



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ



Александра Д. Цветановић, дипл. инж.

**Оптимизација савремених екстракционих поступака за  
изоловање апигенина из цвета камилице (*Chamomilla recutita*  
L.) и карактеризација биолошке активности добијених  
екстраката**

– Докторска дисертација –

Нови Сад, 2016.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број:  
РБР

Идентификациони број:  
ИБР

Тип документације:  
ТД Монографска документација

Тип записа:  
ТЗ Текстуални штампани материјал

Врста рада (дипл., маг.,  
докт.):  
ВР Докторска дисертација

Име и презиме аутора  
АУ Александра Цветановић, дипл. инж.

Ментор (титула, име,  
презиме, звање):  
МН Др Јарослава Шварц-Гајић, ванредни професор

Наслов рада:  
НР Оптимизација савремених екстракционих поступака за изоловање апигенина из цвета камилице (*Chamomilla recutita* L.) и карактеризација биолошке активности добијених екстраката

Језик публикације:  
ЈП Српски, ћирилица

Језик извода:  
ЈИ Српски/енглески

Земља публикавања:  
ЗП Република Србија

Уже географско подручје:  
УГП Војводина

Година:  
ГО 2016.

Издавач:  
ИЗ Ауторски репринт

Место и адреса:  
МА Булевар Цара Лазара 1, 21000 Нови Сад, Србија

Физички опис рада:  
ФО Поглавља 7, страница 254, слика 84, табела 40, референци 362, прилога 9

Научна област: Технолошко инжењерство/биотехничке науке

НО

Научна дисциплина:  
НД

Фармацеутско инжењерство

Предметна одредница:  
ПО

Субкритична вода, апигенин, камилица, изолација биолошки активних молекула, биолошка активност екстраката камилице

УДК

Чува се:  
ЧУ

У библиотеци Технолошког факултета у Новом Саду, Булевар Цара Лазара 1, 21000 Нови Сад

Важна напомена:  
ВН

Нема

Извод:  
ИЗ

У оквиру ове докторске дисертације изведено је испитивање различитих екстракционих поступака за изоловање апигенина из цвета камилице, као и евалуација биолошке активности добијених екстраката. Полазни биљни материјал сачињавале су две групе латица камилице: ферментисане и неферментисане (нативне). Екстракција ферментисаних цветова је извођена применом ултразвучне екстракције користећи етанол као екстрагенс, а добијени екстракти су се одликовали изузетно високим садржајем апигенина. Оптимизација екстракције је била изведена применом методе одзивне површине. Применом електрон-спин резонанце испитана је антирадикалска активност екстраката. Додатно, фармаколошка вредност добијених екстраката је потврђена и одређивањем њиховог антимикуробног и антипролиферативног потенцијала. Нативни цветови камилице су екстраховани применом различитих екстракционих техника: микроталасне, ултразвучне, Soxhlet екстракције као и екстракције субкритичном водом. Екстракција водом у субкритичном стању се показала супериорнијом у односу на све остале технике у погледу садржаја укупних фенола и флавоноида. У циљу добијања екстраката са максималним садржајем апигенина изведена је оптимизација овог екстракционог процеса. Изоловање чистог апигенина је изведено из екстракта добијеног под оптималним екстракцијом условима (однос дрога:растварач 1:30, брзина мешања 3 Hz, притисак 45 bar, температура 115°C, време 30 мин, концентрација модификатора 0,001 M) применом поступка колонске хроматографије на стубу полиамида. Хемијски профил као и садржај појединачних полифенолних компонената у екстрактима добијеним на различитим притисцима, температурама и уз присуство модификатора различитих концентрација одређен је применом UHPLC-DAD-HESI-MS/MS. У свим анализираним екстрактима детектован је велики број полифенолних компонената, док

је апигенин у свима био доминантно једињење. Садржај апигенина у екстракту добијеном под оптималним екстракционим условима је износио 1.700,34 mg/kg. Применом седам различитих тестова извршена је евалуација антиоксидативног и антирадикалског потенцијала екстраката. Антимикробни потенцијал екстраката је одређен за осам различитих микробних линија. *in vitro* тестовима испитана је способност инхибиције  $\alpha$ -амилазе,  $\alpha$ -глукозидазе и тирозиназе. Деловањем на раст три хистолошки различите ћелијске линије, испитана је антипролиферативна активност екстраката добијених субкритичном водом. Антимотилитетна активност обе групе екстраката (ферментисаних и неферментисаних цветова) одређена је у *in vitro* условима.

---

Датум прихватања теме од стране НН већа:  
ДП

29.09.2014.

---

Датум одбране:  
ДО

---

Чланови комисије (име и презиме/титула/звање/назив организације/статус)  
КО

др Зоран Зековић, редовни професор, Технолошки факултет, Нови Сад, председник  
др Весна Николић, редовни професор, Технолошки факултет, Лесковац, члан  
др Јарослава Шварц-Гајић, ванредни професор, Технолошки факултет, Нови Сад, члан

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

---

Identification number:

INO

---

Document type: Monographic publication  
DT

---

Type of record: Textual material, printed  
TR

---

Contents code: PhD Thesis  
CC

---

Author: Aleksandra Cvetanović  
AU

---

Mentor: dr Jaroslava Švarc-Gajić, associated professor  
MN

---

Title: Optimization of novel extraction techniques for apigenin  
isolation from chamomile flowers (*Chamomilla recutita* L.)  
and characterization of biological activity of obtained extracts  
TI

---

Language of text: Serbian, Cyrillic  
LT

---

Language of abstract: Serbian / English  
LA

---

Country of publication: Republic of Serbia  
CP

---

Locality of publication: Vojvodina  
LP

---

Publication year: 2016  
PY

---

Publisher: Author's reprint  
PU

---

Publication place: Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1  
PP

---

Physical description: Chapters 7, pages 254, figures 84, tables 40, references 362,  
annexes 9.  
PD

---

Scientific field: Technological engineering/ Biotechnical sciences  
SF

Scientific discipline SD	Pharmaceutical engineering
Subject, Key words SKW	Subcritical water extraction, apigenin, chamomile, isolation of biologically active molecules, biological activity of chamomile extracts
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	
Accepted on Scientific Board on: AS	29.09.2014.
Defended: DE	<p>In the frame of this thesis different extraction approaches for apigenin isolation from chamomile ligulate flowers were examined and biological activity of obtained extracts was evaluated. Starting plant samples included fermented and nonfermented (native) flowers.</p> <p>Extraction of fermented flowers was performed by using ultrasound-assisted extraction with ethanol. The concentration of apigenin was high in obtained extracts. Optimization of the extraction procedures was performed by response surface methodology. Antiradical activity of observed extracts was examined by electron-spin resonance spectroscopy. Furthermore, pharmacological potential of obtained extracts was confirmed by determining their antimicrobial and antiproliferative activity.</p> <p>Native chamomile flowers were extracted by different extraction techniques: microwave, ultrasound, Soxhlet and subcritical water extraction. Subcritical water extraction showed to be superior in comparison to other applied techniques in respect to total phenols and flavonoids content. Optimization of the subcritical water extraction was directed to maximization of apigenin content. Isolation of pure apigenin from extracts obtained under optimal extraction conditions (sample-to-solvent ratio 1:30, agitation rate 3 Hz, temperature 115°C, pressure 45 bar, extraction time 30 min) was performed by preparative chromatography. Chemical profiles and content of individual polyphenolic components in extracts obtained at different pressures, temperatures, and with different concentrations of a modifier was determined by UHPLC-DAD-HESI-MS/MS. In all analyzed extracts the great number of polyphenolic components was detected while apigenin was the dominant compound in all extracts. Content of apigenin in the extract obtained under optimal extraction condition was</p>

1,700.34 mg/kg. Antioxidant and antiradical potential of extracts was evaluated according to different mechanisms. Antimicrobial potential of extracts was determined against eight different microbial strains. Ability of extracts to inhibit  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and tyrosinase was determined by *in vitro* assays. Antiproliferative activity of subcritical water extracts was defined by testing their influence on the growth of three histologically different cell lines.

Anti-intestinal motility activity of both group of extracts (native and fermented) was determined by *in vivo* experiments.

---

Thesis Defend Board:  
DB

dr Zoran Zeković, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, president

dr Vesna Nikolić, full professor, Faculty of Technology, Leskovac, member

dr Jaroslava Švarc-Gajić, associated professor, Faculty of Technology, Novi Sad, member

*Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у лабораторијама за Фармацеутско инжењерство и лабораторији за Инструменталне методе анализе Технолошког факултета у Новом Саду. Користим овај јединствени тренутак да изразим своју несебичну и искрену захвалност свима онима који су на различите начине пружили своју помоћ и допринели да тренуци проведени на изради ове докторске дисертације буду јединствено и драгоцено искуство.*

*Пре свега велику захвалност дугујем свом ментору, Проф. Др Јарослави Шварц-Гајић која је током свих година заједничког рада на овој дисертацији за мене постала много више од ментора. Хвала јој за несебичну помоћ и разумевање од првог дана наше сарадње, за спремност и жељу да своје знање подели самном, за свеобухватно надгледање тока рада, обликовање и писање рада. За велики оптимизам, снагу и ветар у леђа и онда када није све ишло по плану.*

*Проф др Жики Лепојевићу са којим сам начинила своје прве истраживачке кораке и уронила у свет науке дугујем посебну захвалност. Хвала на свестраној и професионалној подршци и помоћи, на пруженом знању, свему ономе што сам од њега научила, а посебно хвала за сву љубав ка апигенину коју је на мене пренео. Захвалност дугујем и члановима комисије. Проф. др Зорану Зековићу хвала на прилици за усавршавањем у оквиру Пројекта под његовим вођством. Проф. др Весни Николић захваљујем на указаној части прихватањем чланства у Комисији.*

*Велику захвалност за указано поверење, отвореност и спремност да ми изађе у сусрет сваки пут када ми је било потребно, на свим добронамерним саветима и сугестијама, а пре свега за искрено пријатељство дугујем доценту др Марији Радојковић. Неизмерно се захваљујем свом драгом колеги Саши Буровићу на подршци и помоћи током писања рада, драгоценим сугестијама и саветима, искреном пријатељству и свим речима којима ме је охрабривао и подстицао.*

*Славици Остојић, као и свим колегама из свог тима, велико хвала на сарадњи у свакодневним истраживачким обавезама, као и на свим лепим тренуцима и осмесима од раних јутарњих сати. Драгим колегиницама са Катедре за примењене и инжењерске хемије хвала на лепим и пријатељским тренуцима током извођења експерименталног рада у њиховој лабораторији.*

*Искрено се захваљујем свима онима који су својом помоћи дали печат експерименталним резултатима у овом раду. Велико хвала Проф. др Љубиши Николићу и драгом колеги Саши Савићу са Технолошког факултета у Лесковцу на помоћи и сарадњи. Проф, др Живославу Тешићу и колеги Урошу Гашићу са Хемијског факултета у Београду хвала на великој помоћи коју су ми пружили у области хроматографије. Доценту др Павлу Маишковићу са Агрономског факултета у Чачку велико хвала на ентузијазму, пријатељству и помоћи око анализа биолошких карактеристика добијених узорака. Драгим колегиницама са Медицинског факултета у Осиеку дугујем захвалност за помоћ али и за велику колегијалност и пријатељство. Такође, желела бих да се захвалим и колегама са Медицинског факултета у Новом Саду на њиховој помоћи током извођења *in vivo* експеримената. Колеги са Природно-математичког факултета у Селцуку у Турској велико хвала на помоћи око испитивања ензимске активности екстраката. Дипл.инж. машинства Александру Гајићу хвала на техничкој помоћи и подршци.*

*Ипак, највећу захвалност дугујем својој породици, својим родитељима и сестри. Хвала на свим приликама да радим и стварам. Хвала на свему што су учинили за мене и за сву љубав коју ми пружају. Својим деловањем су ми дали добар пример и били добар узор. Они су учинили да данас будем овде, стога своју докторску дисертацију посвећујем управо њима.*

*Александра*



## **Списак публикација проистеклих непосредно из рада на докторској дисертацији**

### **Рад у врхунском међународном часопису, М-21**

**Cveatnović A., Švarc-Gajić J., Zeković Z., Vulić J., Mašković P., Savić S., Četković G.** (2015): *Comparative analysis of antioxidant, antimicrobiological and cytotoxic activities of native and fermented chamomile ligulate flower extracts.* *Planta*, 242, 721-732.

**Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Mašković P., Savić S., Nikolić Lj.** (2015): *Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds.* *Industrial Crops and Products*, 65, 582-591.

### **Рад у међународном часопису, М-24**

**Zeković, Z., Cvetanović, A., Pavlić, B., Švarc-Gajić, J., Radojković, M.** (2014): *Optimization of the polyphenolics extraction from chamomile ligulate flowers using response surface methodology.* *International Journal of Plant Research*, 4, 43-50.

### **Рад у часопису националног значаја, М-52**

**Zeković Z., Cvetanović A., Pavlić B., Švarc-Gajić J., Radojković M.** (2015): *The optimization of the extraction process of flavonoids from fermented chamomile ligulate flowers.* *Advanced technologies*, 4, 54-63.

### **Предавање по позиву са међународног скупа штампаног у изводу, М-31**

**Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Mašković P., Radojković M., Zeković Z.** (2014): *Subcritical water extraction of biologically active compounds from natural sources.* *Natural resources, green technology and sustainable development*, November 2014, Zagreb, Croatia.

### **Саопштење са међународног скупа штампаног у целини, М-33**

**Švarc-Gajić J., Cvetanović A.** (2015): *The influence of temperature on apigenin extraction from chamomile (*Matricaria recutita*) by superheated water.* *International Conference on Chemical and Bioprocess Engineering*, February 2015, Rio de Janeiro, Brazil.

**Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Adamović D., Zeković Z., Spasojević M.** (2014): *Determination of apigenin and apigenin-7-O-β-glucoside in chamomile extracts.* *First International Student Environmental Conference*, November 2014, Novi Sad, Serbia.

**Cvetanović A., Lepojević Ž., Radojković M., Zeković Z.** (2013): *Volatile and non-volatile compounds in chamomile.* *3<sup>th</sup> International Congress Engineering, Environment and Materials in*

Processing Industry, March 2013, Jahorina, Bosnia and Herzegovina.

**Саопштење са међународног скупа штампаног у изводу, М-34**

**Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Zeković Z., Radojković M.** (2015): *Subcritical water extraction - a novel extraction approach for hydrolysis and recovery of bio-potent molecules*. International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (ISPMF). June 2015, Shanghai, China.

**Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Mohamed Elgndi A., Vladić J., Zeković Z.** (2014): *Dry powder extract of chamomile ligulate flowers-potential source of natural spasmolytic compound*. The 18<sup>th</sup> International Congress Phytopharm, July 2014, St-Petersburg, Russia.

Mohamed Elgndi A., **Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Radojković M., Zeković Z.** (2014): *The influence of the preservation time on changes in characteristics of the dry extracts of autofermented chamomile ligulate flowers*. The 18<sup>th</sup> International Congress Phytopharm. July 2014, St-Petersburg, Russia.

Jukić M., **Cvetanović A., Mišković K., Švarc-Gajić J., Glavaš-Obrovac Lj.** (2014): *Influence of extraction methods on antiproliferative potential of chamomile flowers extracts*. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology The Interplay of Biomolecules HDBMB, October 2014, Zadar, Croatia.

Jukić M., Leović J., **Cvetanović A., Mišković K., Švarc-Gajić J., Glavaš-Obrovac Lj.** (2014): *Antiproliferative activity of chamomile extracts on normal and human cell*. Ist László Cholnoky Interdisciplinary Conference, May 2014, Pécs, Hungary.

**Cvetanović, A., Radojković, M., Švarc-Gajić, J., Vidović, S., Zeković, Z.** (2013): *Optimisation of extraction of antioxidants from chamomile ligulate flowers by response surface methodology (RSM)*. The 17<sup>th</sup> International Congress Phytopharm, July 2013, Vienna, Austria.

**Cvetanović A., Radojković M., Vidović S., Milošević S., Lepojević Ž., Zeković Z.** (2012): *Extracts of native and autofermented chamomile ligulate flowers obtained by different extraction methods*. The 14<sup>th</sup> Ružička days, September 2012, Vukovar, Croatia.

**Cvetanović A., Lepojević Ž., Radojković M., Vidović S., Milošević S., Zeković Z.** (2012): *The antioxidant activity of chamomile ligulate flowers (Matricaria chamomile L.)*. 22<sup>nd</sup> Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 2012, Ohrid, Republic of Macedonia.

**Саопштење са националних скупова штампано у изводу, М-64**

**Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Vulić J., Mašković P., Zeković Z., Četković G.** (2015): *The evaluation of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of fermented and non-fermented chamomile flowers*. 11<sup>th</sup> Symposium "Novel Technologies and Economic Development", October 2015, Leskovac, Srbija.

**Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Zeković Z., Mašković P., Radojković M., Adamović D. (2015):** *Anti-proliferative and anti-microbial activity of chamomile extracts obtained by superheated water.* 52<sup>nd</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society, May 2015, Novi Sad, Serbia.

**Cvetanović A., Švarc - Gajić J. Zeković Z., Adamović D. (2013):** *The microwave extraction of phenolic compounds from chamomile ligulate flowers.* 10<sup>th</sup> Symposium “Novel technologies and economic development”, October 2013, Leskovac, Serbia.

**Cvetanović A., Zeković Z., Lepojević Ž., Milošević S. (2011):** *Chamomile - review of previous research.* 18<sup>th</sup> Scientific Meeting Production and Marketing of Medicinal and Aromatic Plants and Spices, Septembar 2011, Bački Petrovac, Serbia.

# САДРЖАЈ

1.	<b>УВОД</b>	1
2.	<b>ТЕОРИЈСКИ ДЕО</b>	4
2.1.	<b>Природни полифеноли</b>	5
2.1.1.	Флавоноиди	7
2.1.2.	Физичко-хемијска својства флавоноида	10
2.1.3.	Биолошки значај и активност флавоноида	10
2.1.4.	Флавоноиди камилице	12
2.1.5.	Апигенин	16
	<i>Биосинтеза апигенина</i>	17
	<i>Апсорпција и метаболизам апигенина</i>	19
	<i>Биолошка активност апигенина</i>	20
2.2.	<b>Биолошка активност природних једињења</b>	22
2.2.1.	Антиоксидативно деловање	22
	<i>Слободни радикали и њихови извори</i>	22
	<i>Оксидативни стрес</i>	24
	<i>Антиоксиданти и антиоксидативни системи</i>	27
	<i>Флавоноиди као антиоксиданси</i>	30
2.2.2.	Антимикробно деловање	35
	<i>Антимикробна активност камилице</i>	38
2.2.3.	Антиканцерогена активност	40
	<i>Ћелијска апоптоза – програмирана ћелијска смрт</i>	44
	<i>Молекуларни механизми антиканцерогеног деловања биљака</i>	46
2.3.	<b>Екстракција лековитог биља</b>	48
2.3.1.	Савремене екстракционе технике	51
2.3.2.	Ултразвучна екстракција	52
2.3.3.	Микроталасна екстракција	56
2.3.4.	Технике екстракције под повишеним притиском	59
2.3.4.1.	Убрзана течна екстракција (ASE – Accelerated Solvent Extraction)	60
2.3.4.2.	Екстракција флуидима у суперкритичном стању	63
2.3.4.3.	Екстракција водом у субкритичном стању	66
	<i>Апаратура за извођење екстракције субкритичном водом</i>	70
	<i>Употреба субкритичне воде за екстракцију полифенолних једињења биљака</i>	71
3.	<b>ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО</b>	75
3.1.	Хемикалије и реагенси	77
3.2.	Биљни материјал	77
3.2.1.	Основна испитивања биљног материјала	78

3.2.2.	Ферментација биљног материјала	78
<b>3.3.</b>	<b>Екстракција</b>	79
3.3.1	Екстракција ферментисаних језичастих цветова и оптимизација процеса екстракције применом методе одзивне површине	79
3.3.2.	Екстракција нативних цветова камиице	82
	<i>Soxhlet екстракција</i>	82
	<i>Ултразвучна екстракција</i>	82
	<i>Микроталасна екстракција</i>	82
	<i>Екстракција водом у субкритичном стању</i>	82
3.3.2.1.	Оптимизација процеса екстракције субкритичном водом	84
3.4.	<b>Испитивање Хемијског Састава Екстраката</b>	85
3.4.1.	Укупни принос екстракције	85
3.4.2.	Садржај укупних фенола	85
3.4.3.	Садржај укупних флавоноида	86
3.4.4.	Одређивање садржаја апигенина помоћу танкослојне хроматографије	87
3.4.5.	UHPLC–DAD MS/MS анализа	87
3.5.	<b>Изолација Апигенина</b>	88
3.5.1.	НPTLC-UV/VIS идентификација апигенина	89
3.6.	<b>Испитивање биолошке активности одабраних екстраката</b>	89
3.6.1.	Одређивање антирадикалске активности електрон спин резонантном (ESR) спектроскопијом	89
	<i>ESR спектрална анализа утицаја екстраката на стварање и трансформацију хидроксила радикала</i>	89
	<i>ESR спектрална анализа утицаја екстраката на стварање и трансформацију супероксидног анјон радикала</i>	90
3.6.2.	Спектрофотометријско одређивање антиоксидативног и антирадикалског потенцијала	91
	<i>Одређивање способности неутрализације DPPH радикала</i>	91
	<i>Одређивање способности неутрализације хидроксила радикала</i>	93
	<i>Одређивање способности неутрализације ABTS радикала</i>	93
	<i>Метода одређивања редуковане способности</i>	95
	<i>Одређивање способности хелирања металних јона</i>	95
	<i>Одређивање инхибиције липидне пероксидације</i>	96
	<i>Одређивање укупне антиоксидативне активности</i>	96
3.6.3.	Одређивање антимицробне активности екстраката	97
3.6.4.	Одређивање активности инхибиције одабраних ензима	98
3.6.5.	Одређивање антипролиферативне активности МTT тестом	99
3.6.5.1.	Морфолошке промене	100
3.6.5.2.	Анализа апоптозе	100
3.6.6.	<i>In vivo</i> одређивање антимиотилитетне активности	101

4.	<b>РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА</b>	103
4.1.	<b>Основна испитивања биљног материјала</b>	104
4.2.	<b>Екстракција ферментисаних језичастих цветова камилице</b>	105
4.2.1.	Оптимизација процеса екстракције ферментисаних цветова камилице применом методе одзивне површине	106
4.2.1.1.	Одабир независних променљивих	106
4.2.1.2.	Оптимизација применом RSM методе	108
	<i>Садржај укупних фенола у екстрактима ферментисаних цветова камилице</i>	109
	<i>Садржај укупних флавоноида у екстрактима ферментисаних цветова камилице</i>	112
	<i>Садржај апигенина у екстрактима ферментисаних цветова камилице</i>	114
4.2.1.3.	Одређивање и валидација оптималних процесних параметара	115
4.3.	<b>Екстракција нативних цветова камилице</b>	117
4.3.1.	Поређење екстракционих техника	117
4.3.2.	Оптимизација субкритичне екстракције водом	121
4.3.2.1.	Одређивање оптималног односа дрога:растварач	121
4.3.2.2.	Утицај брзине мешања	123
4.3.2.3.	Утицај притиска	124
4.3.2.4.	Утицај температуре	126
4.3.2.5.	Утицај времена екстракције	128
4.3.2.6.	Утицај модификатора (косолвента)	130
4.4.	<b>Изолација и идентификација апигенина</b>	131
4.5.	<b>UHPLC-DAD-HESI-MS/MS анализа</b>	134
4.5.1.	Анализа ферментисаних и нативних цветова камилице	134
4.5.2.	Квалитативна анализа екстраката добијених субкритином водом	136
4.5.3.1.	Утицај притиска на хемијски профил СКВ екстраката	139
4.5.3.2.	Утицај температуре на хемијски састав СКВ екстраката	140
4.5.3.3.	Утицај модификатора на хемијски састав СКВ екстраката	146
4.6.	<b>Биолошка активност екстраката камилице</b>	150
4.6.1.	<b>Антиоксидативна активност</b>	150
4.6.1.1.	Одређивање антирадикалске активности екстраката ферментисаних цветова електрон спин резонантном спектроскопијом (ESR)	150
	<i>Утицај екстраката на настанак и трансформацију хидроксил радикала</i>	150
	<i>Утицаја екстраката на настанак и трансформацију супероксидног анион радикала</i>	153
4.6.1.2.	Утицај екстракционе технике на антиоксидативну активност	156
4.6.1.3.	Антиоксидативна активност СКВ екстраката камилице	159

	<i>Способност инхибиције DPPH радикала</i>	159
	<i>Способност инхибиције OH радикала</i>	161
	<i>Способност инхибиције ABTS радикала</i>	163
	<i>Одређивање редукционе способности</i>	164
	<i>Одређивање способности хелирања металних јона</i>	166
	<i>Способност инхибиције липидне пероксидације</i>	167
	<i>Укупна антиоксидативна активност</i>	169
4.6.2.	<b>Антимикробна активност екстраката</b>	171
4.6.2.1.	Антимикробна активност екстраката ферментисаних цветова	171
4.6.2.2.	Антимикробна активност екстраката нативних цветова камилице добијених различитим екстракционим техникама	173
4.6.2.3.	Антимикробна активност СКВ екстраката нативних цветова камилице	175
4.6.3.	<b>Одређивање способности инхибиције одабраних ензима</b>	178
4.6.3.1.	Инхибиција $\alpha$ -амилазе и $\alpha$ -глукозидазе	178
4.6.3.2.	Инхибиција тирозиназе	183
4.6.4.	<b>Одређивање антипролиферативне активности екстраката камилице</b>	185
4.6.4.1.	Одређивање антипролиферативне активности екстраката ферментисаних цветова камилице	185
4.6.4.2.	Антипролиферативна активност екстраката нативних цветова камилице добијених различитим екстракционим техникама	186
4.6.4.3.	Антипролиферативна активност СКВ екстраката цветова камилице	187
4.6.4.4.	Цитотоксично деловање апигенина изолованог из цвета камилице	191
4.6.4.5.	Морфолошке промене на HeLa ћелијској линији	192
4.6.4.6.	Проапоптотичко деловање екстраката камилице на HeLa ћелије	194
4.6.5.	<b><i>In vivo</i> одређивање анти-мотилитетне активности екстраката нативних и ферментисаних цветова</b>	197
5.	<b>ЗАКЉУЧЦИ</b>	200
6.	<b>ЛИТЕРАТУРА</b>	204
7.	<b>ПРИЛОГ</b>	237

# *1. Увод*



Последњих деценија научна јавност све више се окреће природним изворима биолошки активних молекула. Апигенин је само једно од многобројних природних биоактивних једињења које је предмет опсежних испитивања. Ово једињење је флавоноидне структуре, а његова биолошка активност је потврђена многобројним истраживањима. Апигенин испољава антиоксидативна, антимулагена, антиинфламаторна, антинеопластична, пролиферативна и антиканцерогена својства. Оно што ово једињење издваја од осталих јесте чињеница да не изазива нежељене метаболичке реакције, а одликује се ниском токсичношћу и високом селективношћу према канцерогеним ћелијама. Захваљујући оваквим карактеристикама апигенин се сматра једињењем високе биолошке вредности. Због његовог широког спектра деловања, постоји оправдана потреба за његовом изолацијом из природних извора, а његовим најзначајнијим извором сматра се камилица. Апигенин је у камилици присутан у облику агликона, као и у својим везаним облицима (апигенин-7-*O*- $\beta$ -глукозид и његови ацетилувани деривати).

Досадашњи рад на изолацији апигенина подразумевао је примену конвенционалних техника екстракције, применом различитих органских растварача. Органски растварачи врло често могу имати нежељене ефекте по здравље људи, а такође се одликују и недовољном селективношћу што доводи до ко-екстраховања интерферирајућих компоненти. Будући да трагови органских растварача увек заостају у финалном производу, овакав начин изоловања биолошки активних једињења није погодан за примену у прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији. Још један од недостатака конвенционалних техника добијања апигенина јесте и његов изузетно низак садржај у добијеним екстрактима. Током протекле деценије у фокусу научног интересовања је развој нових технологија које се покуравају строгим захтевима безбедности и очувања природне средине. Развијене су савремене технике екстракције и изолације биолошки активних молекула. Са аспеката зелене хемије екстракција флуидима у суб- и суперкритичном стању је добила на изузетној популарности. Ови флуиди замењују токсичне органске раствараче нетоксичним флуидима уз истовремено постизање знатно боље селективности и ефикасности екстракције. Посебну пажњу својим зеленим карактером и солватационим особинама привлачи вода. Вода у свом субкритичном стању представља изванредан алтернативан растварач за издвајање природних биоактивних једињења првенствено због селективности, која се драстично мења са притиском и температуром, нетоксичности,

ефикасности и цене. Иако је апигенин нерастворан у води собне температуре, водом у субкритичном стању се могу остварити значајни приноси. На овај начин добијене екстракте могуће је директно примењивати у прехранбеним и фармацеутским производима. Другим речима, овакви производи не захтевају додатно пречишћавање што у значајној мери смањује цену њихове производње. Оправданост са економског аспекта додатно повећава и чињеница да је вода најјефтинији флуид. Подешавањем радне температуре може се манипулисати њеном поларношћу, а самим тим и селективношћу. Финим подешавањима услова екстракције могуће је значајно повећати садржај апигенина у добијеним екстрактима уз истовремено смањење садржаја интерферирајућих компонената, чиме је даља изолација чисте компоненте олакшана.

Циљ ове докторске дисертације је био поређење различитих екстракционих техника за издвајање биолошки активних једињења из камилице, са посебним акцентом на апигенин, који се сврстава међу најзначајније биомолекуле ове биљне врсте. Истраживања у оквиру дисертације била су фокусирана ка испитивању екстракције камилице субкритичном водом, у специјално дизајнираном екстрактору домаће конструкције и производње. Са циљем искоришћења високог хидролитичког потенцијала субкритичне воде, оптимизација процеса екстракције је вођена у правцу максималне конверзије везаних облика апигенина у агликон. Испитане су и дефинисане оптималне вредности радног притиска, температуре, брзине мешања, времена екстракције, као и тип и садржај модификатора. Након екстракције дефинисан је поступак препаративног издвајања апигенина из укупног екстракта применом колонске хроматографије. Хемијски профил екстраката је дефинисан применом UHPLC-DAD-HESI-MS/MS технике. Карактеризација биолошке активности добијених екстраката извођена је дефинисањем антиоксидативног, антимикробног, антипролиферативног капацитета, као и одређивањем способности екстраката ка инхибицији одабраних ензима. Антимотилитетно деловање екстраката камилице је дефинисано *in vivo* тестовима.

## ***2. Теоријски део***

## 2.1. Природни полифеноли

Биљни полифеноли представљају најзначајније и најраспрострањеније секундарне метаболите биљака. Њихова улога и значај су вишеструки, пре свега њихова синтеза представља један од механизма биљака против штетних утицаја видљиве и ултраљубичасте светлости, као и против напада микроорганизама и других штеточина.

У својој основи ова једињења садрже ароматични прстен са хидроксилним (ОН) супституентима. Могу се јавити у облику агликона или могу имати везану шећерну компоненту преко једне или више хидроксилних група (гликозиди). Од сахараида који улазе у њихов састав најчешће се срећу моносахариди попут глукозе, галактозе, арабинозе, рамнозе, ксилозе, манозе, али се могу наћи и у облику ди-, три- или тетрасахарида.

С обзиром на њихову велику разноликост, класификација биљних полифенола је веома комплексна. Самим тим, у литератури се сусреће велики број подела ових једињења. Ипак, ова једињења се најчешће класификују према својој хемијској структури (табела 1) или биогенетском пореклу.

Табела 1. Структурне класе биљних полифенола (Поповић, 2001).

Број С-атома	С-скелет	Класа
6	C <sub>6</sub>	Прости феноли
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Хидроксибензоати
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ацетофенони и фенилацетати
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Кумарини, хромони, хидроксицинамати, фенилпропени
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Нафтохинони
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Ксантони
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Стилбени и антрахинони
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Флавоноиди
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Лигнани
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Бифлавоноиди
n	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Катехол меланини
n	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Лигнини
n	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Кондензовани танини

Биогенетски пут настанка полифенола може бити различит. Деривати фенилпропана и фенилпропаноида настају у процесу одвијања шикимат-арогенатног пута, такође познатог и као пут шикиминске киселине. Шикиминска киселина настаје кондензацијом

фосфоенолпирувата и еритроза-фосфата, и представља главни прекурсор у синтези ароматичних аминокиселина попут фенилаланина, тирозина и триптофана. Пут шикиминске киселине представља и пут настанка есенцијалних кофактора (фолна киселина) и важних структурних материја (лигнини), као и великог броја других секундарних метаболита (алкалоиди, антибиотици и др.) (Грбовић, 2010).

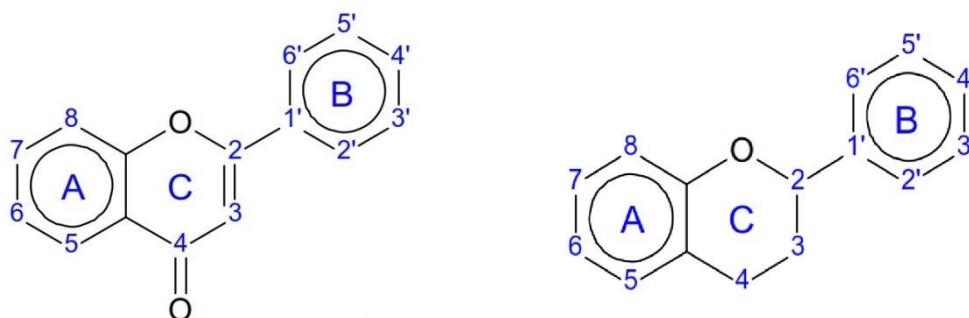
Други начин одвијања биосинтезе фенолних једињења је ацетат-малонатни пут, познат још и под називима поликетидни или ацетогенински пут. Овим метаболичким путем се добијају фенолна једињења попут хинона, антрахинона, хромона, изокумарина, флавоноида, стилбеноида, стирилипирона и сл.

Поједине групе полифенолних једињења могу бити синтетисане и комбинацијом ова два пута, што представља мешовити пут биогенерисања полифенола. Биосинтеза полифенолних једињења се контролише ендогено током раста биљке (Macheix и сар., 1990; Strack, 1997) или егзогеним факторима као што су светлост, температура, оштећења и други фактори који индукују стрес (Dixon и Paiva, 1995).

Последњих деценија фенолни секундарни метаболити привлаче велику пажњу због свог широког спектра фармаколошких активности. Велики број студија потврдио је њихову антимикробну, антиоксидативну, хепатопротективну, антиинфламаторну, вазопротективну и цитостатичку активност (Shukla и сар., 1992; Takasaki и сар., 1995; Tandon и сар., 1995; Oh и сар., 2008; Мимица-Дукић и Божин, 2008), због чега је велика пажња научне јавности усмерена ка овим једињењима. Полифенолна једињења су делом одговорна и за сензорна својства хране, као и за њене здравствене ефекте. Поједина полифенолна једињења, попут деривата бензоеве и циметне киселине, могу послужити као алелопатске супстанце (Величковић, 2013).

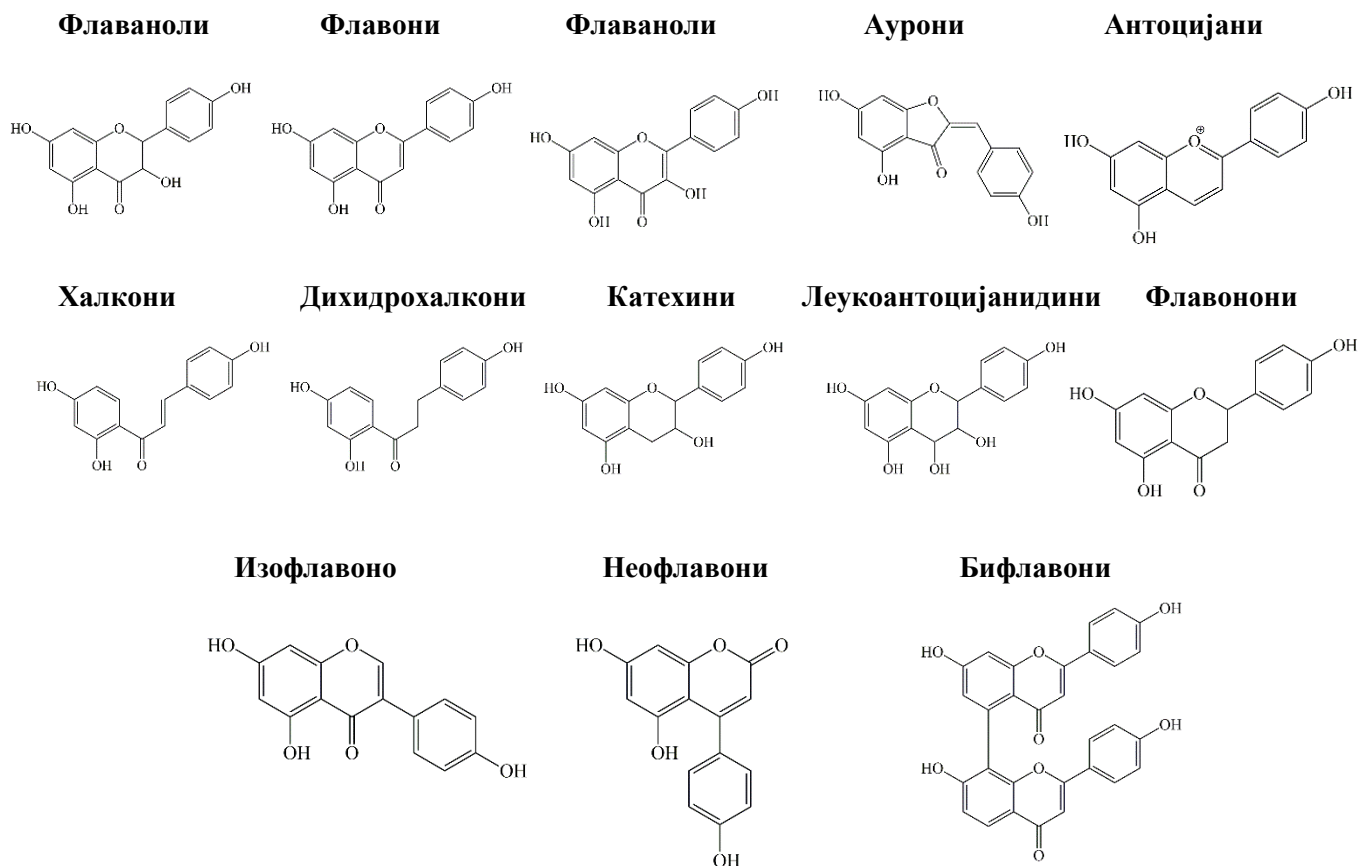
### 2.1.1. Флавоноиди

Прво једињење из ове групе полифенола изоловао је Костанески 1895. године, и назвао га „флавор“ те је по њему и читава група ових једињења добила назив флавоноиди. Данас флавоноиди представљају највећу групу биљних полифенола присутних у гликозидној или агликонској форми, а од којих је изоловано чак преко 6.000 (Орчић, 2010). Флавоноиди су жути, црвени или љубичасти пигменти распрострањени у свим органима биљака. У основи молекула флавоноида може се наћи:  $\gamma$ -пирон (пиран-4-он); бензо- $\gamma$ -пирон (хромон) или 2-фенил-бензо- $\gamma$ -пирон (флавор). Сви флавоноиди имају заједничку  $C_6-C_3-C_6$  структуру изведену од флаворна или флаворана (слика 1).



Слика 1. Основне структуре флаворна и флаворана.

Флавоноиди могу бити хидроксиловани, алкиловани, гликозиловани (моно- или олигосахаридима) или се јављају у агликонској форми, а понекад могу садржати и ацил-групе везане у разним положајима на основној флавоноидној структури или гликозидном делу структуре (Harborne и сар., 1999). Веома често флавоноиди изражавају своју склоност ка умрежавању и полимеризацији (Winkel–Shirley, 2001), а променом оксидационог стања алифатичног низа настају различите класе флавоноида (слика 2). Посебне класе флавоноида могу настати везивањем прстена В за положај 3 или 4 централног прстена (изофлаворни и неофлаворни) или спајањем две флаворне јединице (бифлаворни).

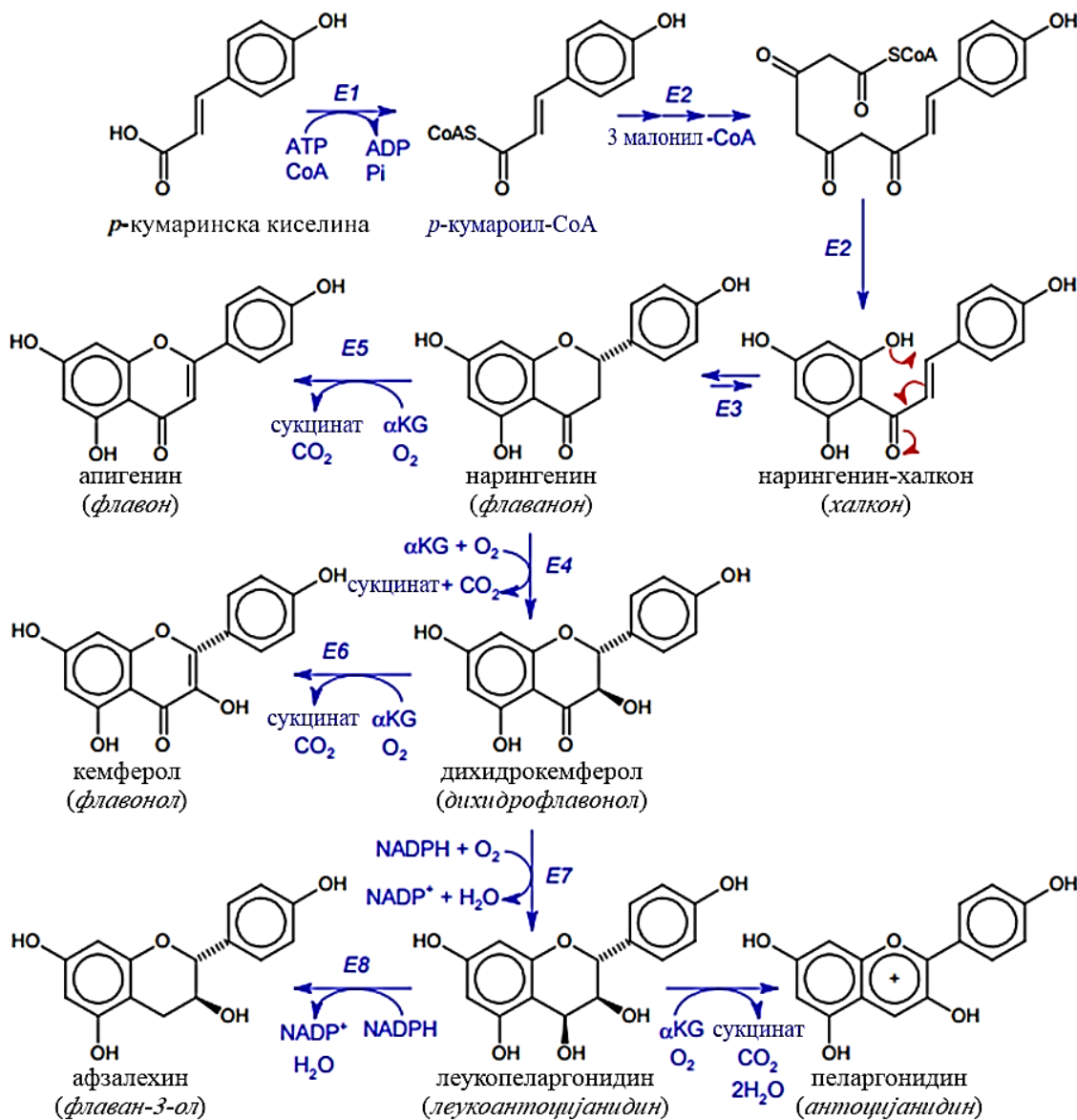


Слика 2. Различите класе флавоноидних једињења.

Гликозиди флавоноида су најчешће присутни у виду О-гликозида, а ређе се могу наћи и у облику С-гликозида. Велики број шећера може улазити у састав гликозидних јединица флавоноида од којих је најчешћа D-глюкоза. За њом следе D-галактоза, L-рамноза, L-арабиноза, D-ксилоза, D-апиоза и D-глукуронска киселина (Williams и Harborne, 1994; Iwashina, 2000; Hollman и Arts, 2000). Гликозилација се најчешће јавља у позицији 3, ређе у позицији 7, а изузетно ретко у позицијама 3', 4' и 5 код флавонола, односно у позицији 7 код флавонола (Hollman и Arts, 2000).

Биогенетски пут настанка флавоноида је мешовит, односно започиње у процесу шикимат-арогенатног пута током којег се формирају прстенови В и С, док се прстен А формира током одвијања биосинтетичког ацетатно-малонатног циклуса. Наиме, током циклуса шикиминске киселине долази до настанка фенилпропенских киселина које се укључују у ацетатни пут у виду тиоестара са коензимом А (CoA). При овоме долази до елонгације бочног низа помоћу малоил-СоА. Формирани поликетидни низ даље подлеже Клајзеновој реакцији кондензације при чему настаје прстен А флавоноидног молекула.

Добијени халкон представља главни прекурсор за биосинтезу свих осталих класа флавоноида (слика 3) (Dewick, 2009). Ова тачка у биосинтези представља „тачку гранања“.



Слика 3. Биогенетски пут настанка флавоноида.

E1-4-кумарат- $\text{CoA}$  лигаза (EC 6.2.1.12), E2-нарингенин-халкон синтаза (флаванон синтаза, EC 2.3.1.74), E3-халкон изомераза (EC 5.5.1.6), E4-флаванон диоксигеназа (EC 1.14.11.9), E5-флавонол синтаза (EC 1.14.11.22), E6-флавонол синтаза (EC 1.14.11.23), E7-дихидрокемферол 4-редуктаза (EC 1.1.1.219), E8-леукоантоцијанидин редуктаза (EC 1.17.1.3), E8-леукоцијанидин оксигеназа (EC 1.14.11.19) (Dewick, 2009)



### 2.1.2. Физичко-хемијска својства флавоноида

Флавоноиди биљака спадају у ред чврстих, безбојно или жуто обојених супстанци са изузетком антоцијана чија боја може да варира од светло розе до плаве. Агликони флавоноида представљају липофилне компоненте добро растворне у неполарним растварачима, док су флавоноидни хетерозиди растворни у води, алкохолима и поларним растварачима. Они су одговорни за боју цветова, плодова и листова биљака.

Спектроскопска истраживања флавоноида указују на постојање два главна апсорпциона максимума у UV/VIS спектру флавоноида. Први је апсорпциони максимум који се уочава у области 240-285 nm, а који потиче од  $\pi$ - $\pi^*$  прелаза у А прстену (бензенски систем), док се други апсорпциони максимум јавља у области 300-400 nm, и потиче од прелаза у В прстену. Флавоноиди који апсорбују у UV области обично се називају копигментима, док праве пигменте представљају флавоноиди који апсорбују у видљивој области спектра. Такви флавоноиди су антоцијани који показују широк опсег боја.

Екстракција флавоноида из природног материјала се може изводити водом или, још ефикасније, 0,1 М хлороводоничном киселином. Из добијених водених екстракта се поједине групе флавоноида даље могу одвојити селективном екстракцијом помоћу органских растварача. Примера ради, на тај начин је могуће издвојити катехине и леукоантоцијанидине употребом етил-ацетата као екстрагенса.

За доказивање присуства флавоноида у биљкама и биљним дрогама, најчешће се примењују колориметријске или спектрофотометријске методе.

### 2.1.3. Биолошки значај и активност флавоноида

За раст, развој и опстанак биљке синтеза и присуство флавоноидних једињења је од пресудног значаја. Функција флавоноида у њима је вишеструка. Ови молекули могу бити одговорни за привлачење опрашивача, стимулацију раста поленске цеви, ресорпцију минерала из одумрлог лишћа и др. Флавоноиди такође учествују у одбранбеном систему биљака (Орчић, 2010). Доказано је да се појачана биосинтеза флавоноидних молекула дешава у условима стреса (оштећење ткива, инфекције, прекомерно UV зрачење) (Britton, 1983; Dixon и Paiva, 1995). Сматра се да нагомилавање флавона и флавонола штити биљку од штетних ефеката ултраљубичастиг зрачења. Наиме, ови молекули, концентрисани у епидермалним ћелијама, служе као филтери штетног UV-A и UV-B зрачења. Заштитна

улога флавоноида огледа се и у њиховој антимикуробној активности, а за биљку у којој настају су значајни и као саставни делови ензимских система који су неопходни за обављање метаболичких процеса. Сматра се да антоцијани дају главни допринос боји цвета и плода. Боја цвета има важну улогу у привлачењу полинатора, док боја плодова привлачи животиње које једу плод и тиме дистрибуирају семе (Kong и сар., 2003; Gould и Lister, 2006). Антоцијани могу имати и фотопротективну улогу чиме спречавају неконтролисано генерисање слободних радикала у ћелији и оштећење хлоропласта (Gould и Lister, 2006).

Присуство флавоноидних молекула доказано је у свим вишим биљкама и то готово у свим врстама и фамилијама, док је њихово присуство у гљивама ретко. Као најчешћи извор флавоноида у литератури се спомиње лековито и зачинско биље. Позитивни ефекти флавоноида на здравље допринели су повећаном интересовању за ове биолошки важне молекуле и довели до употребе флавоноида као конституената функционалне хране. За велику пажњу која је посвећена флавоноидима заслужан је велики број њихових позитивних ефеката на људско здравље. Пре свих, најпознатији је њихов учинак у борби против слободних радикала и болести које могу бити проузроковане њиховим дејством. Епидемиолошка истраживања указују на повезаност уноса хране богате флавоноидним једињењима и смањеног ризика од настанка многих болести. У *in vitro* условима, флавоноиди показују широк спектар активности међу које спада и њихово деловање на централни нервни и кардиоваскуларни систем, хепатопротективно деловање, антимикуробно, антиоксидативно, антиканцерогено дејство и др. (Narayana и сар., 2001; Орчић 2010).

Антиоксидативни механизми који су карактеристични за флавоноиде су отпуштање водоника, „хватање“ радикала и хелирање метала (Величковић, 2013). Као и код осталих полифенолних антиоксиданата, број и положај хидроксилних група утиче на антиоксидативну активност. Код виших класа флавоноида детектована је и естрогена активност (Rosenberg и сар., 2000; Voik, 2001; Орчић, 2010). Иако је њихов ефекат значајно слабији од самих естрогених хормона, у високој концентрацији у плазми код особа са ниским нивоом естрогена (жене у постменопаузи) могу изазвати значајан естрогени ефекат. Бројна *in vitro* и *in vivo* испитивања показала су висок степен антиканцерогене активности флавоноида. Посебно је значајна улога апигенина и лутеолина за које је доказано да

инхибирају пролиферацију низа ћелијских линија канцера при концентрацијама 1-50  $\mu\text{mol/l}$ , док је дејство на здраве ћелије занемарљиво (Kawai и сар., 1999; Boik, 2001).

Међутим, прекомеран и неконтролисан унос флавоноида за последицу може имати појаву прооксидативног ефекта, да проузрокује мутагене процесе, као и инхибицију кључних ензима у метаболизму хормона (Skibola и Smith, 2000). Нека од новијих истраживања показују да уочени позитивни ефекти који се приписују флавоноидима могу потицати и од присуства других класа примарних и секундарних метаболита у биљној храни (полинезасићене масне киселине, једињења сумпора и селена, терпени и сл.) (Hung и сар., 2004; Gould и Lister, 2006). Имајући у виду комплексан однос биомолекула и могуће вишеструке механизме, као и синергистичко деловање, права вредност и значај флавоноида тек треба да буде утврђена (Орчић, 2010).

#### 2.1.4. Флавоноиди камилице

Камилица (*Matricaria chamomilla* L, syn: *M. recutita*), за коју се сматра да је један од најстаријих лекова природне медицине, представља најчешће коришћену биљну дрогу и најконзумиранију биљку данашњице. Припремљена у виду чаја, њена потрошња на светском нивоу досеже и до милион шољица дневно (Srivastava и Gupta, 2010). Њен пријатни, ароматични укус, седативно деловање и низ биолошких активности су главни разлози њене широке употребе. Традиционална примена камилице потврђује њену благотворност код свих обољења желуца и црева: грчева у желуцу, упале дебелог црева, дијареје, цревног катара, катара желуца, надутости желуца, као и код вишка желудачне киселине. Сматра се да не постоји готово ни једно обољење гастро-интестиналног тракта где камилица не може да помогне у излечењу. Такође је корисна у лечењу бубрега, јетре и жучи. Помаже и код нервних поремећаја, за умирење, код неуралгија, раздражљивости, нервне преосетљивости, против несанице и преморености. Њен учинак у виду неуропротективног деловања је и научно потврђен (Chanrashekhar и сар., 2010; Das, 2014). Камилица се успешно примењује за спољашне ране и посекотине, код екцема, чирева, гихтова, иритација коже, реуматских болова, маститиса и др. (Newall и сар., 1996). Поред овога значајна је и њена улога у козметологији. Светска научна јавност, на основу многобројних спроведених студија, експлицитно је потврдила неке од најизразитијих особина камилице које подразумевају антиинфламаторно, антифлогистичко (Srivastava и

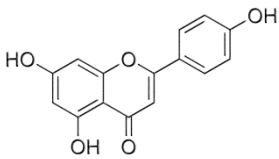
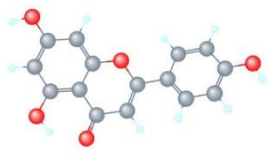
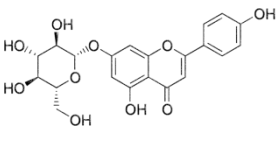
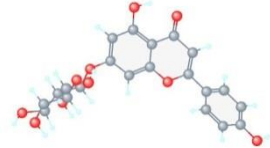
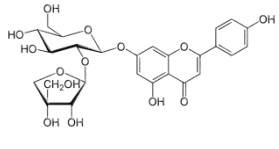

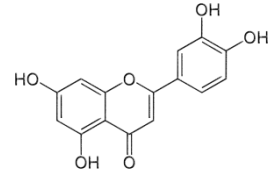
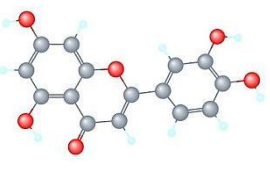
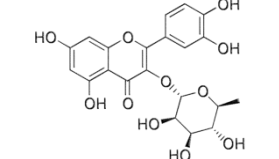
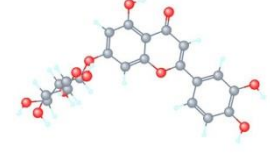
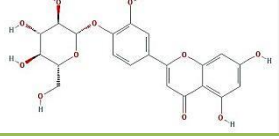
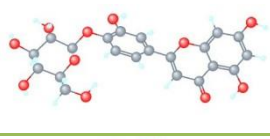
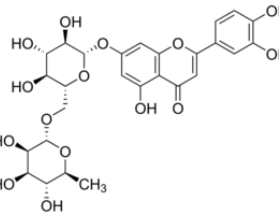
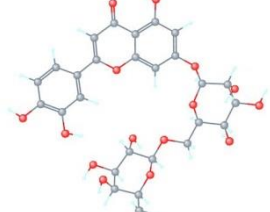
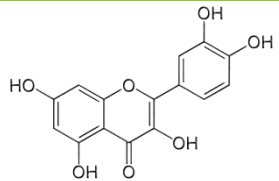
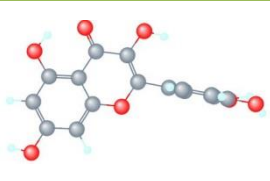
сар., 2010), антиалергијско (Nemecz, 1998; Chandrashekhar и сар., 2011), антибактеријско (Lis-Balchin и сар., 1998; Franke и Schilcher, 2005; McKay и Blumberg, 2006), антиспазматичко, антисептичко (Sahebkar и Emami, 2013), као и антиоксидативно деловање (Цветановић и сар., 2015а). Последњих година, интерес научне јавности је посебно усмерен ка њеном анти-туморском деловању (Цветановић и сар., 2015а; Цветановић и сар., 2015б). Цваст камилице (слика 4) је официнална дрога у фармакопејама 26 земаља.

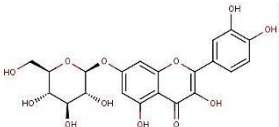
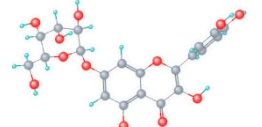
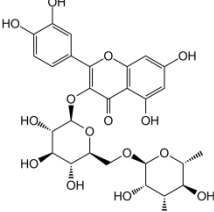
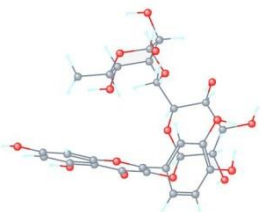
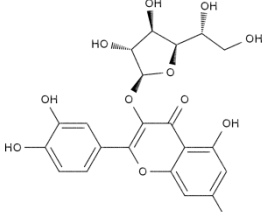
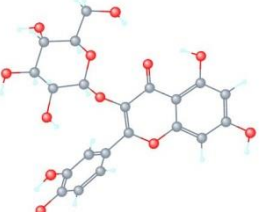
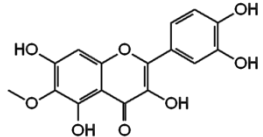
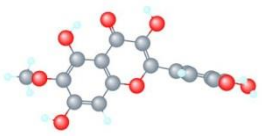
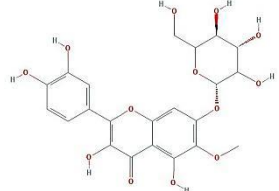
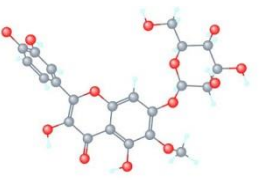
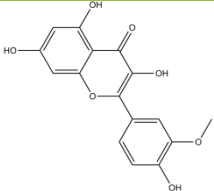
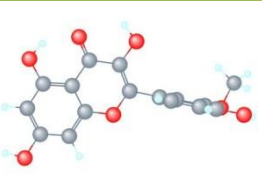
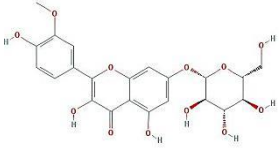



Слика 4. Изглед камилице (*Matricaria chamomilla*).

Широки спектар деловања камилице је био један од основних покретача научника за детаљном анализом њеног састава. На основу многобројних спроведених студија са сигурношћу се може тврдити да се бројна благотворна дејства камилице приписују њеним полифенолним једињењима, у првом реду флавоноидима. Велики број присутних полифенолних једињења припада класи фенолних киселина: хлорогенска, кафена, ванилинска, сиригинска и анизинска киселина, затим кумаринска, умбелиферонска и др. Флавоноиди су присутни у цвету камилице у виду својих агликона и гликозида, при чему се основано верује да су они, највероватније, најзаслужнији за високу антиоксидативну активност камилице, где имају улогу хватача слободних радикала. У табели 2 дат је детаљни приказ идентификованих конституената камилице који припадају класи флавоноидних једињења.

Табела 2. Најзаступљенији флавоноиди камилице.

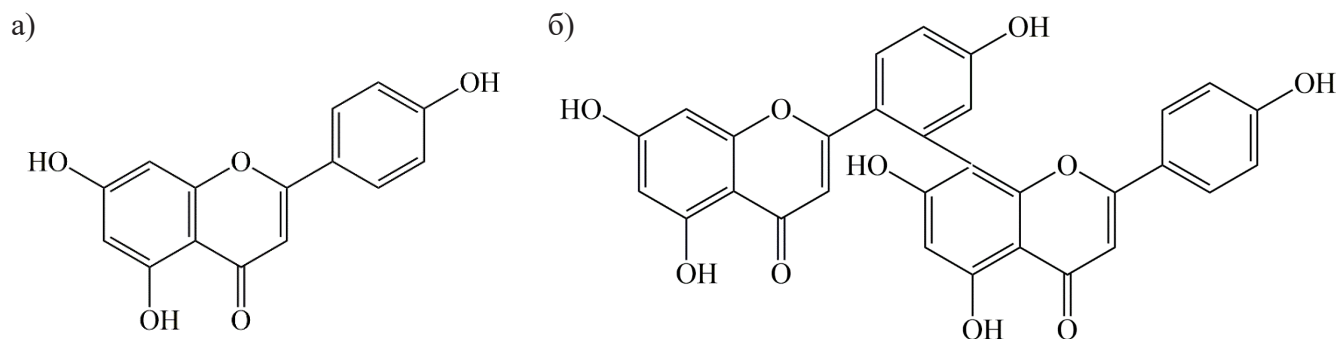
Флавоноид	Молекулска формула/маса	Структурна формула	3Д-конформација
Апигенин	$C_{15}H_{10}O_5$ 270,23 g/mol		
Апигенин-7- глюкозид (космозин, апигетрин)	$C_{21}H_{20}O_{10}$ 432,37 g/mol		
Апигенин- апиозил- глюкозид (апиин)	$C_{26}H_{28}O_{14}$ 564,49 g/mol		
Лутеолин	$C_{15}H_{10}O_6$ 286,23 g/mol		
Лутеолин-7- глюкозид	$C_{21}H_{20}O_{11}$ 448,37 g/mol		
Лутеолин-4'- глюкозид	$C_{21}H_{20}O_{11}$ 448,37 g/mol		
Лутеолин-7- рамно- глюкозид (литеолин-7- рутинозид)	$C_{27}H_{30}O_{15}$ 594,51 g/mol		
Кверцетин	$C_{15}H_{10}O_7$ 302,23 g/mol		

Кверцетин-7- глукозид	$C_{21}H_{22}O_{12}$ 464,37 g/mol		
Кверцетин-3- рутинозид (рутин)	$C_{27}H_{30}O_{16}$ 310,51 g/mol		
Кверцетин-3- галактозид (хиперин, хиперозид)	$C_{21}H_{20}O_{12}$ 464,37 g/mol		
Патулетин	$C_{16}H_{12}O_8$ 332,6 g/mol		
Патулетин-7- глукозид	$C_{22}H_{22}O_{13}$ 494,40		
Изорамнетин	$C_{16}H_{12}O_7$ 316,26 g/mol		
Изорамнетин- 7-глукозид	$C_{22}H_{22}O_{12}$ 478,40 g/mol		

Међу приказаним флавоноидима камилице посебну пажњу привлаче флавоноски агликон апигенин (5,7,4'-трихидроксифлавоон) и флавоноски гликозиди, апигенин-7-*O*- $\beta$ -глукозид као и његови ацетилловани деривати.

### 2.1.5. Апигенин

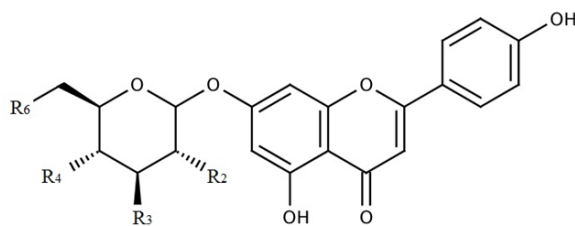
Апигенин ( $C_{15}H_{10}O_5$ ) (5,7-дихидрокси-2-(4-хидроксифенил)-4*H*-1-бензопиран-4-он) је жута кристална супстанца, која својствено својој структури, припада класи флавоноида, тачније флавона. Физичко-хемијске карактеристике апигенина указују на његову нерастворљивост у води, умерену растворљивост у топлом алкохолу и потпуну растворљивост у разблаженом калијум хидроксиду и диметил сулфоксиду (Chemical Sources International, 2000). Једињење се одликује молекулском масом од 270,23 g/mol и тачком топљења од 347,5°C. UV максимуми раствора апигенина у етанолу се јављају на 269 и 340 nm. Поред постојања у свом основном (мономерном) облику, њега карактерише и могућност појављивања у виду димера, биапигенин (слика 5).



Слика 5. Структура а) апигенина и б) биапигенина.

Апигенин је углавном присутан у воћу, воћним напицима, поврћу попут першуна, црног лука, затим у оригану, зеленом чају, камилици, пшеничним клицама, као и у неким другим зачинима. Његовим најзначајнијим извором се сматра камилица, а најчешћи начин уношења овог флавона у организам је путем чаја припремљеног од сувих цветова камилице (McKay и Blumberg, 2006). Инфуз камилице садржи апигенин у концентрацији од 0,8 до 1,2%. Други извори апигенина укључују напитке попут вина или пива (Bevilacqua и сар., 2004; Gerhauser, 2005). У природним изворима апигенин је присутан у облику апигенин-7-*O*-глукозида и различитих ацетилованих деривата (Švehlíková и сар., 2004).

Структурна формула апигенин-7-*O*-глукозида и његових деривата приказују слика 6 и табела 3.



Слика 6. Структурна формула деривата апигенин-7-О-глукозида.

Табела 3. Деривати апигенин-7-О-глукозида.

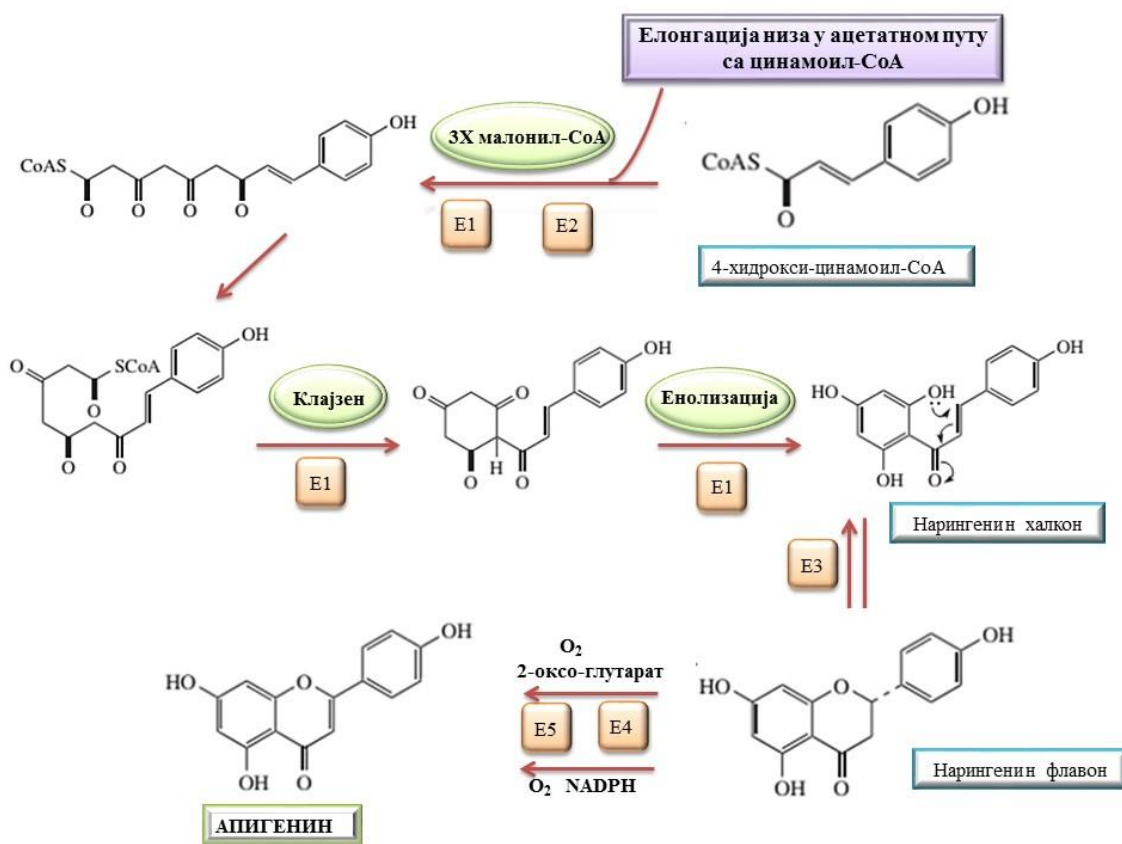
Назив гликозида	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>6</sub>
Апигенин-7-гликозид	ОН	ОН	ОН	ОН
Апигенин-7-(6"-малонил-гликозид)	ОН	ОН	ОН	Малонил
Апигенин-7-(4"-ацетил-гликозид)	ОН	ОН	Ацетил	ОН
Апигенин-7-(6"-малонил-гликозид)	ОН	ОН	ОН	Кафеоил
Апигенин-7-(6"-ацетил-гликозид)	ОН	ОН	ОН	Ацетил
Апигенин-7-(4"-ацетил, 6"-малонил-глукозид)	ОН	ОН	Ацетил	Малонил
Апигенин-7-(4",6"-ди-ацетил-глукозид)	ОН	ОН	Ацетил	Ацетил
Апигенин-7-(2"-ацетил-гликозид)	Ацетил	ОН	ОН	ОН
Апигенин-7-(3"-ацетил-гликозид)	ОН	Ацетил	ОН	ОН
Апигенин-7-(2",3"-ди-ацетил-гликозид)	Ацетил	Ацетил	ОН	ОН
Апигенин-7-(3",4"-ди-ацетил-гликозид)	ОН	Ацетил	Ацетил	ОН

### Биосинтеза апигенина

Синтеза апигенина, као и других флавоноида, започиње процесом елонгације низа цинамоил-коензима А структурне јединице кондензацијом са три молекула малонил-коензима А дејством два ензима: халкон синтазе и стилбен синтазе. Као продукт ових реакција кондензације настаје поликетидни низ који се може оријентисати на два начина. Оријентација низа омогућава одвијање интрамолекулске Клајзенове кондензације уз дејство ензима халкон синтазе. Након кондензације одвија се енолизација где настаје нарингернин-халкон. Сматра се да се овај процес одвија спонтано и да је неензимски, или се одвија под дејством истог ензима као и Клајзенова реакција, што није са сигурношћу утврђено. Након тога се одвија процес кондензације под дејством ензима халкон изомеразе где настаје нарингенин. У овој реакцији настаје други шесточлани хетероциклични прстен



који је карактеристичан за већину флавоноида. Реакција по којој се ова кондензација одвија јесте Мајклова (Michael) реакција (Мајклова адиција) коју, у овом случају, карактерише нуклеофилни напад фенолне групе на незасићени кетон. Ова реакција се може извести и у лабораторији, у киселим реакционим условима. Међутим, предност синтезе у природним условима јесте та што ензим катализује реакцију тако да крајњи производ буде само један енантиомер, односно реакција је стереоспецифична. У даљем току биосинтезе настали нарингенин подлеже дејству два ензима: флавон синтазе I и флавон синтазе II. Ова два ензима катализују превођење овог молекула у апигенин као крајњи производ. На основу наведеног може се закључити да биосинтеза апигенина започиње у шикиматном путу (синтеза хидрокси-цинамоил структурне јединице), наставља се ацетатним путем (елонгација низа и настанак прстена А), и завршава се у шикиматном путу (Dewick, 2009). Реакције овог комбинованог биосинтетског пута приказане су на слици 7.



Слика 7. Биосинтеза апигенина, E1-халкон синтетаза (нарингенин-халкон синтетаза); E2-стилбен синтетаза (развератол синтетаза); E3-халкон изомераза; E4-флавон синтетаза I; E5-флавон синтетаза II.

### **Апсорпција и метаболизам апигенина**

Као и већина флавоноида и апигенин се одликује повишеном биорасположивошћу када се нађе у везаној форми. Везане форме апигенина се јако добро апсорбују у интестиналном тракту (Wen и Walle, 2006а,б; Walle и сар., 2007). Ипак, њихова апсорпција и биорасположивост зависе од природе компонената које су везане за агликон, јер присуство тих компонената захтева и дејство различитих ензима присутних у организму (Ross и Kasum, 2002).

Након уноса у организам и након његовог доспевања у интестинални тракт, апигенин се метаболише кроз дуални метаболички систем који укључује црева и ентерохепатски систем. Показало се да се апигенин веома брзо метаболише преко UDP глукуронозил трансферазе UGT1A1 у глукурозидни конјугат који се брже преноси кроз крвоток и излучује у жучи. Његови сулфатни конјугати се излучују преко урина (Walle и Walle, 2002).

У истраживању спроведеном на 11 особа, максимална количина апигенина у плазми измерена је након 7 h од његовог уноса у организам оралним путем, док је након 28 h његова концентрација била немерљиво мала. Количина апигенина измерена у узорку урина након 24 h износила је 0,22% од укупно унешене количине у организам (Meuer и сар., 2006). Gradolatto и сар. (2005) су уз помоћ обележеног апигенина испитивали његову доступност и расположивост различитим системима у организму. Тако је показано да се 51% радиоактивног изотопа појављује у урину, 12% у фецесу, 1,2% у крви, 0,4% у бубрезима, 9,4% у цревима, 1,2% у јетри и 24,8% у остатку организама током 10 дана од оралне апликације апигенина, а сама радиоактивност се детектује у крви након 24 h.

Кинетику апигенина у крви карактерише продужен период полуживота од 91,8 h, што је доста дуг период у односу на друге флавоноиде који се уносе храном (Gradolatto и сар., 2005).

Истраживање засновано на апликацији екстракта *Chrysanthemum morifolium* на пацовима у дози од 200 mg/kg, показало је да се апигенин апсорбује много ефикасније од лутеолина, а да оба једињења имају дуг период полуживота у организму (Chen и сар., 2007). Овај резултат указује на то да, иако је биорасположивост апигенина ограничена, спора

фармакокинетика омогућава акумулирање овог флавоноида у различитим ткивима где испољава своја лековита својства.

### **Биолошка активност апигенина**

У поређењу са другим структурно сличним флавоноидима апигенин се одликује својим благотворним деловањем на организам, изузетно ниском токсичношћу и високом селективношћу ка канцерогеним ћелијама (Gupta и сар., 2001). Такође, постоји јако мало доказа да апигенин изазива нежељене метаболичке реакције у *in vivo* условима након оралног уношења у организам. Многобројна спроведена истраживања су потврдила да апигенин испољава антиоксидативна, антимулагена, антиканцерогена, антиинфламаторна, антинеопластична, пролиферативна и антинеопластична прогресивна својства (Birt и сар., 1986).

Лабораторијска истраживања су показала да апигенин има утицај на процесе хелирања јона метала и неутрализације слободних радикала, током стимулације фазе II процеса детоксификације ензима у ћелијским културама и туморским моделима у *in vivo* условима (Middleton и сар., 2000). Апликација апигенина пре канцерогеног напада указује на заштитни ефекат овог флавона на кожи мишева и код модела канцера црева (Birt и сар., 1997; Van Dross и сар., 2003). Апигенин се показао као потентан инхибитор орнитин карбоксилазе, ензима који има кључну улогу у процесу прогресије тумора (Wei и сар., 1990). Такође, овај флавон узрокује повећање интрацелуларне концентрације глутатиона чиме се јача ендогени систем одбране од оксидативног стреса (Myhrstad и сар., 2002).

Антиинфламаторна својства апигенина доказана су супресијом активности LPS-индуковане (LPS-липополисахариди) циклооксигеназе-2 (COX-2) и NO синтазе-2 у макрофагама мишева (Liang и сар., 1999). Испитивањем утицаја структуре на активност 45 флавона, флавонола и других сродних молекула дошло се до открића да су лутеолин, ајанин, апигенин и фисетин најпотентнији инхибитори продукције интерлеукина-4 (IL-4) (Kawai и сар., 2007). Друге студије су показале да апигенин изазива супресију активације TNF- $\alpha$  индукованог нуклеарног фактора (NF)- $\kappa$ B у хуманим ендотелним ћелијама пупчане вене (Choi и сар., 2004).

Постојање широког опсега ефеката апигенина као сигналног молекула доказано је у више научних истраживања (Williams и сар., 2004). Показало се да апигенин инхибира активацију протеин киназе С и протеин киназе активираних митогенима (МАРК) (Lee и Lin, 1997; Lin и сар., 1997). Апигенин је познат као инхибитор протеин тирозин киназа, а показало се и да блокира киназе задужене за регулацију пролиферације пероксизома (Mounho и Thrall, 1999). Надаље, утврђено је да апигенин регулише активност  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  јонског канала, као и ензима који је задужен за испумпавање јона калцијума у срчаним миоцитима неонаталних мишева (Carrillo и сар., 1998). Поред овога, апигенин инхибира експресију казеин киназе у ћелијама хуманих канцера простате и дојке (Hessenauer и сар., 2003; Landesman-Bollag и сар., 2001).

Апигенин показује утицај и на животни циклус ћелија. Излагањем широког спектра малигнућ ћелија, укључујући и епидермалне ћелије и ћелије фибробласта, дејству апигенина, установљено је да долази до прекида ћелијског циклуса у G2/M и G0/G1 фазама инхибирањем активности p34 (cdc2) киназе, што је праћено порастом стабилности p35 протеина (Lepley и Pelling, 1997; Plaumann и сар., 1996). Показало се да апигенин индукује апоптозу ћелија канцера простате, као и других малигнућ ћелија (Gupta и сар., 2002; Shukla и Gupta, 2004; Wang и сар., 1999; Iwashita и сар., 2000; Hirano и сар., 1989). Обећавајући резултати су добијени приликом испитивања утицаја овог флавона на процес инвазије ћелија рака и метастазе. Показало се да апигенин инхибира ширење рака путем регулације процеса продукције протеаза (Lindenmeyer и сар., 2001). Студије у *in vivo* условима показале су да апигенин инхибира метастазу рака плућа ометањем интеракција туморних ћелија са ендотелом (Piantelli и сар., 2006).

Орално уношење апигенина у организам повољно утиче на материцу и повећава број естрогенских рецептора (ER)- $\alpha$  у материци женки мишева (Nigamath и сар., 2000). Утврђено је да апигенин утиче на супресију раста ћелија канцера простате и груди преко естрогених рецептора  $\beta 1$  (Mak и сар., 2006). Неколико истраживања су показала да излагање ћелија хуманог канцера простате DU154 дејству апигенина узрокује повећање концентрације E-кадхерина и инхибицију нуклеарне транслокације  $\beta$ -катенина, као и његову ретенцију у цитоплазми (Shukla и сар., 2007). Ова открића указују на то да апигенин испољава потенцијал за инхибицију канцера повезаних са хормонским поремећајима.

## 2.2. Биолошка активност природних једињења

### 2.2.1. Антиоксидативно деловање

#### *Слободни радикали и њихови извори*

Слободни радикали представљају јоне, атоме или молекуле који имају један или више неспарених електрона, односно који се могу детектовати. Слободни радикали могу настати као последице одвијања хомолитичких, хетеролитичких или редокс реакција, затим термолизом, електромагнетном радијацијом или ензимским процесима (Asworth, 2003). Већина слободних радикала су краткоживећи и веома лако подлежу мономолекуларним и бимолекуларним реакцијама разлагања (Halliwell и Gutteridge, 1999). Захваљујући неспареном електрону они спадају у једне од најреактивнијих неселективних хемијских врста. Неспарени електрон се може налазити на атомима различитих елемената, те се тако могу разликовати: реактивне врсте кисеоника (ROS - *reactive oxygen species*), реактивне врсте азота (RNS - *reactive nitrogen species*), реактивне врсте хлора (RCS - *reactive chlorine species*), реактивне врсте брома (RBS - *reactive bromine species*) и реактивне врсте сумпора (RSS - *reactive sulphur species*) (Halliwell и Gutteridge, 2007).

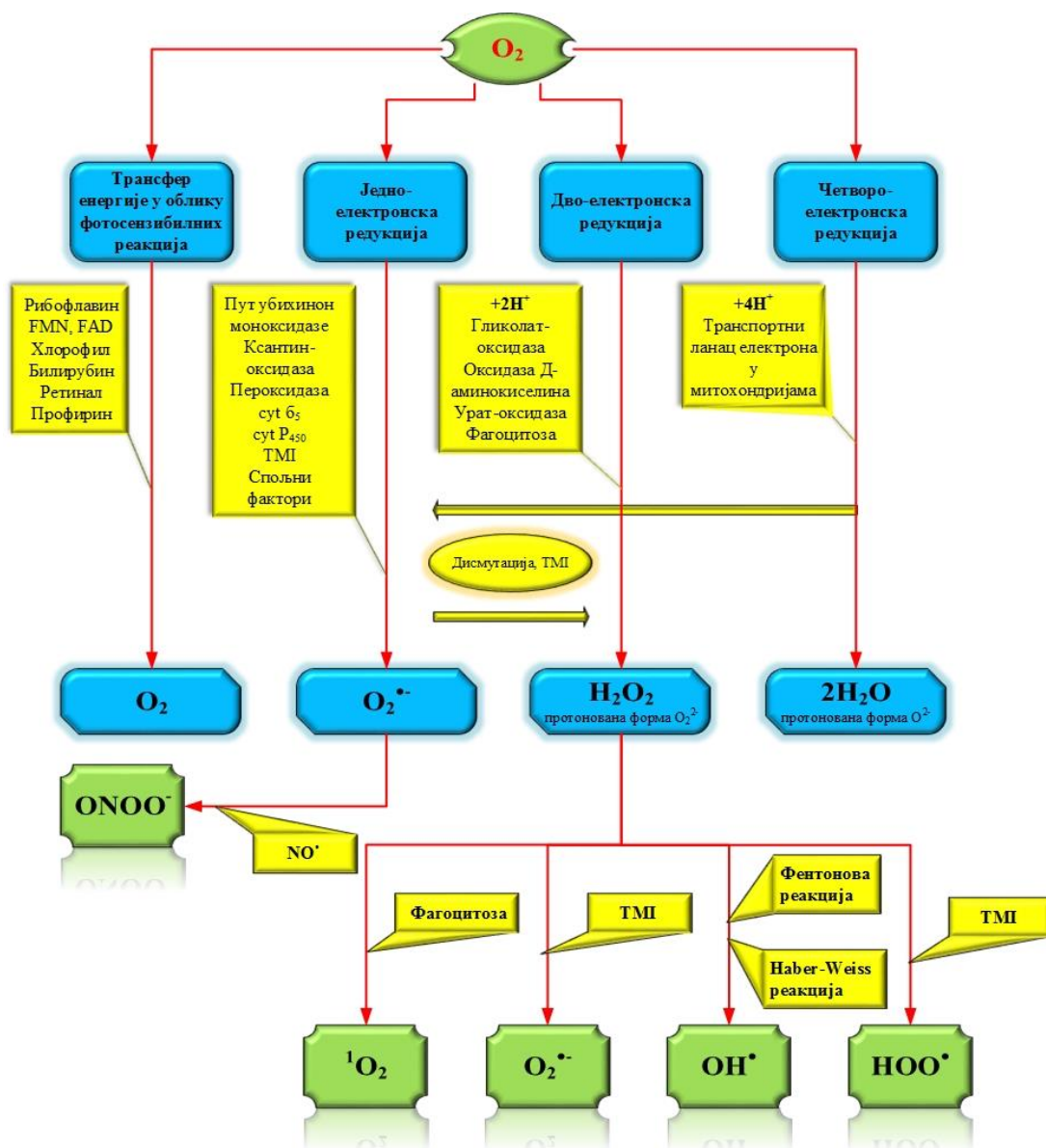
Најзначајнију групу радикалских врста чине реактивне врсте кисеоника. Под називом реактивне врсте кисеоника (ROS) подразумевају се слободно-радикалске и нерадикалске врсте које садрже кисеоник (табела 4). Нерадикалски облици су мање реактивни у односу на слободне радикале, и у основи су оксидациони агенси који се лако могу конвертовати у слободне радикале. Поред кисеоничних форми, азотне форме имају значајну улогу за биолошке системе. ROS и RNS који се генеришу током нормалног метаболичког процеса имају двоструку улогу у живим системима, тј. могу бити штетни и корисни за организам (Valko и сар., 2006).

Табела 4. Значајне реактивне слободнорадикалске и нерадикалске врсте кисеоника (Halliwell и Whiteman, 2004).

Реактивне врсте кисеоника	
Радикалски облици	Нерадикалски облици
Супероксид анион радикал, $O_2^{\cdot-}$	Водоник пероксид, $H_2O_2$
Хидроксил радикал, $OH^{\cdot}$	Хипобромна киселина, $HOBr$
Хидропероксил радикал, $HO_2^{\cdot}$	Хипохлорна киселина, $HOCl$
Пероксил радикал, $RO_2^{\cdot}$	Озон, $O_3$
Алкоксил радикал, $RO^{\cdot}$	Синглетни кисеоник, $^1O_2$
Карбонатни радикал, $CO_3^{\cdot-}$	Органски пероксиди, $ROOH$
Угљендиоксидни радикал, $CO_2^{\cdot-}$	Пероксинитрит, $ONOO^{\cdot-}$
Угљенмоноксидни радикал, $CO^{\cdot-}$	Пероксинитритна киселина, $ONOOH$

Продукција кисеоничних радикала у организму одвија се у склопу катаболичких и анаболичких процеса: у респираторном ланцу, оксидацијом ћелијских биомолекула (тиола, хидрохинона, катехоламина, оксихемоглобина), дејством ензима (ксантин оксидазе, липооксигеназе, простагландин синтетазе и др.), као и дејством бивалентних металних јона (слика 8) (Sayre и сар., 1999; Cadenas и Davies, 2000; Božin, 2009).

Извори слободних радикала се могу сврстати у две групе: ендogene и егзогене. У ендogene изворе се убрајају митохондријска респирација, ензимске реакције, ауто-оксидација, инфекција, исхемија/реперфузија,  $NADP(H)$  оксидазе, ксантин оксидоредуктазе, цитохром P450 ензими, док у егзогене изворе спадају загађење ваздуха, присуство неорганских честица у ваздуху, дувански дим, индустријски растварачи, неки лекови и излагање зрачењу. Медикаменти који могу да доведу до настанка радикала су неки антибиотици, аналгетици, антималяријски агенси, имуносупресори, диуретици, итд. Поред свега овога, и конзумација психоактивних супстанци, као и конзумација алкохола могу довести до оксидативног стреса (Li, 2011; Dasgupta и Klein, 2014).



Слика 8. Генерисање реактивних кисеоничних врста: FMN - флавин-мононуклеотид; FAD - флавин-аденин-динуклеотид; сyt - цитохром; TMI - јони прелазних метала (Грбовић, 2010).

### Оксидативни стрес

Коришћење кисеоника од стране аеробних организама, међу којима су и сисари, води ка неизбежном настанку ROS. Ове веома реактивне врсте могу да оштете конституенте ћелије па су ћелије развиле разне молекуле као вид заштите. ROS, као и RNS, су фамилија веома реактивних једињења које организам може да користи у борби против патогена присутних унутар организма. Међутим, када су присутни у већим концентрацијама могу да

оштете ћелију директно или индиректно путем сигналних путева. Повећање концентрације ROS-а или нарушавање система одбране може довести до оксидативног стреса и настанка разних обољења (Rodrigo, 2009; Li, 2011).

Појам оксидативни стрес се односи на стање када количина ROS/RNS значајно надмаши уобичајни капацитет антиоксидативног система одбране у биолошком систему. Ово стање може бити изазвано повећањем концентрације реактивних врста или опадањем активности антиоксиданаса или оба случаја истовремено. Оксидативни стрес се повезује са оксидативним оштећењем биомолекула међу којима су протеини, липиди и нуклеинске киселине. Умерени оксидативни стрес може изазвати дисфункцију ћелије, док јачи оксидативни стрес изазива ћелијску смрт. Изглед ћелије пре и после оксидативног стреса приказан је на слици 9.



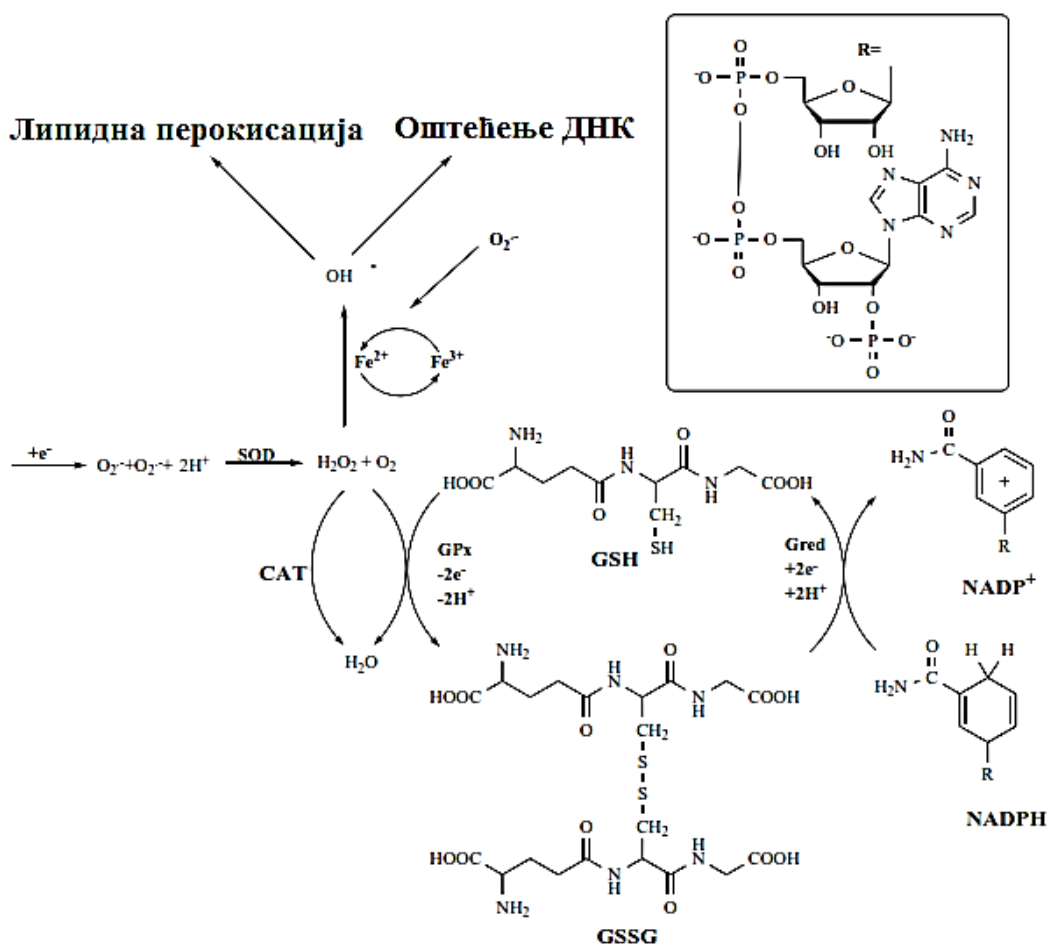
Слика 9. Изглед ћелија пре и после оксидативног стреса (Димитријевић, 2014).

Међутим, пораст нивоа ових реактивних врста није увек повезан са оштећењима. Под одређеним условима благи пораст ROS/RNS може бити део сигналног механизма који изазива специфичан физиолошки ћелијски одговор (Li, 2011; D'Autréaux и Toledano, 2007; Rhee, 2006). Оксидативни стрес је уско повезан са процесом запаљења где се активирањем инфламаторних ћелија формирају велике количине ROS укључујући и NAD(P)H оксидазу и индуцибилну NO синтазу. Са друге стране ROS/RNS који настају изазивају повећану експресију проинфламаторних цитокина и адхезионих молекула и тиме повећавају или ремете инфламаторни процес (Li, 2011).

Интеракције ROS/RNS врста са протеинима, односно ензимима, могу да доведу до инактивације истих, а затим и до структурних промена, као и до убрзавања процеса



деградације протеина/ензима. Интеракција између ROS/RNS реактивних врста и липида узрокује липидну пероксидацију што даље води ка ремећењу структуре ћелијске мембране, као и до настанка других реактивних врста, као што су алдехиди. Ови алдехиди настали из процеса липидне пероксидације (малондиалдехид, 4-хидрокси-2-ноненал и акролеин) представљају цитотоксине и мутагене. Они ремете процес преноса сигнала. Директно оштећење ДНК молекула овим реактивним врстама се манифестује променама у структурама градивних елемената ДНК, разлагањем ланца ДНК, као и укрштањем ДНК ланца међусобно, и ДНК са протеинима. Шематски приказ настанка оксидативног стреса индукованог ROS врстама приказан је на слици 10.



Слика 10. Оксидативни стрес изазван ROS реактивним врстама. Скраћенице које су употребљене на слици: SOD - супероксид дизмутаза; CAT - каталаза; GSH - глутатион; GSSG - оксидовани облик глутатиона; GPx - глутатион пероксидаза; Gred- глутатион редуктаза (Wojsik и сар., 2010).

Уопштено, оштећења виталних молекула од стране ROS/RNS воде ка дисфункцији ћелије, њеном старењу и смрти или ка малигним трансформацијама. Услед оваквог штетног дејства ових врста, аеробни организми су били приморани да развију систем одбране како би заштитили наведене виталне молекуле. Систему одбране од ових оксиданата доприносе бројни молекули природног порекла који имају антиоксидативна својства, као и синтетички молекули створени у лабораторијама. У организму постоји веома сложени баланс између ROS/RNS и антиоксидативног система, и тај баланс представља део физиолошке хомеостазе код сисара. Свако нарушавање овог баланса може довести до појаве и развоја болести (Li, 2011).

### ***Антиоксиданти и антиоксидативни системи***

Половична оксидација и ексцитација кисеоника током одвијања метаболичких процеса води ка формирању реактивних кисеоничних врста. Као вид заштите аеробни организми су створили серију комплементарних антиоксидативних ензима и неензимских молекула који имају антиоксидативна својства чиме се штите биомолекули од оксидативних оштећења. Поред ових природних система и молекула, антиоксиданси који се уносе храном такође доприносе систему одбране организма од оксидативног оштећења. Иако постоји више дефиниција антиоксиданата, они се најчешће дефинишу као супстанце способне да спрече, смање или поправе оштећења биомолекула изазвана деловањем ROS/RNS (Li, 2011; Ratnam и сар., 2006). Једноставније речено, антиоксиданси представљају супстанце које су способне да неутралишу слободне радикале и спрече их да изазову оштећења (Steffen и сар., 2008).

Када је начин деловања ове групе једињења у питању, постоје три потенцијална модела по којима они делују, односно штите биомолекуле од оштећења које могу изазвати настали ROS/RNS (Li, 2011):

- Неутрализација ROS/RNS: многи антиоксиданси су способни да директно неутралишу радикалске врсте. Ова неутрализација се може одвијати путем реакција које катализују ензими. Тако, супероксид дизмутаза (SOD) катализује дизмутацију супероксида до водоник-пероксида и молекуларног кисеоника. Неензимски антиоксиданси неутралишу радикале путем директних хемијских реакција.

- Инхибиција процеса настанка ROS/RNS: ове врсте, као што је то већ споменуто, настају у различитим ћелијама, односно деловима ћелија. Антиоксиданси могу да делују на ове изворе настанка радикала и инхибирају или спрече настанак истих. Тако, моно-О-метилувани флаванолни инхибирају NAD(P)H оксидазу у васкуларним ћелијама, што даље води ка смањењу концентрације супероксида (Kim и Gladyshev, 2007).
- Уклањање или санирање оштећења изазваних дејством ROS/RNS: као што је то већ наглашено, ROS/RNS могу изазвати оштећења или модификације на биомолекулима. Ћелије сисара су развиле јединствени систем одбране који, између осталог, служи да уклони или поправи молекуле који су претрпели наведене промене. Тако, ROS/RNS оксидују резидуенте метионина у протеинима када настаје метионин сулфоксид. Настали метионин сулфоксид се редукује у метионин дејством ензима метионин сулфоксид редуктазе (Kensler и сар., 2004). Због тога овај ензим представља важну карику у ланцу одбране организма од дејства слободних радикала. Ћелије су, поред система за поправку ензима, односно протеина, снабдевене и ензимима који могу да поправе оксидативна оштећења липида и нуклеинских киселина.

Антиоксиданси се могу, уопштено, према извору поделити на ендогене и егзогене. Ендогени антиоксиданси су они које ћелија синтетише, док су егзогени они који се уносе у организам. Ендогени антиоксиданси могу даље да се поделе на две велике групе (Li, 2011):

- Протеински антиоксиданси
- Непротеински антиоксиданси.

Ендогени протеински антиоксиданси укључују ензиме као што су супероксид димутаза (SOD) и каталаза (CAT) и неензимске као што су феритин и металотионеин. Примери за ендогене непротеинске антиоксидансе су редукована форма глутатиона и билирубин. Егзогени антиоксиданси су они које ћелије не синтетишу, и који се уносе путем исхране. Они могу бити природног или синтетичког порекла. Најпознатији примери егзогенних антиоксиданаса природног порекла су витамини Ц и Е, као и полифеноли. У групу синтетичких антиоксиданаса спадају миметици ензима, спинске замке (spin traps) и нано-честице церијум-оксида. У табели 5 (Li, 2011) дат је преглед неких антиоксиданаса према класама којим припадају.

Табела 5. Класификација антиоксиданаса (Li, 2011).

	Извор антиоксиданса	Назив антиоксиданса
Ендогени	Протеински антиоксиданси	-Супероксид дизмутаза (SOD) -Каталаза (CAT) -Ензими задужени за синтезу глутатиона -Глутатион пероксидаза -Глутатион редуктаза -Глутатион С-трансфераза -Глутаредоксин -Тиоредоксин -Пероксиредоксин -Тиоредоксин редуктаза -Сулфиредоксин -Метионин сулфоксид редуктаза -Хем оксигеназа - NAD(P)H:хинон оксидоредуктаза -Параоксоназа -Феритин -Металотионеин
	Непротеински антиоксиданси	-Глутатион -Билирубин -Коензим Q -Естрогени - $\alpha$ -липоинска киселина -Мелатонин -Пируват -Уринска киселина
Егзогени	Антиоксиданси из природних извора који се уносе исхраном	-Витамин Ц -Витамин Е -Каротеноиди -Фенолна једињења
	Синтетски	-Миметици ензима антиоксиданаса -Прекурсори глутатиона -Спинске замке (spin traps) -Нано-материјали

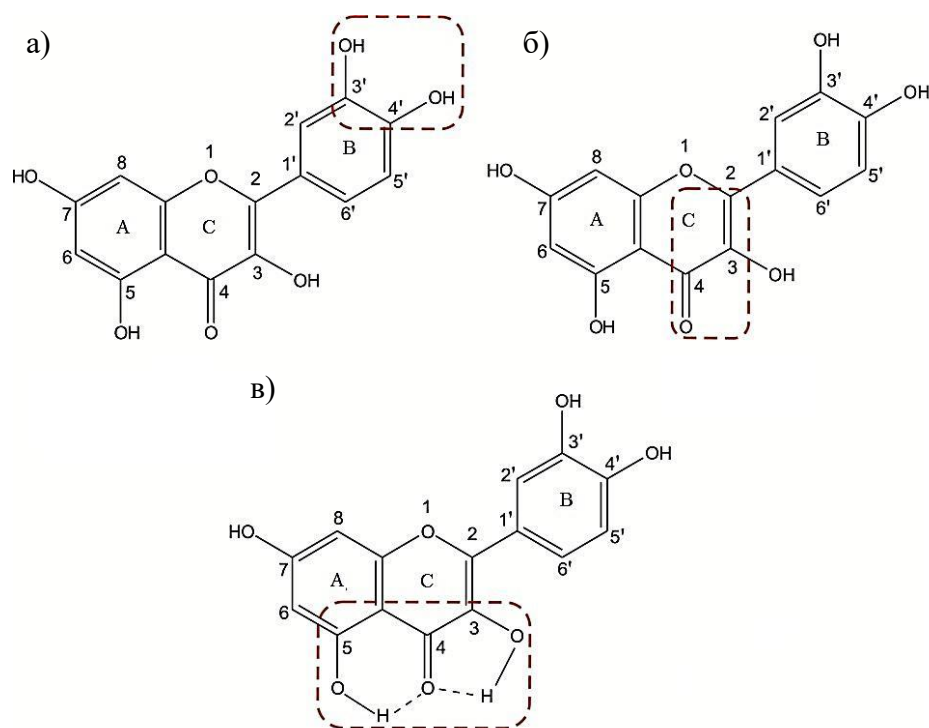
Ratnam и сар. (2006) су у свом раду дали опширнију поделу ове групе молекула према којој се антиоксиданси деле на ензимске и неензимске антиоксидансе. Ензимски се даље деле на примарне ензиме и секундарне ензиме. Са друге стране, неензимски антиоксиданси се деле на минерале, каротеноиде, антиоксидансе малих молекулских маса,

витаине, органосумпорна једињења, антиоксидативне кофакторе и полифеноле. Полифеноли представљају групу једињења која је сада од великог истраживачког интереса. Њихова активност условљена је различитим факторима, међу којима су и енергија дисоцијације О-Н везе, могућност делокализације и резонантне стабилизације неспареног електрона слободног радикала полифенолног једињења и стерних фактора услед присуства волуминозних група везаних за ароматични прстен (Shahidi и Naczk, 1995). Антиоксидативна ефикасност полифенолних једињења одређена је константама брзина њихових реакција са слободним радикалима (Sánchez-Moreno и сар., 1998).

### ***Флавоноиди као антиоксиданси***

Антиоксидативна својства биљних флавоноида су детаљно испитана (Милић и сар., 2000) и они се често употребљавају уместо синтетичких антиоксиданаса. Флавоноидни конституенти биљака испољавају снажно антиоксидативно деловање које је условљено њиховом специфичном структуром. Структурне карактеристике одговорне за постојање антиоксидативног потенцијала флавоноида су (Pietta, 2000, Heim, 2002) (слика 11):

- а) присуство хидроксилних група на  $C_3$  и  $C_5$ -атомима, које граде водоничну везу са кето-групом
- б) присуство двоструке везе између  $C_2$  и  $C_3$ -атома конјуговане са 4-кето-групом, што омогућава делокализацију електрона из В-прстена
- в) присуство хидроксилних група у В прстену које дају стабилност радикалу и омогућавају делокализацију електрона.



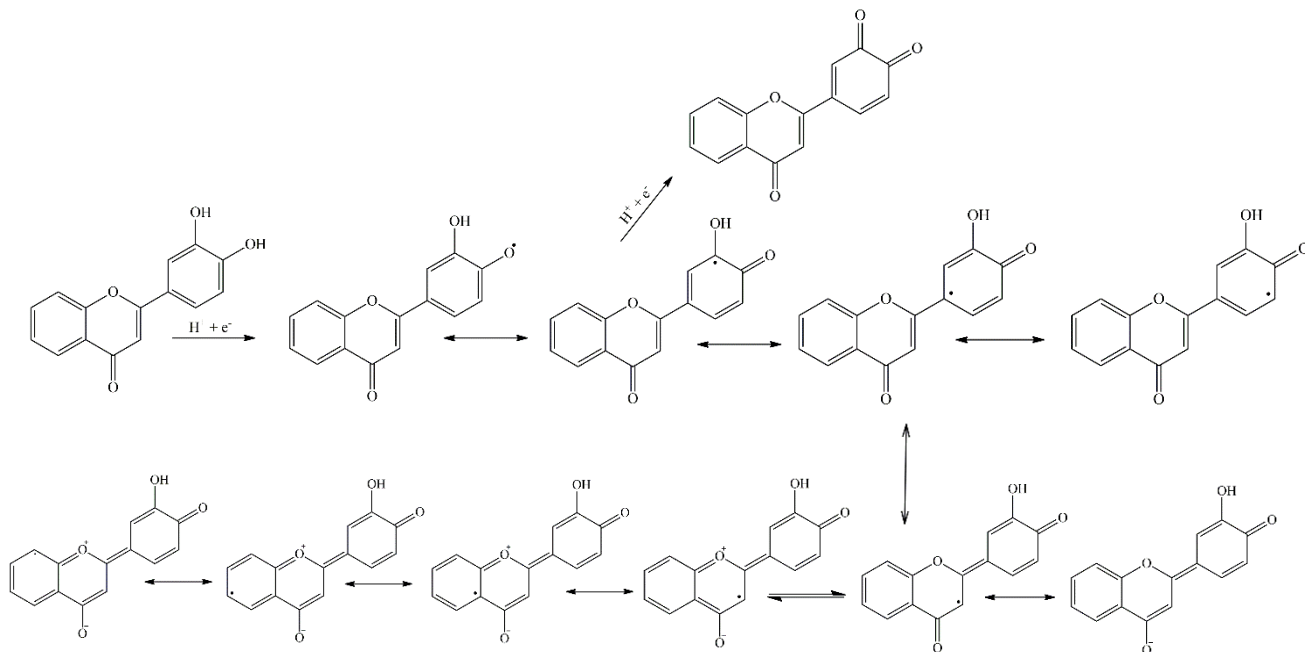
Слика 11. Структурне карактеристике и функционалне групе флавоноидних једињења важне за хватање слободних радикала.

На основу већег броја спроведених студија, хидроксилне групе се сматрају најзначајнијим структурним елементима одговорним за високу антиоксидативну моћ флавоноида (Cotelle, 2001; Yang и сар., 2001; Амић и сар., 2003). Ове групе могу бити извори водоникових атома потребних за процес неутрализације радикала. Повећањем броја хидроксилних група, као и продужењем бочног низа (због могућности стабилизације слободно-радикалских форми конјугацијом у бочном низу) расте антиоксидативна активност ових једињења.

У односу на број хидроксилних група присутних у молекулу флавоноида, њихов положај има далеко већи значај. Тако, на пример, флавоноиди који имају хидроксилне групе у орто положају и хидроксилне групе на А прстену (кверцетин, робинетин, лутеолин, мирицетин) имају израженија антиоксидативна својства (чак и до четири пута већа од Тролокса). Због великог броја могућих реакционих центара, молекул флавоноида може да реагује са више радикала истовремено.

Један од могућих механизма антиоксидативног деловања флавоноида је механизам у коме флавоноидне компоненте отпуштају водоников атом стварајући радикал флавоноида

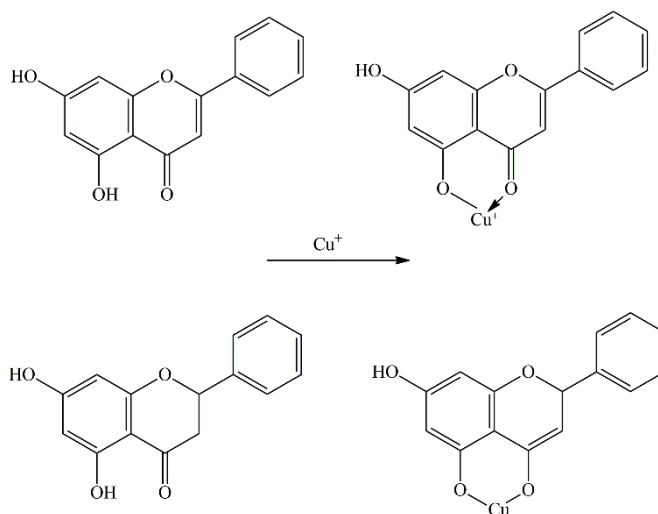
који може накнадно да отпусти још један водоников атом диспропорционисањем и да на тај начин заврши реакцију (слика 12). Накнадно отпуштање водониковог атома је алтернативни пут и може бити доминантан механизам превођења радикала у хинон (Seoum и сар., 2006).



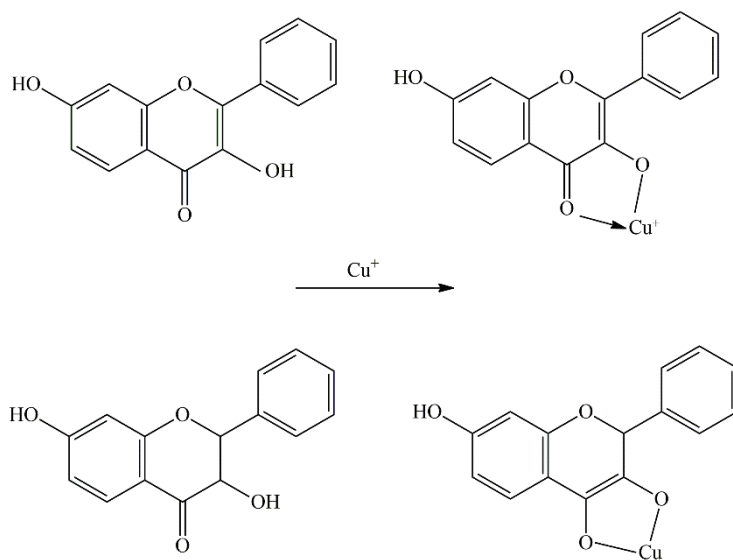
Слика 12. Резонантне структуре радикала флавоноида.

Резултат оваквог механизма јесте уклањање слободних радикала уз формирање мање реактивних структура, чија је повећана стабилност последица делокализације електрона и постојања више резонантних форми. Са повећањем стабилности насталог радикала повећава се могућност настанка рекомбинантних реакција које доводе до терминације слободно-радикалских процеса.

Поред механизма отпуштања водоника, за флавоноиде је карактеристичан и механизам хелирања метала (Afanas'ev и сар., 1989). Хелатори метала могу да смање редокс потенцијал оксидованих форми метала и тиме спрече даљу оксидацију металом. Процес хелирања се може дешавати на 3-хидрокси-4-кето групама и/или 5-хидрокси-4-кето групама флавонола (слика 13) (Hudson и сар., 1983; Pokorny, 2001).



5-хидроксифлаволи и флаванони метални комплекси 5-хидроксифлаваноида



3-хидроксифлаволи и флаванони метални комплекси 3-хидроксифлаваноида

Слика 13. Хелирајући механизам флавоноида.

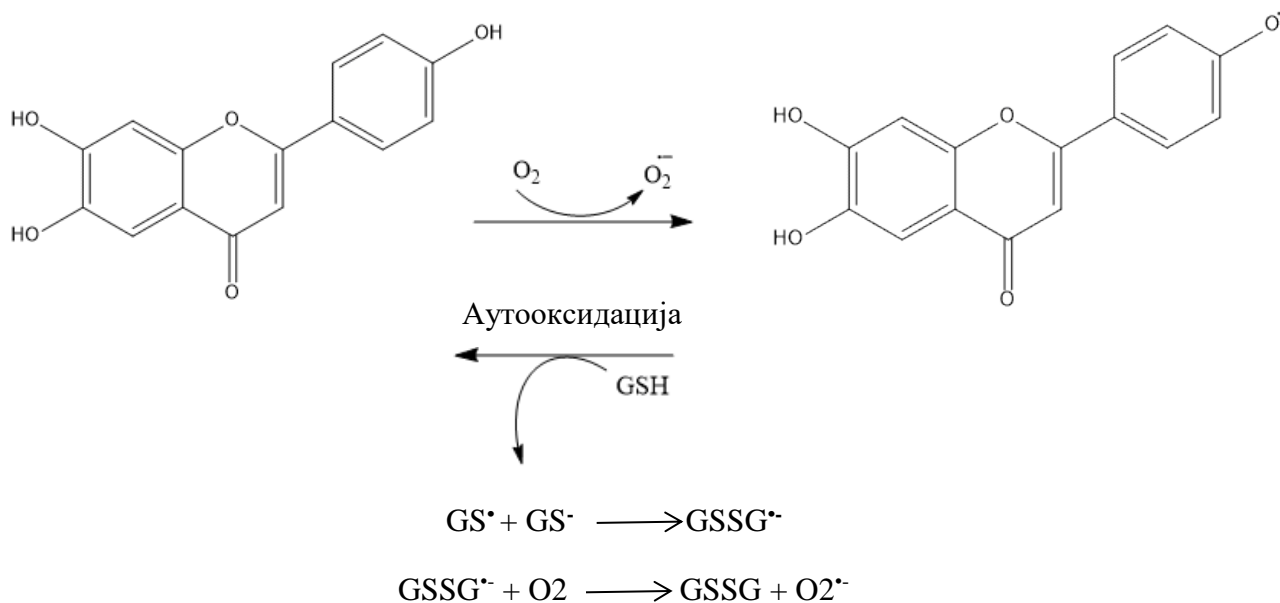
Заштитни ефекат флавоноида доказан је *in vitro* и *ex vivo* испитивањима. Они се одликују способношћу инхибиције оксидације липида, могу да инхибирају одређене ензимске системе, као и да реагују са пероксил радикалом, попут витамина Е, и при томе окончавају аутооксидацију незасићених масних киселина. Неки од ензимских система које флавоноиди могу инхибирати су ксантин-оксидаза, протеин киназа Ц, циклооксигеназа,



липооксигеназа, микрозомална монооксигеназа, глутатион S трансфераза, митохондријална сукцин оксидаза, NADH оксидаза.

Захваљујући нижем редокс потенцијалу флавоноиди могу редуковати слободне радикале који имају већи редокс потенцијал попут супероксид анјон радикала, пероксил, алкоксил, хидроксил радикала, предајом атома водоника.

Међутим, понекад у условим оксидативног стреса флавоноиди могу имати и прооксидативно деловање, тако да и они сами могу продуковати слободне радикале (слика 14) (Rietjens и сар., 2002).



Слика 14. Механизам прооксидативног деловања флавоноида.

Да би флавоноид имао функцију ефикасног антиоксиданса, мора да испуни два услова:

- да буде присутан у нижој концентрацији у односу на материју подложну оксидацији и да успори или спречи реакцију оксидације;
- радикал који је настао из флавоноида мора да буде стабилан како не би иницирао ланчану реакцију.

Када су у питању биљни екстракти, захваљујући чињеници да они представљају комплексне смеше природних једињења, њихова антиоксидативна активност није резултат деловања само једне компоненте. Позитивни и израженији ефекти антиоксидативног деловања флавоноида у оваквим системима могу бити и резултат њихове интеракције са

другим физиолошким антиоксидансима – витамином Ц или витамином Е на пример (Pekkarinen и сар., 1999; Pedrielli и Skibsted, 2002). Када се унесу у организам, антиоксидантни флавоноиди делују синергистички, па је сумарно дејство веће од дејства појединачних компоненти.

### 2.2.2. Антимикробно деловање

Патогени микроорганизми (бактерије, гљиве, вируси) одликују се способношћу да изазову различите заразне болести након њиховог продирања у живи организам. Ови организми изазивају заразне болести на различите начине: продукцијом токсина којима оштећују ћелије домаћина; продукцијом супстанци којима ометају метаболизам ћелија и организама; механичким путем и размножавањем у самим ћелијама (Марковић, 1990). Међутим, тачни механизми изазивања нежељених ефеката на живе организме у великом броју случајева нису познати или нису до краја разјашњени. Са друге стране, сва жива бића поседују различите механизме одбране од патогених напада, односно механизме помоћу којих се супротстављају патогеној активности изазивача болести, што представља отпорност организма која може бити специфична (имунитет) или неспецифична (резистенција). У борби са болестима изазваним микробима значајно место заузели су синтетички антибиотици. Међутим, последњих година све су учесталије бактеријске инфекције узроковане резистентношћу бактерија на синтетичке антибиотике (Станковић и сар., 2011; Савић, 2014). Повећање доза приликом третмана хемијски синтетисаним производима, за последицу може имати бројне нуспојаве. Стога, последњих година, посебна пажња се посвећује развоју природног и безбедног начина контроле и заштите људи од микробних инфекција. Испитивањем хемијских, биолошких и фармаколошких особина природних производа коришћених у традиционалној медицини широм света добијени су многи терапеутски агенси који се данас користе у модерној, конвенционалној медицини. Једињења са јаким антимикробним карактеристикама изолована из биљног материјала (невен, коприва, жалфија, нана и др.) данас су заузела значајно место у савременој медицини приликом третмана различитих инфекција.

Познато је да етарска уља биљака, захваљујући свом специфичном хемијском саставу, поседују антимикробна својства. Компоненте које улазе у састав етарских уља најчешће припадају класама кумарина, терпена, а тачан механизам њиховог антимикробног

деловања није у потпуности разјашњен. Ипак, имплицирано је да се њихова активност одвија на нивоу инхибиције синтезе ћелијске мембране, затим нарушавањем структуре одређених ензимских система, смањењем концентрације ензимских система (HMG-CoA-редуктаза) или деловањем на генетски материјал микроорганизама (de Laurentis и сар., 2005). Компоненте етарског уља могу делимично или потпуно инхибирати раст бактерија, тако да се оне одликују бактериостатским или бактерицидним деловањем (Mayaud и сар., 2008; Friedman и сар., 2002).

Поред етарских уља све су чешћа тестирања екстраката биљака богатих полифенолним једињењима. Многобројним *in vitro* тестовима извршен је скрининг антимикуробне активности флавоноида чиме је потврђена антимикуробна активност ових биолошки важних молекула (Yamada, 1991). Тако, на пример, утврђено је да се антимикуробна активност прополиса приписује управо високом садржају фенолних компонената. У првом реду ова активност је последица високог садржаја флавоноида (Pepeljnjak и сар., 1982; Grange и Davey, 1990; Cheng и Wong, 1996; Park и Ikegaki, 1998; Bosio и сар., 2000; Hegazi и сар., 2000; Toreti и сар., 2013), као и садржаја одређених фенолних киселина. Истраживања о антибактеријској активности флавоноида су у порасту, а самим тим расте и број документованих студија. Доказано је да флавоноиди (Zheng и сар., 1996; Rauha и сар., 2000; Nishino и сар., 1987; Iniesta-Sanmartin и сар., 1990; Encarnacion и сар., 1994; Sato и сар., 1996; Alcaraz и сар., 2000), глукозиди флавоноида (Ng и сар., 1996; el-Lakany и сар., 1997; Verma и сар., 1997), изофлавоноиди (Dastidar и сар., 2004; Chacha и сар., 2005), флаванони (Hufford и Lasswell, 1978; Fukui и сар., 1988; Biyiti и сар., 1988; Tsuchiya и сар., 1996; Kuroyanagi и сар., 1999; Wächter и сар., 1999; Alcaraz и сар., 2000; Deng и сар., 2000; Chacha и сар., 2005), изофлаванони (Li и сар., 1998), флавоноли (Nishino и сар., 1987; Kuroyanagi и сар., 1999; Simin и сар., 2002), флавонол-глукозиди (Ng и сар., 1996; Yadava и сар., 1998; Faizi и сар., 1999; Liu и сар., 1999), изофлаванони (Osawa и сар., 1992), као и халкони (Hufford и Lasswell, 1978; Gafner и сар., 1996; Alcaraz и сар., 2000; Chacha и сар., 2005) имају антибактеријско дејство. Поједни молекули флавоноидне структуре су изоловани и испитивани у погледу антимикуробне активности, у првом реду антибактеријске, при чему је и квантификована њихова активност. Примери таквих флавоноида су апигенин (Khanna и сар., 1980; Palacios и сар., 1983; Öksüz и сар., 1984; Ohemeng и сар., 1993; Bashir и сар., 1994; Aljancic и сар., 1999; Basile и сар., 1999; Basile и

сар., 2000; Sato и сар., 2000), лутеолин и лутеолин-7-глукозид (Bashir и сар., 1994; Sato и сар., 2000), кверцетин, 3-О-метил-кверцетин, глукозиди кверцетина (Khanna и сар., 1980; Rauha и сар., 2000; Arima и Danno, 2002), камферол и његови деривати (Pomilio и сар., 1992; Sakar и сар., 1992; Rauha и сар., 2000), нарингенин и нарингин (Ramaswamy и сар., 1972; Ng и сар., 1996; Tsuchiya и сар., 1996; Rauha и сар., 2000).

Посебну пажњу истраживача привлачи антивирусна активност појединих флавоноида у борби против вируса хумане имунодефицијенције (ХИВ вирус). Због великог значаја овог открића све је већи број активности усмерен ка синтези деривата природних флавоноидних молекула. Поједина истраживања доказала су значај синергизма и у случају антивирусног деловања флавоноида, а посебно флавона и флавонола. Тако, на пример, кемферол и лутеолин показују снажан синергистички ефекат против ХСВ (вирус херпеса - *Herpes simplex virus*). Даље, имплицирано је да прополис има значајно већи антивирусни ефекат него његове појединачне компоненте (Amoros и сар., 1992). Синергизам је, такође, присутан и између флавоноида и других молекула нефлавоноидних структура. На пример, кверцетин појачава ефекте 5-етил-2-диокси-уридин ацикловира (Mucsi и сар., 1992; Middleton и сар., 1993) против ХСВ и лажног беснила, односно Ајјескијеве (Ajjeszky) болести, чији је узрочник херпес вирус. Апигенин такође појачава антивирусно деловање ацикловира против ових вируса (Mucsi и сар., 1992).

Препознато је да модификације структуре флавоноида могу резултовати добијањем нових, моћнијих антимикуробних агенаса. Постојећи подаци који се односе на активност ових једињења у зависности од њихове структуре указују на то да је могуће синтетисати потентан антибактеријски флавонон халогенацијом В прстена, као и супституцијом геранил или лавандулил група на прстену А. Велики напредак који је постигнут у откривању биосинтетских путева флавоноида (Dixon и сар., 1998) могао би у скорије време да резултује синтезом аналога биолошки активних флавоноида путем генетичке манипулације.

Последњих година све је већи број *in vivo* истраживања антимикуробне активности флавоноида. Оваквим тестовима доказано је да орална примена кверцетина у концентрацијама од 142,9 mg/kg и 214,3 mg/kg штити заморце против индуковане *Shigella* инфекције, која је са друге стране била летална за нетретирану (контролну) групу животиња. Доказано је да апигенин инхибира раст 15 микробних линија метицилин резистентне стафилококе, као и различитих сојева *Staphylococcus aureus* у концентрацијама

између 3,9 и 15,6 g/mL (Sato и сар., 2000). Резултати могу варирати зависно од начина одређивања антимикробне активности.

Методe за одређивање антимикробног потенцијала могу бити различите. Најчешће примењивана метода је диск дифузиона метода. Принцип ове методе је да испитивана супстанца дифундује у храњиву подлогу и делује инхибиторно на размножавање микроорганизама (бактерија и гљива) претходно засејаних на ту подлогу. У том случају користе се дискови или таблете обложене тачно одређеном концентрацијом испитиваног узорка. Након одређеног инкубационог периода читава се резултат као пречник зоне инхибиције раста микроба. Уколико су посматрани микроорганизми осетљиви на дејство испитиваног екстракта или његових компонената, доћи ће до изостанка њиховог раста у зони дејства антимикробног агенса. Поред ове методе, често коришћене методе за испитивање антимикробног потенцијала биљних екстраката јесу дилуционе методе на чврстој или у течној подлози (агар-дилуциона и дилуциона метода у епруветама).

### ***Антимикробна активност камилице***

Међу многобројним биолошким активностима камилице, посебна пажња усмерена је ка њеној антимикробној активности. Многобројним *in vitro* тестовима доказано је да етарско уље камилице показује активност против 25 различитих грам позитивних и грам негативних бактерија (Lis-Balchin и сар., 1998; Мскау и Blumberg, 2006). Висока антифунгална активност (91-95%) њеног етарског уља утврђена је према гљивама рода *Aspergillus* и *Fusarium* (Soliman и Badeaa, 2002; Мскау и Blumberg, 2006). Изоловане компоненте етарског уља, у првом реду  $\alpha$ -бисаболол, фарнезол, хамазулен, неролидол и гермакрен Д, такође показују висок ниво антимикробне активности.

Иако се носиоцем антимикробне активности сматра етарско уље, односно компоненте етарског уља, доказана је и висока антимикробна активност теже испарљивих компонената камилице (флавоноида и фенолних киселина), као и њених екстраката. Резултати истраживања показују да су водени екстракти камилице ефикаснији у борби против плесни и квасаца, док етанолни екстракти показују већу активност према бактеријама (Мскау и Blumberg, 2006). Алкохолни екстракти камилице показују веома високу антимикробну активност у случају бактеријских сојева грам позитивних (*Staphylococcus aureus* ATCC

12600, *Streptococcus mutans*, групе Б *Streptococcus*, *Streptococcus salivarius*) и грам негативних бактерија (*Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* и *Leptospira icterohaemorrhagiae*). Поред улоге у борби против бактерија, гљива и квасаца, етанолни екстракти се одликују способношћу инхибиције развоја појединих врста вируса.

Истраживања показују да се поједине компоненте камилице, односно њених екстракта или етарског уља, одликују способношћу да повећају осетљивост бактерија на низ клинички значајних антибиотика. Тако, на пример, неролидол,  $\alpha$ -бисаболол и фарнезол изазивају одређене промене на ћелијским мембранама бактерија, чиме се повећава пропустљивост, односно продирање егзогенних супстанци попут антибиотика или етидијум бромида (Brehm-Stecher и Johnson, 2003). Третман поменутих једињењима у опсегу концентрација од 0,11 до 0,44 g/l повећава осетљивост *Staphylococcus aureus* на ципрофлоксацин, клиндамицин, еритромицин, гентамицин, тетрациклин и ванкомицин. Ово уједно сугерише улогу ових сесквитерпеноида као фактора неспецифичне бактеријске пермеабилности ка антибиотцима и антимикуробним агенсима (Brehm-Stecher и Johnson, 2003; Kamatou и Viljoen, 2010). Поред овога  $\alpha$ -бисаболол и неролидол показују самосталну антимикуробну активност против *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*, али су у том случају неопходне веће концентрације поменутих једињења (van Zyl и сар., 2006; Kamatou и Viljoen, 2010). На основу резултата више *in vitro* студија са неролидолом и гермакреном Д, имплицирана је њихова улога као антимикуробних хемотерапеутика. Овим је показано да  $\alpha$ -бисаболол има способност да инхибира раст *Bacillus phlei* резистентне на стандардна антиинфективна средства, што указује на могућност и велику важност употребе антимикуробних агенаса биљног порека (Simoes и сар., 2008).

Одређивање антимикуробне активности *in vitro* омогућава да се јасно сагледа могућност коришћења камилице и њених производа у борби против микроорганизама, као и могућност замене антибиотика природним производима у случају лакших инфекција. Ипак, једно од најважнијих питања које се поставља у савременим истраживањима јесте питање ефективне концентрације ових једињења.

### 2.2.3. Антиканцерогена активност

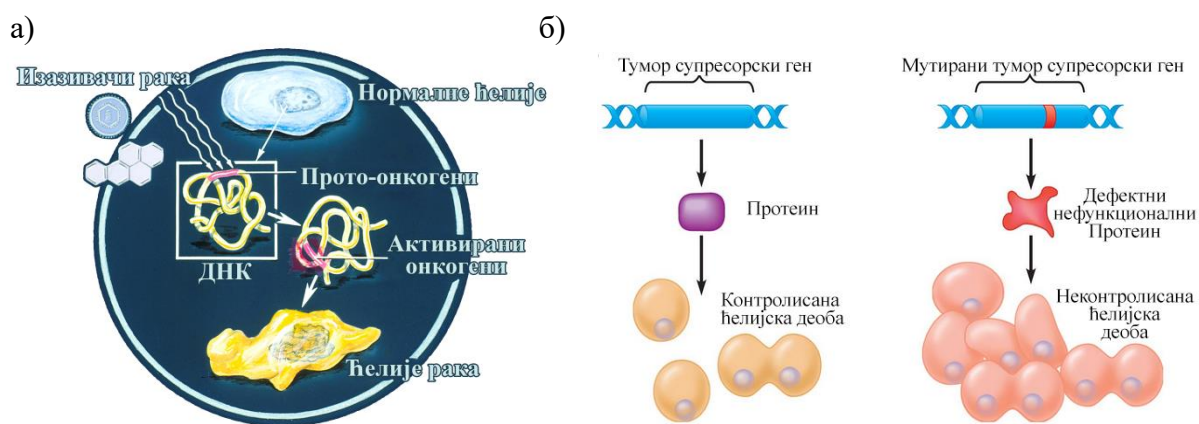
Туморска обољења настају услед поремећаја основних механизма регулације ћелијског циклуса. У таквим условима ћелије не реагују на сигнале који регулишу њихово понашање и оне почињу неконтролисано да расту и да се деле.

Сваки поремећај у пролиферацији може бити доброћудни (бенигни) или злоћудни (малигни). Туморска прогресија се најчешће дешава у смеру повећане злоћудности, а сам појам малигног тумора се изједначава са појмом канцера (Cooper и сар., 2004). Иако се појам канцера временом мењао и другачије дефинисао, данас патологи под овим термином подразумевају широк скуп неоплазми са различитим генетским абномалијама и варијабилним одговором на терапију (Marczi и сар., 2008). За малигна обољења карактеристича је неконтролисана деоба ћелија уз одсуство апоптозе, инвазивност (продирање у околна ткива и њихово уништавање) и понекад метастаза, односно ширење по организму путем крвотока и лимфотока и формирање секундарних тумора. За настајање секундарних тумора одговоран је ензим матрикс металопротеиназа (ММП), који се излучује током одвијања уобичајеног метаболичког процеса. Овај ензим се одликује способношћу разградње густог међућелијског матрикса и везивног ткива. У случају туморских ћелија, услед поремећаја у пролиферацији, долази до нагомилавања туморске масе и све ћелије у нагомиланој туморској маси производе велике количине ММП. Услед активности овог ензима ћелије тумора се одвајају од туморске масе и даље шире организмом путем крви или лимфе, доспевајући при томе до других органа (Савић, 2014). За разлику од малигног тумора, бенигни тумор је окарактерисан ограниченим растом уз одсуство метастазирања и инвазивног понашања.

Процес трансформације ћелија из нормалних у малигне назива се канцерогенеза (онкогенеза), а сами агенси који индукују овај процес означавају се као канцерогени агенси. Овакви процеси могу започињати готово у свим органима, али органи који су посебно подложни овим процесима јесу они који су хронично изложени спољашним утицајима (плућа, црева, итд.). Процес канцерогенезе је вишефазни процес, и да би до њега дошло, по једном од механизма, потребно је да се догоди већи број мутација што обично захтева дужи временски период. Прва фаза у том процесу (иницијација) отпочиње када геном ћелије претрпи промене које остају нерепарирани или се репарирају погрешно. У другој фази (фаза

промоције) долази до деобе већ оштећене ћелије, при чему се формира премалигни тумор. Под дејством различитих фактора долази до последње треће фазе (иреверзибилна фаза), где долази до прогресије, односно до продукције ћелија-клонова са повећаним пролиферативним капацитетом, инвазивношћу и способношћу метастазирања (Marks и Fürstenberger, 1999; Yuspa, 2000; Yokota, 2000; Pezzuto и сар., 2005). Услед овога постепено долази и до морфолошких промена у ткиву, односно долази до појаве лезија.

Ћелијски циклус регулисан је низом гена који пре свега утичу на њен раст, пролиферацију и диференцијацију. Ту спадају прото-онкогени и тумор супресорски гени, а за настанак и развој тумора важни су још и гени одговорни за репарацију насталих грешака у молекулу ДНК. Мутација у прото-онкогенима доводи до њихове конверзије у онкогене, док у случају тумор супресорских гена долази до инактивације или губитка тих гена (слика 15).

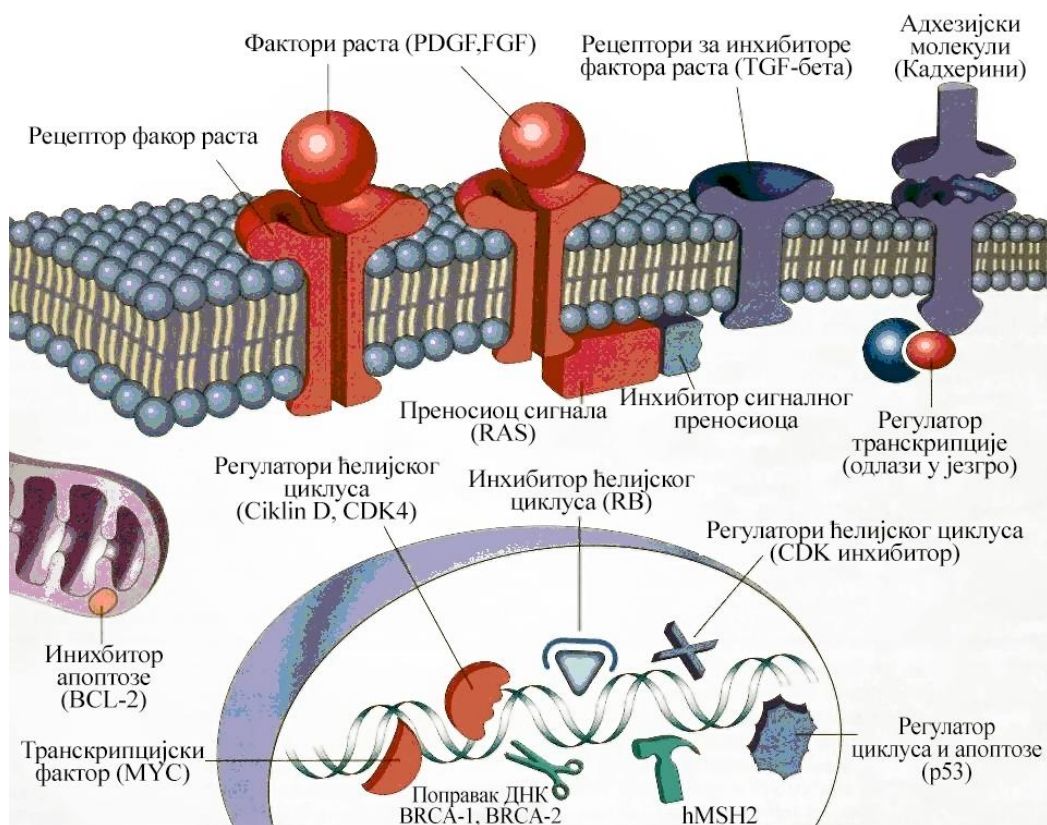


Слика 15. Развој канцера проузрокован генетским аномалијама: а) онкогенима; б) тумор-супресорским генима.

Прото-онкогени су гени укључени у трансдукцију сигнала у ћелији, а њихово функционисање директно је повезано са нормалном ћелијском пролиферацијом и диференцијацијом (Шапија и сар., 2006). До сада је познато око 100 прото-онкогена, а сама чињеница да су сви јако добро еволуцијски очувани говори о њиховој важности. Услед појаве мутација или појачане експресије гена може доћи до преласка прото-онкогена у тумор-индукујуће онкогене. Активација онкогена постиже се на три начина: мутацијом, транслокацијом и амплификацијом. Најчешће мутације су тзв. тачкасте мутације, у којима се један нуклеотид замењује другим. Најзначајнији онкогени су онкогени породице *ras*. *Ras*

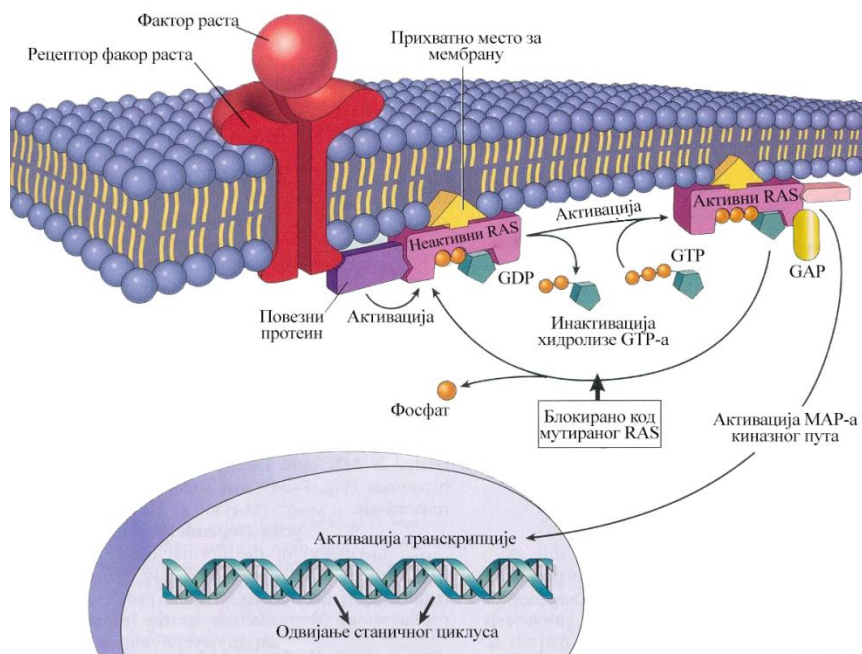


породицу онкогена чине три врсте гена: *H-ras*, *K-ras* и *N-ras* (Saluson, 2002). Протеини ових онкогена су блиско повезани са G-протеинима који имају важну улогу у преносу сигнала са мембране у ћелију (Шамија и сар., 2000). Поред ових значајни су и *тус* (*c-тус*, *n-тус*, *l-тус*), *c-myb* и *c-fos* онкогени чији се протеински производи налазе у самом ћелијском језгру и имају улогу у регулацији процеса транскрипције и експресије гена. *Bcl-2* породица онкогена је једна од најкасније откривених, а њихова функција се огледа у регулацији апоптозе, при чему имају одлучујућу улогу у процесу одабира да ли ће ћелија ући у процес апоптозе или ће преживети, што је још један од доказа повезаности онкогена са неопластичном трансформацијом. Локализација и функција најзначајнијих група прото-онкогена приказана је на слици 16.



Слика 16. Ћелијска локализација и функција најзначајнијих група прото-онкогена (обојени црвеном бојом) (Kumar и сар., 2005).

Протеини онкогена могу бити полипептидни фактори раста, рецептори за факторе раста, компоненте важне за ћелијски циклус или транскрипцијски фактори. Начин њиховог деловања је вишеструк. На слици 17 дат је приказ активности прото-онкогена. Трајно активан мутирани *ras* (онкоген) због немогућности да хидролизује ГТП, узрокује трајну миотичку стимулацију ћелије без присуства спољашњег сигнала (Kumar и сар., 2005).



Слика 17. Приказ активности прото-онкогена *ras* (Kumar и сар., 2005).

Тумор-супресорски гени имају супротну улогу у контроли ћелијског раста у односу на онкогене. У нормалним условима тумор-супресорски гени инхибирају пролиферацију ћелија и настанак малигног обољења. Њихов губитак или инактивација доводе до настанка тумора (Cooper и сар., 2004). Тумор-супресорски гени инхибирају ћелијске путеве које продукти онкогена стимулишу, при чему заустављају ћелијски циклус и учествују у поправци оштећења ДНК молекула (Mršić и сар., 2004).

Услед оваквих генских мутација, почиње да се покреће карциногенеза и долази до појаве неопластичних ћелијских промена (Mendelshon и сар., 2001). Саме мутације могу бити изазване ендогеним или егзогеним факторима. Ендогени фактори обухватају генетске, хормонске и имунолошке факторе, као и хемијске канцерогене факторе настале нормалним

одвијањем метаболитичких процеса (ROS, RNS) (Yuspa, 2000). Егзогени фактори представљају утицај агенаса из околине на генетски материјал (физички и хемијски канцерогени агенси, UV и јонизујуће зрачење, микотоксини, јони тешких метала, биолошки канцерогени агенси, одређени вируси, бактерије, паразити и сл.) (Орчић, 2010). До појаве генетских аномалија може доћи и услед деловања фактора који стимулишу ћелијску деобу (пролиферацију) услед случајних мутација које се могу јавити приликом репликације ДНК (стероидни хормони, разна синтетичка једињења) (Henderson и Feigelson, 2000).

### ***Ћелијска апоптоза – програмирана ћелијска смрт***

Један од ограничавајућих фактора раста тумора је апоптоза, односно физиолошка смрт ћелија, која се запажа у току ембрионалног развоја и током обнове ткива и органа одраслих јединки. Сам процес апоптозе је неопходан за одржавање равнотеже између старих и нових ћелија нормалног ткива током живота (Hall и сар., 1994; Zhang и Негман, 2002). Поред апоптотичке смрти, постоје још и ћелијске смрти услед некрозе и аутофагија. Основна разлика међу њима огледа се у чињеници да је за одвијање процеса апоптозе и аутофагије потребна енергија, те ћелија активно учествује, а ова два начина ћелијске смрти јављају се, како у току физиолошких, тако и у току патолошких услова. Са друге стране некроза је пасиван тип ћелијске смрти, који настаје услед колапса ћелијских хомеостатских механизма и испољава се у екстремним нефизиолошким условима.

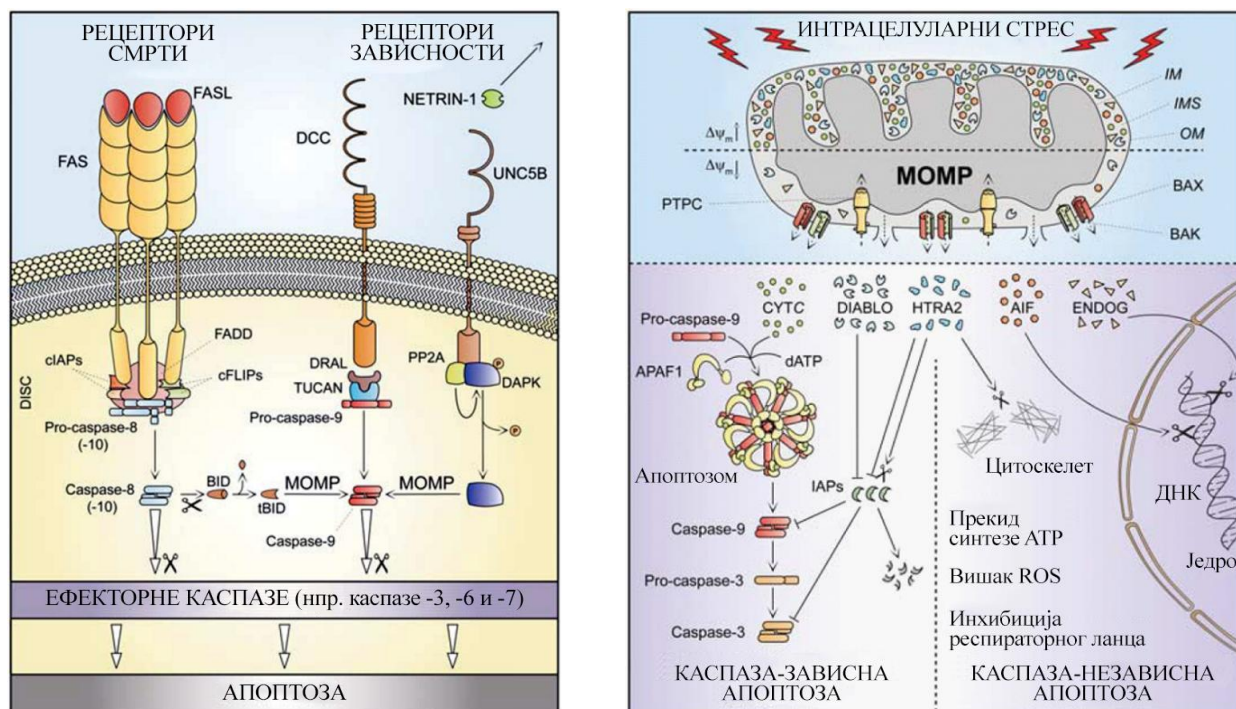
Ток одвијања апоптозе је генетски регулисан порецом током којег ћелија претрпи низ морфолошких промена. Кључну улогу у његовом одвијању имају каспазе, које одмах по свом активирању започињу апоптотички процес. Сигнали за активацију каспаза могу доћи од околних ћелија (спољашни пут активације) или из унутрашности ћелија (унутрашњи пут активације).

Спољашни пут активације каспаза (слика 18) укључује тзв. рецепторе смрти из TNF/Fas породице, која се протеже од спољашње до унутрашње површине ћелијске мембране (Wajant, 2002; Schutze и сар., 2008; Mehlen и Bredesen 2011; Којић, 2012). Про-каспаза 8 се активира примајући сигнал преко адаптерског молекула. Активирана каспаза 8 почиње саму себе да цепа, те узрокује активацију осталих каскадних каспаза, а тиме и ћелијску смрт (Cooper и сар., 2004). Једном активирани каспазе разграђују читав низ

протеина неопходних за живот ћелије и доводе до већине морфолошких промена које настају током апоптотског процеса.

Током унутрашњег активирања каспазе (слика 18), сигнали настају у ћелији услед оштећења у појединим органелама. Централно место у овом процесу имају митохондрије чије мембране постају пермеабилније за мале молекуле који излазе из митохондрија и активирају каспазе.

Током одвијања апоптозе не долази до разградње мембрана, те се ћелијски садржај не ослобађа у околину. Као последица овога јавља се одсуство запаљенских процеса током њеног одвијања. Исход апоптотских процеса је да ћелија на крају бива разбијена на више везикула које се укађају фагоцитозом.



Слика 18. Спољашни и унутрашњи пут активирања каспаза и апоптозе (Vaux, 2002).

Регулацију процеса апоптозе омогућава читав низ регулаторних протеина који могу да учествују у активацији или блокирању процеса. Протеини из *Bcl-2* породице протеина имају важну улогу у процесу регулације, као и протеин *p53*. Поремећај у регулацији апоптозе може да доведе до појаве тумора, али и читавог низа других обољења (нпр. неуродегенеративне болести).

**Молекуларни механизми антиканцерогеног деловања биљака**

Хемотерапија канцера укључује примену једињења (најчешће хемијски синтетисаних) која могу да успоре или потпуно зауставе раст канцерогених ћелија, или пак да доведу до њихове смрти. Третмани у борби против туморских обољења могу укључивати и примену радијације. Међутим, и овај, као и третман хемијски синтетисаним једињењима, често испољава летални утицај на нормалне, односно здраве ћелије, што изазива појаву „споредног“ ефекта. Овакви третмани често доводе до слабљења имунитета, тако да пацијенти постају подложни разним инфекцијама. Стога, у фокусу светске научне јеваности последњих година је потрага за хемотерапеутицима ниске токсичности и широког спектра дејства.

Велики број антиканцерогених једињења јесу заправо примарни и секундарни метаболити биљака, и то како у својој основној, тако и у структурно модификованој форми (стилбени, лигнани, стероиди, сескви- и дитерпени, итд.). Међу овим молекулима посебну пажњу привлаче полифенолна једињења биљака, а у првом реду флавоноиди.

Екстракти биљака и њихова фенолна једињења могу да делују на бројне циљне молекуле сигналних путева у малигно трансформисаној ћелији, нападајући тако истовремено више основних својстава канцера. Различити типови канцера користе различите механизме, тако да екстракти појединих биљака имају специфичне антиканцерогене ефекте према одређеним типовима канцера. Значај полифенолних једињења једним делом се огледа у њиховој антиоксидативној активности којом штите биомолекуле (ДНК, РНК, протеине, липиде и др.) од оксидативног оштећења (Ramos, 2008; Kang и сар., 2011). Малигне ћелије одликује виши ниво ендогеног оксидативног стреса и измењен редокс статус у односу на нормалне ћелије, тако да оне показују повећану осетљивост на фенолна једињења у односу на нормалне ћелије (Trachootham и сар., 2009). Фенолни антиоксиданси испољавају своју антиканцерогену активност путем модулације компоненети сигналних путева који регулишу ћелијски циклус (Aggarwal и Shishodia, 2006; Ramos, 2008; Neergheen и сар., 2010).

Инхибирајући тачно одређене ензиме фазе I и повећавајући генску експресију канцероген-детоксификујућих ензима фазе II, биљни полифеноли могу да спрече активацију канцерогена. Уједно, они могу довести до застоја у G1, G2/M или S фази ћелијског циклуса снижењем или повећањем експресије неких важних протеина.

Посебно важна чињеница у случају биљних полифенола јесте њихова способност да утичу на процес апоптозе у малигно-трансформисаним ћелијама (Aggarwal и Shishodia, 2006; Ramos, 2008; Neergheen и сар., 2010). Ови молекули биљног порекла могу да изазову активацију спољашњег пута апоптозе преко рецептора смрти или унутрашњег пута активације апоптозе преко митохондрија. Такође, уочено је и да могу истовремено да активирају оба апоптотска механизма.

Показано је да снижавају генску експресију регулаторних антиапоптотских протеина (Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1, c-FLIP, сурвивин, XIAP, cIAP1, cIAP2), док повећавају генску експресију регулаторних проапоптотских протеина (Bax, Bak, Bad). Циљни молекули на које делују екстракти и феноли биљака су и каспазе (каспаза-8, каспаза-9, каспаза-3, каспаза-7), као и PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase). Антиинфламаторна активност екстраката и фенолних једињења биљака значајно доприноси њиховом канцер-супресивном дејству (Aggarwal и Shishodia, 2006; Ramos, 2008; Neergheen и сар., 2010; Kang и сар., 2011).

Поред овога, полифеноли биљака, на челу са флавоноидима, се одликују својом способношћу ка морфо-функционалној регенерацији организма појачавајући уједно и његов одбрамбени систем. Због свега наведеног, данас постоји велики интерес како у светској науци, тако и у индустрији за искоришћењем биљака као извора водећих биоактивних анти-канцерогених супстанци, као и за развој стандардизованих биљних лекова.

### 2.3. Екстракција лековитог биља

Биљни производи, захваљујући свом високом биолошком потенцијалу налазе широку примену у производњи дијететских суплемената и функционалне хране, која, поред задовољавајућих нутритивних својстава, испољава и одређене фармаколошке и физиолошке ефекте. Последњих година дошло је до значајног напретка у технологији прераде лековитог биља, као и у изоловању фармаколошки активних једињења природног порекла, пре свега захваљујући новим научним сазнањима везаним за механизме издвајања једињења из сложених матрикса. Ово је утицало на то да екстракциони процеси заузму значајно место у савременој науци, те је развијен велики број екстракционих техника. Стога се данас, на индустријском нивоу, примењују различити процеси за добијање биљних производа и екстраката са одеђеним биопотенцијалом.

Иако се процес екстракције вековима уназад користи за добијање биолошки значајних производа, он још увек представља својеврсни изазов, пре свега због сложености састава узорака из којих се компоненте екстрахују. Успешност процеса екстракције у многоме зависи од особина самог биљног материјала, односно од карактеристика биљног ткива. Веома је важно правилно припремити биљну сировину пре самог процеса екстракције. Најчешће је потребно најпре извршити сушење и уситњавање биљног материјала. Сушење има за циљ денатурисање биљних ћелија. Наиме, протоплазма живих ћелија свежег биљног материјала је полупропустљива мембрана кроз коју активни састојци, растворени у ћелијском соку, не могу да пролазе. Квашењем оваквог материјала, услед осмозе, долази само до продирања воде, односно растварача у ћелије. Сушењем долази до денатурисања протоплазме, тако да ћелијски зид добија својства порозне средине, која пропушта растворене компоненте у оба правца. Растварач продире у поре биљног ткива и тиме испуњава ћелије, као и друге празне просторе биљног материјала. Време испуњавања пора може понекад бити веома дугачко, пре свега због присуства ваздуха у њима. За повећање брзине продирања растварача може се користити вакуумирање сувог биљног материјала, повећање притиска растварача и замена ваздуха лако растворним гасом (нпр. CO<sub>2</sub>). Истовремено, продирањем растварача у биљни материјал започиње и процес растварања активних и других састојака (Пекић и Миљковић, 1980).

Операцијом уситњавања биљног материјала нарушава се његова структура, те се део ћелија отвара и супстанце које оне садрже постају лако доступне растварачу. Уједно,

уситњавањем материјала за екстракцију долази до повећања контактне површине за размену масе, а самим тим долази и до њеног интензивнијег преноса (Милошевић, 2011).

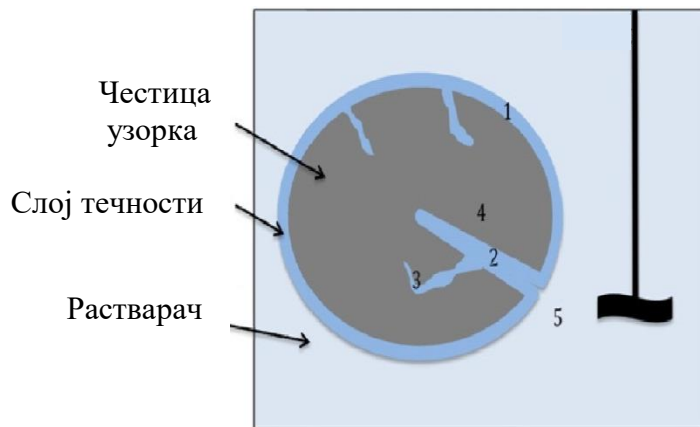
Када је реч о производњи биљних екстраката, ту се ради о узорцима који су сложеног хемијског састава, а сам жељени аналит који се из узорка изолује је обично веома чврстим везама везан за матрикс узорака, тако да познавање типа успостављених веза представља предуслов за успешност процеса екстракције. Ефекти матрикса спадају у најмање разјашњене феномене у процесима екстракција. Ови ефекти су често непредвидиви, и они у значајној мери утичу на ефикасност процеса. Чак и ако су супстанце добро растворне у примењеном растарачу ефикасност екстракције може бити незадовољавајућа уколико су аналити заробљени у матриксу различитим механизмима. Ови феномени објашњавају различиту ефикасност процеса екстракције истог аналит/растварач система у различитим узорцима. Поједине екстракционе технике нису у стању да превазиђу изузетно изражене ефекте матрикса, што уједно представља и њихов најзначајнији недостатак (Шварц-Гајић, 2012).

Процес екстракције и изоловање аналита из матрикса узорка се може поделити на неколико фаза (Pawliszyn, 2003.). Прво долази до десорпције аналита из матрикса, а затим се одвија процес дифузије жељеног једињења кроз органски слој матрикса и његовог доласка до површине матрикс-флуид фазе. У овом моменту почиње да се одвија процес дистрибуције аналита у екстракционој фази, а затим он дифундује кроз екстракциону фазу која је присутна унутар пора и прелази у део екстракционе фазе у којој се одвија процес конвекције. Задњи корак који чини процес екстракције је сакупљање екстрахованог аналита (Namiesnik и Gorecki 2000; Camel, 2001; Buldini и сар. 2002; Huie 2002; Kaufmann и Christen 2002; Smith, 2002; Tura и Robards 2002; Pawliszyn, 2003). Критични моменат у процесу екстракције је познавање карактеристика аналита и његовог односа са матриксом (Mustafa и Turner, 2011.).

Аналит у матриксу узорка може бити позициониран на пет различитих позиција (слика 19). Као што је приказано на слици 19, аналит пре свега може бити адсорбован на површини чврсте честице (1), смештен у порама чврсте честице растворене у растварачу и/или адсорбован (2), затим може бити растворен/адсорбован у микро/нано-порама матрикса (3), хемијски везан за матрикс (4) или пак растворен у целокупној запремини раствора (5) (Pawliszyn, 2003; Waldebäck, 2005). Корак који одређује брзину процеса



екстракције у највећој мери зависи од природе матрикса узорка. Тако на пример, процес десорпције ће одређивати брзину процеса када се ради о процесу у коме је неопходно савладати интеракције аналит-матрикс (пример су интеракције које постоје у природном седименту, земљишту и блату/муљу). Када су у питању биљни материјали, процеси који одређују брзину екстракције су најчешће солубилизација или дифузија (Camel, 2001; Smith, 2002; Ong и сар., 2006).



Слика 19. Положај аналита у матриксу узорка.

Разумевање основних процеса екстракције чврстих узорака омогућава избор адекватне екстракционе технике и оптимизацију процесних параметара. Веома је важно препознати ограничавајући фактор целокупног процеса. Тако, на пример, ако је ефикасност процеса екстракције незадовољавајућа услед формирања веома чврстих веза аналита са матриксом узорака, примењена екстракциона техника треба да има за циљ раскидање интеракција аналит/матрикс (Шварц-Гајић, 2012).

Поред одговарајуће припреме биљног материјала, избор растварача има важну улогу у ефикасности издвајања материја из биљака. Избор растварача за екстракцију зависи од степена хидрофилности, односно хидрофобности жељених компонаната, те се овде може применити познато правило „слично се у сличном раствара“. Другим речима, поларне компоненте које имају високе вредности диелектричне константе добро су растворне у поларним растварачима, док су неполарне компоненте, које се одликују малим вредностима диелектричних константи, растворне у неполарним растварачима. За екстракцију лековитог биља у фармацији најчешће се примењује смеша алкохола и воде, при чему се диелектрична

константа смеше мења у широким границама. Ово омогућује примену оваквих смеша за екстракцију великог броја супстанци из биљног материјала.

Осим диелектричне константе, велики утицај имају и вискозитет и површински напон растварача. Смањење вредности ових физичких карактеристика повољно утиче на процес екстраховања компонената, те се често растварачу додају различите површински активне материје ради снижења површинског напона.

### 2.3.1. Савремене екстракционе технике

Екстракција у својој основи подразумева употребу органских растварача ради издвајања анализата из комплексних матрикса. За екстракцију лековитог биља користи се читав низ лако испарљивих органских растварача, попут етил-етра, метилен-хлорида, хлороформа, бензола и сл. (Дамјановић, 2005). Наведени органски растварачи нису довољно селективни јер растварају и тешко испарљиве компоненте великих молекулских маса као што су смоле, масне компоненте, пигменти и друге пратеће компоненте. Из екстракта се коришћени растварачи уклањају упаравањем под сниженим притиском, али у крајњем производу они ипак заостају у траговима. Установљено је да присуство органских растварача у траговима у већини случајева штетно делује на људски организам, као и на сензорна својства производа (Видовић, 2011; Нађалин, 2013). Поред тога, традиционалне технике екстракције подразумевају дуго време извођења процеса, велике количине узорака и органских растварача, што ове процесе чини некономичним и непогодним са аспекта одрживог развоја.

С циљем што селективнијег издвајања анализата, развијене су многобројне савремене технике екстракције, тако да је основни концепт надограђен, а појам „екстракција“ данас има много шири смисао. Екстракциона фаза данас подразумева технолошки усавршене материјале дизајниране тако да омогуће селективу изолацију анализата из комплексних матрикса. Издвајање анализата се у савременим екстракционим техникама може остварити употребом растварача измењених физичко-хемијских особина, или медијума другачијих од класичних растварача (суб/суперкритични флуид, имобилисани растварач, растварач под притиском, специфични чврсти материјал и сл.). Поред тога, у савременим екстракционим техникама солватационе и физичко-хемијске особине конвенционалних растварача могу

бити модулиране у ултразвучном или микроталасном пољу, резултирајући добијањем растварача бољих солватационих особина (Шварц-Гајић, 2012).

Последњих година највећи број истраживања је окренут ка развоју „зелених“ технологија, односно хемијских процеса код којих се користе растварачи који не загађују животну средину. Примена зелене хемије има за циљ очување природног окружења и њених ресурса, као и умањење негативног утицаја самог процеса на људско здравље. У ту сврху, све већу популарност добија употреба суб- или суперкритичних флуида.

Развој аналитичких техника и њихова усавршена осетљивост су довеле до развоја тзв. екстракционих техника без растварача, битних са здравствених аспеката и аспеката очувања животне средине. Ове технике користе запремину растварача од свега неколико микролитара, те се њима могу екстраховати само ограничене количине супстанци. Технике екстракције суперкритичним флуидима се могу сматрати техникама без растварача, с обзиром да примењени екстрагенс не поседује већину карактеристика уобичајених растварача.

Обзиром да је један од главних недостатака конвенционалних техника екстракције велика запремина растварача, као и дуго време трајања процеса, модерне екстракционе технике теже да превазиђу ове недостатке. Један од начина којим се то може остварити јесте замена шаржних екстракционих поступака проточним у којима се узорак проводи кроз слој екстракционе фазе или се узорак пакује и имобилише док се екстракциона фаза проводи кроз чврст узорак. У проточним екстракционим техникама велике запремине течних узорака се могу превести кроз малу запремину екстракционе фазе. Проток узорака чини процес преноса масе ефикаснијим.

### **2.3.2. Ултразвучна екстракција**

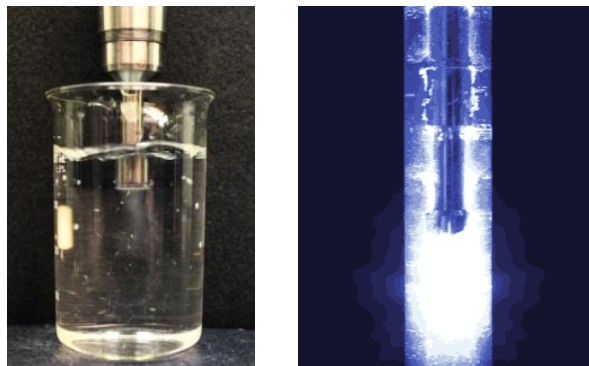
Примена ултразвука раније је била углавном ограничена на чишћење и емулговање док се данас откривају предности употребе ултразвука у различитим технолошким операцијама, попут кристализације, сушења, екстракције, филтрације, замрзавања, хомогенизације, стерилизације, деградације, итд. (Fairbanks, 2001; Mason, 1992; Povey, 1998; Дрмић и Режак Јамбрак, 2010). Последњих деценија посебну популарност примена ултразвука је добила у области добијања природних производа са израженом фармаколошком активношћу. Применом ултразвука у процесу екстракције биљног

материјала могуће је остварити већу репродуктивност у краћем временском периоду у односу на традиционалне технике екстракција. Ултразвучна екстракција не захтева високе температуре, а понекад захтева и мање количине екстрагенса (Сали и сар., 2006; Дрмић и Режак Јамбрак, 2010). У пракси се изводи помоћу ултразвучних сонди, односно сонотрода (слика 20), или мање прикладних ултразвучних купатила (Стојановић и Шварц-Гајић, 2011). Применом ултразвучних купатила феномену кавитације није изложена целокупна запремина медијума, него само медијум у непосредној близини ултразвучног генератора. Код оваквих система снага са временом опада, што утиче на репродуктивност екстракције (Patanik, 2004).



Слика 20. Сонотрода за екстракцију узорака.

Феномен који доминира у процесу екстракције ултразвуком јесте кавитација (слика 21) која настаје простирањем ултразвука кроз неки медијум. Том приликом долази до формирања микромехурића ваздуха услед наизменичног удаљавања и приближавања молекула. Брза компресија мехурића испуњених ваздухом ослобађа огромну количину енергије, која се карактерише драматичним порастом температуре и притиска (Шварц-Гајић, 2012).



Слика 21. Кавитације у течној фази.

Ултразвук омогућује продирање растварача у неразорене ћелије што повећава принос за краће време екстракције. Приликом распада кавитационог мехура близу ћелијског зида, долази до образовања ултразвучног микро-млаза који усмерава растварач према ћелијском зиду. Услед оваквог дејства ултразвука растварач продире у ћелију биљног материјала, растварајући компоненте и транспортујући их изван ћелије. Процес продирања растварача у биљни материјал у многоне зависи од капиларних сила, јер се дешава кроз огроман број пора капиларног типа. Време попуњавања капилара и ћелија растварачем може бити дуго због ваздуха који се налази у њима. То време је одређено брзином дифузије ваздуха кроз течност и може се смањити под утицајем ултразвука (Станковић и Станојевић, 2014).

Процес ултразвучне екстракције је неопходно оптимизовати, пре свега због чињенице да услед деловања ултразвука долази до драстичних промена у самом медијуму, те су могуће дисоцијације молекула и настанак слободних радикала на рачун разградње жељеног анализата. Даље, често се током процеса ултразвучног деловања генеришу високе температуре које могу изазвати прелазак појединих молекула у више енергетско стање, односно њихову ексцитацију и деградацију. Стога, процес је неопходно водити под јасно оптимизованим условима за сваки узорак, а нарочито уколико је циљ екстракције изоловање анализата присутних у ниским концентрацијама у матриксу.

Предност коришћења ултразвука лежи и у чињеници да се ултразвучни таласи простиру кроз било који медијум, те је избор растварача који се могу узети у обзир код овог типа екстракције доста широк. Сам избор растварача, као и код других уобичајених техника, зависи првенствено од његове селективности према анализата од интереса, као и од типа

узорка. Најчешће се користе растварачи попут хексана, смеша ацетон-хексан и ацетон-метилен-хлорид, и други. Имајући у виду могућу дисипацију ултразвучне енергије услед употребе великих запремина растварача, кад год је то могуће треба прибегавати употреби мањих запремина (Шварц-Гајић, 2012). Поларност растварача се може кориговати и додатком модификатора, што представља аналитички значајну предност недоступну у неким традиционалним техникама, нпр. у Soxhlet приступу.

Поред одабира растварача и температуре екстракције, веома је важно водити рачуна и о осталим факторима који утичу на учинак процеса, попут: фреквенције, снаге ултразвука и дистрибуције ултразвучних таласа (Mitra, 2003). Учинак ултразвука је пуно кориснији при нижим фреквенцијама (18 - 40 kHz), док је практично занемарљив у распону од 400 - 800 kHz. Растојање између узорка и извора ултразвука је такође веома важно, тако да је потребно обезбедити што је могуће ближи положај генератора ултразвука узорку. Ефикасност ултразвучне екстракције се даље може побољшати смањењем величине честица узорка или повећањем односа снага/маса (Mitra, 2003).

Имајући у виду да се, у односу на конвенционалне технике, ултразвучном екстракцијом повећава принос компоненти из биљног материјала, поменути вид екстракције има и индустријску важност. Применом ултразвука током процеса екстракције биоактивних компонената може се потенцијално повећати екстракциони принос одређених једињења попут, на пример, полифенола (Springett, 2001), ароматичних компонената (Vinatoru, 2001), полисахарида (Ebringerova и Hromadkova, 1997), уља (Chemat и сар., 2004). Употреба ултразвука у сврху екстракције код сировина високих цена је економична алтернатива традиционалним процесима екстракције, што је и захтев индустрије за њен одрживи развој.

Широка примена ултразвучне екстракције за добијање биљних екстраката последица је чињенице да ова метода нуди добру ефикасност не захтевајући при том дуго време одвијања процеса (процес се изводи у трајању од неколико минута до 1 часа), као и због њене релативно ниске цене. Са друге стране, недостатак ултразвучне екстракције може бити недовољна репродуктивност, затим разлагање органских молекула под дејством слободних радикала насталих у процесу кавитације, као и тенденције појединих анализа да се реадсорбују на матрикс узорка при дужем трајању процеса. Ипак, ултразвуком потпомогнута екстракција је веома погодна за издвајање термо-лабилних анализа јер не захтева загревање. Такође, постоји потенцијал за њену примену у воденим медијумима, као

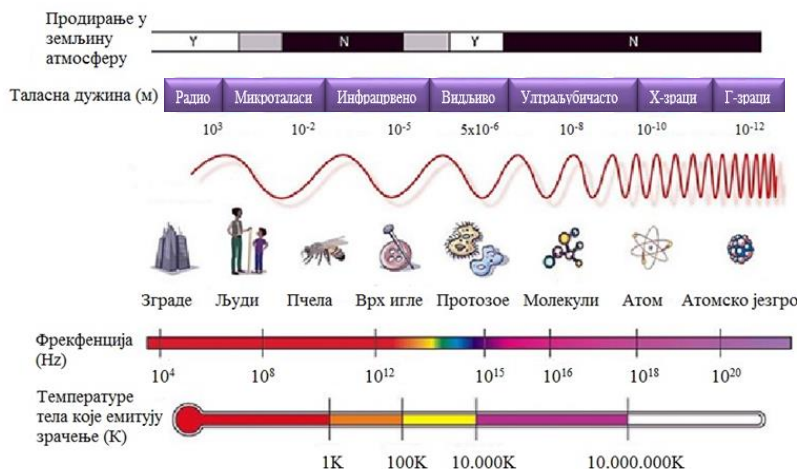
и могућност замене органских растварача „зеленим“, односно онима који се генерално окарактерисани као безбедни.

### 2.3.3. Микроталасна екстракција

Последњих година XX века употреба микроталаса нашла је широку примену у процесима загревања, сушења, пастеризације, стерилизације и сл. У технологији добијања природних производа биљног порекла, микроталасна екстракција спада у ред брзих и поузданих метода за екстракцију чврстих узорака чијом применом је могуће остваривање већег приноса екстрахованих компонената него применом стандардних екстракционих техника уз пуно краће време, и уз смањену потрошњу растварача (Abert, 2008).

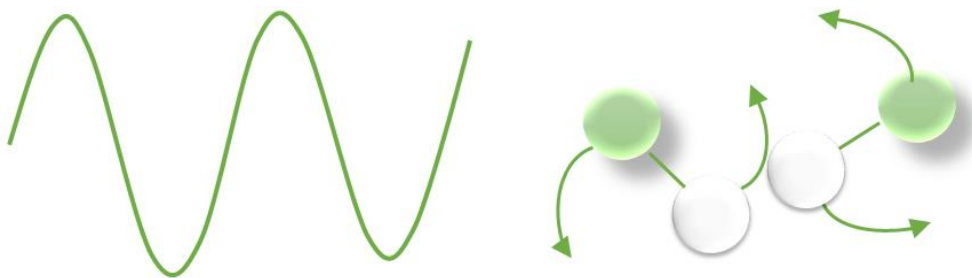
Микроталасно потпомогнута екстракција (МАЕ) или, једноставније, микроталасна екстракција је нова екстракциона техника која комбинује традиционалну екстракцију растварачем и микроталасе. Микроталасна енергија се ефикасно преноси до материје путем молекулских интеракција са електромагнетним пољем, при чему се остварује брзи трансфер енергије до растварача и материјала (Criado и сар., 2004). Директна интеракција микроталаса са молекулима растварача изазива брзо загревање (Lay-Keow и Michel, 2003). Између осталог, она се изузетно успешно може примењивати за изолацију полифенолних једињења (Шварц-Гајић и сар., 2013), те се данас она сматра потенцијалном алтернативом традиционалној чврсто-течној екстракцији за екстракцију метаболита из биљака.

За разлику од ултраљубичастих, рендгентских и гама зрака, који припадају јонизујућем зрачењу, а које при великим фреквенцијама узрокују промене у структури материје, те су изузетно опасни по здравље (слика 22), микроталаси су таласи електромагнетног зрачења (у фреквенцијском распону од 0,3 GHz до 300 GHz, што одговара таласним дужинама од 1 cm до 1 m) и припадају нејонизирајућем зрачењу.



Слика 22. Спектар електромагнетног зрачења.

Загревање помоћу микроталаса се заснива на способности неких течности и чврстих супстанци да преводе електромагнетно зрачење у топлоту. Постојање диполних молекула или јона се поставља као услов који мора бити испуњен како би дошло до интеракције супстанце или реакционе смеше са микроталасима. Процесима диполне поларизације и кондукције долази до загревања. Услед деловања електромагнетног поља, диполи теже да се поравнају у складу са његовим смером (слика 23). Уколико је фреквенција превисока, дипол не може да прати промене поља, тако да не долази до кретања, а самим тим ни до загревања. До појаве загревања може доћи уколико диполи прате промену поља, али те промене морају бити довољно брзе како би се остварила фазна разлика, која заправо доводи до губитка енергије дипола и до загревања (Мијин и Петровић, 2005). Са друге стране, до загревања неће доћи ни у случају јако ниских фреквенција, када дипол идеално прати промене поља, јер је у ствари трење између молекула одговорно за загревање.



Слика 23. Диполни молекули у осцилаторном електричном пољу.



Микроталаси се у ваздуху крећу брзином светлости, док се у другим срединама њихова брзина мења. Енергија коју микроталас поседује може у биолошком ткиву да покрене слободне наелектрисане честице (електроне и јоне) и поларизоване молекуле, али не може да изазове јонизацију.

У састав биљног ткива улазе различити поларизовани молекули-диполи као што је вода. Када микроталаси пролазе кроз биљни материјал молекули воде и други поларни молекули се оријентишу сходно промени поларитета електромагнетног поља. Поларитет се мења 915 или 2450 милиона пута у секунди, за две стандардне фреквенције. Молекули практично осцилују и долази до њиховог трећа што доводи до врло брзог загревања. Пошто микроталаси загревају материјал чије компоненте имају различите коефицијенте губитка енергије, не загревају се све компоненте материје једнако. Међутим, температура има тенденцију изједначавања кондукцијом између компонената, односно конвекцијом у случају течности.

Ефикасност микроталасне екстракције, поред осталог, условљена је и температуром јер она у значајној мери утиче на дубину продирања микроталаса (табела 6). Уопштено, повишење температуре резултира бољим екстракционим учинком. Међутим, приликом екстракције термо-лабилних једињења високе температуре могу узроковати разградњу компонената. Изабрана снага микроталаса током микроталасне екстракције мора бити адекватна како би се избегло прекорачење температуре, што доводи до разградње термоосетљивих супстанци (Font и сар., 1998; Блекић и сар., 2011).

Табела 6. Дубина продирања микроталаса на различитим температурама и фреквенцијама.

Температура (°C)	Дубина продирања (mm)		
	0,4 GHz	0,9 GHz	2,45 GHz
<b>-20</b>	250	130	85
<b>-10</b>	150	76	45
<b>0</b>	90	47	25
<b>10</b>	30	21	18
<b>20</b>	23	20	16
<b>30</b>	20	18	10
<b>40</b>	14	15	11
<b>60</b>	11	12	11

Избор растварача је у микроталасној екстракцији јако важан. Избор зависи од растворљивости жељене компоненте, од интеракције између растварача и матрикса, као и од диелектричних својстава растварача. Обично, изабрани растварач треба да поседује високу диелектричну константу и могућност доброг апсорбовања енергије микроталаса (Bousbia и сар., 2009). Растварачи попут етанола, метанола и воде довољно су поларни да би се могли загрејати микроталасном енергијом (Font, 1998; Brachet и сар., 2002). Уколико се анализи боље растварају у неком неполарном растварачу могуће је у поступку применити и његову смешу са неким поларним растварачем чија се улога своди на апсорпцију микроталасне енергије и загревање смеше. У смешама се морају користити мешљиви растварачи. Уколико су физичко-хемијске карактеристике самог узорка такве да поседује високу диелектричну константу, за екстракцију се може користити и растварач ниже диелектричне константе. У овом случају се узорак интензивно загрева у микроталасном пољу и предаје топлоту околном растварачу (Шварц-Гајић, 2012). Насупрот овим параметрима, величина узорака који се користе у процесу екстракције, као и снага магнетрона (у коме се генеришу микроталаси) имају занемарљив утицај на ефикасност микроталасне екстракције.

За извођење микроталасне екстракције, процес се може вршити у затвореним системима при контролисаном притиску и температури, као и у микроталасним пећницама при атмосферском притиску (Kaufmann и Christen, 2002). Притисак у затвореним системима битно зависи од количине и врсте растварача, односно од његове тачке кључања (Cravotto и сар., 2008). Процеси при повишеном притиску су брзи, ефикаснији и омогућавају екстракцију више узорака у јединици времена.

#### **2.3.4. Технике екстракције под повишеним притиском**

Почевши од последње деценије XX века па све до данас, све су израженији напори да се развију технологије обзирније према животној средини, тако да се највећи део савремених истраживања фокусира на развој и примену „чистих“ технологија. Развој таквих технологија имплицира употребу тзв. „зелених“ растварача, међу којима су посебно значајни вода, јонске течности, суб/суперкритични флуиди. Изолација биоактивних молекула, поред употребе „зелених“ растварача, може бити конципирана тако да се изводи и без присуства растварача. Од великог броја савремених екстракционих техника, посебно

место заузимају технике код којих се екстракција изводи уз помоћ флуида под повишеним притиском.

Флуиди под притиском или по другим дефиницијама флуиди високе дифузивности јесу заправо флуиди који се налазе у стању повише температуре и притиска, односно стања у коме они постају флуиди високе дифузивне моћи. Екстракција флуидима под притиском заправо је заснована на чињеници да се брзина преноса масе може мењати променама вредности притиска и температуре. Повећањем температуре долази до повећања растворљивости анализата, слабљења везе између анализата и матрикса из којег се издваја, а самим тим и до олакшане дифузије анализата. Повећање температуре условљава смањење вискозитета флуида, што омогућава његово боље продирање у поре матрикса. Уједно доводи до смањења површинског напона растварача, те омогућава боље „влажење“ материјала.

Овакви флуиди поседују карактеристичне физичко-хемијске особине у односу на флуиде под амбијенталним условима. Малим променама у густини флуида може се успешно регулисати принос и састав добијеног екстракта, тако да овај начин екстракције пружа неуобичајено широке могућности за селективну екстракцију, фракционисање и пречишћавање природних производа. Због оваквих својих предности, екстракција флуидима под повишеним притиском представља добру алтернативу класичним поступцима екстракције, и посебно је интересантна за прехранбену и фармацеутску индустрију (Скала и сар. 2002).

Техника екстракције флуидима под повишеним притиском се може изводити различитим растварачима и под различитим експерименталним условима, те се тако разликује убрзана течна екстракција, екстракција флуидима у суперкритичном стању, као и екстракција субкритичном водом.

#### **2.3.4.1. Убрзана течна екстракција (ASE – Accelerated Solvent Extraction)**

Убрзана течна екстракција (ASE, енг. Accelerated Solvent Extraction), позната још и као течна екстракција под притиском (PLE, енг. Pressurized Liquid Extraction) је техника намењена екстракцији чврстих узорака која је оперативно слична екстракцији суперкритичним флуидима. Међутим, за разлику од суперкритичних флуида, овај вид екстракције у себе укључује примену конвенционалних растварача под блажим условима.

Убрзана течна екстракција подразумева употребу течних растварача у условима повишене температуре (од 100 до 180°C) и притиска (од 100 до 150 bar), чиме се перформансе самог екстракционог процеса могу побољшати тако да процес буде ефикаснији у поређењу са техникама екстракција које се врше на собној температури и атмосферском притиску. Промене притиска и температуре утичу на солватационе особине растварача, као и на интеракције са матриksom узорка. Овим променама се заправо утиче и на сам узорак и сам растварач. Са порастом температуре расте и растворљивост анализата, а услед брже дифузије долази и до повећања брзине преноса масе. Услед смањења густине растварача долази до бољег контакта између честица узорка и растварача. Јачина интеракција које постоје између анализата и матрикса (Ван дер Валсове, водоничне, дипол-дипол везе) опада са порастом температуре што утиче на кинетику процеса десорпције, односно долази до повећања брзине десорпције. Такође, услед пораста температуре долази до пада површинског напона и вискозитета растварача, услед чега растварач боље пенетрира у поре матрикса (Шварц-Гајић, 2012).



Слика 24. Фактори који утичу на ефикасност процеса високопритисне течне екстракције.

Убрзана течна екстракција може бити веома погодна екстракциона техника за изоловање великог броја компонената, од поларних до неполарних, уз оптимизацију

параметара који утичу на њену ефикасност (врста растварача, односно флуида, време екстракције, температура, притисак, величина честица, као и присуство влаге у биљном материјалу). Да би се процес изводио у жељеном правцу неопходно је оптимизовати све параметре који могу имати утицај на његову ефикасност. Шематски приказ свих параметара који морају бити узети у обзир приликом екстракције флуидима под повишеним притиском дат је на слици 24.

Увођење корастварача, односно косолвента или модификатора, омогућава повећање растворљивости. Са једне стране, корастварач може да мења поларност растварача, а са друге стране, може да делује као модификатор порозног нерастворног дела материјала (основног матрикса) и тиме повећа или смањи доступност жељеног анализата. На пример, присуство влаге у материјалу може имати утицај на екстракцију уља због два различита ефекта које вода има на материјал. Наиме, повећање влаге у материјалу повећава пермеабилност ћелијског зида, што поспешује екстракцију уља, док се са друге стране повећава и еластичност чврсте фазе, што пак смањује приносе при већем садржају влаге (Дамјановић и сар., 2003).

Косолвенти делују специфичним хемијским интеракцијама (водоничне везе, кисело-базне интеракције) или физичким интеракцијама (дипол-дипол, индуковани дипол) са анализом или са растварачем. Поред тога, косолвент повећава селективност према жељеном анализу. Употребом косолвената остварен је значајни напредак у практичној примени високопритисне екстракције. Међутим, треба имати у виду да се при додатку чак и мале количине косолвента драстично мењају особине екстрагенса (Совиљ, 2004). Негативни ефекат примене корастварача представља добијање производа који је онечишћен растварачем.

Различите методе и уређаји који оперишу флуидима под притиском су у потпуности развијени и комерцијализовани.

Имајући у виду да је коришћење органских растварача законски регулисано, а у неким случајевима ограничено или забрањено, безбедни флуиди под повишеним притиском могу бити њихова одлична алтернатива. Овоме треба додати још и чињеницу да се све чешће примењују јефтине, незапаљиви, нетоксични и нешкодљиви растварачи, што им даје још већу предност у односу на конвенционалне органске раствараче.

### 2.3.4.2. Екстракција флуидима у суперкритичном стању

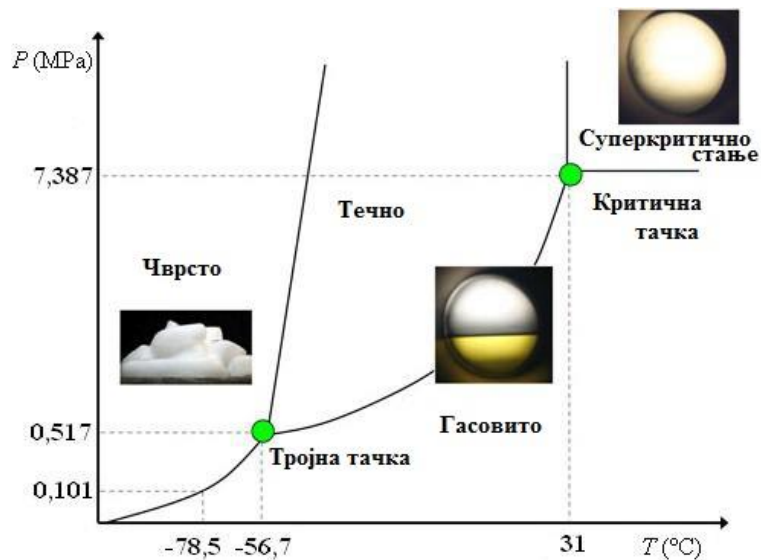
Екстракција флуидима у суперкритичном стању, суперкритична екстракција или по наводима неких аутора надкритична екстракција, је операција преноса масе заснована на чињеници да поједини гасови постају изузетно моћни растварачи (екстрагенси) када се нађу у близини своје критичне тачке, односно у својој надкритичној области (Николовски, 2009). Физичко-хемијске карактеристике флуида у суперкритичном стању се налазе између особина гасова и течности што их чини јако атрактивним у пољу екстракције. Они се понашају као изузетно покретне течности, комбинујући добре солватационе особине течности и брзи трансфер масе који се одиграва у гасовима. Вредност вискозитета оваквих флуида су један ред величине ниже од вредности вискозитета течних растварача, а вредности коефицијената дифузије су један ред величине виши од оних за течне раствараче (табела 7). Низак вискозитет и површински напон близак гасовима дозвољава суперкритичним флуидима бољу пенетрацију у поре чврстог узорка. Као последица брзина екстракције бива знатно повећана у поређењу са конвенционалним поступцима, омогућавајући да процес буде завршен у веома кратком периоду (Jung и Perrut, 2001).

Табела 7. Приближне вредности густине, вискозитета и коефицијента дифузије гасова, суперкритичних флуида и течности.

Флуид	Густина (g/cm <sup>3</sup> )	Вискозитет (g/cm s)	Коефицијент дифузије (cm <sup>2</sup> /s)
Гас	(0,6 -2)10 <sup>-3</sup>	(1-3) 10 <sup>-5</sup>	0,1-1,0
Суперкритични флуид	0,2-0,9	(1-3) 10 <sup>-4</sup>	(0,1-5) 10 <sup>-4</sup>
Течност	0,6-1,6	(0,2-3) 10 <sup>-3</sup>	(0,2-3) 10 <sup>-5</sup>

Ако се гас загрева и компримује до суперкритичног стања у критичној тачки долази до оштрог пораста његове густине. Густина суперкритичног флуида битно се мења са променом притиска и температуре чинећи ове параметре веома значајним код финог подешавања селективности. Имајући у виду да јако мале промене у густини флуида могу значајно променити селективност суперкритичног флуида, екстракција овим флуидима се карактерише изузетном селективношћу (Шварц-Гајић, 2012).

Угљеник (IV)-оксид данас представља најчешће коришћени суперкритични флуид. Разлог овоме лежи у чињеници да је овај гас нетоксичан, незапаљив, физиолошки инактиван, хемијски инертан, тако да нема опасности од токсичних примеса које заостају у екстракту. Поред овога, поменути растварач испољава добре солватационе особине према неполарним и умерено поларним једињењима, те у потпуности замењује токсичне органске раставараче и доступан је по повољној цени. Са друге стране, ниска вредност критичне температуре ( $31,1^{\circ}\text{C}$ ) омогућава екстракцију на релативно ниским температурама, што је од великог значаја за екстракцију термички нестабилних супстанци (Ozer и сар., 1996; Lang и Wai, 2001). Слика 25 представља рТ дијаграм угљеник(IV)-оксида.



Слика 25. Фазни дијаграм угљеник(IV)-оксида.

У зависности од стања у коме се налази угљеник(IV)-оксид, разликују се поступци екстракције течним (субкритичним) угљеник(IV)-оксидом, када је температура испод  $31,1^{\circ}\text{C}$ , а притисак нешто изнад или испод 73,8 bar, и поступак екстракције у надкритичном (суперкритичном) стању када су притисак и температура изнад критичних вредности.

Зависност параметара растворљивости неког флуида од притиска је слична зависности његове густине од притиска, односно, моћ растварања флуида у наткритичном стању може се повезати са његовом густином у критичном региону. Уопштено, густина угљеник(IV)-оксида опада са порастом температуре, а самим тим и његова растворна моћ.

Са друге стране, напон паре растворака расте са порастом температуре, што утиче на повећање растворљивости. У зависности од релативне јачине ова два супротна ефекта, растворљивост ће или расти или опадати са порастом температуре на константном притиску. Највеће промене у густини, а тиме и највеће промене у растворљивости, добијају се у области критичне тачке. Управо због тога је област око критичне тачке интересантна за развој процеса јер долази до великих промена у густини растварача које су резултат малих изотермских промена притисака или изобарских промена температуре. Избором погодне комбинације притиска и температуре могу се подешавати жељени ефекти растварања, односно може се постићи одређена селективност угљен-диоксида.

Течни угљеник(IV)-оксид има добру способност растварања једињења мале молекулске масе која садрже кисеоник (кетони, естри, алкохоли, етри и алдехиди), неполярна једињења мале молекулске масе (алкани, алкени, терпени и други угљоводоници) и поларна једињења мале молекулске масе (карбонске киселине, сирћетна киселина и др.). Једињења растворљива у течном угљеник(IV)-оксиду су растворљива и у надкритичном угљеник(IV)-оксиду. Међу компонентама садржаним у ароматичним биљкама, релативно лако испарљива етарска уља су према досадашњим истраживањима најрастворљивије компоненте у надкритичном угљеник(IV)-оксиду. Међутим, и компоненте веће молекулске масе, укључујући епикутикуларне воскове, обично се коекстрахују са етарским уљем. Са друге стране угљеник(IV)-оксид има релативно малу моћ растварања поларних једињења и једињења са дугим ланцима, мада се она може прилично повећати додатком косолвената (Pourmortazavi и Najmirsadeghi, 2007; Smith, 1996). Повећана растворљивост проистиче из физичких и хемијских интеракција косолвент-растворак и, у мањој мери, из повећане густине растварача. Специфичне физичке и хемијске интеракције у великој мери зависе од поларности косолвената. За екстракцију и фракционисање природних једињења мање молекулске масе од већег значаја је коришћење поларних косолвената који имају јак ефекат на поларизацију угљеник(IV)-оксида. Тако да додатком мале фракције органског растварача са перманентним диполним моментом, екстракциони систем може бити подешен тако да буде селективан према поларним компонентама. Неполарни косолвенти се најчешће користе за повећање густине екстрагена ради екстраховања угљоводоника велике молекулске масе. Модификатори морају бити мешљиви са суперкритичним угљен-диоксидом и обично се додају у уделу 1-10% у односу на суперкритични флуид,



обезбеђујући фино подешавање поларности. Модификатори који се додају суперкритичном флуиду треба да су тачке кључања негде између анализата и флуида. Чак и најнижа концентрација додатог модификатора мења критичне параметре што се мора узети у обзир при подешавању процесних услова (Шварц-Гајић, 2012). Избор модификатора и његова концентрација зависе пре свега од анализата. Модификатори који се обично додају угљен-диоксиду укључују:

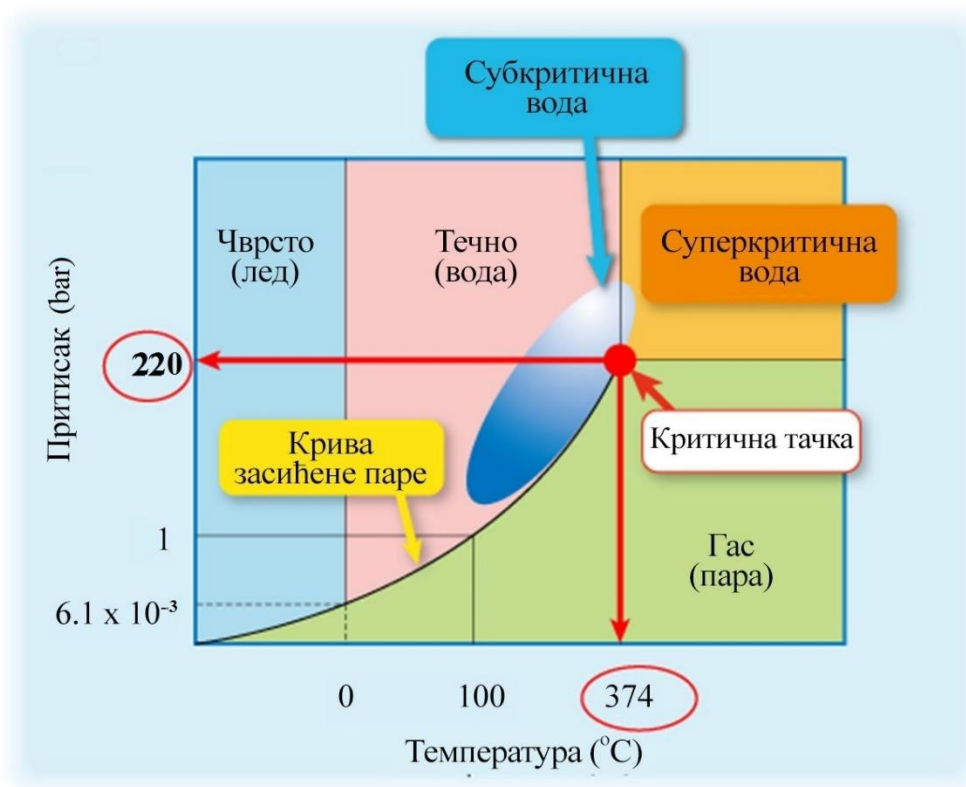
- Раствараче са кисеоником: метанол, етанол, изопропанол, ацетон, тетраhydroфуран;
- Раствараче са азотом: ацетонитрил;
- Раствараче са сумпором: угљен-дисулфид, сумпор-диоксид, сумпор-хексафлуорид;
- Органске киселине: мравља киселина.

Недостатак угљеник(IV)-оксида је и релативно висок критични притисак ( $p_c = 73,8$  bar) када се пореди са другим гасовима, што захтева коришћење опреме за високе притиске, а то условљава повећање инвестиционих трошкова (Purohit и сар., 1994).

#### **2.3.4.3. Екстракција водом у субкритичном стању**

Вода је флуид изузетно интересантних солватационих и физичко-хемијских карактеристика који до сада није наишао на значајнију примену у свом суперкритичном стању. Високи критични параметри воде (220,9 bar и 374°C) се тешко постижу и одржавају током одвијања процеса, што заправо предствала главни проблем при манипулацији водом и један је од разлога њене ретке употребе у суперкритичном стању. Такође, ограничена употреба суперкритичне воде је последица и недовољног броја описаних апликација за њену примену, као и недовољане количине литературних података о њеним физичко-хемијским карактеристикама у суперкритичном стању. Када се вода нађе у својој наткритичној (суперкритичној) области њена реактивност се драстично мења. Тако, она постаје растварач способан да разгради многе токсичне супстанце попут диоксина, затим да изазове распад експлозива, дехалогенизацију полихлорованих бифенила, или да изазове корозију чак и нерђајућег челика (Шварц-Гајић, 2012). Због овакве своје изражене реактивности вода се најчешће примењује у субкритичној области притиска и температуре, при чему она тада постаје прегрејани флуид изузетно интересантних физичко-хемијских карактеристика и солватационих особина.

Прегрејана или субкритична вода је заправо вода загрејана до температуре изнад своје температуре кључања ( $100^{\circ}\text{C}$ ), а испод критичне температуре ( $374^{\circ}\text{C}$ ), и под притиском чија је вредност довољно висока да је задржи у течном стању (слика 26). Услед оваквих промена експерименталних услова својства воде као растварача се мењају у широком опсегу. Заправо, њене особине се мењају од граничних услова када она раствара поларне супстанце на амбијенталним условима температуре и притиска до могућности растварања парафина, ароматичних и других неполарних једињења у стању блиском критичном. Посебну пажњу привлачи чињеница да субкритична вода у значајној мери раствара једињења која су умерено растворна или чак и врло слабо растворна у води собне температуре, док се у исто време растворљивост једињења која су добро растворна у води на собној температури (поларна и умерено поларна једињења) не мења битније довођењем воде у субкритично стање. Уједно, због своје ниске цене, потпуне нетоксичности и високе реактивности могућност употребе воде под одређеним експерименталним условима изазива велико интересовање.



Слика 26. Фазни дијаграм воде.

Манипулација субкритичном водом мора се изводити под строго контролисаним условима, те се процесни параметри морају пажљиво бирати како би се избегла деградација жељених анализата. Први параметар о коме се мора посебно водити рачуна јесте температура. Она има кључну улогу када је у питању процес екстракције субкритичном водом, јер са порастом температуре поларност воде драстично опада. Повишена температура повећава ефикасност процеса екстракције нарушавајући интеракције између анализата и матрикса узорка које су условљене Ван дер Валсовим, водоничним везама и интеракцијама дипола (Richter и сар. 1997). Коришћење термалне енергије помаже превазилажењу кохезивних (молекул-молекул) и адхезивних (аналит-матрикс) интеракција смањивањем активационе енергије потребне за одвијање процеса десорпције. Повишена температура смањује површински напон растварача, растворка и матрикса, што омогућава лакше формирање солватационих шупљина, а тиме и брже растварање анализата у растварачу (Möckel и сар., 1987). Такође, у условима повишене температуре долази до смањења вискозитета растварача, чиме се олакшава пенетрација растварача унутар матрикса (Perry и сар., 1984). Још једна предност рада у областима повишених температура јесте и повећање степена дифузивности, тј. повећање преноса масе чиме се поспешује процес екстракције. При загревању воде долази до значајног пада њене густине, тако на пример у критичној тачки густина воде је чак троструко нижа од оне на собној температури и износи 0,32 g/ml (Шварц-Гајић, 2012), што доприноси порасту ефикасности екстракције.

Још један параметар који је у корелацији са температуром јесте константа дисоцијације воде. Са порастом температуре вредност ове константе драстично расте, тако да се на 250°C концентрација хидроксилних и хидронијум јона повећава 25 пута, чиме се поспешују реакције хидролизе (Marshall и Franck, 1981).

Са друге стране, растворљивост интерферирајућих компонената може бити већа на повишеној температури, тј. селективност процеса ће у том случају бити умањена. Такође, постоји опасност од деградације термолабилних компонената (Fernandez-Gonzalez и сар., 2008; Mogeno и сар., 2007). Све ово указује на то да се вредност температуре мора пажљиво избалансирати. Приликом изоловања једињења из биљног материјала субкритичном водом, услед процеса хидролизе, може доћи до разлагања молекула. Ово може бити пожељно када се ради о природним гликозидима или супстанцама везаним за друге компоненте матрикса, а када је циљ управо издвајање агликона (Шварц-Гајић, 2012). Процес је тада потребно

водити под строго контролисаним условима како би се процес хидролизе водио до жељене мере уз избегавање деградације анализата. Температура до које се вода загрева зависи искључиво од анализата који се екстрахују, а са променом примењеног притиска долази до промене њене поларности. При загревању воде долази до значајног смањења њене поларности при чему настаје растварач који ће бити селективан према умерено-поларним једињењима. Један од најзначајнијих параметара који описују поларност воде јесте диелектрична константа, чија се вредност једноставним загревањем од собне температуре (25°C) до 250°C мења од 80 до 27 (Galkin и Lunin, 2005; Herrero и сар., 2006). Имајући у виду овако велику промену поларности, вода представља значајно флексибилнији растварач, што се може и видети из чињенице да се код суперкритичног угљен-диоксида поларност мења за свега 1-2 јединице. Вредности диелектричних константи различитих растварача дате су у табели 8.

Табела 8. Вредности диелектричних константи за различите раствараче.

Растварач	Температура	Диелектрична константа
Ацетон	25,0 °C	20,7
Етил-алкохол	25,0 °C	24,3
Метил-алкохол	20,0 °C	33,1
Пропил-алкохол	20,0 °C	21,8
Хлороформ	20,0 °C	4,8
Хексан	-90,0 °C	2,0
Етар	20,0 °C	4,3
Етиленамин	21,1 °C	6,3
Етилен-гликол	20,0 °C	37,0
Вода	25,0 °C	80,4

Загревајући воду до 250°C растворљивост умерено поларних једињења се повећава 4-5 редова величине (Шварц-Гајић, 2012). Тако се вода загрејана на 300°C понаша као умерено поларан растварач, као што су метанол или ацетонитрил, и може се применити за екстракцију анализата попут пестицида, полицикличних ароматичних угљоводоника, полихлорованих бифенила и др. (Miler и Hawthorne, 1998; Curren и King, 2001). Уколико се вода даље загрева до 350°C може се повећати растворљивост неполарног бензо(е) пирена и до 25 милиона пута управо због драстичног пада вредности њене диелектричне константе, која на тој температури има вредност свега 13 (Hawthorne и Kubatova, 2002).

Утицај притиска током извођења процеса екстракције субкритичном водом огледа се у бољој пенетрацији растварача у поре матрикса чиме се интензивира пренос масе. Контакт растварача и његово продирање у капиларе матрикса може бити отежан, односно веома спор услед присуства ваздуха унутар пора матрикса. У условима повећаног притиска овај проблем може бити превазиђен (Richter и сар. 1997; Rostagno и сар., 2009). Ипак, утицај промене притиска на ефикасност екстракције је занемарљив у већини случајева екстракције биљног материјала (Choi и сар., 2003; Deng и сар., 2004; Deng и сар., 2005). Самим тим, за разлику од најексплоатисанијег надкритичног флуида, угљен-диоксида, код којег притисак представља један од најважнијих параметара, у случају субкритичне воде притисак има улогу само да одржи воду у течном стању.

Још једну могућност за повећање ефикасности екстракције супстанци које се иначе слабо растварају у води, представља, као и у случају убрзане течне и суперкритичне екстракције, увођење корастварача, односно косолвента или модификатора. Додатак ових растварача и могућност њиховог заостатка у производу се коси са принципима „зелених“ техника, нарочито ако се има у виду да се у случају екстракције субкритичном водом косолвенти додају у концентрацији ~20% (Hawthorne и Kubatova, 2002).

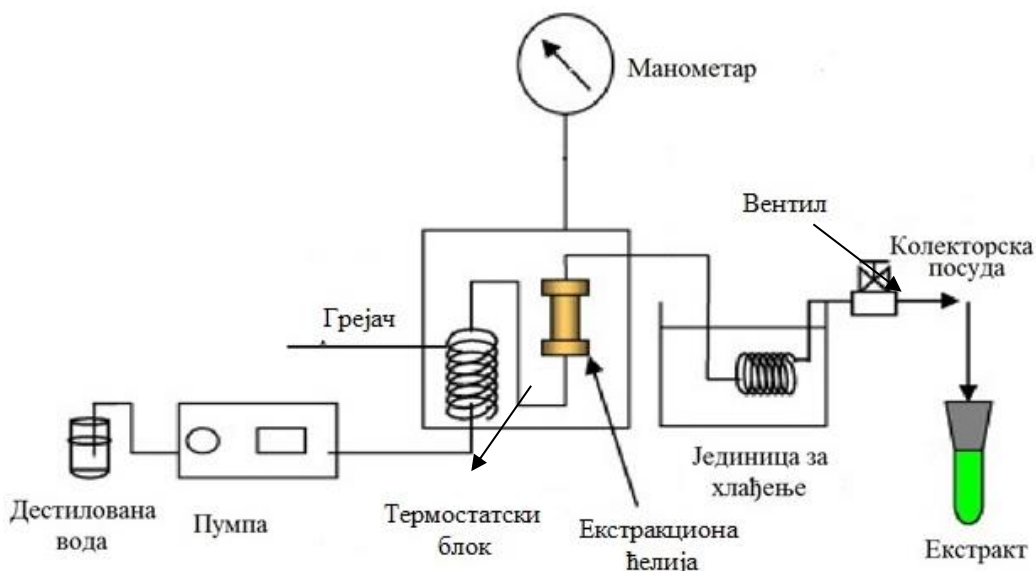
#### **2.3.4.4. Апаратура за извођење екстракције субкритичном водом**

Субкритична екстракција представља одрживу и „зелену“ технологију која нуди бројне предности које се првенствено односе на заштиту животне средине, токсичност и цену растварача. Ипак, индустријска постројења су у свету, а поготово у Европи, веома ретка, пре свега због специфичности воде у свом субкритичном стању и због сложености уређаја. Екстрактори субкритичном водом оперишу на знатно вишим притисцима и температурама у односу на, већ уобичајене, суперкритичне екстракторе угљен-диоксидом, те су стога технички захтеви оваквих екстрактора изузетно строги.

Последњих година све су израженији напори у конструисању уређаја који оперишу са водом у субкритичном стању. Генерално, овакви уређаји могу бити конструисани за рад у проточним и статичним условима. На слици 27 дат је шематски приказ уређаја који се заснива на проточном режиму рада.

Процес екстракције субкритичном водом започиње довођењем воде на жељене услове притиска и температуре. Постизање жељеног притиска постиже се помоћу пумпе,

док се вредност температуре подешава проласком воде кроз грејач. Након довођења воде у субкритично стање под жељеним условима, она се уводи у екстрактор и пушта да под притиском континуално протиче кроз слој биљног материјала, растварајући притом жељене компоненте. Након проласка кроз слој врши се декомпресија и хлађење, а добијени екстракт се сакупља у колекторске посуде.



Слика 27. Шематски приказ екстракције субкритичном водом.

#### 2.3.4.5. Употреба субкритичне воде за екстракцију полифенолних једињења биљака

Иако вода као екстрагенс није експлоатисана у довољној мери, последњих година све је већи број описаних апликација. Посебно је атрактивна њена примена у процесу екстракција биолошки активних једињења. Сам процес екстракције природних биомолекула може бити изузетно компликован због велике сличности компонената и сложености састава узорака. Поступак додатно компликује осетљивост компоненти на утицај светлости, температуре, рН-вредности, различита оксидациона једињења и др. Стога висок хидролитички потенцијал воде мора бити пажљиво избалансиран како би се у крајњем производу нашле жељене компоненте изоловане из биљних матрикса уз минимално присуство других интерферирајућих компонената, и како би се циљне компоненте заштитиле од деградације.

Недавна истраживања су показала да се различите фенолне компоненте могу издвојити из биљног материјала применом субкритичне воде као екстракционог средства. Ефикасност екстракције условљена је, пре свега, примењеним екстракционим параметрима, али и структуром самих молекула који се изолују из биљног матрикса. Тако, на пример, ефикасност процеса екстракције флавоноида зависиће од присуства двоструких веза и глукозе, као и од структуре и састава бочног низа у самом молекулу флавоноида (Ко и сар., 2014). Испитивања растворљивости флавоноида у субкритичној води показују да на њихову растворљивост додатно утиче и способност формирања водоничних веза са околним молекулима растварача. Досадашња истраживања демонстрирају да је за достизање задовољавајуће ефикасности екстракције биолошки активних компоненти применом субкритичне воде неопходно извести оптимизацију оперативних параметара (притиска, температуре, модификатора, односа биљног материјала и растварача и сл.) за сваки аналит биљног материјала посебно. На тај начин би се принос жељених компонента у крајњем екстракту могао значајно повећати уз смањење садржаја интерферирајућих компоненти.

Када су у питању флавоноиди као главна група биљних фенола, њихова растворљивост зависи и од молекулске масе. Флавоноиди који у својој структури садрже Н-атом или глукозне јединице могу градити водоничне везе са околним молекулима воде. Тако да се спираеозид, изокверцетин и кверцетин екстрахују на релативно нижим температурама (испод 150°C) зато што њихове високе диелектричне константе омогућавају стварање водоничних веза, за разлику од агликона. У досадашњим експерименталним истраживањима показало се да се агликони боље екстрахују на вишим температурама у односу на гликозиде, што указује на већу стабилност агликонских форми на вишим температурама (Luthria, 2008).

На успешност екстракције појединих флавоноида, као и на принос екстракције, додатно утиче присуство и број двоструких веза у молекулу (Barbero и сар., 2006). Растворљивост хидрофобних органских једињења у субкритичној води варира са степеном конјугације ароматичног прстена (Сагг и сар., 2011). Иако апигенин и нарингенин имају сличну молекулску масу, апигенин, који у својој структури садржи двоструке везе, екстрахује се на вишим температурама у субкритичној води у односу на нарингенин.

Вода на собној температури, као поларни растварач, није у стању да раствара неполарне молекуле флавоноидних компонента. Међутим, у условима повишене

температуре долази до слабљења водоничних веза што узрокује смањење вредности диелектричне константе и убрзавање екстракције флавоноидних (хидрофобних) једињења.

Субкритична вода је до сада била успешно коришћена за изолацију различитих група флавоноидних једињења попут флаванола, флавона, флаванона, при чему се њена употреба, на основу приноса жељених компоненти, показала као потпуно оправдана и исплатива (Шварц-Гајић и Цветановић, 2015; Цветановић и сар., 2015а; Ко и сар., 2014). Флаваноли (језгро ове групе једињења је структура 3-хидрокси-2-фенил хромен-4-он) у свом бочном низу могу садржати хидроксилну групу (кверцетин), метокси групу (изораметин) или водоник (кемферол), што узрокује и разлике у њиховој растворљивости. Тако на пример, кверцетин има релативно поларнији бочни низ, па се ефикасније екстрахује на нижим температурама (170°C, 10 мин) него молекули са метокси групом у бочном низу (190°C, 15 мин) или молекули са водоником (190°C, 15 мин). Разлике у растворљивости флаванола уједно су и последица различитих положаја у којима се може наћи ОН-група унутар молекула. Њихови гликозиди углавном садрже моносахаридну шећерну компоненту. Присуство шећера (глукозе или рамнозе) чини флавоноле растворљивијим у поларним растварачима, тако да се они боље растварају на нижим температурама него одговарајући, мање поларни, агликони. Тако, нпр., екстракција кверцетина на 190°C у временском периоду од 15 минута даје већи принос овог једињења него његовог гликозида за исто време на истој температури. Кверцетин везан за рамнозу садржи у молекулској структури деокси шећер, па је његова структура нестабилна и лако се деградира, тако да би он требао да се екстрахује субкритичном водом на знатно нижим температурама.

Флаволи, са основном структуром језгра 2-фенилхромен-4-он (2-фенил-1-бензопиран-4-он) су у досадашњим истраживањима такође успешно екстраховани уз помоћ субкритичне воде. Као и код претходне групе флавоноидних једињења гликозидни флаволи имају тенденцију да се екстрахују боље на нижим температурама него одговарајући агликони због температурно зависне диелектричне константе воде. Досадашња истраживања показују да је њихова растворљивост условљена бројем и положајем ОН-група у бочном низу. Тако се, нпр., апигенин екстрахује у већем приносу на вишој температури у односу на лутеолин.

Флаванони су група флавоноида који се најчешће екстрахују из цитрусног воћа попут лимуна, наранце и грејпфрута. Могу бити у облику агликона или гликозида (најчешће



дисахаридни шећер улази у њихов састав), и могу садржати различите хемијске групе у свом бочном низу. Хесперидин, који има метокси групу, мање је поларан од нарингенина те се екстрахује на вишој температури. Присуство дисахарида чини ова једињења растворљивијим у поларнијим растварачима. Табела 9 приказује флавоноиде који су успешно изоловани помоћу субкритичне воде, као и њихове карактеристике које утичу на избор параметара процеса њихове изолације.

Табела 9. Карактеристике појединих флавоноида које условљавају њихову растворљивост у субкритичној води.

Група	Тип флавоноида	Једињење	Карактеристике		
			Бочни низ	Молекулска маса (g/mol)	Тачка топљења (°C)
Флавоноли	Агликон	Кверцетин	ОН	302,24	316
		Изораменетин	О-СН <sub>3</sub>	316,27	307
		Кемферол	Н	286,24	278
	Гликозид	Кверцетин-4'-О-глукозид	Глукоза	464,38	240
		Изокверцетин (кверцетин-3-О-глукозид)	Глукоза	464,37	225
		Кверцетин-3- L-раминозид	Рамноза	448,38	179
Флаволи	Агликон	Апигенин	-	270,24	345
		Лутеолин	ОН	286,24	330
Флаванони	Агликон	Хесперитин	О-СН <sub>3</sub>	307,27	228
		Нарингенин	-	272,25	307
	Гликозид	Хесперитин-7-О-рутинозид	Рамноза	610,57	225
		Нарирутин-7-О-рутинозид	Рамноза	580,54	164
		Нарингин-7-О-рамно глукозид	Рамноза и глукоза	580,54	166

### *3. Експериментални део*

Експериментални део ове докторске дисертације реализован је у лабораторијама Катедре за биотехнологију и фармацеутско инжењерство и Катедре за примењене и инжењерске хемије Технолошког факултета у Новом Саду. Део истраживања урађен је у лабораторијама Агрономског факултета у Чачку, Технолошког факултета у Лесковцу, Хемијског факултета у Београду, Медицинског факултета у Новом Саду, Медицинског факултету у Осијеку, Република Хрватска, Природно-математичког факултета Универзитета у Селџуку, Конија, Турска. Ток експеримената шематски је приказан на слици 28.



Слика 28. Шематски приказ тока експеримената.

### 3.1. ХЕМИКАЛИЈЕ И РЕАГЕНСИ

Линолна киселина (99%),  $\beta$ -каротен (95%), Tween 40, 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH) радикал, трихлорсирћетна киселина (ТСА), Folin-Ciocalteu реагенс, бутиловани хидрокситолуен (ВНТ), аскорбинска киселина, етилендиаминтетраацетат дихидрат (EDTA), гвожђе(II)-сулфат хептахидрат, гвожђе(III)-хлорид, гална киселина, рутин, метил метан сулфонат и 3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум-бромид (МТТ), 5,5-диметил-пиролин-*N*-оксид (DMPO), акарбоза, којична киселина, L-DOPA (L-3,4-дихидроксифенилаланин),  $\alpha$ -амилаза (EC 3.2.1.1),  $\alpha$ -глукозидаза (EC 3.2.1.20), L-глутатион, ферозин и тирозиназа су производи компаније Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Немачка). Диметилформаид (DMF), диметилсулфонилоксид (DMSO) и етанол HPLC чистоће произведени су у J. T. Baker (Deventer, Холандија), док су метанол HPLC чистоће, мравља киселина, натријум карбонат, нитрофенил- $\alpha$ -D-глукопиранозид (PNPG), натријум-хлорид, хлороводонична киселина, као и кверцетин произведени у компанији Merck (Darmstadt, Немачка). Mueller Hinton агар (МНВ) и Sabouraud декстрозни агар су набављени из Института „Торлак” (Београд, Србија). Ултрачиста вода је добијена коришћењем система Millipore, Elix UV и Simplicity Water Purification System-a (Molsheim, Француска). Сви остали реагенси и хемикалије употребљени у експерименталном раду дисертације су били аналитичког степена чистоће.

### 3.2. БИЉНИ МАТЕРИЈАЛ

Биљни материјал коришћен током експерименталног рада - беле (језичасте) латице камилице достављене су од стране Института за ратарство, повртарство и лековито биље у Бачком Петровцу. Сакупљање биљног материјала вршено је током маја месеца 2012. године. Цвасти камилице су сушене у соларној сушари на температури од 40°C, при чему је дебљина слоја цвасти приликом сушења износила 5 cm. Сушење биљног материјала је извођено до садржаја воде око 12%. Процесом просејавања кроз сита извршена је сепарација белих (језичастих) и жутих (тубуларних) цветова камилице.

### 3.2.1. Основна испитивања биљног материјала

Основним хемијским испитивањима биљне дроге добијају се подаци о параметрима који дефинишу њен општи квалитет. Дефинисан је квалитет коришћеног биљног материјала у погледу следећих параметара:

- *Садржај влаге*

Сушење биљног материјала представља најбољи начин његовог чувања, јер се спречава развој микроорганизама и заустављају ензимски процеси. Садржај влаге у белим језичастим латицама камилице одређен је гравиметријским поступком према Југословенској фармакопеји (*Ph. Jug. IV*, 1984).

- *Садржај пепела*

Количина неиспарљивих минералних материја, која се добија после потпуног сагоревања дроге, представља остатак после жарења (пепео). Садржај пепела у белим језичастим латицама камилице одређен је гравиметријским поступком који прописује *Ph. Jug. IV* (1984).

- *Садржај у киселини нерастворљивог пепела ( $\text{SiO}_2$ )*

У киселини нерастворљиви пепео ( $\text{SiO}_2$ ) представља део пепела који се не раствара у разблаженој  $\text{HCl}$ . Садржај  $\text{SiO}_2$  у језичастим цветовим камилице одређен је гравиметријским поступком према *Ph. Jug. IV* (1984), непосредно после одређивања садржаја пепела.

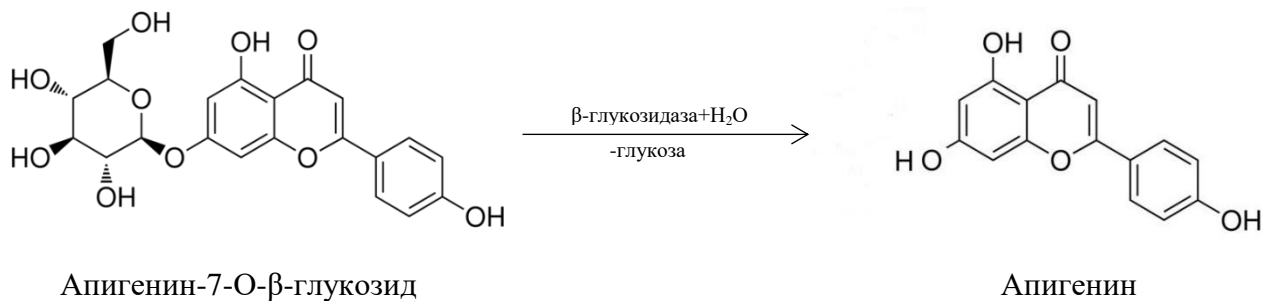
- *Садржај етарског уља*

Садржај етарског уља у језичастим цветовима камилице одређен је поступком хидродестилације према *Ph. Jug. IV* (1984).

### 3.2.2. Ферментација биљног материјала

Ферментација биљног материјала извођена је са циљем повећања садржаја апигенина у биљном материјалу. Процесом ферментације долази до хидролизе глукозида

апигенина до агликона дејством киселина и/или ензима (Зековић, 1993; Maier и сар., 1991; Пекић и Зековић, 1994; Пекић и сар., 1994). У основи ова биохемијска трансформација подразумева активирање  $\beta$ -глюкозидазе присутне у самом цвету камилице. Каталитичка активност овог ензима заснива се на специфичној хидролизи гликозидне везе молекула апигенин-7-О- $\beta$ -глюкозида (слика 29).



Слика 29. Хидролиза апигенин-7-О- $\beta$ -глюкозида применом  $\beta$ -глюкозидазе.

Језичасти цветови камилице навлажени су 0,1 М натријум-ацетатним пуфером рН-вредности 5,5 (у односу 1:5) и ферментисани на температури од 37°C у току 72 h, након чега су сушени на ваздуху (4 дана). Осушени ферментисани језичасти цветови коришћени су у даљем раду ради добијања екстраката са повећаним садржајем апигенина.

### 3.3. ЕКСТРАКЦИЈА

#### 3.3.1. Оптимизација екстракције ферментисаних језичастих цветова применом методе одзивне површине

Ферментисани језичасти цветови камилице екстраховани су етанолом као екстрагенсом. Екстракција је извођена применом ултразвучне екстракције, при чему је однос биљног материјала и растварача износио 1:50. У циљу одређивања оптималних параметара екстракције и испитивања њиховог утицаја на принос укупних фенола, флавоноида и апигенина у екстрактима ферментисаних цветова камилице, коришћена је метода одзивне површине (RSM, енг. Response Surface Methodology). Применом ове методе дефинисане су вредности концентрације етанола, температуре и времена који дају

екстракте ферментисаних језичастих цветова камилице са максималним приносом апигенина.

Током оптимизације процеса температура, концентрација етанола и време екстракције су изабрани као независно променљиве величине, а њихове вредности дефинисане су на основу прелиминарних експерименталних резултата као и литературних података (Зековић, 1993). Вредности независно променљивих испитиване су на 3 нивоа (-1, 0, +1), а њихове вредности дате су у табели 10.

Табела 10. Кодирани и некодирани вредности нивоа независно променљивих.

Независно променљиве	Симбол	Нивои		
		(-1)	(0)	(+1)
Температура (°C)	$X_1$	40	60	80
Концентрација етанола (%)	$X_2$	50	70	90
Време (мин)	$X_3$	20	40	60

Статистичка обрада експерименталних података и цртање површина одзива урађена је применом софтверског пакета Design-Expert v.7 Trial (Stat-Ease, Minneapolis, Minnesota, САД).

Експериментални подаци фитовани су моделом одзивне површине полиномом другог реда према изразу:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

где је:

$y$  – одзивна функција - одсечак,

$\beta_j, \beta_{jj}, \beta_{ij}$  – константе, тј. регресиони коефицијенти једначине модела, линеарни, квадратни и коефицијент интеракције међу факторима,

$X_i$  и  $X_j$  – кодирани независне променљиве (температура, концентрација етанола, време).

Регресиони коефицијенти за процену модела дефинисаног полиномом другог реда израчунати су методом најмањих квадрата. Степен значајности сваког од фактора одређен је на основу њихове  $p$ -вредности. Тест статистичког значаја заснован је на критеријуму

укупне грешке са нивоом вероватноће од 95%. У случају када је  $p$ -вредност мања од 0,05, фактор показује значајан утицај на процес (за ниво вероватноће 95%).

Коришћени Вох-Behnken дизајн састојао се од 17 експерименталних корака са 5 понављања у централној тачки. У табели 11 приказан је дизајн по коме су урађени експерименти у циљу оптимизације екстракције етанолом.

Табела 11. Експериментални дизајн оптимизације екстракције етанолом.

Редни број експеримента	Температура (°C)	Концентрација етанола (%)	Време (мин)
1	40 (-1)	50 (-1)	40 (0)
2	60 (0)	50 (-1)	20 (-1)
3	80 (1)	50 (-1)	40 (0)
4	60 (0)	50 (-1)	60 (1)
5	40 (-1)	70 (0)	20 (-1)
6	80 (1)	70 (0)	20 (-1)
7	60 (0)	90 (1)	20 (-1)
8	80 (1)	90 (1)	40 (0)
9	60 (0)	90 (1)	60 (1)
10	80 (1)	70 (0)	60 (1)
11	60 (0)	70 (0)	40 (0)
12	60 (0)	70 (0)	40 (0)
13	60 (0)	70 (0)	40 (0)
14	60 (0)	70 (0)	40 (0)
15	60 (0)	70 (0)	40 (0)
16	40 (-1)	90 (1)	40 (0)
17	40 (-1)	70 (0)	60 (1)

Након добијања оптималних параметара екстракције етанолом, ферментисани језичасти цветови камилице су екстраховани под оптималним условима ради валидације добијених параметара. С тим циљем добијена су два екстракциона система. Систем I је имао за циљ добијање екстраката са максималним приносом сва три излазна параметара (укупни феноли, флавоноиди, апигенин), и систем II у коме су улазни параметри оптимизовани ради добијања екстраката са максималним садржајем апигенина.



### 3.3.2. Екстракција нативних језичастих цветова камилице

За потребе екстракције нативних (неферментисаних) језичастих цветова камилице примењено је више екстракционих техника (Soxhlet, ултразвучна, микроталасна и екстракција водом у субкритичном стању). Екстракције су најпре извођене етанолом, а потом, с циљем сагледавања утицаја саме екстракционе технике, у свим екстракционим системима коришћена је вода као екстракционо средство. Такође, однос биљне сировине и растварача, као и време екстракције били су исти при свим екстракционим техникама.

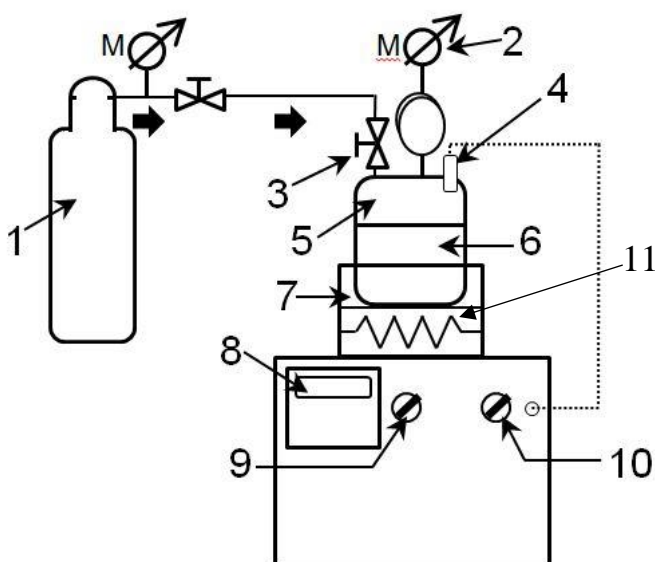
**3.3.2.1 Soxhlet екстракција** (СЕ) је извођена у конвенционалном лабораторијском уређају по Soxhlet-у. Узорак биљног материјала (5 g) постављен је у чауру за екстракцију, а затим је додато 250 ml растварача. Добијени екстракти су упарени до сува на ротационом вакуум упаривачу и осушени у лабораторијској сушници на 40°C.

**3.3.2.2 Ултразвучна екстракција** (УЕ) је извођена у ултразвучном купатилу (Branson, САД). Узорак биљног материјала (5 g) је пренешен у ерленмајер и преливен са 250 ml растварача. Смеша је сонификована у трајању од 40 минута. Добијени екстракти су филтрирани, упарени до сува и осушени на 40°C.

**3.3.2.3 Микроталасна екстракција** (МЕ) је извођена у отвореном систему користећи модификовану комерцијалну микроталасну пећницу. Узорак биљног материјала (5 g) је пренешен у ерленмајер и преливен са 250 ml растварача. Поступак екстракције је извођен у следећем режиму: 1 минут предгревање на 160 W; 1 минут предгревање на 320 W; 40 минута екстракција на 480 W. Добијени екстракти су филтрирани, упарени до сува и осушени на 40°C.

**3.3.2.4 Екстракција водом у субкритичном стању** (СКВ) је најпре била извођена у адаптираним системима мале запремине, а затим је била пренета на препаративни екстракциони систем већег капацитета и побољшаних перформанси. Екстрактор већег капацитета је омогућио извођење екстракције у условима конвективног преноса масе омогућавајући бољу ефикасност процеса, као и извођење процеса на знатно вишим притисцима и температурама. Екстракциони систем је приказан на слици 30. Биљни материјал је заједно са растварачем унет у екстракциону посуду (б) укупне запремине 1,7 l. Компресија је извођена азотом чистоће 99,99% (Messer, Србија) преко вентила (3). Азот је

коришћен са циљем извођења компресије и како би спречио евентуалну оксидацију. Помоћу манометра (2) (Inol, Словенија, модел IM 811A12) контролисана је вредност притиска у екстракционој посуди, док је температура мерена уз помоћ термопара Pt 100 (4) и регулисана помоћу регулатора температуре (8) (Nigos, Србија, модел 1011P). Загревање је обезбеђено применом грејне подлоге (11). Повећање преноса масе, као и избегавање локалног прегревања постигнуто је преко вибрационе платформе (7) која је осигуравала конвекцију у вибрационој области 2-6 Hz .



Слика 30. Шематски приказ екстрактора/реактора субкритичном водом. 1 - боца са гасом; 2 - манометар; 3 - сигурносни вентил; 4 - термоелемент за мерење температуре; 5 - поклопац екстракционе/реакционе посуде; 6 - екстракциона/реакциона посуда; 7 - механичка облога са вибрационом платформом; 8 - терморегулатор; 9 - главни прекидач; 10 - прекидач за укључивање вибрационе платформе; 11 - грејна подлога.

Сви добијени екстракти упарени су до сува користећи ротациони вакуум упаривач (Devarot, Електромедицина, Словенија). Након тога сушењем на 40°C добијени су суви екстракти камилице. Овако припремљени суви екстракти подвргавани су даљим квалитативним и квантитативним анализама применом различитих метода.

### 3.3.3. Оптимизација процеса екстракције субкритичном водом

Са циљем сагледавања утицаја свих процесних параметара и ради одабира оптималних који би омогућили добијање екстраката са максималним приносом апигенина, изведена је оптимизација најзначајнијих експерименталних параметара технике.

Испитан је утицај четири различита односа дрога:растварач, и то: 1:30; 1:50; 1:70; 1:100, при чему су остали параметри екстракције одржавани константним. Вредности осталих параметара биле су следеће: вибрација 2 Hz, притисак 20 bar, температура 100°C, време екстракције 30 минута. У екстрактима добијеним под овим условима одређен је садржај апигенина, а поред ове циљне компоненте праћен је и садржај укупних фенола и флавоноида. Одабир односа извршен је на основу садржаја апигенина, и он је даље одржаван константним у свим наредним екстракцијама.

Након одабира оптималног односа, праћен је утицај брзине мешања, односно вибрације на садржај поменутих компонената. Услови екстраховања били су као и у претходном случају (притисак 20 bar, температура 100°C, време екстракције 30 минута) уз усвојени однос (1:30). Утицај фреквенције вибрација испитан је у опсегу вредности од 2 до 6 Hz.

Притисак је праћен у опсегу вредности од 10 до 90 bar, користећи претходно усвојене вредности брзине мешања и односа дрога:растварач.

Температура је најзначајнији параметар екстракције субкритичном водом. Испитано је седам различитих вредности температуре (65, 85, 115, 130, 150, 180, 210°C). Дефинисане и одабране вредности претходно посматраних параметара одржавани су константним током одабира оптималне температуре.

Утицај времена екстракције дефинисан је на основу приноса апигенина. Екстракције су извођене у трајању од 5 до 60 минута. Као и у претходним етапама оптимизације и овде су добијени екстракти, поред одређивања садржаја апигенина, окарактерисани и у погледу садржаја укупних фенола и укупних флавоноида.

Након одабира оптималног односа дрога:растварач (1:30), брзине мешања (3 Hz), притиска (45 bar), температуре (115°C) и времена екстракције (30 мин), посматран је утицај присуства модификатора на садржај апигенина. Као модификатор коришћена је хлороводонична киселина у следећим концентрацијама: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 M.

Течни екстракти добијени у свим фазама оптимизације екстракције коришћени су за одређивање садржаја фенола, флавоноида и апигенина применом одговарајућих спектрофотометријских метода. Остатак течних екстраката је упараван на ротационом упаривачу под сниженим притиском, и сушен у сушници на 40°C. Тако добијени суви екстракти коришћени су даље у поступцима испитивања њихове биолошке активности, као и одређивање полифенолног профила применом HPLC методе.

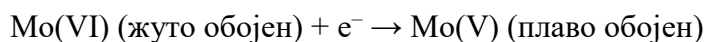
### 3.4. ИСПИТИВАЊЕ ХЕМИЈСКОГ САСТАВА ЕКСТРАКАТА

#### 3.4.1. Укупан принос екстракције

Укупан принос екстракције одређен је применом стандардне методе по *Ph. Jug. IV* (1984). Након филтрације течног екстракта, аликуот запремине 50 ml пренешен је у претходно измерен балон и упарен до сува на ротационом вакуум упаривачу. Упарени екстракт је сушен у сушници на температури од 105°C у току 3 сата до константне масе. За сваки узорак поступак екстракције је поновљен три пута. Принос екстракције изражен је као g сувог екстракта/100 g дроге (% m/m).

#### 3.4.2. Садржај укупних фенола

Садржај укупних фенола у екстрактима камилице одређен је методом по Folin-Ciocalteu (Singleton и Rosi, 1965). Метода по Folin-Ciocalteu је заснована на мерењу редукујућег капацитета полифенолних једињења, чијом дисоцијацијом настаје протон и феноксидни анјон. Настали феноксидни анјон редукује Folin-Ciocalteu реагенс до плаво обојеног јона:

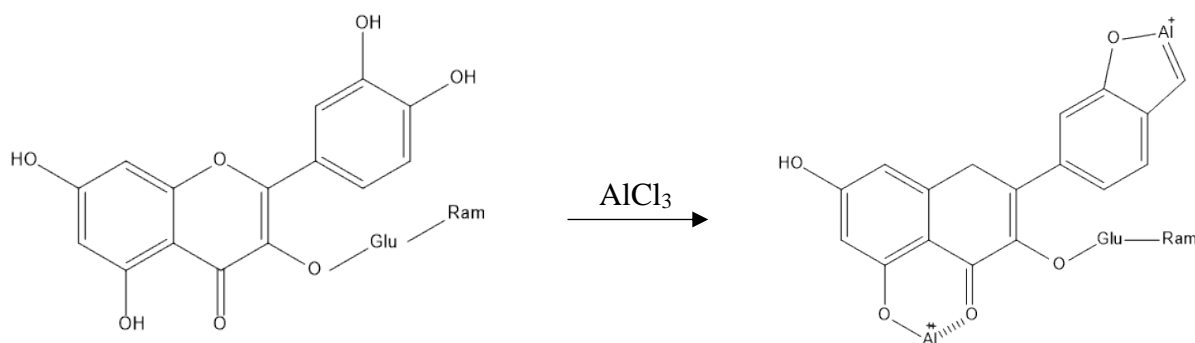


Реакциона смеша је припремљена мешањем екстракта (0,1 ml), 7,9 ml дестиловане воде, 0,5 ml реагенса Folin-Ciocalteu и 1,5 ml 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Као слепа проба коришћена је смеша у коју је уместо 0,1 ml узорка додато 0,1 ml дестиловане воде. Након 1 h на собној температури, измерена је апсорбанца испитиване смеше на таласној дужини од 750 nm. За сваки узорак поступак је поновљен три пута. Садржај фенола израчунат је на основу

калибрационе криве стандарног раствора хлорогенске киселине. Укупан садржај фенола у анализираним узорцима изражен је као mg еквивалента хлорогенске киселине по g дроге  $\pm$  стандардна девијација (mg ЕХК/g  $\pm$  СД). Код екстраката код којих је садржај одређиван из сувог екстракта, суви екстракти су претходно били растворени до концентрације 10 mg/ml. Код оваквих екстраката резултат је изражен као mg еквивалента хлорогенске киселине по g сувог екстракта  $\pm$  стандардна девијација (mg ЕХК/g  $\pm$  СД).

### 3.4.3. Садржај укупних флавоноида

Садржај укупних флавоноида у екстрактима камилице одређен је колориметријском методом по Markham-у (1989). Одређивање садржаја укупних флавоноида засновано је на њиховој особини да са металима граде одговарајуће метало-комплексе. Нарочито значајан је Al- комплекс (слика 31).



Слика 31. Структура рутина и његов комплекс са алуминијумом (кверцетин-3-О-рутинозидодиалуминат(III) комплекс).

Реакциона смеша је припремљена мешањем 1 ml екстракта са 4 ml дестиловане воде и 0,3 ml 5% NaNO<sub>2</sub>. Као слепа проба коришћена је смеша у коју је уместо 1 ml узорка додато 1 ml дестиловане воде. Реакција се одвијала на собној температури 6 минута. Након тога у реакциону смешу додато је 0,3 ml AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O и 5 минута касније још 2 ml NaOH (1 M). Добијена смеша је допуњена дестилованом водом до укупне запремине од 10 ml. Апсорбанца узорка је измерена на таласној дужини од 510 nm. За сваки узорак поступак је поновљен три пута. Садржај флавоноида израчунат је на основу калибрационе криве стандарног раствора рутина. Укупан садржај флавоноида у анализираним узорцима изражен је као mg еквивалента рутина по g дроге  $\pm$  стандардна девијација (mg ЕР/g  $\pm$  СД),

односно као mg еквивалента рутина по g сувог екстракта  $\pm$  стандардна девијација (mg EP/g  $\pm$  СД).

#### 3.4.4. Одређивање садржаја апигенина помоћу танкослојне хроматографије

Садржај апигенина у екстрактима камилице добијеним субкритичном екстракцијом водом одређен је применом комбинованог хроматографско-спектрофотометријског поступка (Пекић и сар., 1989). Раздвајање флавоноида присутних у екстрактима изведено је методом хроматографије на танком слоју (TLC, енг. Thin Layer Chromatography). За потребе раздвајања 10 ml екстракта је упарено под сниженим притиском, а суви остатак у балону растворен је у 1 ml смеше хлороформ:метанол (1:1, V/V). Тако припремљен раствор нанешен је на плочу са слојем силикагела (GF<sub>254</sub>), дебљине 0,5 mm, у виду стартних тачака (40  $\mu$ l). Истовремено је на плочу нанешен и стандард апигенина растворен у истој смеси растварача (1 mg/ml, 5  $\mu$ l). Раздвајање хроматограма изведено је применом смеше растварача толуол:метилетилкетон:метанол (55:30:15, V/V/V) као мобилне фазе. Након 30 минута плоча је извађена и сушена на ваздуху, а детекција је извођена посматрајући хроматограм под УВ лампом на таласним дужинама 254 и 365 nm. На основу стандарда апигенина оивичене су зоне силикагела које садрже овај флавоноид. Те зоне су састругане и пренешене у шлифоване епрувете. Потом је додато 5 ml етанола (50%) и уз мешање вршено растварање 30 минута. Центрифугирањем (3.000 мин<sup>-1</sup>) етанолни раствори апигенина су одвојени од силикагела. Овако добијеном раствору је измерена апсорбанца на таласној дужини 350 nm. На основу калибрационе криве за апигенин, израчунат је садржај апигенина у екстрактима камилице. Добијени резултати изражени су као mg апигенина по g осушеног биљног материјала (mg/g).

#### 3.4.5. UHPLC–DAD -MS/MS анализа

Одређивање фенолних једињења изведено је применом Dionex Ultimate 3000 UHPLC течног хроматографа са DAD детектором (енг. Diode Array Detector) спрегнутог са TSQ Quantum Access Max трипл-квадрупол масеним детектором (ThermoFisher Scientific, Basel, Швајцарска). За хроматографско раздвајање коришћена је Synchronis C18 колоне при температури од 40°C. Бинарна мобилна фаза састојала се од 0,01% сирћетне киселине (А) и ацетонитрила (Б). Примењен је градијентни мод, који је подразумевао следећи однос фаза:

5% Б у прве две минуте, 2-12 минута са 5-95% Б, 12-13 минута са распоном концентрација Б од 95% до 5% и 5% Б након 20 минута. Проток је био подешен на 0,3 ml/мин, а таласне дужине на DAD детектору 254 и 280 nm. Инјектована запремина свих узорача износила је 5 µl. Примењени стандарди фенолних компоненти растворени су у метанолу у концентрацији од 1 mg/ml. Овај раствор је даље мешан са водом како би се добили радни раствори следећих концентрација: 0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 и 1,00 mg/l.

Трипл-квадрупол масени спектрометар (MS) са HESI (енг. Heated Electrospray Ionization) извором је коришћен уз температуру испаравања од 250°C и следеће параметре извора јонизације: напон 4500 V, притисак гаса (N<sub>2</sub>) 27 AU (арбитрарних јединица), притисак гаса за чишћење 0 AU, притисак помоћног гаса (N<sub>2</sub>) 7 AU, температура капиларе 275°C, офсет летача 0 V, офсет капиларе -35 V. Масени спектри снимани су у негативном јонизационом моду. За квалитативну анализу примењен је вишеструки скенирајући мод укључујући комплетно скенирање (FS) (енг. Full Scanning) и скенирање јонских продуката (PIS) (енг. Product Ion Scanning). Колизиони фрагментациони експерименти су изведени уз употребу аргона као колизионог гаса, док је колизиона енергија варирана у зависности од једињења. tSRM (енг. The Time-Selected Reaction Monitoring) експерименти за квантитативну анализу изведени су употребом два MS<sup>2</sup> фрагмента за свако једињење које се претходно показало као доминантно у PIS експериментима (Гашић и сар., 2015). Обрада података је изведена преко Xcalibur софтвера (верзија 2.2). Фенолна једињења су идентификована директним поређењем спектра са спектрима комерцијалних стандарда. Садржај сваког једињења појединачно је израчунат преко површине пика и изражен као mg датог једињења по kg сувог екстракта (mg/kg).

### 3.5. ИЗОЛАЦИЈА АПИГЕНИНА

Изолација апигенина је изведена из екстракта добијеног екстракцијом субкритичном водом под оптималним условима екстракције, односно под условима који обезбеђују добијање екстракта са максималним садржајем апигенина. Изолација је извођена применом колонске хроматографије на стубу MN-полиамида SC6 (Macherey-Nagel, Düren, Немачка). Полиамид (2 g) суспендован у дестилованој води (60 ml) је унешен у стаклену колону (дужине 30 cm, пречника 1,5 cm). Елуирање апигенина након наношења екстракта камилице је изведено етанолом (96%) при константном протоку (0,4 ml/мин). Сакупљане

фракције (1 ml) анализирани су применом претходно описаног TLC поступка. Фракције које су садржале чист апигенин су спојене и концентроване. Прекристализација апигенина вршена је из апсолутног етанола. Идентификација апигенина извршена је применом НРТLC-UV/VIS технике.

### **3.5.1. НРТLC-UV/VIS идентификација апигенина**

Узорци изолованог (5 и 15  $\mu\text{L}$ ) и комерцијално добијеног (5  $\mu\text{L}$ ) апигенина нанесени су уз помоћ аутоматског апликатора (Linomat 5 – Camag, Muttenz, Швајцарска), при брзини апликације од 30 nl/s, на плоче силикагела у виду стартних линија (5 mm).

Хроматографска анализа извођена је применом истог растварачког система као и у претходним TLC анализама. Након развијања хроматограма, плоче су сушене (3 минута), а затим је изведена квалитативна анализа применом TLC Scanner 4 (Camag) система на апсорбанци 340 nm уз брзину скенирања од 20 mm/s и резолуцију од 100  $\mu\text{m}$ /кораку. На основу UV спектра комерцијалног и изолованог апигенина, извршена је идентификација изолованог апигенина.

## **3.6. ИСПИТИВАЊЕ БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ ОДАБРАНИХ ЕКСТРАКТА**

### **3.6.1. Одређивање антирадикалске активности електрон спин резонантном (ESR) спектроскопијом**

#### *3.6.1.1. ESR спектрална анализа утицаја екстракта на стварање и трансформацију хидроксил радикала*

Хидроксилни радикали добијени су у Фентоновој реакцији и детектовани у систему који се састојао од 0,2 ml DMPO (112 mM), 0,2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 mM) и 0,2 ml  $\text{FeCl}_2$  (0,3 mM) (Чанадановић-Брунет и сар., 2009). Утицај екстракта камилице и апигенина на формирање и стабилизацију хидроксил радикала испитан је додавањем њихових диметилформаидних раствора. Концентрације екстракта додатих Фентоновој реакцији били су у опсегу 0,1 - 1,5 mg/ml, док су концентрације раствора апигенина износиле 0,01 - 0,1 mg/ml. Контрола је припремана без додавања екстракта или апигенина. ESR спектри снимљени су 2,5 минута након мешања и преношења у Bruker ER-160FT кварцну кивету на ESR спектрометру Bruker300E (Rheinstetten, Немачка). Одређивања су изведена при следећим условима:



- Фреквенција модулације: 100 kHz
- Амплитуда модулације: 0,226 G
- Временска константа: 80,72 ms
- Временски опсег мерења: 327,68 ms
- Центар поља: 3440,00 G
- Укупан опсег мерења: 100,00 G
- Фреквенција микроталасног подручја: 9,64 GHz
- Снага микроталасног подручја: 20 mW
- Температура мерења: 23°C.

Антирадикалска активност (АА) испитиваних узорака дефинисана је изразом:

$$AA = \frac{(h_0 - h_x)}{h_0} 100 (\%)$$

где је:

$h_0$  – висина другог пика ESR сигнала слепе пробе

$h_x$  – висина другог пика ESR сигнала узорка (екстракта или апигенина).

### 3.6.1.2. ESR спектрална анализа утицаја екстракта на стварање и трансформацију супероксидног анјон радикала

Супероксидни анјон радикали су припремљени растварањем  $\text{KO}_2$ /краунетра (10 mM/20 mM) у осушеном DMSO. Реакциона смеша састојала се од 5  $\mu\text{l}$  ове смеше, 0,5 ml осушеног DMSO и 5  $\mu\text{l}$  раствора DMPO у DMSO (2 M). Утицај екстракта камилице, као и стандарда апигенина на формирање и трансформацију њихових DMPO/OOH “спин-адукта” испитана је додавањем диметилформаидних раствора. Концентрациони опсег екстракта износио је 0,005-0,25 mg/ml, док су концентрације раствора стандарда апигенина биле у опсегу 0,001-0,025 mg/ml. Контрола је припремана без додавања екстракта или стандарда апигенина. ESR спектри снимљени су након мешања и преношења у Bruker ER-160FT кварцну кивету при следећим условима:

- Фреквенција модулације: 100 kHz,
- Амплитуда модулације: 4 G
- Временска константа: 40,96 ms

- Временски опсег мерења: 327,68 ms
- Центар поља: 3440,00 G
- Укупан опсег мерења: 100,00 G
- Фреквенција микроталасног подручја: 9,64 GHz
- Снага микроталасног подручја: 20 mW
- Температура мерења: 23°C.

Антирадикалска активност (AA) испитиваних узорака дефинисана је изразом:

$$AA = \frac{h_0 - h_x}{h_0} 100 (\%)$$

где је:

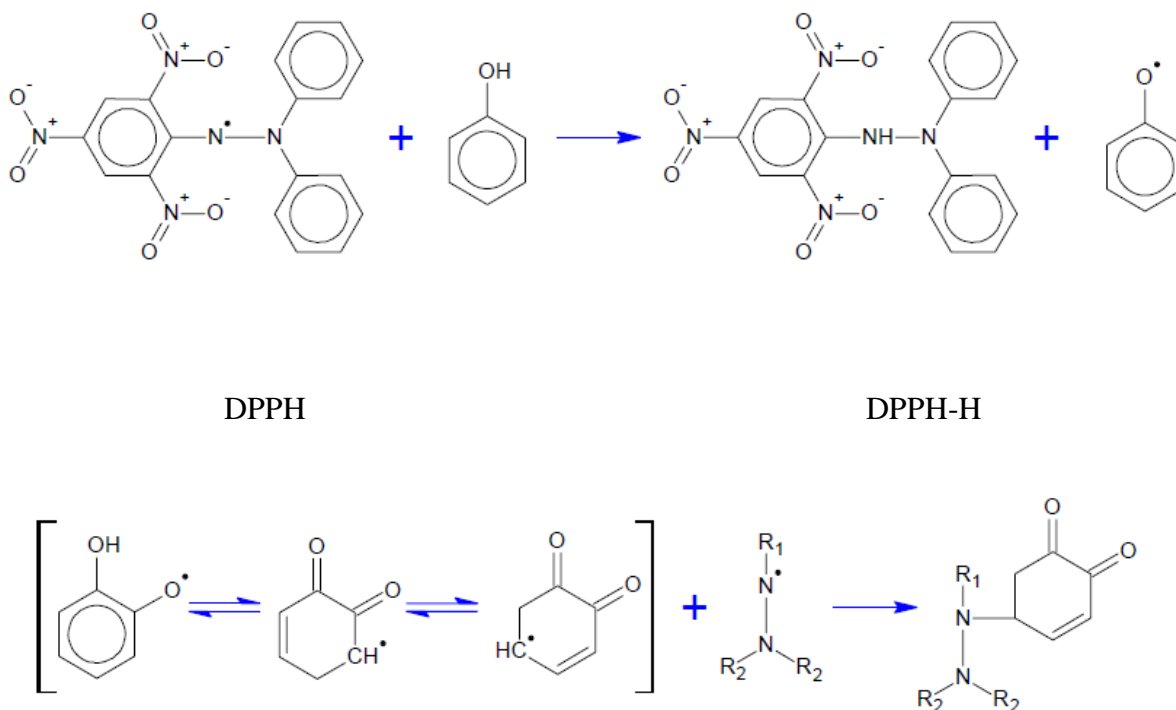
$h_0$  – висина другог пика ESR сигнала слепе пробе

$h_x$  – висина другог пика ESR сигнала узорка (екстракта или апигенина).

### 3.6.2. Спектрофотометријско одређивање антиоксидативног и антирадикалског потенцијала

#### *Одређивање способности неутрализације DPPH радикала*

Способност неутрализације DPPH<sup>•</sup> (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикала одређена је применом спектрофотометријске методе (Espin и сар., 2000) која је заснована на праћењу промене боје љубичасто обојеног раствора стабилног азот-центрираног DPPH<sup>•</sup> радикала у редуковану, жуто обојену форму, DPPH-H. Појава жуте боје објашњава се способношћу појединих компонената да делују као доноси водоника или електрона, при чему DPPH<sup>•</sup> прелази у редуковани неутрални DPPH-H. Неутрализација DPPH<sup>•</sup> фенолним једињењима одвија се према два симултана механизма. Најпре, фенолно једињење делује као донор H-атома при чему настаје редуковани, неутрални DPPH-H облик и арилокси радикал који је резонантно стабилизован, а затим, настали арилоксил радикал реагује са још једним DPPH<sup>•</sup> радикалом при чему долази до њихове кондензације и преласка у неутралан молекул (слика 32).



Слика 32. Механизам неутрализације DPPH<sup>•</sup> радикала фенолним једињењима.

Суви екстракти камилице растворени су у води (1 mg/ml) и помешани са 95% метанолом и 90  $\mu$ M раствором DPPH<sup>•</sup> радикала у метанолу до различитих садржаја сувог екстракта (0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 и 0,2 mg/ml). Као контрола коришћена је смеша у коју је уместо узорка додата дестилована вода. Као слепа проба коришћен је 95% метанол. Након 60 минута на собној температури мерена је апсорбанца реакционе смеше на таласној дужини  $\lambda=515$  nm. На основу измерене апсорбанце испитиваног узорка и контроле израчуната је RSC (енг. Radical Scavenging Capacity) вредност према једначини:

$$RSC(\%) = 100 - \frac{A_{уз} 100}{A_{к}}$$

где је:

$A_{уз}$  – апсорбанца узорка

$A_{к}$  – апсорбанца контроле.

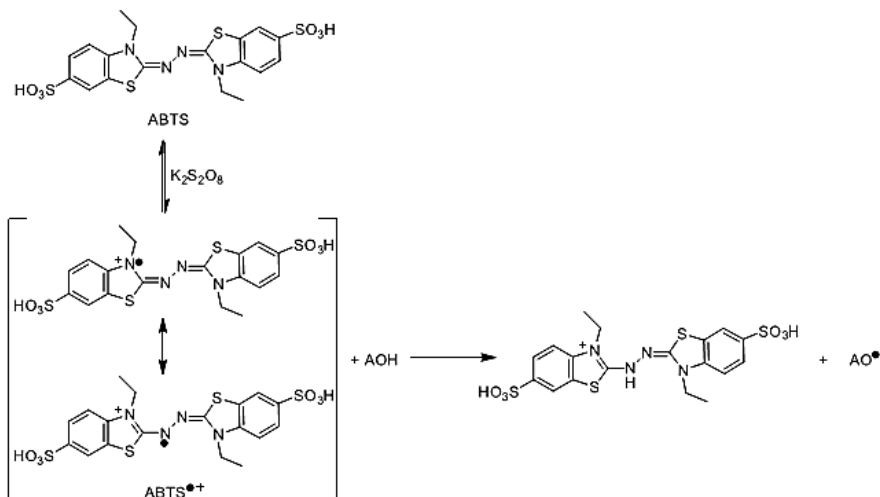
Сва мерења су изведена у три понављања, након чега је добијена зависност између вредности RSC (%) и концентрације екстракта. Из добијене зависности помоћу једначине линеарне регресије израчуната је IC<sub>50</sub> вредност (mg/ml), дефинисана као концентрација екстракта која елиминиса 50% DPPH радикала (RCS = 50%).

### ***Одређивање способности неутрализације хидроксилиних радикала***

Способност инхибиције неспецифичног хидроксилног радикала одређена је методом по Hinneburg и сар. (2006). Од сувих екстраката направљена је серија раствора од седам разблажења у распону садржаја 0,02 - 0,08 mg/ml. Раствори сувих екстраката помешани су са 500 µl 5,6 mM раствора 2-деокси-D-рибозе, 100 µM FeCl<sub>3</sub>, 104 mM раствором EDTA, 100 µl 1,0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 µl 1,0 mM воденог раствора аскорбинске киселине и 2,7 ml фосфатног пуфера pH-вредности 7,4. Након тога, реакциона смеша је инкубирана 30 минута на 50°C. По завршетку периода инкубације 1 ml 2,8% трихлор-сирћетне киселине и 1 ml 1% тиобарбитурне киселине је додато у реакциону смешу. Даља инкубација је вршена на 50°C у трајању од 30 минута. Као контрола коришћена је смеша у коју је уместо узорка додата дестилована вода. Свакој проби и контроли мерена је апсорбанца спектрофотометријски на 532 nm. Сва мерења су изведена у три понављања.

### ***Одређивање способности неутрализације ABTS радикала***

ABTS (2,2'-азино-бис(3-етил-бензотиазолин-6-сулфонска киселина) тест, извођен по методи Delgado-Andrade и сар. (2005) се заснива на реакцији ABTS са калијум-персулфатом при чему настаје ABTS катјон радикал (слика 33). Раствор насталог радикала се затим остави да стоји у мраку на собној температури од 12 до 16 часова при чему се раствор обоји тамно плаво.



Слика 33. Оксидација АВТС калијум-персулфатом, настанак АВТС радикал катјона и његова реакција са антиоксидансом (АОН) (de Oliveira и сар., 2014).

Добијени раствор се затим разблажује фосфатним пуфером (рН-вредност 7,4) док апсорбанца на 734 nm не буде  $0,70 \pm 0,02$ . Након тога се 4 ml овог раствора инкубира са 10  $\mu$ l узорка на 30°C у току 30 минута, а затим се читава апсорбанца. У присуству антиоксиданса раствор ће се обезбојити пошто антиоксиданси редукују настали радикал катјон до АВТС, а обезбојавање раствора је у корелацији са антиоксидативном активношћу испитиваних екстраката (Erel, 2004.) Као контрола коришћена је смеша у коју је уместо узорка додата дестилована вода. Способност "хватања" АВТС<sup>•+</sup> радикала израчуната је на основу следеће формуле:

$$RSC (\%) = \left[ \frac{A_k - A_{уз}}{A_k} \right] 100$$

где је:

$A_k$  – апсорбанца контроле

$A_{уз}$  - апсорбанца узорка.

Сва мерења су изведена у три понављања. Из добијене зависности RSC (%) од концентрације екстракта израчуната је IC<sub>50</sub> вредност (mg/ml). Као рефернтне супстанце коришћени су гална киселина, аскорбинска киселина и бутилхидрокситолуен (ВНТ).

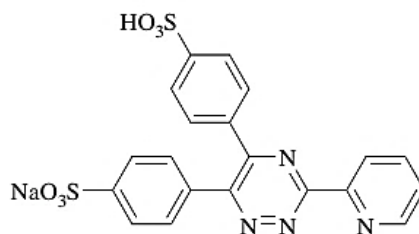
### **Метода одређивања редукционе способности**

Редуктивна способност екстраката одређена је према методи по Оуаизу (1986). Ова метода се заснива на праћењу редукције  $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$  под дејством испитиваних узорака. Као мера редуктивне способности користи се  $\text{IC}_{50}$  вредност која представља концентрацију испитиваног узорка при којој се постиже 50% редукције.

Раствори екстраката камилице различитих концентрација (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 и 1 mg/ml) помешани су са фосфатним пуфером (1 ml, 0,2 M, рН-вредност 6,6) и 1 ml 1% калијум-ферицијанида,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Добијена смеша остављена је 20 минута на температури од 50°C. Након тога, 1 ml 10% раствора трихлор-сирћетне киселине додат је смеси и она је центрифугирана 10 минута на 3.000  $\text{min}^{-1}$ . Добијеном супернатанту (2 ml) додата је бидестилована вода (2 ml) и 0,1%  $\text{FeCl}_3$  (0,4 ml). Апсорбанца узорка измерена је на таласној дужини од 700 nm. Сва мерења су изведена у три понављања. Редукциона способност испитиваних екстраката је изражена преко  $\text{IC}_{50}$  вредности (mg/ml).

### **Одређивање способности хелирања металних јона**

У склопу одређивања и дефинисања антиоксидативне моћи важно је одредити и способност хелирања металних јона. Најчешће примењивана метода се заснива на комплексирању гвожђа(II)-јона. Ферозин (слика 34) омогућава квантитативно грађење комплекса са  $\text{Fe}(\text{II})$ -јонима. У присуству хелирајућих агенаса долази до разлагања овог комплекса, односно смањења интензитета црвене боје која потиче од ферозинског комплекса. Ово се прати спектрофотометријски на 562 nm (Dasgupta и Klein, 2014; Gülçin 2012). Одређивање хелирајуће способности је изведено према устаљеној методи (Carter и сар., 1971; Yan и сар., 2006).



Слика 34. Структура ферозина.

Суви екстракти камилице растворени су у води до садржаја од 1 mg/ml. Од овог почетног раствора екстраката направљена је серија разблажења у опсегу концентрација од 0,02 до 0,05  $\mu\text{g/ml}$ . Од сваког раствора узимано је по 1 ml за припрему реакционе смеше. Реакциона смеша је припремана мешањем са 0,125 mM FeSO<sub>4</sub> (1 ml). Одмах затим је додат 1 ml ферозина (0,3125 mM). Овако припремљеној реакционој смеси мерена је апсорбанца ( $\lambda = 562 \text{ nm}$ ) након 10 минута. Резултати су изражени као IC<sub>50</sub> вредности (mg/ml).

### **Одређивање инхибиције липидне пероксидације**

Одређивање инхибиције липидне пероксидације се употребљава како би се одредио укупни антиоксидативни капацитет природних производа. Многи природни антиоксиданси инхибирају процес липидне пероксидације у *in vitro* условима.

Способност екстраката камилице да инхибирају липидну пероксидацију одређен је у складу са тиоцијанидном методом (Hsu и сар., 2008). Суви екстракти камилице растворени су у води и направљена је серија разблажења у опсегу од 0,02 mg/ml до 1 mg/ml. Од сваког раствора узет је аликвот од 0,5 ml који је помешан са 2,5 ml емулзије линолне киселине (40 mM, рН-вредност 7,0). Емулзија линолне киселине припремана је мешањем 0,2804 g линолне киселине и 0,2804 g Tween-20 у 50 ml 40 mM фосфатног пуфера. Смеша је након тога инкубирана на 37°C током 72 сата. Након истека времена, 0,1 ml реакционе смеше је помешано са 4,7 ml етанола (75%), 0,1 ml FeCl<sub>2</sub> (20 mM) и 0,1 ml амонијум-тиоцијаната (30%). Након интензивног мешања у трајању од 3 минута, мерена је апсорбанца на таласној дужини  $\lambda = 500 \text{ nm}$ . Аскорбинска киселина, гална киселина,  $\alpha$ -токоферол и ВНТ коришћене су као референтне супстанце у овом експерименту. Сва мерења су изведена у три понављања. Резултати су изражени као IC<sub>50</sub> вредности (mg/ml).

### **Одређивање укупне антиоксидативне активности**

Укупна антиоксидативна активност екстраката камилице одређена је фосфомолибденском методом (Prieto и сар., 1999). За потребе извођења анализе суви екстракти су разблажени у води, при чему је направљена серија од 10 разблажења у опсегу садржаја од 0,05 до 0,5 mg/ml. Од сваке концентрације узимано је по 0,3 ml узорка екстракта и помешано са 3 ml смеше реагенаса. Смешу реагенаса сачињавали су: 0,6 M сумпорна

киселина, 28 mM натријум-фосфат и 4 mM амонијум-молибдат. Реакциона смеша реагенса и екстраката је инкубирана на 95°C у трајању од 90 минута. Након хлађења мерена је апсорбанца на 695 nm. Као слепа проба коришћена је смеша у коју је уместо узорка додата дестилована вода. Сва мерења су извођена по три пута. Аскорбинска киселина је коришћена као референтна супстанца, а укупна антиоксидативна активност је изражена као mg аскорбинске киселине по граму сувог екстракта (mg AA/g).

### 3.6.2. Одређивање антимикуробне активности екстраката

Антимикуробна активност екстраката камилице одређена је мерењем њихове минималне инхибиторне концентрације МИС (енг. Minimum Inhibitory Concentration) микродилуционом методом (Satyajit и сар., 2007) на сојевима микроорганизама: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Aspergillus niger* (ATCC 16404). Идентификација испитиваних микроорганизама потврђена је од стране Лабораторије за микологију Одсека за микробиологију Института Торлак у Београду, Србија. Стерилисани Mueller Hinton агар (МНВ), је коришћен у случају бактерија, док је у експериментима са квасцима коришћен Sabouraud декстрозни агар. При одређивању антимикуробне активности суви екстракти камилице су растворени у води до садржаја 400 µg/ml, одакле је даље прављена серија разблажења (312, 156, 78, 39 и 19,5 µg/ml). Након мешања узорка екстраката са сојевима микроорганизама концентрација бактеријских ћелија износила је 10<sup>6</sup> CFU/ml (Colony Forming Unit - јединица за формирање колонија), док је концентрација квасаца износила 3×10<sup>4</sup> CFU/ml. Као позитивна контрола коришћен је амрацин у случају бактерија, односно нистатин код сојева квасаца. Плоче са засејаним микроорганизмима су обавијене парафилмом и инкубиране. Инкубација је, у случају бактерија, извођена 24 h на 37°C, односно у случају квасаца 48 h на 28°C, након чега је одређивана минимална инхибиторна концентрација. МИС вредност представљала је ону концентрацију екстраката при којој је дошло до промене боје, односно најмању концентрацију која је инхибирала раст посматраних микроорганизама. За сваки узорак и сваку концентрацију поступак је поновљен три пута, а резултат је изражен као средња вредност (µg/ml).



### 3.6.3. Одређивање способности инхибиције одабраних ензима

Инхибиторна активност екстраката камилице према ензимима одређена је мерењем инхибиције  $\alpha$ -амилазе,  $\alpha$ -глукозидазе и тирозиназе. За потребе одређивања способности инхибиције ових ензима суви екстракти камилице растворени су у води (2 mg/ml). Овако припремљени раствори сувих екстраката камилице су даље коришћени у анализи.

Способност инхибиције  $\alpha$ -амилазе одређена је помоћу Caraway-Somogyi методе (Zengin и сар., 2014). 25  $\mu$ l раствора сувог екстракта камилице помешано је са 50  $\mu$ l раствора  $\alpha$ -амилазе (ЕС 3.2.1.1) у фосфатном пуферу (рН-вредност 6,9 са 6 mM раствором натријум-хлорида) и нанесено на 96-ћелијску плочу. Реакција је иницирана додавањем раствора скроба (50  $\mu$ l, 0,05%). Потом је реакциона смеша инкубирана 10 мин на 37°C. Слепа проба је припремана без додатка раствора ензима. Реакција је заустављена додатком 1 M HCl (25  $\mu$ l), након чега је додато 100  $\mu$ l раствора јода у калијум-јодиду (5/1, w/w). Апсорбанце су очитане на таласној дужини од 630 nm. Способност инхибиције  $\alpha$ -амилазе добијена је одузимањем апсорбанце слепе пробе од апсорбанце узорка, и изражена као еквивалент акарбозе по граму сувог екстракта камилице (mg ACE/g екстракта).

За одређивање способности инхибиције  $\alpha$ -глукозидазе коришћен је метод по Zengin и сар. (2014). Раствор екстраката камилице (2 mg/ml; 50  $\mu$ l) помешан је са глутатионом (50  $\mu$ l, 0,5 mg/ml), раствором  $\alpha$ -глукозидазе (ЕС 3.2.1.20) у фосфатном пуферу (0,1 M, рН-вредност 6,8) и 50  $\mu$ l PNPГ-а (10 mM) (4-N-трофенил- $\alpha$ -D-глукопиранозид) у 96-ћелијској плочи. Инкубација реакционе смеше је изведена на 37°C у трајању од 15 минута. Слепа проба је припремана без додатка раствора ензима. Реакција је прекинута додавањем раствора натријум-карбоната (50  $\mu$ l, 0,2 M), након чега је измерена апсорбанца на таласној дужини од 400 nm. Од апсорбанце узорка одузета је апсорбанца слепе пробе, а добијена ензимска активност изражена је као еквивалент акарбозе по граму сувог екстракта камилице (mg ACE/g).

Активност инхибирања тирозиназе одређена је по модификованој методи (Orhan и сар., 2012) користећи L-DOPA (L-3,4-дихидроксифенилаланин) као супстрат. Екстракт камилице (2 mg/ml; 25  $\mu$ l) помешан је са раствором тирозиназе (40 mM, 40  $\mu$ l) и фосфатним пуфером (100  $\mu$ l, рН-вредност 6,8). Реакција је иницирана додатком 40  $\mu$ l раствора L-DOPA (10 mM), након чега је смеша инкубирана у трајању од 15 минута на 25°C. Слепа проба је припремљена на исти начин, али без додавања ензимског раствора. Апсорбанца слепе пробе

и узорка измерена је на 492 nm. На основу разлике апсорбанци узорка и слепе пробе израчуната је активност инхибиције тирозиназе и изражена као еквивалент којичне киселине по граму сувог екстракта камилице (mg КАЕ/g).

#### 3.6.4. Одређивање антипролиферативне активности МТТ тестом

Антипролиферативна активност екстракта камилице одређена је МТТ тестом (Mosmann, 1983; Dighe и сар., 2011). Тест се заснива на настанку љубичастих кристала формазана распадом тетразолијумове МТТ соли (3-(4,5-диметилтиазол-2)-2,5-дифенилтетразолијум бромида) под дејством дехидрогеназе живих ћелија. Интензитет обојења пропорционалан је броју живих ћелија и читава се спектрофотометријски на таласној дужини од 580 nm.

При одређивању антипролиферативне активности екстракта камилице коришћене су следеће туморске ћелије:

1. Нер2 (подлога: MEM Eagle/5% FCS), хумана ћелијска линија рака грљана (*human larynx carcinoma*),
2. RD (подлога: MEM Eagle/10% FCS), хумана ћелијска линија рабдомиосаркома (*rhabdomyosarcoma*),
3. L2OB (подлога: MEM Eagle/10% FCS), тумори мишијег фибробласта у коју су трансфектовани неки хумани гени.

За потребе испитивања антипролиферативне активности екстракта камилице, суви екстракти су растварани у апсолутном етанолу (5 mg/ml). Суспензије ћелија пренешене су на микротитар плоче ( $2 \times 10^5$  ћелија/ml; 100  $\mu$ l/отвор), а потом инкубиране на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> у инкубатору. Након 24 часовне инкубације ћелијским суспензијама је додат раствор екстракта камилице различитих концентрација (25, 50, 100, 250, 500, 750, 1.000  $\mu$ g/ml), као и контрола (апсолутни етанол). Потом су ћелије инкубиране на 37°C, 48 сати. Контролне, нетретиране ћелије су расле под истим условима. По завршетку периода инкубације супернатант је одбачен, а ћелијама је додат раствор МТТ концентрације 500  $\mu$ g/ml. Након додатка по 100  $\mu$ l МТТ раствора (у сваки од бунарчића) уследила је четворочасовна инкубација (37°C) у CO<sub>2</sub> инкубатору. Реакција је прекинута додавањем 100  $\mu$ l натријум-додецилсулфата (10% у 10 mM HCl). Настали формазански кристали растворени су додатком DMSO, а апсорбанца је читана 24 сата касније на 580 nm на

спектрофотометру (Ascent 6-384 [Suomi], MTX Lab Systems Inc., Vienna, VA 22182, САД). Обзиром да је апсорбанца новонасталог формаза на директно сразмерна броју живих ћелија, апсорбанца третираних ћелија подељена је апсорбанцом контролних нетретираних ћелија и потом је та вредност помножена са 100. Апсорбанца слепе пробе је увек одузета од апсорбанце одговарајућег узорка. Антипролиферативна активност је изражена као  $IC_{50}$  вредност (концентрација која инхибира 50% ћелијског раста). Резултати су добијени из три паралелна експеримента.

### **3.6.5.1. Морфолошке промене**

Да би се утврдиле морфолошке промене на HeLa ћелијама, које су биле изложене екстрактима камилице примењен је инвертни микроскоп Olympus 1 x 51 са Olympus SP-500 UZ фотоапаратом за визуализацију. HeLa ћелије су тестиране у временском периоду од 48 и 72 сата. Ћелије су нанешене у концентрацији  $1 \times 10^5$  ћел/ml, на плоче са 6 отвора које су потом инкубирале 24 сата у инкубатору при  $37^{\circ}C$  уз 5%  $CO_2$ . Следећег дана додати су екстракти камилице. Као контрола коришћене су нетретиране ћелије. Поред екстраката камилице, утицај апигенина на морфолошке промене ћелија је такође посматран. Концентрације екстраката камилице, као и самог апигенина одабране су на основу претходно спроведеног МТТ теста ( $IC_{50}$  вредности). Инхибиторне концентрације израчунате су на основу процента преживљавања HeLa ћелијске линије у временском периоду од 48 и 72 сата.

### **3.6.5.2. Анализа апоптозе**

Праћење апоптозе изведено је под дејством екстраката ферментисаних цветова камилице. Промене у изгледу ћелија које настају услед подстакнуте апоптозе и некрозе посматране су визуално помоћу флуоресцентног микроскопа (Axioscope 2 MOT, Carl Zeiss Jena GmbH, Јена, Немачка) повезаног са рачунаром и софтвером који омогућавају снимање и обраду слике. Микроскоп се састојао од 4 филтера који детектују светлости на различитим таласним дужинама и то: (f1)  $\lambda_{exc}$  365/12 nm  $\lambda_{em}$  397 nm, (f2)  $\lambda_{exc}$  530–585 nm  $\lambda_{em}$  615 nm, (f3)  $\lambda_{exc}$  = 450–490 nm  $\lambda_{em}$  = 520 nm и (f4) видљива област. Да би се утврдио удео апоптотичних и некротичних ћелија у култури након одговарајућег третмана ћелије су бојене са анексин V-флуоресцеин изотиоцијанатом (анексин V-FITC) и пропидијум-јодидом (PI), а

затим анализирани на проточном цитофлуориметру. Анексин V-FITC је протеин масе 35-36 kDa обележен флуоресцеин-изотиоцијанатом (FITC) који након побуђивања светлошћу аргонског ласера емитује зелену флуоресценцију. Анексин V има велики афинитет за везивање за фосфатидил-серин који се у нормалним условима налази са унутрашње стране мембране. Током апоптозе фосфатидил-серин се пребацује са унутрашње на спољашњу страну мембране, везујући FITC-ом обележен анексин. PI, флуоресцентна боја која се умеће између нуклеинских база ДНК, по побуђивању ласерском светлошћу проточног цитофлуориметра емитује црвену флуоресценцију која је пропорционална садржају ДНК у ћелији. PI не може да прође кроз очувану ћелијску мембрану, међутим при некрози долази до оштећења ћелијске мембране тако да PI може да уђе у ћелију и реагује са ДНК при чему флуоресцира црвеном бојом. Двоструким бојењем са анексин V-FITC и PI се могу разликовати здраве, апоптотичне и некротичне популације ћелија.

За праћење апоптозе, ћелије у концентрацији  $1 \times 10^5$  ћел/ml пренешене су на стерилно предметно стакло на које је причвршћена силиконска коморица (Flexiperm, Greiner, Немачка) која формира баријеру и 8 отвора у које су нанешене ћелије. Ћелије су инкубирани током 24 сата у инкубатору при температури од 37°C уз 5% CO<sub>2</sub>. Следећи дан са ћелија је уклоњен медијум и додати су екстракти камилице. Ћелије су тестиране у временском периоду од 24 и 48 сати. По истеку задатог времена уклоњен је медијум, ћелије су испиране PBS-ом. Припремљен је раствор (1:0,5 анексин/PI) (70-100  $\mu$ l/коморица). Ћелије су инкубирани 5-10 минута у мраку. Анализа ћелија је извршена применом флуоресцентног микроскопа.

### **3.6.6. *In vivo* одређивање спазмолитичке активности**

*In vivo* експерименти на експерименталним животињама су изведени у складу са Директивом савета Европске заједнице (86/609/ECC). Експеримент са животињама одобрен је од стране етичке комисије Универзитета у Новом Саду и Министарства пољопривреде Републике Србије (бр. 168). За потребе *in vivo* експеримента коришћени су мишеви (NMRI-Наап) старости 10 недеља, телесне масе 20-25 g. Животиње су узгајане на Медицинском факултету у Новом Саду, на Одељењу за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију. Све животиње су имале слободан приступ храни и води и гајене су у условима са наизменичним светлим и тамним периодима у трајању од 12 h. Пре почетка

експеримента животиње су држане без хране 24 сата. Животиње су насумично подељене у неколико тест група и једну контролну групу, при чему се свака група састојала од по шест животиња. Контролној групи (група 1) је орално дозиран физиолошки раствор, док су осталим групама давани узорци екстраката камилице припремљени од ферментисаних и неферментисаних (нативних) цветова камилице. Доза екстраката нативних цветова износила је 2,5 mg/kg у случају друге тест групе, односно 5 mg/kg у случају треће тест групе животиња. Четвртој и петој групи животиња орално су давани екстракти ферментисаних цветова камилице у дози 2,5 mg/kg (четврта група), односно 5 mg/kg (пета група). По истеку 30 минута од давања физиолошког раствора или екстраката камилице, све животиње су кљукане активним угљем, односно емулзијом активног угља (0,6 ml емулзије садржала је 0,4 g медицинског угља и 0,2 g арапске гуме у 10 ml маслиновог уља). Након 30 минута животиње су жртвоване, а интестинална покретљивост је одређена на основу размака између медицинског угља и доњег дела желуца (pilorus) у центиметрима. Пут који је прешао активни угаљ је изражен као проценат од укупне дужине танког црева.

## ***4. Резултати и дискусија***

#### 4.1. Основна испитивања биљног материјала

За контролу квалитета биљног материјала је коришћен низ аналитичких метода испитивања квалитета полазног материјала (аналитичких метода прописаних европском и националном фармакопејом). Вредности параметара квалитета језичастих цветова камилице су приказане у табели 12.

Први параметар који је био одређен је садржај влаге. Влага индиректно утиче на садржај активних компонената. Прописано осушена дрога задржава извесну количину воде у облику хемијски везане и слободне воде. Садржај влаге у адекватно чуваном биљном материјалу, према захтевима фармакопеје, мора бити у границама 7-16%, а најчешће се креће у опсегу 8-12%. У испитиваним цветовима камилице, као што показује табела 12, садржај влаге био је 8,12%, што је у складу са захтевима Фармакопеје (*Ph. Jug. IV*).

Табела 12. Параметри квалитета језичастих цветова камилице

Материјал	Садржај влаге (%, m/m)	Садржај пепела (%, m/m)	SiO <sub>2</sub> (%, m/m)	Садржај етарског уља (%, m/m)
Језичасти цветови камилице	8,12±0,11*	9,53±0,07	2,00±0,01	0,196±0,001

\* ±2СД

Други испитиван параметар био је садржај пепела, односно количина неиспарљивих минералних материја које се добијају после потпуног сагоревања биљног материјала. Он потиче од минералних једињења која у живој биљци имају значајну улогу (физиолошки пепео). Вишак пепела, односно његов садржај изнад уобичајних граница представља тзв. физички пепео и убедљив је показатељ неисправности дроге. Након жарења језичастих цветова камилице количина заосталог пепела износила је 9,53% (табела 12), што указује на исправност биљног материјала.

Поред укупног садржаја пепела за потпуну карактеризацију биљних дрога потребно је одредити и количину пепела нерастворног у киселини. Количина у киселини нерастворног пепела била је у прописаним границама и износила је 2,00%.

Следећи параметар који је био испитан је садржај етарског уља (ЕУ). Садржај ЕУ латица камилице одређен је официналном методом дестилације помоћу водене паре.

Садржај ЕУ у језичастим цветовима камилице износио је 0,196%. Ова вредност је мања од оне коју садржи цваст камлилице (*in toto*), што је и очекивано обзиром да је код камилице ЕУ концентрисано, пре свега, у жутим (тубуларним) цветовима, а не у белим.

На основу добијених резултата, може се закључити да је полазна дрога била одговарајућег квалитета, односно вредности испитиваних параметара су биле у границама прописаним *Ph. Jug. IV*.

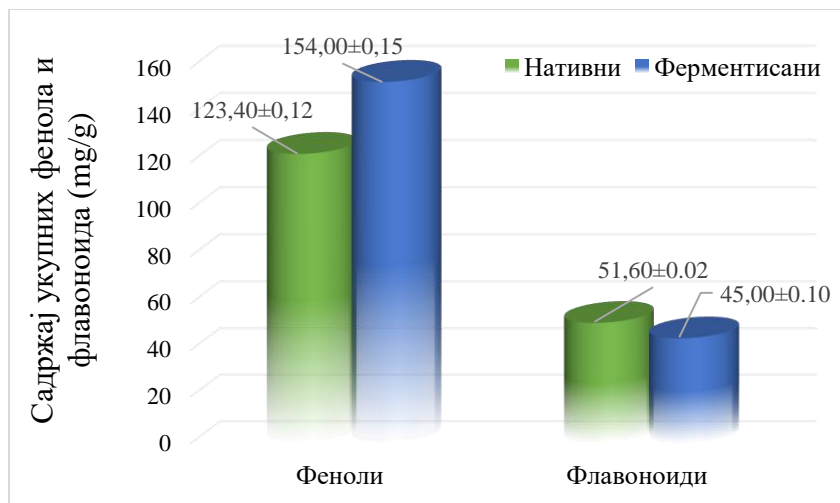
#### 4.2. Екстракција ферментисаних језичастих цветова камилице

Прегледом литературе утврђено је да количина апигенина у екстрактима камилице може бити повећана на више различитих начина који укључују хемијске и биохемијске процесе, а један од погоднијих поступака јесте ензимска трансформација. У принципу ензимска трансформација се може реализовати применом два поступака, и то:

- Активирањем  $\beta$ -глукозидазе присутне у цвету камилице;
- Додатком ензимског препарата екстракту камилице (комерцијална  $\beta$ -глукозидаза или  $\beta$ -глукозидаза изолована из природних извора, нпр. јечма).

У овом раду ензимска трансформација (ферментација) је вршена првим начином, односно активирањем ензима. Ферментација нативних цветова камилице је изведена са циљем повећања садржаја овог флавоноида у биљном материјалу, како би последично добијени екстракти били богатији њиме. Садржаји укупних фенола и флавоноида су одређени у нативним и ферментисаним цветовима (слика 35).





Слика 35. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима нативних и ферментисаних цветова камилице.

На основу приказаних резултата јасно се види да процес ферментације биљног материјала утиче на садржај посматраних група једињења. За сагледавање дубљих разлика међу екстрактима ферментисаних и неферментисаних цветова, извршена је и детаљна анализа хемијског састава поменутих екстраката применом високопритисне течне хроматографије (поглавље 4.5.1), као и биолошке активности (поглавље 4.6.).

Како би процес екстракције ферментисаног биљног материјала осигурао максималан принос апигенина, сам екстракциони процес је био оптимизован методом одзивне површине (RSM, енг. Response Surface Methodology).

#### 4.2.1. Оптимизација процеса екстракције ферментисаних цветова камилице применом методе одзивне површине

##### 4.2.1.1. Одабир независних променљивих

Ефикасност процеса екстракције условљена је са више параметара истовремено, при чему они могу бити међусобно независни или зависни (Montgomery и сар., 2001). Ради утврђивања најпогоднијих услова екстракције извршена је оптимизација процеса применом методе одзивне површине. Пре постављања самог дизајна по коме је процес оптимизације вођен, одабране су независне променљиве, као и опсег њихових вредности.

Као независно променљиве одабране су температура, концентрација растварача и време екстракције. У прелиминарним експериментима одабран је најпогоднији растварач, његова концентрација, као и однос растварача и биљног материјала. Након тога, дефинисане су и граничне вредности улазних (независно променљивих) величина, и одређени нивои испитивања (виши, нижи и средњи).

Узимајући у обзир структуру полифенолних једињења, већина њих се лако екстрахује применом поларних и умерено поларних растварача. Испитана су три растварача: вода, метанол и етанол. У поређењу са метанолом и водом, етанолни екстракти су показали нешто већи садржај фенолних и флавоноидних материја. Стога је етанол изабран као растварач који је коришћен током процеса оптимизације. Додатни разлог оваквог избора је ниска токсичност етанола у односу на друге раствараче и могућа даља примена овако добијених екстраката у фармацији и прехранбеној индустрији. Такође, етанолни екстракти се одликују и већом микробиолошком стабилношћу у односу на водене екстракте.

Принос екстракције компонената се повећава са повећањем поларности употребљеног екстрагенса. Повећањем удела воде у екстрагенсу повећава се и његова поларност, па се различите концентрације етанола као екстрагенса могу користити за издвајање различитих класа фенолних једињења. На основу литературног прегледа, етанол у концентрацији од 70% се сматра најпогоднијим за екстракцију апигенина (Зековић, 1993), те је ова концентрација етанола узета као средњи ниво параметра концентрације. Нижи и виши нивои овог параметра су били 50 и 90%.

Након одабира растварача, његове концентрације, као и нивоа овог параметра, одабран је однос дрога:растварач. Однос дрога:растварач је испитан на три нивоа (1:20, 1:30 и 1:50; m/V). Принос укупних екстрахованих материја при односу 1:20 је износио 30,80%, затим 31,98% при односу 1:30, док је укупни принос екстракције при односу 1:50 износио 33,00%. На основу добијених резултата евидентно је да при повећању односа расте и принос екстракције. Међутим, даљи пораст односа није пожељан из практичних и економских разлога. Стога, однос 1:50 је одабран и коришћен у свим наредним експериментима.

На основу литературног прегледа најчешћи температурни интервал екстракције полифенолних компонената из биљног материјала је између 40 и 80°C, те су ове вредности температуре дефинисане као граничне вредности при оптимизацији процеса. Ниже, средње

и више вредности температуре су износиле 40, 60 и 80°C. Имајући у виду чињеницу да се у литератури време од 40 мин помиње као оптимално време за екстракцију апигенина (Зековић, 1993), ова вредност је била усвојена као вредност средњег нивоа, док су нижи и виши нивои износили 20 и 60 мин.

#### 4.2.1.2. Оптимизација применом RSM методе

Како екстракција представља први корак ка изолацији и идентификацији биоактивних молекула, постоји доста приступа оптимизације овог процеса. Метода одзивне површине (RSM) је статистичка техника за дизајн, емпиријско моделовање и оптимизацију процеса, где је одзивна функција условљена са неколико различитих процесних променљивих (Box и Draper, 1987; Myers и Montgomery, 1995). Према досадашњим литературним подацима оптимизација екстракције апигенина из ферментисаних цветова камилице није рађена.

Метод одзивне површине је примењен за испитивање утицаја температуре (40-60-80°C), концентрације етанола (50-70-90%) и времена екстракције (20-40-60 минута) на принос апигенина, као и за одређивање њихових оптималних вредности које би омогућиле добијање екстраката са максималним приносом поменутог флавонола. Поред апигенина, одзиви обухваћени оптимизационим процесом били су и садржај укупних фенола и флавоноида. Добијени експериментални резултати статистички су тестирани анализом варијансе (ANOVA) при нивоу значајности  $p = 0,05$  (табела 13).

Резултати дати у табели 13 показују да је принос укупних фенолних компонената (УФ), екстрахованих под различитим условима, био у опсегу 0,770-1,920 mg ЕХК/ml. Садржај флавоноидних материја (УФЛ) кретао се у интервалу 0,128-0,314 mg ЕР/ml. Минимална концентрација апигенина (А) износила је 0,0884 mg/ml, док је максимална имала вредност од 0,1790 mg/ml.

Табела 13. Вох-Веhккен матрица, кодиране и праве вредности независно променљивих и експериментални резултати приноса укупних фенола (УФ), флавоноида (УФЛ) и апигенина (А)

Редни број	Температура (°C)	Концентрација етанола (%)	Време (мин)	УФ (mg ЕХК/ml) <sup>1</sup>	УФЛ (mg ЕР/ml) <sup>2</sup>	А (mg/ml)
1	40 (-1)	50 (-1)	40 (0)	0,982	0,184	0,1306
2	60 (0)	50 (-1)	20 (-1)	1,033	0,202	0,1410
3	80 (1)	50 (-1)	40 (0)	1,245	0,228	0,1576
4	60 (0)	50 (-1)	60 (1)	1,293	0,236	0,1774
5	40 (-1)	70 (0)	20 (-1)	0,969	0,155	0,1230
6	80 (1)	70 (0)	20 (-1)	1,200	0,215	0,1524
7	60 (0)	90 (1)	20 (-1)	0,733	0,128	0,0884
8	80 (1)	90 (1)	40 (0)	0,937	0,211	0,1438
9	60 (0)	90 (1)	60 (1)	0,860	0,200	0,1300
10	80 (1)	70 (0)	60 (1)	1,920	0,288	0,1536
11	60 (0)	70 (0)	40 (0)	1,140	0,240	0,1628
12	60 (0)	70 (0)	40 (0)	1,110	0,257	0,1790
13	60 (0)	70 (0)	40 (0)	1,140	0,245	0,1634
14	60 (0)	70 (0)	40 (0)	1,110	0,314	0,1624
15	60 (0)	70 (0)	40 (0)	1,120	0,257	0,1582
16	40 (-1)	90 (1)	40 (0)	0,770	0,147	0,1364
17	40 (-1)	70 (0)	60 (1)	1,150	0,257	0,1582

<sup>1</sup>Еквивалента хлорогенске киселине; <sup>2</sup> Еквивалента рутина

#### 4.2.1.2.1. Садржај укупних фенола у екстрактима ферментисаних цветова камилице

У овом експерименту највећи садржај фенолних компонената (1,920 mg ЕНК/ml) имао је екстракт добијен на температури од 80°C, при концентрацији етанола од 70% и времену трајања процеса од 60 минута.

Регресиони коефицијенти за процену модела добијени су вишеструком линеарном регресијом. Сумиране вредности регресионих коефицијента (за сва три праћена одзива) приказане су у табели 14. Степен значајности сваког фактора израчунат је преко њихове *p*-вредности. Тест статистичког значаја заснован је на критеријуму укупне грешке са нивоом тачности 95%. Када је *p*-вредност мања од 0,05, фактор показује значајан утицај на процес, у случају *p*-вредности мање од 0,01 фактор показује веома значајан утицај на процес, док вредност већа од 0,05 указује да посматрани фактор није значајан за процес (за ниво тачности 95%). У табели 14 су дате и вредности коефицијента вишеструке детерминације

( $R^2$ ), као и коефицијента варијације ( $CV$ ), на основу чијих вредности се може проверити слагање експерименталних и теоријских вредности. Наиме, висока вредност коефицијента вишеструке детерминације и ниска вредност коефицијента варијације указују на слагање експерименталних и теоријских вредности.

Табела 14. Регресиони коефицијенти полиномне функције одзива

Регресиони коефицијент	УФ	УФЛ	А
$\beta_0$	1,124***	0,262**	0,165*
<b>Линеарни члан</b>			
$\beta_1$	0,178***	0,024**	0,007
$\beta_2$	-0,156***	-0,020*	-0,013**
$\beta_3$	0,161***	0,035***	0,014**
<b>Члан интеракције</b>			
$\beta_{12}$	-0,024	0,005	-0,004
$\beta_{13}$	0,134**	-0,007	-0,008
$\beta_{23}$	-0,033	0,009	0,001
<b>Квадратни члан</b>			
$\beta_{11}$	0,094	-0,016	-0,005
$\beta_{22}$	-0,235***	-0,053***	-0,017**
$\beta_{33}$	0,091	-0,017	-0,013
<sup>a</sup> $R^2$	0,927	0,883	0,803
<sup>b</sup> $CV$	9,734	11,512	10,019

\* Ниво значајности 10%; \*\* Ниво значајности 5%; \*\*\* Ниво значајности 1%.

<sup>a</sup> Коефицијент вишеструке детерминације; <sup>b</sup> Коефицијент варијације

На основу вредности линеарних коефицијента приказаних у табели 14, садржај укупних фенола значајно је условљен линеарним члановима екстракционих параметара и квадратним чланом концентрације етанола ( $p < 0,01$ ). Интеракција између екстракционе температуре и времена је показала значајан утицај на садржај фенола ( $p < 0,05$ ). Услед негативног квадратног ефекта концентрације растварача, може се закључити да садржај фенола достиже свој максимум при одређеној концентрацији етанола, након чега опада.

Осим одређивања коефицијената корелације, понекад је неопходно спровођење детаљнијих статистичких анализа, на основу којих се може утврдити оправданост одабраног модела. У спроведеном експерименту и обради резултата примењена је анализа варијансе (ANOVA) и у табели 15 су дати резултати анализе варијансе моделованих одзива.

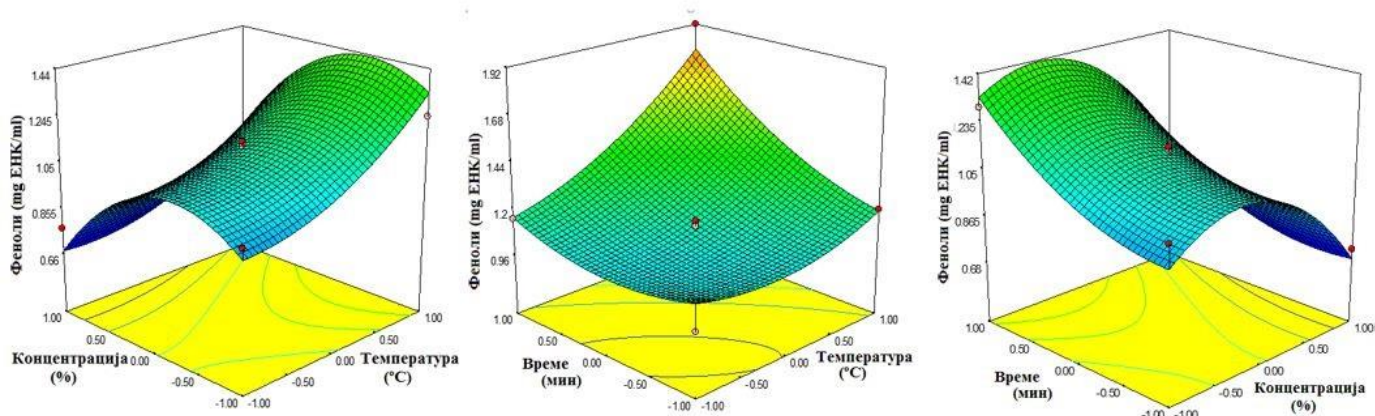
Табела 15. Анализа варијансе (ANOVA) моделованих одзива екстракције ферментисаних цветова камилице

	Збир квадрата	Степен слободe	Средња вредност квадрата	F-вредност	p - вредност
<b>Садржај укупних фенола</b>					
Модел	1,029	9	0,114	9,966	0,003
Остатак	0,080	7	0,011		
Одступање од модела	0,079	3	0,026	115,146	0,000
Грешка	0,000	4	0,000		
Укупно	1,110	16			
<b>Садржај укупних флавоноида</b>					
Модел	0,034	9	0,003	5,894	0,014
Остатак	0,004	7	0,000		
Одступање од модела	0,001	3	0,000	0,387	0,769
Грешка	0,003	4	0,000		
Укупно	0,039	16			
<b>Садржај апигенина</b>					
Модел	0,006	9	0,000	3,178	0,070
Остатак	0,001	7	0,000		
Одступање од модела	0,001	3	0,000	6,689	0,048
Грешка	0,000	4	0,000		
Укупно	0,007	16			

У случају укупних фенола, вредност одступања од модела била је висока, што указује на то да постоји значајно велико одступање између одговора на сваком нивоу независних варијабли и одговарајуће фитоване вредности, тако да у случају фенола није било могуће генерисати математичку једначину која би задовољавајуће описала модел при испитиваним интервалима експерименталних параметара.

Најбољи начин да се ефекти независних променљивих визуализују јесте да се графички (у две или три димензије) прикаже одзивна функција модел једначине (O'Prey и сар., 2003). Тродимензионални дијаграм помаже при одређивању праваца којим би се повећао жељени одзив. Фитована површина графички се може приказати као максимум, минимум или као превојна тачка. Као што се са слике 36 може видети, садржај укупних фенола у екстрактима ферментисаних цветова камилице је био у порасту са повећањем вредности температуре и времена. Концентрација етанола је такође значајно условљавала

садржај фенола, при чему се при приказу утицаја концентрације етанола на принос фенола уочавала превојна тачка. Другим речима, принос фенола расте са порастом концентрације етанола до одређене вредности где достиже свој максимум. Даљим повећањем концентрације етанола уочава се пад приноса фенола.



Слика 36. Утицај испитиваних параметара на принос укупних фенола.

#### 4.2.1.2.2. Садржај укупних флавоноида у екстрактима ферментисаних цветова камилице

Садржај укупних флавоноида је варирао од 0,128 до 0,314 mg EP/ml (табела 13). Највећи принос флавоноида добијен је при следећим условима екстракције: температура 60°C, концентрација етанола 70% и време екстракције 40 мин. Вредности коефицијента вишеструке детерминације и коефицијента варијације указују на добро слагање експерименталних и теоријских вредности (табела 14).

У случају садржаја укупних флавоноида, подаци из табеле 14 показују да је садржај ових једињења био условљен линеарним члановима, пре свега временом ( $p < 0,01$ ). Такође, веома значајан утицај на принос флавоноида показао је квадратни члан концентрације етанола. Вредности регресионих коефицијената интеракција нису имале значајан утицај на садржај флавоноидних материја у екстрактима ферментисаних цветова камилице ( $p > 0,1$ ). Негативна вредност квадратног члана концентрације етанола указује на достизање максималне концентрације флавоноида у екстрактима при одређеној концентрацији етанола. Даљим порастом вредности концентрације, садржај флавоноида у добијеним

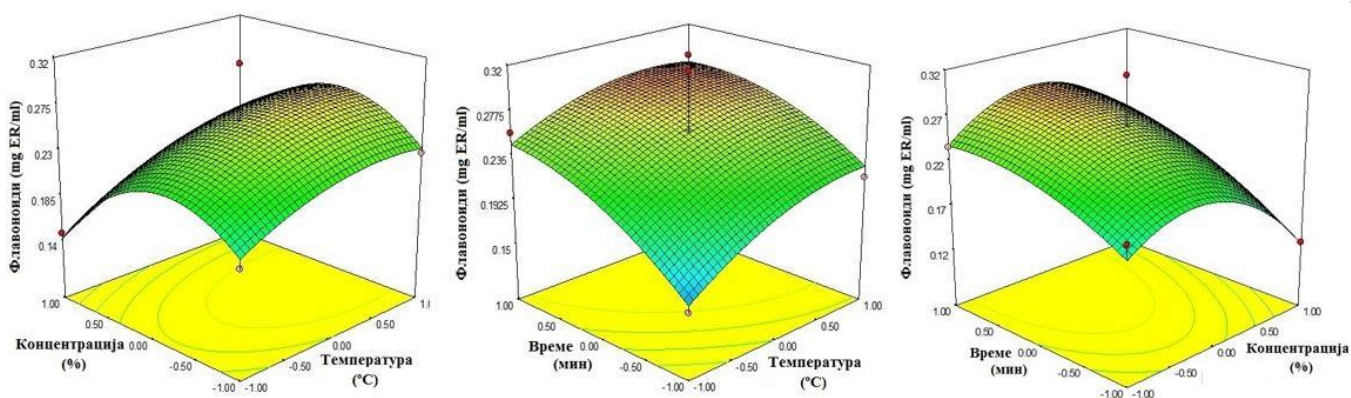
екстрактима је опадао. Вредности регресионог коефицијента и коефицијента варијансе су указивале на адекватност примењеног модела.

Према анализи варијансе ANOVA (табела 15) предложени модел показује добро слагање теоријских и експерименталних вредности. Ефекти независно променљивих на принос флавоноида могу бити описани следећом једначином:

$$Y = 0,2626 + 0,024875 X_1 - 0,0205 X_2 + 0,035125 X_3 - 0,016425 X_1^2 - 0,053675 X_2^2 - 0,017425 X_3^2 + 0,005 X_1X_2 - 0,00725 X_1X_3 + 0,0095 X_2X_3$$

где  $Y$  представља садржај флавоноида, док чланови  $X_1$ ,  $X_2$  и  $X_3$  представљају независно променљиве.

Утицај екстракционих параметара представљен је и графички на слици 37. Као што се са слике може видети, највећи принос флавоноида остварен је при вишим температурама и временима. Са порастом концентрације етанола до око 70% примећен је пораст садржаја флавоноида, док је даље повећање концентрације водило ка смањењу излазне величине, што је и било у корелацији са регресионим коефицијентом концентрације. Ово је повезано са чињеницом да поларност екстрагенса у великој мери утиче на принос флавоноида у екстрактима. Смеша етанола и воде пружа могућност модификације поларности растварача.



Слика 37. Утицај испитиваних параметара на принос укупних флавоноида.



## 4.2.1.2.3. Садржај апигенина у екстрактима ферментисаних цветова камилице

Садржај апигенина у анализираним течним екстрактима је био у опсегу 0,088-0,179 mg/ml. Коефицијент вишеструке детерминације је био задовољавајући, што је указивало на добро слагање експерименталних и теоријских вредности (табела 14).  $F$ -вредност одступања модела била је висока (табела 15), као што је то био случај и код модела за садржај укупних фенола. Међутим, његова  $p$ -вредност је била веома блиска критичној тачки ( $p < 0,05$ ).

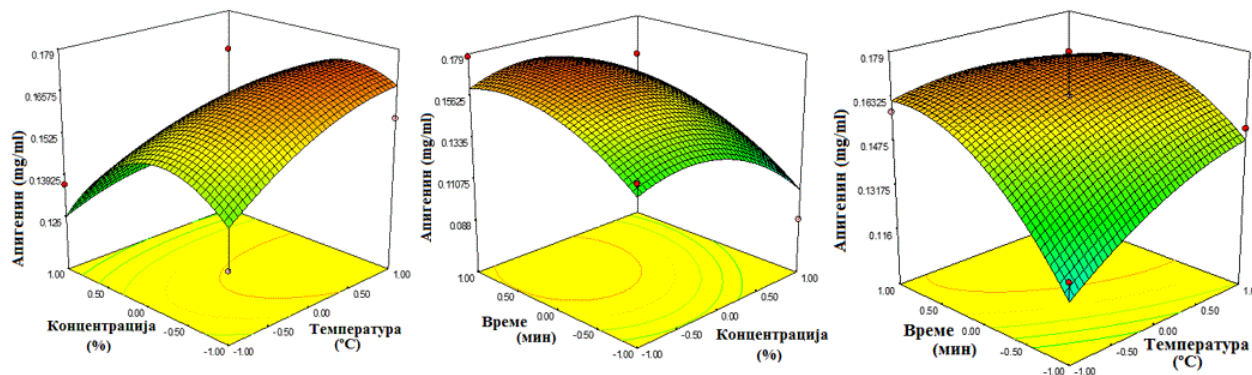
Садржај апигенина био је значајно условљен линеарним чланом концентрације и времена. Такође, значајан утицај показао је и квадратни члан концентрације ( $0,01 < p < 0,05$ ). Утицај чланова интеракција био је занемарљив ( $p > 0,1$ ), што је био случај и са линеарним чланом температуре, као и квадратним члановима температуре и времена. Негативни квадратни члан концентрације етанола био је исти као код УФ и УФЛ, што је указало на постојање превојне тачке. Након ове тачке, даљим порастом концентрације етанола, принос апигенина је опадао.

Оптимальне вредности процесних параметара (температуре, концентрације етанола и времена) које би омогућиле добијање екстраката ферментисаних цветова камилице са максималним садржајем апигенина, могу бити израчунате коришћењем следеће једначине:

$$Y = 0,16516 + 0,0074 X_1 - 0,0135 X_2 + 0,0143 X_3 - 0,00523 X_1^2 - 0,01783 X_2^2 - 0,01313 X_3^2 - 0,0085 X_1 X_2 + 1,3 X_1 X_3 - 5,23 X_2 X_3$$

где  $Y$  представља садржај апигенина,  $X_1$  температуру екстракције,  $X_2$  концентрацију растварача и  $X_3$  време екстракције.

Графички приказ утицаја испитиваних параметара на принос апигенина дат је на слици 38. Као и у претходним случајевима, утицај концентрације растварача био је најизраженији. Већи нагиб се уочава при нижим вредностима концентрација, а након одређене тачке принос апигенина је опадао. Оптимальна вредност концентрације је била испод средњег нивоа независне променљиве. У случају друге две варијабле, са повећањем њихових вредности садржај апигенина је био у сталном порасту, стога се и очекује да оптимальне вредности температуре и времена буду изнад средњих тачака ових варијабли.



Слика 38. Утицај испитиваних параметара на принос апигенина.

#### 4.2.1.3. Одређивање и валидација оптималних процесних параметара

У хемијском инжењерству оптимизација процесних параметара је значајна и води ка рационализацији процесних операција, смањењу трошкова производње и повећању квалитета финалних производа. Приказана оптимизација је извршена применом методе одзивне површине која симултано оптимизује неколико процесних променљивих у циљу добијања најбољих перформанси система. Као резултат процеса оптимизације добијена су два система, при чему је први од њих (систем I) био усмерен ка добијању производа са високим садржајем сва три испитана излазна параметра (УФ, УФЛ, А), док је други (систем II) имао за циљ добијање екстраката са максималним приносом апигенина.

Развој првог система је посебно важан имајући у виду висок биолошки потенцијал ових група једињења, као и због њиховог синергистичког деловања. Ниво значајности приноса апигенина у првом систему био је највиши (5), док је ниво значајности укупних фенола и флавоноида био низак (1). Вредности параметара који би омогућили добијање екстраката оваквих карактеристика приказани су у табели 16. Екстракцијом при оптимизованим условима (температура 80°C, концентрација етанола 62%, време екстракције 50,4 мин), предвиђен садржај фенола у екстрактима износио је 1,615 mg ЕЖК/ml, предвиђен садржај флавоноида 0,276 mg ЕР/ml, док је предвиђен садржај апигенина био 0,171 mg/ml (табела 16). Односно, предвиђен удео флавоноида у односу на садржај укупних фенолних компонената је износио 17%, док је предвиђен садржај апигенина у односу на укупне флавоноиде био 62%. Провера експеримената је изведена под

оптималним условима у циљу процене сагласности предвиђених и добијених вредности, а добијени резултати дати су у табели 16. У случају укупних флавоноида и апигенина предвиђени и стварни садржаји су били у сагласности, док је добијена вредност садржаја укупних фенола била нижа од предвиђене.

У другом систему (систем II), фокус истраживања је био на апигенину као циљном молекулу, те друге две излазне величине нису праћене. Применом методе одзивне површине оптималне вредности екстракционих параметара које би омогућиле добијање максималног приноса апигенина у добијеним екстрактима биле су следеће: температура 73,6°C, концентрација етанола 60,8% и време екстракције 46,0 минута. Предвиђен садржај апигенина у екстрактима добијеним под овим условима био је 0,172 mg/ml. Добијена вредност (0,178 mg/ml) је била веома блиска предвиђеној. Овако добра корелација (табела 16) између предвиђених и добијених вредности потврђује адекватност примењеног модела.

Табела 16. Оптималне вредности процесних параметара и поређење предвиђених и добијених вредности посматраних излазних величина.

	Систем I	Систем II
Оптимизовани услови		
Температура (°C)	80,0	73,6
Концентрација (%)	62,0	60,8
Време (мин)	50,4	46,0
<b>Предвиђене вредности<sup>a</sup></b>		
УФ (mg ЕХК/ml)	1,615±0,180	
УФЛ (mg ЕР/ml)	0,276±0,040	
А (mg/ml)	0,171±0,020	0,172±0,020
<b>Добијене вредности<sup>b</sup></b>		
УФ (mg ЕХК/ml)	1,270±0,01	
УФЛ (mg ЕР/ml)	0,303±0,002	
А(mg/ml)	0,184±0,005	0,178±0,004

<sup>a</sup> Интервал поверења ± 95%

<sup>b</sup> ±2СД

### 4.3. Екстракција нативних цветова камилице

#### 4.3.1. Поређење екстракционих техника

У циљу проналажења екстракционе технике којом се остварује највећи принос биоактивних једињења испитане су четири различите екстракционе технике.

Садржај биоактивних једињења у екстрактима условљен је многобројним факторима. Тако на пример, растворљивост фенолних једињења је условљена поларношћу употребљеног растварача за екстракцију, степеном полимеризације фенолних компонената, интеракцијама фенола и других конституената биљног материјала, као и формирањем нерастворних комплекса. Стога, не постоји универзална процедура погодна за екстракцију свих фенола или пак специфичне класе фенолних једињења из биљног материјала. Избор технике је посебно важан имајући у виду различите механизме који доминирају приликом изоловања жељених компонената из матрикса. Поред технике, утицај растварача је доминантан. Метанол, етанол, ацетон, вода, као и њихове комбинације, су најчешће коришћени растварачи за екстракцију фенола (Dai и сар., 2010). Агликони флавоноида се успешно екстрахују неполарним растварачима, попут метилен-хлорида, етил-етра или етил-ацетата. Међутим, поларнији глукозидни конјугати растворљивији су у поларнијим растварачима, као што су метанол или етанол, те се ови органски растварачи често користе при Soxhlet екстракцији (Stobiecki и Kachlicki, 2007). Етанол је један од најчешће коришћених растварача (Зековић, 1993). Употреба етанола као растварача има низ предности, а свакако једна од важнијих, како је и раније истакнуто, је ниска токсичност у поређењу са другим сличним растварачима. Поред тога, етанол лако пенетрира у ткиво биљног материјала убрзавајући тиме процес екстракције. Антисептичка својства етанола смањују могућност микробиолошке контаминације екстраката. Из ових, али и низа других разлога, етанол је коришћен за екстракцију нативних цветова камилице примењујући следеће екстракционе технике: ултразвучну (УЕ), микроталасну (МЕ) и Soxhlet екстракцију (СЕ). Поред ове три екстракционе технике, процес екстракције нативних цветова камилице је извођен и субкритичном водом (СКВ). Ефикасност примењених техника оцењена је на основу укупног екстракционог приноса, као и на основу садржаја фенолних и флавоноидних компонената у добијеним екстрактима. Садржај посматраних параметара у екстрактима добијеним различитим техникама је дат у табели 17.

Табела 17. Укупни принос екстракције, садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима добијеним различитим екстракционим техникама.

Техника	Принос (%)	Садржај укупних фенола (mg ЕХК/g*)	Садржај укупних флавоноида (mg ЕР/g)
<b>УЕ</b>	11,09±0,09**	123,40±1,70	51,60±1,41
<b>СЕ</b>	25,75±0,22	141,41±0,85	64,32±2,07
<b>МЕ</b>	31,64±0,56	117,31±1,32	58,23±0,46
<b>СКВ</b>	42,10±0,15	151,45±0,45	49,70±0,65

\*g - сувог екстракта; \*\*±2СД

Остварени резултати показују значајну разлику између екстраката добијених СКВ и другим примењеним екстракционим техникама. Предност екстраката добијених СКВ техником огледа се у већем екстракционом приносу и већем садржају укупних фенола (УФ).

Екстракциони принос остварен СКВ техником је износио 42,10%, што представља скоро четири пута већи принос у поређењу са УЕ техником (11,09%). Принос укупних екстрахованих материја у екстрактима добијеним МЕ техником износио је 31,54%, док је у случају СЕ екстракционе технике износио 25,75%. СКВ екстракција је извођена на највишој температури у поређењу са другим примењеним методама, те је и принос остварен овом техником био највећи. МЕ је извођена на нешто нижој температури, што је водило и до нижег приноса у односу на СКВ. Имајући у виду да се ултразвучна екстракција изводила на собној температури (што заправо представља и најнижу температуру у овом сету експеримената), потпуно је разумљиво да је принос остварен овом техником био најмањи.

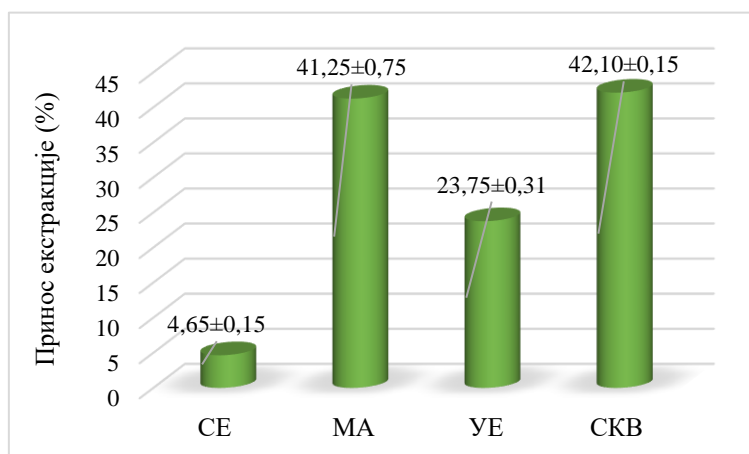
Када је у питању садржај укупних фенола, СКВ екстракција је показала најбољи резултат (151,45 mg ЕХК/g). Након ње, највећа количина фенолних једињења је одређена у СЕ (141,41 mg ЕХК/g) екстрактима. Узимајући у обзир да се СЕ изводила у трајању од неколико сати, а СКВ свега 40 мин остварени принос јасно показује предност СКВ.

Са друге стране, највећи принос укупних флавоноида остварен је СЕ техником (64,32 mg ЕР/g). Резултати приказани у табели 17 показују да, иако је садржај укупних флавоноидних једињења добијен СКВ техником био најмањи, разлике у садржају поменутих једињења између техника нису биле значајне. Као што је већ речено, етанол по својој растворљивости флавоноида је испред воде, што може бити тесно повезано са оваквим садржајем флавоноида у СКВ екстрактима (Цветановић и сар., 2015а).

Како би се елиминисао утицај растварача и стекао увид о утицају екстракционе технике, наредни сет експеримената је извођен коришћењем истог растварача – воде.

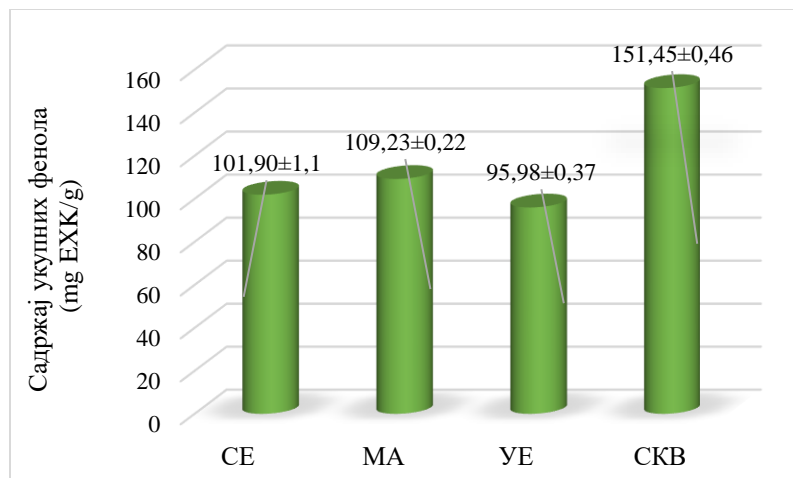
Остварени резултати су приказани на сликама 39-41. Резултати су изражени као средње вредности три понављања ( $\pm 2\text{СД}$ ).

Као што се са слике 39 може видети укупни принос екстрахованих материја остварен помоћу СКВ екстракције је био највећи (42,10%), док је незнатно нижи принос остварен МЕ техником (41,25%). У случају екстраката добијених УЕ техником, укупни екстракциони принос је био скоро два пута мањи (23,75%) у односу на СКВ. Најмањи екстракциони принос, свега 4,65%, је остварен применом СЕ технике. Поређењем резултата оствареним применом УЕ и СЕ технике са водом у односу на оне добијене етанолом може се јасно видети утицај и значај одабира погодне комбинације растварача и екстракционе технике.



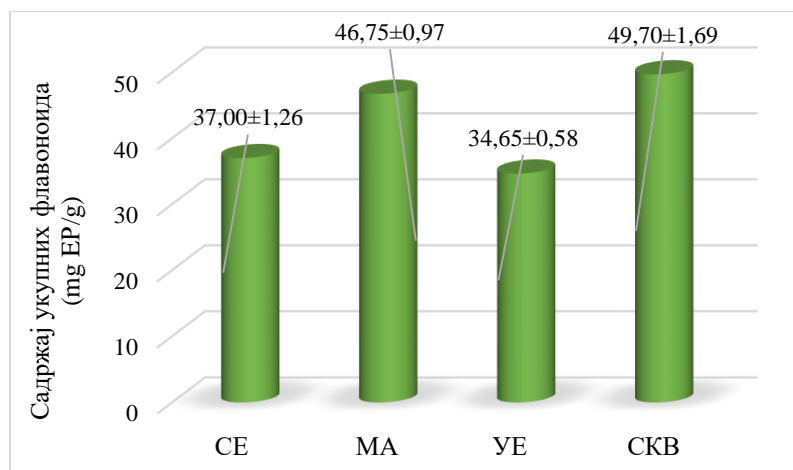
Слика 39. Укупни принос екстракције остварен водом као екстрагентом различитим екстракционим техникама.

Принос фенолних једињења у екстрактима добијеним СКВ техником је био значајно већи у односу на приносе остварене свим осталим техникама (слика 40). Вредности садржаја укупних фенола у УЕ, МЕ и СЕ екстрактима су биле блиске. За ефикасну екстракцију фенола, СКВ техника се показала најефикаснијом, чак иако постоји велики број апликација са МЕ и УЕ.



Слика 40. Принос укупних фенола у екстрактима нативних цветова камилице добијеним водом као екстрагенсом различитим екстракционим техникама.

Слика 41 приказује садржај укупних флавоноида у испитиваним екстрактима. Садржај ових једињења је био у опсегу 37,0-49,7 mg EP/g, у зависности од примењене технике. Као и у претходним случајевима, СКВ техником добијени су екстракти са највећим садржајем флавоноида (49,70 mg EP/g). Принос близак овоме је постигнут помоћу МЕ технике (46,75 mg EP/g). Добијени резултати су у корелацији са претходно добијеним резултатима за феноле.

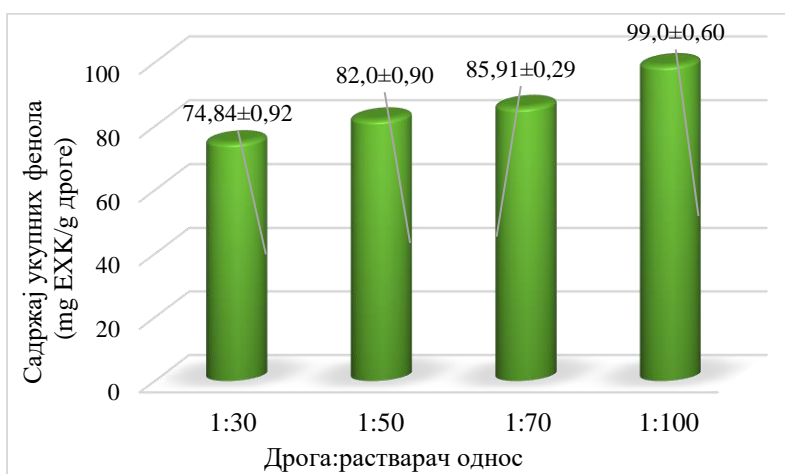


Слика 41. Садржај укупних флавоноида у воденим екстрактима у зависности од примењене технике екстракције.

### 4.3.2. Оптимизација субкритичне екстракције водом

#### 4.3.2.1. Одређивање оптималног односа дрога:растварач

Са циљем дефинисања оптималних услова под којим би се добили производи са максималном концентрацијом жељених једињења уз истовремено смањење количине интерферирајућих компонената, неопходно је да се утицај сваког од процесних параметара на процес детаљно испита. Први параметар који утиче на ефикасност екстракције јесте однос дрога:растварач. Испитана су четири различита односа (1:30; 1:50; 1:70 и 1:100, m/V), а добијени резултати су приказани на слици 42 као средња вредност три независна понављања ( $\pm 2\text{СД}$ ).



Слика 42. Утицај односа дрога:растварач на принос укупних фенола.

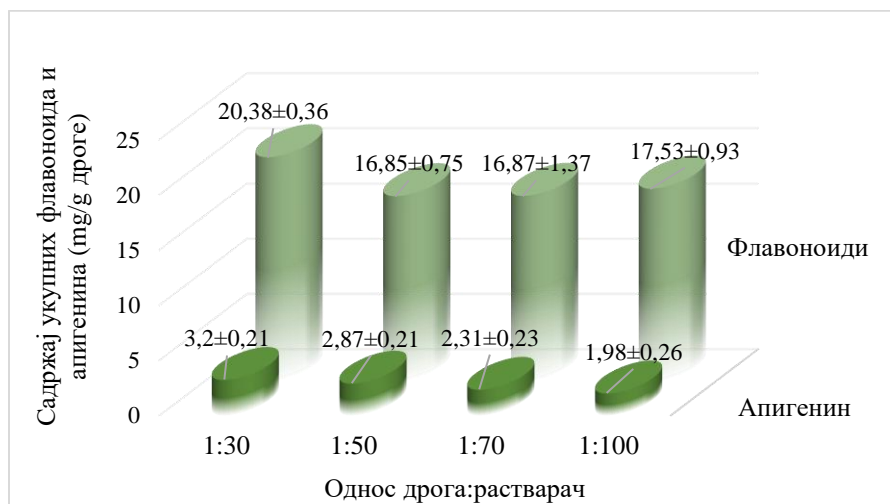
Хистограм на слици 42 јасно показује да са порастом односа расте и принос укупних фенола у екстрактима. Овакви резултати су били у складу са основним принципима теорије преноса масе, која сугерише да је концентрациони градијент између матрикса узорка и запремине растварача једна од главних покретачких сила током екстракције. Добијени резултати су у корелацији са литературним наводима који показују да пораст односа повољно утиче на екстракцију фенолних једињења (Mohamad и сар., 2013).

Резултати утицаја односа дрога:растварач на принос апигенина приказани су на слици 43, где је уједно представљен и утицај односа на садржај укупних флавоноида чијој класи једињења апигенин и припада. Добијени резултати (представљени као средња вредност три независна понављања) показују да је највећи принос и флавоноида (20,38 mg



EP/g) и апигенина (3,2 mg/g) остварен при најмањем односу (1:30, m/V). Даље повећање односа водило је ка смањењу садржаја посматраних једињења. Ово може бити повезано са чињеницом да је током екстракције концентрација раствора условљена равнотежним стањем, односно након достизања стања равнотеже концентрација више није у порасту (Herodež и сар., 2003). Однос дрога:растварач показује значајан утицај на постизање равнотежног стања (Hamdam, 2008). На основу овога може се претпоставити да се равнотежно стање постигло већ при односу 1:30, када је концентрација посматраних једињења достигла свој максимум.

Поред овога, однос дрога:растварач може утицати на вредност коефицијента активитета (Frank и сар., 1999), који условљава растворљивост компоненти из матрикса узорка, а самим тим утиче и на њихову концентрацију у добијеним екстрактима. Такође, активитет, односно вредност његовог коефицијента, условљена је и интеракцијама компонената које се екстрахују (Tan и сар., 2011).



Слика. 43. Утицај односа дрога:растварач на садржај укупних флавоноида и апигенина у екстрактима камилице добијеним субкритичном водом.

На основу добијених резултата може се рећи да однос дрога:растварач има значајан утицај на садржај фенолних, флавоноидних једињења, као и на садржај апигенина у екстрактима добијеним субкритичном водом. Због значаја апигенина и због чињенице да је

апигенин био циљно једињење, однос 1:30 је одабран као оптималан и одржаван је константим током даљих експеримената.

#### 4.3.2.2. Утицај брзине мешања

Поред многобројних фактора који условљавају ефикасност процеса екстракције, у већини конвенционалних екстракционих техника брзина мешања је један од најважнијих. Брзина мешања директно утиче на процес преноса масе у систему, као и на његов механизам.

У примењеном екстрактору мешање је било обезбеђено преко платформе на којој је била смештена екстракциона посуда. Вибрациони мод је осигуравао ефикасно мешање и конвективни пренос масе. Испитивана брзина мешања била је у опсегу од 2 до 6 Hz. При испитивању утицаја овог фактора примењен је оптималан однос дрога:растварач који је одређен у претходном оптимизационом кораку, док су вредности осталих параметара износили: 100°C, 20 bar, 30 минута. Добијени резултати дати су табеларно (табела 18).

Табела 18. Утицај брзине мешања на садржај укупних фенола, флавоноида и апигенина.

Брзина мешања (Hz)	Садржај укупних фенола (mg ЕХК/g*)	Садржај укупних флавоноида (mg EP/g)	Садржај апигенина (mg/g)
2	96,66±1,55**	20,16±0,56	2,36±0,51
3	90,30±1,85	19,46±0,79	3,57±0,55
4	83,93±0,63	19,54±0,28	1,93±0,15
5	83,63±1,53	18,52±0,19	2,48±0,51
6	77,87±0,16	15,99±0,20	1,30±0,41

\*дроге; \*\* ±2СД

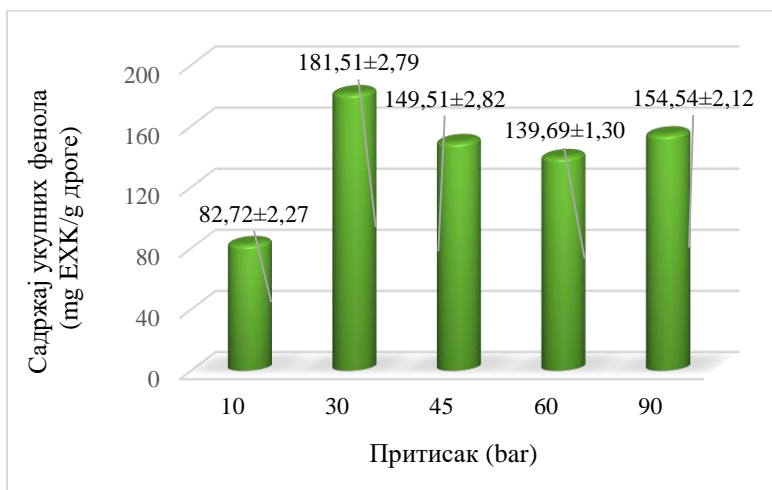
Као што се може видети из табеле 18, највећи принос укупних фенолних и флавоноидних једињења остварен је при брзини мешања од 2 Hz. У опсегу између 3 и 5 Hz ефикасност екстракције се незнатно мењала, док је најмањи принос остварен при највећој брзини (6 Hz).

У случају апигенина највећи принос је остварен при брзини од 3 Hz (3,57 mg/g), док је минимални принос апигенина (1,30 mg/g) био остварен при максималној брзини (6 Hz).

Као и у претходном кораку, имајући у виду апигенин као циљну компоненту, брзина мешања од 3 Hz је одабрана као оптимална и примењивана је у даљим испитивањима.

#### 4.3.2.3. Утицај притиска

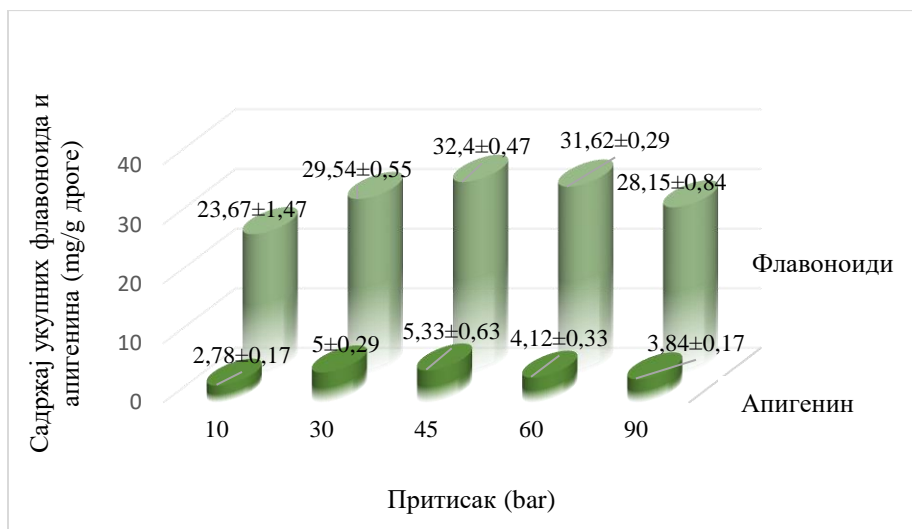
За разлику од екстракције суперкритичним угљен-диоксидом у којој је кључни параметар који условљава ефикасност процеса притисак, код екстракције субкритичном водом најзначајнији параметар је температура. Улога притиска у овој техници је задржавање воде у течном стању (Шварц-Гајић, 2012). Примењени притисак помаже и пенетрацији растварача у поре матрикса узорка и елиминише проблеме повезане са стварањем ваздушних мехурића (Шварц-Гајић, 2012; Mustafa и Turner, 2011). У циљу дефинисања утицаја притиска на екстракцију једињења од интереса, а пре свега апигенина, испитано је пет различитих вредности притиска. Вредности притисака биле су опсегу 10-90 bar. Добијени резултати приказани су хистограмима на сликама 44 и 45 као средње вредности три понављања ( $\pm 2\text{СД}$ ).



Слика 44. Утицај притиска на принос укупних фенола.

Хистограм на слици 44 јасно показује да се екстракти добијени на притиску од 10 bar карактеришу најмањим приносом фенолних компоненти (82,72 mg EP/g). Скок вредности притиска са 10 на 30 bar је условио повећање приноса фенолних једињења, при

чему је највећи принос фенола био на 30 bar (181,51 mg ЕХК/g). Приноси укупних фенолних једињења остварени на 45, 60 и 90 bar су износили 149,51, 139,69 и 154,54 mg ЕХК/g, не показујући значајне промене. Наиме, принос остварен на притиску од 90 bar је био 154,54 mg ЕХК/g, што је свега 3% више од приноса на 45 bar.



Слика 45. Утицај притиска на принос укупних флавоноида и апигенина.

У случају садржаја укупних флавоноида, минимални принос је остварен екстракцијом на притиску од 10 bar (23,67 mg EP/g). Са друге стране, максимални принос остварен је екстракцијом на притиску од 45 bar (32,4 mg EP/g), док је са даљим порастом притиска долазило до пада у садржају ових једињења. Слика 45 показује да се садржај флавоноида није мењао битније са променом притиска, што је било у корелацији са резултатима оствареним за садржај укупних фенола.

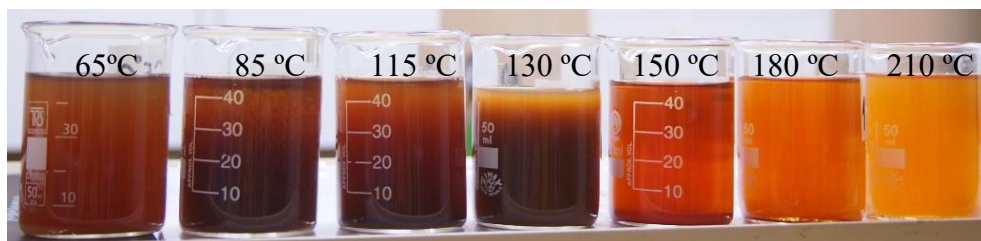
Са хистограма се уочава идентичан утицај притиска на принос апигенина. Имајући у виду да је апигенин заправо једињење флавоноидне структуре, овакав утицај притиска је био и очекиван. И у случају апигенина, максимална концентрација је остварена на 45 bar. У испитиваном опсегу притисака садржај апигенина је варирао од 2,78 mg/g (10 bar) до максималних 5,33 mg/g (45 bar). Притисак од 45 bar је усвојен као оптималан и примењен у свим наредним испитивањима.

#### 4.3.2.4. Утицај температуре

Температура показује значајан утицај на ефикасност екстракције независно од примењене технике, што је последица њеног утицаја на интеракцију аналит-узорак, кинетику десорпције, растворљивост растварача, површински напон, вискозитет растварача, као и на пренос масе (Шварц-Гајић, 2012). Пораст температуре помаже да се превазиђу кохезивне (молекул-молекул) и адхезивне (аналит-узорак) интеракције смањењем вредности активационе енергије неопходне за процес десорпције (Mustafa и Turner, 2011). Утицај температуре на површински напон и вискозитет одражавају се на ефикасност пуњења пора чврстог узорка и на међусобни контакт растварача и матрикса узорка.

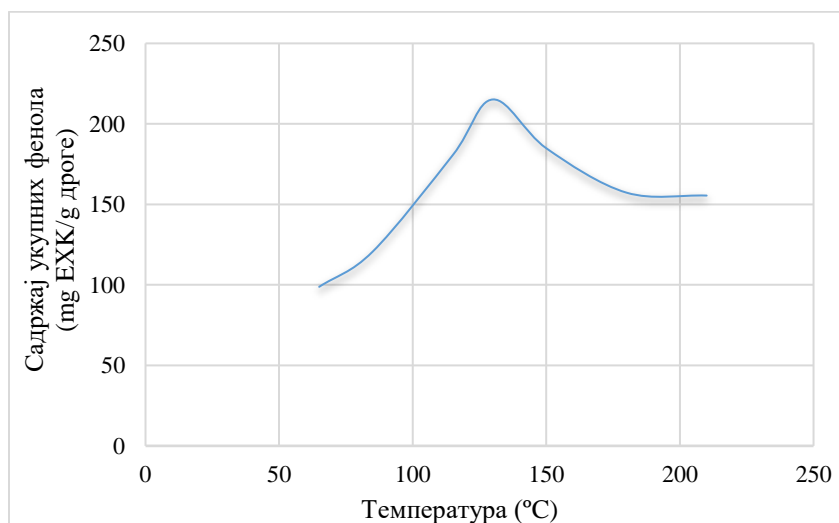
Код екстракције субкритичном водом температура је кључни параметар који одређује ефикасност процеса, а такође и његову селективност. Варирањем температуре долази до промене вредности диелектричне константе воде. На собној температури вода је изузетно поларан растварач чија диелектрична константа има вредност близу 80. Вредност диелектричне константе воде опада до 27 њеним загревањем на 250°C и под притиском довољно високим да воду одржи у течном стању. Последица примене оваквих услова јесте да поларност воде постаје једнака поларности органских растварача. Ово имплицира да се поларне супстанце које су растворне у води на собној температури ефикасно екстрахују на нижој температури, док се умерено поларне, па чак и неполарне супстанце екстрахују компримованом загрејаном водом (Smith, 2006). Висока температура води ка раскидању водоничних веза међу молекулима воде што узрокује ефикасну екстракцију хидрофобних молекула. Са друге стране, екстракција на превисокој температури може довести до деградације термолабилних једињења. Стога, веома је важно дефинисати оптималну температуру за изоловање жељене компоненте из испитиваног узорка.

Испитиване вредности температура биле су у опсегу од 65 до 210°C. Екстракти добијени на различитим температурама били су различито обојени. Њихова боја се мењала од светло жуте до тамно браон (слика 46). Најтамнија нијанса добијена је на температури од 130°C. Даљи пораст температуре водио је ка светлијим екстрактима, што је указало на деградационе процесе.



Слика 46. Боја екстраката у зависности од температуре екстракције.

График на слици 47 показује зависност садржаја укупних фенола од примењене температуре. Значајан утицај је примећен у температурном интервалу 65-130°C. Пораст температуре од 65 до 130°C је водио порасту садржаја укупних фенолних компоненти, што је било у корелацији са променом боје екстраката. На 130°C добијени екстракти су били најтамнији, а принос фенолних компоненти је био максималан. На температурама изнад 130°C долазило је до смањења садржаја укупних фенола у екстрактима.



Слика 47. Утицај температуре екстракције на садржај укупних фенола.

Утицај температуре је био исти и у случају приноса укупних флавоноида. Резултати су дати у табели 19. Са порастом температуре у порасту је био и принос флавоноида и апигенина до одређене тачке, након чега је даљи пораст температуре био праћен падом приноса. Док је максимални принос у случају садржаја укупних фенола био достигнут на температури од 130°C, у случају укупних флавоноида и апигенина максимум се уочавао

при вредности температуре од 115°C. На овој температури садржај укупних флавоноида је износио 36,96 mg EP/g, док је садржај апигенина био 10,90 mg/g.

Табела 19. Утицај температуре екстракције на принос укупних фенола, флавоноида и апигенина.

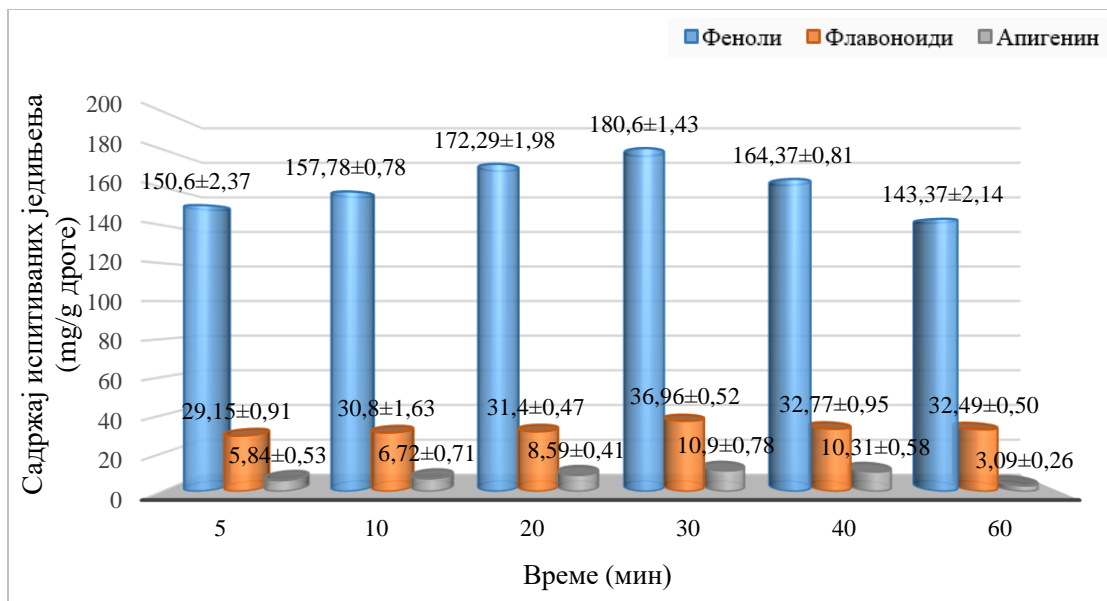
Температура (°C)	Садржај укупних фенола (mg ЕХК/g*)	Садржај укупних флавоноида (mg EP/g*)	Садржај апигенина (mg/g*)
<b>65</b>	98,78±1,09**	14,72±0,4	3,33±0,32
<b>85</b>	120,60±1,76	20,96±0,09	3,18±0,23
<b>115</b>	180,60±1,58	36,96±0,77	10,90±0,62
<b>130</b>	215,15±0,84	36,66±0,45	8,03±0,15
<b>150</b>	184,84±4,83	34,48±0,33	5,60±0,31
<b>180</b>	157,27±5,88	34,36±0,26	3,48±0,40
<b>210</b>	155,45±2,43	33,93±0,87	3,03±0,06

\*дрогe \*\*±2СД

#### 4.3.2.5. Утицај времена екстракције

Трајање екстракције је још један од фактора који мора бити пажљиво испитан. При дужим временима екстракције повећава се ризик од деградације анализата. Такође, скраћење процеса екстракције има низ практичних предности, међу којима је и економски аспект.

Експерименти су извођени у трајању од 5 до 60 минута. Хистограм приказан на слици 48 илуструје утицај времена екстракције на принос укупних фенола, укупних флавоноида и апигенина.



Слика 48. Утицај времена екстракције на садржај испитиваних компоненти.

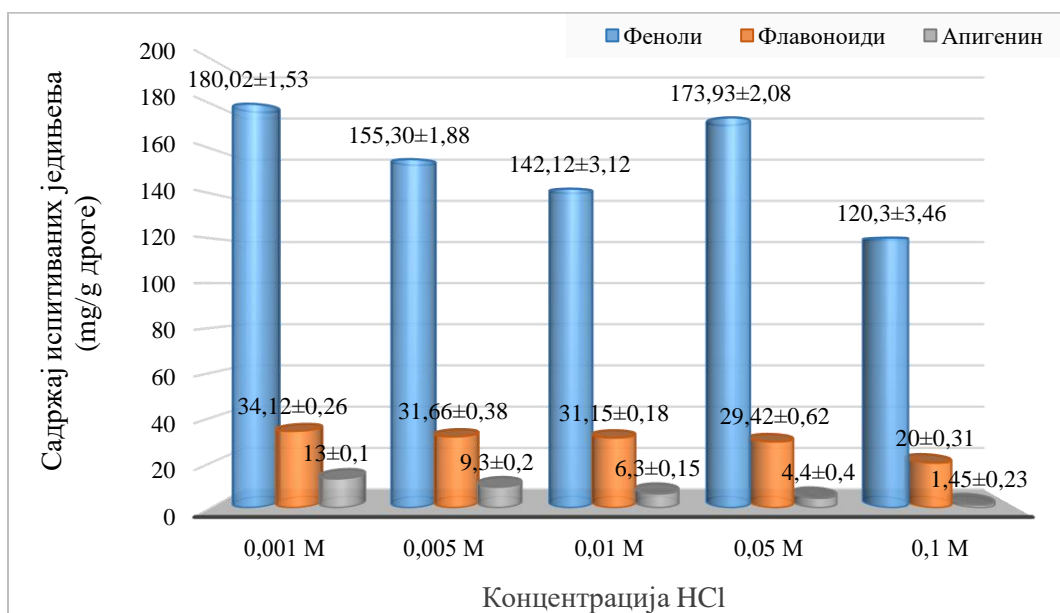
Екстракциони приноси све три посматране излазне величине су били у порасту током првих 30 минута процеса, након чега је долазило до пада сва три одзива у добијеним екстрактима. Ово указује на могућу деградацију биоактивних компоненти. Највећи принос укупних фенола је остварен након 30 минута (180,60 mg ЕХК/g). Садржаји укупних флавоноида и апигенина су при поменутом времену екстракције били 36,96 mg EP/g и 10,90 mg/g. У случају укупних фенолних компоненти најмањи принос остварен је након 60 минута (143,37 mg ЕХК/g). Такође, минимални принос апигенина (3,09 mg/g) забележен је у случају најдужег времена трајања процеса (60 мин). За разлику од садржаја апигенина и укупних фенола, садржај укупних флавоноидних компоненти се није значајно мењао трајањем процеса. Од 5 до 60 минута садржај ових једињења у екстрактима је био у границама од 29,15 до 38,89 mg EP/g. Максимални принос је забележен при трајању екстракције од 30 минута.

На основу добијених резултата, трајање екстракције од 30 минута је усвојено као оптимално.



## 4.3.2.6. Утицај модификатора (косолвента)

Утицај модификатора на садржај апигенина је праћен додатком пет различитих концентрација хлороводоничне киселине (0,001; 0,005; 0,01; 0,05 и 0,1 М). Улога модификатора је да помогне ослобађање слободног апигенина из његових везаних облика. Поред апигенина, одређен је и садржај укупних фенолних и флавоноидних компонената. Добијени резултати су приказани на слици 49.



Слика 49. Утицај различитих концентрација модификатора на принос укупних фенола, флавоноида и апигенина.

Као што се са слике 49 може видети повећање концентрације хлороводоничне киселине се негативно одразило на принос посматраних компонената. У случају најниже примењене концентрације модификатора (0,001 М) остварен је највећи принос свих посматраних једињења. При овој концентрацији хлороводоничне киселине садржај укупних фенола је износио 180,02 mg ЕХК/g. Поређењем са приносом фенолних једињења у узорку добијеном при истим условима без модификатора (180,60 mg ЕХК/g) може се приметити да је он приближан. Ово доводи до закључка да у случају ове групе органских једињења употреба модификатора није потребна. Најнижи принос фенолних једињења забележен је у случају коришћења модификатора концентрације 0,1 М (120,3 mg ЕХК/g).

У погледу садржаја укупних флавоноидних компонената садржај је линеарно опадао са порастом концентрације модификатора, од максималних 34,12 до 20 mg EP/g. Одређени садржаји флавоноида су одговарали оним добијеним без употребе модификатора.

За разлику од фенола и флавоноида, у случају апигенина примена концентрације од 0,001 M је водила ка већем приносу. Концентрација апигенина у добијеним екстрактима кретала се од минималних 1,45 mg/g у случају концентрације 0,1 M до максималних 13,00 mg/g у случају концентрације од 0,001 M. Као и у случају фенола и флавоноида, пораст концентрације модификатора је водио ка смањењу концентрације апигенина. Применом најниже концентрације киселине од 0,001 M дошло је до повећања приноса апигенина у екстрактима. При нешто већој концентрацији (0,005 M) количина апигенина у добијеним екстрактима је била мања него у случају без модификатора. Свако даље повећање концентрације модификатора је водило ка смањењу садржаја апигенина у односу на систем без модификатора.

Дефинисане вредности параметара при којима се остварује максимална активност субкритичне воде и конверзије везаних облика апигенина у агликон биле су следеће: однос дрога:растварач 1:30, брзина мешања 3 Hz, притисак 45 bar, температура 115°C, време екстракције 30 мин, присуство хлороводоничне киселине као модификатора у концентрацији од 0,001 M.

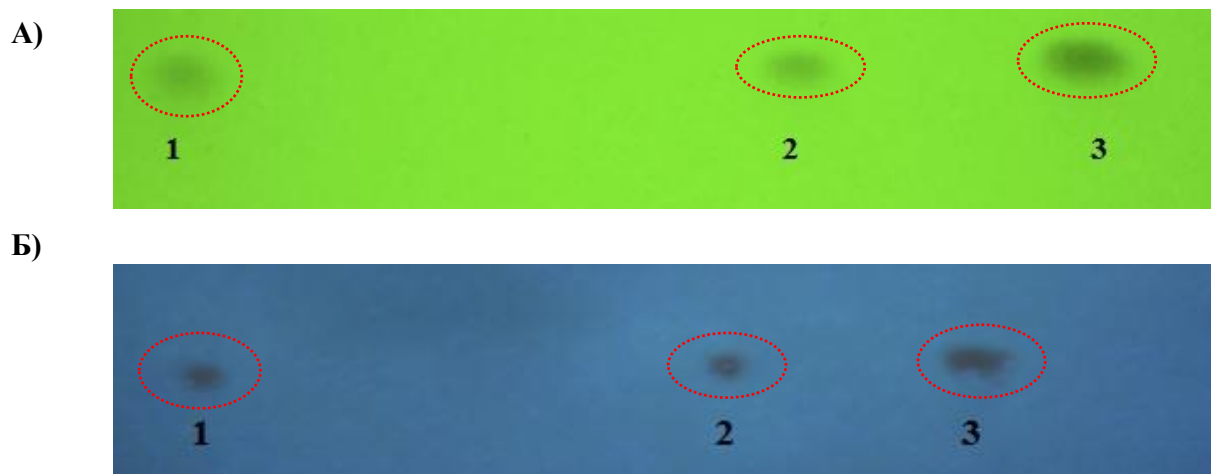
#### **4.4. Изолација и идентификација апигенина**

Иако су последњих деценија развијени различити синтетски биоактивни молекули, природне компоненте, а пре свега из лековитог биља, се одликују низом предности у односу на синтетисане молекуле (Newman и сар., 2000; Butler, 2004). Процес изоловања природних молекула је често компликован услед присуства огромног броја једињења у природним екстрактима, а многи од њих имају веома сличну хемијску структуру или припадају истој класи једињења као и циљна компонента.

Имајући у виду високу фармаколошку активност апигенина, развијен је поступак његовог препаративног изоловања из екстраката добијених под оптимизованим условима. Раздвајање компонената из екстраката је изведено препаративном хроматоматографијом на

колони полиамида. Фракције које су садржавале чист апигенин су биле спојене и супстанца је даље била изолована прекристализацијом из апсолутног етанола.

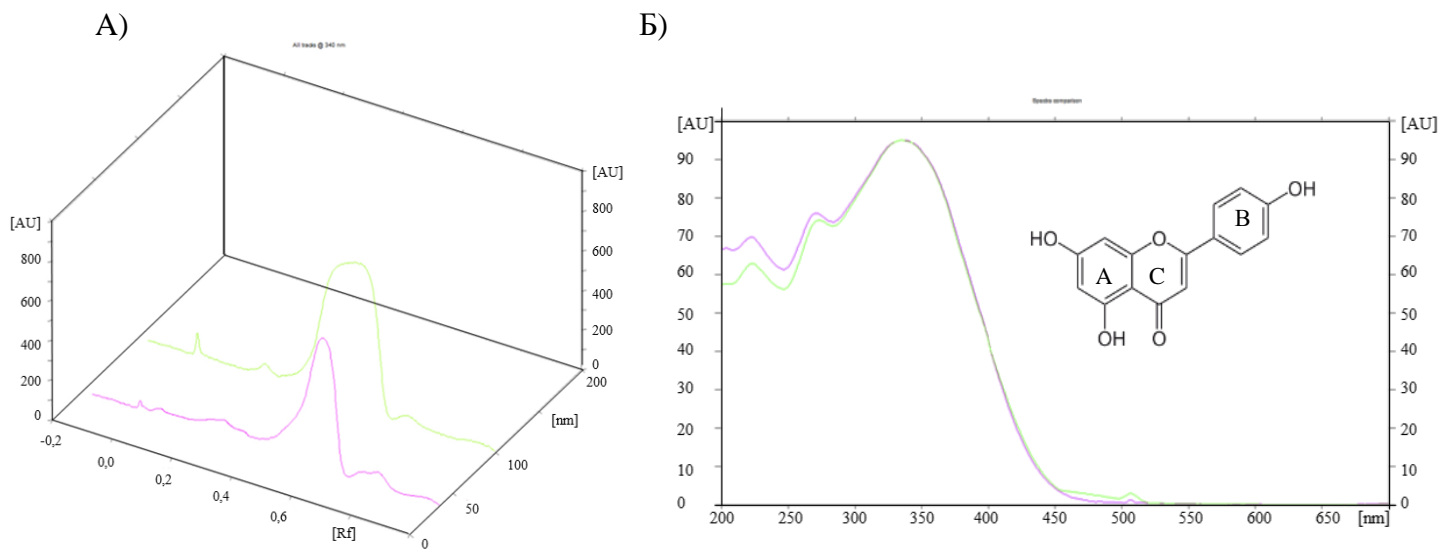
У циљу потврђивања идентитета изолованог једињења, примењена је танкослојна хроматографија. Паралелно са анализом изолованог апигенина, изведена је и анализа референтног стандарда апигенина. TLC хроматограми изолованог апигенина и референтног стандарда приказани су на слици 50.



Слика 50. TLC хроматограм изолованог апигенина (мрља 2 и 3) и његовог стандарда (мрља 1) А) 254 nm и Б) 340 nm.

Додатна структурна карактеризација изолованог апигенина је извршена и применом UV спектроскопије. Узорци изолованог апигенина и стандарда су пре снимања растворени у етанолу након чега су снимљени њихови спектри (слика 51).

На UV спектру се могу јасно запазити два главна максимума који се јављају на 340 nm и на 230 nm. Оба максимума потичу од  $\pi$ - $\pi^*$  НОМО-LUMO (Н-L) прелаза. Први максимум, на 340 nm, потиче од Н $\rightarrow$ L и Н-1 $\rightarrow$ L прелаза, док други максимум (на 230 nm) потиче од Н $\rightarrow$ L+1 и Н-1 $\rightarrow$ L+1 прелаза. Познато је да се код конјугованих хетероцикличних система јављају и слаби максимуми који потичу од n- $\pi^*$  прелаза. И заиста на UV спектру апигенина може се запазити слаб максимум на 270 nm који потиче од Н-2 $\rightarrow$ L прелаза (Amat и сар., 2009; Amat и сар., 2010). Самим тим може се закључити да први максимум (340 nm) највероватније настаје услед апсорпције у систему прстенова В-С (цинамоилни део молекула), док се други максимум (230 nm) повезује са апсорпцијом у А-С систему (1,4-бензопиронски систем).



Слика 51. А) 3D-UV спектар и Б) UV спектар апигенина изолованог из СКВ екстракта и стандарда апигенина.

## 4.5. UHPLC-DAD-HESI-MS/MS анализа

### 4.5.1. Анализа ферментисаних и нативних цветова камилице

Као што је већ напоменуто, процесом ферментације, односно ензимском хидролизом, могуће је повећати количину апигенина у полазном биљном материјалу. У основи, овим се поступком активирају  $\beta$ -глукозидаза и ацетилестераза, природно присутне у камилици, које затим раскидају гликозидне везе у молекулима присутног и насталог апигенин-7-О- $\beta$ -глукозида, повећавајући тиме количину слободног агликона на рачун редукције садржаја везаних облика. У циљу утврђивања успешности процеса биоконверзије извршена је UHPLC-DAD-HESI-MS/MS анализа екстракта добијених екстракцијом ферментисаних (Ф-УЕ) и нативних цветова (Н-УЕ). Компоненте детектоване у добијеним екстрактима дате су у табели 20 (приказ идентификованих једињења је дат азбучним редом).

Табела 20. Идентификована једињења у ултразвучним екстрактима нативних и ферментисаних цветова камилице.

Идентификована компонента	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>	MS/MS
<b>Н-УЕ* екстракт</b>		
Апигенин	269,09	151,17; 133,19; 107,02
Апигенин-7-О-глукозид	431,08	269,14; 151,09; 117,07
Дериват апигенин-7-О-глукозида	473,19	431,08; 269,17
Флавоноидни дериват	293,08	265,25; 205,41
Флавоноидни дериват	265,17	205,31; 151,37
Хлорогенска киселина	353,21	191,34; 179,21
<b>Ф-УЕ** екстракт</b>		
Апигенин	269,05	151,12; 133,14; 107,04
Апигенин-7-О-глукозид	431,07	269,04; 151,01; 117,02
Дериват апигенин-7-О-глукозида	473,14	431,04; 269,01
Флавоноидни дериват	293,51	265,22; 205,27
Флавоноидни дериват	265,11	205,43; 151,51
Хлорогенска киселина	353,23	191,31; 179,29

\*Н-УЕ - Етанолни екстракт добијен ултразвучном екстракцијом нативних цветова;

\*\*Ф-УЕ -Етанолни екстракт добијен ултразвучном екстракцијом ферментисаних цветова.

Апигенин је у анализираним екстрактима идентификован на основу добијених спектралних података. MS фрагментацијом његовог квази-молекулског јона [M-H]<sup>-</sup> на  $m/z$  269 [M-H]<sup>-</sup> настају три јонска фрагмента:  $m/z$  151 [M-H-Glc-C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 133 [M-H-Glc-C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup> и 107 [C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>. Поређењем добијених резултата са литературним подацима, посматрано једињење је идентификовано као апигенин (Fattahi и сар., 2013; Song и сар., 2014). Такође, присуство апигенина у добијеним екстрактима потврђено је и поређењем

спектра посматраног једињења са спектралним подацима референтног стандарда. Апигенин-7-*O*-глукозид даје квази-молекулски јон на  $m/z$  431  $[M-H]^-$  који након фрагментације продукује следеће јонске фрагменте:  $m/z$  269  $[M-H-Glc]^-$ , 151  $[M-H-Glc-C_8H_6O]^-$  и 117  $[M-H-Glc-C_7H_4O_4]^-$  (Song и сар., 2014; Švehlíková и сар., 2004). Присуство апигенин-7-*O*-глукозида у екстрактима камилице такође је потврђено и поређењем са референтним стандардом. У посматраним екстрактима детектовано је присуство и деривата апигенин-7-*O*-глукозида. Дериват апигенин-7-*O*-глукозида је идентификован на основу добијених јонских фрагмента ( $m/z$  431 и 269) и фрагмента  $m/z$  473. Присуство јонског фрагмента  $m/z$  431 указује на то да је квази-молекулски јон апигенин-7-*O*-глукозид, а јонски фрагмент  $m/z$  269 указује на глукозидну јединицу из молекула апигенин-7-*O*-глукозида. У анализираним екстрактима детектовано је и присуство флавоноидних деривата. Присуство деривата флавоноида је утврђено поређењем добијених UV и масених спектра са литературним подацима. Хлорогенска киселина у екстрактима нативних и ферментисаних цветова је идентификована поређењем добијених спектралних података са подацима из литературе (Ye и сар., 2010; Zhang и сар., 2010). Фрагментацијом квази-молекуларног јона  $[M-H]^-$  настају јонски фрагменти  $m/z$  191 и 179. Присуство хлорогенске киселине додатно је потврђено и поређењем добијених спектралних карактеристика посматраног једињења са спектралним карактеристикама референтног стандарда.

У циљу одређивања ефикасности  $\beta$ -глукозидазе која раскида глукозидну везу између агликонског и шећерног дела молекула, чиме се повећава садржај апигенина, урађена је квантификација ова два флавоноидна једињења методом спољашњег стандарда. Оба анализа су показала добру линеарну зависност у испитиваном концентрационом опсегу, што је и потврђено високим коефицијентима корелације (0,9988 у случају апигенина, односно 0,9985 у случају његовог глукозида).

Подаци приказани у табели 21 показују да је садржај апигенина повећан у биљном материјалу након процеса ферментације. Поред апигенина, количина апигенин-7-*O*-глукозида је такође била значајно већа у екстрактима ферментисаних цветова. На основу литературног прегледа камилица може да садржи и до 12 различитих деривата апигенин-7-*O*-глукозида (Švehlíková и сар., 2004). Ово указује на могућност да је током процеса ферментације симултано са конверзијом апигенин-7-*O*-глукозида у апигенин, дошло и до конверзије деривата апигенин-7-*O*-глукозида (моно- и диацетилваних деривата глукозида)

у апигенин-7-глукозид. Тачније, услед активирања горе поменутих ензима, дошло је до трансформисања ацетилованих форми деривата апигенин-7-*O*- $\beta$ -глукозида у апигенин-7-*O*- $\beta$ -глукозид, чиме се његова количина повећала упркос његовом преласку у апигенин. Надаље, раскидањем глукозидних веза у молекулима присутног, али и насталог апигенин-7-*O*- $\beta$ -глукозида, дошло је до повећања количине слободног агликона на рачун редукције садржаја везаних облика. Добијени подаци (табела 21) у вези са њиховим квантитативним саставом јасно показују значајно већи садржај апигенина у ферментисаним него у неферментисаним (нативним) цветовима.

Табела 21. Садржај апигенина и апигенин-7-*O*- $\beta$ -глукозида у екстрактима нативних и ферментисаних цветова камилице.

Компонента	Садржај, mg/mL	
	Екстракти Н-УЕ	Екстракти Ф-УЕ
Апигенин-7- <i>O</i> -глукозид	0,25±0,01 <sup>a</sup> (95,2%) <sup>b</sup>	0,42±0,02 <sup>a</sup> (94,0%) <sup>b</sup>
Апигенин	0,11±0,011 <sup>a</sup> (94,0%) <sup>b</sup>	0,78±0,02 <sup>a</sup> (93,4%) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>±2СД

<sup>b</sup>Резултат recovery теста

#### 4.5.2. Квалитативна анализа екстракта добијених субкритичном водом

Поређење ефикасности различитих метода екстракције (поглавље 4.3.1.) показало је да је садржај полифенолних једињења био знатно већи у екстрактима добијеним субкритичном водом. Ова чињеница је указала на потребу за детаљнијом анализом хемијског састава ових екстраката. Квалитативна анализа изведена је применом UHPLC-DAD-HESI-MS/MS методе, а добијени резултати су дати у табели 22.

Апигенин је у СКВ екстракту идентификован на основу добијених спектралних података. MS фрагментацијом његовог квази-молекулског јона [M-H]<sup>-</sup> долази до образовања јонских фрагмената на *m/z* 153 [M-H-Glc-C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 133 [M-H-Glc-C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup> и 107 [C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (Fattahi и сар., 2013; Song и сар., 2014). Присуство апигенина у посматраном екстракту потврђено је и поређењем са референтним стандардом. У случају апигенин-7-*O*-глукозида, фрагментацијом квази-молекулског јона [M-H]<sup>-</sup> долази до образовања три јонска фрагмента: *m/z* 269 [M-H-Glc]<sup>-</sup>, 151 [M-H-Glc-C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>-</sup> и 117 [M-H-Glc-C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup> (Song и сар., 2014; Švehlíková и сар., 2004). Присуство поменутог једињења потврђено је референтним стандардом. Апигенин-*O*-глукуронид након MS фрагментације

квази-молекулског јона на  $m/z$  445  $[M-H]^-$  образује јонски фрагмент са вредношћу  $m/z$  од 269. Идентификација адхиперфирина је извршена поређењем добијених спектралних карактеристика са подацима из литературе (Tatsis и сар., 2007). Гална киселина која представља дериват хидрокси-бензојеве киселине, након фрагментације свог квази-молекулског јона даје јонски фрагмент на  $m/z$  125, што указује на губитак  $CO_2$ . Губитак  $CO_2$  групе је уобичајен током фрагментације фенолних киселина (Kečkeš и сар., 2013). У екстрактима је детектовано и присуство ферулне киселине, која даје квази-молекулски јон на  $m/z$  355  $[M-H]^-$ . Фрагментацијом њеног квази-молекулског јона долази до образовања два јонска фрагмента са  $m/z$  вредностима од 193 и 179. Идентификација ферулне киселине је извршена поређењем добијених спектралних карактеристика са подацима из литературе. Димер проантоцијанидина даје квази-молекулски јон на  $m/z$  577  $[M-H]^-$  који након фрагментације продукује три јонска фрагмента. Фрагментни јон на  $m/z$  425 настаје губитком фрагмента масе  $m/z$  152 (карактеристични фрагментациони пут током ретро-Diels-Alder-ове реакције) (de Pascual-Teresa и Rivas-Gonzalo, 2003), и указује на присуство димера проантоцијанидинског типа (епи)катехин-(епи)катехин (Kajdžanoska и сар., 2010). Дикафеоил-хининска киселина даје масени фрагмент на  $m/z$  515. Фрагментни јон на  $m/z$  191 је указао на губитак кафеоил групе (Keškeš и сар., 2013). Идентификација катехина и његовог изомера епикатехина је извршена поређењем њихових масених спектра са спектрима из литературе (Simirgiotis, 2013). Након MS фрагментације њихових квази-молекулских јона  $[M-H]^-$  детектовано је присуство три јонска фрагмента:  $m/z$  245, 205 и 179 (Stoggl и сар., 2004). Присуство кафеоил-хексозид-метилглутарата је потврђено на основу добијених спектралних података (табела 22) са подацима из литературе. Након фрагментације квази-молекулског јона на  $m/z$  469  $[M-H]^-$  уочена је појава два фрагментна јона на  $m/z$  307 и 179, који потврђују присуство кафеоил-хексозид-метилглутарата. Кверцетин-3-*O*-глукозид након MS фрагментације квази-молекулског јона на  $m/z$  463  $[M-H]^-$  образује јонски фрагмент са вредношћу  $m/z$  од 301. Присуство 3-*p*-кумарил-хининске киселине у субкритичном воденом екстракту камилице је потврђено на основу литературних података и добијених спектралних података. Квази молекулски јон 3-*p*-кумарил-хининске киселине је продуковао јонски фрагмент на  $m/z$  163. Такође, на основу MS спектра потврђено је и присуство *p*-кумароил-хексозид-метилглутарата. Присуство флавона лутеолина, као и његовог глукозида (лутеолин-7-*O*-глукозид) је такође



установљено у испитиваном узорку. Основни јон лутеолин-7-*O*-глукозида је давао сигнал на  $m/z$  447  $[M-H]^-$ , док су се његови фрагментни јони јављали на  $m/z$  285  $[M-H-162]^-$  и 243  $[M-H-42-162]^-$  као последица губитка хексозил и ацетил-хексозид група (Guimarães и сар., 2013а,б). Идентитет пинобанксин-3-*O*-бутирату је утврђен на основу поређења спектралних података са спектралним подацима из литературе (Keškeš и сар., 2013). Једињење чији је квази-молекулски јон  $[M-H]^-$  након фрагментације продуковао фрагментни јон на  $m/z$  503 потиче од присуства малонил-деоксихексозе или пак сукцинил-пентозе. Ови резултати спектралне анализе указују на присуство пеларгонидин-3-сукциниларабинозида или пеларгонидин-3-малонилрамнозида (Kajžanoska и сар., 2010).

Табела 22. Идентификована једињења у СКВ екстракту камилице.

Једињење	$m/z$ $[M-H]^-$	MS/MS
Апигенин	269	153,133,107
Апигенин-7- <i>O</i> -глукозид	431	269, 151, 117
Апигенин- <i>O</i> -глукуронид	445	269
Адхиперфирин	481	412
Гална киселина	169	125
Глукозид ферулне киселине	355	193, 179
Дикафеоил-хининска киселина	515	191
Димер проантоцијанидина	577	425, 407, 289
Епикатехин	289	245, 205, 179
Катехин	289	245, 205, 179
Кафеоил-хексозид-метилглутарат	469	307, 179
Кверцетин-3- глукозид	463	301
3- <i>p</i> -Кумароил-хининска киселина	338	163
<i>p</i> -Кумароил-хексозидметилглутарат	453	291, 163
Лутеолин	285	213, 151
Лутеолин-7- <i>O</i> -глукозид	447	285, 243
Пинобанксин-3- <i>O</i> -бутират	341	271, 253
Пеларгонидин-сукциниларабинозид или пеларгонидин-малонилрамнозид	503	271
Фенилетил естар кафене киселине	283	179,135
5- <i>O</i> -Феруолоил-хининска киселина	367	193, 173
Хиперфирин	467	398
Хлорогенска киселина	353	191, 179

UHPLC-DAD-HESI-MS/MS анализа је потврдила присуство великог броја фенолних једињења у анализираном екстракту. Имајући у виду велики значај сваког од појединачних

фенола, као и њихов синергетски ефекат, добијени екстракт се може окарактерисати високим биолошким потенцијалом.

#### 4.5.3.1. Утицај притиска на хемијски профил СКВ екстраката

Испитан је утицај притиска на садржај појединачних полифенолних компонената у СКВ екстрактима добијеним на различитим оперативним притисцима. Добијени резултати приказани су у табели 23, док су хроматограми дати у прилогу 4.

На основу добијених резултата јасно се види да је при промени притиска екстракције са 10 bar на 30 bar садржај полифенола нагло порастао. За сваки полифенол присутан у екстрактима примећена је промена садржаја при поменутој промени притиска. Примера ради, садржај лутеолин-7-*O*-глукозида у екстракту добијеном при притиску од 10 bar износио је 15,62 mg/kg. При повећању притиска на 30 bar његов садржај је порастао остварујући принос од чак 1.075,59 mg/kg. За највећи број једињења вредности притисака од 30 bar и 45 bar су се показале најоптималнијим за процес екстракције.

Иако се при притисаку од 10 bar остварио најмањи принос укупних полифенола, једино је на овој вредности притиска присутан рутин у добијеном екстракту. Даљим порастом притиска поменуто једињење није детектовано. Код осталих гликозида (кверцетин-3-*O*-галактозид, лутеолин-7-*O*-глукозид, апигенин-7-*O*-апиоглукозид, нарингин, апигенин-7-*O*-глукозид) примећени су знатно већи приноси на притиску од 30 bar него 45 bar, као и аескулина, који по својој структури припада групи кумаринских гликозида. Са друге стране, највећи принос њихових слободних облика (лутеолина, апигенина, нарингенина и кемферола) је био при притиску од 45 bar. Максимални принос хризина је остварен приликом екстракције камилице при притиску од 30 bar. Галангин је детектован једино на овој вредности притиска, а катехин само при примени притиска од 60 bar. Максимална концентрација апигенина је остварена на притиску од 45 bar и износила је 1.344,99 mg/kg, што је у корелацији са резултатима оптимизације процеса екстракције.

Поменуте вредности притиска (30 и 45 bar) су се показале оптималним и када је реч о екстракцији фенолних киселина. Изузетак је цинаминска киселина која се јављала тек на 90 bar.

Табела 23. Утицај притиска на принос полифенола.

Једињење	Принос (mg/kg*)				
	10 bar	30 bar	45 bar	60 bar	90 bar
Протокатехуинска киселина	-	33,91	38,30	11,48	-
Аескулин	4,74	304,72	149,93	69,20	89,07
<i>p</i> -Хидроксibenзоева киселина	27,79	312,87	461,02	322,05	230,54
Катехин	-	-	-	10,21	-
5- <i>O</i> -Кафеоилхининска киселина	1,18	175,39	28,82	22,27	21,22
Рутин	0,23	-	-	-	-
<i>p</i> -Кумарна киселина	0,93	76,18	30,10	12,82	17,44
Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид	0,25	22,30	8,13	2,89	3,93
Лутеолин-7- <i>O</i> -глукозид	15,62	1075,59	551,40	187,37	262,08
Елагинска киселина	0,91	24,21	19,00	12,16	11,59
Апигенин-7- <i>O</i> -апиоглукозид	0,26	8,15	5,49	2,64	3,00
Нарингин	-	3,42	-	-	-
Синапинска киселина	2,59	38,32	70,12	31,35	15,15
Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	-	-	-	-	-
Апигенин-7- <i>O</i> -глукозид	4,35	139,22	106,98	40,55	40,67
Конифералдехид	-	-	1,41	-	-
Лутеолин	3,81	63,33	86,86	47,67	38,20
Цинаминска киселина	-	-	-	-	1,36
Апигенин	61,53	903,76	1344,99	684,82	541,39
Нарингенин	0,34	5,87	8,10	3,85	3,04
Кемферол	2,26	35,92	54,43	25,98	21,43
Хризин	0,08	1,99	0,85	-	-
Галангин	-	3,86	-	-	-

\* mg једињења по kg сувог екстракта

Иако је детектовано присуство великог броја једињења полифенолне структуре, примећено је одуство кафене, ванилинске, сирингинске и ферулне киселине. Такође, аескулетин, резвератрол, кверцетин и флоретин нису детектовани ни у једном од добијених екстраката.

#### 4.5.3.2. Утицај температуре на хемијски састав СКВ екстраката

Резултати приноса појединачних полифенолних једињења у екстрактима камилице добијених екстракцијом субкритичном водом при различитим температурама приказани су у табелама 24 и 25, док су хроматограми дати у прилогу 5. У екстрактима камилице укупно је детектовано 26 различитих полифенолних једињења. Експерименти су извођени у

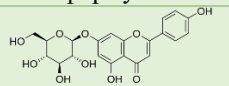
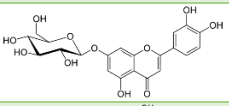
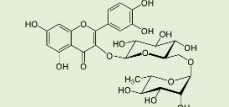
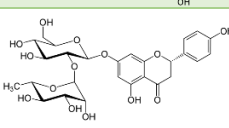
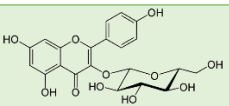
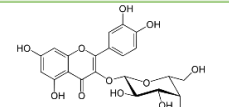
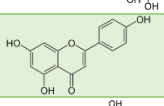
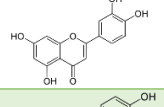
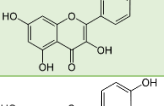
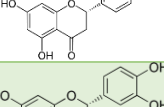
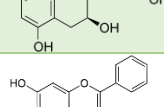
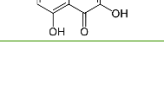
температурном опсегу од 65 до 210°C, а добијени резултати указују на веома значајан утицај температуре на принос, односно растворљивост ових једињења у субкритичној води. Принос појединачних компонената зависи од њихове структуре, те су се тако значајне разлике уочавале између различитих класа фенолних једињења.

Када су у питању флавоноиди и њихови гликозиди (табела 24), добијени резултати указују на то да се максимални приноси гликозида остварују на нижим температурама него приноси агликона. Ово је у тесној вези са чињеницом да шећерне компоненте у молекулима гликозида повећавају поларност молекула. Из тог разлога се гликозиди боље екстрахују на нижој температури у растварачу веће поларности захтевјући ниже температуре субкритичне воде. Тако на пример, највећи принос глукозида апигенина, лутеолина и нарингенина је постигнут на температури од 85°C. На температури изнад 85°C примећен је пад концентрације апигенин-7-*O*-глукозида и лутеолин-7-*O*-глукозида услед процеса хидролизе и хемијске трансформације у субкритичном воденом медијуму. Поларност субкритичне воде загрејане на 115°C се показала оптималном када је реч о екстракцији агликона апигенина и лутеолина, али и кемферола и нарингенина. Висок принос агликонских форми остварује се и на 130°C, док даљи пораст температуре условљава пад њиховог приноса указивајући на процес деградације, односно трансформације. Иако се очекује да хидролиза гликозида резултира у приближно једнаком збиру агликона и њихових гликозида, претпоставља се да се услед високог хидролитичког потенцијала субкритичне воде дешава и симунтална хидролиза деривата гликозидних молекула. Свакако, поред процеса хидролизе у субкритичном воденом медијуму долази и до одвијања других хемијских трансформација.

Кверцетин је у испитиваним узорцима био детектован само у својим везаним облицима (кверцетин-3-*O*-галактозид и кверцетин-3-*O*-рутинозид). Максимални принос поменутих везаних облика кверцетина је остварен на температури од 115°C, где је примећен и максимални принос глукозида кемферола. Ова једињења припадају истој класи флавоноида, групи флавонол-3-*O*-глукозида.

Катехин, који припада флаванолима (флаван-3-ол), у својој структури на положају 4 у С-прстену нема кето-групу. Ова структурна разлика у односу на поменуте флавоноле, флавоне и флаваноне одражава се и на растворљивост катехина у субкритичној води, који је детектован само у екстракту добијеном на температури од 130°C.

Табела 24. Утицај температуре СКВ на принос агликона и њихових гликозида.

Садржај флавоноида (mg/kg*)									
Класа	Једињење	Структурна формула	Температура						
			65°C	85°C	115°C	130°C	150°C	180°C	210°C
Гликозиди	Апигенин-7- <i>O</i> -глукозид		47,55	158,33	69,9	53,45	2,58	0,09	-
	Лутеолин-7- <i>O</i> -глукозид		351,28	1101,07	278,37	166,32	-	-	-
	Рутин (кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид)		-	-	5,35	2,15	-	-	-
	Нарингин (нарингенин-7- <i>O</i> -гликозид)		1,44	4,08	2,32	-	-	-	-
	Каемпферол-3- <i>O</i> -глукозуид		-	-	24,53	-	-	-	-
	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид		-	-	4,69	3,01	-	-	-
Агликон	Апигенин		230,98	739,98	1501,25	1296,82	634,14	283,43	298,45
	Лутеолин		24,28	55,15	97,19	83,2	36,34	20,67	27
	Кемферол		10,51	29,21	60,37	58,74	27,09	14,49	19,81
	Нарингенин		1,62	4,63	7,87	6,64	3,37	1,55	1,52
	Катехин		-	-	-	46,05	-	-	-
	Галангин		-	-	-	-	-	-	2,22

\* kg сувог екстракта

Утицај хидроксилних група у бензеновом прстену на растворљивост молекула у субкритичној води јасно се види на примеру галангина. Галангин припада класи флавонола који у В-прстену не садржи хидроксилне супституенте. Због веће хидрофобности овог молекула у односу на друге агликоне галангин је екстрахован само на температури од 210°C.

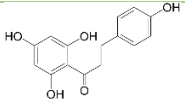
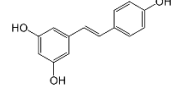
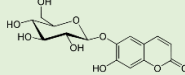
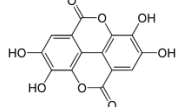
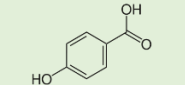
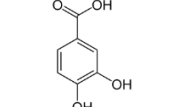
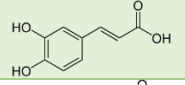
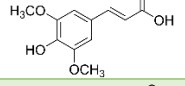
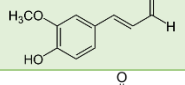
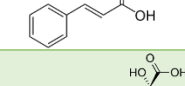
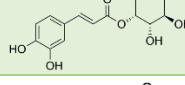
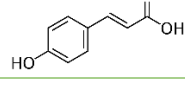
Поред флавоноидних компонената у екстрактима камилице добијених субкритичном водом, детектовано је присуство и других група фенолних компонената попут фенолних киселина, кумарина, стилбена и др. У зависности од групе фенолних једињења којој припадају различити молекули су се другачије понашали, што је повезано са њиховом структуром, присуством двоструких веза, као и супституената у њиховом молекулу (табела 25).

Флоретин, који припада класи дихидрохалкона се јављао тек на температури од 210°C. Евидентно је да конјугација бензеновог прстена са кето-групом утиче на стабилност и поларност молекула, а самим тим и на његову растворљивост. Резвератрол, класа стилбена, такође поседује у својој структури високо конјуговани систем двоструких веза што се одражава на његову растворљивост у субкритичној води. Он се јављао у екстрактима добијеним на температурама од 180°C и 210°C, док се максимални принос постизао на 210°C. Принос аескулина је био већи на нижим температурама, иако је он по својој структури кумарински гликозид и садржи конјуговани систем двоструких веза (2*H*-хромен-2-он). Као и у случају флавоноидних гликозида, и овде је био очигледан утицај глукозе на растворљивост овог молекула у субкритичној води, те се максимални принос јављао на 85°C (на вишим вредностима диелектричне константе).

Велики утицај температуре био је очигледан у случају фенолних киселина (табела 25). Елагинска киселина у својој структури садржи два кондензована бензопирана са кето- и хидрокси-групама. Захваљујући оријентацији ових група ка спољашности молекула она је способна да гради водоничне везе, што указује на то да би ово једињење требало да се боље раствара у субкритичној води на нижим температурама, односно при вишим диелектричним константама. И заиста, добијени подаци показују да се максималан принос овог једињења остварио на температури од 85°C.

Поредећи утицај температуре на принос 4-хидроксибензојеве (*p*-хидроксибензојеве) киселине и протокатехуинске киселине (3,4-хидроксибензојеве киселине) (табела 25) може се запазити да се максимални принос првог једињења остварио на вишој температури у односу на друго (150 и 85°C). Разлику у структури ова два молекула чини једна хидроксилна група у *мета*-положају. Та хидроксилна група јесте узрок постизања максималног приноса на нижој температури за протокатехуинску киселину, односно одговорна је за бољу растворљивост у субкритичној води веће диелектричне константе.

Табела 25. Утицај температуре СКВ на принос полифенолних компонената.

Класа	Једињење	Структурна формула	Садржај (mg/kg)						
			Температура (°C)						
			65	85	115	130	150	180	210
Дихидрохалкон	Флоретин		-	-	-	-	-	-	1,26
Стилбени	Резвератрол		-	-	-	-	-	15,9	30,36
Кумарински гликозид	Аескулин		212,21	326,19	85,14	56,91	4,84	-	8,17
Фенолне киселине	Елагинска киселина		14,09	30,24	18,45	20,83	22,67	15,4	16,98
	<i>p</i> -Хидроксibenзоева киселина		-	258,88	496,83	535,45	557,63	208,31	184,02
	Протокатехуинска киселина		2,44	34,36	-	-	-	8,63	-
	Кафена киселина		-	134,15	-	-	-	-	-
	Синапинска киселина		14,24	39,23	69,07	55,48	119,71	112,55	149,74
	Конифералдехид		0,51	-	2,3	-	-	-	7,62
	Цинаминска киселина		1,7	-	-	-	-	4,55	6,8
	5- <i>O</i> -Кафеоилхининска киселина		147,95	187,59	24,33	18,1	6,56	-	8,35
	<i>p</i> -Кумарна киселина		55,36	79,33	13,6	9,7	8,42	7,51	10,24

Кафена киселина, 5-*O*-кафеоилхининска киселина, *p*-кумарна киселина, синапинска киселина, конифералдехид и цинаминска киселина имају исту структурну основу коју чини 3-фенил-2-пропенска киселина (цинаминска киселина). Сва наведена једињења имају супституенте на бененовом прстену и/или различите функционалне групе (карбоксилну или алдехидну). Самим тим, растворљивост наведених једињења ће, у складу са претходним разматрањима, зависити од положаја, типа и броја супституената у молекулима.

Цинаминска киселина (3-фенил-2-пропенска киселина) би, према својој структури која садржи систем конјугованих двоструких веза који обухвата бензенов прстен, угљоводонични низ и карбоксилну групу, требала да буде најбоље растворна при вишим температурама. Резултати приказани у табели 25 то и потврђују, где се јасно види да се највећи принос цинаминске киселине остварио на 210°C. Са друге стране, максимални принос кафеинске, 5-*O*-кафеоилхининске и *p*-кумарне киселине је остварен на 85°C. Кафена киселина садржи две хидроксилне групе у *мета*- и *пара*-положају у бензеновом прстену, док 5-*O*-кафеоилхининска киселина представља естар кафеине киселине и хининске киселине. Из приказаних резултата проистиче да су кафена и *p*-кумарна киселина показале максималну растворљивост на истој температури. Ово се може приписати већем утицају конјугованог система двоструких веза него хидроксилних група присутних у молекулима, па стога оба једињења задржавају максималну растворљивост на истој температури. Ово такође важи и за 5-*O*-кафеоилхининску киселину. Међутим, максимални принос конифералдехида и синапинске киселине је постигнут на вишој температури, односно на 210°C. У односу на кафену и *p*-кумарну киселину које имају слободне хидроксилне групе, конифералдехид и синапинска киселина имају етарске (метокси) групе везане за бензеново језгро у молекулу, што утиче на њихову растворљивост у субкритичној води. Заменом поларних хидроксилних група етарским групама повећава се растворљивост ових једињења у субкритичној води мање диелектричне константе (више температуре) на шта указују добијени резултати (табела 25).

Утицај температуре на изоловане полифенолне компоненте био је у складу са литературним подацима. Наиме, претходним испитивањем утицаја температуре на растворљивост природних једињења у субкритичној води дошло се до закључка да се мање поларна једињења, односно једињења која не могу да граде водоничне везе, као и једињења која у својој структури имају двоструке везе, растварају на вишим температурама. Такође, утврђено је да постојање система конјугованих двоструких веза утиче на растворљивост једињења у субкритичној води. Поред овога, показало се да поларне групе (хидроксилна, карбоксилна, итд.), као и гликозидне везе, повећавају растворљивост ових једињења на нижим температурама. Са друге стране, замена ових група са етарским или са водониковима атомима помера максималну растворљивост ових једињења ка вишим температурама.



#### 4.5.3.3. Утицај модификатора на хемијски састав СКВ екстраката

Како би се утврдио утицај модификатора (косолвента) на хемијски састав екстраката добијених применом субкритичне воде, екстракције су извођене уз додатак пет различитих концентрација модификатора - HCl (0,001; 0,005; 0,01; 0,05 и 0,1 M). На основу добијених резултата, може се закључити да се највећи принос укупних полифенолних једињења остварио при коришћењу модификатора концентрација 0,001 M и 0,05 M. Већина посматраних полифенола своју максималну концентрацију је достигла у случају додавања косолвента концентрације 0,05 M. Садржај идентификованих компоненти при оптималној концентрацији модификатора дат је у табели 26. Хроматограми добијени на таласној дужини 280 nm приказани су у прилогу 6.

Када је у питању апигенин, његов максимални садржај је одређен у екстракту добијеном са најмањом концентрацијом хлороводоничне киселине (1.700,34 mg/kg). Даљим порастом концентрације киселине долазило је до пада његове концентрације у екстрактима. Овакав тренд је пратио и лутеолин и кемферол. Пад у садржајима поменутих агликона указује на могућност ступања у хемијске реакције и/или разлагања у киселој средини.

У екстрактима добијеним уз додатак модификатора у концентрацији од 0,05 M детектован је кверцетин, који у претходно испитиваним екстрактима (добијеним без присуства модификатора) није детектован. Овакво понашање последица је чињенице да додатак модификатора није имао утицај само на хидролизу агликона, него се мењала и поларност растварача и модификовао матрикс узорка.

Табела 26. Утицај модификатора (НСI) на принос детектованих полифенола у СКВ екстрактима.

Једињење	Принос (mg/kg <sup>*</sup> )	
	Садржај без модификатора	Садржај са оптималном концентрацијом модификатора
Протокатехуинска киселина	34,36	359,41 (0,05M)**
Аескулин	85,14	147,10 (0,001M)
<i>p</i> -Хидроксибензоева киселина	496,83	599,10 (0,05M)
5- <i>O</i> -Кафеоилхининска киселина	24,33	171,22 (0,05M)
Кафена киселина	-	68,20 (0,05M)
Ванилинска киселина	-	316,92 (0,05M)
Сирингинска киселина	69,07	4,19 (0,1M)
Рутин	5,35	8,03 (0,001M)
<i>p</i> -Кумарна киселина	13,60	46,40 (0,05M)
Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид	4,69	7,87 (0,001M)
Лутеолин-7- <i>O</i> -глукозид	278,37	522,45 (0,001M)
Елагинска киселина	18,45	30,12 (0,1M)
Апигенин-7- <i>O</i> -апиоглукозид	-	8,40 (0,1M)
Ферулна киселина	-	40,65 (0,1M)
Нарингин	2,32	2,68 (0,001M)
Синапинска киселина	69,07	162,10 (0,1M)
Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	24,53	-
Апигенин-7- <i>O</i> -глукозид	69,90	106,72 (0,001M)
Конифералдехид	2,3	14,61 (0,05M)
Аескулетин	-	11,46 (0,05M)
Лутеолин	97,19	113,97 (0,001M)
Кверцетин	-	22,00 (0,05M)
Цинаминска киселина	-	2,52 (0,1M)
Флоретин	-	3,45 (0,05M)
Апигенин	1501,25	1.700,34 (0,001M)
Нарингенин	7,87	11,99 (0,05M)
Каемпферол	60,37	90,58 (0,001M)

\* kg сувог екстракта

\*\* оптимална концентрација модификатора

Промена поларности воде са додатком модификатора је била очигледна и у случају екстракције гликозида. Принос гликозида у екстрактима добијеним уз присуство модификатора најмање концентрације (0,001 M) је био већи него у екстрактима без модификатора. Наиме, приноси апигенин-7-*O*-глукозида, лутеолин-7-*O*-глукозида,

кверцетин-3-*O*-галактозида, као и рутина и нарингина у екстрактима добијеним без присуства модификатора су износили 69,9, 278,37, 4,69, 5,35 и 2,32 mg/kg, док су у екстрактима добијеним уз присуство 0,001 М HCl њихови приноси били повећани и износили су 106,72, 522,45, 7,87, 8,03 и 2,68 mg/kg. Употреба модификатора већих концентрација водила је, услед хидролизе, ка линеарном смањивању њихових приноса, тако да при додатку 0,1 М HCl није детектовано присуство ни једног глукозида. Такође, примећено је и да се 3-*O*-глукозидна веза лакше хидролизује у односу на 7-*O*-глукозидну везу, са изузетком нарингина. Ову разлику условљава структурна разлика нарингина и осталих агликона, односно одсуство двоструке везе у C-прстену.

Аескулин, који структурно припада групи кумаринских гликозида, прати тренд гликозида флавоноида. Наиме, при додатку 0,001 М HCl услед промене поларности растварача и модификације самог матрикса узорка, бележи се његов већи принос (147,10 mg/kg) него у случају екстракта без модификатора (85,14 mg/kg). Даљим порастом концентрације хлороводоничне киселине долази до хидролизе глукозидне везе, односно повећањем концентрације киселине концентрација аескулина опада. Аескулетин, као и кверцетин, није детектован при промени притиска и температуре што са резултатима хидролизе указује на то да је потребан већи хидролитички потенцијал за његово ослобађање. Слична ситуација се показала и у случају флоретина. Он је детектован на 210°C. У случају хидролизе киселином, јавља се при додатку 0,05 М HCl у нешто већем садржају него при екстракцији субкритичном водом на 210°C (3,45 mg/kg и 1,26 mg/kg).

Када је реч о фенолним киселинама максимални принос је остварен при додатку модификатора у концентрацији од 0,05 и 0,1 М. Највећи учинак модификатора огледао се у случају ванилинске, сиригинске и ферулне киселине. Ове киселине се водом без модификатора нису могле екстраховати при испитиваним притисцима и температурама. Додатаком киселине, и то само у максималној концентрацији од 0,1 М, долази до њихове екстракције. Ово указује на изузетно чврсте везе између поменутих једињења и матрикса узорка. Максимални принос цинаминске киселине је био остварен приликом екстракције на 210°C, док приликом екстракције на 115°C њено присуство није забележено. Процес екстракције уз модификатор одвијао се на 115°C, а она је детектована само уз коришћење 0,1 М HCl. Поред поменутих фенолних киселина, максимални принос синапинске и елагинске киселине је такође био остварен при максималној концентрацији модификатора.

У случају поменутих киселина садржај је био већи у односу на њихов садржај без модификатора. Тако на пример, концентрација синапинске киселине у екстрактима добијеним на температури од 115°C без модификатора је износила 69 mg/kg, док је максимални принос био остварен на температури од 210°C (150 mg/kg). Екстракцијом на 115°C уз присуство 0,1 М НСl принос синапинске киселине је износио 162,10 mg/kg. У случају осталих фенолних киселина, максимални принос се остваривао при концентрацији модификатора од 0,05 М.

Флоретин је детектован само при температури екстракције изнад 200°C, што може указивати на његову изузетну стабилност и јаку везу са матриksom. Употребом нижих концентрација модификатора није било могуће његово ослобађање из матрикса. Тек при концентрацији од 0,05 М једињење је детектовано у екстрактима.

Резвератрол, који структурно припада класи стилбена, се није екстраховао ни при једној од примењених концентрација модификатора.

На основу свега до сад реченог јасно је да киселином потпомогнута хидролиза има позитиван учинак када је у питању принос фенолних киселина. Код других класа полифенола, а нарочито флавоноидних агликона присуство модификатора високе концентрације није оправдано. Могуће је да додатком киселине већих концентрација долази до структурних промена у хетероцикличном прстену, те у крајњем исходу долази до деградације молекула агликона или је могућа конјугација са околним молекулима. Такође, на основу добијених резултата може се закључити да сама субкритична вода има довољно висок хидролитички потенцијал за екстракцију фенолних гликозида и агликона. Као што је већ раније споменуто ово може бити у тесној вези са изузетно високом концентрацијом  $\text{H}_3\text{O}^+$  јона у субкритичној води.

## 4.6. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКАТА КАМИЛИЦЕ

### 4.6.1. АНТИОКСИДАТИВНА АКТИВНОСТ

#### 4.6.1.1. Одређивање антирадикалске активности екстраката ферментисаних цветова електрон спин резонантном спектроскопијом (ESR)

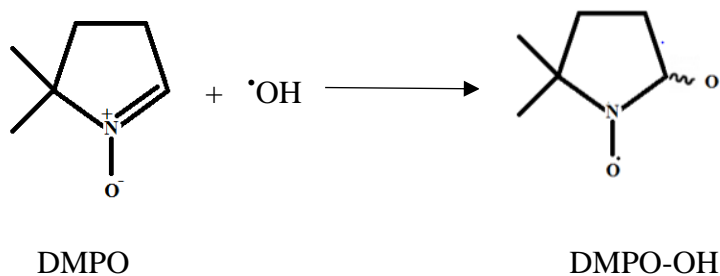
Антиоксидативна активност етанолних екстраката ферментисаних цветова камилице је одређена електрон спин резонантном спектроскопијом. У циљу дефинисања утицаја процеса ферментације на биолошку активност екстраката, антиоксидативна активност је паралелно одређена и екстрактима нативних цветова. Активност је одређена мерењем способности неутрализације две различите слободно-радикалске врсте: хидроксил и супероксид анјон радикала. Електрон спин резонантна (ESR) спектроскопија је инструментална метода која омогућава директну детекцију слободних радикала. Иако је осетљивост ове методе веома висока, детекција краткоживећих, релативно нестабилних, реактивних слободно-радикалских врста, попут супероксид анјон и хидроксил радикала није могућа због њиховог кратког времена живота. Једна од метода која омогућава њихову детекцију је „спин трапинг“ метода којом се нестабилни слободни радикали „хватају“ помоћу одређених органских једињења тзв. „спин трапова“ формирајући стабилне радикале, тзв. „спин адукте“, који се даље могу детектовати ESR спектроскопијом (Чанадановић-Брунет, 1998).

#### *Утицај екстраката на настанак и трансформацију хидроксил радикала*

За одређивање антирадикалске активности екстраката на реактивне  $\cdot\text{OH}$  радикале коришћен је Фентонов модел систем. Реактивни хидроксил радикали генерисани су следећим реакционим механизмом:



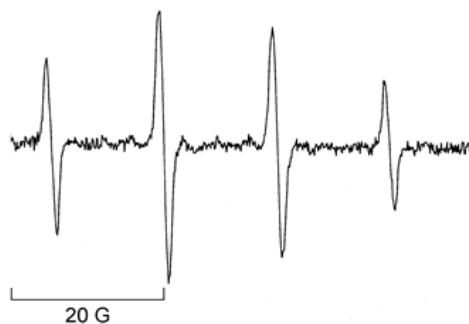
Настали реактивни  $\cdot\text{OH}$  радикали у присуству „спин трапа“ DMPO (5,5-диметил-1-пирилин-*N*-оксид) формирају стабилне нитроксид радикале, односно DMPO-OH „спин адукте“:



Слика 52. Формирање нитроксид радикала (DMPO-OH „спин адукта“).

Овај антирадикалски тест даје информацију не само о антирадикалској активности екстраката на слободне хидроксил радикале, већ и о способности активних једињења присутних у екстрактима да стварају комплексе са јонима гвожђа и да на тај начин спречавају стварање хидроксил радикала Фентоновом реакцијом (Вулић, 2012).

На слици 53 је приказан ESR спектар DMPO-OH „спин адуката“ насталих у Фентоновом модел систему.

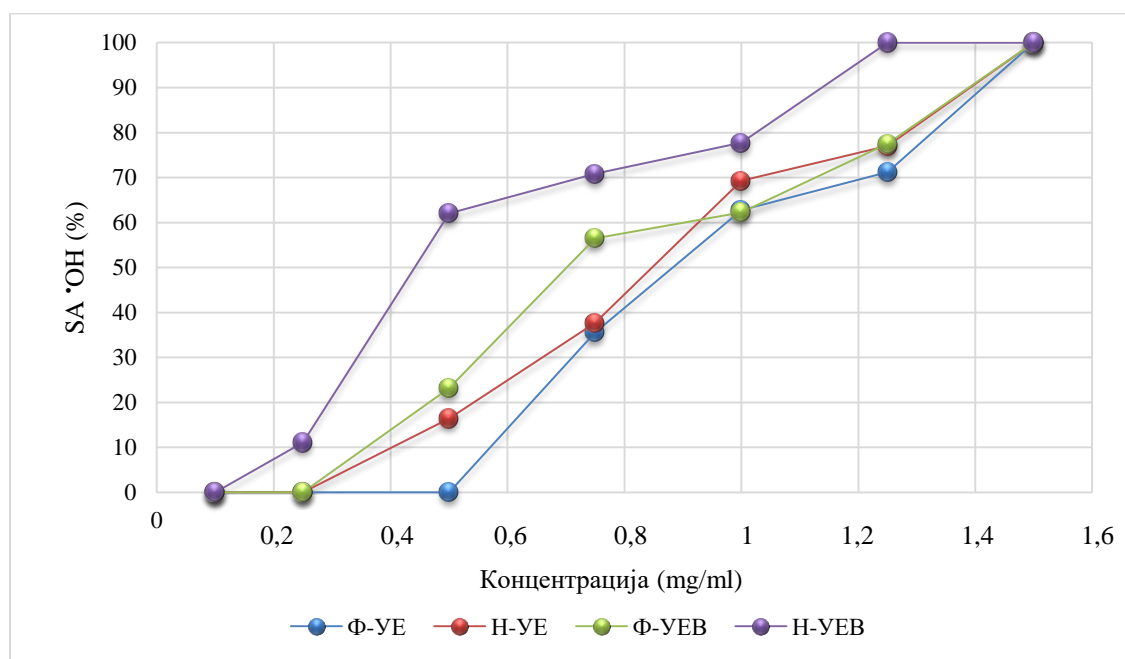


Слика 53. ESR спектар DMPO-OH „спин адуката“ насталих у Фентоновом модел систему (слепа проба).

Хиперфина структура овог ESR спектра је представљена са четири линије релативног интензитета 1:2:2:1 и истих константи хиперфиног цепања за један  $^{14}\text{N}$ -атом ( $I = 1$ )  $a\text{N} = 14,9 \text{ G}$ , и за један  $^1\text{H}$ -атом ( $I = 1/2$ )  $a\text{H} = 14,9 \text{ G}$ .

На слици 54 приказане су антирадикалске активности ( $AA^{\bullet OH}$ ) екстракта нативних и ферментисаних цветова камилице на хидроксил радикале у Фентоновом модел систему.

Са слике се јасно уочава да су екстракти камилице, како ферментисаних тако и нативних цветова, ефикасно утицали на стварање и трансформацију хидроксил радикала. Водени екстракти нативних цветова су потпуно уклонили хидроксил радикале из реакционе смеше ( $AA^{\bullet OH} = 100\%$ ) при примењеној концентрацији од 1,25 mg/ml, док су остали испитани екстракти ову ефикасност постигли при нешто већим концентрацијама од 1,5 mg/ml. ESR спектрална анализа антирадикалске активности екстракта камилице на хидроксил радикале указује на зависност активности од тога да ли је биљни материјал ферментисан или не, врсте растварача, као и од концентрације екстракта. Активност добијених екстраката је расла следећим редоследом: Н-УЕВ > Ф-УЕВ > Н-УЕ > Ф-УЕ.



Слика 54. Утицај екстраката ферментисаних и нативних цветова камилице на стварање и трансформацију хидроксил радикала.

За изражавање антиоксидативне активности се често користи  $IC_{50}^{\bullet OH}$  вредност, односно концентрација екстракта при којој долази до неутрализације 50% слободних радикала под специфичним експерименталним условима (Cuvelier и сар., 1992). Добијене

IC<sub>50</sub> вредности испитиваних екстраката приказане су у табели 27. Мања IC<sub>50</sub> вредност указује на већу антиоксидативну активност.

Табела 27. IC<sub>50</sub> вредности екстраката нативних и ферментисаних цветова камилице и апигенина.

Екстракт	IC <sub>50</sub> <sup>•OH</sup> (mg/ml)*	IC <sub>50</sub> <sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup></sup> (mg/ml)*
<b>Ф-УЕ</b>	0,8828±0,0438	0,0679±0,0032
<b>Н-УЕ</b>	0,8474±0,0411	0,0999±0,0046
<b>Ф-УЕВ</b>	0,7014±0,0345	0,0556±0,0022
<b>Н-УЕВ</b>	0,4409±0,0219	0,0308±0,0014
<b>Апигенин</b>	0,0417±0,0019	0,0016±0,0001

\*± 2СД

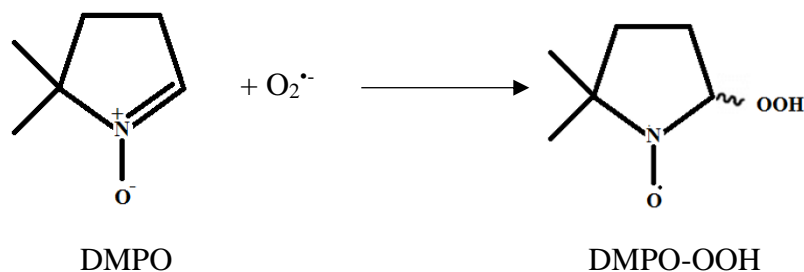
Као што се може видети из табеле 27, IC<sub>50</sub> вредности испитиваних екстраката камилице варирале су у опсегу од 0,4409 до 0,8828 mg/ml. У поређењу са антиоксидативним капацитетом апигенина (IC<sub>50</sub><sup>•OH</sup> = 0,0417 mg/ml), који је коришћен као референтна супстанца, сви екстракти су показали добру антирадикалску способност ка хидроксил радикалима. Код водених екстраката, видна је разлика између екстраката нативних и ферментисаних цветова. Међутим, у случају етанолних екстраката способност нативних и ферментисаних цветова ка неутрализацији <sup>•OH</sup> радикала је врло слична. Добијени резултати показују да су водени екстракти знатно бољи у „хватању“ хидроксил радикала наспрам етанолних, што је у колизији са подацима из литературе (Guimarães и сар., 2013а,б; МсКау и Blumberg, 2006).

### **Утицај екстраката на настанак и трансформацију супероксидног ањон радикала**

Иако је супероксид ањон радикал слаб оксидациони агенс, он је прекурсор у стварању врло реактивних хидроксил радикала и синглет кисеоника (Okuno и сар., 2001). Супероксид ањон радикал се може генерисати ензимски, системом ксантин/ксантин оксидаза или хемијским путем, са смешом калијум супероксида и краунетра. Предност хемијског генерисања супероксид ањон радикала за одређивање антирадикалске активности је једнозначност интерпретираних резултата. Наиме, једињења присутна у екстрактима могу имати и инхибиторно дејство на ензимски систем ксантин/ксантин оксидаза, поред антирадикалске активности. Овај проблем је превазиђен када је извор супероксид ањон радикала хемијски систем (Вулић, 2012). ESR спектрална одређивања слободних

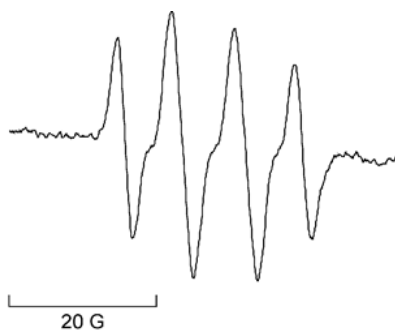


супероксид анјон радикала у наведеном модел систему извршена је „спин трапинг“ методом употребом DMPO као „спин трап“ једињења, следећим механизмом:



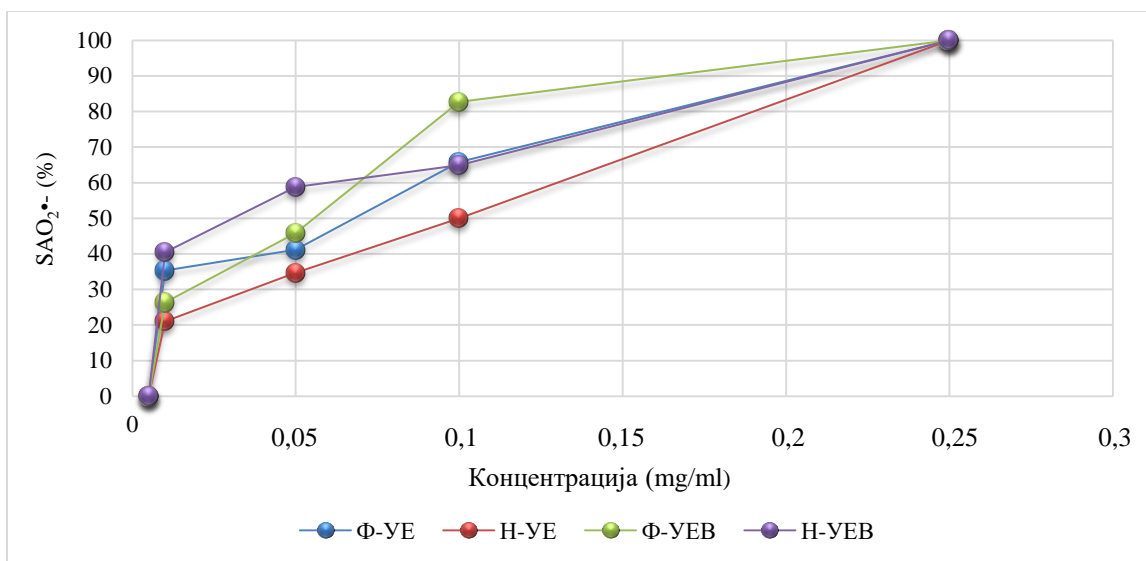
Слика 55. Формирање DMPO-OOH.

Хиперфина структура ESR сигнала стабилованих супероксид анјон радикала, односно DMPO-OOH „спин адуката“ (слика 56), састоји се од четири линије, а константе цепања имају вредност  $a_N = 12,65 \text{ G}$ ,  $a_{H\beta} = 10,4 \text{ G}$  и  $a_{H\gamma} = 1,3 \text{ G}$ .



Слика 56. ESR спектар DMPO-OOH „спин адуката“ супероксид анјон радикала (слепа проба).

На слици 57 приказан је утицај испитиваних екстраката на стварање и трансформацију супероксид анјон радикала.



Слика 57. Утицај екстраката камилице на стварање и трансформацију супероксид анјон радикала.

Екстракти ферментисаних и нативних цветова камилице ефикасно су утицали на стварање и трансформацију супероксид анјон радикала. Сви испитани узорци су потпуно елиминисали супероксид анјон радикал из реакционе смеше ( $AAO_2^{\bullet-} = 100\%$ ) при концентрацији од 0,25 mg/ml. Према подацима приказаним у табели 27 може се видети да је чист апигенин ( $IC_{50}^{O_2^{\bullet-}} = 0,0016$  mg/ml) показао већи афинитет ка „хватању“ супероксид анјон радикала него испитивани екстракти, чије су се  $IC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$  вредности кретале у опсегу од 0,0308 до 0,0999 mg/ml. Од свих испитаних екстраката највећу ефикасност ка супероксид анјон радикалима показао је Н-УЕВ екстракт ( $IC_{50} = 0,0308$  mg/ml). Иако су се ферментисани екстракти одликовали вишим садржајем апигенина, њихова антирадикалска активност била је мања у односу на неферментисане. Ово свакако може указивати на допринос других компоненти присутних у екстрактима нативних цветова, као и на ефекат њиховог синергистичког деловања.

#### 4.6.1.2. Утицај екстракционе технике на антиоксидативну активност

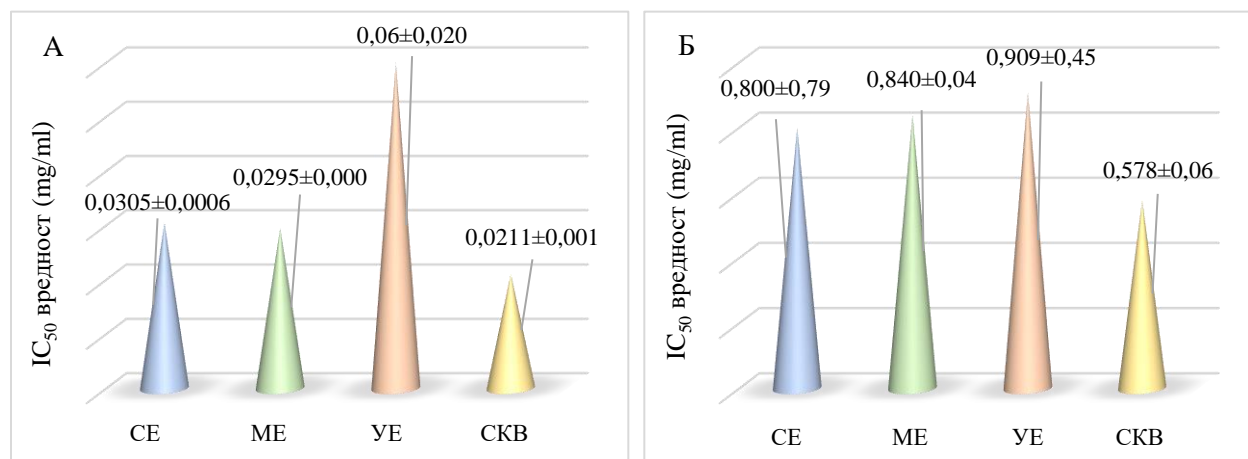
У претходном делу јасно је показана већа антиоксидативна активност нативних цветова у поређењу са ферментисаним. Иако о антиоксидативној активности ферментисаних цветова камилице нема довољно литературних података, када је реч о нативним ситуација је другачија. Ипак, сва спроведена истраживања односе се на цваст камилице (*in toto*), при чему се он показао добрим извором антиоксиданаса.

Бројним тестовима потврђена је антиоксидативна активност цвасти камилице, и то како њених екстраката, њеног етарског уља, тако и појединачних конституената садржаним у њој. Спроведена истраживања су показала утицај екстракционих техника на антиоксидативну моћ екстраката. Ово је заправо последица чињенице да различити начини добијања екстраката условљавају различит састав екстраката, а такође и различит принос компонената са специфичном антиоксидативном активношћу. Даље, активност екстраката условљена је такође и примењеним растварачем. Истраживања су показала да метанолни екстракти имају већи антиоксидативни капацитет у односу на етанолне, и да су супериорнији у односу на хексанске (Roby и сар., 2013). Антирадикалски капацитет у тесној је вези са садржајем полифенолних компонената у биљном материјалу, њиховим појединачним антирадикалским карактеристикама, као и са њиховим међусобним интеракцијама (Song и сар., 2010).

Иако нема доступних литературних података о антиоксидативној и антирадикалској активности језичастих цветова камилице, на основу претходних истраживања може се претпоставити њихов висок антиоксидативни капацитет, пре свега због података који потврђују да језичасти цветови камилице садрже полифенолне компоненте. Као што је наведено, различите екстракционе технике условљавају различит садржај биоактивних компонената у добијеним екстрактима, стога је неопходно пронаћи адекватну технику којом се остварује добијање екстраката са максималним антиоксидативним, односно антирадикалским деловањем. Резултати испитивања капацитета хватања слободног DPPH радикала, као и редукционе моћи екстраката језичастих цветова камилице добијених различитим екстракционим техникама приказани су на слици 58 као средње вредности три понављања ( $\pm 2\text{СД}$ ). Добијени резултати указују на јак антиоксиадтивни потенцијал испитиваних екстраката.

У поређењу са етанолним екстрактима добијеним ултразвучном (УЕ), микроталасном (МЕ) и Soxhlet екстракцијом (СЕ), СКВ се показао најпотенијим при неутрализацији DPPH радикала (слика 58А). Његова антирадикалска активност, изражена преко  $IC_{50}$  вредности, износила је 0,0211 mg/ml, што представља најнижу вредност инхибиторне концентрације у односу на друге екстракте. Резултати антирадикалске активности када су у питању МЕ екстракти ( $IC_{50} = 0,0295$  mg/ml) показали су блиску вредност са оним за СЕ ( $IC_{50} = 0,0305$  mg/ml). Са друге стране, екстракт добијен УЕ са својом  $IC_{50}$  вредношћу од 0,0606 mg/ml, показао је релативно умерену активност, што је и у сагласности са претходно одређеним садржајем фенола и флавоноида.

Када је у питању редукциона моћ екстраката, као што је и било очекивано, највећу активност показао је водени екстракт са  $IC_{50}$  вредношћу од 0,578 mg/ml (слика 58Б).  $IC_{50}$  вредности за МЕ и СЕ екстракте износиле су 0,840 mg/ml и 0,800 mg/ml. УЕ екстракт је показао најнижи редукциони потенцијал (0,909 mg/ml).

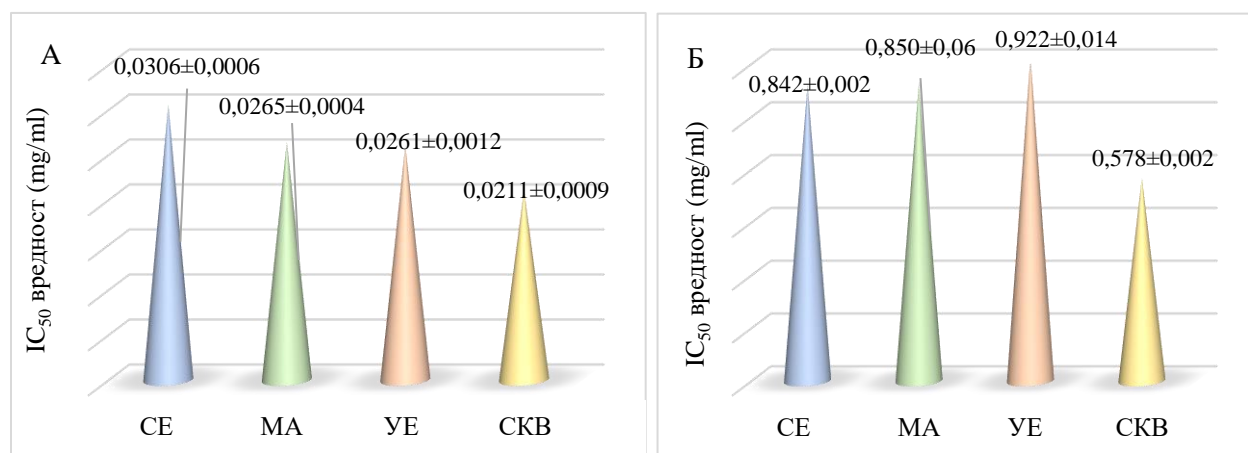


Слика 58. Резултати одређивања (А) способности инхибиције DPPH радикала и (Б) редукционе моћи екстраката добијених различитим екстракционим техникама.

Добијеним резултатима показно је да екстракт камилице добијен субкритичном водом изражава већу активност у односу на етанолне. У циљу елиминисања утицаја растварача и сагледавања ефекта саме технике на антиоксидативну активност екстраката камилице, антиоксидативна активност воденог екстракта даље је упоређена са активношћу екстраката добијених водом примењујући различите екстракционе технике. Добијени подаци (слика 59) показују да је екстракт добијен субкритичном водом опет демонстрирао

најбоље антиоксидативне способности, доказујући да вода у субкритичном стању показује одличне солватационе особине.

Резултати DPPH антирадикалског теста (слика 59А) показују да је овај екстракт са својом  $IC_{50}$  вредношћу од 0,021 mg/ml испред свих осталих екстраката. Насупрот њему, СЕ екстракт је показао најнижу антиоксидативну моћ (0,0306 mg/ml). Када су у питању МЕ и УЕ екстракти, примећено је да имају приближне  $IC_{50}$  вредности (0,0265 и 0,0261 mg/ml), као и да је неопходна нешто већа концентрација ових екстраката да би неутралисали 50% DPPH радикала.



Слика 59. Резултати одређивања (А) способности инхибиције DPPH радикала и (Б) редукционе моћи водених екстраката добијених различитим екстракционим техникама.

Када је у питању редукциона моћ, резултати приказани на слици 59Б јасно демонстрирају да СКВ екстракт показује највећу редукциону моћ у поређењу са екстрактима добијеним другим екстракционим техникама. Најнижу моћ редукције  $Fe^{+3}$  у  $Fe^{+2}$  (највећа  $IC_{50}$  вредност у износу од 0,922 mg/ml) одређена је код УЕ екстраката. Сличне инхибиторне концентрације су биле утврђене код МЕ (0,850 mg/ml) и СЕ (0,842 mg/ml).

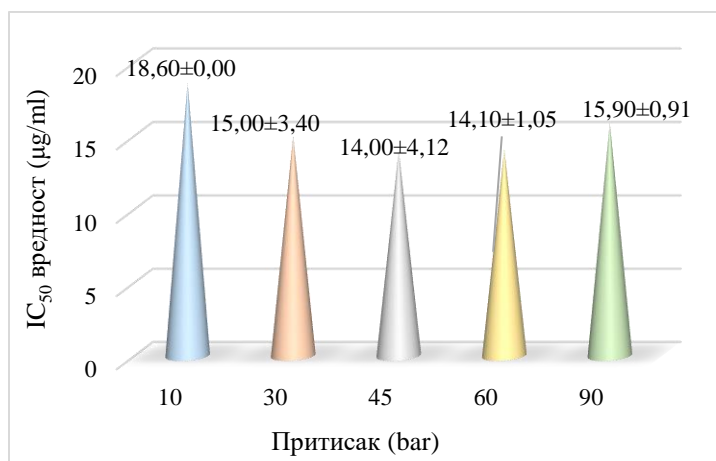
Добијени резултати демонстрирају предност употребе екстракције субкритичном водом за добијање екстраката богатих биоактивним једињењима, односно антиоксидансима.

#### 4.6.1.2.2. Антиоксидативна активност СКВ екстракта камилице

Узимајући у обзир досад приказане резултате у којима се јасно осликавају предности субкритичне екстракције водом у односу на друге екстракционе технике, урађена је опсежнија анализа антиоксидативног потенцијала СКВ екстракта. Са тим у вези, антиоксидативна и антирадикалска активност екстракта камилице утврђена је применом већег броја спектрофотометријских метода. Свака од примењених метода заснива се на различитом механизму деловања антиоксиданаса из екстракта, те се спровођењем већег броја метода стиче реалнији увид у антиоксидативни капацитет добијених екстракта. Добијене инхибиторне концентрације су приказане табеларно и дате у прилозима 7 и 8.

##### *Способност инхибиције DPPH радикала*

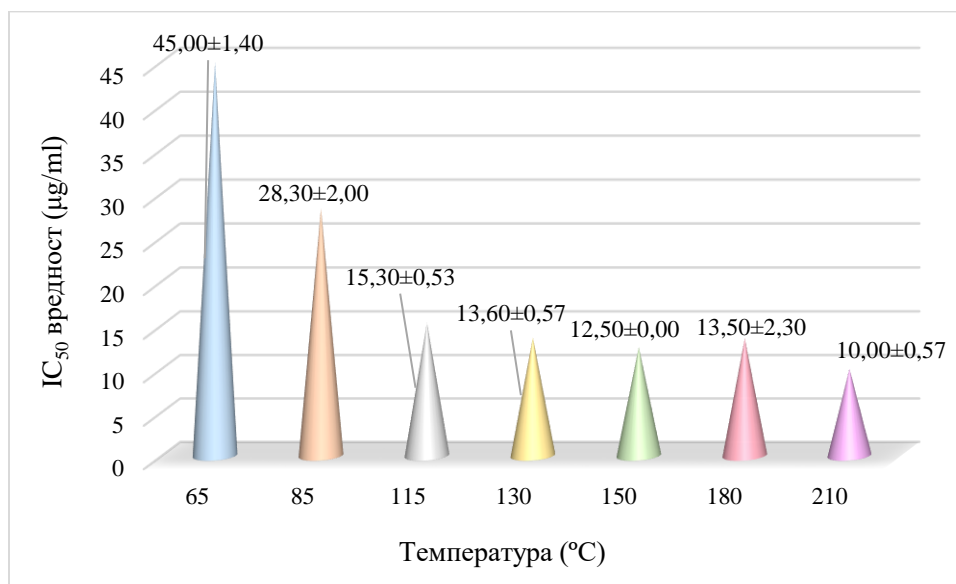
Способност екстракта да неутралисању DPPH радикала изражена је преко инхибиторних концентрација ( $IC_{50}$  вредност) и приказана је на сликама 60-62 као средња вредност три понављања ( $\pm 2SD$ ).



Слика 60. Утицај притиска на способност екстракта да неутралишу DPPH радикале.

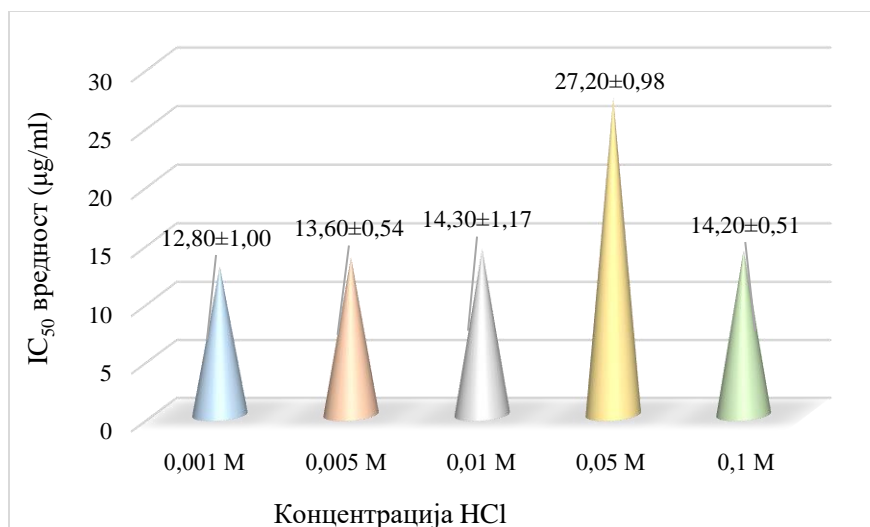
На слици 60 приказан је антирадикалски потенцијал екстракта добијених на различитим оперативним притисцима. Добијене  $IC_{50}$  вредности биле су у опсегу од 14  $\mu\text{g/ml}$  (у случају екстракта добијеног на 45 bar), па до 18,60  $\mu\text{g/ml}$  (у случају екстракта добијеног на 10 bar). Оваква активност екстракта је у корелацији са садржајем апигенина, као и укупних флавоноида. Наиме, у погледу садржаја апигенина и укупних флавоноидних материја, екстракти су показали тренд пораста од почетних 10 bar па све до 45 bar, где су

достигли максимум. Даље повећање притиска водило је ка смањењу садржаја посматраних једињења у екстрактима. Способност неутралисања DPPH радикала прати овај тренд, односно најмањи капацитет хватања радикала је показао екстракт најсиромашнији апигенином и укупним флавоноидима. Даљим порастом притиска IC<sub>50</sub> вредности су опадале, уз повећање вредности концентрација апигенина и флавоноида, све до вредности притиска од 45 bar који је одговарао максимуму активности, односно максимуму садржаја ових једињења.



Слика 61. Утицај температуре на способност екстраката да неутралишу DPPH радикале.

Када је у питању утицај температуре (слика 61), добијени резултати нису били у складу са садржајем укупних фенолних једињења, укупних флавоноида и апигенина. Повећање температуре је водило ка све нижим IC<sub>50</sub> вредностима, односно ка већој антирадикалској активности. Са друге стране, код екстраката добијених уз додатак модификатора (слика 62), јасно се види да је екстракт добијен коришћењем 0,001 М HCl имао највећи антирадикалски капацитет, што је у складу са садржајем укупних фенола, флавоноида и апигенина. Међутим, у случају екстракта добијених коришћењем 0,05 М HCl уочено је да, иако је овај екстракт имао изузетно висок садржај укупних фенола (нешто нижи од максимално оствареног), он није испољио јак антирадикалски потенцијал. Разлог овоме може бити низак ниво садржаја флавоноида, као и самог апигенина. Ови резултати показују да је за инхибицију DPPH радикала апигенин највероватније од значајног утицаја.



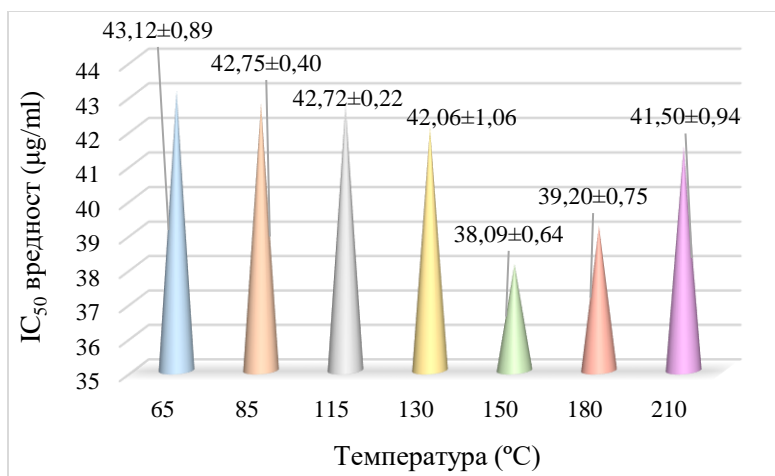
Слика 62. Утицај концентрације модификатора на способност екстраката да неутралишу DPPH радикале.

### Способност инхибиције $\text{OH}$ радикала

Хидроксил радикали ( $\text{OH}$ ) се сматрају једним од најреактивнијих слободно радикалских врста са којима су повезана многобројна озбиљна оштећења ткива, деградација протеина, нерастворних липида, угљених хидрата, нуклеинских киселина и др. (Calderon и сар., 1988). Због њиховог негативног утицаја на живе системе, мерење способности њихове неутрализације од стране природних молекула је од изузетне важности. У овом раду способност неутрализације  $\text{OH}$  радикала од стране екстраката одређена је мерењем степена оксидације 2-деокси-Д-рибозе хидроксил радикалима накнадним мерењем производа ове реакције са тиобарбитурном киселином.

Сви испитани екстракти су показали јако висок ниво способности неутрализације  $\text{OH}$  радикала. Екстракти добијени на различитим вредностима притиска су постигли IC<sub>50</sub> вредности у границама 37,44-45,98 µg/ml. Најниже инхибиторне концентрације неопходне за неутрализацију 50% посматраних радикала показали су екстракти добијени на 30 bar (37,44 µg/ml) и 45 bar (38,02 µg/ml), односно екстракти у којима је ниво фенола, флавоноида и апигенина био максималан. Са друге стране екстракт добијен на притиску од 10 bar показао је најнижу активност (45,98 µg/ml).





Слика 63. Утицај температуре на способност екстраката ка неутрализацији хидроксил радикала.

Екстракти добијени у температурном опсегу 65-210°C показали су очекивано висок ниво активности (слика 63). Најпотентнијим се показао екстракт добијен на температури од 150°C. Као и у претходном антирадикалском тесту, и овде са порастом температуре је долазило до пораста антирадикалске активности. Екстракти добијени на температурама 65-130°C нису испољили значајне разлике у активности. Даљим повећањем температуре са 130°C на 150°C дошло је до значајнијег пада IC<sub>50</sub> вредности. Порастом температуре изнад 150°C активност је опадала.

Поред израженог утицаја температуре, модификатор је такође утицао на способност екстраката да неутралишу  $\cdot\text{OH}$  радикале. За екстракт добијен на 115°C без модификатора добијена IC<sub>50</sub> вредност износила је 42,72 µg/ml, док на истој температури, али уз присуство модификатора, ова вредност може опати и до 37,94 µg/ml (0,05 M). Изузев екстракта добијеног при концентрацији модификатора од 0,01 M, сви екстракти су показали приближну активност. Употреба 0,01 M HCl је имала негативан утицај на антирадикалску активност према  $\cdot\text{OH}$  радикалима, па је добијена IC<sub>50</sub> вредност (69,76 µg/ml) била далеко већа у односу на вредности осталих екстраката.

Испитани екстракти су показали већу активност у односу на галну и аскорбинску киселину и приближну активност са бутил хидрокситолуеном (ВНТ, енг. Butylated Hydroxy Toluene) (табела 28).

Табела 28. IC<sub>50</sub> вредности стандардних антиоксидатних супстанци.

Референтни стандард	Гална киселина	Аскорбинска киселина	ВНТ**
IC <sub>50</sub> (µg/ml)*	59,14±1,10*	160,55±2,31	33,92±0,79

\*±2СД

\*\* Бутил хидрокситолуен

### Способност инхибиције ABTS радикала

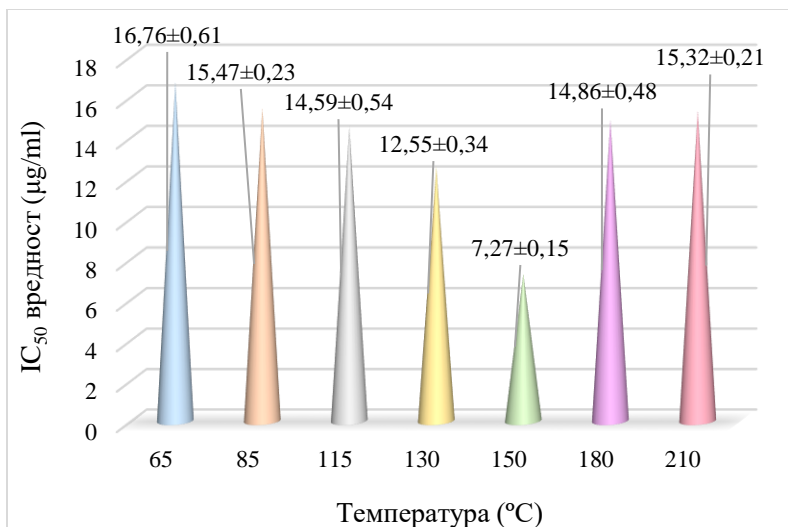
За добијене екстракте камилице је одређена способност неутрализације ABTS (2,2'-азино-бис-(3-етил-бензотиазолин-6-сулфонска киселина)) радикала у реакцији у којој се ABTS конвертује до стабилне форме (ABTS<sup>•+</sup>). Сви испитани екстракти су испољили активност ка неутрализацији ових дугоживећих радикалских врста. Паралелно са одређивањем антиоксидативних активности екстраката, испитана је и активност референтних стандарда (табела 29).

Екстракти камилице добијени под притиском од 45 bar били су у стању да неутралишу 50% ABTS радикала већ при концентрацији од 5,42 µg/ml. Испољени антирадикалски капацитет је био бољи у односу на два комерцијална стандарда (аскорбинску киселину и ВНТ). Најмањи афинитет ка ABTS радикалима испољили су екстракти добијени на притиску од 10 bar, што је било у сагласности са садржајима фенола, флавоноида и апигенина, а такође и у сагласности са претходно спроведеним антирадикалским тестовима, у којима се показало да екстракти добијени на 10 bar имају најмању антирадикалску активност.

Табела 29. IC<sub>50</sub> вредности стандардних антиоксидативних супстанци.

	Екстракт добијен на 45 bar	Гална киселина	Аскорбинска киселина	ВНТ
IC <sub>50</sub> (µg/ml)*	5,42±0,73	1,96 ± 0,41	10,98 ±0,95	7,23 ± 0,87

\*±2СД



Слика 64. Утицај температуре на способност “хватања” ABTS радикала.

Када је у питању утицај температуре, највећа антирадикалска активност је примећена код екстракта добијеног на 150°C (слика 64). Утицај температуре на антирадикалску активност према ABTS радикалима је била идентична са њеним утицајем на способност неутрализације  $\cdot\text{OH}$  радикала. И овде, као и у претходном антирадикалском тесту, са порастом температуре је активност благо расла, да би са порастом температуре од 130°C на 150°C дошло до наглог скока активности.

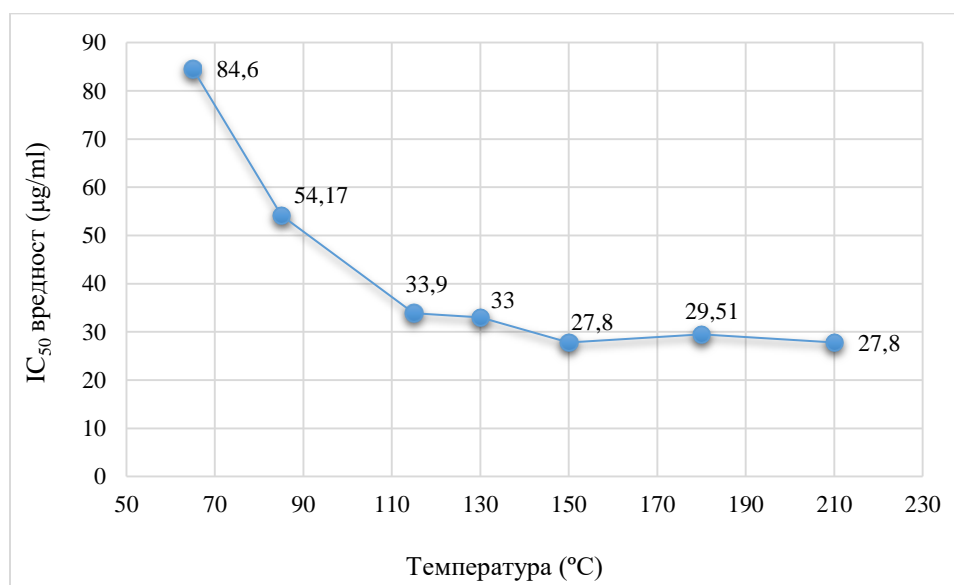
Када је у питању утицај додатка модификатора на антирадикалски капацитет, као и у случају хидроксил радикала, екстракт добијен коришћењем модификатора концентрације 0,01 M је показао најмању инхибиторну активност (34,87 µg/ml). Највиши ниво активности је постигнут у случају коришћења 0,1 M модификатора (11,48 µg/ml). Антирадикалска активност према ABTS радикалима при осталим испитиваним концентрацијама се није значајно мењала. Вредности осталих инхибиторних концентрација кретале су се у опсегу 13,04-15,73 µg/ml.

### **Одређивање редуccionе способности**

Редуccionа моћ екстраката је одређена мерењем њихове способности редуccionе  $\text{Fe}^{+3}$  у  $\text{Fe}^{+2}$  јон.

Утицај притиска на редуциону моћ екстраката је био сличан утицају овог параметра на антирадикалски потенцијал узорака. Са изузетком екстракта добијеног на 10 bar, чија је  $IC_{50}$  вредност износила  $49,50 \mu\text{g/ml}$ , сви остали екстракти су показали приближну активност. Вредности инхибиторних концентрација су биле у опсегу  $32,40\text{-}38,54 \mu\text{g/ml}$ .

Повећање температуре током процеса екстракције водило је ка добијању екстраката високе редуционе моћи. Екстракти добијени на нижим температурама ( $65$  и  $85^\circ\text{C}$ ) су показали знатно нижу редуциону способност, односно антиоксидативну активност. Њихове  $IC_{50}$  вредности биле су значајно веће од оних за екстракте добијене на температурама изнад  $100^\circ\text{C}$ . Утицај температуре на редуциону моћ екстраката илустрован је на слици 65. Тачке на графику представљају  $IC_{50}$  вредности и дате су као средње вредности три узастопна понављања ( $\pm 2\text{SD}$ ).

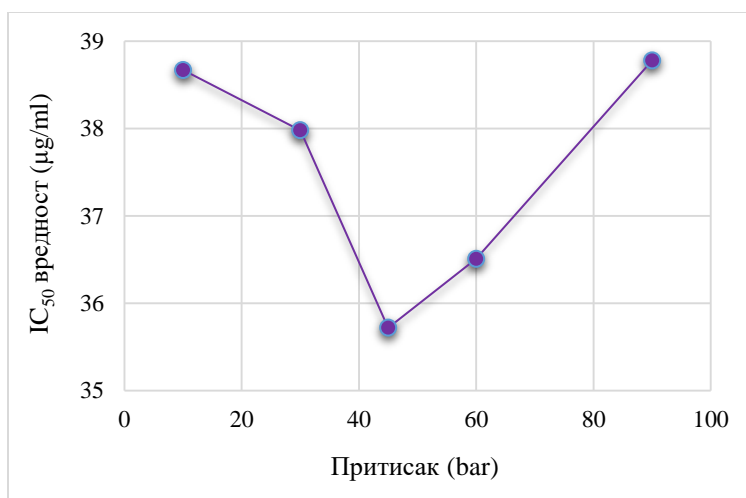


Слика 65. Утицај температуре на редуциону способност СКВ екстраката.

Када је у питању утицај модификатора,  $IC_{50}$  вредности кретале су се у опсегу од  $26,13$  до  $45,28 \mu\text{g/ml}$ . Ниже концентрације модификатора нису условиле значајне разлике међу екстрактима. Концентрација  $0,05 \text{ M}$  водила је ка добијању екстракта знатно лошије активности ( $45,28 \mu\text{g/ml}$ ).

### Одређивање способности хелирања металних јона

Антиоксидативни капацитет СКВ екстраката окарактерисан је и одређивањем способности хелирања металних јона. Познато је да током Фентон реакције гвожђе може учествовати у стварању високореактивних  $\cdot\text{OH}$  радикала, и тиме утицати на процес оштећења ћелија. Минимизирање феро јона може водити ка заштити од оксидативног оштећења. Стога је од великог значаја одређивање способности екстраката да делују као хелатори металних јона.



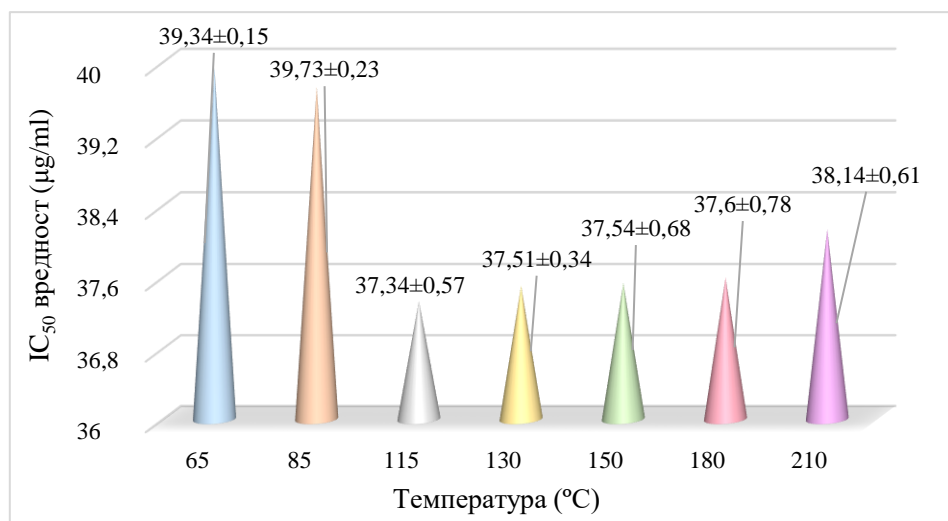
Слика 66. Утицај притиска на способност СКВ екстраката ка хелирању металних јона.

Резултати испитивања екстраката добијених на различитим притисцима (слика 66) показују да су екстракти који су се одликовали највећим садржајем апигенина имали највећу антиоксидативну активност. У екстрактима добијеним на 10 и 90 bar у којима је детектован најнижи ниво фенола и флавоноида детектована је и најмања антиоксидативна активност.

Када је у питању утицај температуре, највећи учинак ка хелирању метала показао је екстракт најбогатији апигенином, односно добијен на 115°C. Са повећањем температуре, активност екстраката се није битније мењала. Екстракти добијени на нижим температурама имали су лошији антиоксидативни капацитет у односу на остале екстракте (слика 67).

Екстракт добијен коришћењем 0,001 M HCl је имао највећи антирадикалски капацитет (35,97 µg/ml), што је било у складу са садржајем апигенина и укупних полифенолних компоненти. Екстракт добијен коришћењем 0,01 M HCl је испољио најнижи

потенцијал ( $48,82 \mu\text{g/ml}$ ). Активности екстраката добијених уз модификатор концентрација  $0,005$ ,  $0,05$  и  $0,1 \text{ M}$  се нису битније разликовале.



Слика 67. Утицај температуре на способност СКВ екстраката ка хелирању металних јона.

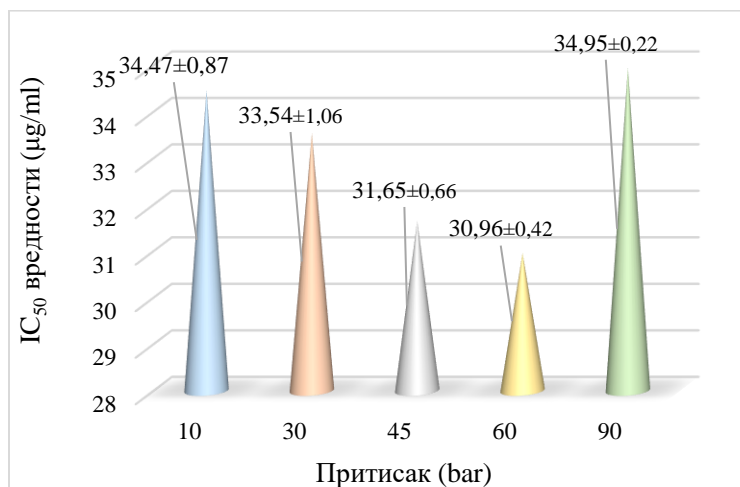
### *Способност инхибиције липидне пероксидације*

Процес пероксидације незасићених масних киселина основни је узрок оксидативног оштећења ћелијских мембрана, али и свих осталих биолошких система који садрже липиде (Halliwell и Gutteridge, 1985; Chatterjee и Agarwal, 1988). Испитивање утицаја екстраката на процес липидне пероксидације је неопходан у циљу сагледавања укупне биолошке активности екстраката.

Способност СКВ екстраката да инхибирају липидну пероксидацију је одређен тиоцијанидном методом. Примењена метода заправо одређује количину пероксида током иницијалне фазе оксидације, који је примарни производ липидне оксидације. СКВ екстракти добијени под различитим условима показали су висок степен инхибирања процеса липидне пероксидације.

Добијени резултати показују да су сви испитани екстракти додати у емулзију линолне киселине били способни да инхибирају формирање хидропероксида. Са порастом вредности притиска расла је и способност екстракта да инхибирају процес липидне

пероксидације, при чему се максимална активност постизала на притиску од 60 bar. Даље повећање притиска је водило ка смањењу активности (слика 68).



Слика 68. Утицај притиска на способност СКВ екстраката да инхибирају процес липидне пероксидације.

Инхибиторне концентрације које су добијене за екстракте на различитим температурама биле су блиске једне другима и кретале су се у интервалу од 28,67 до 35,02 µg/ml. Са друге стране, вредности инхибиторних концентрација екстраката добијених уз присуство различитих концентрација модификатора, биле су у много ширем опсегу (од 27,76 до 41,12 µg/ml). Ово указује на значај концентрације модификатора на способност инхибирања процеса липидне пероксидације добијених екстраката. Најнижа IC<sub>50</sub> концентрација била је у случају екстракта добијеног уз присуство 0,1 М НСl (27,76 µg/ml), док је највиша била у случају модификатора концентрације 0,01 М (41,12 µg/ml). Добијене вредности показују њихову значајно већу активност у односу на референтне стандардне компоненте - галну и аскорбинску киселину (табела 30). Међутим, способност тестираних екстраката да делују као инхибитори процеса липидне пероксидације била је мања него код друга два стандарда (ВНТ и α-токоферол).

Табела 30. Инхибиторне концентрације референтних стандарда.

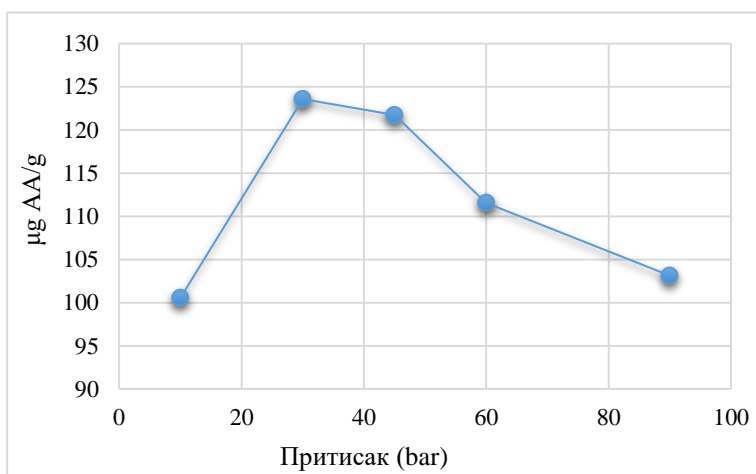
Референтни стандард	Гална киселина	Аскорбинска киселина	ВНТ	α-Токоферол
IC <sub>50</sub> (µg/ml)*	255,43±11,68*	> 1000	1,00±0,23	0,48±0,05

\*±2СД

### Укупна антиоксидативна активност

Укупна антиоксидативна моћ екстраката камилице одређена је коришћењем фосфолибденске методе засноване на реакцији редукције Мо (VI) → Мо (V). Коришћењем ове методе антиоксидативни капацитет екстраката је изражен преко еквивалента аскорбинске киселина (АА) по граму сувог екстракта.

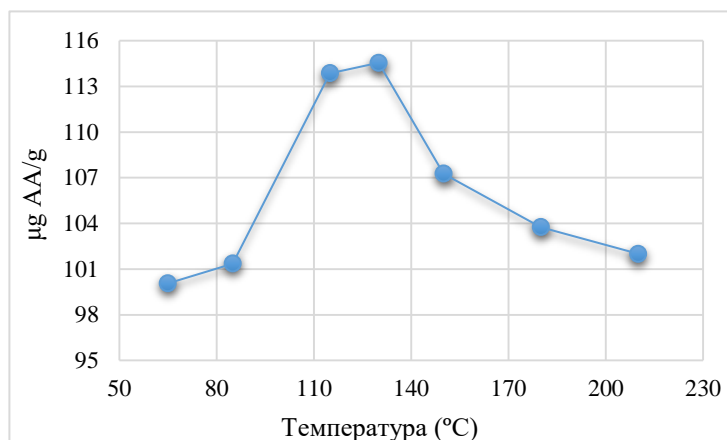
Када је у питању утицај притиска, екстракти добијени на притисцима од 10 и 90 bar су показали најнижи ниво активности (слика 69), што је било у корелацији са садржајем детектованих биоактивних једињења у поменутих екстрактима. Највећу активност ( $IC_{50} = 123,58 \mu\text{g AA/g}$ ) показао је екстракт добијен на притиску од 30 bar, а затим на 45 bar, што је пратило тренд садржаја фенола у узорцима.



Слика 69. Утицај притиска на укупну антиоксидативну активност СКВ екстраката.

Утицај температуре на укупни антиоксидативни капацитет приказан је графички на слици 70. Добијени резултати су у корелацији са садржајем полифенолних компонената и апигенина. Максималну активност показали су екстракти добијени на 115 и 130°C (113,87 и 114,55 µg AA/g). Даље повећење температуре условило је благи пад активности.





Слика 70. Утицај температуре на укупну антиоксидативну активност СКВ екстраката.

Узорак добијен екстракцијом уз примену модификатора концентрације 0,01 М је показао најнижу укупну антиоксидативну активност (92,84 µg AA/g), док је највишу активност испољио екстракт добијен процесом екстракције уз присуство модификатора у концентрацији од 0,005 М (106,72 µg AA/g) (табела 31).

Табела 31. Утицај концентрације модификатора на укупну антиоксидативну активност СКВ екстраката.

Концентрација модификатора	Укупна антиоксидативна активност (µg AA/g)
0,001 М	103,36±1,03*
0,005 М	106,72±0,95
0,01 М	92,84±0,35
0,05 М	103,37±0,71
0,1 М	105,54±1,14

\*±2СД

Узимајући у обзир све добијене резултате, може се закључити да испитани екстракти испољавају значајну антиоксидативну активност. У већини тестова добијени резултати антиоксидативне и антирадикалске активности су корелирали са садржајем фенола, односно флавоноида и апигенина. Такође, примећен је готово идентични утицај притиска на антиоксидативни капацитет екстраката, без обзира на тестирани антиоксидативни механизам.

#### 4.6.2. Антимикробна активност екстраката

##### 4.6.2.1. Антимикробна активност екстраката ферментисаних цветова

Резултати испитивања антимикробне активности етанолних екстраката ферментисаних цветова камилице приказани су у табели 32. Резултати су изражени преко минималне инхибиторне концентрације (МИС, енг. Minimum Inhibitory Concentration) екстраката. Антимикробна активност је одређена према осам различитих микробних линија: шест бактеријских и две гљивичне. Добијени резултати јасно показују да су сви екстракти испољили антимикробну активност. Способност ка инхибицији испитиваних микробних линија упоређена је са стандардним антибиотицима: амрацином (у случају бактерија) и нистатином (у случају гљивица). Добијене МИС вредности за анализиране екстракте биле су у опсегу 19,53-312,5  $\mu\text{g/ml}$  (табела 32).

Табела 32. Антимикробна активност екстраката ферментисаних цветова камилице.

Микробна линија	МИС вредности ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Ф-УЕ*	Ф-УЕВ**	Амрацин	Нистатин
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	156,25 $\pm$ 1,23	312,5 $\pm$ 2,11	0,97 $\pm$ 0,15	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	78,125 $\pm$ 1,05	78,12 $\pm$ 0,76	0,49 $\pm$ 0,09	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	39,10 $\pm$ 0,99	19,53 $\pm$ 0,15	0,97 $\pm$ 0,12	/
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	78,12 $\pm$ 0,74	78,12 $\pm$ 0,00	0,49 $\pm$ 0,25	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	156,25 $\pm$ 1,54	/	0,49 $\pm$ 0,27	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	39,10 $\pm$ 0,68	312,50 $\pm$ 1,58	0,24 $\pm$ 0,18	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	78,12 $\pm$ 0,88	39,10 $\pm$ 0,39	/	1,95 $\pm$ 0,03
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	78,12 $\pm$ 0,85	39,10 $\pm$ 0,17	/	0,97 $\pm$ 0,05

\*Ф-УЕ- Етанолни екстракт добијен ултразвучном екстракцијом ферментисаних цветова;

\*\*Ф-УЕВ – Водени екстракт добијен ултразвучном екстракцијом ферментисаних цветова.

Иако је антимикуробна активност камилице потврђена у ранијим студијама, добијени резултати по први пут показују антимикуробну активност екстраката ферментисаних цветова камилице.

Без обзира на чињеницу да се ферментисани цветови одликују високим садржајем апигенина, велики антимикуробни потенцијал свакако је последица присуства и других конституената ферментисаног биљног материјала. Према подацима из литературе (Зековић, 1993) језичасти цветови камилице садрже углавном умерено хидрофилне компоненте, у првом реду феноле и флавоноиде. Имајући у виду да су феноли познати као антимикуробни агенси (Pereira и сар., 2006; Pereira и сар., 2007а,б; Proestos и сар., 2005; Rauha и сар., 2000), висока антимикуробна активност екстраката може бити повезана са високим фенолним садржајем. Према подацима Курчубића и сар. (2014), са порастом броја хидроксилних група у фенолном прстену, антимикуробна активност фенола расте. Chabot и сар. (1992) су установили да мање поларна једињења, попут флавоноида, код којих је одсутна хидроксилна група у В прстену, показују већу активност ка микроорганизмима у поређењу са оним који садрже ОН групе. Са друге стране, слободне хидроксилне групе у В прстену, као и слободна ОН група на С-3 атому у А прстену су неопходне за антибактеријску активност ових једињења (Mogi и сар., 1987). На основу овога може се закључити да антимикуробна активност испитиваних екстраката не зависи само од флавоноидних компоненти, већ и од присуства различитих секундарних метаболита. За свеобухватну процену антимикуробне активности појединачних компоненти неопходна су додатна истраживања у вези са саставом екстраката. За високу антимикуробну активност ове биљке може бити одговорно синергистичко деловање различитих компонената у екстрактима камилице.

#### 4.6.2.2. Антимикробна активност екстраката нативних цветова камилице добијених различитим екстракционим техникама

Резултати антимикробне активности водених и етанолних екстраката нативних цветова камилице добијених различитим екстракционим техникама (МЕ, УЕ, СЕ, СКВ), као и стандардних антибиотика дати су у табели 33. Добијени резултати демонстрирају антимикробну активност екстраката независно од примењеног растварача и екстракционе методе. Измерене МИС вредности биле су у интервалу од 19,53 до 312,50 µg/ml. Водени екстракти добијени екстракцијом субкритичном водом показали су највећи степен активности према линијама *Escherichia coli* и *Aspergillus niger* са МИС вредностима у износу од 39,10 µg/ml, док се бактеријски сој *Staphylococcus aureus* са МИС вредношћу од 312,50 µg/ml показао најмање осетљивим на поменути екстракт.

Када су у питању етанолни екстракти, узорци добијени МЕ техником су испољили нижу активност у односу на друге етанолне екстракте, као и у односу на екстракте добијене субкритичном водом. Тако у случају сојева *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* и *Candida albicans* МИС вредности етанолних МЕ екстраката биле су двоструко веће у односу на МИС вредности СКВ екстракта, док су у случају соја *Proteus vulgaris* поменуте вредности МЕ екстракта биле чак 4 пута веће од оних за СКВ екстракте. Имајући у виду да и сам етанол има антимикробна својства овакви резултати потврђују још једном предност субкритичне воде.

Сви водени екстракти, добијени различитим техникама, су показали значајну антимикробну активност, а у неким случајевима су се показали чак бољим и од етанолних. Иако су водени екстракти добијени СЕ техником показали нижи антиоксидативни капацитет, у случају антимикробне активности ови екстракти су били супериорнији. У случају бактеријске линије *Staphylococcus aureus* СЕ екстракти су показали бољу антимикробну моћ у односу на све друге екстракте. Ипак, у случају бактеријских линија *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris*, СКВ екстракти су имали ниже вредности МИС, указујући на њихова боља антимикробна својства.

Табела 33. Минималне инхибиторне концентрације (МИС) екстраката камилице према одабраним патогеним микроорганизмима.

Микробна линија	МИС вредности ( $\mu\text{g/ml}$ )*						
	МЕ		УЕ		СЕ		СКВ
	Етанол	Вода	Етанол	Вода	Етанол	Вода	Вода
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	156,2 $\pm$ 1,0	312,5 $\pm$ 1,0	78,1 $\pm$ 0,7	312,5 $\pm$ 2,1	156,2 $\pm$ 0,8	78,1 $\pm$ 0,0	312,5 $\pm$ 0,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	312,5 $\pm$ 1,6	312,5 $\pm$ 1,5	156,2 $\pm$ 0,8	78,2 $\pm$ 0,1	156,2 $\pm$ 0,9	78,1 $\pm$ 0,3	156,2 $\pm$ 0,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	78,1 $\pm$ 0,2	39,1 $\pm$ 0,1	39,1 $\pm$ 0,0	19,5 $\pm$ 0,8	39,1 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 0,0	39,1 $\pm$ 0,3
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	312,5 $\pm$ 1,7	78,1 $\pm$ 0,2	78,1 $\pm$ 0,1	78,1 $\pm$ 0,6	78,1 $\pm$ 0,1	156,2 $\pm$ 0,6	78,1 $\pm$ 0,4
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	78,12 $\pm$ 0,3	78,1 $\pm$ 0,3	39,1 $\pm$ 0,1	156,2 $\pm$ 0,3	78,1 $\pm$ 0,9	156,2 $\pm$ 0,3	78,1 $\pm$ 0,0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	156,25 $\pm$ 1,1	78,1 $\pm$ 0,8	78,1 $\pm$ 0,0	78,1 $\pm$ 0,0	78,1 $\pm$ 0,4	312,5 $\pm$ 0,7	156,2 $\pm$ 0,8
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	156,25 $\pm$ 0,9	78,1 $\pm$ 0,9	39,1 $\pm$ 0,2	78,1 $\pm$ 0,6	78,1 $\pm$ 0,2	78,1 $\pm$ 0,0	78,1 $\pm$ 0,5
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	39,10 $\pm$ 0,0	19,5 $\pm$ 0,0	39,1 $\pm$ 0,1	39,1 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 0,0	19,5 $\pm$ 0,6	39,1 $\pm$ 0,8

\* $\pm$ 2СД

Упркос чињеници да се о антимикробном потенцијалу камилице, као и о ефектима њених конституената доста зна, активност језичастих цветова камилице до сада није испитивана. Овим испитивањем демонстриран је њихов потенцијал, који може бити последица богатог садржаја секундарних метаболита. Имајући у виду да се ова једињења синтетишу од стране биљака као одговор на микробне инфекције (Cowan, 1999), значајан антимикробни ефекат ових екстраката је био очекиван. Узимајући у обзир повећање резистентности микроорганизама ка антибиотицима, одређивање антимикробне активности природних производа као што су екстракати камилице има велики значај за фармацеутску индустрију. Када су у питању појединачни конституенти камилице, показало

се да једињења присутна у камилици могу у значајној мери да повећају осетљивост бактерија ка многобројним клинички важним антибиотицима (Petronilho и сар., 2012). Многи конституенти камилице мењају пропустљивост ћелијског зида бактерија омогућавајући улазак егзогенних супстанци и антибиотика (Brehm-Stecher и Johnson, 2003).

#### 4.6.2.3. Антимикробна активност СКВ екстраката нативних цветова камилице

Антимикробна активност екстраката добијених субкритичном водом одређена је за 17 одабраних екстраката добијених на различитим притисцима, температурама и уз присуство модификатора. Утицај притиска на антимикробну активност СКВ екстраката приказан је у табели 34.

Табела 34. Утицај притиска на антимикробну активност СКВ екстраката.

Микробна линија	МИС вредности ( $\mu\text{g/ml}$ )*				
	10 bar	30 bar	45 bar	60 bar	90 bar
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	156,25 $\pm$ 1,2	78,125 $\pm$ 0,13	78,12 $\pm$ 0,71	156,25 $\pm$ 1,21	78,12 $\pm$ 0,82
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	39,10 $\pm$ 0,36	78,12 $\pm$ 0,11	156,25 $\pm$ 0,99	312,50 $\pm$ 1,58	156,25 $\pm$ 1,15
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19,53 $\pm$ 0,24	19,53 $\pm$ 0,03	19,53 $\pm$ 0,26	19,53 $\pm$ 0,07	19,53 $\pm$ 0,09
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	78,12 $\pm$ 0,91	78,12 $\pm$ 0,38	78,12 $\pm$ 0,64	312,50 $\pm$ 2,15	78,12 $\pm$ 0,02
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	156,25 $\pm$ 0,58	78,12 $\pm$ 0,92	78,12 $\pm$ 0,48	78,12 $\pm$ 0,64	78,12 $\pm$ 0,45
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	39,10 $\pm$ 0,00	39,10 $\pm$ 0,08	19,53 $\pm$ 0,18	39,10 $\pm$ 0,31	39,10 $\pm$ 0,21
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	19,53 $\pm$ 0,18	19,53 $\pm$ 0,00	19,53 $\pm$ 0,13	19,53 $\pm$ 0,33	19,53 $\pm$ 0,23
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	39,10 $\pm$ 0,08	19,53 $\pm$ 0,00	19,53 $\pm$ 0,00	39,10 $\pm$ 0,02	19,53 $\pm$ 0,15

\* $\pm$ 2СД

Из табеле 34 се види да су плесни биле осетљивије на дејство екстраката у односу на бактерије. Њихове МИС вредности биле су у опсегу од 19,53 до 39,1  $\mu\text{g/ml}$ . Грам негативна бактерија *Escherichia coli*, са својим МИС вредностима од 19,53  $\mu\text{g/ml}$ , је показала највећу осетљивост ка испитиваним узорцима.

Екстракт најбогатији апигенином (добијен на вредности притиска од 45 bar) показао се најпотентнијим у случају грам позитивне бактерије *Bacillus subtilis*, што се осликава нижом вредношћу инхибиторне концентрације (19,43 µg/ml) у односу на вредности осталих екстраката (39,1 µg/ml). Примећено је да је у случају екстракције на 60 bar добијени екстракт показао најнижи ниво антимикуробне способности ка микробним линијама *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Bacillus subtilis*. На већој вредности притиска (90 bar) антимикуробна активност је била идентична као и у случају екстраката добијених на нижим притисцима.

Табела 35. Утицај температуре на антимикуробну активност СКВ екстраката.

Микробна линија	МИС вредности (µg/ml)*						
	65°C	85°C	115°C	130°C	150°C	180°C	210°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	39,10±0,11	78,12±0,25	78,12±0,91	39,10±0,31	78,12±0,54	39,10±0,58	156,25±1,11
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	78,12±0,24	156,25±0,98	78,12±0,85	39,10±0,19	39,10±0,26	78,12±0,61	78,12±0,28
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19,53±0,06	19,53±0,15	39,10±0,25	39,10±0,16	19,53±0,18	78,12±0,35	19,53±0,05
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	39,10±0,19	156,25±0,96	78,12±0,11	19,53±0,27	78,12±0,98	78,12±0,39	156,25±1,68
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	312,5±1,37	78,12±0,85	156,25±0,13	78,12±0,51	78,12±0,67	78,12±0,15	78,12±0,77
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	19,53±0,46	19,53±0,21	19,53±0,51	156,25±1,2	78,12±0,85	78,12±0,36	78,12±0,76
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	19,53±0,35	39,10±0,18	39,10±0,67	19,53±0,46	19,53±0,12	19,53±0,02	78,12±0,95
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	19,53±0,17	19,53±0,85	39,1±0,05	19,53±0,24	39,10±0,31	19,53±0,11	39,10±0,38

\*±2СД

Поређење екстраката добијених на различитим температурама приказано је у табели 35. Ниже МИС вредности добијене су у случају гљивичних линија, што указује на њихову већу осетљивост у односу на тестиране грам позитивне и грам негативне бактерије.

Екстракт добијен на 210°C је испољио нижу активност према *Candida albicans* и *Staphylococcus aureus*. По питању бактерија, екстракти добијени на различитим температурама су показали највећи степен инхибирања раста микробне линије *Escherichia coli*.

Табела 36. Утицај концентрације модификатора на антимикуробну активност СКВ екстраката.

Микробна линија	МИС вредности (µg/ml)*						
	0,001 М	0,005 М	0,01 М	0,05 М	0,1 М	A <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	78,12±0,12	39,10±0,05	156,25±1,05	39,10±0,00	/	0,97±0,00	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	156,25±0,9	39,10±0,26	39,10±0,10	39,10±0,02	/	0,49±0,01	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19,53±0,08	39,10±0,15	19,53±0,25	39,10±0,21	/	0,97±0,08	/
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	39,10±0,15	156,25±1,2	156,25±0,95	78,12±0,63	/	0,49±0,00	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	39,10±0,24	78,12±0,44	78,125±0,86	39,10±0,28	/	0,49±0,10	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	78,12±0,67	78,12±0,47	156,25±0,77	78,12±0,65	/	0,24±0,00	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	78,12±0,74	39,10±0,24	19,53±0,11	39,10±0,11	/	/	1,95±0,12
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	39,10±0,31	19,53±0,15	39,1±0,06	39,10±0,15	/	/	0,97±0,15

\*±2СД; <sup>a</sup>Амрацин; <sup>b</sup>Нистатин

У табели 36 приказане су МИС вредности за екстракте добијене уз присуство модификатора различитих концентрација. Екстракт добијен уз коришћење модификатора концентрације 0,01 М показао је нижу активност према грам позитивним бактеријама у односу на друге узорке. Овај узорак, заједно са узорком добијеним уз примену модификатора концентрације 0,005 М, показао је нижу антибактеријску активност према бактеријама *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*. Ипак, оно што је најочигледније је да



екстракт добијен екстракцијом уз присуство HCl концентрације 0,1 M није показао никакву активност, ни према бактеријама, ни према плеснима. Ово може бити последица ниског садржаја флавоноида и њихових глюкозида. Наиме, у поређењу са другим екстрактима, у овом се запажа знатно нижи садржај кемферола, нарингенина, апигенина, лутеолина, апигенин-7-*O*-глюкозида, као и потпуно одсуство кверцетин-3-*O*-глюкозида, лутеолин-7-*O*-глюкозида и апигенин-7-*O*-апиоглюкозида. Поред ових класа, примећен је и нижи садржај кумаринског глюкозида - аескулина. Иако су се поједине фенолне киселине јављале само у овом екстракту, садржај *p*-хидроксисбензојеве, 5-*O*-кафеоилхиниске, као и кафене је био низак. Овакав хемијски профил свакако може условљавати изостанак антимикуробног учинка екстракта.

#### 4.6.3. Одређивање способности инхибиције одабраних ензима

##### 4.6.3.1. Инхибиција $\alpha$ -амилазе и $\alpha$ -глюкозидазе

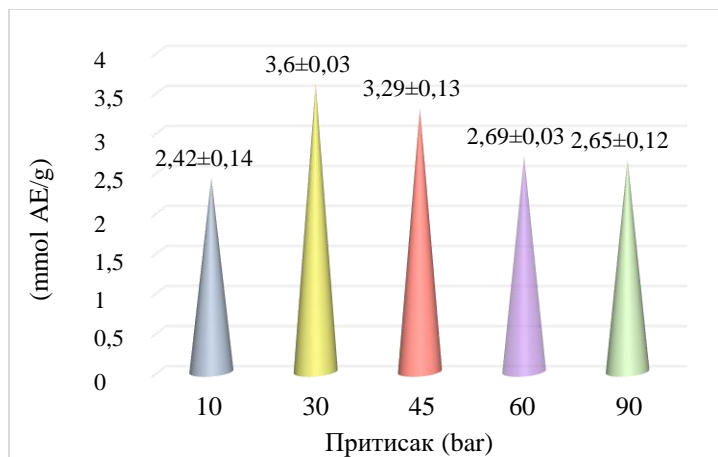
Шећерна болест, односно дијабетес (*diabetes mellitus*), је хронични, неизлечиви поремећај метаболизма, који се карактерише хипергликемијом, односно трајно повишеним нивоом глукозе у крви. Број узрочника који условљавају појаву ове болести је изузетно велики, а болест најчешће настаје услед смањене секреције и/или смањења биолошког дејства инсулина. Данас дијабетес представља један од најчешћих здравствених проблема, са преваленцом у сталном порасту. Према подацима Светске здравствене организације, број оболелих 2015. године износио је 415 милиона, а очекује се пораст броја људи са овим ендокриним обољењем, те се предвиђа да ће до 2040. године тај број порастати на чак 642 милиона. Сматра се да је оваква тенденција броја оболелих последица модерног стила живота и повећања броја спољашњих етиолошких чинилаца, међу којима се посебно издваја гојазност.

Због значаја превенције и лечења ове болести, све је већи интерес ка проналажењу нових приступа лечењу и контролисању прогреса саме болести. Једна од најприхваћенијих теорија за контролу дијабетеса последњих година јесте инхибиција деловања кључних ензима, односно  $\alpha$ -амилазе и  $\alpha$ -глюкозидазе, главних ензима у катаболизму угљених хидрата. Ови ензими каталишу хидролизу  $\alpha$ -(1,4) везе у молекулима угљених хидрата (Exteberria и сар., 2012). Инхибиција ових ензима се може сматрати веома важном алатком

за контролу нивоа глукозе у крви код пацијената оболелих од дијабетеса. Са тим у вези, синтетисано је неколико синтетичких инхибитора поменутих ензима. Међутим, показало се да ови синтетички молекули имају нежељене ефекте на организам међу које спадају и гастроинтестиналне потешкоће и поремећаји органа за варење (Van de Laar, 2008). Због овога, све је већа пажња усмерена ка проналажењу природних и безбедних инхибитора. Природни инхибитори су често конституенти биљака, односно њихових екстраката.

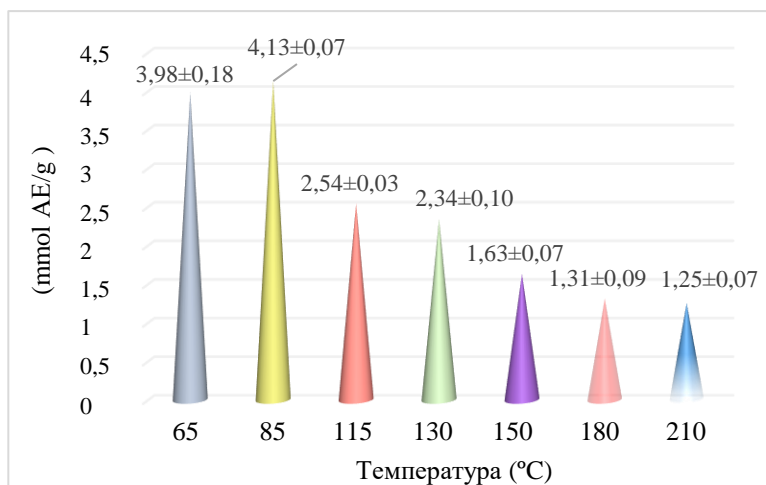
Активност СКВ екстраката камилице ка инхибирању  $\alpha$ -амилазе и  $\alpha$ -глукозидазе испитана је у оквиру ове дисертације, а добијени резултати изражени су као еквивалент акарбозе по граму сувог екстракта (mmol EA/g). Као и у претходним тестовима испитивања биолошке активности, екстракти су били подељени у три групе, на основу испитивања утицаја притиска, температуре и модификатора на ову биоактивност. Добијене вредности активности свих екстраката дате су у прилогу 9. Заједничко за све испитиване екстракте независно од начина њиховог добијања је да су показали већу активност ка инхибицији  $\alpha$ -глукозидазе него  $\alpha$ -амилазе, што је у складу са литературним подацима (Kumar и сар., 2013; Lazarova и сар., 2015).

Активности екстраката добијених при различитим вредностима притиска ка инхибицији  $\alpha$ -амилазе се нису битније разликовале. Вредности инхибиторних концентрација кретале су се од 0,44 до 0,46 mmol AE/g, док су у случају  $\alpha$ -глукозидазе ове вредности биле у опсегу 2,42-3,60 mmol AE/g. Екстракт добијен на притиску од 30 bar је испољио највећи степен инхибиције посматраних ензима (слика 71), што може бити последица највећег полифенолног садржаја. Поред садржаја укупних полифенолних једињења, у овом екстракту је детектована и највећа концентрација аескулина, хризина, 5-*O*-кафеоилхининске киселине, *p*-кумарне и елагинске киселине, као и гликозида кверцетин-3-*O*-галактозида, лутеолин-7-*O*-глукозида, апигенин-7-*O*-глукозида и апигенин-7-*O*-апиоглукозида. Оваква разлика у хемијском профилу може објаснити предност овог узорка у односу на друге екстракте када је у питању инхибиција  $\alpha$ -амилазе и  $\alpha$ -глукозидазе.



Слика 71. Способност инхибиције  $\alpha$ -глюкозидазе СКВ екстраката у зависности од притиска екстракције.

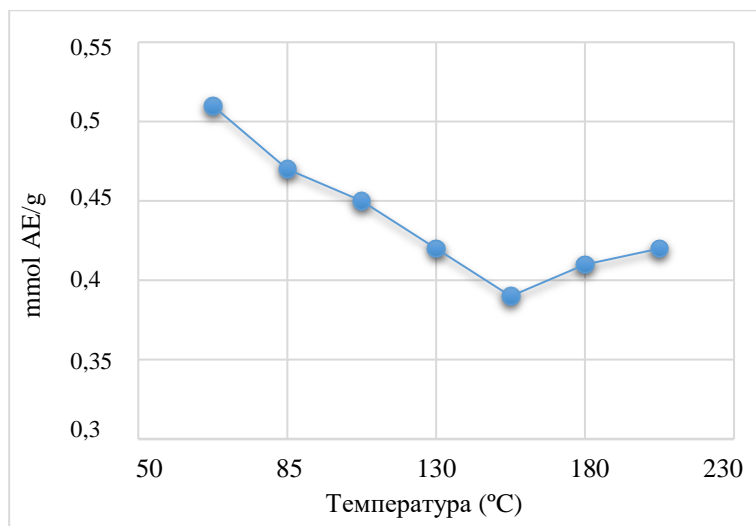
На слици 72 је приказана активност екстраката добијених при различитим температурама ка инхибицији  $\alpha$ -глюкозидазе. Са слике се уочава да је екстракт добијен на температури од 85°C испољио највећи степен инхибиције посматраних ензима (4,13 mmol AE/g). Нешто нижи потенцијал ка инхибирању испољио је екстракт добијен на температури од 65°C (3,98 mmol AE/g). Повећањем температуре изнад 85°C дошло је до константног пада активности.



Слика 72. Способност инхибиције  $\alpha$ -глюкозидазе СКВ екстраката у зависности од температуре екстракције.

На температурама изнад 130°C садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима је опадао. У екстракту који је испољио највећу активност (добијен на температури од 85°C) забележен је максимални принос *p*-кумарне, 5-*O*-кафеоилхининске, кафеене, елагинске и протокатехуинске киселине, затим кумаринског глукозида-аескулина, као и флавоноидних глукозида апингенин-7-*O*-глукозида, лутеолин-7-*O*-глукозида и нарингина (нарингенин-7-*O*-глукозид). Познато је да су у односу на своје агликоне, молекули глукозида активнији ка инхибицији  $\alpha$ -амилазе и  $\alpha$ -глукозидазе. Тако на пример, апинетрин (апингенин-7-*O*-глукозид) може да инхибира 50%  $\alpha$ -амилазе при концентрацији мањој од 0,2 mM, а лутеолин-7-*O*-глукозид при концентрацији од 5 mg/ml постиже 100% учинак. Екстракција ових компонената је ефикаснија на нижим температурама, што може бити повезано са већом способношћу ових узорака ка инхибицији испитиваних ензима.

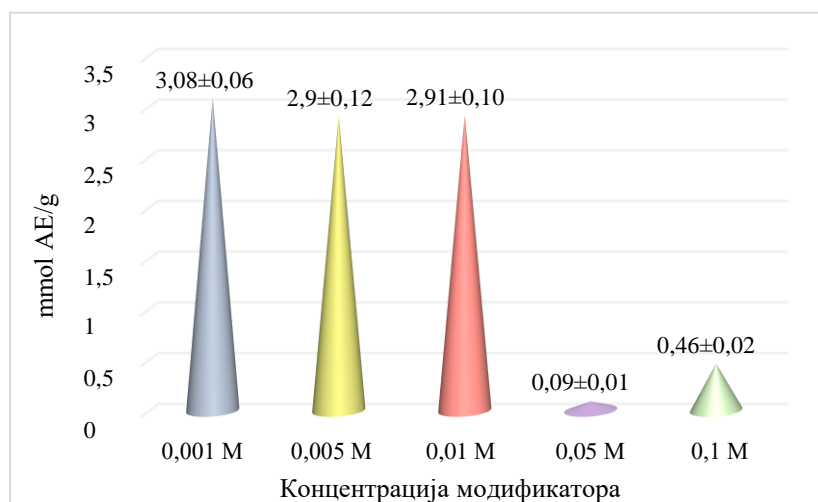
У случају инхибиције  $\alpha$ -амилазе нису уочене веће разлике у активности екстраката. Активност је била у границама 0,39 mmol AE/g (у случају екстракта добијеног на 150°C) до 0,51 mmol AE/g (у случају екстракта добијеног на 65°C). Повећање температуре изнад 65°C водило је ка смањењу активности екстраката све до температуре од 150°C, након чега је уследио благи пораст активности (слика 73).



Слика 73. Способност инхибиције  $\alpha$ -амилазе СКВ екстраката у зависности од температуре екстракције.

Утицај модификатора на активност екстраката ка инхибицији  $\alpha$ -амилазе није био велики, а и између екстраката добијеним при различитим концентрацијама модификатора није примећена велика разлика. Вредности инхибиторних концентрација су биле у опсегу од 0,39 mmol АЕ/g (за екстракте добијене при концентрацији модификатора од 0,05 М и 0,1 М) до 0,46 mmol АЕ/g (за екстракт добијен при 0,001 М). Екстракти добијени при концентрацији модификатора од 0,005 и 0,01 М показали су подједнаку активност (0,42 mmol АЕ/g).

У случају инхибиције  $\alpha$ -глукозидазе значајне разлике су биле видљиве међу узорцима, односно примећен је пад активности са порастом концентрације модификатора са 0,01 на 0,05 М (слика 74).

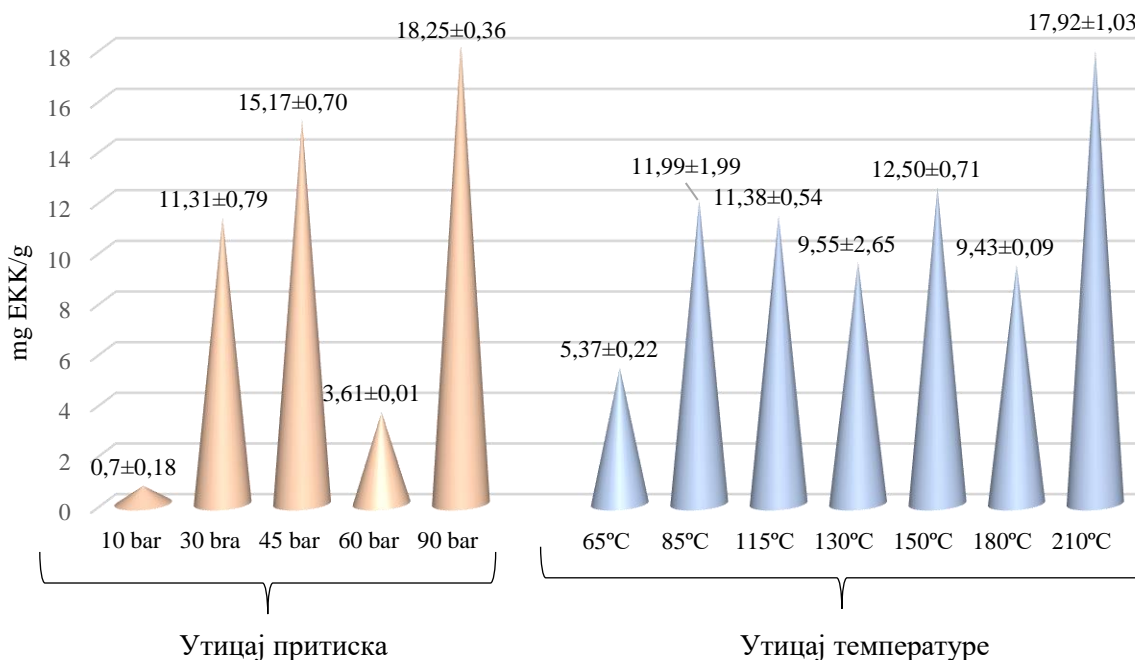


Слика 74. Способност инхибиције  $\alpha$ -глукозидазе СКВ екстраката у зависности од концентрације модификатора.

Највећа активност ка инхибицији оба ензима забележена је код екстракта добијеног екстракцијом уз присуство косолвента концентрације 0,001 М. Овај екстракт се одликовао максималним садржајем укупних фенола, флавоноида и апигенина. Такође, овај екстракт је имао највећу концентрацију других флавоноидних агликона и глукозида: кемферола, лутеолина, апигенин-7-*O*-глукозида, кемферол-3-*O*-глукозида, лутеолин-7-*O*-глукозида и кверцетин-3-*O*-галактозида, који се одликују високом способношћу инхибиције испитиваних ензима.

#### 4.6.3.2. Инхибиција тирозиназе

Тирозиназа је кључни ензим у синтези меланина и неких других пигмената, а његова повећана концентрација у организму може довести до појаве меланома. Стога, инхибиција овог ензима може бити веома важна за контролисање разних облика поремећаја на кожи, а посебно поремећаја пигментације (Shiino и сар., 2001). До сада је синтетисано неколико инхибитора овог ензима, међутим, они испољавају нусефекте, као што су висок ниво цитотоксичности или доводе до појаве дерматитиса (Chiari и сар., 2011). Због овога, наметнула се потреба ка проналажењу и изолацији природних инхибитора овог ензима. Испитана је инхибиторна моћ СКВ екстраката камилице добијених при различитим вредностима притиска, температуре и модификатора, а добијени резултати су изражени као еквивалент којичне киселине по граму сувог екстракта (mg ЕКК/g). Добијене вредности активности свих испитаних екстраката дате су у прилогу 9. Способност СКВ екстраката камилице да инхибирају активност тирозиназе у зависности од притиска и температуре екстракције приказана је на слици 75.



Слика 75. Способност инхибиције тирозиназе СКВ екстраката у зависности од притиска и температуре екстракције.

Сви екстракти камилице су показали способност инхибирања испитаног ензима. На њихову активност у значајној мери су утицали експериментални услови под којима су тестирани узорци добијени. При испитивању утицаја притиска показало се да је екстракт добијен на 10 bar испољио нижу активност у односу на све остале екстракте. Када је у питању утицај температуре, екстракт добијен на 65°C је показао најмању активност ка инхибирању овог ензима (5,37 mg ЕКК/g), док је највећу активност показао екстракт добијен на температури од 210°C (17,92 mg ЕКК/g). Разлог оваквој активности ових екстраката може бити присуство једињења нефлавоноидне структуре који такође имају склоност ка инхибирању  $\alpha$ -тирозиназе (нпр. алкалоиди).

Када је у питању екстракција уз присуство модификатора различитих концентрација, екстракт добијен уз коришћење HCl концентрације 0,05 M је показао највећу активност (табела 37). Иако је овај екстракт имао најмању способност инхибиције  $\alpha$ -глукозидазе, његов специфични полифенолни профил је допринео инхибицији тирозиназе. Код овог екстракта примећен је највећи садржај *p*-хидроксибензоеве, 5-*O*-кафеоилхининске, кафене, као и *p*-кумарне киселине. У овим екстрактима је одређен највећи садржај апигенин-7-*O*-апиоглукозида, конифералдехида и нарингенина. У односу на остале екстракте добијене уз модификатор, једино су овде били детектовани протокатехуинска и ванилинска киселина, као и аескулетин, кверцентин и флоретин.

Табела 37. Способност инхибиције тирозиназе СКВ екстраката у зависности од концентрације модификатора.

Концентрација модификатора	Инхибиција тирозиназе (mg ЕКК/g)*
0,001 M	6,23±1,80
0,005 M	9,75±0,01
0,01 M	7,45±1,31
0,05 M	20,83±4,26
0,1 M	15,72±0,86

\*±2СД

#### 4.6.4. Одређивање антипролиферативне активности екстраката камилице

##### 4.6.4.1. Одређивање антипролиферативне активности екстраката ферментисаних цветова камилице

Одређивање антипролиферативне активности екстраката ферментисаних цветова камилице изведено је применом МТТ теста. Антипролиферативна активност екстраката је одређена за три различите ћелијске линије: Нер2с-хумана ћелијска линија рака гркљана (*human larynx carcinoma*), RD-хумана ћелијска линија рабдомиосаркома (*rhabdomyosarcoma*) и L2OB-мишија туморска фибробластна линија у коју су трансфектовани неки хумани гени. Добијени резултати, приказани у табели 38, јасно показују да су сви испитани узорци показали извесни ниво антипролиферативне активности према одабраним туморским ћелијама. Добијене IC<sub>50</sub> вредности за екстракте биле су у опсегу 18,84-74,33 µg/ml, при чему су већу активност показали етанолни екстракти (Ф-УЕ) у односу на водене (Ф-УЕВ). Концентрације ових екстраката неопходне да инхибирају 50% ћелијског раста у случају Нер2с, RD и L2OB ћелија су износиле 34,36, 30,57 и 18,84 µg/ml. Ови резултати указују да су највећу цитотоксичну активност испољили екстракти ферментисаних цветова у случају L2OB ћелија (IC<sub>50</sub> =18,84 µg/ml). Међутим, предност етанолних екстраката над воденим није толико значајна у случају Нер2с и RD ћелијских линија. Концентрације водених екстраката неопходне да инхибирају 50% ћелијског раста Нер2с и RD ћелија износиле су 47,61 и 35,78. Са друге стране, у случају L2OB ћелија уочена је значајна разлика између етанолних (18,84 µg/ml) и водених екстраката (74,33 µg/ml).

Табела 38. *In vitro* цитотоксична активност ферментисаних цветова камилице.

Ћелијска линија	IC <sub>50</sub> вредност (µg/ml) *		
	Ф-УЕ	Ф-УЕВ	Cis-DDP**
Нер2с ћелије <sup>а</sup>	34,36 ± 0,58	47,61 ± 1,44	0,94 ± 0,55
RD ћелије <sup>б</sup>	30,57 ± 0,93	35,78 ± 0,32	1,4 ± 0,97
L2OB ћелије <sup>в</sup>	18,84 ± 4,25	74,33 ± 0,59	0,72 ± 0,64

\* ± 2SD; \*\*Cis- Диаминдихлороплатина (II);

<sup>а</sup>хумана ћелијска линија рака гркљана (*human larynx carcinoma*), <sup>б</sup>хумана ћелијска линија рабдомиосаркома (*rhabdomyosarcoma*), <sup>в</sup>мишија туморска фибробластна линија у коју су трансфектовани неки хумани гени.



Из приказаних резултата евидентно је да се екстракцијом ферментисаног биљног материјала могу добити екстракти високе антипролиферативне моћи. Имајући у виду да светска научна јавност наводи апигенин као један од најпотентнијих антиканцерогених агенаса данашњице, висока антипролиферативна активност испитаних екстраката свакако је последица високог садржаја поменутог флавона. Поред апигенина, на укупну антипролиферативну активност екстраката утиче и присуство других компонената, те се активност може објаснити и преко укупног механизма деловања конституената језичастих цветова камилице као модулятора цитотоксичне активности.

#### **4.6.4.2. Антипролиферативна активност екстраката нативних цветова камилице добијених различитим екстракционим техникама**

Антипролиферативна активност водених и етанолних екстраката камилице добијених помоћу МЕ, УЕ, СЕ и СКВ техника је приказана у табели 39. Антипролиферативна активност је одређена користећи три различите ћелијске линије, као и у случају ферментисаних цветова.

У поређењу са етанолним екстрактима, СКВ екстракт је показао већу активност у односу на МЕ и УЕ етанолне екстракте. Концентрације СКВ екстраката које су инхибирале 50% раста ћелија Нер2с, RD и L2OB су биле 30,54; 20,54 и 19,65  $\mu\text{g/ml}$ . Супериорност овог екстракта у односу на МЕ и УЕ етанолне екстракте се уочавала у највећој мери у случају RD ћелија, где су инхибиторне концентрације биле дупло ниже, указујући на дупло већу активност СКВ екстракта.

У односу на екстракте добијене микроталасном и Soxhlet екстракцијом, екстракт добијен субкритичном водом био је знатно потентнији у спречавању ћелијске пролиферације. Са друге стране, његова активност била је упоредива са активношћу екстракта добијеног ултразвучном екстракцијом.

Између СКВ и МЕ екстраката је уочена највећа разлика на L2OB ћелијској линији. СКВ екстракт је инхибрирао 50% ћелијског раста L2OB при концентрацији од 19,65  $\mu\text{g/ml}$ , док је МЕ водени екстракт при 94,28  $\mu\text{g/ml}$ .

Имајући на уму да је критеријум за цитотоксичну активност за биљне екстракте (у складу са Америчким националним институтом за канцер)  $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$  (Suffness и

Rezzuto, 1990), СКВ екстракти су на основу својих вредности индиковали антитуморску активност.

Table 39. *In vitro* цитотоксична активност екстраката камилице.

Ћелијска линија	IC <sub>50</sub> вредности* (µg/ml)							
	МЕ		УЕ		СЕ		СКВ	(cis-DDP)**
	Етанол	Вода	Етанол	Вода	Етанол	Вода	Вода	
<b>Нер2с</b>	44,29 ±	32,67 ±	49,26 ±	13,39 ±	15,34 ±	29,44 ±	30,54 ±	0,94 ±
<b>ћелије<sup>а</sup></b>	5,09	5,67	1,52	0,46	3,59	0,50	1,12	0,55
<b>RD</b>	40,84 ±	46,53 ±	40,83 ±	18,59 ±	17,33 ±	37,49 ±	20,54 ±	1,4 ±
<b>ћелије<sup>б</sup></b>	4,20	0,94	0,46	2,34	0,44	4,36	0,20	0,97
<b>L20B</b>	25,51 ±	94,28 ±	35,99 ±	15,34 ±	18,54 ±	54,17 ±	19,65 ±	0,72 ±
<b>ћелије<sup>в</sup></b>	1,99	7,10	4,73	0,90	4,19	0,27	0,99	0,64

\* ± 2SD; \*\* Cis- Диаминдихлороплатина (II);

<sup>а</sup>хумана ћелијска линија рака гркљана (*human larynx carcinoma*);

<sup>б</sup>хумана ћелијска линија рабдомиосаркома (*rhabdomyosarcoma*);

<sup>в</sup>мишија туморска фибробластна линија у коју су трансфектовани неки хумани гени.

#### 4.6.4.3. Антипролиферативна активност СКВ екстраката цветова камилице

Природна фенолна једињења показују способност модулације ћелијских сигналних путева који су у блиској вези са смрћу ћелија (Pan, Ghai и Но, 2008; Lantto и сар., 2009). Њихова улога као хемопревентивних агенаса је последњих година предмет проучавања, при чему су откривене многе компоненте са обећавајућим ефектима. Имајући у виду да су СКВ екстракти добијени под различитим оперативним условима показали не само разлику у количини појединих компонената, већ и у саставу, могли су се очекивати различити ефекти на пролиферацију ћелија.

Степен преживљавања ћелија (вијабилност) је измерен колориметријским МТТ тестом њихове активности и пролиферације. Добијени резултати приказани су у табели 40 и на сликама 78 и 79.

Табела 40. Утицај притиска на антипролиферативну активност СКВ екстраката ка Нер2с, RD и L2OB ћелијама.

Притисак	<i>Нер2с</i> ћелије <sup>а</sup>	<i>RD</i> ћелије <sup>б</sup>	<i>L2OB</i> ћелије <sup>в</sup>
10 bar	50,54±0,24	59,78±0,25	99,74±1,25
30 bar	11,06±1,14	27,85±0,50	30,24±0,95
45 bar	14,24±0,32	21,28±0,62	28,36±0,17
60 bar	77,55±1,52	98,15±1,94	119,08±1,91
90 bar	74,96±0,52	106,47±0,85	127,71±0,86

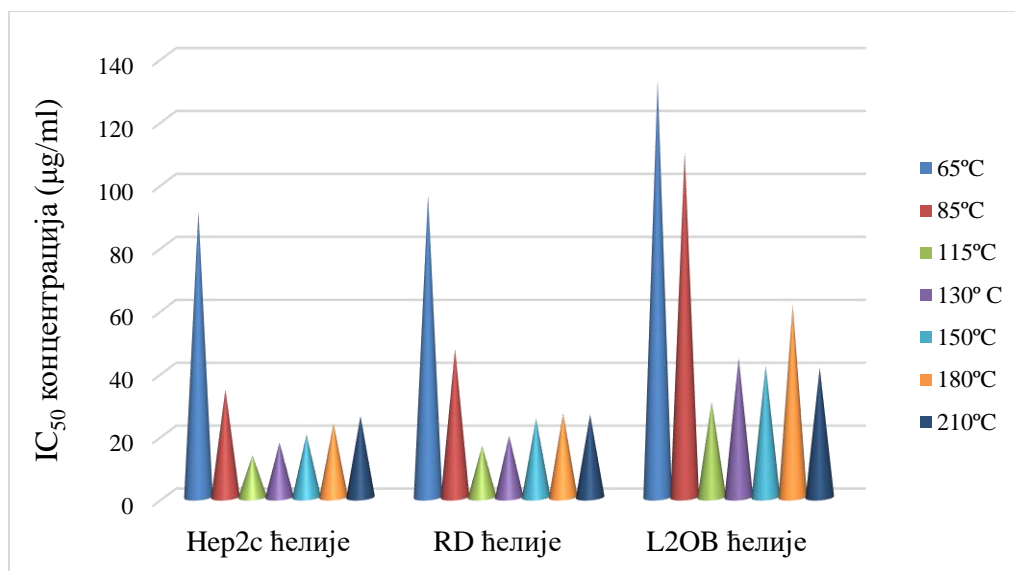
<sup>а</sup>хумана ћелијска линија рака гркљана (*human larynx carcinoma*);

<sup>б</sup>хумана ћелијска линија рабдомиосаркома (*rhabdomyosarcoma*);

<sup>в</sup> мишија туморска фибробластна линија у коју су трансфектовани неки хумани гени.

Екстракти добијени на притисцима од 60 и 90 bar су испољили најмањи цитотоксични ефекат на посматране туморске ћелије, док су екстракти добијени на 30 и 45 bar показали највећу активност. Екстракт добијен на притиску од 30 bar је показао најснажније дејство ка Нер2с ћелијској линији (11,06 µg/mL), док је према осталим туморским линијама екстракт добијен на 45 bar био потентнији. Екстракт добијен на 30 bar одликовао се највећим садржајем фенола, док је екстракт добијен на 45 bar имао највећи садржај флавоноида и апигенина. Имајући у виду огроман потенцијал апигенина у борби против различитих облика тумора, већа активност екстракта који су богатији овим једињењем може бити и последица његовог утицаја.

Утицај температуре на активност екстраката приказан је на слици 76. Инхибиторне концентрације кретале су се у опсегу од 13,44 до 132,47 µg/ml.

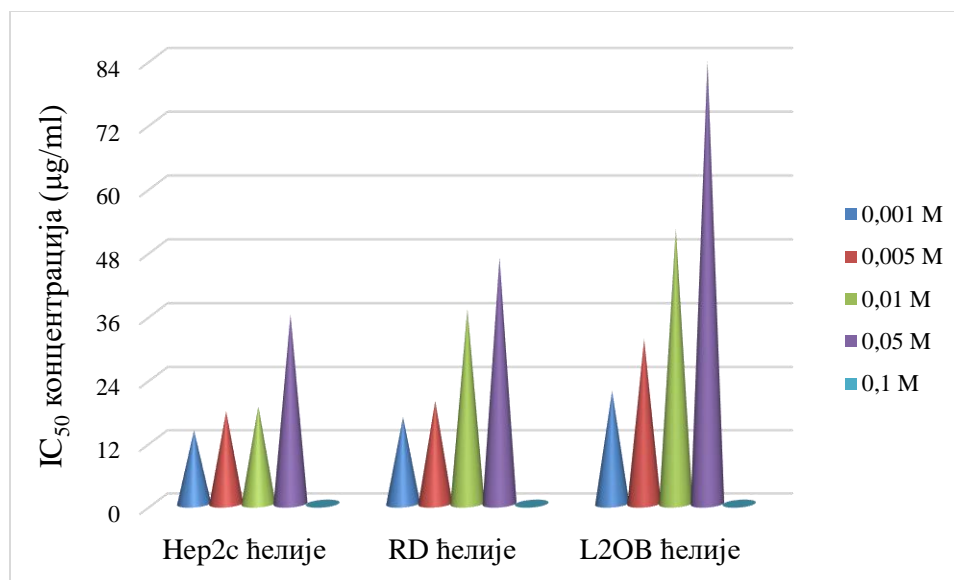


Слика 76. Утицај температуре на антипролиферативну активност СКВ екстраката.

Независно од ћелијске линије екстракти добијени на 65°C и 85°C су показали најмању активност према инхибирању раста посматраних туморских ћелија. Са друге стране, код Her2c и RD ћелија нису примећене значајне разлике са порастом температуре од 150°C до 210°C.

Независно од ћелијске линије екстракт добијен на температури од 115°C је показао највећу активност. IC<sub>50</sub> вредности за Her2c, RD и L2OB ћелије су износиле 13,44, 16,44 и 30,52 µg/ml. Поред високог садржаја апигенина, овај екстракт се одликовао и високом концентрацијом других флавоноидних агликона (нарингенин, кемферол, лутеолин) и гликозида (кверцетин-3-*O*-галактозид, кемферол-3-*O*-глукозид, рутин). Антитуморно деловање сваког од поменутих једињења је већ доказано, те њихово присуство у повећаној концентрацији у односу на остале екстракте може бити у тесној вези са значајним антитуморским деловањем екстракта.

Утицај концентрације модификатора током екстракције на антипролиферативну активност добијених екстраката приказан је на слици 77.



Слика 77. Утицај концентрације модификатора (HCl) на антипролиферативну активност СКВ екстраката.

Промене у концентрацији модификатора условиле су разлике у добијеним  $IC_{50}$  вредностима које су биле у опсегу 13,96-83,52  $\mu\text{g/ml}$ . Највећу инхибицију раста посматраних туморских ћелија испољио је екстракт добијен уз модификатор концентрације 0,001 M. Овај екстракт се уједно одликовао и највећом концентрацијом апигенина (1.700,34 mg/kg), и то далеко већом у односу на све остале екстракте. Ово може бити у тесној вези са његовом цитотоксичном активношћу. Такође, у посматраном екстракту детектована је и највећа концентрација лутеолин-7-*O*-глукозида (522,45 mg/kg), апигенин-7-*O*-глукозида (106,72 mg/kg), лутеолина (113,97 mg/kg), кемферола (90,58 mg/kg) и аескулина (147,10 mg/kg). Примећено је да са падом концентрације поменутих компонената, инхибиција раста туморских ћелија опада. Ово свакако може бити доказ корелације између садржаја флавоноида и антитуморске активности камилице. Такође, корелација је примећена и са садржајем укупних фенола и флавоноида.

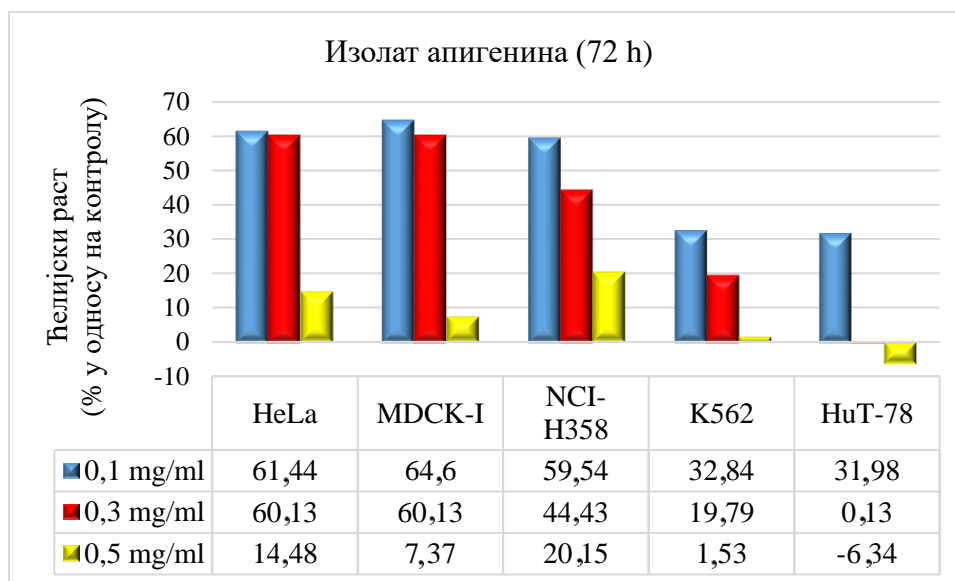
Екстракти добијени уз присуство модификатора концентрације 0,1 M нису показали активност. Код овог екстракта поред најмањег садржаја апигенина у поређењу са осталим екстрактима, примећен је и мањи садржај укупних полифенолних једињења. Одсуство многих компоненти у овом екстракту (*p*-кумарна киселина, апигенин-7-*O*-апиоглукозид,

кверцетин-3-*O*-галактозид, лутеолин-7-*O*-глукозид и др.) такође је условило одсуство активности овог екстракта.

#### 4.6.4.4. Цитотоксично деловање апигенина изолованог из цвета камилице

Биолошка активност апигенина добијеног из екстракта цветова камилице је одређена на панелу од пет различитих ћелијских линија, од којих су четири биле хуманог, а једна животињског порекла. Коришћене хумане ћелијске линије биле су следеће: аденокарцином грлића материце (HeLa); хронична мелоидна леукемија у бластичној кризи (хумана еритролеукемија) (K562); лимфом Т-ћелије (HuT-78) и бронхоалвеоларни карцином (NCI-H358). Коришћена ћелијска линија животињског порекла била је нормална епителна ћелијска линија бубрега пса (MDCK-I).

Цитотоксичност апигенина изолованог из екстракта цвета камилице приказана је на слици 78.



Слика 78. Цитотоксичност апигенина изолованог из цвета камилице.

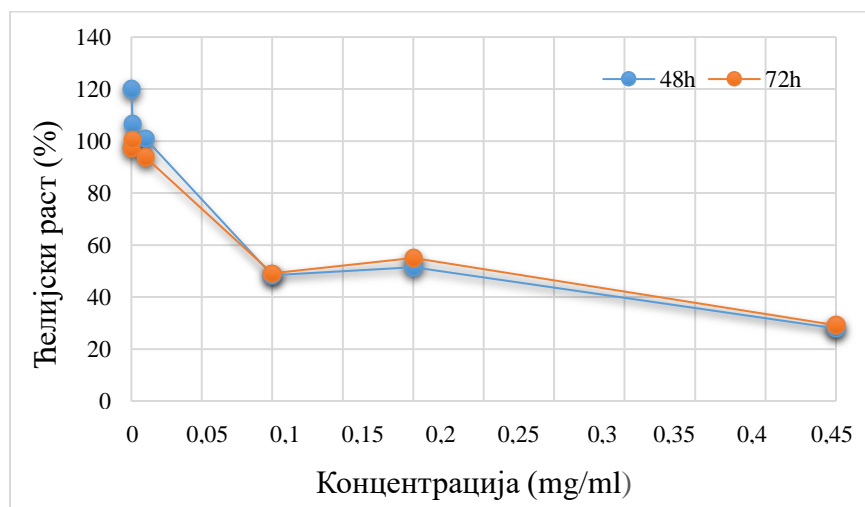
Различите ћелијске линије показале су различит степен осетљивости према изолату апигенина током излагања у трајању од 72 h. Изолат апигенина је показао највећи учинак ка леукемијским ћелијама. Са друге стране, најмање осетљивом ћелијском линијом на изолат се показала нормална MDCK-I ћелијска линија, код које је једино при примени

највеће испитиване концентracије дошло до значајнијег смањења ћелијског раста. Применом најниже испитиване концентracије апигенина проценат ћелијског раста се налазио у опсегу од 31,98 до 64,6%. Са повећањем концентracије апигенина од 0,1 до 0,3 mg/ml проценат ћелијског раста се није битније мењао у случају HeLa и MDCK-I ћелијских линија, док је у случају преосталих дошло до значајнијег смањења раста. Даље повећање концентracије апигенина (0,5 mg/ml) изазвало је смањење процента ћелијског раста на свим испитиваним ћелијским линијама.

На основу добијених резултата може се закључити да је оптимална концентracија апигенина 0,3 mg/ml, односно, третирањем ћелија апигенином у овој концентracији долази до значајног смањења ћелијског раста код три од четири испитане туморске линије. Истовремено, поменута концентracија не узрокује значајно смањење раста норманих ћелија.

#### 4.6.4.5. Морфолошке промене на HeLa ћелијској линији

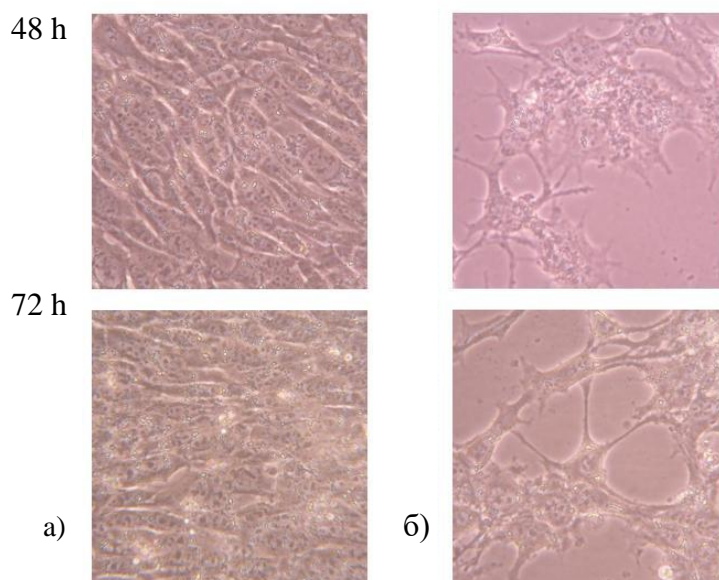
Након утврђеног цитотоксичног ефекта екстракта камилице, праћен је утицај на морфологију ћелија. Модел за посматрање морфолошких промена била је ћелијска линија HeLa. Ради потпунијег сагледавања ефеката екстракта камилице праћена је ћелијска пролиферација у трајању од 48 и 72 h. Добијени резултати приказани су на слици 79.



Слика 79. Цитотоксичност екстракта камилице на HeLa ћелијску линију након 48 и 72 h.

Ћелијска пролиферација је праћена у наведеном периоду, при чему су ћелије третиране екстрактом камилице концентрације 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 0,2 и 0,5 mg/ml. Учинак екстракта током оба периода тестирања био је сличан, што се јасно уочава и са графика (слика 79). Инхибиторне концентрације су израчунате на основу процента преживљавања HeLa ћелијске линије у временском периоду од 48 и 72 сата, и коришћене су за тест морфолошких промена HeLa ћелија.

По завршетку периода тестирања, контролне и третиране ћелије су микроскопирани, а добијени резултати су приказани на слици 80. Са слике се јасно уочава видљив утицај екстракта камилице на промену морфолошког изгледа ћелија.



Слика 80. Морфолошке промене на HeLa ћелијама под дејством екстракта камилице у концентрацији која изазива 50% преживљавање ћелија - током 48 и 72 сата.

а) контролне ћелије; б) екстракт камилице. Повећање 400x.

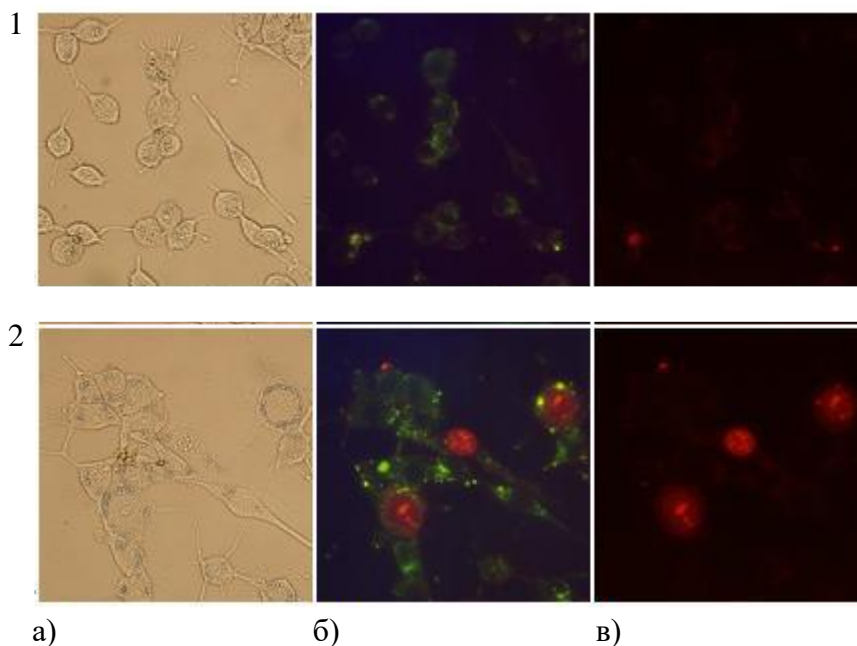
Под утицајем екстракта камилице уочен је редукован број ћелија што је указало на сам цитотоксични ефекат. Деловањем екстракта, значајно је био смањен број ћелија већ након 48 h у односу на контролне ћелије, а након времена инкубације од 72 h цитотоксични учинак је био још видљивији, као и нарушавање морфологије ћелија. Ћелије су губиле конfluентност која је била присутна код контролних ћелија. Карактеристичан развучени облик HeLa ћелија је био нарушен, што се најјасније видело након 72 сата излагања (слика 80 б) када су ћелије попримале овалан изглед. Примењени екстракт је своју активност



испољио већ након 48 h, што се јасно уочава са графика приказаног на слици 79. Добијени проценат преживљавања ћелија је готово исти при оба посматрана времена, што имплицира да продужена изложеност није потребна. При финалним концентрацијама екстракта од 0,2 и 0,5 mg/ml долазило је до појаве кристализације. Међутим, како је екстракт остварио своју  $IC_{50}$  вредност при нижим концентрацијама, појава кристализација не утиче на резултат.

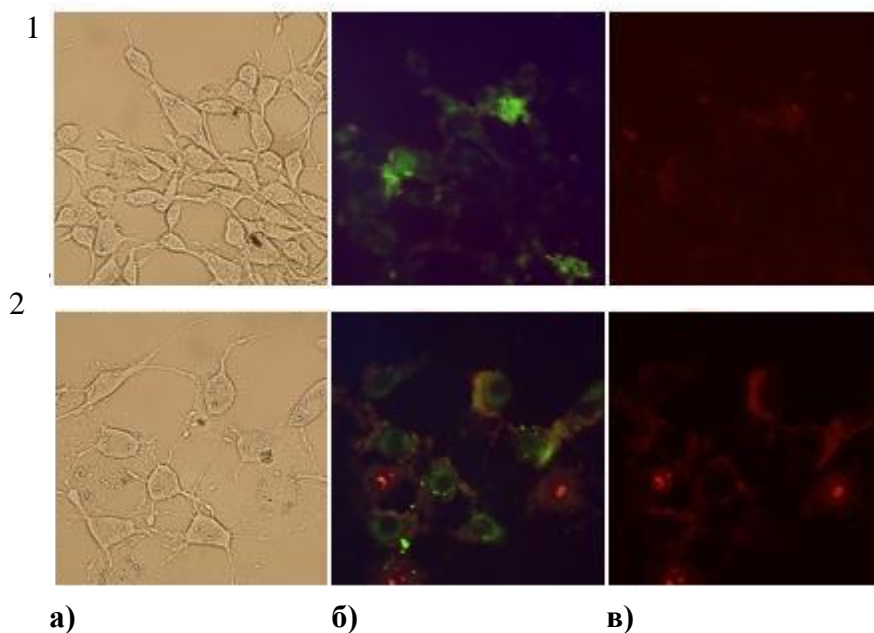
#### 4.6.4.6. Проапоптотичко деловање екстракта камилице на HeLa ћелије

Као и у случају праћења морфолошких ћелијских промена, проапоптотичко деловање екстракта камилице тестирано је на HeLa ћелијама током 24 и 48 сата. Концентрација екстракта узета за анализу била је еквивалентна  $IC_{50}$  вредности испитаног екстракта. Добијени подаци су поређени са стандардом апигенина као позитивном контролом.



Слика 81. Проапоптотичко деловање екстракта камилице на HeLa ћелијску линију након 24 сата; а) видљиво светло; б) Annexin V-FITC  $\lambda_{exc}=495$  nm,  $\lambda_{em}=525$  nm (зелена флуоресценција); в) PI  $\lambda_{exc} = 488-535$  nm,  $\lambda_{em}=612-617$  nm (црвена флуоресценција); 1) стандард апигенина (позитивна контрола); 2) екстракт камилице. Повећање 400x.

Уопштено, почетак процеса апоптозе препознаје се по благој зеленој флуоресценцији око још увек неоштећених мембрана ћелија. Код ћелија у апоптози Анексин V-FITC се веже за фосфатидил-серин који се налази на спољашњој страни мембране, а резултат се уочава као јасно видљива зелена флуоресценција. Пропидијум-јодид (PI) се примарно веже на ДНК унутар језгра што се детектује као црвено обојење. Црвено обојење је распршено по читавој ћелији, што указује да се PI везује и на једарце. Преклапање црвеног и зеленог сигнала јасно показује разлику у локализацији. Код деловања екстракта камилице јасно су видљиви апоптотички и некротични елементи деловања већ након 24 сатног излагања (слика 81). Потпуна некроза је била видљива након 48 сати, где се јасно види како PI улази у већину ћелија осликавајући црвено обојење, које је захватило распаднуте ћелије (слика 82).



Слика 82. Проапоптотичко деловање екстракта камилице на HeLa ћелијску линију након 48 сата; а) видљиво светло; б) Анексин V-FITC  $\lambda_{exc}=495\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}=525\text{ nm}$  (зелена флуоресценција); в) PI  $\lambda_{exc} = 488\text{-}535\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}=612\text{-}617\text{ nm}$  (црвена флуоресценција); 1) стандард апигенина (позитивна контрола); 2) екстракт камилице.

Тачан механизам деловања екстракта на инхибицију ћелијске пролиферације у овом раду није утврђен, али досадашња истраживања указују на неколико могућих путева деловања апигенина и сродних флавоноида. Према литературним наводима о утицају

апигенина на туморске ћелије грлића материце (HeLa), претпоставља се да апигенин инхибира раст ћелија кроз апоптозу тако што делује на активацију протеина p53, који активира транскрипцију гена укључујући p21, који на крају зауставља раст ћелија у G1 фази ћелијског циклуса. Затим долази до стварања комплекса (апаф-1/каспаза-9), што даље резултира ланчаном активацијом низводних каспаза водећи туморске ћелије у апоптозу. Апигенин такође утиче на смањену експресију Bcl-2 протеина, који делује као инхибитор програмиране ћелијске смрти (Zheng и сар., 2005). Друга могућност је да апигенин инхибира деловање ензима топоизомеразе који регулише ДНК неправилности и који је укључен у метаболизам леукемијских ћелија, укључујући контролу ДНК репликације и транскрипције (Vargo и сар., 2006).

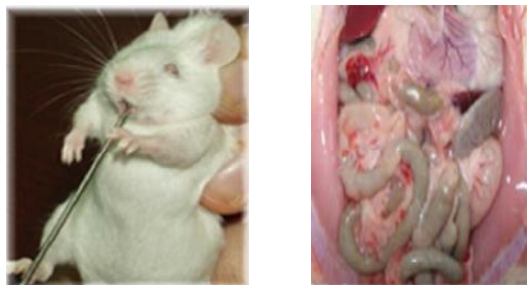
Најновија истраживања су показала да апигенин утиче на апоптозу и аутофагију истовремено. Апигенин изазива аутофагију стварањем аутофагних вакуола и повишењем концентрације LC3-II. Доказано је да апигенин инхибира и фостаидилинозитол 3-кинази/Akt/mTOR сигнални пут који је битан у негативној регулацији аутофагије. Деловањем инхибитора аутофагије као што је 3-МА (3-метиладенин), појачава се учинак апоптозе. Ово истраживање објашњава како одређени хемотерапеутици инхибирајући аутофагију и истовремено појачавајући апоптозу дају резултате у превенцији настанка тумора (Сао и сар., 2013).

Резултати истраживања на хуманој ћелијској линији леукемије (HL-60) потврдили су да флавоноиди индукују губитак митохондријског трансмембранског потенцијала што доводи до отпуштања цитохрома Ц у цитосол и активације низводних каспаза, које подстичу програмирану ћелијску смрт. Као главни флавоноид са проапоптотичким деловањем истакнут је апигенин (Wang и сар., 1999). Објављени резултати истраживања о утицају апигенина и сродних флавоноида на туморске ћелије и сигналне путеве укључене у смрт изложених ћелија могу објаснити утицај екстракта камилице.

#### 4.6.5. *In vivo* одређивање анти-мотилитетне активности екстраката нативних и ферментисаних цветова

Под појмом функционалних гастроинтестиналних поремећаја подразумева се скуп симптома и стања за које је карактеристичан појачан или смањен мотилитет црева. То значи да глатка мускулатура црева прејако, преслабо или потпуно неконтролисано реагује на надражаје узрокујући поремећаје у протицању цревног садржаја кроз дигестивни тракт, узрокујући опстипацију или дијареју. За такве поремећаје је карактеристичан абдоминални бол - грчеви који могу бити изузетно болни. Познато је да апигенин има изражено спазмолитичко, односно анти-мотилитетно дејство и то чак 3,27 пута јаче него официјални спазмолитик папаверин (Пекић и Зековић, 1994). Повећање концентрације апигенина у камилици процесом ферментације води ка добијању екстраката са повећаним садржајем апигенина, те се очекује и повећано анти-мотилитетно деловање оваквих екстраката.

Испитано је анти-мотилитетно дејство екстраката нативних и ферментисаних (Н-УЕ и Ф-УЕ) цветова камилице. Апликација испитиваних екстраката вршена је перорално (слика 83).



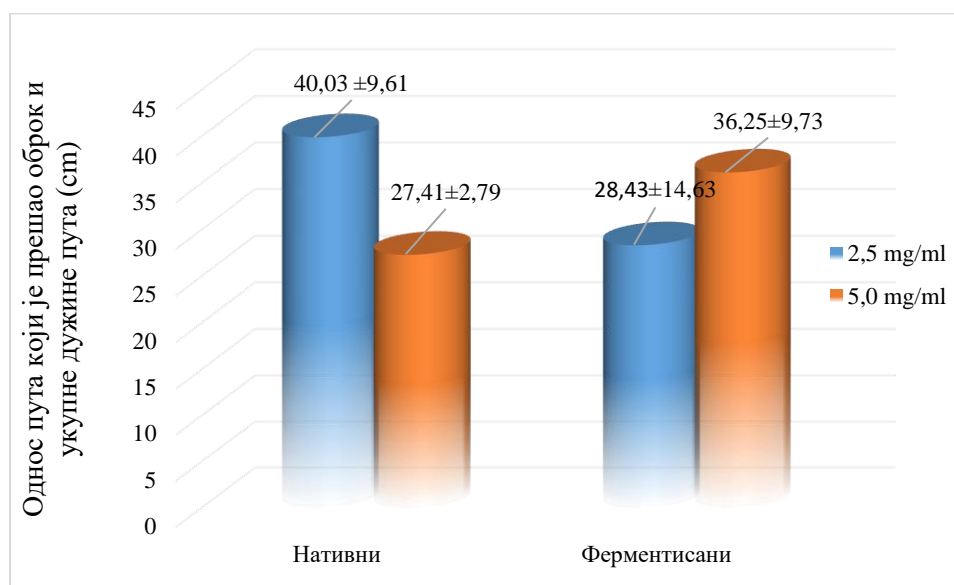
Слика 83. Перорално уношење испитиваних екстраката и изглед интестиналног тракта жртвоване животиње након спроведене *in vivo* анализе.

Добијени резултати су указали да су екстракти и нативних и ферментисаних цветова ефикасно смањили мотилитет црева експерименталних животиња у поређењу са контролном групом. Међутим, показале су се одређене разлике између тестираних узорака (Слика 84).

Резултати су приказани као однос пута које је прошао оброк са активним угљем од пилоруса (желудачног излаза) и укупне дужине танког црева. Ова дистанца, за прву тестирану групу животиња (контролна група која је орално храњена физиолошким

раствором) је била  $40,34 \pm 5,46$  cm и слична је оној добијеној за Н-УЕ екстракт ( $40,03 \text{ cm} \pm 9,61$ ) при дози од 5 mg/kg. У случају Н-УЕ екстракта концентрације 2,5 mg/kg пређени пут је износио  $27,41 \pm 2,79$  cm. Са друге стране, у случају Ф-УЕ екстракта, мања концентрација (2,5 mg/kg) прошла је мању дистанцу ( $28,43 \pm 14,63$  cm) него већа концентрација истог екстракта ( $36,25 \pm 9,73$  cm).

Према приказаним резултатима, разлике између активности екстраката нативних и ферментисаних цветова су јасно уочљиве. Ферментисани цветови су показали већу ефикасност у смањењу мотилитета црева него нативни, што може бити последица различите концентрације апигенина. Из добијених резултата се може закључити и да апигенин смањује гастроинтестиналну мотилност до одређене концентрације након чега се са повећањем концентрације испољава супротан ефекат.



Слика 84. Цревна покретљивост код мишева третираних са различитим концентрацијама екстраката ферментисаних и нативних цветова камилице.

Различита испитивања су спровођена у циљу одређивања ефеката апигенина на гастроинтестинални мотилитет. С тим у вези, поменути ефекти апигенина су поређени са ефектима других флавоноида (кверцетин, патулетин и лутеолин), при чему је апигенин изразио далеко већу потентност. Установљено је да апигенин примењен у концентрационом опсегу 12,5-50 mg/kg смањује пролазно време у танком и дебелом цреву мишева код којих је индукована дијареја рицинусом. Спровођењем *in vivo* анализа на пацовима установљено

је да апигенин заједно са  $\alpha$ -бисабололом (једним од важнијих конституената цвасти камилице садржан у етарском уљу) инхибира развој чирева на желуцу индукованих индометацином, стресом и алкохолом (Szelenyi и сар., 1979). Катехин примењен у дозама чак и до 200 mg/kg не показује слично дејство (Di Carlo и сар., 1993).

Истраживање реализовано у оквиру ове докторске дисертације обухватило је испитивање различитих екстракционих техника погодних за изоловање апигенина, фармаколошки значајног флавоноида, а добијени резултати јасно показују предности субкритичне воде. Узимајући у обзир висок хидролитички потенцијал субкритичне воде, оптимизација процеса екстракције субкритичном водом је била изведена у правцу максималне конверзије везаних облика апигенина у агликон. Екстракти добијени овом „зеленом“ техником су се одликовали високим садржајем апигенина, али и других полифенолних компонената. Богат полифенолни профил и присуство других ко-екстрахованих биолошки активних једињења, омогућио је високу биолошку активност екстраката. Испитивања биолошке активности су потврдила висок антиоксидативни, антирадикалски, антимикуробни, антипролиферативни капацитет екстраката, као и њихову способност да инхибирају одабране биолошки важне ензиме. Процесом ферментације биљног материјала се такође може повећати садржај апигенина. Екстракти су се одликовали нижом биолошком активношћу у односу на екстракте припремљене субкритичном водом. Поред тога, предности примене субкритичне воде за изоловање природних биоактивних једињења се огледају и њеној апсолутној нетоксичности, „зеленом“ карактеру, као и цени чинећи је чини погодном за примену у фармацеутској индустрији.

## *5. Закључци*

- Екстракција ферментисаних цветова је извођена етанолом применом ултразвучне екстракције, а процес је оптимизован методом одзивне површине. Добијени екстракти су се одликовали високом концентрацијом апигенина (0,78 mg/ml).
- Екстракција нативних цветова је извођена применом Soxhlet, ултразвучне, микроталасне и субкритичне екстракције (СКВ). Применом субкритичне екстракције водом добијени су екстракти са највећим садржајем укупних фенола и флавоноида.
- Оптимизација екстракције субкритичном водом је изведена на основу садржаја апигенина. Одређени оптимални услови за екстракцију субкритичном водом подразумевали су однос дрога:растварач 1:30, брзину мешања 3 Hz, притисак 45 bar, температуру 115°C, време екстракције 30 мин, концентрацију модификатора 0,001 M. Принос апигенина остварен под оптимизованим условима је износио 13 mg/g дроге (одређен спектрофотометријском методом).
- Из екстраката добијеним под оптималним условима субкритичне екстракције водом изведена је изолација апигенина применом колонске хроматографије. Добијени апигенин је прекристалисан, а његова чистоћа је потврђена применом HPTLC-UV/VIS методе.
- Применом UHPLC-DAD-HESI-MS/MS методе одређен је хемијски састав екстраката добијених субкритичном водом. Утврђено је присуство флавоноида, њихових гликозида, фенолних киселина, као и других једињења полифенолне структуре. Укупан број идентификованих једињења је износио 27. У свим анализираним екстрактима апигенин је био доминантна компонента.
- Применом UHPLC-DAD-HESI-MS/MS испитан је утицај притиска, температуре и модификатора на квалитативни и квантитативни састав екстраката добијених субкритичном водом.
- Притисак је испољио значајан утицај на полифенолни садржај субкритичних водених екстраката. Садржај апигенина варирао је у зависности од вредности примењеног притиска, и кретао се у границама од 61,53 до 1.344,99 mg/kg. Концентрација његовог гликозида била је у опсегу од 4,35 до 139,22 mg/kg.
- Температура је, као што је и очекивано, условљавала значајне разлике у хемијском саставу добијених екстраката. Садржај апигенина се кретао у опсегу 230,98-1.501,25



mg/kg. Максимални принос је био осварен на температури од 115°C. Концентрације апигенин-7-О-глукозида су се кретале у границама 0,09-158,33 mg/kg.

- Коришћењем модификатора (хлороводоничне киселине) концентрације 0,001 М садржај апигенина у екстрактима се повећао до 1.700,34 mg/kg. Употреба модификатора веће концентрације водила је ка смањењу садржаја апигенина.
- Биолошки потенцијал је одређен у екстрактима нативних и ферментисаних цветова. Екстракти ферментисаних цветова су окарактерисани у погледу њихове антирадикалске, антимикробне и антипролиферативне активности. Утврђен је висок степен свих посматраних активности.
- Екстракти нативних цветова добијени субкритичном водом су показали значајно већу биолошку активност у односу на екстракте добијене другим техникама (ултразвучна, микроталасна, Soxhlet екстракција).
- Биолошка активност екстракта добијених субкритичном водом је утврђена испитивањем њихове антиоксидативне и антирадикалске активности, затим антимикробне, антипролиферативне, као и способности да делују као инхибитори одређених ензима. Испитан је утицај притиска, температуре и концентрације модификатора на биолошку активност.
- Применом седам различитих тестова, који су посматрали различите механизме деловања, детаљно је испитан антиоксидативни потенцијал одабраних СКВ екстракта. Температура је имала значајан утицај на антиоксидативну активност екстракта.
- Антимикробна активност СКВ екстракта одређена је за осам микробних линија, а добијене вредности су упоређене са вредностима стандардних антибиотика (нистатином и амрацином). Остварене минималне инхибиторне концентрације кретале су се у границама 19,53-156,25 µg/ml.
- Антидијабетско деловање СКВ екстракта испитано је мерењем њихове способности да инхибирају активност α-амилазе и α-глукозидазе, главних ензима у катаболизму угљених хидрата. У случају α-амилазе добијене вредности кретале су се у опсегу 0,39-0,47 mmol АЕ/g, док су у случају α-глукозидазе биле 0,09-3,98 mmol АЕ/g. Способност СКВ екстракта да инхибирају тирозиназу је била дефинисана еквивалентом којичне киселине који се кретао у опсегу 0,7-20,83 mg ЕКК/g у

зависности од притиска и температуре екстракције, као и од концентрације модификатора.

- Антипролиферативна активност СКВ екстраката је испитана на три различите ћелијске линије. Сви испитани екстракти су показали изузетно висок степен антипролиферативног деловања. Код екстраката добијених субкритичном водом примећена је зависност инхибиторних концентрација екстраката од садржаја апигенина.
- Анти-мотилитетно деловање екстраката ферментисаних и неферментисаних цветова камилице одређено је *in vivo* експериментима на мишевима. Екстракти ферментисаних цветова су испољили већу антимотилитетну активност, што се могло повезати са већим садржајем апигенина. При већим концентрацијама екстраката испољавао се супротан ефекат.

## *6. Литература*

- Abert, V.M., Fernandez, X., Visinoni, F., Chemat F., 2008. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *J. Chrom. A.* 1190, 14-17.
- Acworth, I., 2003. *The Handbook of Redox Biochemistry*. ESA. Chelmsford, USA.
- Afanas'ev, I.B., Dcrozshko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A., Potapovitch, A.I., 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1763–1769.
- Aggarwal, B.B., Shishodia, S., 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.* 71, 1397–1421.
- Alcaráz, L.E., Blanco, S.E., Puig, O.N., Tomás, F., Ferretti, F.H., 2000. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theor. Biol.* 205, 231–240.
- Aljancić, I., Vajs, V., Menković, N., Karadžić, I., Juranić, N., Milosavljević, S., Macura, S., 1999. Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* subsp. *multifida*: antimicrobial activity. *J. Nat. Prod.* 62, 909–911.
- Amat, A., Dementia, C., De Angelis, F., Sgamellotti, A., Fantacci, S., 2009. Absorption and emission of the apigenin and luteolin flavonoids: A TDDFT investigation. *J. Phys. Chem. A* 113, 15118–15126.
- Amat, A., Clementi, C., Miliani, C., Romani, A., Sgamellotti, A., Fantacci, S., 2010. Complexation of apigenin and luteolin in weld lake: a DFT/TDDFT investigation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 6672–6684.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Trinajstić, N., 2003. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat. Chim. Asta* 76, 55–61.
- Amoros, M., Simões, C.M.O., Girre, L., Sauvager, F., Cormier, M., 1992. synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.* 55, 1732–1740.
- Arai, S., Mori, T., Miki, W., Yamaguchi, K., Konosu, S., Satake, M., Fujita, T., 1987. Pigmentation of juvenile coho salmon with carotenoid oil extracted from Antarctic krill. *Aquaculture* 66,

255–264.

- Arima, H., Danno, G., 2002. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1727–1730.
- Barbero, G.F., Palma, M., Barroso, C.G., 2006. Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from peppers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3231–3236.
- Bashir, A.K., Abdalla, A.A., Wasfi, I.A., Hassan, E.S., Amiri, M.H., Crabb, T.A., 1994. Flavonoids of *Limonium axillare*. *Pharm. Biol.* 32, 366–372.
- Basile, A., Giordano, S., López-Sáez, J.A., Cobianchi, R.C., 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52, 1479–1482.
- Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D., Castaldo Cobianchi, R., Vuotto, M.L., Ferrara, L., 2000. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia* 71, S110–S116.
- Bevilacqua, L., Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasionowska, R., 2004. Identification of compounds in wine by HPLC-tandem mass spectrometry. *Annali di Chimica.* 94, 679–689.
- Birt, D.F., Mitchell, D., Gold, B., Pour, P., Pinch, H.C., 1997. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res.* 17, 85–91.
- Birt, D.F., Walker, B., Tibbels, M.G., Bresnick, E., 1986. Anti-mutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* 7, 959–963.
- Biyiti, L., Pesando, D., Puisseux-Dao, S., 1988. Antimicrobial activity of two flavanones isolated from the cameroonian plant *erythrina sigmoidea*. *Planta Med.* 54, 126–128.
- Blekić, M., Jambrak, A.R., Chemat, F., 2011. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 3, 32–47.
- Boik, J., 2001. Natural compounds in cancer therapy. Oregon Medical Press. Princeton, USA.
- Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O., Savoia, D., 2000. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 174–177.

- Bousbia, N., Abert Vian, M., Ferhat, M.A., Petitcolas, E., Meklati, B.Y., Chemat, F., 2009. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* 114, 355–362.
- Box, G.E.P., Draper, N.R., 1987. Empirical model building and response surfaces. John Wiley & Sons. New York, USA.
- Božin, B., 2009. Biohemijska i farmakološka ispitivanja vrsta roda *Allium* L. (Sect. *Allium*). Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Brachet, A., Christen, P., Veuthey, J.L., 2002. Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem. Anal.* 13, 162–169.
- Brehm-Stecher, B.F., Johnson, E.A., 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3357–3360.
- Britton, G., 1983. The biochemistry of natural pigments. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Buldini, P.L., Ricci, L., Sharma, J.L., 2002. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *J. Chromatogr. A* 975, 47–70.
- Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* 67, 2141–2153.
- Cadenas, E., Davies, J.A.K., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Rad. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Camel, V., 2001. Recent extraction techniques for solid matrices - supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst* 126, 1182–1193.
- Carr, A.G., Mammucari, R., Foster, N.R., 2011. A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chem. Eng. J.* 172, 1–17.
- Carrillo, C., Cafferata, E.G., Genovese, J., O'Reilly, M., Roberts, A.B., Santa-Coloma, T.A., 1998. TGF-beta 1 up-regulates the mRNA for the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in neonatal rat cardiac

- myocytes. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 44, 543–551.
- Carter, P., 1971. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal. Biochem.* 40, 450–458.
- Cao, X., Liu, B., Cao, W., Zhang, W., Zhang, F., Zhao, H., Meng, R., Zhang, L., Niu, R., Hao, X., Zhang, B., 2013. Autophagy inhibition enhances apigenin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Chin J Cancer Res* 25, 212-222.
- Caili, F., Haijun, T., Quanhong, L., Tongyi, C., Wenjuan, D., 2006. Ultrasound assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrason. Sonochem.* 13, 511-516.
- Calderon, P.B., Robertfroid, M., 1988. Free radicals and free radical-mediated toxicity *J. Pharm. de Belgique*, 43, 390-400.
- Chacha, M., Bojase-Moleta, G., Majinda, R.R.T., 2005. Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. *Phytochemistry* 66, 99–104.
- Chandrashekhar, V.M., Ranpariya, V.L., Ganapaty, S., Parashar, A., Muchandi, A.A., 2010. Neuroprotective activity of *Matricaria recutita* Linn against global model of ischemia in rats. *J. Ethnopharmacol.* 127, 645–651.
- Chandrashekhar, V.M., Halagali, K.S., Nidavani, R.B., Shalavadi, M.H., Biradar, B.S., Biswas, D., Muchchandi, I.S., 2011. Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model. *J. Ethnopharmacol.* 137, 336–340.
- Chatterjee, S.N., Agarwal, S., 1988. Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.*, 4, 51-72.
- Chemat, F., Grondin, I., Chan Cheon Sing A., Smadja, J., 2004. Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* 11, 13–15.
- Chemical Sources International (2000). All chemical suppliers for apigenin. *Chem. Sources Chemical Search* [<http://kw1.innova.net>].
- Cheng, P.C., Wong, G., 1996. Honey bee propolis: prospects in medicine. *Bee World* 77, 8–15.
- Chen, T., Li, L.P., Lu, X.Y., Jiang, H. Di, Su, Z., 2007. Absorption and excretion of luteolin and apigenin in rats after oral administration of *Chrysanthemum morifolium* extract. *J. Agric.*

- Food Chem. 55, 273–277.
- Chiari, M.E., Vera, D.M.A., Palacios, S.M., Carpinella, M.C., 2011. Tyrosinase inhibitory activity of a 6-isoprenoid-substituted flavanone isolated from *Dalea elegans*. Bioorg. Med. Chem. 19, 3474–3482.
- Choi, M.P.K., Chan, K.K.C., Leung, H.W., Huie, C.W., 2003. Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. J. Chromatogr. A 983, 153–162.
- Choi, J.S., Choi, Y.J., Park, S.H., Kang, J.S., Kang, Y.H., 2004. Flavones mitigate tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule - Upregulation in cultured human endothelial cells: Role of nuclear factor-kappa B. J. Nutr. 134, 1013–1019.
- Cooper G.M, Hausman R.E., 2004. Stanica, molekularni pristup. Medicinska naklada, Zagreb, Hrvatska.
- Cotelle, N., 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. Curr. Top. Med. Chem. 1, 569–590.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12,564–582.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P., 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. Ultrason. Sonochem. 15, 898–902.
- Criado, M.R., Torre, S.P., Pereiro, I.R., Torrijos, R.C., 2004. Optimization of a microwave-assisted derivatization–extraction procedure for the determination of chlorophenols in ash samples. J. Chromatogr. A. 1024, 155–163.
- Curren, M.S.S., King, J.W., 2001. Solubility of triazine pesticides in pure and modified subcritical water. Anal. Chem. 73, 740–745.
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C., 1992. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. Biosci Biotech Biochem. 56, 324–325.
- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Mašković, P., Savić, S., Nikolić, L., 2015a. Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds. Ind. Crops Prod. 65,



582–591.

- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Zeković, Z., Savić, S., Vulić, J., Mašković, P., Četković, G., 2015b. Comparative analysis of antioxidant, antimicrobiological and cytotoxic activities of native and fermented chamomile ligulate flower extracts. *Planta* 242, 721–732.
- Čanadanović-Brunet, J., 1998. Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti, Zadužbina Andrejević, Beograd, Srbija.
- Čanadanović-Brunet, J.M., Četković, G.S., Djilas, S.M., Tumbas, V.T., Savatović, S.S., Mandić, A.I., Markov, S.L., Cvetković, D.D., 2009. Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 269–278.
- D’Auréaux, B., Toledano, M.B., 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 813–824.
- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313–7352.
- Damjanovic, B.M., Skala, D., Petrovic-Djakov, D., Baras, J., 2003. A comparison between the oil, hexane extract and supercritical carbon dioxide extract of *Juniperus communis* L. *J. Essent. Oil Res.* 15, 90–92.
- Damjanović, B., 2005. Ispitivanje ekstrakcije ploda morača (*Foeniculum vulgare* Mill.) natkritičnim ugljen-dioksidom. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet. Novi Sad.
- Das, M., 2014. Chamomile: Medicinal, Biochemical and Agricultural Aspects. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
- Dasgupta, A., Klein, K., 2014. Antioxidants in food, vitamins and supplements-prevention and treatment of disease. Elsevier Inc. San Diego, USA.
- Dastidar, S.G., Manna, A., Kumar, K.A., Mazumdar, K., Dutta, N.K., Chakrabarty, A.N., Motohashi, N., Shirataki, Y., 2004. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *Int J Antimicrob Agents* 23, 99–102.
- de Laurentis, N., Rosato, A., Gallo, L., Leone, L., Milillo, M.A., 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Myrtus communis*. *Riv. Ital. EPPOS* 39, 3–8.

- de Oliveira, S., de Souza, G.A., Rodrigues Eckert, C., Silva, T.A., Sobral, E.S., Fávero, O.A., Ferreira, M.J.P., Romoff, P., Baader, W.J., 2014. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova* 37, 497-503.
- de Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J.C., 2003. Application of LC-MS for the identification of polyphenols: Santos-Buelga, C., Williamson, G., (Eds.), *Methods in Polyphenol Analysis*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, U.K.
- Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J.A., Morales, F.J., 2005. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7832–7836.
- Deng, Y., Lee, J.P., Tianasoa-Ramamonjy, M., Snyder, J.K., Des Etages, S.A., Kanada, D., Snyder, M.P., Turner, C.J., 2000. New antimicrobial flavanones from *physena madagascariensis*. *J. Nat. Prod.* 63, 1082–1089.
- Deng, C., Li, N., Zhang, X., 2004. Rapid determination of essential oil in *Acorus tatarinowii* Schott. by pressurized hot water extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1059, 149–155.
- Deng, C., Ji, J., Wang, X., Zhang, X., 2005. Development of pressurized hot water extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of ligustilides in *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis*. *J. Sep. Sci.* 28, 1237–1243.
- Dewick, P.M., 2009. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*, John Wiley & Sons Ltd. Chippingham, UK.
- Di Carlo, G., Autore, G., Izzo, A.A., Maiolino, P., Mascolo, N., Viola, P., Diurno, M.V., Capasso, F., 1993. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure–activity relationships. *J. Pharm. Pharmacol.* 45, 1054–1059.
- Dighe, R.D., Shiradkar, M.R., Rohom, S.S., Dighe, P.D., 2011. Synthesis and SAR of methyl linked cyclohexyl thiophenyl triazoles for their anti-alzheimer activity. *Der Chem. Sin.* 2, 70–87.

- Dimitrijević, D., 2014. Analiza hemijskog sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakata duda (*Morus* spp. *Moraceae*). Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet Niš.
- Dixon, R.A., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085–1097.
- Dixon, R.A., Howles, P.A., Lamb, C., He, X.Z., Reddy, J.T., 1998. Prospects for the metabolic engineering of bioactive flavonoids and related phenylpropanoid compounds. *Adv. Exp. Med. Biol.* 439, 55–66.
- Drmić, H., Jambrak, A.R., 2010. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2, 22–33.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., 1997. The effect of ultrasound on the structure and properties of the water-soluble corn hull heteroxylan. *Ultrason. Sonochem.* 4, 305–309.
- El-Lakany, A.M., Abdel-Kader, M.S., Hammoda, H.M., Ghazy, N.M., Mahmoud, Z.F., 1997. A new flavone glycoside with antimicrobial activity from *Carduus pycnocephalus* L. *Pharmazie* 52, 78–79.
- Encarnacion D., R., Ochoa, N.A., Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P.H., 1994. Two new flavones from *Calliandra californica*. *J. Nat. Prod.* 57, 1307–1309.
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37, 277–285.
- Espín, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J., 2000. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* 48, 648–656.
- Etxeberria, U., de la Garza, A.L., Campión, J., Martínez, J.A., Milagro, F.I., 2012. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert Opin. Ther. Targets* 16, 269–297.
- Fairbanks, H.V., 1984. Drying powdered coal with the aid of ultrasound. *Powder Technol.* 40, 257–264.
- Faizi, S., Ali, M., 1999. Shamimin: A new flavonol c-glycoside from leaves of *Bombax ceiba*. *Planta Med.* 65, 383–385.

- Fattahi, M., Nazeri, V., Torras-Claveria, L., Sefidkon, F., Cusido, R.M., Zamani, Z., Palazon, J., 2013. Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild growing populations of *Dracosephalum kotschyi* by LC–DAD–ESI-MS. *Food Chem.* 141, 139–146.
- Fernández-González, V., Concha-Graña, E., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2008. Pressurized hot water extraction coupled to solid-phase microextraction - gas chromatography - mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *J. Chromatogr. A* 1196-1197, 65–72.
- Font, N., Hernández, F., Hogendoorn, E., Baumann, R., van Zoonen, P., 1998. Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography - UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J. Chromatogr. A* 798, 179–186.
- Frank, T.C., Downey, J.R., Gupta, S.K., 1999. Quickly screen solvents for organic solids. *Chem. Eng. Prog.* 95, 41–61.
- Franke, R., H. Schilcher, 2005. Chamomile: industrial profiles, series: medicinal and aromatic plants: industrial profiles. CRC Press/Taylor & Francis Group. New York, USA.
- Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65, 1545–1560.
- Fukui, H., Goto, K., Tabata, M., 1988. Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 36, 4174–4176.
- Gafner, S., Wolfender, J.L., Mavi, S., Hostettmann, K., 1996. Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Med.* 62, 67–69.
- Gašić, U.M., Natić, M.M., Mišić, D.M., Lušić, D. V., Milojković-Opsenica, D.M., Tešić, Ž.L., Lušić, D., 2015. Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *J. Food Compos. Anal.* 44, 128–138.
- Galkin, A.A., Lunin, V. V, 2005. Subcritical and supercritical water: a universal medium for chemical reactions. *Russ. Chem. Rev.* 74, 21–35.
- Gerhauser, C., 2005. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Cancer*

41, 1941–1954.

Gould, K.S., Lister, C., 2006. Flavonoid functions in plants: Anderson, O.M., Markham, K.R. (Eds.), Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA.

Gradolatto, A., Basly, J.P., Berges, R., Teyssier, C., Chagnon, M.C., Siess, M.H., Canivenc-Lavier, M.C., 2005. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. *Drug Metab. Dispos.* 33, 49–54.

Grange, J.M., Davey, R.W., 1990. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. R. Soc. Med.* 83, 159–60.

Grbović, S., 2010. Hemijska karakterizacija i biološke aktivnosti vrsta *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. i *Eucalyptus gunni* Hook. iz Crne Gore. Prirodno-matematički fakultete. Novi Sad.

Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R., 2013a. Infusion and decoction of wild German chamomile: bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chem.* 136, 947–954.

Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R., 2013b. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: a comparison between the herb and its preparations. *Food Chem.* 136, 718–725.

Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.* 86, 345–391.

Gupta, S., Afaq, F., Mukhtar, H., 2001. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 914–920.

Gupta, S., Afaq, F., Mukhtar, H., 2002. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene* 21, 3727–3738.

- Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B., Hopwood, D., 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell Sci.* 107, 3569–3577.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.* 8, 89-193.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine-some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 46, 501-514.
- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231–255.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2007. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press. New York. USA.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Hamdan, S., Daood, H.G., Toth-Markus, M., Illés, V., 2008. Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane. *J. Supercrit. Fluids* 44, 25–30.
- Harborne, H.B., 1999. *The Handbook of Natural Flavonoids.* Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Hawthorne, S.B., Kubatova A., 2002. Hot (subcritical) water extraction: Pawliszyn, J. (Ed.), *Sampling and sample preparation for field and laboratory.* Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands.
- Hegazi, A.G., Abd El Hady, F.K., Abd Allah, F.A., 2000. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift für Naturforschung. C. J. Biosci.* 55, 70–75.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572–584.
- Henderson, B.E., 2000. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 427–433.
- Herodež, Š.S., Hadolin, M., Škerget, M., Knez, Ž., 2003. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem.* 80, 275–282.

- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E., 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae A review. *Food Chem.* 98, 136–148.
- Hessenauer, A., Montenarh, M., Götz, C., 2003. Inhibition of CK2 activity provokes different responses in hormone-sensitive and hormone-refractory prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* 22, 1263–1270.
- Hinneburg, I., Damien Dorman, H.J., Hiltunen, R., 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* 97, 122–129.
- Hirano, T., Oka, K., Akiba, M., 1989. Antiproliferative effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on tumor cells of the human breast carcinoma cell line, ZR-75-1. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 64, 69–78.
- Hiremath, S.P., Badami, S., Hunasagatta, S.K., Patil, S.B., 2000. Antifertility and hormonal properties of flavones of *Striga orobanchioides*. *Eur. J. Pharmacol.* 391, 193–197.
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W., 2000. Flavonols, flavones and flavanols - Nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1081–1093.
- Hsu, C.K., Chiang, B.H., Chen, Y.S., Yang, J.H., Liu, C.L., 2008. Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chem.* 108, 633–641.
- Hudson, B., Lewis, J., 1983. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. structural criteria for activity. *Food Chem.* 10, 47–55.
- Hufford, C.D., Lasswell, W.L., 1978. Antimicrobial activities of constituents of *Uvaria chamae*. *Lloydia* 41, 156–60.
- Huie, C.W., 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 23–30.
- Hung, H.C., Joshipura, K.J., Jiang, R., Hu, F.B., Hunter, D., Smith-Warner, S.A., Colditz, G.A., Rosner, B., Spiegelman, D., Willett, W.C., 2004. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1577–1584.

- Iniesta-Sanmartín, E., Tomás-Barberán, F., Guirado, A., Tomás-Lorente, F., 1990. Antibacterial Flavonoids from *Helichrysum picardii* and *H. italicum*. *Planta Med.* 56, 648–649.
- Iwashina, T., 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.* 113, 287–299.
- Iwashita, K., Kobori, M., Yamaki, K., Tsushida, T., 2000. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1813–1820.
- Jung, J., Perrut, M., 2001. Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey. *J. Supercrit. Fluids.* 20, 179-219.
- Kajdžanoska, M., Gjamovski, V., Stefova, M., 2010. HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from macedonia. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 29, 2, 181–194.
- Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., 2010. A review of the application and pharmacological properties of  $\alpha$ -bisabolol and  $\alpha$ -bisabolol-rich oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 1–7.
- Kang, N.J., Shin, S.H., Lee, H.J., Lee, K.W. 2011. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther.* 130, 310-324.
- Kaufmann, B., Christen, P., 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.* 13, 105–113.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., 1999. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 896–899.
- Kensler, T.W., Egner, P.A., Wang, J.B., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Lu, P.X., Chen, J.G., Qian, G.S., Kuang, S.Y., Jackson, P.E., Gange, S.J., Jacobson, L.P., Muñoz, A., Groopman, J.D., 2004. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas. *Gastroenterology* 127, S310–S318.
- Kečkeš, S., Gašić, U., Ćirković-Veličković, T., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž., 2013. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chem.* 138, 32–40.



- Khanna, P., Sharma, O.P., Sehgal, M., Bhargava, C., Jain, M., Goswami, A., Singhvi, S., Gupta, U., Agarwal, R., Sharma, P., Jain, S.C., 1980. Antimicrobial principles from tissue culture of some plant species. *Indian J. Pharm. Sci.* 42, 113–117.
- Kim, H.Y., Gladyshev, V.N., 2007. Methionine sulfoxide reductases: selenoprotein forms and roles in antioxidant protein repair in mammals. *Biochem. J.* 407, 321–329.
- Ko, M.J., Cheigh, C.I., Chung, M.S., 2014. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chem.* 143, 147–155.
- Kojić, V., 2012. Sinteza i detaljna biološka ispitivanja tiazolnih c-nukleozida. Doktorska disertacija. Prirodno- matematički fakultet, Novi Sad,
- Kong, J., Chai, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64, 923–933.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N., 2005. Neoplasia: Pathologic basis of disease. Elsevier Saunders. Philadelphia, USA.
- Kumar, M.S.Y., Dutta, R., Prasad, D., Misra, K., 2011. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food Chem.* 127, 1309–1316.
- Kumar, D., Gupta, N., Ghosh, R., Gaonkar, R.H., Pal, B.C., 2013.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory constituent of *Carex baccans*: Bio-assay guided isolation and quantification by validated RP-HPLC–DAD. *J. Funct. Foods* 5, 211–218.
- Kurčubić, V., Mašković, P., Vujić, J., Vranić, D, Vesković-Moračanin, S., Okanović, Đ., Lilić, S., 2014. Antioxidant and antimicrobial activity of *Kitaibelia vitifolia* extract as alternative to the added nitrite in fermented dry sausage. *Meat Science* 97, 459–467.
- Kuroyanagi, M., Arakawa, T., Hirayama, Y., Hayashi, T., 1999. Antibacterial and antiandrogen flavonoids from *sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.* 62, 1595–1599.
- Landesman-Bollag, E., Song, D.H., Romieu-Mourez, R., Sussman, D.J., Cardiff, R.D., Sonenshein, G.E., Seldin, D.C., 2001. Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol. Cell. Biochem.* 227, 153–165.

- Lang, Q.Y., Wai, C.M., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review. *Talanta* 53, 771-782
- Lantto, T.A., Colucci, M., Zavadova, V., Hiltunen, R., Raasmaja, A., 2009. Cytotoxicity of curcumin, resveratrol and plant extracts from basil, juniper, laurel and parsley in SH-SY5Y and CV1-P cells. *Food Chem.* 117, 405–411.
- Lay-Keow, N., & Michel, H., 2003. Effects of moisture content in cigartobacco on nicotine extraction similarity between Soxhlet and focused open-vessel microwave-assisted techniques. *Journal of Chromatography A*, 1011, 213–219.
- Lazarova, I., Zengin, G., Bender, O., Zheleva-Dimitrova, D., Uysal, S., Ceylan, R., Gevrenova, R., Aktumsek, A., Acar, M., Gunduz, M., 2015. A comparative study of Bulgarian and Turkish *Asphodeline lutea* root extracts: HPLC–UV profiles, enzyme inhibitory potentials and anti-proliferative activities against MCF-7 and MCF-10A cell lines. *J. Funct. Foods* 15, 254–263.
- Lee, S.F., Lin, J., 1997. Inhibitory effects of phytopolyphenols on TPA-induced transformation, PKC activation, and c-jun expression in mouse fibroblast cells. *Nutr. Cancer* 28, 177–183.
- Lepley, D.M., Pelling, J.C., 1997. Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. *Mol. Carcinog.* 19, 74–82.
- Li, W., Asada, Y., Yoshikawa, T., 1998. Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Planta Med.* 64, 746–747.
- Li, Y., 2011. Antioxidants in biology and medicine—essentials, advances and clinical applications. Nova Science Publishers. New York, USA.
- Liang, Y., Huang, Y., Tsai, S., Chen, C., Lin, J., 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages 20, 1945–1952.
- Liang, Y.C., Tsai, S.H., Tsai, D.C., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K., 2001. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett.* 496, 12–18.

- Lin, J.K., Chen, Y.C., Huang, Y.T., Lin-Shiau, S.Y., 1997. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 28-29, 39–48.
- Lindenmeyer, F., Li, H., Menashi, S., Soria, C., Lu, H., 2001. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutr. Cancer* 39, 139–147.
- Lis-Balchin, M., Deans, S.G., Eaglesham, E., 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour Fragr. J.* 13, 98–104.
- Liu, H., Orjala, J., Sticher, O., Rali, T., 1999. Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*. *J. Nat. Prod.* 62, 70–75.
- Luthria, D.L., 2008. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chem.* 107, 745–752.
- Macheix, J.J., Fleuriot, A., Billot, J., 1990. Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton. Florida, USA.
- Maier, R., Kreis, W., Carle, R., Reinhard, E., 1991. Partial purification and substrate specificity of a  $\beta$ -glucosidase from *Chamomilla recutita*. *Planta Med.* 57, A84–85.
- Mak, P., Leung, Y.K., Tang, W.Y., Harwood, C., Ho, S.M., 2006. Apigenin suppresses cancer cell growth through ER $\beta$ . *Neoplasia* 8, 896–904.
- Marci, S., Glavaš-Obrovac, L., Belovari, T., Stojković, R., Ivanković, S., Šerić, V., Piantanida, I., Žinić, M., 2008. Biological properties of 4-methyl-2,7-diamino-5,10-diphenyl-4,9-diazapyrenium hydrogensulfate (ADAP). *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62, 595–604.
- Markham, K.R., 1989. Flavones, flavonoids, and their glycosides: Harborne, J.B., Dey, P.M. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press Ltd. London, UK.
- Marković, B.S., 1990. Mikrobiologija II-bakterije, kvasci i plesni. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd, Srbija.
- Marks, F., Fürstenberger, G., 1999. Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids: from biogenesis to clinical application. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany.

- Marshall, W.L., Franck, E.U., 1981. Ion product of water substance, 0–1000 °C, 1–10,000 bars  
New International Formulation and its background. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 10, 295.
- Mason, T.J., 1992. Industrial sonochemistry: potential and practicality. *Ultrasonics* 30, 192–196.
- Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., Aubert, G., 2008. Comparison of bacteriostatic and  
bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics.  
*Lett. Appl. Microbiol.* 47, 167–173.
- McKay, D.L., Blumberg, J.B., 2006. A Review of the bioactivity and potential health benefits of  
chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phyther. Res.* 20, 519–530.
- Mehlen, P., Bredesen, D.E., 2011. Dependence Receptors: From Basic Research to Drug  
Development. *Sci. Signal.* 4, 155, mr2.
- Mendelsohn, J., Howley, P.M., Israel, M., Liotta, L.A., 2001. *The Molecular Basis of Cancer.*  
Elsevier Saunders. Philadelphia, USA.
- Meyer, H., Bolarinwa, A., Wolfram, G., Linseisen, J., 2006. Bioavailability of apigenin from apiin-  
rich parsley in humans. *Ann. Nutr. Metab.* 50, 167–172.
- Middleton Jr E, Chithan C.K., 1993. The impact of plant flavonoids on mammalian biology:  
implications for immunity, inflammation and cancer: JB, H. (Ed.), *The flavonoids: Advances  
in Research since 1986.* Chapman and Hall. London, UK.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on  
mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*  
52, 673–751.
- Mijin, D.Ž., Petrović, S.D., 2005. Primena mikrotalasne tehnike u organskoj hemiji i ogranskoj  
hemijskoj tehnologiji. *Hem. Ind.* 59, 224–229.
- Miller, D.J., Hawthorne, S.B., 1998. Method for determining the solubilities of hydrophobic  
organics in subcritical water. *Anal. Chem.* 70, 1618–1621.
- Milić B., Đilas, S., Čandanović-Brunet J., Sakač.M., 2000. *Biljni polifenoli.* Tehnološki fakultet,  
Novi Sad, Srbija.
- Milošević, S., 2011. Ekstrakcija ginka (*Ginko biloba* L.) ugljenik(IV)-oksidom pod pritiskom.

Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet. Novi Sad.

- Mimica-Dukić, N., Božin, .B., 2008. *Mentha L. Species (Lamiaceae)* as promising sources of bioactive secondary metabolites. *Curr. Pharm. Des.* 14, 3141–3150.
- Mitra, S., 2003. *Sample preparation techniques in analytical chemistry.* John Wiley & Sons. New Jersey, USA.
- Myhrstad, M.C., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R., Moskaug, J.O., 2002. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 386–393.
- Möckel, H.J., Welter, G., Melzer, H., 1987. Correlation between reversed-phase retention and solute molecular surface type and area: I. Theoretical outlines and retention of various hydrocarbon classes. *J. Chromatogr. A* 388, 255–266.
- Mohamad, M., Ali, M.W., Ripin, A., Ahmad, A., 2013. Effect of extraction process parameters on the yield of bioactive compounds from the roots of *Eurycoma longifolia*. *J. Teknol.* 60, 51–57.
- Montgomery, D., 2001. *Design and analysis of experiments.* John Wiley & Sons. New York, USA.
- Moreno, E., Reza, J., Trejo, A., 2007. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycycl. Aromat. Compd.* 27, 239–260.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 26, 2231–2234.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mršić, Z., Krmpotić, A.R., 2004. *Internistička onkologija.* Medicinska naklada. Zagreb, Hrvatska.
- Mounho, B.J., Thrall, B.D., 1999. The extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to mitogenic and antiapoptotic effects of peroxisome proliferators *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159, 125–133.
- Mucsi, I., Gyulai, Z., Béládi, I., 1992. Combined effects of flavonoids and acyclovir against

- herpesviruses in cell cultures. *Acta Microbiol. Hung.* 39, 137–147.
- Mustafa, A., Turner, C., 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta* 703, 8–18.
- Myhrstad, M.C., Carlsen, H., Nordstrom, O., Blomhoff, R., Moskaug, J.O., 2002. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic. Biol.* 32, 386–393.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., 1995. *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments.* John Wiley & Sons. New York, USA.
- Nađalin, V., 2013. Ispitivanje ekstrakcije i ekstrakata gajene lavande (*Lavandula officinalis* L.). Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet. Novi Sad.
- Namieśnik, J., Górecki, T., 2000. Sample preparation for chromatographic analysis of plant material. *J. Planar Chromatogr.* 13, 404–13.
- Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 33, 2–16.
- Ng, T.B., Ling, J.M.L., Wang, Z.T., Cai, J.N., Xu, G.J., 1996. Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 27, 1237–1240.
- Nemecz, G., 1998. Chamomile (*Matricaria recutita*, *Anthemis nobilis*). *US. Pharm.* 23, 115–116.
- Neergheen, V.S., Bahorun, T., Taylor, E.W., Jen, L.S., Aruoma, O.I., 2010. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* 278, 229–241.
- Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., Kobayashi, K., Fukushima, M., 1987. Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 51, 139–143.
- Nikolovski B., 2009. Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz bobica kleke (*Juniperus communis* L.) i semenki tikve (*Cucurbita pepo* L.) natkritičnim ugljendioksidom. Doktorska disertacija.

Tehnološki fakultet. Novi Sad.

- Newall, C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., 1996. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. Pharmaceutical Press. London, UK.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. Nat. Prod. Rep. 17, 215–234.
- Oh, S.O., Kim, J.A., Jeon, H.S., Park, J.C., Koh, Y.J., Hur, H., Hur, J.S., 2008. Antifungal activity of eucalyptus-derived phenolics against postharvest pathogens of kiwifruits. Plant Pathol. J. 24, 322–327.
- Ohemeng, K.A., Schwender, C.F., Fu, K.P., Barrett, J.F., 1993. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1). Bioorg. Med. Chem. Lett. 3, 225–230.
- Okuno, T., Kawai, H., Hasegawa, T., Ueno, H., Nakamuro, K., 2001. Enhancement of hydroxyl radical formation from superoxide anion radical in the presence of organic selenium compounds. J Health Sci. 47, 240–247.
- Ong, E.S., Cheong, J.S.H., Goh, D., 2006. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. J. Chromatogr. A 1112, 92–102.
- O’Prey, J., Brown, J., Fleming, J., Harrison, P.R., 2003. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. Biochem. Pharm. 66, 2075–2088.
- Orhan, I.E., Senol, F.S., Gulpinar, A.R., Sekeroglu, N., Kartal, M., Sener, B., 2012. Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses. Food Chem. 130, 882–888.
- Orčić, D., 2010. Vrste tribusa scandiceae (*apiaceae* lindley 1836, *subfam. apioidae*) potencijalni izvor biološki i farmakološki aktivnih sekundarnih biomolekula. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet. Novi Sad.
- Osawa, K., Yasuda, H., Maruyama, T., Morita, H., Takeya, K., Itokawa, H., 1992. Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 40, 2970–2974.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese

- J. Nutr. 44, 307–315.
- Ozer, E.O., Platin, S., Akman, U., Hortasçu, O., 1996. Supercritical carbon dioxide extraction of spearmint oil from mint-plant leaves. *Can. J. Chem. Eng.* 74, 920-928.
- Öksüz, S., Ayyildiz, H., Johansson, C., 1984. 6-methoxylated and c-glycosyl flavonoids from centaurea species. *J. Nat. Prod.* 47, 902–903.
- Palacios, P., Gutkind, G., Rondina, R.V, de Torres, R., Coussio, J.D., 1983. Genus *Baccharis*. II. Antimicrobial activity of *B. crispa* and *B. notoserghila*. *Planta Med.* 49, 128.
- Pan, M.H., Ghai, G., Ho, C.T., 2008. Food bioactives, apoptosis and cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 43–52.
- Park, Y.K., Ikegaki, M., 1998. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2230–2232.
- Patanik P., 2004. *Dean's Analytical Chemistry Handbook*. McGraw-Hill. New York, USA.
- Pawliszyn, J., 2003. Sample Preparation: Quo Vadis? *Anal. Chem.* 75, 2543–2558.
- Pedrielli, P., Skibsted, L.H., 2002. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (–)-epicatechin, and (+)-catechin on  $\alpha$ -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7138–7144.
- Pekić, B., Miljković, D., 1980. Hemija i tehnologija kardiotioničnih glikozida. Univezitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet. Novi Sad, Srbija.
- Pekić, B., Lepojević, Ž., Slavica, B., 1989. Determination of apigenin and apigenin-7-*O*- $\beta$ -glucoside in the *Matricaria chamomilla* ligulate flowers. *Arh Farm* 39, 169–174.
- Pekić, B., Zeković, Z., 1994. Investigation of camomile fermentation. *Biotechnol. Lett.* 16, 1323–1328.
- Pekić, B., Zeković, Z., Lepojević, Ž., 1994. Investigation of apigenin-7-*O*- $\beta$ -glucoside hydrolysis by  $\beta$ -glucosidase from almonds. *Biotechnol. Lett.* 16, 229–234.
- Pekkarinen, S.S., Heinonen, M.I., Hopia, A.I., 1999. Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *J. Sci. Food Agric.* 79, 499–506.



- Pepeljnjak, S., Jalsenjok, I., Maysinger, D., 1982. Growth inhibition of bacillus subtilis and composition of various propolis extracts. *Pharmazie* 37, 864–865.
- Pereira, J.A., Pereira, A.P.G., Ferreira, I.C.FR., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., 2006. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8425–8431.
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, F., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., 2007a. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. *Cobrançosa*) leaves. *Molecules* 12, 1153–1162.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., 2007b. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2287–2295.
- Perry, R.H., Green, D.W., Maloney, J.O., 1984. Perry's Chemical Engineers' Handbook. McGraw-Hill, New York.
- Petronilho, S., Maraschin, M., Coimbra, M.A., Rochaa, S.M., 2012. *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Ind. Crop Prod.* 40, 1–12.
- Pezzuto, J.M., Kosmeder II, J.W., Park, E.J., Lee, S.K., Cuendet, M., Gills, J., Bhat, K., Grubjesic, S., Park, H.S., Mata-Greenwood, E., Tan, Y.M., Yu, R., Lantvit, D.D., Kinghorn, A.D., 2005. Characterization of natural product chemopreventive agents: Kelloff, G.J., Hawk, E.T., Sigman, C.C., (Eds.), *Cancer Chemoprevention*. Humana Press. New Jersey, USA.
- Pharmacopoea Jugoslavica edito quarta, (Ph. Jug. IV), 4th ed, 1984. Savezni zavod za zaštitu zdravlja, Beograd.
- Piantelli, M., Rossi, C., Iezzi, M., La Sorda, R., Iacobelli, S., Alberti, S., Natali, P.G., 2006. Flavonoids inhibit melanoma lung metastasis by impairing tumor cells endothelium interactions. *J. Cell. Physiol.* 207, 23–29.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042.

- Plaumann, B., Fritsche, M., Rimpler, H., Brandner, G., Hess, R.D., 1996. Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene* 13, 1605–1614.
- Plazonić, A., Bucar, F., Maleš, Ž., Mornar, A., Nigović, B., Kujundžić, N., 2009. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules* 14, 2466–2490.
- Pokorny, J., 2001. Introduction: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds.), *Antioxidants in food, practical applications*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England.
- Pomilio, A.B., Buschi, C.A., Tomes, C.N., Viale, A.A., 1992. Antimicrobial constituents of *Gomphrena martiana* and *Gomphrena boliviana*. *J. Ethnopharmacol.* 36, 155–161.
- Popovic, M., 2001. *Biohemija biljaka*, Poljoprivredni fakultet. Novi Sad, Srbija.
- Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S., 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A* 1163, 2–24.
- Povey, M.J.W., 1998. Ultrasonics of food. *Contemp. Phys.* 39, 467–478.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E., Komaitis, M., 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1190–1195.
- Purohit, P., Kapsner, T.R., 1994. Natural essential oils; functional benefits. *Cosmet Toilet.* 109, 51–55.
- Ramaswamy, A.S., Jayaraman, S., Sirsi, M., Rao, K.H., 1972. Antibacterial action of some naturally occurring citrus bioflavonoids. *Indian J. Exp. Biol.* 10, 72–73.
- Ramos, S., 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 507–526.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Ravi Kumar, M.N.V., 2006. Role of

- antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control. Release* 113, 189–207.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 3–12.
- Rhee, S.G., 2006. Cell signaling: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312, 1882–1883.
- Richter, B.E., Ezzell, J.L., Knowles, D.E., Hoefler, F., Mattulat, A.K.R., Scheutwinkel, M., Waddell, D.S., Gobran, T., Khurana, V., 1997. Extraction of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans from environmental samples using accelerated solvent extraction (ASE). *Chemosphere* 34, 975–987.
- Richter, B.E., Jones, B. A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., 1996. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem.* 68, 1033–1039.
- Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., de Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P., Van Zanden, J.J., Van der Woude, H., Alink, G.M., Koeman, J.H., 2002. The prooxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11, 321 - 333.
- Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.H., Khalela, K.I., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Ind. Crop. Prod.* 44, 437– 445.
- Rodrigo, R., 2009. Oxidative stress and antioxidants-their role in human disease. Nova Science Publishers. New York USA.
- Rosenberg Zand, R.S., Jenkins, D.J.A., Diamandis, E.P., 2000. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds, *Breast Cancer Res. Treat.* 62, 35–49.
- Ross, J.A., Kasum, C.M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19–34.
- Rostagno, M.A., Villares, A., Guillamón, E., García-Lafuente, A., Martínez, J.A., 2009. Sample

- preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J. Chromatogr. A* 1216, 2–29.
- Sahebkar, A., Emami, S.A., 2013. Medicinal plants for the treatment of uterus inflammation: implications from iranian folk medicine. *J. Acupunct. Meridian Stud.* 6, 1.
- Sakar, M.K., Engelshowe, R., Tamer, A.U., 1992. Isolation and antimicrobial activity of flavonoids from *Prunus spinosa* L. flowers. *Hacettepe Univ. Eczac. Fak. Derg.* 12, 59–63.
- Sato, M., Fujiwara, S., Tsuchiya, H., Fujii, T., Iinuma, M., Tosa, H., Ohkawa, Y., 1996. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 54, 171–176.
- Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata, H., Higuti, T., 2000. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 72, 483–488.
- Satyajit, D., Sarker, L.N., Kumarasamy, Y., 2007. Microtitre plate based antibacterial assay incorporating resazurin as indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 42, 321–324.
- Savić, I., 2014. Optimizacija tehnološkog postupka izolacije amigdalina i kvercentina iz biljnog materijala i njihova farmakološka aktivnost. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet Leskovac.
- Sayre, M.L., Perry, G., Smith, A.M., 1999. Redox metals and neurodegenerative disease. *Curr. Opin. chem. Biol.* 3, 220–225.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76, 270–276.
- Schütze, S., Tchikov, V., Schneider-Brachert, W., 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 655–662.
- Shahidi, F., Naczki, M., 1995. Food phenolics - an overview: Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Technomic Publishing Co. Pennsylvania, USA.
- Shiino, M., Watanabe, Y., Umezawa, K., 2001. Synthesis of *N*-substituted *N*-nitrosohydroxylamines as inhibitors of mushroom tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 1233–

1240.

- Shukla, B., Visen, P.K.S., Patnaik, G.K., Tripathi, S.C., Srimal, R.C., Dayal, R., Dobhal, P.C., 1992. Hepatoprotective activity in the rat of ursolic acid isolated from eucalyptus hybrid. *Phyther. Res.* 6, 74–79.
- Shukla, S., Gupta, S., 2004. Molecular mechanisms for apigenin-induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells. *Mol. Carcinog.* 39, 114–26.
- Shukla, S., MacLennan, G.T., Flask, C.A., Fu, P., Mishra, A., Resnick, M.I., Gupta, S., 2007. Blockade of beta-catenin signaling by plant flavonoid apigenin suppresses prostate carcinogenesis in TRAMP mice. *Cancer Res.* 67, 6925–35.
- Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K., 2006. Structure - radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* 67, 2058–2070.
- Simin, K., Ali, Z., Khaliq-Uz-Zaman, S.M., Ahmad, V.U., 2002. Structure and biological activity of a new rotenoid from pongamia pinnata. *Nat. Prod. Lett.* 16, 351–357.
- Simirgiotis, M.J., 2013. Antioxidant capacity and HPLC-DAD-MS profiling of chilean peumo (*Cryptocarya alba*) fruits and comparison with german peumo (*Crataegus monogyna*) from southern Chile. *Molecules*, 18, 2061–2080.
- Simoës, M., Rocha, S., Coimbra, M., Vieira, M., 2008. Enhancement of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* antibiotic susceptibility using sesquiterpenoids. *Med. Chem.* 4, 616–623.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.J., 1965. Colorometry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S., 2002. Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, *Hem. Ind.* 56, 179-190.
- Skibola C.F., Smith M.T., 2000, Potential health impacts of excessive flavonoid intake, *Free Radic. Biol. Med.* 29, 375-383.
- Smith, R.M., 2002. Extractions with superheated water. *J. Chromatogr. A* 975, 31–46.

- Smith, R.M., 1996. Supercritical fluid extraction of natural products. *LC-GC Int.* Jan. 8-15.
- Smith, R.M., 2006. Superheated water: the ultimate green solvent for separation science. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 419–421.
- Soliman, K., Badaea, R., 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1669–1675.
- Song, F.L., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L., Li, H.B., 2010. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2362–2372.
- Song, H., Zhang, H., Fu, Y., Mo, H., Zhang, M., Chen, J., Li, P., 2014. Screening for selective inhibitors of xanthine oxidase from *Flos Chrysanthemum* using ultrafiltration LC–MS combined with enzyme channel blocking. *J. Chromatogr. B.* 961, 56–61.
- Sovilj, M., 2004. Difuzione operacije. Tehnološki fakultet. Novi Sad, Srbija.
- Springett, B., 2001. Effect of agronomic factors on grape quality for wine production, in: Springett, M.B. (Ed.), *Raw ingredient quality in processed foods*. Aspen Publishers, Inc., Maryland, pp. 125–146.
- Srivastava, J.K., Shankar, E., Gupta, S., 2010. Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future (Review). *Mol. Med. Rep.* 3, 895–901.
- Stanković, N., Čomić, L., Kocić, B., Nikolić, D., Mihajilov-Krstev, T., Ilić, B., Miladinović, D., 2011. Antibacterial activity chemical composition relationship of the essential oils from cultivated plants from Serbia. *Hem. Ind.* 65, 583–589.
- Stanković, M., Stojanović, L., 2014. Tehnologija lekovitog i začinskog bilja. Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Steffen, Y., Gruber, C., Schewe, T., Sies, H., 2008. Mono-*O*-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 469, 209–219.
- Stobiecki, M., Kachlicki, P., 2007. Isolation and identification of flavonoids: Grotewold, E. (Ed.), *The Science of Flavonoids*. Springer Science, New York, USA.
- Stoggl, W.M., Huck, C.W., Bonn, G.N.K., 2004. Structural elucidation of catechin and epicatechin

- in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography coupled to diode array-, fluorescence-, and mass spectrometric detection. *J. Sep. Sci.* 27, 524–528.
- Stojanović, Z., Švarc-Gajić, J., 2011. A simple and rapid method for histamine determination in fermented sausages by mediated chronopotentiometry. *Food Control* 22, 2013–2019.
- Strack, D., 1997. Phenolic metabolism: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Plant Biochemistry*. Academic Press. New York, USA.
- Srivastava, J.K., Gupta, S., 2010. Health promoting benefits of chamomile in the elderly population: Watson, R.R., (Ed), *Complementary and alternative therapies and the aging population an evidence-based approach*. San Diego, USA.
- Suffness, M. Pezzuto, J.M., 1990. Assays related to cancer drug discovery: Hostettmann, K. (Ed.). *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity*. Academic Press, London.
- Szelenyi, I., Isaac, O., Thiemer, K., 1979. Pharmacological experiments with compounds of chamomile. III. Experimental studies of the ulcerprotective effect of chamomile. *Planta Med.* 35 218–227.
- Šamija, M., 2000. *Onkologija*. Medicinska naklada, Zagreb, Hrvatska.
- Šamija, M., Vrdoljak, E., Krajcin, Z., 2006. *Klinicka onkologija*. Medicinska naklada. Zagreb, Hrvatska.
- Švarc-Gajić, J., 2012. *Sampling and sample preparation in analytical chemistry*. Nova Science Publishers. New York, USA.
- Švarc-Gajić, J., Cvetanović, A., 2014. The influence of temperature on apigenin extraction from chamomile (*Matricaria recutita*) by superheated water. *Int. J. Chem. Mol. Eng.* 1, 578.
- Švarc-Gajić, J., Stojanović, Z., Segura Carretero, A., Arráez Román, D., Borrás, I., Vasiljević, I., 2013. Development of a microwave-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J. Food Eng.* 119, 525–532.
- Švehlíková, V., Bennett, R.N., Mellon, F.A., Needs, P.W., Piacente, S., Kroon, P.A., Bao, Y., 2004. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-*O*-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Phytochemistry* 65, 2323–2332.

- Takasaki, M., Konoshima, T., Kozuka, M., Tokuda, H., 1995. Anti-tumor-promoting activities of euglobals from eucalyptus plants. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 435–438.
- Tan, P.W., Tan, C.P., Ho, C.W., 2011. Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of pegaga (*Centella asiatica*). *Int. Food Res. J.* 18, 557–562.
- Tandon, S.K., Chandra, S., Gupta, S., Lal, J., 1995. Pharmacological effects of alcoholic extract of *Eucalyptus citriodora* leaves. *Indian Vet. J.* 72, 762–764.
- Tatsis, E.C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A.N., Vervoort, J., Gerothanassis, I.P., 2007. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* 68, 383–393.
- Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., Park, Y.K., 2013. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 1–13.
- Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P., 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 579–591.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Iinuma, M., 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 50, 27–34.
- Tura, D., Robards, K., 2002. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *J. Chromatogr. A* 975, 71–93.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.
- van de Laar, F.A., 2008. Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vasc. Health Risk Manag.* 4, 1189–1195.
- Van Dross, R., Xue, Y., Knudson, A., Pelling, J.C., 2003. The chemopreventive bioflavonoid apigenin modulates signal transduction pathways in keratinocyte and colon carcinoma cell lines. *J. Nutr.* 133, 3800S–3804S.



- Van Zyl, R.L., Seatlholo, S.T., Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., 2006. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *J. Essent. Oil Res.* 18, 129–133.
- Vargo, M.A., Voss, O.H., Poustka, F., Cardounel, A.J., Grotewold, E., Doseff, A.I., 2006. Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKC delta and caspases in leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* 72, 681-692.
- Vaux, D., 2002. Apoptosis and toxicology - what relevance? *Toxicology* 181, 3–7.
- Veličković, J., 2013. Hemijska analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim jedinjenjima. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet. Niš.
- Verma, D.K., Singh, S.K., Tripathi, V., 1997. A rare antibacterial flavone glucoside from *Lantana camara*. *Indian drugs* 34, 32–35.
- Vidović, S., 2011. Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet. Novi Sad.
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* 8, 303–313.
- Vulić, J., 2012. Funkcionalne i antioksidativne osobine tropa cvekle (*Beta vulgaris*). Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet. Novi Sad.
- Wajant, H., 2002. The fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635–1636.
- Waldebäck, M., 2005. Pressurized fluid extraction. a sustainable technique with added values. Acta Universitatis Upsaliensis. Uppsala, Švedska.
- Walle, T., Ta, N., Kawamori, T., Wen, X., Tsuji, P.A., Walle, U.K., 2007. Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids - Methylated versus unmethylated flavones. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1288–1296.
- Walle, U.K., Walle, T., 2002. Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids-structural requirements. *Drug Metab. Dispos.* 30, 564–569.
- Wang, I.K., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K., 1999. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in

- leukaemia HL-60 cells. *Eur. J. Cancer* 35, 1517–1525.
- Wächter, G.A., Hoffmann, J.J., Furbacher, T., Blake, M.E., Timmermann, B.N., 1999. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* 52, 1469–1471.
- Wei, H., Tye, L., Bresnick, E., Birt, D.F., 1990. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res.* 50, 499–502.
- Wen, X., Walle, T., 2006a. Methylation protects dietary flavonoids from rapid hepatic metabolism. *Xenobiotica* 36, 387–397.
- Wen, X., Walle, T., 2006b. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metab. Dispos.* 34, 1786–1792.
- Williams, C.A., Harborne, J.B., 1994. Flavone and flavonoid glycosides: Harborne, J.B. (Ed.), *The flavonoids advances in research since 1986*. Chapman and Hall. London, UK.
- Williams, R.J., Spencer, J.P., Rice-Evans, C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 838–849.
- Winkel-Shirley, B., 2001. Flavonoid Biosynthesis . A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology 1. *Plant Physiol.* 126, 485–493.
- Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I., Wozniak, L.A., 2010. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr. Med. Chem.* 17, 3262–3288.
- Yadava, R.N., Reddy, K.I.S., 1998. A new bio-active flavonol glycoside from the stems of *butea superba roxb.* *J. Asian Nat. Prod. Res.* 1, 139–145.
- Yamada, H., 1991. Natural products of commercial potential as medicines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2, 203–210.
- Yan, L.Y., Teng, L.T., Jhi, T.J., 2006. Antioxidant properties of guava fruit : comparison with some local fruits. *Sunw. Acad. J.* 3, 9–20.
- Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F., 2001. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Anal. Sci. Int. J. Japan Soc. Anal. Chem.* 17, 599–

604.

- Ye, J.X., Wei, W., Quan, L.H., Liu C.Y., Chang Q., Liao Y.H., 2010. An LC–MS/MS method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, forsythiaside A and baicalin in rat plasma and its application to pharmacokinetic study of Shuang-huang-lian in rats. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 52, 625–630.
- Yokota, J., 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21, 497–503.
- Yuspa, S.H., 2000. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis* 21, 341–344.
- Zhang, Y., Herman, B., 2002. Ageing and apoptosis. *Mech. Ageing Dev.* 123, 245–260.
- Zhang, J., Chen, M., Ju, W., Liu, S., Xu, M., Chu, J., Wu, T., 2010. Liquid chromatograph/tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of chlorogenic acid and cinnamic acid in plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 51, 685–690.
- Zheng, W., Tan, R., Yang, L., Liu, Z., 1996. Two flavones from artemisia giraldii and their antimicrobial activity. *Planta Med.* 62, 160–162.
- Zheng, P.W., Chiang, L.C., Lin, C.C., 2005. Apigenin induced apoptosis through p53-dependet pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sciences* 76, 1367-1379.
- Zekovic, Z., 1993. Određivanje, ekstrakcija i hemijske transformacije flavonoida kamilice (*Matricaria chamomilla* L.). Magistarska teza. Tehnološki fakultet. Novi Sad.
- Zengin, G., Sarikurkcü, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., Ceylan, O., 2014. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Ind. Crops Prod.* 53, 244–251.

## ***7. Прилог***

## Прилог 1. Списак важнијих скраћеница и ознака

**МЕ** - Микроталасна екстракција (енг. Microwave-Assisted Extraction)

**УЕ** - Ултразвучна екстракција (енг. Ultrasound-Assisted Extraction)

**СЕ** - Soxhlet екстракција

**СКВ** - Екстракција водом у субкритичном стању (енг. Subcritical Water Extraction)

**ЕЖК** - Еквивалент хлорогенске киселине

**ЕР** - Еквивалент рутина

**УФ** - Укупни феноли

**УФЛ** - Укупни флавоноиди

**А** - Апигенин

**ЕУ** - Етарско уље

**Н-УЕ** –Екстракт нативних цветова добијен ултразвучном екстракцијом

**Ф-УЕ** - Екстракт ферментисаних цветова добијен ултразвучном екстракцијом

**Н-УЕВ** - Екстракт нативних цветова добијен ултразвучном екстракцијом и водом као растварачем

**Ф-УЕВ** - Екстракт ферментисаних цветова добијен ултразвучно екстракцијом и водом као растварачем

**СД** - Стандардна девијација

**ANOVA** - Анализа варијансе

**UV-VIS** - Ултразубичаста-видљива спектроскопија

**TLC** – Танкослојна хроматографија

**HP TLC** - Танкослојна хроматографија високих перформанси

**HPLC** - Течна хроматографија високих перформанси

**ESI** - Електрон спреј јонизација

**MS** - Масена спектрометрија

**Прилог 2. Списак слика**

Слика 1. Основне структуре флавона и флавана.

Слика 2. Различите класе флавоноидних једињења.

Слика 3. Биогенетски пут настанка флавоноида.

Слика 4. Изглед камилице (*Matricaria chamomilla*).

Слика 5. Структура а) апигенина и б) биапигенина.

Слика 6. Структурна формула деривата апигенин-7-О-глукозида.

Слика 7. Биосинтеза апигенина, Е1-халкон синтетаза (нарингенин-халкон синтетаза); Е2-стилбен синтетаза (развератол синтетаза); Е3-халко изомераза; Е4-флаван синтетаза I; Е5-флаван синтетаза II.

Слика 8. Генерисање реактивних кисеоничних врста: FMN - флавин-мононуклеодит; FAD - флавин-аденин-динуклеотид; сут - цитохром; TMI - јони прелазних метала.

Слика 9. Изглед ћелија пре и после оксидативног стреса.

Слика 10. Оксидативни стрес изазван ROS реактивним врстама. Скраћенице које су употребљене на слици: SOD -супероксид дизмутаза; CAT -каталаза; GSH –глутатион; GSSG -оксидовани облик глутатиона; GPx -глутатион пероксидаза; Gred-глутатион редуктаза (Wojsik и сар., 2010).

Слика 11. Структурне карактеристике и функционалне групе флавоноидних једињења важне за хватање слободних радикала.

Слика 12. Резонантне структуре радикала флавоноида.

Слика 13. Хелирајући механизам флавоноида.

Слика 14. Механизам прооксидативног деловања флавоноида.

Слика 15. Развој канцера проузрокован генетским аномалијама: а) онкогенима; б) тумор-супресорским генима.

Слика 16. Ћелијска локализација најзначајнијих група прото-онкогена (обојени црвеном бојом) (Kumar и сар., 2005).

Слика 17. Приказ акривности прото-онкогена Ras и његова структура (H-Ras).

Слика 18. Спољашни у унутрашњи пут активирања каспаза и апоптозе.

Слика 19. Положај аналта у матриксу узорка.

Слика 20. Сонотрода за екстракцију узорака.

Слика 21. Кавитације у течној фази.

Слика 22. Спектар електромагнетног зрачења.

Слика 23. Диполарни молекули у осцилаторном електричном пољу.

Слика 24. Фактори који утичу на ефикасност процеса високопритисне екстракције.

Слика 25. Фазни дијаграм угљеник(IV)-оксида.

Слика 26. Фазни дијаграм воде.

Слика 27. Шематски приказ екстракције субкритичном водом.

Слика 28. Шематски приказ тока експеримената.

Слика 29. Хидролиза апигенин-7-О- $\beta$ -глукозида применом  $\beta$ -глукозидазе.

Слика 30. Шематски приказ екстрактора/реактора субкритичном водом. 1 – боца са гасом; 2 – манометар; 3 – сигурносни вентил; 4 – термоелемент за мерење температуре; 5 – поклопац екстракционе/реакционе посуде; 6 – екстракциона/реакциона посуда; 7 – механичка облога са вибрационом платформом; 8 – терморегулатор; 9 – главни прекидач; 10 – прекидач за укључивање вибрационе платформе; 11 – грејна подлога.

Слика 31. Структура рутина и његов комплекс са алуминијумом.

Слика 32. Механизам неутрализације DPPH<sup>\*</sup> радикала фенолним једињењима.

Слика 33. Структура ферозина.

Слика 34. Оксидација ABTS калијум-персулфатом, и настанак ABTS радикал катјона и његова реакција са антиоксидансом (АОН) (de Oliveira и сар., 2014).

Слика 35. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима нативних и ферментисаних цветова камилице.

Слика 36. Утицај испитиваних параметара на принос укупних фенола.

Слика 37. Утицај испитиваних параметара на принос укупних флавоноида.

Слика 38. Утицај испитиваних параметара на принос апигенина.

Слика 39. Укупни принос екстракције остварен водом као екстрагенсом различитим екстракционим техникама.

Слика 40. Принос укупних фенола у екстрактима нативних цветова камилице добијеним водом као екстрагенсом различитим екстракционим техникама.

Слика 41. Садржај укупних флавоноида у воденим екстрактима у зависности од примењене технике екстракције.

Слика 42. Утицај односа дрога:растварач на принос укупних фенола.

Слика 43. Утицај односа дрога:растварач на садржај укупних флавоноида и апигенина у екстрактима камилице добијеним субкритичном водом.

Слика 44. Утицај притиска на принос укупних фенола.

Слика 45. Утицај притиска на садржај укупних флавоноида и апигенина.

Слика 46. Боја екстраката у завосности од температуре екстракције.

Слика 47. Утицај температуре екстракције на садржај укупних фенола.

Слика 48. Утицај времена екстракције на садржај испитиваних компоненти.

Слика 49. Утицај различитих концентрација модификатора на принос укупних фенола, флавоноида и апигенина.

Слика 50. TLC хроматограм изолованог апигенина (мрља 2 и 3) и његовог стандарда (мрља 1) А) 254 nm и Б) 340 nm.

Слика 51. А) 3D-UV спектар и Б) UV спектар апигенина изолованог из СКВ екстракта и стандарда апигенина.

Слика 52. Формирање нитроксид радикала (DMPO-OH „спин адукта“).

Слика 53. ESR спектар DMPO-OH „спин адуката“ насталих у Фентоновом модел систему (слепа проба).

Слика 54. Утицај екстраката ферментисаних и нативних цветова камилице на стварање и трансформацију хидроксил радикала

Слика 55. Формирање DMPO-OOH.

Слика 56. ESR спектар DMPO-OOH „спин адуката“ супероксид ањон радикала (слепа проба).

Слика 57. Утицај екстраката камилице на стварање и трансформацију супероксид ањон радикала.

Слика 58. Резултати одређивања (А) способности инхибиције DPPH радикала и (Б) редукционе моћи екстраката добијених различитим екстракционим техникама.

Слика 59. Резултати одређивања (А) способности инхибиције DPPH радикала и (Б) редукционе моћи водених екстраката добијених различитим екстракционим техникама.

Слика 60. Утицај притиска на способност екстраката да неутралишу DPPH радикале.

Слика 61. Утицај температуре на способност екстраката да неутралишу DPPH радикале.

Слика 62. Утицај концентрације модификатора на способност екстраката да неутралишу DPPH радикале.



Слика 63. Утицај температуре на способност екстраката ка неутрализацији хидроксил радикала.

Слика 64. Утицај температуре на способност “хватања” АВТС радикала.

Слика 65. Утицај температуре на редукциону способност СКВ екстраката.

Слика 66. Утицај притиска на способност СКВ екстраката ка хелирању металних јона.

Слика 67. Утицај температуре на способност СКВ екстраката ка хелирању металних јона.

Слика 68. Утицај притиска на способност СКВ екстраката да инхибирају процес липидне пероксидације.

Слика 69. Утицај притиска на укупну антиоксидативну активност СКВ екстраката.

Слика 70. Утицај температуре на укупну антиоксидативну активност СКВ екстраката.

Слика 71. Способност инхибиције  $\alpha$ -глукозидазе СКВ екстраката у зависности од притиска екстракције.

Слика 72. Способност инхибиције  $\alpha$ -глукозидазе СКВ екстраката у зависности од температуре екстракције.

Слика 73. Способност инхибиције  $\alpha$ -амилазе СКВ екстраката у зависности од температуре екстракције.

Слика 74. Способност инхибиције  $\alpha$ -глукозидазе СКВ екстраката у зависности од концентрације модификатора.

Слика 75. Способност инхибиције тирозиназе СКВ екстраката у зависности од притиска и температуре екстракције.

Слика 76. Утицај температуре на антипролиферативну активност СКВ екстраката.

Слика 77. Утицај концентрације модификатора (HCl) на антипролиферативну активност СКВ екстраката.

Слика 78. Цитотоксичност апигенина изолованог из цвета камилице.

Слика 79. Цитотоксичност екстракта камилице на HeLa ћелијску линију након 48h и 72h.

Слика 80. Морфолошке промене на HeLa ћелијама под дејством екстракта камилице у концентрацији која изазива 50 % преживљавање ћелија - током 48 и 72 сата. а) контролне ћелије; б) екстракт камилице. Повећање 400x.

Слика 81. Проапоптотичко деловање екстракта камилице на HeLa ћелијску линију након 24 сата. а) видљиво светло; б) Annexin V-FITC  $\lambda_{exc}=495$  nm,  $\lambda_{em}=525$  nm (зелена

флуоресценција); в) РИ  $\lambda_{exc} = 488-535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}=612-617 \text{ nm}$  (црвена флуоресценција); 1) стандард апигенина (позитивна контрола); 2) екстракт камилице. Повећање 400х.

Слика 82. Проапоптогичко деловање екстракта камилице на HeLa ћелијску линију након 48 сата. а) видљиво светло; б) Анексин V-FITC  $\lambda_{exc}=495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}=525 \text{ nm}$  (зелена флуоресценција); в) РИ  $\lambda_{exc} = 488-535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}=612-617 \text{ nm}$  (црвена флуоресценција); 1) стандард апигенина (позитивна контрола); 2) екстракт камилице.

Слика 83. Перорало уношење испитиваних екстраката и изглед интестиналног тракта жртвоване животиње након спроведене *in vivo* анализе.

Слика 84. Цревна покретљивост код мишева третираних са различитим концентрацијама екстраката ферментисаних и нативних цветова камилице.

### Прилог 3. Списак табела

Табела 1. Структурне класе биљних полифенола (Поповић, 2001).

Табела 2. Најзаступљенији флавоноиди камилице.

Табела 3. Деривати апигенин-7-О-глукозида.

Табела 4. Значајне реактивне слободнорадикалске и нерадикалске врсте кисеоника (Halliwell и Whiteman, 2004).

Табела 5. Класификација антиоксиданаса.

Табела 6. Дубина продирања микроталаса на различитим температурама и фреквенцијама.

Табела 7. Приближне вредности густине, вускозитета и коефицијента дифузије гасова, суперкритичних флуида и течности (Wasen и сар., ).

Табела 8. Вредности диелектричних константи за различите раствараче.

Табела 9. Карактеристике појединих флавоноида које условљавају њихову растворљивост у субкритичној води.

Табела 10. Кодирани и некодирани вредности нивоа независно променљивих.

Табела 11. Експериментални дизајн оптимизације екстракције етанолом.

Табела 12. Параметри квалитета језичастих цветова камилице.

Табела 13. Вох-Веhken матрица, кодиране и праве вредности независно променљивих и експериментални резултати приноса укупних фенола (УФ), флавоноида (УФЛ) и апигенина (А).

Табела 14. Регресиони коефицијенти полиномне функције одзива.

Табела 15. Анализа варијансе (ANOVA) моделованих одзива екстракције ферментисаних цветова камилице.

Табела 16. Оптималне вредности процесних параметара и поређење предвиђених и добијених вредности посматраних излазних величина.

Табела 17. Укупни принос екстракције, садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима добијеним различитим екстракционим техникама.

Табела 18. Утицај брзине мешања на садржај укупних фенола, флавоноида и апигенина

Табела 19. Утицај температуре екстракције на принос укупних фенола, флавоноида и апигенина.

Табела 20. Идентификована једињења у ултразвучним екстрактима нативних и ферментисаних цветова камилице.

Табела 21. Садржај апигенина и апигенин-7-О-β-глукозида у екстрактима нативних и ферментисаних цветова камилице.

Табела 22. Идентификована једињења у СКВ екстракту камилице.

Табела 23. Утицај притиска на принос појединачних полифенола једињења.

Табела 24. Утицај температуре СКВ на принос агликона и њихових глукозида.

Табела 25. Утицај температуре СКВ на принос полифенолних компонената.

Табела 26. Утицај модификатора (HCl) на принос детектованих полифенола у СКВ екстрактима.

Табела 27. IC<sub>50</sub> вредности екстраката нативних и ферментисаних цветова камилице и апигенина.

Табела 28. IC<sub>50</sub> вредности стандардних антиоксидатних супстанци.

Табела 29. IC<sub>50</sub> вредности стандардних антиоксидатних супстанци.

Табела 30. Инхибиторне концентрације референтних стандарда.

Табела 31. Утицај концентрације модификатора на укупну антиоксидативну активност СКВ екстраката.

Табела 32. Антимикробна активност екстраката ферментисаних цветова камилице.

Табела 33. Минималне инхибиторне концентрације (МИС) екстраката камилице према одабраним патогеним микроорганизмима

Табела 34. Утицај притиска на антимикуробну активност СКВ екстраката.

Табела 35. Утицај температуре на антимикуробну активност СКВ екстраката.

Табела 36. Утицај концентрације модификатора на антимикуробну активност СКВ екстраката.

Табела 37. Способност инхибиције тирозиназе СКВ екстраката у зависности од концентрације модификатора.

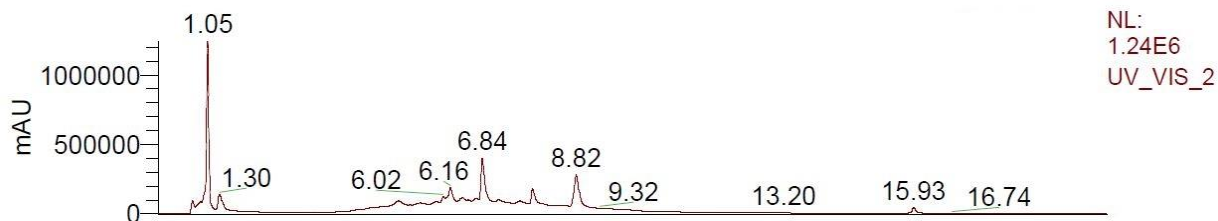
Табела 38. *In vitro* цитотоксична активност ферментисаних цветова камилице.

Table 39. *In vitro* цитотоксична активност екстраката камилице.

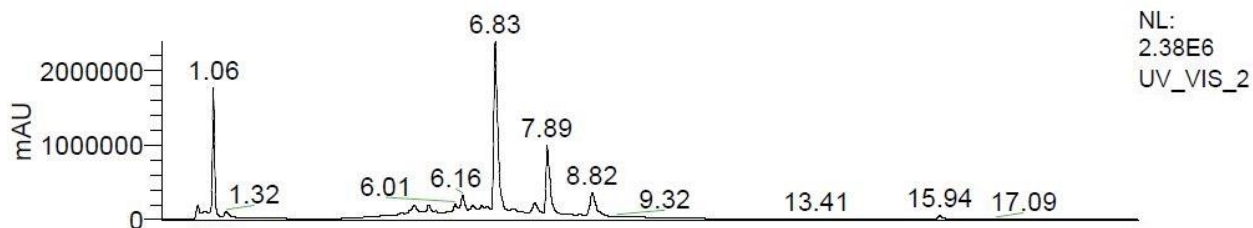
Табела 40. Утицај притисака на антипролиферативну активност СКВ екстраката ка Нер2с, RD и L2OB ћелијама.

**Прилог 4. Хроматограми СКВ екстракта добијених на различитим притисцима  
(таласна дужина 280 nm)**

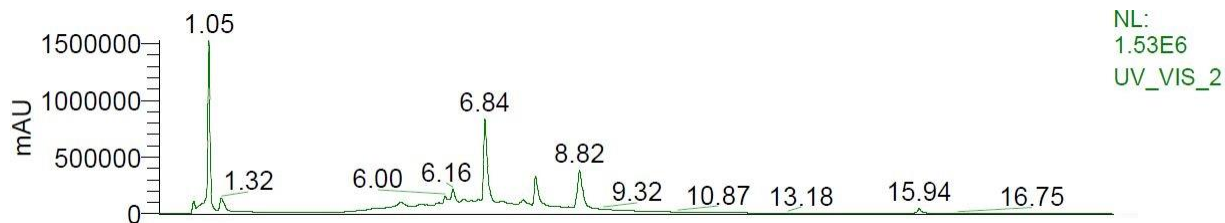
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на притиску од 10 bar



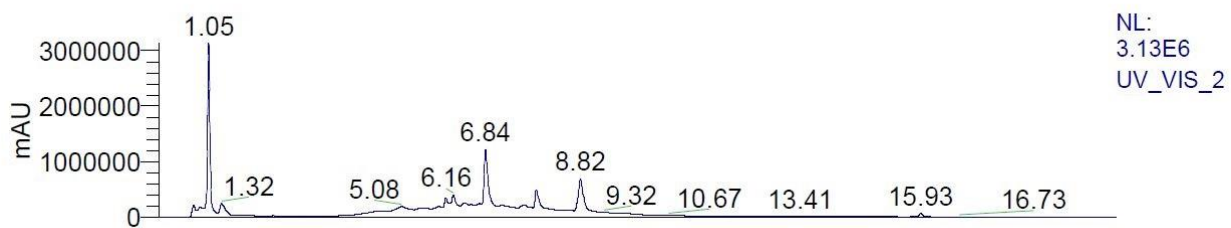
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на притиску од 30 bar



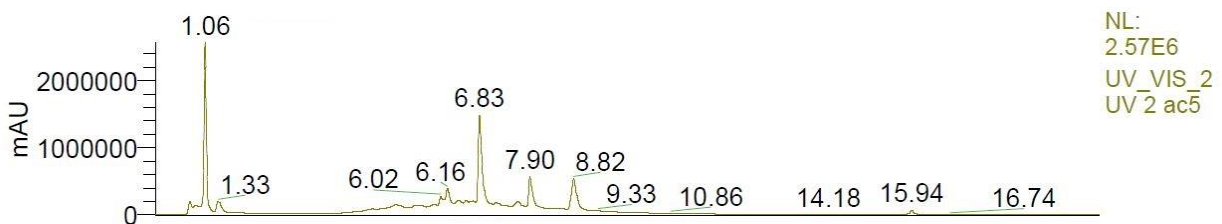
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на притиску од 45 bar



Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на притиску од 60 bar

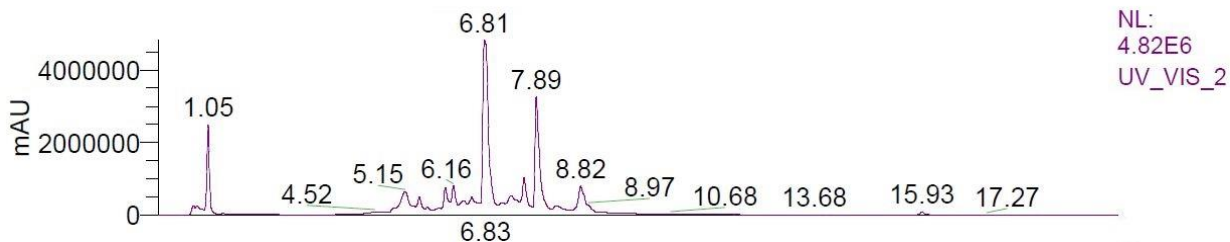


Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на притиску од 90 bar

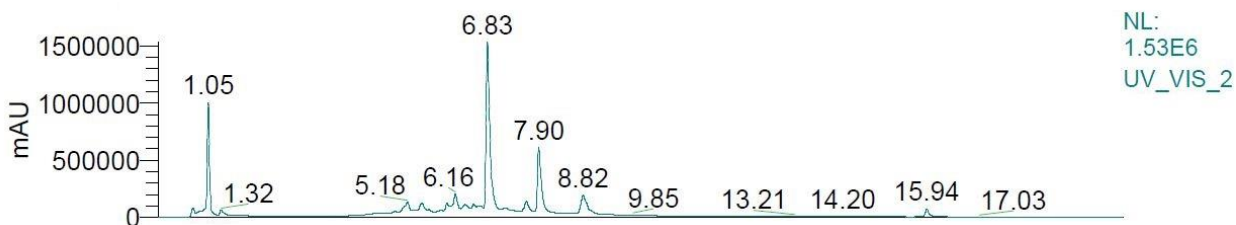


**Прилог 5. Хроматограми СКВ екстракта добијених на различитим температурама  
(таласна дужина 280 nm)**

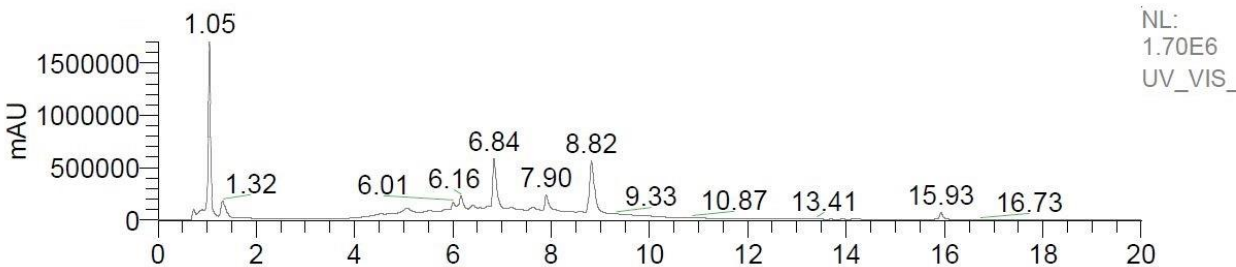
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 65°C



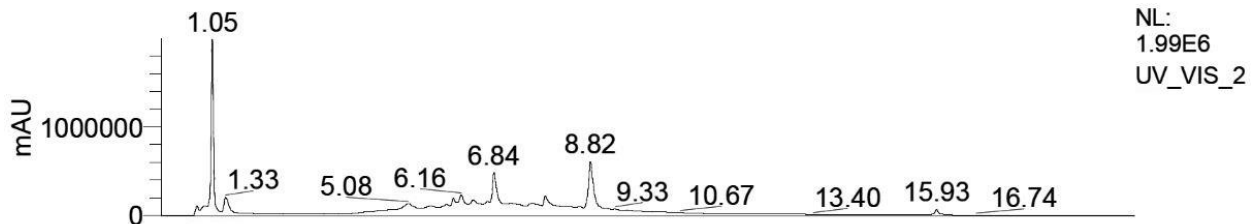
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 85°C



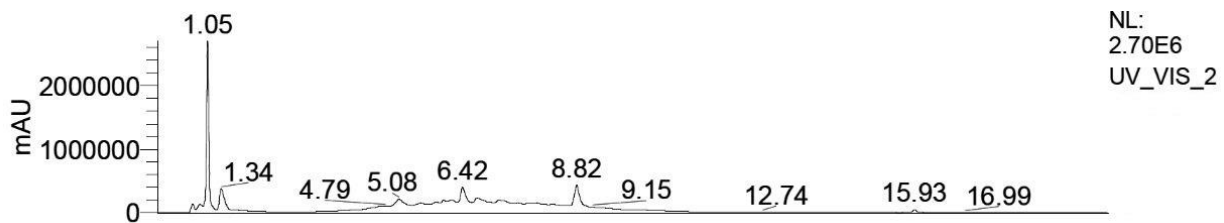
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 115°C



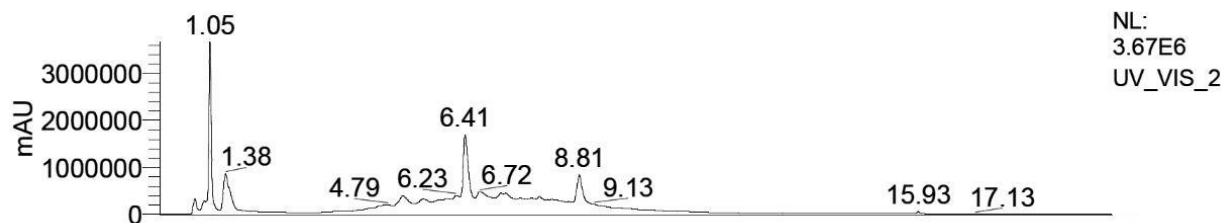
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 130°C



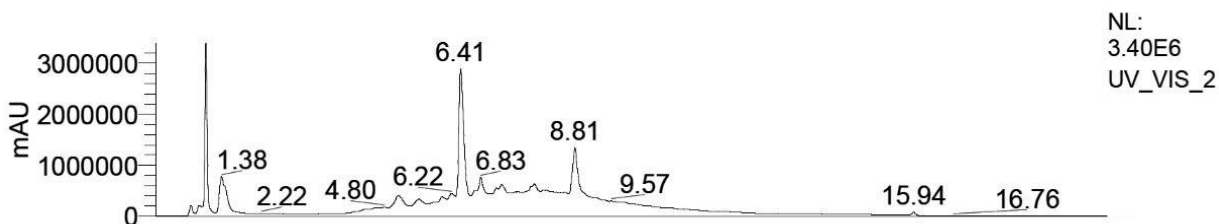
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 150°C



Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 180°C



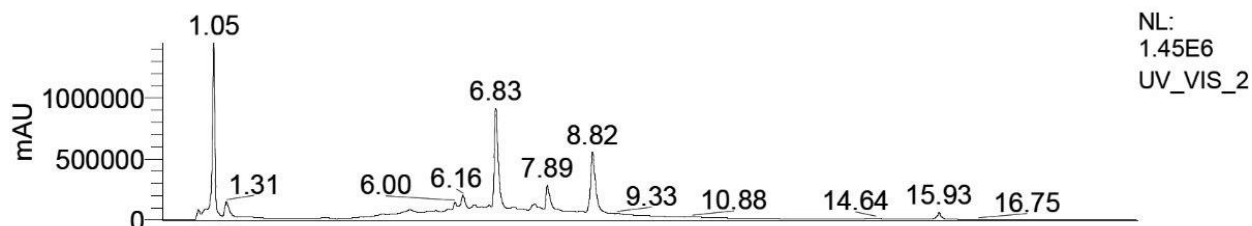
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 210°C



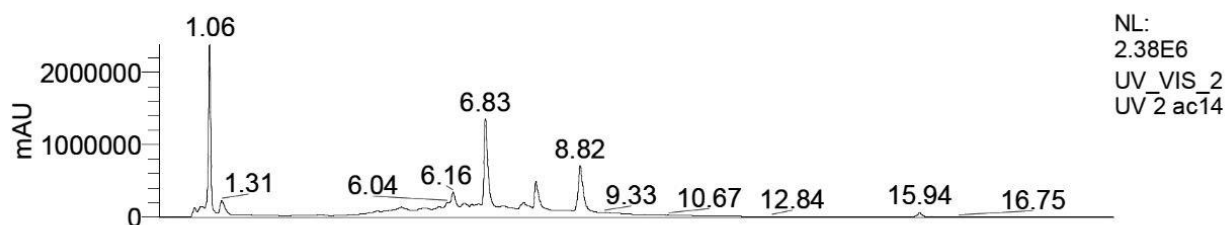


**Прилог 6. Хроматограми СКВ екстракта добијених уз присуство модификатора различитих концентрација (таласна дужина 280 nm)**

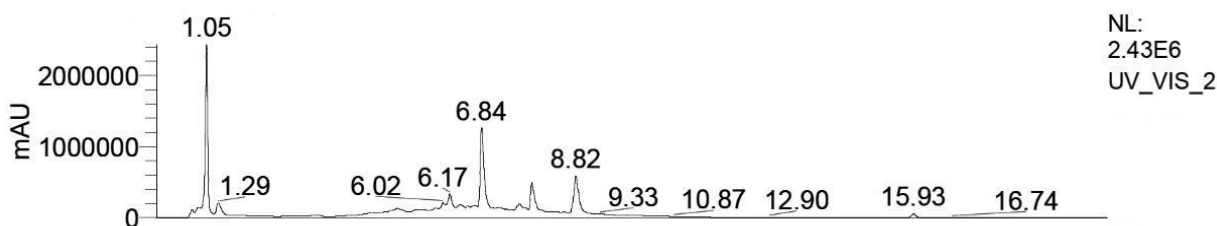
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 115°C уз коришћење модификатора концентрације 0,001 М



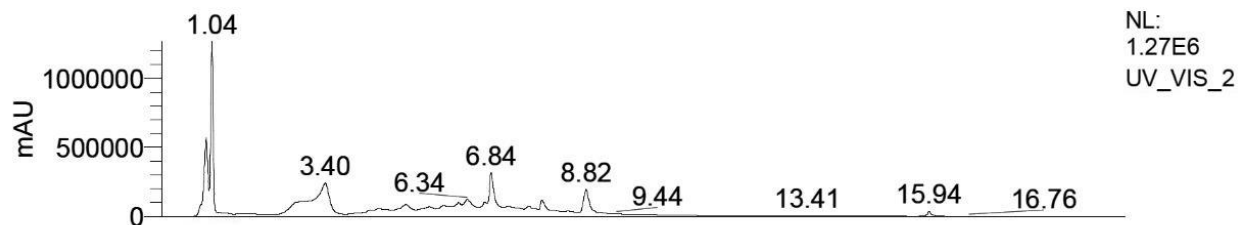
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 115°C уз коришћење модификатора концентрације 0,005 М



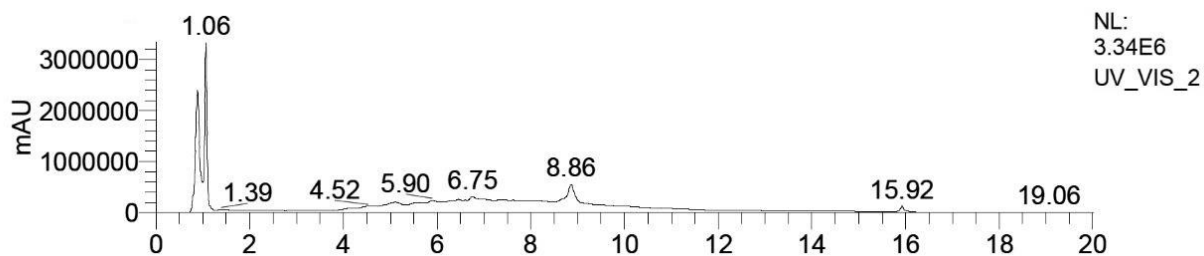
Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 115°C уз коришћење модификатора концентрације 0,01 М



Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 115°C уз коришћење модификатора концентрације 0,05 М



Хроматограм СКВ екстракта камилице добијеног на температури од 115°C уз коришћење модификатора концентрације 0,1 М



Прилог 7. Антирадикалски потенцијал СКВ екстраката изражен преко IC<sub>50</sub> вредности

Узорак	IC <sub>50</sub> вредност (µg/ml)		
	Способност инхибиције DPPH радикала	Способност инхибиције ОН радикала	Способност инхибиције АВТS радикала
<b>Утицај притиска</b>			
10 bar	18,60±0,00	45,98±0,22	14,28±0,15
30 bar	15,00±3,40	37,44±0,75	6,91±0,48
45 bar	14,00±4,12	38,02±0,64	5,42±0,73
60 bar	14,10±1,05	44,36±1,06	12,38±0,54
90 bar	15,90±0,91	41,86±0,94	9,29±0,72
<b>Утицај температуре</b>			
65°C	45,00±1,40	43,12±0,89	16,76±0,61
85°C	28,30±2,00	42,75±0,40	15,47±0,23
115°C	15,30±0,53	42,72±0,22	14,59±0,54
130°C	13,60±0,57	42,06±1,06	12,55±0,34
150°C	12,50±0,00	38,09±0,64	7,27±0,15
180°C	13,50±2,30	39,20±0,75	14,86±0,48
210°C	10,00±0,57	41,50±0,94	15,32±0,21
<b>Утицај модификатора</b>			
0,001 M	12,8±1,00	41,36±0,82	15,73±0,61
0,005 M	13,6±0,54	39,34±0,55	13,04±0,88
0,01 M	14,3±1,17	69,76±0,05	34,87±0,27
0,05 M	27,2±0,98	37,94±0,28	13,33±0,42
0,1 M	14,20±0,51	4,72±0,75	11,48±0,93

Прилог 8. Антиоксидативни потенцијал СКВ екстраката изражен преко IC<sub>50</sub> вредности

Узорак	IC <sub>50</sub> вредност (µg/ml)			(µg AA/g)
	Одређивање редуковане способности	Одређивање способности хелирања металних јона	Способност инхибиције липидне пероксидације	Укупна антиоксидативна активност
<b>Утицај притиска</b>				
10 bar	49,50±0,36	38,67±0,22	34,47±0,87	100,56±0,69
30 bar	32,40±0,10	37,98±0,31	33,54±1,06	123,58±0,63
45 bar	34,24±0,78	35,72±0,89	31,65±0,66	121,74±0,87
60 bar	35,19±0,98	36,51±0,34	30,96±0,42	111,56±0,59
90 bar	38,54±0,78	38,78±0,27	34,95±0,22	109,12±0,51
<b>Утицај температуре</b>				
65°C	84,60±0,16	37,34±0,15	32,60±1,08	100,06±0,94
85°C	54,17±0,99	39,73±0,23	35,02±0,89	101,36±0,71
115°C	33,90±0,62	37,37±0,57	34,95±0,83	113,87±0,40
130°C	33,00±0,37	37,51±0,34	32,77±0,71	114,55±0,89
150°C	27,80±0,50	37,54±0,68	28,67±0,57	107,26±0,25
180°C	29,51±0,29	37,60±0,78	29,69±0,56	103,75±0,57
210°C	27,80±0,56	38,14±0,61	32,60±1,08	102,00±0,94
<b>Утицај модификатора</b>				
0,001 M	33,61±0,11	35,97±0,42	31,34±0,84	103,36±1,03
0,005 M	37,19±0,19	39,24±0,19	28,09±0,58	106,72±0,95
0,01 M	37,93±0,47	48,82±0,31	41,12±0,74	92,84±0,35
0,05 M	45,28±0,10	36,44±0,94	28,74±0,21	103,37±0,71
0,1 M	26,13±0,00	36,31±0,92	27,76±0,05	105,54±1,14

## Прилог 9. Способност СКВ екстраката ка инхибицији одабраних ензима

Узорак	(mmol EA/g).		(mg ЕКК/g),
	Инхибиција $\alpha$ -амилазе	Инхибиција $\alpha$ -глюкозидазе	Инхибиција тирозиназе
<b>Утицај притиска</b>			
10 bar	0,45±0,01	2,42±0,14	0,70±0,18
30 bar	0,46±0,05	3,60±0,03	11,31±0,79
45 bar	0,45±0,02	3,29±0,13	15,17±0,70
60 bar	0,45±0,04	2,69±0,03	3,61±0,01
90 bar	0,44±0,02	2,65±0,12	18,25±0,36
<b>Утицај температуре</b>			
65°C	0,51±0,06	3,98±0,18	5,37±0,22
85°C	0,47±0,04	4,13±0,07	11,99±1,90
115°C	0,45±0,03	2,54±0,03	11,38±0,54
130°C	0,42±0,01	2,34±0,10	9,55±2,65
150°C	0,39±0,02	1,63±0,07	12,50±0,71
180°C	0,41±0,01	1,31±0,09	9,43±0,09
210°C	0,42±0,02	1,25±0,07	17,92±1,03
<b>Утицај модификатора</b>			
0,001 M	0,46±0,03	3,08±0,06	6,23±1,80
0,005 M	0,42±0,01	2,90±0,12	9,75±0,01
0,01 M	0,42±0,02	2,91±0,10	7,45±1,31
0,05 M	0,39±0,03	0,09±0,01	20,83±4,26
0,1 M	0,39±0,01	0,46±0,02	15,72±0,86

## БИОГРАФИЈА

Александра Цветановић, рођена је у Лесковцу, Република Србија, 27.12.1982. године. Основну и средњу школу завршила је са највишим оценама, у родном граду. Након завршене средње школе уписала је студије на Технолошком факултету у Лесковцу, Универзитета у Нишу. Током основних студија учествовала је у великом броју радионица, семинара, као и летњих школа у области иновација у високом образовању. Активно се бавила изработом научно-стручних студентских радова и била полазник летње школе хемије (Школа масене спектроскопије института Pierre et Marie Curie, Париз). Дипломски рад је радила под менторством проф. др Миодрага Лазића и дипломирала 2009. године, чиме је стекла звање Дипломираног инжењера технологије, хемијског и биохемијског инжењерства. Након дипломирања, уписала је докторске студије на Технолошком факултету у Новом Саду, на студијском програму „Фармацеутска технологија“. Од јануара 2011. ангажована је на националном пројекту Технолошког развоја „Фармаколошки активне супстанце и производи на бази лековитог/ароматичног биља за примену у фармацији“ као истраживач-приправник, а од 2013. год. у звању истраживач-сарадник.



Током докторских студија била је учесник програма мобилности студената у оквиру Central European Exchange Program for University Studies. У периоду јануара и фебруара 2013. је боравила на факултету за Хемијско инжењерство и Технологију, катедра за Аналитичку хемију, у Загребу. Током боравка у Загребу бавила се изучавањем јонске хроматографије са тродимензионалном пулсном амперометријском детекцијом.

Аутор је и коаутор четири рада у врхунским међународним часописима (M-21), рада у истакнутом међународном часопису (M-22), три рада у међународном часопису (M-23) и два рада у међународном часопису (M-24). Аутор и коаутор пет радова саопштена на међународним скуповима штампана у целини (M-33), двадесет и једног рада саопштених на међународним скуповима штампаних у изводу (M-34), једног рада у водећем часопису националног значаја (M-51), рада у часопису националног значаја (M-52), два рада саопштених на скуповима националних значаја штампаних у целини (M-63), као и једанаест рада саопштених на скуповима националног значаја штампаних у изводу (M-64). Резултате свог рада излагала је и као предавач по позиву.

Активно се бави рецензирањем научних радова у области екстракције и изолације биоактивних молекула у међународним часописима: Food and Bioprocess Technology Journal Zhejiang University, Journal of Applied Life Sciences International и Journal of Separation Science.

Говори енглески језик. Живи и ради у Новом Саду.