare AS. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *J Exp Biol*. 2005; 208: 3-14.
66. Bonaterra GA, Heinich EU, Kelber O, Weiser D, Metz J, et al. Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. *Phytomedicine*. 2010; 17: 1106–13.
67. Freischmidt A, Jurgenliemk G, Kraus B, Okpanyi SN, Muller J, et al. Contribution of flavonoids and catechol to the reduction in ICAM-1 expression in endothelial cells by standardized willow bark extract. *Phytomedicine*. 2012; 19: 245–52.
68. Ishikado A, Sono Y, Matsumoto M, Robida-Stubbs S, Okuno A, et al. Willow bark extract increases antioxidant enzymes and reduces oxidative stress through activation of Nrf2 in vascular endothelial cells and *Caenorhabditis elegans*. *Free Rad Biol Med*. 2013; 65:1506-15.

69. Shakibaei M, Allaway D, Nebrich S, Mobasheri A. Botanical extracts from rosehip (*Rosa canina*), willow bark (*Salix alba*), and nettle leaf (*Urtica dioica*) suppress IL-1 β induced NF- κ B activation in canine chondrocytes. *Evid Based Complement Altern Med*. 2012; 2012:50983.
70. Drummond E, Harbourne N, Marete E, Martyn D, Jacquier JC, et al. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytother Res*. 2013; 27(4):588-94.
71. Fiebich BL, Chrubasik S . Effects of an ethanolic *Salix* extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. *Phytomedicine*. 2004; 11: 135–138.
72. Gyawali R, Bhattarai P, Dhakal S, Jha B, Kattel SS, et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Salix alba* Linn and *Calotropis procera* (Aiton) Dryand. *IJPBA*. 2013; 4(5): 873 – 7.
73. Hostanska K, Jurgenliemk G, Abel G, Nahrstadt A, Saller R. Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells. *Cancer Detect Prev*. 2007; 31: 129–39.
74. El-Shemy HA, Aboul-Enein AM, Aboul-Enein KM, Fujita K. Willow Leaves' Extracts Contain Anti-Tumor Agents Effective against Three Cell Types. *PLoS ONE*. 2007; 2(1): e178.
75. Kong CS, Kim KH, Choi JS, Kim JE, Park C, Jeong JW. Salicin, an Extract from White Willow Bark, Inhibits Angiogenesis by Blocking the ROS-ERK Pathways. *Phytother Res*. 2014; 28: 1246–1251. doi:10.1002/ptr.5126
76. Pop C, Vodnar D, Ranga F, Socaciu C. Comparative Antibacterial Activity of Different Plant Extracts in Relation to their Bioactive Molecules, as Determined by LC-

MS Analysis. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies. 2013; 70(1): 86-94.

77. Sulaiman GM, Hussien NN, Marzoog TR, Awad HA. Phenolic content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanolic extract of *Salix alba*. Am J Biochem Biotechnol. 2013; 9 (1): 41-6.

78. Zaiter A, Becker L, Petit J, Zimmer D, Karam MC, et al. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of different granulometric classes of *Salix alba* (L.) bark powders. Powder Technol. 2016; 301: 649-56.

79. Shrivastava R, Pechadre JC, John GW. Tanacetum parthenium and *Salix alba* (Mig-RL) combination in migraine prophylaxis: a prospective, open-label study. Clin Drug Investig. 2006; 26(5): 287-96.

80. Shara M, Stohs SJ. Efficacy and safety of white willow bark (*Salix alba*) extracts. Phytother Res. 2015; 29(8): 1112-6.

81. Martins N, Barros L, Ferreira ICFR. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. Trends in Food Sci Technol. 2016; 48: 1-12.

82. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010;4(8):118-26.

83. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food Bioprod Process. 2011; 89 (3): 217-33.

84. Goli AH, Barzegar M, Sahari MA. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. Food Chem. 2005; 92: 521–525.

85. Caroch M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013; 51: 15-25.
86. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, et al. Potential application of antioxidants – A review. *J Pharm Res.* 2013; 7 (9): 828-35.
87. Brewer MS. Natural Antioxidants: sources, compounds, mechanism of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2011; 10 (4): 221-47.
88. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 2015; 5: 27986-28006.
89. Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zheng J, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1): 96.
90. Zabihi NA, Mahmoudabady M, Soukhtanloo M, Hayatdavoudi P, Beheshti F, et al. *Salix alba* attenuated oxidative stress in the heart and kidney of hypercholesterolemic rabbits. *Avicenna J Phytomed.* 2018; 8(1): 63-72.
91. Khadem S, Marles RI. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies . *Molecules.* 2010; 15: 7985-8005.
92. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006;99:191-203.
93. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016; 5: e47.

94. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med.* 1996; 20(7): 933-56.
95. Savić Lj. Metode ekstrakcije biljnih materijala: uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. *Lek Sirov.* 2014; 34 (34): 93-103.
96. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng.* 2013; 117(4): 426-36.
97. de Castro MDL, Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J Chromatogr A.* 2010; 1217: 2383-9.
98. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol.* 2006; 17: 300-12.
99. Delazar A, Nahar L, Hamedeyazdan S, Sarker SD. Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Methods Mol Biol.* 2012; 864:89-115.
100. Chan CH, Yusoff R, Ngoh GC, Kung FWL. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J Chromatogr A.* 2011;1218:6213–25.
101. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants* 2017; 6(4):42.
102. Zhang HF, Yang XH, Wang Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends Food Sci Technol* 2011; 22: 672-88.

103. Mijin DŽ, Petrović DS. Primena mikrotalasne tehnike u organskoj hemiji i organskoj hemijskoj tehnologiji. *Hem ind.* 2005;59(9-10):224-9.
104. Ameer K, Shahbaz HM, Kwon JH. Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: a review. *Compr Rev Food Sci Food* 2017; 16(2):295-315.
105. Routray W, Orsat V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food Bioprocess Technol.* 2012; 5: 409-24.
106. Drmić H, Jambrak AR. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol.* 2010;2(2):22-33.
107. Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiation – A review of current status. *Chem Eng Process.* 2012; 53: 10-23.
108. Azwanida NN. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants* 2015; 4: 196.
109. Grujić N, Lepojević Ž, Srđenović B, Vladić J, Sudić J. Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition on mate tea extracts. *Molecules.* 2012;17(3):2518-28.
110. Li S, Sang Y, Zhu D, Yang Y, Lei Z, et al. Optimization of fermentation conditions for crude polysaccharides by *Morchella esculenta* using soybean curd residue. *Ind Crop Prod.* 2013; 50: 666-72.
111. Božin B, Mimica-Dukić N, Samojlik I, Goran A, Igić R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chem.* 2008;111(4):925-9.

112. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2006;97:654-60.
113. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Federal Register, Rockville, 1995.
114. Grujić-Letić N, Rakić B, Šefer E, Rakić D, Nedeljković I, Kladar N, et al. Determination of 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) as one of the major classes of chlorogenic acid in commercial tea and coffee samples. *Vojnosanit Pregl* 2015; 72(11): 1018–1023.
115. Guvenc A, Arihan O, Altun ML, Dinc E, Baleanu D. Determination of Salicin Content of some *Salix L.* species by HPLC method. *Rev Chim.* 2007;58(1):8-12.
116. Lipinski C, Lombardo F, Dominy B, Feeney P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997; 23: 3–25.
117. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature.* 1994; 367(6460): 243–9.
118. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature.* 1996; 384(6610): 644–8.
119. Kryger G, Harel M, Giles K, Toker L, Velan B, Lazar A, et al. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculins. *Acta Crystallogr.* 2000; 56: 1385-94.

120. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009; 30(16): 2785–91.
121. Aybastier O, Isik E, Sahin S, Demir C. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Ind Crop Prod.* 2013; 44: 558-65.
122. Dai J, Mumper RJ. Review Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules.* 2010; 15: 7313-7352.
123. Selvamuthukumar M, Shi J. Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety.* 2017; 1: 61-81.
124. Alothman M, Bhat R, Karim AA. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem.* 2009; 115 (3): 785–8.
125. Blekić M, Jambark AR, Chemat F. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol.* 2011;3(1):32-47.
126. Lapornik B, Prošek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng.* 2005; 71: 214-22.
127. Qu W, Pan Z, Ma H. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *J Food Eng.* 2010; 99: 16–23.
128. Olugbami O, Gbadegisin M, Odunola O. In vitro free radical scavenging and antioxidant properties of ethanol extract of *Terminalia glaucescens*. *Pharmacognosy Res.* 2015; 7(1): 49-56.

129. Krimat S, Dob T, Lamari L, Boumeridja S, Chelghoum C, Metidji H. Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *J Coast Life Med.* 2014;2(6):478-83.
130. Durak A, Gawlik-Dziki U, Sugier D. Coffee enriched with willow (*Salix purpurea* and *Salix myrsinifolia*) bark preparation – Interactions of antioxidative phytochemicals in a model system. *J Funct Foods.* 2015;1106–16.
131. Makanjuola S. Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea–ginger blend. *Food Sci Nutr.* 2017; 5(6): 1179-85.
132. Kähkönen MP, Hopia a I, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 1999;47(10):3954–62.
133. Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules.* 2009;14:2167-80.
134. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredio FE, Ismadji S, et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *J Food Drug Anal.* 2014;22(3):296-302.
135. United States Pharmacopoeia, 24th ed.; NF 19, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 2002.
136. International Conference on Harmonization, guideline Q2A, Text on validation of analytical procedures, Federal register, Rockville, 1995.

137. International Conference on Harmonization, guideline Q2B, Validation of analytical procedures: methodology, Federal Register, Rockville, 1997.
138. Heyden YV, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001;24:723-53.
139. Julkunen-Tiitto R, Sorsa S. Testing the effects of drying methods on willow flavonoids, tannins and salicylates. *J Chem Ecol* (2001) 27: 779-89.
140. Palo RT. Distribution of birch (*Betula* spp.), willow (*Salix* spp.), and poplar (*Populus* spp.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *J Chem Ecol*. 1984; 10 (3): 499-520.
141. Julkunen-Tiitto R. A chemotaxonomic survey of phenolics in leaves of northern Salicaceae species. *Phytochemistry*. 1986; 25: 663-7.
142. Zaugg SE, Cefalo D, Walker EB. Capillary electrophoretic analysis of salicin in *Salix* spp. *J Chromatogr A*. 1997; 781:487-90.
143. Harbourne N, Marete E, Jacquier JC, O’Riordan D. Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). *LWT - Food Sci Technol*. 2009; 42: 1468–1473.
144. Kenstaviciene P, Nenortiene P, Kiliuvuene G, Zevzikovas A, Lukosius A, Kazlauskiene D. Application of high-performance liquid chromatography for research of salicin in bark of different varieties of *Salix*. *Medicina (Kaunas)* 2009;45(8):644–51.

145. Noleto-Dias C, Ward JL, Bellisai A, Lomax C, Beale MH. Salicin-7-sulfate: A new salicionoid from willow and implications for herbal medicine. *Fitoterapia*. 2018;127:166-72.
146. Sulima P, Przyborowski JA, Wiwart M. Willow bark – herbal raw material harvested from plants cultivated on arable lands. *Herba Pol*. 2006; 52 (4): 18-25.
147. Ikonen A, Tahvanainen J, Roininen H . Chlorogenic acid as an antiherbivore defence of willow against leaf beetles. *Entomol Exp Appl*. 2001; 99:47–54.
148. Julkunen-Tiitto, R. and Meier, B. 1992. Variation in growth and secondary phenolics among field-cultivated clones of *Salix myrsinifolia*. *Planta Med*. 58:77-80.
149. Pohjamo SP, Hemming JE, Willför SM, Reunaen MHT, Holmbom BR. Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots. *Phytochemistry*. 2003: 165-9.
150. Sharma V, Vaid N. Age related changes in indolic and phenolic compounds in leaves from enforced *Salix* shoot bud. *Indian J Plant Physiol*. 1997; 2: 207–210.
151. Qizhen D, Jerz G, Winterhalter P. Preparation of three flavonoids from the bark of *Salix alba* by High-speed countercurrent chromatographic separation. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2004; 27(20): 3257-64.
152. Duggan KC, Walters MJ, Musee J, Harp JM, Kiefer JR, Oates JA, et al. Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. *J Biol Chem*. 2010; 285(45): 34950–9.
153. Selvam C, Jachak SM, Thilagavathi R, Chakraborti AK. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant,

cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15(7): 1793-7.

154. Furse KE, Pratt DA, Schneider C, Brash AR, Porter NA, Lybrand TP. Molecular Dynamics Simulations of Arachidonic Acid-Derived Pentadienyl Radical Intermediate Complexes with COX-1 and COX-2: Insights into Oxygenation Regio- and Stereoselectivity. *Biochemistry* 2006;45(10):3206-3218.

155. Duthie GG, Wood AD. Natural salicylates: foods, functions and disease prevention. *Food Funct.* 2011; 2(9): 515-20.

156. Khan MTH, Orhan I, Şenol FS, Kartal M, Şener B, Dvorská M, et al. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem Biol Interact.* 2009; 181: 383-389.