



UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET



Natalija M. Čutović

Optimizacija ekstrakcije latica *Paeonia tenuifolia* L., biološki efekti na koži i imobilizacija ekstrakata u nosače

Doktorska disertacija

Beograd, 2024



UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND
METALLURGY

Natalija M. Čutović

**Optimization of *Paeonia tenuifolia* L. petal
extraction, biological effects on the skin and
immobilization of extracts in carriers**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

MENTORI KANDIDATA

Prof. dr Branko Bugarski, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Dr Aleksandra A. Jovanović, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije INEP, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE ZA PREGLED, OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Prof. dr Zorica Knežević Jugović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Prof. dr Rada Pjanović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Dr Marko Stamenić, docent,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Dr Tatjana Marković, naučni savetnik,
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd

Dr Dejan Stojković, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

DATUM ODBRANE DOKTORSKE DISERTACIJE

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru programa razvoja nauke i tehnologije – Zajedničko finansiranje razvojnih i istraživačkih projekata Republike Srbije i Narodne Republike Kine, projekat: „Zaštita resursa i efikasno korišćenje ugroženih funkcionalnih biljaka poreklom iz Kine i Srbije“, finansiran od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija, u periodu od 2021. do 2024.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije izvedeni su na Katedrama za hemijsko inženjerstvo i organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u odseku za poljoprivredna istraživanja i razvoj Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, kao i na odeljenju za fiziologiju biljaka, u mikološkoj laboratoriji, Instituta za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerziteta u Beogradu.

Finansijska sredstva neophodna za rad na ovoj doktorskoj disertaciji obezbedila je Vlada Republike Srbije, Ministarstvo nauke, tehnološkog razvoja i inovacija (evidencioni broj ugovora: 451-03-1202/2021-09 i 451-03-66/2024-03/200003).

Zahvalnica

Veliku zahvalnost za pomoć u izradi ove doktorske disertacije dugujem svoj mentoru, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, prof. dr Branku Bugarskom, koji mi je omogućio da postanem deo njegovog tima i da deo eksperimenata iz ove doktorske disertacije izvedem u laboratorijama Tehnološko-metalurškog fakulteta.

Mojoj dragoj mentorki, višem naučnom saradniku Instituta za primenu nuklearne energije INEP Univerziteta u Beogradu, dr Aleksandri Jovanović, bezgranično hvala za svu pomoć, podršku i upućenu lepu reč. Hvala joj na svojoj pomoći u planiranju eksperimenata, kao i pisanju naučnih radova koji su proistekli iz ove teze, ali i na prijateljskom pristupu u teškim trenucima. Zajedno smo ovo uspele.

Želim posebno da se zahvalim dr Tatjani Marković, naučnom savetniku Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu, rukovodiocu odseka za poljoprivredna istraživanja i razvoj. Veliko hvala na ukazanoj prilici da postanem istraživač u odseku i da u njemu učim i sazrevam, kao i na prilici da budem istraživač na strateškom projektu sa NR Kinom, iz kog je ova doktorska disertacija proistekla.

Hvala prof. dr Zorici Knežević-Jugović, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurškog fakulteta, na korisnim sugestijama prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Iskreno hvala dr Marku Stameniću, docentu Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurškog fakulteta, na savetima koji su mi u značajnoj meri olakšali izradu ove disertacije.

Hvala prof. dr Radi Pjanović, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurškog fakulteta, na članstvu u komisiji za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Veliko hvala dr Dejanu Stojkoviću, višem naučnom saradniku, Univerziteta u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, na ukazanoj prilici da deo svoje doktorske disertacije uradim na odeljenju za fiziologiju bilja, na sjajnoj radnoj atmosferi i dobronamernim sugestijama.

Iskrenu zahvalnost dugujem svom kolegi i prijatelju, dr Petru Batiniću naučnom saradniku Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu, koji je uvideo moj potencijal i u teškim trenucima bio moj vetar u leđa. Hvala na svojoj pomoći, savetima i razgovorima.

Veliko hvala dr Urošu Gašiću, višem naučnom saradniku, dr Marini Kostić, naučnom saradniku i Tamari Carević, istraživaču saradniku, Instituta za biološka istraživanja Siniša Stanković Univerziteta u Beogradu, odeljenja za fiziologiju biljaka, na ukazanoj šansi da deo ove doktorske disertacije uradim uz njihovu pomoć. Hvala vam na svakom savetu i velikoj pomoći.

Hvala prof. dr Dušanu Mijinu, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pruženoj mogućnosti da mikrotalasnu ekstrakciju uradim na Katedri za organsku hemiju.

Hvala dr Ivoni Janković-Častvan, višem naučnom saradniku Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zbog mogućnosti da ultrazvučnu ekstrakciju uradim na Katedri za neorgansku hemijsku tehnologiju.

Hvala prof. dr Đorđu Veljoviću, vanrednom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, i dr Vukašinu Ugrinoviću, naučnom saradniku Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu na izvršenoj analizi uzoraka biopolimernih filmova primenom skenirajuće elektronske mikroskopije.

Iskreno sam zahvalna dr Bojani Balanč, višem naučnom saradniku Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pomoći u ispitivanju mehaničkih svojstava biopolimernih filmova, kao i na korisnim savetima.

Zahvalna sam koleginicama dr Vanji Tadić, naučnom savetniku, i dr Ani Žugić, višem naučnom saradniku, Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, koje su mi dale neophodne fosfolipdine smeše za izradu lipozoma.

Želim da se zahvalim svojim kolegama iz Odseka za poljoprivredna istraživanja i razvoj Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ na ukazanoj podršci i prijatnoj atmosferi za rad. Hvala vam što ste obogatili ovaj važan deo mog života.

Hvala svim mojim prijateljima i bliskim ljudima, koji su me bez problema slušali, čak i kada nisu razumeli o čemu pričam. Hvala vam što ste bili tu da se zajedno smejemo, radujemo i proslavljamo. Zbog vas je svaki korak bio znatno lepši.

Mojoj porodici bezgranično hvala što su u svakom trenutku bili uz mene, što su me bezgranično voleli i podržavali. Mojoj majci, mom životnom osloncu, hvala na svim odricanjima i neprospavanim noćima koje su dovele do mog uspeha, ovo je samo još jedan delić slagalice mog života. Mom bratu Aleksi, koji mi nikada nije dozvolio da pokleknem i odustanem, koji je bio tu da odagna svaku brigu, neopisivo ti hvala što nikad nisi pomislio da nešto ne mogu, i time učinio da i sama verujem da mogu sve.

Bogdanu i Mini, hvala za svaki lep trenutak i ljubav, hvala za svaki trenutak koji mi ulepšate svojim osmesima i zagrljajima. Hvala vam što ste mi pokazali koliko čovek može da voli i bude bolji.

Doktorsku disertaciju posvećujem svojoj majci Žaklini, ovo nije ništa naspram svega što si ti pružila meni.

Tata, volela bih da si bio tu, da vidiš šta sam sve postigla.

Ovo je i za tebe.

“Uspeh nije krajnji cilj, neuspeh nije fatalan: hrabrost da nastavimo je ono što se računa.”

– Winston Čerčil

OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE LATICA *PAEONIA TENUIFOLIA* L., BIOLOŠKI EFEKTI NA KOŽI I IMOBILIZACIJA EKSTRAKATA U NOSAČE

REZIME

Vrsta *Paeonia tenuifolia* L. (Paeoniaceae) ili stepski božur je višegodišnja zeljasta biljka bogata polifenolima koji ispoljavaju antioksidativni, antimikrobni, antiinflamatorni, antikancerogeni i kardioprotektivni potencijal. Optimizacija procesa ekstrakcije predstavlja inicijalni korak u dobijanju maksimalnog prinosa aktivnih komponenata iz biljaka, kao bezbedne i prirodne alternative sintetskim komponentama. Nestabilnost polifenola usled dejstva spoljašnjih faktora (svetlost, temperatura, vlaga i slično) i niska bioraspoloživost ograničavaju njihove potencijalne korisne efekte na zdravlje ljudi. Inkapsulacijom polifenola prevazilaze se pomenuti problemi i produžava se njihovo poluvreme eliminacije.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su (1) optimizacija procesa ekstrakcije polifenola latica stepskog božura, (2) hemijska i biološka karakterizacija ekstrakata i (3) inkapsulacija ekstrakata u liposome, biopolimerne filmove i/ili sistem lipozom-biopolimerni film.

Optimizacija procesa ekstrakcije je izvedena variranjem faktora od interesa: lokalitet sakupljanja biljnog materijala, vrsta rastvarača i metoda ekstrakcije (maceracija, ekstrakcija potpomognuta delovanjem ultrazvučnih talasa i ekstrakcija potpomognuta delovanjem mikrotalasnog zračenja). Optimalni uslovi za dobijanje ekstrakata sa najvećim sadržajem polifenola razlikovali su se u zavisnosti od primenjene metode ekstrakcije. Najviši sadržaj polifenola je zabeležen u ekstraktima latica sakupljenih na lokalitetu Gulenovci.

Primenom UHPLC-LTQ-Orbitrap MS metode, u ekstraktu latica stepskog božura koji spontano raste na lokalitetu Gulenovaca detektovano je pet grupa bioaktivnih jedinjenja. Fenolne kiseline čine najbrojniju grupu jedinjenja, a među njima su galna, elaginska, *p*-kumarinska, ferulanska i digalna kiselina. Prema ciljanoj UHPLC/MS analizi, u najvećoj količini je prisutna elaginska kiselina, za koju je naučno već dokazano da ispoljava brojne pozitivne efekte na zdravlje ljudi.

Antioksidativna aktivnost ekstrakata je evaluirana primenom četiri testa (ABTS, DPPH, CUPRAC i FRAP metode), dok je antimikrobni potencijal ispitivan na više bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis* i *Proteus vulgaris*) i gljivica (*Candida albicans*, *Candida krusei* i *Candida kefyr*). Takođe se pokazalo da ekstrakti ne pokazuju citotoksični efekat na imortalizovane humane keratinocite (HaCaT ćelijske linije) i da dovode do proliferacije ćelija i njihove poboljšane migracije, što je rezultiralo *in vitro* pospešivanjem zarastanja rana. Vodeni i metanolni ekstrakti latica stepskog božura iz Gulenovaca inhibirali su adheziju i invaziju *S. aureus* na HaCaT ćelije.

U cilju zaštite polifenolnih komponenata, izvršena je inkapsulacija ekstrakata u liposome, biopolimerne filmove i sisteme lipozom-biopolimerni film (filmovi na bazi karboksimetil-celuloze). Ispitivan je potencijal kontrolisanog otpuštanja i biološke aktivnosti dobijenih inkapsulata, te im je definisan hemijski sastav i fizička svojstva.

Različite metode inkapsulacije (inkapsulacija u liposome, biopolimerne filmove, kao i u sistem lipozom-biopolimerni film) uticale su na fizičko-hemijske karakteristike pripremljenih inkapsulata, što je potvrđeno rezultatima dobijenim primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FT-IR), testovima bioloških aktivnosti (antimikrobna i antibiofilm aktivnost) i studijom kontrolisanog otpuštanja. Biološki testovi su dokazali da lipozomi koji sadrže Fosfolipon (fosfolipidnu komponentu) najefikasnije inhibiraju rast ispitanih mikroorganizama i da njihova dalja inkapsulacija u biopolimerne filmove umanjuje njihov antimikrobni potencijal, što može da ukazuje da se tokom trajanja ispitivanja ne oslobađa dovoljna količina bioaktivnih komponenata. Rezultati kinetike otpuštanja su pokazali da su biopolimerni filmovi sa lipozomima u koje su bili inkapsulirani ekstrakti latica ispoljili najveći otpor difuziji, što je posledično dovelo do najsporijeg oslobađanja polifenola, implicirajući da se ove formulacije potencijalno mogu koristiti za izradu proizvoda sa produženim delovanjem.

Ključne reči: stepski božur, optimizacija procesa ekstrakcije, hemijski profil, biološka aktivnost, inkapsulacija.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Hemijsko inženjerstvo

UDK broj:

OPTIMIZATION OF *PAEONIA TENUIFOLIA* L. PETAL EXTRACTION, BIOLOGICAL EFFECTS ON THE SKIN AND IMMOBILIZATION OF EXTRACTS IN CARRIERS

SUMMARY

The species *Paeonia tenuifolia* L. (Paeoniaceae) or steppe peony is a perennial herbaceous plant rich in polyphenols that show antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, anti-cancer, and cardioprotective effects. Optimization of the extraction process represents the initial step in obtaining the maximum yield of active components from plants, as a safe and natural alternative to synthetic components. The instability of polyphenols due to the effect of external factors (light, temperature, humidity, etc.) and their low bioavailability limit their potential beneficial effects on human health. The encapsulation of polyphenols leads to overcoming the mentioned problems, but also to the prolongation of their half-time elimination.

The goals of this doctoral dissertation were (1) optimization of the extraction of polyphenols from steppe peony petals, (2) chemical and biological characterization of the extracts, and (3) encapsulation of the extract in liposomes, biopolymer films, and/or liposome-biopolymer film systems.

The optimization of the extraction process was carried out by varying the factors of interest: the locality of the collection of plant material, the type of solvent, and the extraction method (maceration, ultrasound- and microwave-assisted extractions). The optimal conditions for obtaining extracts with the highest polyphenol content differed depending on the applied extraction method. The highest polyphenol content was recorded in the extract of the petals collected in Gulenovci.

By applying the UHPLC-LTQ-Orbitrap MS method to the extract of the petals of the steppe peony that grows spontaneously in the territory of Gulenovci, five groups of bioactive compounds were detected. Phenolic acids present the most numerous group of compounds, among which are gallic, ellagic, *p*-coumaric, ferulic, and digalic acids. According to targeted UHPLC/MS analysis, ellagic acid is present in the highest amount, which is characterized by numerous beneficial effects on human health.

The antioxidant activity of the extracts was assessed using four tests (ABTS, DPPH, CUPRAC, and FRAP assays), while the antimicrobial potential was determined using bacterial (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*, and *Proteus vulgaris*) and fungal strains (*Candida albicans*, *Candida krusei*, and *Candida kefyr*). In the cytotoxicity test of the extracts, it was proven that they are not cytotoxic towards immortalized human keratinocytes (HaCaT cell lines), and in addition to that, they lead to cell proliferation and improved migration, which results in the *in vitro* effect of promoting wound healing. Aqueous and methanolic extracts of petals collected in Gulenovci showed an inhibitory effect on the adhesion and invasion of *S. aureus* on HaCaT cells.

In order to protect the polyphenolic components, the extracts were encapsulated in liposomes, biopolymer films, and liposome-biopolymer film systems (the films are based on carboxymethyl

cellulose). The encapsulates were then examined from the aspect of controlled release, biological activity, chemical composition, and physical properties.

Different encapsulation methods (encapsulation into liposomes, biopolymer films, and liposome-biopolymer film systems) affected the physico-chemical characteristics of the obtained encapsulates, which was confirmed by the results obtained using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), biological activity tests (antimicrobial and antibiofilm activities) and controlled release study. Biological tests have shown that liposomes containing Phospholipon as a phospholipid are the most effective in inhibiting the growth of the tested bacterial and fungal strains, while their further encapsulation into biopolymer films leads to a decrease in this potential, which indicates that during the test period, an insufficient amount of the necessary bioactive components is released. FT-IR characterization of liposomes and films confirmed that the encapsulation of extracts into carriers was successful. The release kinetics results showed that biopolymeric films with liposomes encapsulated with petal extracts exhibited the highest diffusion resistance, which consequently led to the slowest release of polyphenols, implying that these formulations could potentially be used for the preparation of prolonged-release products.

Keywords: steppe peony, optimization of extraction, chemical profile, biological activity, encapsulation.

Scientific field: Technological Engineering

Scientific subfield: Chemical Engineering

UDC number:

SADRŽAJ

1.	TEORIJSKI DEO	1
1.1.	Rod <i>Paeonia</i> L.	1
1.2.	Stepski božur (<i>Paeonia tenuifolia</i> L.)	1
1.3.	Tradicionalna primena zeljastih božura	2
1.4.	Sekundarni metaboliti biljaka i polifenolna jedinjenja.....	4
1.5.	Polifenolna jedinjenja kao antioksidansi.....	6
1.6.	Polifenolna jedinjenja kao antimikrobni agensi.....	8
1.7.	Polifenolna jedinjenja kao supresori razvoja bakterijskog biofilma	10
1.8.	Polifenoli kao supresori adhezije i invazije bakterija.....	11
1.9.	Citotoksičnost polifenolnih jedinjenja.....	12
1.10.	Polifenolna jedinjenja kao aktivne komponente za pospešivanje zarastanja rana.....	13
1.11.	Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja	14
1.11.1.	Maceracija kao klasična metoda ekstrakcije.....	15
1.11.2.	Ekstrakcija potpomognuta ultrazvučnim talasima.....	15
1.11.3.	Ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima	16
1.12.	Inkapsulacija polifenolnih jedinjenja	17
2.	Cilj istraživanja	21
3.	Eksperimentalni deo	22
3.1.	Materijali i metode istraživanja.....	22
3.1.1.	Biljni materijal	22
3.1.2.	Metode ekstrakcije biljnog materijala	22
3.1.2.1.	Maceracija.....	22
3.1.2.2.	Ekstrakcija potpomognuta ultrazvučnim talasima.....	23
3.1.2.3.	Ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima	23
3.1.3.	Spektrofotometrijske metode karakterizacije	23
3.1.3.1.	Određivanje sadržaja ukupnih polifenola.....	23
3.1.3.2.	Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	24
3.1.4.	Hemijska karakterizacija ekstrakata	25
3.1.4.1.	Hibridna masena spektrometrija - UHPLC-LTQ-Orbitrap MS.....	25
3.1.4.2.	Ciljna analiza aktivnih jedinjenja ultravisoko efikasnom tečnom hromatografijom - UHPLC/MS	25
3.1.5.	Priprema lipozomalnih čestica.....	26

3.1.6.	Metode karakterizacije lipozomalnih čestica	26
3.1.6.1.	Određivanje stepena inkapsulacije	26
3.1.6.2.	Studija stabilnosti	27
3.1.6.3.	Ispitivanje reoloških svojstava.....	27
3.1.7.	Priprema biopolimernih filmova	27
3.1.7.1.	Biopolimerni filmovi sa ekstraktom latica.....	27
3.1.7.2.	Biopolimerni film sa lipozomima sa inkapsuliranim ekstraktom	28
3.1.8.	Metode karakterizacije biopolimernih filmova	28
3.1.8.1.	Određivanje sadržaja vlage	28
3.1.8.2.	Određivanje mehaničkih svojstava filmova	28
3.1.8.3.	Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	29
3.1.9.	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR).....	29
3.1.10.	Studija kontrolisanog otpuštanja	30
3.1.11.	Metode ispitivanja biološke aktivnosti	31
3.1.11.1.	Metode ispitivanja antioksidativne aktivnosti	31
3.1.11.2.	Metode ispitivanje antibakterijske aktivnosti	33
3.1.11.3.	Metode ispitivanja antifungalne aktivnosti.....	33
3.1.11.4.	Ispitivanje antibiofilm aktivnosti.....	34
3.1.11.5.	Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata	34
3.1.11.6.	Ispitivanje efekata na kapacitete adhezije i invazije <i>Staphylococcus lugdunensis</i> na HaCaT ćelijama.....	35
3.1.11.7.	<i>In vitro</i> ispitivanje efekta uzoraka na zarastanje rana	35
3.1.12.	Statistička analiza	35
4.	Rezultati i diskusija	37
4.1.	Optimizacija procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenata.....	37
4.2.	Hemijski profil latica stepskog božura.....	39
4.3.	Kvantifikacija ciljanih komponenata ekstrakata latica <i>Paeonia tenuifolia</i> L.	50
4.4.	Antioksidativna aktivnost ekstrakata.....	52
4.5.	Antimikrobna i antibiofilm aktivnost ekstrakata	56
4.6.	Citotoksičnost ekstrakata	61
4.7.	Dejstvo ekstrakata latica stepskog božura na <i>in vitro</i> migraciju HaCaT ćelija	61
4.8.	Efekti uzoraka na adheziju i invaziju <i>Staphylococcus lugdunensis</i> prema HaCaT ćelijama	63

4.9.	Lipozomi sa inkapsuliranim ekstraktom – fizičko-hemijske karakteristike, stabilnost i biološki potencijal	64
4.9.1.	Stepen inkapsulacije polifenola latica <i>Paeonia tenuifolia</i> L. u lipozome	64
4.9.2.	Stabilnost lipozoma	66
4.9.3.	Reološka svojstva lipozoma	70
4.9.4.	Antioksidativna aktivnost lipozoma	71
4.9.5.	Citotoksičnost lipozoma	73
4.9.6.	Dejstvo lipozoma na <i>in vitro</i> migraciju HaCaT ćelija	74
4.9.7.	Efekti lipozoma na adheziju i invaziju <i>Staphylococcus lugdunensis</i> prema HaCaT ćelijama	75
4.10.	Karakterizacija biopolimernih filmova	76
4.10.1.	Sadržaj vlage biopolimernih filmova	76
4.10.2.	Mehanička svojstva biopolimernih filmova	77
4.10.3.	Analiza biopolimernih filmova skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM)	79
4.11.	FT-IR spektri lipozoma i biopolimernih filmova	81
4.12.	Studija kontrolisanog otpuštanja	84
4.13.	Biološke aktivnosti inkapsulata	88
4.13.1.	Antibakterijska aktivnost lipozoma	88
4.13.2.	Antifungalna aktivnost lipozoma	89
4.13.3.	Antibakterijska aktivnost biopolimernih filmova	90
4.13.4.	Antifungalna aktivnost biopolimernih filmova	91
4.13.5.	Antibiofilm aktivnost lipozoma	92
5.	Zaključak	94
6.	Literatura	96
	Spisak slika	119
	Spisak tabela	121
	Spisak skraćenica	122
	Biografski podaci	124
	Lista objavljenih radova	125

1. TEORIJSKI DEO

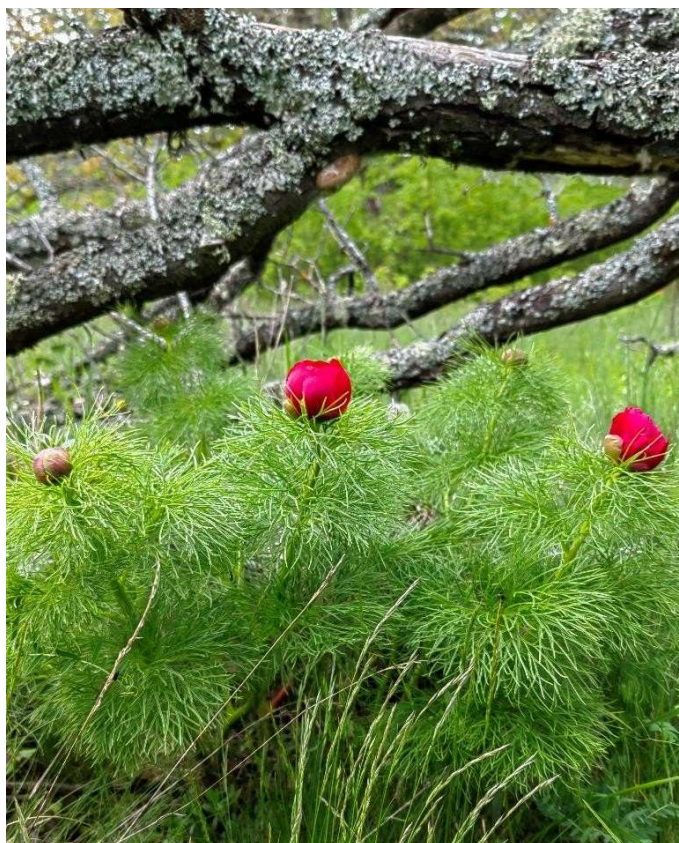
1.1. Rod *Paeonia* L.

Vrste koje pripadaju rodu *Paeonia* široko su prepoznate kao bogati izvori germplazme i karakteriše ih različit habitus biljaka koje krasi cvetovi raznovrsnih oblika i boja. Rod *Paeonia* se sastoji od dva podroda: 1) podrod *Moutan* i 2) podrod *Paeonia* [1]. Podrod *Moutan* obuhvata 10 vrsta (*Paeonia cathayana*, *Paeonia decomposita*, *Paeonia delavayi*, *Paeonia jishanensis*, *Paeonia ludlowii*, *Paeonia ostii*, *Paeonia qiui*, *Paeonia rockii*, *Paeonia rotundilobai*, *Paeonia suffruticosa*), od kojih su sve drvenaste i endemične za Kinu [2,3]. Podrod *Paeonia* broji 25 vrsta, od kojih su sve zeljaste, a najrasprostranjenije su u umerenim zonama Starog sveta u Aziji, od Japana na zapadu do Portugala i Maroka, a najviše na Mediteranu i u regiji istočne Azije (*Paeonia anomala*, *Paeonia emodi*, *Paeonia lactiflora*, *Paeonia sterniana*, *Paeonia veitchii*, *Paeonia arietina*, *Paeonia intermedia*, *Paeonia officinalis*, *Paeonia parnassica*, *Paeonia peregrina*, *Paeonia saueri*, ***Paeonia tenuifolia***, *Paeonia obovata*, *Paeonia mairei*, *Paeonia algeriensis*, *Paeonia broteri*, *Paeonia cambessedesii*, *Paeonia clusii*, *Paeonia coriacea*, *Paeonia corsica*, *Paeonia daurica*, *Paeonia kesrouanensis*, *Paeonia mascula*, *Paeonia brownii*, *Paeonia californica*) [4,5].

Od svih zeljastih božura koji su do sada otkriveni u svetu, na teritoriji Republike Srbije spontano raste sledećih pet taxona: *P. tenuifolia* L. (stepski ili uskolisni božur), *P. peregrina* Mill. (kosovski božur), *P. officinalis* L. (evropski ili ženski božur), *P. banatica* Rochel (panonski božur) i *Paeonia daurica* Andrews (balkanski ili divlji božur) [3,6]. Iako su stepski kosovski božur u većoj meri rasprostranjeni u poređenju sa preostale tri vrste zeljastih božura sa ovih prostora, sve su uvrštene u Crvenu knjigu flore Srbije [7] i strogo zaštićene Zakonom o zaštiti prirode Republike Srbije [8].

1.2. Stepski božur (*Paeonia tenuifolia* L.)

P. tenuifolia (slika 1) je višegodišnja zeljasta vrsta poreklom sa ruskih planina Kavkaza i ukrajinske obale Crnog mora, a proširila se na istok, do severozapadnog Kazahstana i na zapad, u Bugarsku, Rumuniju i Srbiju [6]. U našoj zemlji stepski božur spontano raste na nekoliko lokaliteta, među kojima je najrasprostranjeniji u Deliblatskoj peščari (Banat), a spontano raste i u centralnoj Srbiji (u okolini Dimitrovgrada, blizu planine Vidlič) [6]. Staništa su mu suve livade, kamenjari, stepe i pašnjaci, na mestima koja su osunčana ili u blagoj senci, a može dostići visinu i do 50 cm. Karakterišu je pojedinačni cvetovi oblika čaše sačinjene od 5-8 jarko crvenih jajolikih latica, sa jarko žutim prašnicima smeštenim u centralnom delu cveta. Biljke cvetaju u maju, a dužina faze cvetanja je svega 7-10 dana.



Slika 1 *Paeonia tenuifolia* L. u punom cvetu, Gulenovci, Srbija (maj 2023. godine)

1.3. Tradicionalna primena zeljastih božura

U narodnoj medicini mnogih kultura, vrste roda *Paeonia* se smatraju lekovitim. Približno 23 vrste, 2 podvrste i 7 varijeteta se pominju u konvencionalnim medicinskim zapisima [4,5]. Kroz istoriju su korišćeni različiti delovi ovih biljaka (koren, kora korena, cvetovi, listovi, seme i cele biljke) u tretmanima mnogih zdravstvenih tegoba, kao što su poremećaji menstrualnog ciklusa (dismenoreja i amenoreja), bolovi (glave, stomaka, očiju i dr.), neurološke tegobe (spazam i epilepsija), stafilokokne upale folikula i perifolikularnog tkiva (karbunkuli), hematurija, upale (srednjeg uha, slepog creva i želudačne sluznice) i traume. Najčešće korišćeni biljni delovi bili su koren i njegova kora. U današnje vreme, potencijalna lekovitost biljaka iz roda *Paeonia* privlači sve veću pažnju istraživača.

Tradicionalna medicinska upotreba božura često se povezuje sa njihovim botaničkim karakteristikama. U slučaju vrsta koje pripadaju podrodu *Paeonia*, koji obuhvata sve zeljaste božure, u tradicionalnoj medicini se najčešće koristio koren, zbog svojih povoljnih dejstava na ljudsko zdravlje. Vrsta *P. lactiflora* Pall. se smatra reprezentativnom, a njen koren se u tradicionalnoj kineskoj medicini (TKM) koristi za lečenje bolova u stomaku, hemostaze i nekontrolisanog mokrenja. *Radix Paeoniae* Rubra i *Radix Paeoniae* Alba predstavljaju dve forme biljne sirovine – korena vrste *P. lactiflora*, koje se dobijaju različitim tretmanom ubiranja i prerade, i s tim u vezi imaju različita lekovita dejstva (Kineska farmakopeja,). Terapijski efekat *Radix Paeoniae* Rubra ogleda se u ubrzavanju cirkulacije dovodeći do

smanjenja povišene telesne temperature i ublažavanja bola, dok je *Radix Paeoniae Alba* tonik koji blagotvorno deluje na jetru. Takođe, *Radix Paeoniae Rubra* se uglavnom koristi za lečenje hematemeze, toksina otpornih na toplotu, amenoreje, dismenoreje, bolova u stomaku, upalnih procesa očiju, glavobolje i karbunkla, dok se *Radix Paeoniae Alba* više koristi u tretmanima neredovnih menstrualnih ciklusa i zaštiti jetre [11,12]. Klinički, ova dva medikamenta iz TKM ulaze u sastav preparata koji se koriste za lečenje različitih bolesti. Podaci o korenu *P. veitchii* su takođe zabeleženi u Kineskoj farmakopeji (izdanje iz 2020.), kao originalnoj biljci korišćenoj za pripremu *Radix Paeoniae Rubra*. Istovremeno, koreni mnogih drugih vrsta (*P. obovata*, *P. obovata* var. *vilmottiae*, *P. mairei*, *P. sterniana*, *P. anomala*, *P. anomala* subsp. *intermedia*, *P. emodi*, *P. sinjiangensis* i *P. japonica*) iz podroda *Paeonia* su korišćeni kao zamena za *Radix Paeoniae Rubra* u nekim regionima Kine zbog sličnosti njihove botaničke morfologije sa morfologijom same *P. lactiflora*. U Evropi i Sjedinjenim Državama, koren božura se koristio kao tinktura za lečenje dispepsije i poremećaja u toku menopauze [13].

P. officinalis je poreklom iz jugoistočne Evrope i u Evropi se gaji dugi niz godina. Zabeleženo je da se koren ove biljne vrste koristi kao lek već više od 2000 godina, kao i da se uglavnom primenjuje za lečenje epilepsije i neredovnih menstrualnih ciklusa [14]. U tradicionalnom indijskom unani i ajurvedskom sistemu medicine, seme i koren se koriste u nekim lekovitim preparatima namenjenim lečenju bolesti nervnog sistema i jetre [15].

P. emodi Royle je vrsta božura koja je često korišćena u mnogim zemljama. Ahmad i sar. [14] su detaljno opisali njenu tradicionalnu medicinsku primenu i otkrili da se njen koren, a takođe i cvet, list, krtola i plod, mogu koristiti u terapiji različitih bolesti navesti bar neku bolest [14]. Na Tibetu se koren ove vrste koristi kao zamena za *Radix Paeoniae Rubra*. U Pakistanu je infuz suvog cveta *P. emodi* veoma cenjen preparat protiv dijareje, dok se seme koristi kao emetik i katarzik [16]. U Indiji se koren i cvet koriste u tretmanima grčeva, dizenterije, dijabetesa, urinarnih tegoba, histerije, epilepsije i poremećaja menstrualnog ciklusa [17]. Neke druge lekovite vrste iz podroda *Paeonia* takođe se koriste za lečenje bolesti nervnog sistema. *P. mascula*, *P. officinalis* i *P. peregrina* su korišćene u lečenju epilepsije, a *P. corallina* i *P. foemina* su korišćene za lečenje grčeva [18].

Cvetovi vrsta iz roda *Paeonia* su poznati po svojim nutritivnim vrednostima; bogati su proteinima, ugljenim hidratima i drugim hranljivim materijama, kao i superoksid dismutazom [19]. Kina ima dugu istoriju upotrebe jestivih cvetova božura u sklopu svoje tradicionalne medicine, dok ih ljudi i pored toga, koriste zbog povoljnih dejstava na spoljašnji izgled [20]. Trenutno su čaj od cvetova božura, kaša, vino i kolač uobičajeni načini uzimanja cvetova božura.

U tradicionalnoj medicini, stepski božur se koristio za lečenje bolesti srca, plućne tuberkuloze, anemije i kod raznih trovanja. Ispoljava baktericidno, protistocidno i fitoncicidno delovanje [9]. Uprkos širokoj primeni, u dosadašnjem periodu je malo pažnje posvećeno njegovom detaljnom hemijskom sastavu. Istraživanja su bila fokusirana na sadržaj askorbinske kiseline u listovima, flavonoidima i antocijaninima u cvetovima i polenu, i masnim uljima u semenu [10].

1.4. Sekundarni metaboliti biljaka i polifenolna jedinjenja

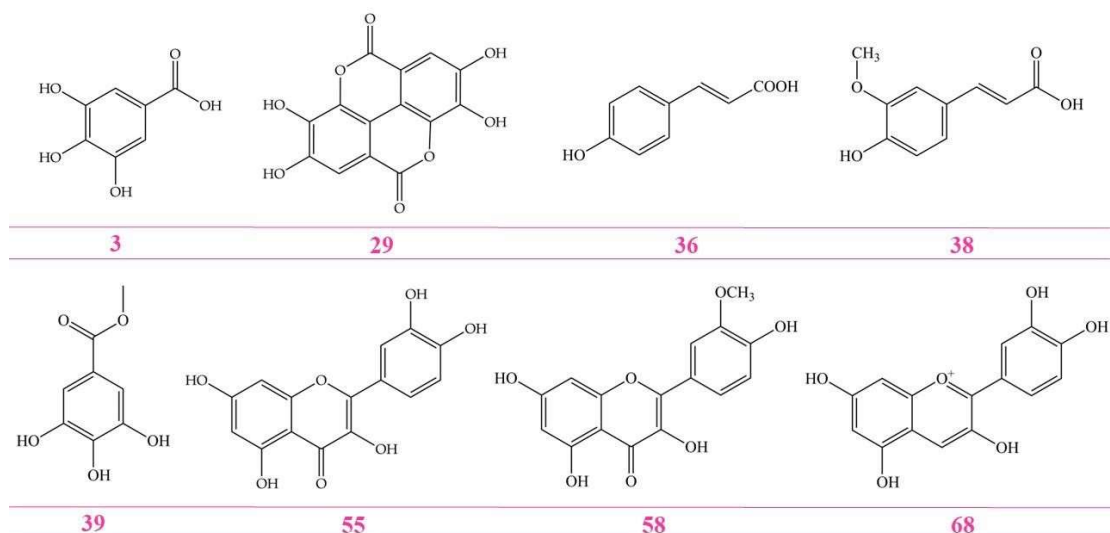
Sekundarni metaboliti biljaka se često smatraju jedinjenjima koji nemaju fundamentalnu ulogu u održavanju životnih procesa u biljkama, ali su važni za njenu interakciju sa okolinom radi adaptacije i odbrane [21]. Ovi molekuli imaju širok spektar dejstva na samu biljku i na druge žive organizme. Ključni su za procese cvetanja, formiranje plodova i njihovo opadanje, podržavaju višegodišnji rast ili utiču na ponašanje listopadnih biljaka. Oni deluju kao antimikrobni agensi, a mogu obavljati i ulogu atraktanata ili, obrnuto, kao repelenata. U biljnom carstvu otkriveno je preko 50.000 različitih vrsta sekundarnih metabolita. Lekovita svojstva biljaka se zasnivaju na njihovim sekundarnim metabolitima [22]. Dodatno, veliki broj savremenih lekova u svom sastavu sadrži pomenuta jedinjenja.

U višim biljkama veliki broj sekundarnih metabolita se sintetiše iz primarnih metabolita (npr. ugljeni hidrati, lipidi i aminokiseline). Ova vrsta jedinjenja je, između ostalog, neophodna u odbrani biljaka od biljojeda i patogena i zaštitu od stres uslova okoline. Sekundarni metaboliti takođe doprinose specifičnim mirisima, ukusima i bojama u biljkama. Biljni sekundarni metabolizam je jedinstveni izvor aroma, aditiva za hranu i aktivnih jedinjenja farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Akumulacija sekundarnih metabolita se često dešava u biljkama koje su podvrgnute stresu, uključujući različite elicitore ili signalne molekule [21]. Stoga, može se zaključiti da sekundarni metaboliti pored toga što imaju značajnu praktičnu primenu u medicinske, nutritivne i kozmetičke svrhe, pokazuju značaj i u fiziologiji biljaka za prilagođavanje stresu. Prinos ovih jedinjenja je često nizak (manje od 1% suve težine) i u velikoj meri zavisi od fiziološkog i razvojnog stadijuma biljke.

Među prirodnim supstancama dobijenim iz biljaka nalaze se lekovite komponente poput morfijuma, kodeina, salicilne kiseline, kinina i drugih. Biljni aktivni principi korišćeni u farmakologiji uključuju alkaloidne iz *Catharanthus*, alkaloidne beladone, kolhicin, fitostigmin, pilokarpin, rezerpin, kao i steroide poput diosgenina, digoksina i digitoksina, uz flavonoide, fenole i njima slične komponente.

Sekundarni biljni metaboliti su klasifikovani prema njihovoj hemijskoj strukturi u nekoliko klasa. Klase sekundarnih biljnih metabolita uključuju: polifenole, alkaloidne, saponine, terpenne i druga jedinjenja [23].

Polifenoli (slika 2) čine najveću grupu sekundarnih metabolita biljaka. Zajedničko im je prisustvo jedne ili više fenolnih grupa i mogu biti jednostavnih struktura sa jednim aromatičnim prstenom do visoko složenih polimernih supstanci. Neki fenoli su cenjeni farmakološki agensi zbog svog antiinflamatornog potencijala, kao što je kvercetin, ili hepatoprotektivnih svojstava, kao što je silibinin. Drugi polifenoli ispoljavaju fitoestrogenu aktivnost, poput genisteina i daidzeina, dok su drugi insekticidna jedinjenja, kao što je naringenin [24]. Mnogi polifenoli su takođe efikasni antioksidansi, posebno flavonoidi. Polifenoli se mogu klasifikovati prema njihovoj strukturi ili biosintetičkom poreklu. Prema svojoj strukturi, fenoli se mogu klasifikovati na: jednostavne fenole, tanine, kumarine, flavonoide, hormone i ksantone, stilbene, lignane i fenolkarboksilne kiseline.



Slika 2 Hemijska struktura nekih fenolnih jedinjenja. *3- galna kiselina; 29 - elaginska kiselina; 36 - p-kumarinska kiselina; 38 - ferulanska kiselina; 39 - metil galat; 55 - kvercetin; 58 - isorhamnetin; 68 - cijanidin

Fenolne kiseline su široko rasprostranjene u biljnom svetu, posebno galna kiselina koja služi kao osnovna komponenta galotanina. Galna kiselina je dobro poznata po svojim adstringentnim svojstvima, ali je pokazala mnoge druge aktivnosti *in vitro*, uključujući antibakterijsko, antivirusno, antifungalno, antiinflamatorno, antitumorsko, antianafilaktičko, antimutageno, holeretičko i bronhodilatatorno dejstvo [23]. Takođe inhibira razgradnju insulina i omogućava relaksaciju glatkih mišića [25]. Fenolna jedinjenja u ovoj grupi variraju u zavisnosti od njihove funkcionalne grupe, koja može biti hidroksilna, aldehidna ili karboksilna; tu spadaju eugenol (fenolni fenilpropan), vanilin (fenolni aldehyd) i salicilna, ferulna i kafeinska kiselina (fenolne kiseline). Hidrohinon je takođe široko distribuiran jednostavni fenol, koji se javlja u brojnim biljkama kao glikozid arbutin. Formiranje glikozida je uobičajeno u sekundarnom metabolizmu biljke, dok široko rasprostranjeni glikozid koniferin i drugi derivati fenolnih cimetnih alkohola predstavljaju prekursore lignina [26]. Farmakološka svojstva ovih široko rasprostranjenih sastojaka se ogledaju u antimikrobnom potencijalu na nivou urinarnog trakta (arbutin) [27] i antiinflamatornom efektu (salicilati) [28]. Svojstvo koje je zajedničko za sve fenole je njihova antimikrobna aktivnost. Zapravo je sam fenol prvi korišćeni antiseptik u hirurgiji [29].

Flavonoidi su najveća grupa polifenola. U današnje vreme je poznato više od 2000 ovih jedinjenja, od kojih se skoro 500 nalazi u slobodnom obliku [26]. Strukturni skelet flavonoida uključuje hromanski prsten koji ima vezan aromatični prsten na poziciji 2, 3 ili 4. Flavonoidi se mogu podeliti u različite klase prema stepenu oksidacije centralnog prstena (prsten C). Najveći broj flavonoida čine antocijanini, flavoni i flavonoli. Flavoni su često žuti (lat. *flavus*, žuti). Oni su široko rasprostranjeni u prirodi, ali su češći u višim biljkama i u mladim tkivima, gde se javljaju u ćelijskom soku. Nedavna istraživanja su pokazala lekovito dejstvo biljnih vrsta koje su bogate flavonoidima, kao što su *Glycyrrhiza glabra* (koren sladića), *Chamaemelum nobile* (rimska kamilica) i *Ginkgo biloba* (gingko). Flavonoidi su poznati po

svojim antiinflamatornim i antialergijskim efektima, po antitrombotičkim i vazoprotektivnim svojstvima, po inhibiciji promocije rasta tumora i kao zaštitna sredstva za sluznicu želuca [30,31].

Terpeni su druga najveća i najraznovrsnija grupa sekundarnih metabolita biljaka. Naziv „terpen“ potiče od reči „terpentin“, koja potiče od starog francuskog ter(e)bintb, što znači „smola“. Svi terpeni i njihovi derivati su hemijski izvedeni iz jedinica 5-ugljenika izoprena sastavljenih na različite načine [32]. Terpeni se klasifikuju prema broju jedinica izoprena u molekulu; prefiks u nazivu označava broj terpenskih jedinica na sledeći način:

- Hemiterpeni – sastoje se od samo jedne izoprenske grupe. Smatra se da ovoj grupi pripada samo izopren.
- Hemiterpeni – sastoje se od dve izoprenske grupe, a molekulska formula im je $C_{10}H_{16}$. Predstavljaju važnu grupu komponenata u etarskim i lako isparljivim uljima. Monoterpeni se dalje klasifikuju u nezasićene ugljene hidrate (npr. limonen), alkohole (npr. linalool), estre alkohola (npr. linalil acetat), aldehide (npr. citronelal) i ketone (npr. karvon).
- Seskviterpeni – sastoje se od tri izoprenske grupe, a karakteriše ih molekulska formula $C_{15}H_{24}$. Na osnovu biogenetskog porekla, postoji više od 200 različitih strukturnih tipova seskviterpena, a poznato je nekoliko hiljada takvih jedinjenja. Ova jedinjenja se mogu klasifikovati u tri glavne grupe prema strukturi: aciklična (npr. farnezol), monociklična (npr. bisabolol) i biciklična (npr. kariofilen). Brojni seskviterpenski laktone pokazuju antibakterijske, antifungalne i antiprotozoične aktivnosti.
- Diterpeni – sastoje se od četiri izoprenske grupe, sa molekulskom formulom $C_{20}H_{32}$. Kao i sve grupe terpena, diterpeni su pokazali niz farmakoloških svojstava uključujući: analgetičko, antibakterijsko, antifungalno, antiinflamatorno, antineoplastično i antiprotozoalno dejstvo [32].
- Triterpeni – sastoje se od šest izoprenskih grupa, molekulske formule $C_{30}H_{48}$. Triterpeni čine značajan deo lipidnih supstanci svih biljaka; izolovano je više od 4000 triterpenoida. Ova jedinjenja su prekursori steroida u biljkama.

1.5. Polifenolna jedinjenja kao antioksidansi

Polifenoli postaju sve važnija biljna jedinjenja, posebno zbog njihovog povoljnog dejstva na zdravlje ljudi i životinja. Njihova uloga kao prirodnih antioksidanata se ogleda u potencijalnoj prevenciji i terapiji raka [33,34], kao i inflamatornih, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti [35]. Njihov unos konzumiranjem voća, povrća, semena i orašastih plodova povezan je sa manjim rizikom od hroničnih i degenerativnih bolesti koje se dovode u vezu sa starenjem [36,37]. Imaju široku primenu kao dodaci ishrani i farmaceutski i kozmetički aditivi i aktivne komponente [33–38].

Oksidativni stres se definiše kao neravnoteža između proizvodnje slobodnih radikala i reaktivnih metabolita, takozvanih oksidanasa ili reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive*

oxygen species - ROS), i njihovog eliminisanja zaštitnim mehanizmima, preko jedinjenja koja se nazivaju antioksidansi. Ova neravnoteža dovodi do oštećenja važnih biomolekula i ćelija, sa potencijalnim uticajem na ceo organizam. Oksidativni stres može oštetiti lipide, proteine, ugljene hidrate i DNK u ćelijama, što dovodi do oštećenja membrane, fragmentacije ili nasumičnog umrežavanja molekula DNK, enzima i strukturnih proteina, pa čak i do smrti ćelije izazvane fragmentacijom DNK i peroksidacijom lipida. Ove posledice oksidativnog stresa predstavljaju molekularnu osnovu za razvoj kardiovaskularnih bolesti, raka, neurodegenerativnih poremećaja, dijabetesa i autoimunih poremećaja. ROS su proizvodi normalnog ćelijskog metabolizma i igraju vitalnu ulogu u stimulaciji signalnih puteva u ćelijama kao odgovor na promene u intra- i ekstracelularnim uslovima životne sredine. Većina ROS se generiše u ćelijama u mitohondrijalnom respiratornom lancu. Tokom endogenih metaboličkih reakcija, aerobne ćelije proizvode ROS kao što su superoksid anjon ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), vodonik peroksid (H_2O_2) i organski peroksidi kao normalni proizvodi biološke redukcije molekularnog kiseonika. Prenos elektrona na molekularni kiseonik se dešava na nivou respiratornog lanca, a lanci transporta elektrona se nalaze u membranama mitohondrija. U hipoksičnim uslovima, mitohondrijski respiratorni lanac takođe proizvodi azot oksid (NO), koji može da generiše reaktivne vrste azota (engl. *reactive nitrogen species* - RNS). ROS/RNS može dalje da generiše druge reaktivne vrste izazivanjem prekomerne peroksidacije lipida. Da bi se suzbili i neutralisali štetni efekti ROS/RNS, različite antioksidativne strategije su uključivale ili povećanje endogene antioksidativne enzimske odbrane (npr. superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza i katalaza) ili poboljšanje neenzimske odbrane (npr. glutation, vitamini) putem dijetetskih ili farmakoloških sredstava. Antioksidansi mogu da odlože, inhibiraju ili spreče oksidaciju supstrata koji se može oksidovati uklanjanjem slobodnih radikala i smanjenjem oksidativnog stresa. Međutim, u uslovima bolesti, odbrana od radikala je oslabljena ili oštećena, a opterećenje oksidansima se povećava. U takvim uslovima, spoljno snabdevanje antioksidansima je od suštinskog značaja za kompenzaciju štetnih posledica oksidativnog stresa [39,40]. Polifenoli mogu delovati kao antioksidansi putem brojnih potencijalnih mehanizama. Neutralizacija slobodnih radikala, u kojoj polifenoli mogu prekinuti lančanu reakciju slobodnih radikala, kao i supresija stvaranja slobodnih radikala regulacijom aktivnosti enzima ili heliranjem metalnih jona uključenih u proizvodnju slobodnih radikala, smatraju se najvažnijim mehanizmima njihove antioksidativne aktivnosti. Interakcija između polifenolnih jedinjenja sa drugim fiziološkim antioksidansima je još jedan mogući antioksidativni mehanizam [41,42].

Kako bi procenili efikasnost polifenola kao antioksidanasa, kao i da bi razjasnili način njihovog delovanja, istraživači danas koriste širok spektar eksperimentalnih modela, od najjednostavnijih testova hemijskih oksidanasa i antioksidanasa preko biološki relevantnijih testova zasnovanih na ćelijama do najefikasnijeg testa na životinjskim modelima, a na kraju i kliničke studije. Uzimajući u obzir sve poznate prednosti i ograničenja, svaki metod koji se trenutno koristi za ispitivanje antioksidativnog potencijala supstance daje korisne informacije na određenom nivou.

Poznato je da su efekti polifenola koji promovišu zdravlje širi od njihove „osnovne“ antioksidativne funkcije. Kontrola starenja i degenerativnih bolesti primenom polifenola je takođe povezana i sa njihovom sposobnošću da inhibiraju neke enzime kao što su ciklooksigenaza i lipooksigenaza 15 uključene u inflamatorne procese [43,44] ili acetilholinesteraza [44], povezane sa nekim neurodegenerativnim bolestima kod kojih oksidativni stres i holinergički nedostatak može stvoriti povoljne uslove za razvoj Alchajmerove ili Parkinsonove bolesti.

1.6. Polifenolna jedinjenja kao antimikrobni agensi

Antibiotici se koriste za sprečavanje i lečenje infekcija uzrokovanih dejstvom bakterija. Otkriće ove vrste lekova bila je istorijska prekretnica koja je dovela do revolucije u medicinskoj praksi, mikrobiologiji i ljudskim životima. Ipak, od samog početka njihove primene, uočeni su otporni bakterijski sojevi. Ovaj trend se intenzivirao tokom poslednjih decenija zbog prekomerne upotrebe i zloupotrebe antibiotika, što je jedna od najvećih pretnji u zdravstvu ili prehrambenoj industriji. Najveća posledica rezistencije na antibiotike je nemogućnost ili otežano lečenje bakterijskih infekcija jer antibiotici gube svoju efikasnost. Neophodno je promeniti sadašnje stavove u vezi antibiotika, u pogledu ne samo njihovog propisivanja i upotrebe, već i poboljšanja prevencije i kontrole infekcija. Otpornost na antibiotike je globalni problem koji pogađa ljude, životinje, životnu sredinu i privredu. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), ako se hitno ne preduzmu preventivne mere, smrtni slučajevi od rezistentnih bakterija biće vodeći uzrok smrti na planeti do 2050. godine. Različite institucije preduzimaju svesne korake u vezi sa ovom temom. Organizacija Ujedinjenih nacija je u svojoj skupštinskoj deklaraciji iz 2016. godine proglasila da je razvoj rezistencije na antibiotike i nedostatak novih antibiotika ogroman problem javnog zdravlja i da zahteva globalno učešće i koordinaciju [47].

SZO je 2017. godine objavila listu globalno prioritetnih patogena koja sadrži 12 porodica bakterija koje su najopasnije po ljudsko zdravlje. Ova lista se uglavnom fokusira na Gram-negativne bakterije otporne na više antibiotika, jer su u stanju da pronađu nove načine da stvore rezistenciju na antibiotike prenošenjem genetskog materijala, čime omogućavaju i drugim bakterijama da postanu otporne na lekove. Ova lista je podeljena u tri kategorije u zavisnosti od hitnosti potrebe za novim antibioticima: kritičnog, visokog i srednjeg prioriteta [48].

U kritičnu i najvažniju grupu, spadaju bakterije otporne na više lekova, koje predstavljaju posebnu opasnost u bolnicama i staračkim domovima. *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i razne *Enterobacteriaceae* (uključujući *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia* i *Proteus*) pripadaju ovoj kategoriji. Neka medicinska stanja, poput infekcija krvotoka i pneumonije mogu biti uzrokovane ovim bakterijama. Pomenuti sojevi mogu razviti otpornost na širok spektar antibiotika kao što su karbapenemi ili cefalosporini treće generacije [48].

Druge dve grupe, kategorije visokog i srednjeg prioriteta, podrazumevaju bakterije koje su sve otpornije na lekove i izazivaju češće bolesti, poput gonoreje i trovanja hranom koje izaziva salmonela [48].

Drugi termin koji se odnosi na bakterije otporne na više lekova je „ESKAPE“, grupa bakterija koja uključuje 6 patogena sa rastućom rezistencijom na više lekova i virulencijom: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. [49]. Ovi patogeni izazivaju većinu bolničkih infekcija i u stanju su da „izbegnu“ biocidno dejstvo velikog broja antimikrobnih agenasa [50].

Pošto razvoj novih antibiotika nije isplativ, dolazi se u situaciju da novi lekovi nisu dostupni, što takođe pogoršava problem. Zbog ovoga je veoma važno pronaći nove strategije za borbu protiv bakterijskih infekcija. Alternativne strategije za borbu protiv patogena koji su rezistentni na dejstvo lekova uključivale su antimikrobne peptide, bakteriofage, nanočestice srebra i fotodinamičku svetlost [51].

Ekstrakti biljaka takođe igraju važnu ulogu kao potencijalni novi resursi za borbu protiv patogenih mikroorganizama. U ovom kontekstu, polifenoli pored antioksidativne, antiinflamatorne, antidijabetičke, antialergijske, antiaterogene, antihipertenzivne, antitrombotičke, anti-kancerogene, kardioprotektivne, osteoprotektivne, neuroprotektivne i hepatoprotektivne aktivnosti, poseduju dokazana antibakterijska, antivirusna i antifungalna svojstva [52,53]. Polifenoli se takođe koriste kao prirodni konzervansi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji zbog svojih antimikrobnih svojstava [54-56].

Mehanizmi antimikrobnog delovanja polifenola još uvek nisu u potpunosti otkriveni. Zbog strukturne raznovrsnosti klasa polifenola, nemoguće je predvideti strukturne karakteristike svake klase odgovorne za antimikrobnu aktivnost i interakcije između bakterija i polifenola [57].

Kovan [58] je smatrao da antimikrobna aktivnost polifenola potiče od -OH grupa vezanih za aromatični prsten i prsten supstituisan kiseonikom. Studije o aglikonima i glikozilovanim flavonoidima su pokazale slabu antimikrobnu aktivnost glikozilovanih flavonoida [59,60]. Stoga, antibakterijska aktivnost flavonoida u velikoj meri zavisi od same strukture, broja i položaja -OH grupa, prisustva glikozidnih veza i alkilacija -OH grupe.

Minami i sar. [45] opisuju aktivnost sa Hochuekkitoom, formulom bogatom polifenolima koja se sastoji od 10 biljnih lekova u tradicionalnoj Kampo medicini, za lečenje nazalne kolonizacije *Staphylococcus aureus* otporne na meticilin u mišjem modelu, sugerišući ga na taj način kao ozbiljnog kandidata za uspešnu terapiju kod ljudi.

Mehanizam kojim polifenoli inhibiraju rast bakterija ili izazivaju njihovu smrt još uvek nije tačno definisan. To mogu biti vodonične veze, hidrofobne interakcije, te stvaranje kovalentnih veza između polifenola i bakterijskih elemenata kao što su mikrobne membrane, adhezini, enzimi i proteini transporteri prisutni u ćelijskoj membrane [58,61].

Antibakterijska aktivnost polifenola potencijalno može biti povezana sa njihovim kapacitetom da heliraju gvožđe, neophodno za opstanak skoro svih bakterija [62].

1.7. *Polifenolna jedinjenja kao supresori razvoja bakterijskog biofilma*

Biofilm predstavlja sesilni oblik postojanja bakterija na čvrstim površinama ili dodirnim tačkama vazduh-tečnost, u kome se bakterije umnožavaju prekrivene samoproizvedenim matriksom biofilma, sastavljenim od bakterijskih polisaharida, proteina i ekstracelularno oslobođenih nukleinskih kiselina [63]. Zaštitni efekat bakterijskog biofilma je multifaktorski, uključujući smanjeno prodiranje antimikrobnih agenasa u dublje slojeve biofilma, hvatanje pozitivno naelektrisanih molekula ekstracelularnim polimernim matriksom biofilma ili sposobnost matrica biofilma da koncentrišu bakterijske enzime koji inaktiviraju antibiotike [64]. Gradijent hranljivih materija, metabolita, kiseonika, pH, redoks potencijala ili antibiotika koji prodiru u biofilm stvaraju ekološki stres u bakterijama, što rezultira ekspresijom inducibilnih mehanizama rezistencije, povećanom stopom izmena i promenama bakterijskog adaptivnog sistema. Ove promene dovode do metaboličke supresije kod bakterija, što uzrokuje povećanu sposobnost preživljavanja usled izloženosti antibioticima i sve veću stopu formiranja perzistentnih ćelija. Perzistirajuće bakterije preživljavaju antimikrobnu terapiju i mogu ponovo dovesti do infekcije nakon prekida antimikrobne terapije, što dovodi do relapsa bolesti [65]. Mehanizmi prijanjanja bakterija, akumulacije biofilma i bakterijske disperzije iz zrelog biofilma, koordinirani hemijskim signalima međubakterijske komunikacije koji senzibiliziraju kvorum odražavajući gustinu ćelija bakterijske populacije, igraju vitalno važnu ulogu u procesu razvoja biofilma [66].

Stoga, zajedno sa koracima koji su preduzeti da bi se smanjila opasnost od krize rezistencije na antibiotike i traženje novih antimikrobnih agenasa [67], istraživanje agenasa sposobnih da modulišu neke važne faktore virulencije bakterija, kao što su adhezivnost, formiranje biofilma i fenomen bakterijske perzistencije, ima izuzetan značaj u razvoju novih terapeutika za medicinsku praksu.

U slučaju fenolnih jedinjenja opisani su višestruki mehanizmi antibakterijske aktivnosti: oni stupaju u interakciju sa bakterijskim proteinima i strukturama ćelijskog zida, mogu izazvati oštećenje citoplazmatskih membrana, smanjiti fluidnost membrane, inhibirati sintezu nukleinskih kiselina, sintezu ćelijskog zida ili energetski metabolizam [53,70,71]. S druge strane, istraživanje aktivnosti biljnih fenola na supresiju biofilma otkrilo je pored njihove destruktivne aktivnosti na bakterije i aktivnosti koje dovode do supresije biofilma tako što utiču na bakterijske regulatorne mehanizme kao što je senzibilizacija kvoruma ili drugi globalni regulatorni sistemi, bez uticaja na rast bakterija [72].

Biljni flavonoidi funkcionišu kao signalni molekuli, alelopatska jedinjenja, fitoaleksini, agensi za detoksikaciju i antimikrobna odbrambena jedinjenja [73]. U literaturi su opisana tri različita načina antibakterijske aktivnosti flavonoida. Prvi odgovara inhibiciji sinteze nukleinskih kiselina [74]. Drugi način podrazumeva oštećenje membrane citoplazme mehanizmom perforacije [75] i smanjenje fluidnosti membrane [75], a treći, inhibiciju

energetskog metabolizma [76]. Upravo ovi mehanizmi antibakterijskog dejstva doprinose supresiji formiranja bakterijskog biofilma.

1.8. Polifenoli kao supersori adhezije i invazije bakterija

Većina bakterijskih patogena inficira svog domaćina na površini sluzokože. Proces infekcije zahteva ekspresiju specifičnih molekula koji omogućavaju vezivanje, kolonizaciju ili čak invaziju bakterija. Bakterijske vrste kao što su *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila* i *Bordetella pertussis* prodiru u domaćina respiratornim putem i inficiraju bronhio-alveolarne površine. Nakon gutanja, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio cholerae* mnoge druge enterične vrste uzrokuju dijareju svojom sposobnošću da kolonizuju, dok neke od njih vrše invaziju na crevnu barijeru.

Kada bakterijski patogeni stignu do površine sluzokože, u zavisnosti od njihovog prirodnog načina kolonizacije, invazivnih kapaciteta, prirode toksina koje proizvode, njihove sposobnosti da se odupru odbrani domaćina ili da se umnožavaju unutar makrofaga, postoje različiti načini kojim vrše adheziju i invaziju. Određene bakterijske vrste se javljaju lokalno i izazivaju infekciju koja ostaje vanćelijska, lučenjem enzima i/ili toksina sa lokalnim ili sistemskim efektima [77]. Druge bakterijske vrste, da bi izrazile svoj puni patogeni potencijal, moraju da penetriraju epitel. Ove bakterije mogu da napadnu epitelne ćelije, umnože se unutra, ubiju ih i izazovu inflamatorni odgovor koji stoji u osnovi velikog broja bolesti. Bakterije takođe mogu da prođu epitelnu barijeru pomoću još uvek nedefinisanih mehanizama, da bi unutar njih uspostavili rezidentne mukozne makrofage, što može predstavljati polaznu tačku za sistemsku diseminaciju.

Adhezija odgovara specifičnoj interakciji između liganda eksprimiranog na površini bakterije (često se naziva adhezin) i receptora na površini same epitelne ćelije [78]. Adherencija je karakteristika Gram-negativnih bakterija koje su često u stanju da na svojoj površini nagomilaju supramolekularne strukture poznate kao fimbrije ili pile. Ove strukture služe kao podrška za predstavljanje adhezina njegovom receptoru. Adhezini su obično lektini, tj. proteini sposobni da prepoznaju ostatke šećera koje nose glikoproteini ili glikolipidi. Kao posledica toga, često je teško identifikovati specifičan receptor za Gram- negativne bakterijske adhezine jer specifičnost receptora leži u ostacima manozina, galaktozina ili sialina koji se mogu povezati sa mnogo različitih vrsta lipida ili proteina. Ovaj proces adhezije, uprkos posredovanju visokoefikasne kolonizacije, ne posreduje u internalizaciji patogena u ćeliju. Međutim, može značajno uticati na inflamatorni odgovor [79]. Ovo je važna tačka koju treba uzeti u obzir, jer adherencija *per se* ne mora biti samo proces kolonizacije, već može predstavljati i vrlo ranu fazu signalizacije koja će olakšati daljirazvoj reakcije tkiva, posebno inflamatornog odgovora, kao najčešće glavne komponente infektivnih bolesti.

Kod nekih bakterijskih vrsta, invazija može pratiti fazu adhezije. Epitelna barijera, posebno creva, efikasno je zaštićena od invazije bakterija mehanizmima kao što su peristaltika, lučenje sluzi, proizvodnja mnogih antibakterijskih supstanci kao što su

laktoferin i sekretorni imunoglobulin IgA, postojanje ruba četkice, visoko diferencirana struktura apikalnog pola enterocita i čvrstih međućelijskih spojeva koji postižu efikasno zatvaranje paracelularnog puta. U slučaju narušavanja ove strukture, brojni rezidentni makrofagi koji oblažu bazalni pol epitelnog sloja mogu izvršiti fagocitozu i uništiti translocirajuće bakterije [77].

Antimikrobna aktivnost različitih agenasa je takođe povezana sa inhibicijom prijanjanja mikroba na biotske i abiotske površine. Pokazalo se da polifenoli koji pokazuju antibakterijsku aktivnost igraju ključnu ulogu u inhibiciji same adhezije [80,81]. Nedavno objavljeni rezultati sugerišu da oligosaharidi takođe pokazuju anti-adhezionu aktivnost [82,83].

U skorašnjim studijama, brojna polifenolna jedinjenja pokazala su anti-adhezionu aktivnost prema različitim vrstama bakterijskih patogena [84–86], bilo razaranjem ćelijske membrane bakterija, degradacijom proteina na njihovoj površini ili smanjenjem njihove pokretljivosti. Kada je adhezija bakterija onesposobljena, bakterije ne mogu penetrirati u dublje slojeve tkiva i dovesti do infekcije kod domaćina.

Ukoliko na površini ćelije ne dođe do adhezije mikroba, njihova invazija je posledično onesposobljena, s obzirom da su ova dva procesa međusobno zavisna.

1.9. Citotoksičnost polifenolnih jedinjenja

Ispitivanje toksičnosti novih jedinjenja je od suštinskog značaja kada je u pitanju proces razvoja leka. Postoje brojne konvencionalne metode ispitivanja citotoksičnosti koje omogućavaju ispitivanje *in vitro* efekata novih kandidata za lek na žive ćelije. Osnovni testovi citotoksičnosti obuhvataju one koji mere metaboličku aktivnost ćelija, integritet membrane plazme, promene u broju i morfologiji ćelija, rast/proliferaciju ćelije ili mehanizme ćelijske smrti [87]. Međutim, jedno od glavnih ograničenja ove vrste testova je njihova nemogućnost da izmere širok spektar potencijalnih ranih ili kasnih patoloških promena uključenih u toksične promene izazvane lekovima. Većina konvencionalnih testova procenjuje samo jednu krajnju tačku, dok bi višestruki mehanizmi toksičnosti morali biti verifikovani višestrukim testovima koji uključuju upotrebu morfoloških, biohemijskih ili funkcionalnih parametara. Štaviše, merenja bi trebalo da se izvode direktno na nivou pojedinačne ćelije kako bi se smanjili artefakti i kako bi se osiguralo da oni istinski odražavaju efekte povezane sa ćelijama [88].

Važan iskorak u ovoj oblasti postignut je 1997. godine, kada je tehnologija skrininga visokog sadržaja (engl. *high-content screening* - HCS), poznata i kao analiza visokog sadržaja (engl. *high-content analysis*, HCA), uvedena na tržište kao novo, efikasno sredstvo za procenu toksičnosti [89]. Skrining visokog sadržaja definiše se kao kombinacija moderne ćelijske biologije, automatizovane mikroskopije visoke rezolucije i protočne citometrije integrisane za simultanu detekciju više parametara, kao što su nuklearna površina/intenzitet, nivo intracelularnog kalcijuma, potencijal mitohondrijalne membrane, permeabilnost membrane plazme i broj ćelija. Proces omogućava karakterizaciju novih

terapijskih jedinjenja olova i identifikaciju mehanizama toksičnosti lekova, uključujući mitohondrijalnu disfunkciju, oksidativni stres, dishomeostazu kalcijuma, apoptozu, fosfolipidozu i steatozu [90,91]. Pored toga, HCS može poslužiti kao važan alat za predviđanje bezbednosti jedinjenja [88,92].

Kao metabolički kompetentne ćelije, primarni ljudski hepatociti i hepatomska HepG2 ćelijska linija pružaju *in vitro* modele najbliže ljudskoj jetri, a HaCaT (spontano imortalizovane ćelije humanih keratinocita) ćelijske linije predstavljaju *in vitro* modele najbližije stratum corneumu, površinskom sloju ljudske kože, i stoga su najprikladniji kandidati za upotrebu u testovima citotoksičnosti.

Citotoksično dejstvo polifenola može biti poželjnokada takav efekat ispoljavaju prema ćelijama raka, dok je u slučajevima kada su oni citotoksični prema zdravim ćelijama, ovo dejstvo neophodno suzbiti.

Citotoksičnost polifenola na zdrave ćelije kože nije bio predmet velikog broja istraživanja, s obzirom na to da se fokus uglavnom stavlja na ćelije tumora.

1.10. Polifenolna jedinjenja kao aktivne komponente za pospešivanje zarastanja rana

Rana se definiše kao povreda živog tkiva ili oštećenje integriteta samog epitela površinskog sloja kože, što može dovesti do promena u anatomiji i fiziologiji kože [93]. Zarastanje rana je složen i dinamički proces koji uključuje nekoliko tipova ćelija i četiri konsolidovane i konvergentne faze, među kojima su hemostaza, inflamacija, proliferacija i remodelovanje, koje se moraju dogoditi po hronološkom redosledu, tokom određenog vremenskog perioda [94]. Procesi zarastanja rana zahtevaju integraciju međusobno uslovljenih različitih fizioloških procesa kao što su angiogeneza, fagocitoza, mitogeneza, hemotaksa, sinteza kolagena i drugih matriksnih sastojaka, kao i interakciju rastvorljivih medijatora, molekula ekstracelularnog matriksa i različitih imunoloških procesa koji dovode do oporavka imune ćelije [95]. Ove imune ćelije proizvode veću količinu ROS koje su neophodne za zaštitu tela od mikrobne infekcije, ali kada su prisutne u višku dovode do oštećenja ćelija [96].

Boljni lekovi, kao i biljni ekstrakti imali su širok dijapazon lokalne primene za zarastanje rana [97]. Nekoliko istraživačkih grupa širom sveta pokazalo je da fitohemikalije mogu igrati ključnu ulogu u prevenciji i/ili lečenju raka i inflamatornih stanja [98], a takođe mogu da obezbede značajan efekat u zarastanju rana i regeneraciji kože [99]. Hronične rane se izuzetno teško leče, a utiču na milione pacijenata izazivajući i mentalnu traumu, drastično smanjujući kvalitet života [100]. Svaka rana pokreće signalne puteve za regeneraciju tkiva, bez obzira na vrstu i stepen oštećenja [101]. Proces zarastanja rana uključuje upalu (reaktivnu) ili eksudativnu fazu za odvajanje oštećenih tkiva i čišćenje rane, proliferaciju (regenerativnu) za razvoj granulacionog tkiva i sazrevanje (remodelovanje) za formiranje ožiljaka, kao i epitelizaciju [102]. Obično je zarastanje rana brz i nekomplikovan proces, dok neke rane kod stanja kao što su dijabetes, oksidativni stres, infekcija, imunosupresija ili gojaznost, teško zarastaju [103,104]. Angiogeneza, takođe poznata kao neovaskularizacija,

predstavlja razvoj novih kapilara iz postojećih vaskularnih mreža i sastavni deo u sistemu oporavka [105]. Angiogeneza je ključni korak u zarastanju rana, a za neke biljne ekstrakte je pokazano da imaju efekat na modulaciju angiogeneze i pospešivanje zarastanja rana [95]. Do regeneracije (angiogeneze) dolazi usled formiranja vaskularnih uslova koji snabdevaju nutrijentima građivne blokove ćelijskih komponenata u granulacionom tkivu i preklapanja epidermalnih ćelija, usled čega počinje migracija unutar tkiva, kako bi se obnovila epitelna barijerna funkcija kože [105]. Pored toga, angiogeneza pomaže i u započinjanju relaksacije ćelijskih kontakata i narušavanja spoljašnjeg pericitnog sloja [105]. Pokazano je da fitohemikalije pospešuju zarastanje rana na različitim životinjskim modelima [106].

Veliki broj bioaktivnih jedinjenja različitih struktura stoji iza terapijske aktivnosti lekovitih biljaka: polifenoli (flavonoidi, fenolne kiseline, lignani, tanini, stilbeni i kumarini); terpeni, jedinjenja koja sadrže sumpor (sulfidi i tiofeni), karotenoidi, saponini, furili, alkaloidi, različiti šećeri, masna ulja, smole, fitosteroli, proteini, peptidi, itd. [107].

Flavonoidi mogu da obezbede brzo zarastanje rana, zbog svojih antimikrobnih, antioksidativnih i adstringentnih svojstava [108]. Kvercetin, koji se nalazi u raznim biljnim vrstama, stimuliše inkorporaciju kolagenskih matrica u slučaju zarastanja rana na koži [109], dok mešavina flavonoida (kvercetin, izorhamnetin i kaempferol) pospešuje taloženje kolagena i zasićenje kolagenom i smanjuje nivo COX-2 enzima (ciklooksigenaza 2) odgovornog za inflamatorni proces [110], dok je galnoj kiselini pripisana sposobnost povećanja sadržaja askorbinske kiseline (vitamina C), važne za metabolizam kolagena [111]. Među polifenolima, prirodni tanini u biljnim ekstraktima su se pokazali kao efikasni u antibakterijskim, antioksidativnim i adstringentnim aktivnostima, što takođe može podstaći zarastanje rana [112,113]. Dejstvo polifenolnih jedinjenja na zarastanje rana još uvek nije detaljno ispitano i predstavlja važnu oblast za dalja medicinska istraživanja [114].

1.11. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja

Farmaceutska, kozmetička i prehrambena industrija koriste ekstrakciju, kao jednu od najčešće primenjenih tehnoloških operacija za izolovanje jedinjenja od interesa. Izdvajanje jedinjenja kao što su farmakološki aktivne supstance, etarska ulja ili bilo koja druga materija sa upotrebom vrednošću, čine osnovnu svrhu ekstrakcije. Mnogi od prirodnih proizvoda se teško mogu dobiti sintetskim putem. Danas, u bilo kojoj grani hemijske industrije, gotovo da ne postoji proces tokom kog ekstrakcija nije zastupljena [115].

Ekstrakcija predstavlja izdvajanje i koncentrovanje aktivnih komponenti biljnih i životinjskih tkiva upotrebom odgovarajućih rastvarača [116]. Produkti dobijeni na ovaj način su čvrsti ili polučvrsti, ponekad relativno onečišćeni proizvodi koji zahtevaju dodatni tretman poput prečišćavanja, uparavanja ili taloženja.

Biljni ekstrakti se dobijaju dovođenjem u kontakt suvog, usitnjenog dela biljke sa odgovarajućim rastvaračem. Na ovaj način se dobija međuproizvod (miscella, eluat). Ako se u procesu ekstrakcije koriste tečni agensi (etanol ili smeša etanola i vode, masna ulja i dr.), nakon filtracije se dobija tečni ekstrakt. Ako međuproizvod bude podvrgnut uparavanju u

vakuu uparivaču, dobija se polučvrsti ekstrakt, koji daljim procesom sušenja prelazi u čvrsti ekstrakt [116].

Cilj standardnih procedura ekstrakcije jeste dobijanje terapeutskih produkata, pri čemu bi se ekstrahovala bioaktivna jedinjenja prisutna u biljnom materijalu usled dejstva odgovarajućeg rastvarača. Ekstrakti dobijeni na ovaj način su spremni za upotrebu kao medicinski preparati, u formi tinkture i tečnog ekstrakta, koji se dalje takođe mogu prerađivati i integrisati u gotov lek, npr. kapsulu ili tabletu [116].

Ekstrakcija biljnih polifenola se može vršiti tradicionalnim ili savremenim tehnikama. U tradicionalne spadaju maceracija, ekstrakcija potpomognuta toplotom, Soxhlet ekstrakcija; dok savremenima pripadaju automatizovana Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija fluidima pod pritiskom, superkritična ekstrakcija i slično [117].

1.11.1. Maceracija kao klasična metoda ekstrakcije

Maceracija, kao vrsta klasične ekstrakcije predstavlja difuzionu operaciju na sobnoj temperaturi tokom koje jedna ili više komponenata, na osnovu razlike u njihovoj rastvorljivosti, iz čvrstog materijala prelazi u tečni rastvarač. Pri kontaktu čvrstog materijala sa tečnim rastvaračem dolazi do prodora molekula rastvarača u pore čvrstog materijala [118].

Ova ekstrakcija, na kontaktu čvrsto-tečno, se odigrava kroz dve faze [116]:

- tokom prve faze dolazi do rastvaranja ekstraktivnih supstanci sa površine čvrstog materijala (tzv. ispiranje ili brza ekstrakcija)
- tokom druge faze dolazi do difuzije ekstraktivnih supstanci iz unutrašnjosti prema površini čvrstih čestica, kao i njihov prenos u masu rastvora (tzv. spora ekstrakcija)

Ovaj tip ekstrakcije se najčešće koristi za dobijanje preparata prirodnih jedinjenja. Izvodi se šaržno, potapanjem biljnog materijala u rastvarač, na sobnoj temperaturi. Svež rastvarač se može dodati već iscrpljenom biljnom materijalu, kako bi na taj način bila izvršena remaceracija (dvostruka maceracija) [116].

Iako klasična metoda maceracije omogućava dobar prinos ukupnog ekstrakta, ova metoda ima i nedostatke kao što su: velika potrošnja rastvarača, dugo trajanje procesa, moguća degradacija bioaktivnih materija usled predugog izlaganja ekstrakcionom medijumu, potreba za dodatnim koracima u obradi ekstrakta poput filtracije, prečišćavanjaj koncentrovanja [116].

1.11.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvučnim talasima

Ultrazvučna ekstrakcija podrazumeva korišćenje ultrazvuka sa frekvencijama 20-2000 kHz. Ova tehnika omogućava veću produktivnost u kraćem vremenskom periodu, korišćenje niže temperature i manjih količina rastvarača, kao i jednostavno rukovanje [116]. Ultrazvučna

energija se prostire u obliku talasa kroz smešu uzorka i rastvarača. Sila koja nastaje pri dodiru talasa sa čvrstom materijom, može biti normalna (formira se kompresivni talas) ili paralelna sa površinom (formira se ekspanzioni talas) [119]. Usled toga, dolazi do kavitacije¹, koja uzrokuje bubrenje ćelija i degradaciju ćelijskih zidova. Ova pojava omogućava veću difuziju kroz oštećen ćelijski zid, odnosno olakšano ispiranje sastojaka i njihovo oslobađanje u ekstrakcionim medijum [115].

Ultrazvuk niskog intenziteta, sa frekvencijom u opsegu od 2 kHz do 100 kHz, neće izazvati fizičke ili hemijske promene, stoga se može koristiti prilikom obrade hrane, određivanja sastava proizvoda, viskoznosti, itd. Međutim, ultrazvuk visokog intenziteta, sa frekvencijom u opsegu 20-100 kHz može izazvati fizičke i hemijske promene u uzorku na koji je primenjen, te se može koristiti za ekstrakciju željenih komponenta [115].

Kako bi se proces ultrazvučne ekstrakcije optimizovao i postigao maksimalan prinos, potrebno je odrediti optimalnu temperaturu, rastvarač, frekvenciju i snagu ultrazvuka, kao i vreme tretiranja. Potencijalna primena ultrazvuka u prehrambenoj industriji, za analizu i modifikaciju proizvoda, pokrenula je intenzivnija istraživanja u toj oblasti [115].

Nedostatak ove metode je u tome što može doći do degradacije nekih aktivnih supstanci usled delovanja ultrazvuka. Takođe, u ekstraktu mogu biti pristurni tragovi teških metala koji potiču od glave ultrazvučnog generatora, koja se uranja u smešu uzorka i rastvarača.

1.11.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima

Mikrotalasi su oblik elektromagnetnog zračenja talasne dužine 0,001-0,3 m, sa frekvencijom od 300 MHz do 300 GHz [120]. Mikrotalasna ekstrakcija je jedna od nekonvekcionalnih ekstrakcionih tehnika, koju karakteriše upotreba male količine rastvarača, kao i kratko vreme trajanja procesa. Pored toga, ova tehnika omogućava veći ekstrakcioni prinos i bolji kvalitet ekstrakta. U poređenju sa ultrazvučnom ekstrakcijom, potrebno je kraće vreme za izvođenje ekstrakcije potpomognute mikrotalasima [120].

Postoje dva mehanizma mikrotalasnog zagrevanja: rotacija dipola i jonska polarizacija [115].

Mehanizam dipolne rotacije se objašnjava činjenicom da su mnogi molekuli električni dipoli. Kao takvi, kada su postavljeni u elektromagnetno polje oni teže da se orijentišu prema polarnosti polja. Konstantna rotacija molekula izaziva zagrevanje [115].

Jonska jedinjenja se kreću ubrzano kada se nađu u naizmeničnom električnom polju, pa se tako javlja jonska polarizacija. Kinetička energija nastala tokom takvog ubrzanog kretanja se pretvara u termalnu energiju [119].

Neke supstance iz biljnog materijala (naročito polarni molekuli) i voda, pri mikrotalasnoj ekstrakciji, apsorbiraju mikrotalasnu energiju, što dalje dovodi do porasta temperature unutar

¹ Fenomen koji nastaje usled konstantnog stvaranja kompresivnih i ekspanzionih sila, tokom kog mehurići rastu (ekspanziona faza), a zatim se uruše (kompresivna faza) [115]

biljne ćelije. Nakon toga, dolazi do formiranja para unutar ćelija (posledica drastične promene temperature), što izaziva pucanje ćelijskih zidova i ćelijskih membrana. Degradacijom ćelija olakšan je prolaz rastvarača u biljni matriks, a sekundarni metaboliti biljaka nalaze se u ćelijskim zidovima ili citoplazmi, te im je olakšan izlazak u rastvarač, što povećava efikasnost ekstrakcije [119].

Zastupljene su dve vrste mikrotalasne ekstrakcije [119]:

- ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontrolisanom pritisku i temperaturi
- ekstrakcija u mikrotalasnim pećnicama pri atmosferskom pritisku

Prednost ove ekstrakcione tehnike je brzo zagrevanje i mali obim opreme. Pored toga, mala potrošnja rastvarača i kraće ekstrakciono vreme ovu tehniku čine ekološki prihvatljivom [120].

Negativan ishod ove tehnike predstavlja potencijalnu promenu hemijske strukture željenih biološki aktivnih komponenti ili njihovu degradaciju. Takođe, ne bi bila pogodna za ekstrahovanje termolabilnih jedinjenja [120].

1.12. Inkapsulacija polifenolnih jedinjenja

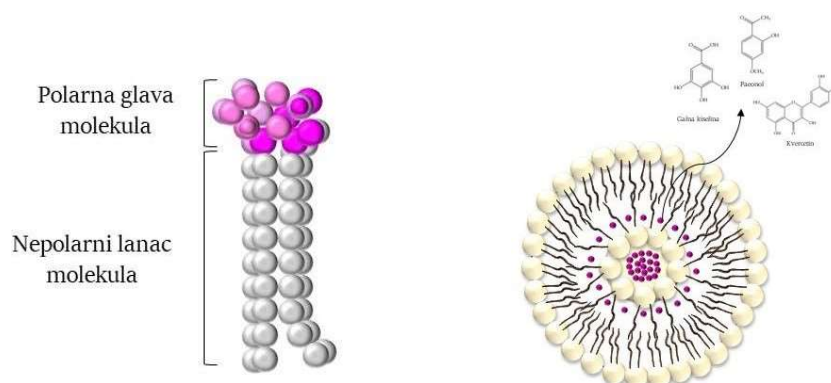
Biološki aktivna jedinjenja iz biljaka se podrgavaju različitim metodama inkapsulacije, koje bi se mogle podeliti u tri veće grupe: fizičke (ekstruzija, sušenje zamrzavanjem, impregnacija, pan-prevlačenje, elektrospinoвање, itd.), hemijske (inkluziono kompleksiranje, emulziona polimerizacija, međufazna polimerizacija, itd.) i fizičko-hemijske metode (koacervacija, sol-gel metod, reverzno fazno uparavanje i slične metode) [121]. Manje istražen alternativni metod za inkapsulaciju polifenola je kombinacija biopolimernih filmova i lipozoma. Aktivni sastojci u pomenutoj kombinaciji mogu biti zaštićeni od faktora uključenih u proces prerade i skladištenja, kao i uticaja faktora životne sredine [122], čuvajući njihova bioaktivna svojstva i omogućavajući kontrolisano oslobađanje i produženi rok trajanja.

Uprkos činjenici da su biljni ekstrakti korisni za lečenje raznih poremećaja, istraživanja su pokazala da je njihova terapijska vrednost ograničena zbog njihovog kompleksnog sastava i toksičnosti kada se daju organizmima sa složenijim metabolizmom. Štaviše, organski rastvarači (npr. metanol, etanol, heksan, dihlorometan, etil acetat, itd.) se obično koriste za dobijanje ovih ekstrakata. Kao rezultat toga, konačni nosač u kome se nalaze bioaktivna jedinjenja predstavlja prepreku za njihovu direktnu primenu u organizmima [123], te je potrebna inkapsulacija pomenutih jedinjenja u biokompatibilne nosače. Dodatno, zbog ograničene biorasplošivosti i značajne osetljivosti/nestabilnosti flavonoida, fenolnih kiselina i antocijanina prisutnih u biljnim ekstraktima [124], potrebno je pripremiti nosače za ekstrakt, kako bi se zaštitile biološki aktivne komponente, omogućila olakšana primena (*per os* i dermalna), kao i bolja bioiskoristljivost. Kako bi se postigao jedan ili više željenih efekata, biljni ekstrakti mogu biti sačuvani u formi koja promovise njihove karakteristike pogodne za ljudsko zdravlje, tako što će biti inkapsulirani u matriks ili membranu u formi

čestica. Inkapsulacija se koristi za poboljšanje stabilnosti ekstrahovanih jedinjenja tokom obrade, skladištenja ili transporta, kao i krajnje primene od strane korisnika. Štaviše, primarni cilj je prevođenje tečnih jedinjenja u njihove čvrste oblike kako bi se omogućilo olakšano upravljanje aktivnim komponentama. Upotreba farmaceutskih formulacija sa inkapsuliranim jedinjenjima kao sistemima za isporuku može biti posebno korisna u situacijama kada direktna konzumacija aktivnog sastojka dovodi do neželjenih dejstava na ljudskoj koži ili na sistemima unutrašnjih organa [125]. Inkapsulacija se takođe može koristiti za poboljšanje kvaliteta finalnog proizvoda, odvajanje nekompatibilnih hemikalija i oslobađanje bioaktivnih sastojaka na kontrolisan način [126].

Lipozomi, kao zatvorene vezikule, nastaju kada se lipidne komponente, sastavljene od fosfolipida, distribuiraju kroz vodeni medijum. Unutrašnja vodena faza je razdvojena od spoljašnje dvoslojnom membranom (jednom ili više) čija je struktura slična ćelijskoj membrani [127]. Zbog svoje jedinstvene strukture, lipozomi imaju niz značajnih prednosti kada se koriste u sistemima za isporuku lekova. Na početku, sposobnost prisutnih vezikula da odvoje unutrašnju od spoljašnje faze doprinosi većoj stabilnosti inkapsuliranog leka. Drugo, kada se slabo rastvorljivi lekovi integrišu u lipozome, njihova bioraspoloživost se poboljšava [128,129]. Štaviše, nakon inkapsulacije, može se dobiti profil kontrolisanog ili produženog oslobađanja leka. Lipozomi imaju izuzetnu biorazgradivost i snažan afinitet prema ćelijama. Pored toga, ciljni efekat lipozomalnih preparata jeste sposobnost da promene *in vivo* distribuciju inkapsuliranog leka, dok inkapsulacija omogućava bolje efekte na ciljnom mestu dejstva leka jer će tu biti postignuta efektivna koncentracija leka, smanjujući neželjene efekte na drugim mestima [130]. Površina lipozoma može biti izmenjena na više načina, što bi uticalo na karakteristike krajnjeg proizvoda i njihovu biološku aktivnost. Preciznije, inkapsulacija bioaktivnih jedinjenja u nanočestice ili lipozome mogla bi da smanji njihovu toksičnost, uz povećanje bioraspoloživosti, a takođe i da poboljša farmakokinetiku, što dovodi do boljeg profila kontrolisanog oslobađanja i poboljšane stabilnosti i rastvorljivosti jedinjenja u organizmu [131]. Ovo je dovelo do velikog broja oblasti u kojima se oni mogu potencijalno primeniti, kao što je lečenje raka [132-134], kožnih oboljenja [135], post ishemije [136], plućne hipertenzije [137], itd. Razvoj lipozoma namenjenih kliničkoj upotrebi oslanjao se na razvoj metoda koje bi omogućile brzo formiranje homogenih malih lipozoma i efikasno inkapsuliranje lekova ili bioaktivnih jedinjenja u njih [138]. Fosfolipidi su jedinjenja koja su generalno nerastvorna u vodi, ali rastvorna u organskim rastvaračima, sastavljena od polarne glave molekula i nepolarnog repa masnih kiselina, odnosno molekularnog repa (slika 3). Ova dvojna priroda, koju karakteriše prisustvo i polarnog i nepolarnog dela, čini fosfolipidne molekule amfifilnim, omogućavajući im da se u različitim okolinama organizuju na specifične načine. Kada se nađu u vodenom okruženju izvan ćelije, fosfolipidi se spontano organizuju (zbog hidrofobnog efekta), često formirajući dvosloj. Pomenuti fosfolipidni dvosloj ima formu ploče debljine dva molekula fosfolipida, sa molekulima organizovanim tako da su hidrofilne fosfatne glave okrenute prema vodi na obe strane dvosloja, dok su hidrofobni repovi okrenuti ka unutrašnjosti dvosloja. U rastvoru fosfolipidi takođe mogu formirati micelle, a primena

dodatne mehaničke energije, kao što je mešanje ili pritisak, može rezultirati formiranjem sfere zatvorenog lipidnog dvosloja, poznatog kao lipozom [139].



Slika 3 Struktura molekula fosfolipida (levo) i lipozoma (desno)

Prolipozomna metoda nudi veći energetska unos agitacije, što rezultira manjim i homogenijim lipozomima [140]. Korišćenje ove metode može biti najlakši način za dobijanje lipozoma [141]. Glavni nedostatak je u tome što iako pokazuje znatno bolju efikasnost inkapsulacije, nije tako reproducibilna kada je u pitanju izrada manje količine lipozoma. U procesu izrade lipozoma, jedinjenja se mogu kombinovati sa etanolom (u slučaju lipofilnih supstanci) ili biti u vodenom rastvoru (u slučaju hidrofilnih supstanci). Upotreba prolipozomne metode predstavlja mogućnost za industrijsku proizvodnju lipozoma [142].

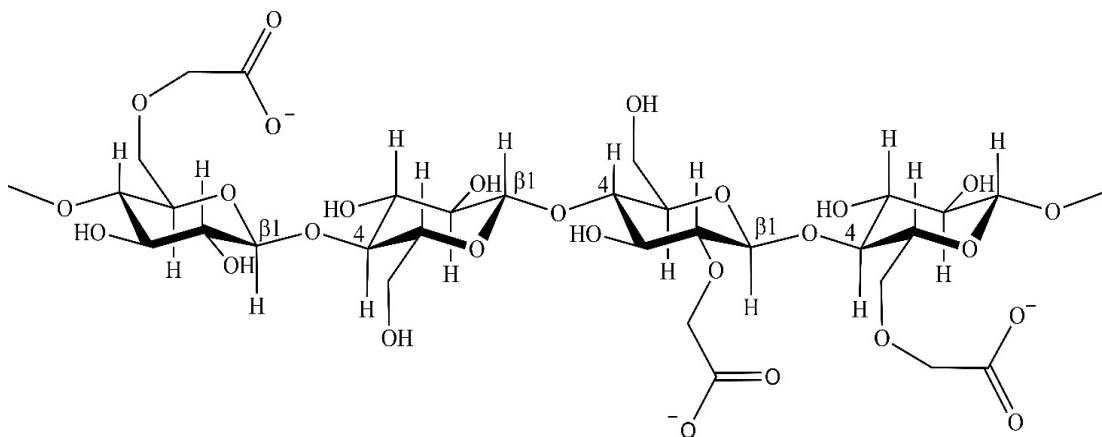
Biopolimerni filmovi predstavljaju aktivne tehnologije koje se koriste za kreiranje flastera za transdermalnu primenu, obezbeđujući dodatnu zaštitu biološki aktivnih komponenti u cilju zadržavanja ili povećanja ukupnog kvaliteta bioaktivnih sastojaka iz biljaka i produžavanja njihovog roka trajanja [143,144]. Pokazalo se da biljni ekstrakti sa visokim sadržajem polifenola poboljšavaju antioksidativnu aktivnost, povećavaju kapacitet zaštite od UV svetlosti, a biopolimerni filmovi oponašaju barijeru za kiseonik, smanjujući mogućnost degradacije ovih biološki aktivnih komponenta [145,146]. Interakcije polifenola sa biopolimernim matricama mogu promeniti strukturalna i funkcionalna svojstva matriksa [142, 144] i smanjiti bioaktivnost polifenola; stoga, potencijalne interakcije i njihov uticaj na biološke aktivnosti polifenola treba temeljno istražiti.

U dobijanju biofilmova, vlažna obrada, poznata i kao izlivanje iz rastvarača, zasniva se na procesu sušenja rastvora koji formira film, uključujući faze solubilizacije, izlivanja i sušenja [147]. Prvo se biopolimer rastvara u odgovarajućem rastvaraču, organskom ili neorganskom, kako bi se pripremio rastvor koji formira film. Međutim, voda, etanol ili njihove kombinacije su jedine medicinski odobrene smeše rastvarača koje su dostupne za biopolimerne filmove. Rastvorena smeša za formiranje filma može se povremeno zagrejati ili izvršiti podešavanje pH vrednosti kako bi se poboljšalo formiranje filma ili unapredila njegova svojstva. Nakon toga, rastvor se suši izlivanjem na ravnu površinu, u cilju formiranja

filmske matrice [148]. Razvoj kontinuirane trodimenzionalne mreže među biopolimerima je ključan za izgradnju kohezivnog filma [149]. Prirodu, vrstu i broj interakcija određuju izabrani polimeri i parametri u formiranju filma, kao što su temperatura i brzina sušenja, sadržaj vlage, tip rastvarača, koncentracija plastifikatora i pH.

Biopolimerni filmovi mogu se pripremiti upotrebom homopolisaharida (skrob, celuloza, inulin), heteropolisaharida (pektini, poliuronidi), kao i proteina (zein, kazein, kolagen) [150].

Karboksimetil-celuloza (slika 4) je beli prah bez ukusa i mirisa, čija se molarna masa kreće između 90,000 i 2,000,000 Da, sa stepenom supstitucije u intervalu od 0,4 do 0,9 [151,152]. Stepem supstitucije utiče na fizička i hemijska svojstva molekula, a prevashodno na rastvorljivost u vodi, koja za natrijum karboksimetil-celulozu iznosi 10 mg/mL. U strukturi glukopiranozne jedinice, atomi ugljenika na pozicijama dva, tri i šest imaju vezane atome kiseonika, na kojima je dodat supstituent. U glukopiranoznom lancu uvedena je karboksimetil grupa (-CH₂-COOH) umesto vodonika. Stepem supstitucije za natrijum karboksimetil celulozu koja se koristi u prehrambenoj industriji varira između 0,7 i 0,8. Uniformnost supstitucije duž celog lanca polimera direktno utiče na svojstva i ponašanje u vodenim sistemima. Svojstva kao što su tečljivost i deformacije koje nastaju pod uticajem spoljašnje sile smicanja zavise od molarne mase polimera i stepena supstitucije. U literaturi se navodi da karboksimetil celuloza s molarom masom od oko 300,000 Da i stepenom supstitucije od 0,6 do 0,9, poznata kao "natrijum karboksimetil celuloza srednje viskoznosti", formira uniformne i homogene rastvore koji pokazuju svojstva tiksotropnih fluida [151,152].



Slika 4 Hemijska struktura natrijum-karboksimetil-celuloze

2. Cilj istraživanja

Polazni cilj istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije je optimizacija ekstrakcije polifenola iz latica stepskog božura koji spontano raste na teritoriji Srbije, variranjem sledećih parametara: nadmorska visina na kojoj raste biljka (tj. lokalitet), vrsta rastvarača (voda i metil alkohol) i metoda ekstrakcije (maceracija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, kao i ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima). Ovako dobijeni ekstrakti latica *P. tenuifolia* su ispitani sa aspekta sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida, njihovog antioksidativnog, antimikrobnog i antibiofilm potencijala na patogenima prisutnim na ljudskoj koži (bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Proteus vulgaris*; i gljive: *Candida albicans*, *Candida kruzei* i *Candida kefyr*), *in vitro* sposobnosti pospešivanja zarastanja rana, utvrđivanja stepena citotoksičnosti ekstrakata, kao i dejstva na sposobnost adhezije i invazije bakterije *S. lugdunensis*. Ekstrakt latica *P. tenuifolia* koji je pokazao najviši sadržaj polifenolnih jedinjenja i najbolji biološki potencijal, podvrgnut je detaljnom određivanju hemijskog sastava, primenom dve metode: hibridne masene spektrometrije (UHPLC-LTQ-Orbitrap MS) i tačne hromatografije pod ultra visokim pritiskom (UHPLC/MS).

Pored ovoga, ekstrakt latica *P. tenuifolia* koji je pokazao najviši sadržaj polifenola i najveći biološki potencijal je podvrgnut procesu inkapsulacije, u cilju zaštite osetljivih biološki aktivnih jedinjenja, povećanja njihove biorasploživosti i omogućavanja kontrolisanog otpuštanja, radi potencijalne dalje primene u farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji. Inkapsulacija ekstrakta latica stepskog božura u liposome je izvršena primenom prolipozomne metode i u celulozni film primenom film *casting* metode. Ovako dobijeni inkapsulati su podvrgnuti ispitivanju antioksidativnog, antimikrobnog i antibiofilm potencijala, praćenju kinetike otpuštanja polifenola i određivanja koeficijenta difuzije i otpora difuziji, kao i određivanju interakcija između fosfolipidnih smeša u lipozomima i karboksimetil-celuloze iz filmova sa ekstraktom latica, primenom FT-IR spektroskopije. Pored ovoga, lipozomi su okarakterisani sa aspekta stepena inkapsulacije, veličine čestica, ζ potencijala, indeksa polidisperzije i reoloških karakteristika. Biopolimernim filmovima su ispitana mehanička svojstva, sadržaj vlage, morfološka svojstva (primenom SEM-a). Pored ovoga, lipozomalne čestice su podvrgnute ispitivanju njihovih bioloških aktivnosti, sa aspekta pospešivanja zarastanja rana, citotoksičnosti, kao i sposobnosti da suprimiraju adheziju i invaziju bakterije *S. lugdunensis* na površini HaCaT ćelija.

3. Eksperimentalni deo

3.1. Materijali i metode istraživanja

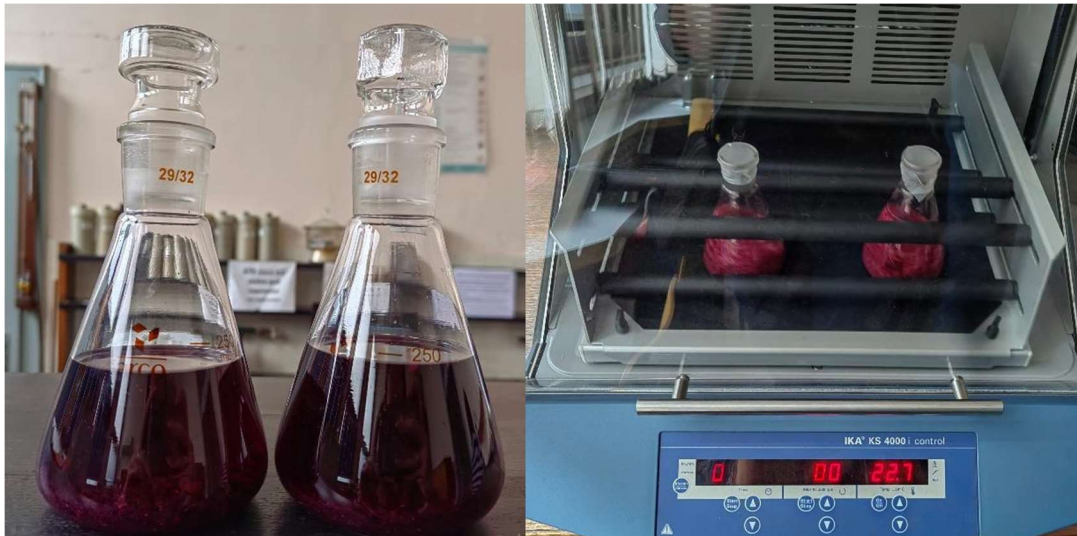
3.1.1. Biljni materijal

Sveže latice stepskog božura (*P. tenuifolia*) sakupljane su na proleće 2022. godine, na dva lokaliteta u Srbiji na kojima ova biljna vrsta spontano raste, u Deliblatskoj peščari, na 167 m nadmorske visine (8. maj, 2022) i na Gulenovcima, na 840 m nadmorske visine (11. maj, 2022), kao i u kolekciji Instituta za proučavanje lekovitog bilja “Dr Josif Pančić” u Pančevu, na nadmorskoj visini 74 m (12. maj, 2022). Sakupljanje latica stepskog božura sa prirodnih staništa omogućeno je dozvolom Ministarstva za zaštitu životne sredine Republike Srbije (br. 353-01-162/2022-04, izdata 24.02. 2022. godine). Latice su sakupljane ručno, sa nasumično izabranih biljaka u fazi punog cveta, pri čemu je sa svakog lokaliteta prikupljena 1/3 latica sa maksimalno 10% raspoloživih cvetova. Sveže latice su sušene na sobnoj temperaturi (10% vlage). Neposredno pred ekstrakciju, osušeni biljni materijal je samleven u laboratorijskom mlinu M-20, IKA Universal mill, IKA®, GmbH&Co (Nemačka).

3.1.2. Metode ekstrakcije biljnog materijala

3.1.2.1. Maceracija

Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata iz latica *P. tenuifolia* primenom maceracije izvedena je uz upotrebu magnetne mešalice IKA C MAG HS-7 (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Nemačka), na sobnoj temperaturi, uz brzinu mešanja od 400 ob/min, korišćenjem dve vrste rastvarača (voda i metil alkohol), dok je period ekstrakcije bio 60 min. U staklene erlenmajere zapremine 250 mL, odmereno je 5 g usitnjenih latica stepskog božura i dodato 100 mL odgovarajućeg ekstrakcionog agensa. Erlenmajeri su zatvoreni odgovarajućim čepovima, zatim obmotani parafilmom u cilju sprečavanja isparavanja rastvarača (slika 5). Nakon toga, smeša je razdvojena u tri tube za centrifugiranje, kako bi se supernatant odvojio od taloga. Centrifugiranje je izvršeno na 3000 ob/min (Hermle Benchamark Z 206 A, Hermle Labortechnik, Vehingen, Nemačka), u trajanju od 10 min. Zatim je pipetom odvojen rastvor u nove tri tube za centrifugiranje. Pod istim uslovima, centrifugiranje je ponovo izvršeno, kako bi se izdvojio preostali talog. Čist ekstrakt je čuvan u plastičnim falkonima u frižideru do daljih analiza.



Slika 5 Maceracija latica *Paeonia tenuifolia* L.

3.1.2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvučnim talasima

Ultrazvučna ekstrakcija (UAE) je izvršena uz upotrebu ultrazvučne sonde, procesora jačine 750 W, titanijumskog vrha, prečnika 13 mm, pri amplitudi od 70% i konverterom od 20 kHz (Sonics Vibra Cell, Sonics and Materials, SAD). Korišćeni su isti uslovi ekstrakcije kao u slučaju maceracije, odnos droga:rastvarač bio je 1:20 (5 g droge ekstrahovano je sa 100 mL odgovarajućeg rastvarača), u trajanju od 10 min. Pored ovog, čaša u kojoj se nalazio uzorak, uronjena je u ledeno kupatilo, kako bi se sprečilo pregrevanje posude, uzorka i isparavanje rastvarača. Ekstrakt je odvojen od taloga na isti način kao u slučaju maceracije, uz čuvanje u frižideru do dalje upotrebe.

3.1.2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima

Mikrotalasna ekstrakcija (MAE) je urađena uz upotrebu mikrotalasnog reaktora Monowave 300 (Anton Paar, Austrija). Ekstrahovanje aktivnih komponenata izvršeno je u staklenim vialama, zapremine 30 mL, pri temperature od 60 °C, brzinom mešanja 600 ob/min, uz upotrebu odnosa droga:rastvarač od 1:20, dok je variran korišćen rastvarač (voda ili metil alkohol), u toku 10 min. U viale je odmereno 0,5 g usitnjenih latica stepskog božura i 10 mL odgovarajućeg rastvarača. Supernatant je odvojen od taloga kao i u prethodno navedena dva tipa ekstrakcije, i čuvan u frižideru do dalje upotrebe.

3.1.3. Spektrofotometrijske metode karakterizacije

3.1.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola (engl. *total polyphenol content*, TPC) prisutnih u vodenim i metanolnim ekstraktima latica *P. tenuifolia*, kao i u supernatantu odvojednom od lipozoma u koje je inkorporiran metanolni ekstrakt određen je primenom spektrofotometrijske Folin-Čiklteu metode, zasnovane na reakciji između prisutnih polifenola i Folin-Čiklteu reagensa, u blago alkalnim uslovima (slika 6). Pomenuta reakcija zasniva se na oksidaciji polifenola, dok se fosfovolframova i fosfomolibdenska kiselina iz Folin-Čiklteu reagensa redukuju, usled

čega dolazi do formiranja stabilnih oksida plave boje [153]. Uzorak koji je razblažen na propisan način (20 μ L) potrebno je dodati u 1,5 mL destilovane vode, a zatim pomešati sa 100 μ L prethodno razblaženog Folin-Čiklteu reagensa (reagens : voda=1:2). Smeši je nakon toga dodato 300 μ L 20% vodenog rastvora Na_2CO_3 , nakon čega je zapremina dopunjena destilovanom vodom do 2 mL. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, u mraku, koja je trajala dva sata apsorbance su izmerene na 765 nm, na spektrofotometru UV Spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu, Japan), pri čemu je slepa proba sadržala sve navedene reagense, dodate u istom odnosu i istim redosledom, samo je umesto ekstrakta/supernatanta korišćen čist rastvarač/voda. Svi uzorci su pripremljeni u tri paralelne probe. Kalibraciona kriva je izrađena uz upotrebu rastvora galne kiseline (100-700 mg/L). Rezultati sadržaja ukupnih polifenola izraženi su kao miligram ekvivalenta galne kiseline (engl. *gallic acid equivalent*, GAE) po litru ekstrakta/supernatanta [mg GAE/L], s obzirom da su svi uzorci u tečnom stanju.



Slika 6 Određivanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima latica *Paeonia tenuifolia* L.

3.1.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida prisutnih u vodenim i metanolnim ekstraktima latica *P. tenuifolia*, izvršen je primenom kolorimetrijske metode (slika 7) [154]. Uzorak koji je propisno razblažen (250 μ L) pomešan je sa 75 μ L 5% vodenog rastvora NaNO_2 i 1250 μ L destilovane vode. Nakon petominutne inkubacije, dodato je 150 μ L 10% rastvora AlCl_3 , a potom u 6. minutu 500 μ L 1M rastvora NaOH . Smeša je zatim dopunjena destilovanom vodom, do ukupne zapremine od 3 mL. Merenja apsorbanci rastvora izvršena su na 510 nm, u odnosu na slepu probu (svi reagensi sa čistim rastvaračem umesto ekstrakta). Kalibraciona kriva je izrađena u primenom katehin monohidrata (50-300 mg/L). Rezultati su izraženi kao milligram ekvivalenta katehin monohidrata (engl. *catechin equivalent*, CE) po litru ekstrakta [mg CE/L].



Slika 7 Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima latica *Paeonia tenuifolia* L.

3.1.4. Hemijska karakterizacija ekstrakata

3.1.4.1. Hibridna masena spektrometrija - UHPLC-LTQ-Orbitrap MS

Za LC/MS analizu odabranog ekstrakta korišćen je LTK OrbiTrap KSL maseni spektrometar povezan sa Accela 600 UHPLC sistemom koji radi u režimu pozitivne i negativne jonizacije (jonizacija zagrejanim elektrosprejom ili HESI) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka). Hromatografsko odvajanje jedinjenja od interesa je izvedeno na Sincronis C18 koloni (100 × 2,1 mm, veličina čestica 1,7 μm) korišćenjem UHPLC sistema koji se sastoji od kvaternarne Accela 600 pumpe i Accela autosamplera (ThermoFisher Scientific, Bremen, Nemačka). Mobilna faza se sastojala od (A) vode koja sadrži 0,1% sirćetne kiseline i (B) 100% acetonitrila. Program gradijenta pri brzini protoka od 0,300 mL/min je bio sledeći: 0,0–1,0 min 5% B, 1,0–16,0 min od 5% do 95% B, 16,0–16,1 min od 95% do 5% B, zatim 5% B tokom 4 min. Zapremina injekcije za sve uzorke bila je 5 μL . Program za uređivanje molekula ChemDraw (verzija 12.0, CambridgeSoft, Cambridge, MA, SAD) korišćen je za crtanje strukture i za izračunavanje preciznih masa jedinjenja od interesa. Za kontrolu instrumenta i analizu podataka korišćen je softver Xcalibur (ver. 2.1, Thermo Fisher Scientific, Valtham, MA, SAD). Neka od jedinjenja za koja nisu bili dostupni standardi su uslovno identifikovana korišćenjem prethodno prijavljenih podataka o fragmentaciji MS [155,156].

3.1.4.2. Ciljna analiza aktivnih jedinjenja ultravisoko efikasnom tečnom hromatografijom - UHPLC/MS

Dionex Ultimate 3000 UHPLC sistem sa TSK Quantum Access Max triple-kvadrupolnim masenim spektrometrom (ThermoFisher Scientific, Bazel, Švajcarska) je korišćen za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenti u uzorcima ekstrakta latica *P. tenuifolia*. Na koloni Sincronis C18, eluiranje je izvedeno na 40 °C. Voda sa 0,1% mravljom kiselinom i acetonitril (B) čine mobilnu fazu, koja je primenjena u sledećem gradijentu elucije: 5%B tokom prvih 2,0 min, 5–95% B tokom narednih 2,0–12,0 min, 95% B u narednih 12,0–12,2 min i 5% B u poslednjih 15 min. Brzina protoka je podešena na 0,4 mL/min, a injekcije imala zapreminu od 5 μL .

Temperatura isparivača je održavana na 200 °C, a zagrejani izvor jonizacije elektrosprej (HESI) je korišćen sa TSQ Quantum Access Max trostrukim kvadrupolnim masenim spektrometrom sa sledećim podešavanjima: napon raspršivanja 5000 V, pritisak u obliku gasa (N_2) 40 AU, pritisak gasa za čišćenje jona 1 AU, pritisak pomoćnog gasa (N_2) 8 AU, temperatura kapilara 300 °C i pomak skimera 0 V. Podaci masene spektrometrije su prikupljeni od 100 do 1000 m/z u režimu negativnih jona. Za kvalitativno ispitivanje ciljanih komponenata korišćeno je nekoliko režima skeniranja masene spektrometrije, kao što su potpuno skeniranje (FS) i skeniranje jona proizvoda (PIS). Energija sudara je prilagođena, zavisno od jedinjenja u testovima fragmentacije izazvane sudarom, koji su sprovedeni sa argonom koji je služio kao kolizioni gas. Praćenje vremenski odabranih reakcija (tSRM) za kvantitativnu analizu je izvedeno korišćenjem dva MS^2 fragmenta za sve molekule koji su prethodno identifikovani kao dominantni u PIS testovima.

3.1.5. Priprema lipozomalnih čestica

Lipozomi koji sadrže odabrani ekstrakt latica *P. tenuifolia* (ekstrakt sa najvišim sadržajem polifenola i najboljom biološkom aktivnošću) pripremljeni su primenom prolipozomne metode [157]. Lipozomi su izrađeni od tri mešavine fosfolipida: Phosal SA 75 (fosfatidilholin u etanolu i ulju šafranike, sadržaj $\geq 72,0\%$, Lipoid, Skoplje, Makedonija) – L75 SA lipozomi, Phosal MCT 53 (fosfatidilholin u trigliceridu srednje dugih lanaca, sadržaj $\geq 53,0\%$, Lipoid, Skoplje, Makedonija) – L53 MCT lipozomi i Phospholipon (komercijalna smeša lipida, suncokretov fosfatidilholin iz genetski modifikovanih biljaka, $\geq 90\%$; od Lipoid GmbH, Ludvigschafen, Nemačka) – LPh lipozomi. Na 50 °C, pomešani su fosfolipidi (4 g), etanol (15 mL), dejonizovana voda (3 mL) i osušeni ekstrakt latica *P. tenuifolia* sa lokaliteta Gulenovci (0,4 g). Nakon što se emulzija ohladila do sobne temperature, dodata je vodena faza (20 mL) u malim količinama i emulzija je mešana na 800 rpm tokom 1 h (slika 8). Kao kontrola, napravljeni su prazni lipozomi.



Slika 8 Lipozomi sa inkapsuliranim ekstraktom latica stepskog božura

3.1.6. Metode karakterizacije lipozomalnih čestica

3.1.6.1. Određivanje stepena inkapsulacije

Čestice lipozoma sa inkorporiranim ekstraktom su odvojene od neinkapsulirane frakcije ekstrakta centrifugiranjem na 17 500 rpm i 4 °C, tokom 45 min (Thermo Scientific Sorval VKS Ultra serija ultracentrifuga, ThermoScientific, Valtham, MA, USA). Efikasnost inkapsulacije (EI) određena je merenjem sadržaja ukupnih polifenola (TPC) u supernatantu korišćenjem UV-Vis spektrometrije i Folin-Čiklteu metode prethodno objašnjene u sekciji 3.1.3.1. EI je izračunat prema količini polifenola prisutnih u supernatantu, dobijenoj nakon centrifugiranja kao što je prikazano u jednačini (1):

$$EI [\%] = \frac{TPC_i - TPC_{sup}}{TPC_i} \times 100\% \quad (1)$$

TPC_i označava početni sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu latica *P. tenuifolia* koji se koristi za pripremu lipozoma, dok TPC_{sup} označava sadržaj ukupnih polifenola koji se nalazi u supernatantu nakon centrifugiranja.

3.1.6.2. Studija stabilnosti

Veličina čestica, indeks polidisperzije (PDI) i ζ potencijal pripremljenih lipozoma mereni su prvog i svakog 7. dana tokom prvih 28 dana, a potom i 60. dana od pripreme, korišćenjem Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Tokom 60-dnevne procene stabilnosti, lipozomalni sistem je čuvan u frižideru na 4 °C.

3.1.6.3. Ispitivanje reoloških svojstava

Gustina i površinski napon lipozoma u koje je inkapsuliran ekstrakt latica mereni su primenom uređaja Force Tensiometer K20 (Kruss, Hamburg, Nemačka) korišćenjem silicijumskog kristala kao imerzionog tela (za gustinu) i Vilhelmijeve ploče (za površinski napon). Na 25 °C svaki uzorak (20 mL) je analiziran tri puta.

Korišćenjem Rotavisc *lo-vi* uređaja opremljenog VOL-C-RTD komorom, VOLS-1 adapterom i vretenom (IKA, Staufen, Nemačka), merena je viskoznost lipozoma u koje je inkapsuliran ekstrakt latica. Na 25 °C svaki uzorak (6,7 mL) je analiziran tri puta.

Merenje gustine, površinskog napona i viskoziteta vršeno je prvog i šezdesetog dana.

3.1.7. Priprema biopolimernih filmova

3.1.7.1. Biopolimerni filmovi sa ekstraktom latica

Karboksimetil-celuloza (CMC – srednji viskozitet, 400–800 cP, molarna masa od 250 kDa, stepen supstitucije između 0,65–0,9; iz Sigma Aldrich, Hamburg, Nemačka) (0,96 g), dejonizovana voda (24 mL) i propilen glikol (0,36 mL) pomešani su sa rastvorom ekstrakta (0,4 g odabranog osušenog ekstrakta latica u 12 mL dejonizovane vode) i mešani 24 h na sobnoj temperaturi na magnetnoj mešalici na 500 ob/min. Dobijena smeša je izlivena u Petri šolje i sušena 24 h u laboratorijskoj peći (Emmeret UN 160, Emmeret GmbH + Co. KG, Schvalmstadt, Nemačka) (slika 9). Tip filma, CMC + 0,2 ex (polimer sa 0,2 g ekstrakta kao paralela lipozomalnom inkapsulatu sa ekstraktom), napravljen je istom tehnikom, ali uz dodatak 0,2 g osušenog ekstrakta latica, umesto 0,4 g. Biopolimerni filmovi su kondicionirani na sobnoj temperaturi tri dana u eksikatoru koji sadrži magnezijum sulfat.



Slika 9 Biopolimerni film na bazi karboksimetil-celuloze sa inkapsuliranim ekstraktom *Paeonia tenuifolia* L.

3.1.7.2. Biopolimerni film sa lipozomima sa inkapsuliranim ekstraktom

Karboksimetil-celuloza (CMC) (0,48 g), dejonizovana voda (12 mL), 12 mL lipozoma dobijenih od Phospholipona i ekstrakta latica i propilen glikol (0,36 mL) su mešani na magnetnoj mešalici pri brzini 500 ob/min tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Dobijena smeša je stavljena u Petri šolje i sušena 24 h u laboratorijskoj peći. Na kraju, biopolimerni filmovi su kondicionirani na sobnoj temperaturi tri dana u eksikatoru koji sadrži magnezijum sulfat.

3.1.8. Metode karakterizacije biopolimernih filmova

3.1.8.1. Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage (SV) je izračunat merenjem svakog uzorka filma nakon sušenja u pećnici do konstantne težine na temperaturi $30 \pm 0,2$ °C. Sadržaj vlage je izračunat prema jednačini (2):

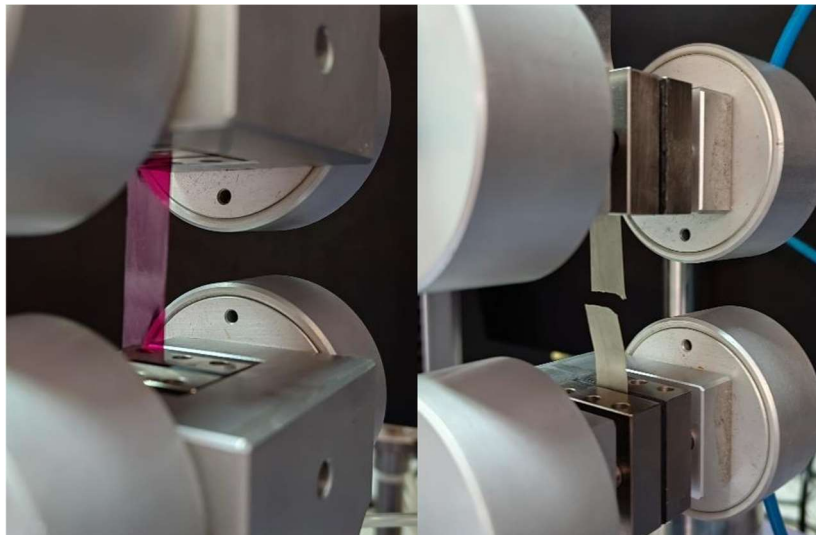
$$SV[\%] = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (2)$$

gde m_1 predstavlja početnu težinu (g) uzorka, m_2 je masa suvog uzorka (g), a SV sadržaj vlage u finalnom filmu.

3.1.8.2. Određivanje mehaničkih svojstava filmova

Zatezna čvrstoća (TS, MPa), sila kidanja (BF, N) i izduženje pri pucanju (EB, %) filmova (film + 0,2 ex, film + 0,4 ex, film + LPh lipozom) mereni su univerzalnom mašinom za ispitivanje (Shimadzu Corporation, Kjoto, Japan) opremljenom opterećujućom ćelijom od 100 N. Pravougaone trake filmova (25 × 80 mm) su istegnute brzinom poprečne glave od 10 mm/min korišćenjem hvataljki od nerđajućeg čelika (slika 10). Merna dužina je iznosila 50

mm. Merenja su izvršena u tri ponavljanja. Mehaničke osobine filmova su određene korišćenjem inženjerskih krivulja naprezanje–deformacija i sila–pomeranje na tački loma [143]. Debljina filma je merena korišćenjem digitalnog nonius kalibra dubine (0-Industrial&Scientific, Pittsburgh, PA, SAD, 0–150 mm), a težina filma je određena korišćenjem analitičke vage (Mettler, Columbus, OH, USA, Tipe AE 200 0,0001 g).



Slika 10 Ispitivanje istezanja filmova na bazi karboksimetil-celuloze korišćenjem univerzalne mašine za ispitivanje; uzorak između hvataljki koji sadrže ekstrakt latica (levo) i lipozome u koje je inkorporiran ekstrakt (desno).

3.1.8.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

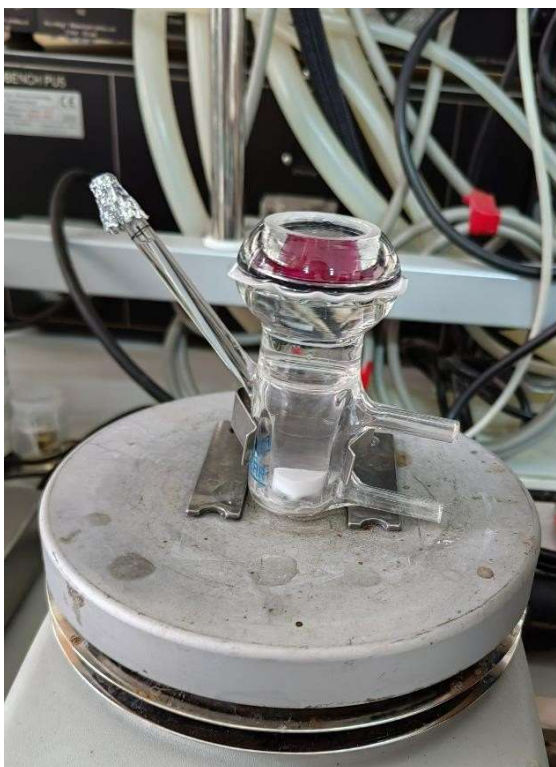
Morfologija biopolimernih filmova koji sadrže ekstrakt latica *P. tenuifolia* ili lipozoma sa ekstraktom je ispitana korišćenjem skenirajuće elektronske mikroskopije (Tescan Mira3 KSMU, Cranberry Township, PA, SAD), koja radi na 10 keV. Uzorci su podvrgnuti analizi u suvom obliku. Pre SEM analize, sva tri uzorka filmova su isečena u obliku kvadrata (5×5 mm), fiksirana na držač uzorka, a zatim obložena u vakuumu legurom zlato/platina (15/85) korišćenjem Polaron Sputter Coater SC502 (Fisons Instruments, Sjedinjene Američke Države) vakuum raspršivača.

3.1.9. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

FT-IR spektroskopijom okarakterisane su hemijske interakcije između komponenti filma, biološki aktivnih komponenata iz ekstrakata i lipozoma, za sve pripremljene lipozomei filmove. FT-IR spektri su dobijeni upotrebom Nicolet iS10 ATR-IR spektrometra (Thermo Scientific, Stokholm, Švedska) sa rezolucijom skeniranja od 4000 cm^{-1} . Za FT-IR merenja, polimerni biofilmovi su isečeni na male ploče ($1 \times 1 \text{ cm}$) i postavljeni na dijamantsku šasiju. Lipozomi su liofilizovani (prazni i sa inkorporiranim ekstraktom), a proces se sastojao od centrifugiranja, nakon čega su lipozomi zamrznuti u LAB11/EL19LT (Elcold, Hobro, Danska), na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 1 h i liofilizovani u Beta 2-8 LD plus liofilizatoru (Krist, Memingen, Nemačka) na $-75 \text{ }^\circ\text{C}$ i 0,011 mbar tokom 24 h.

3.1.10. Studija kontrolisanog otpuštanja

Upotrebom Francove difuzione ćelije (PermGear, Inc., Hellertovn, PA, SAD), sprovedene su studije ispitivanja kinetike otpuštanja polifenola iz čistog ekstrakta, lipozoma sa ekstraktom, filmova sa ekstraktom u lipozomima i filmova sa čistim ekstraktom (slika 11). Donorski i akceptorski odeljak Francove ćelije odvojeni su celuloznoacetatnom membranom (Permgear, Hellertovn, PA, SAD) sa površinom difuzije od 4,91 cm² i veličinom pora od 0,2 μm. Na membranu donorskog odeljka (0,05 g, d = 2,5 cm) nanošeni su uzorci (1 mL lipozoma/0,12 g biopolimernih filmova). Magnetna mešalica je korišćena za kontinuirano mešanje medijuma za oslobađanje (fosfatni pufer, pH = 5,5, c = 0,1 mol/L) na 37 °C i 400 ob/min u receptorskom odeljku [158]. Tokom 24 h, uzorci su prikupljeni u određenim vremenskim intervalima. Folin-Čiklteu metoda prilagođen je za kvantifikaciju polifenola u ovim uzorcima. Ukratko, 20 μL uzorka iz receptorskog dela, 100 μL Folin-Čiklteu reagensa i 1500 μL dejonizovane vode stavljeno je u vialu od 2000 μL. Zatim je dodato 300 μL natrijum karbonata (20% v/v), a smeša je zatim dopunjena dejonizovanom vodom do zapremine od 2000 μL. Posle 120 min inkubacije na sobnoj temperaturi i u mraku, merena je apsorbanca na 765 nm.



Slika 11 Francova difuziona ćelija.

Procenat oslobođenih polifenola u receptoru prikazanom na slici 11 izračunat je korišćenjem jednačine (3):

$$\% \text{ oslobođenih polifenola} = 100 - \frac{m_d}{m_0} \times 100\% \quad (3)$$

gde je m_d^0 bila početna masa ukupnih polifenola u uzorcima (ekstraktu, lipozomima i filmovima) u donorskom delu, a m_d je bila masa ukupnih polifenola u uzorcima u donorskom delu tokom vremena t .

3.1.11. Metode ispitivanja biološke aktivnosti

3.1.11.1. Metode ispitivanja antioksidativne aktivnosti

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metoda je jedna od najčešće korišćenih antioksidativnih metoda zbog svoje jednostavnosti i visoke osetljivosti u detekciji. DPPH[•] je stabilan radikal tamnoljubičaste boje, čiji je maksimum apsorpcije na 517 nm. Prilikom reakcije DPPH[•] sa antioksidansima, tamnoljubičasta boja se polako obezbojava, te preko svetloljubičaste prelazi u bledo žutu boju, u zavisnosti od koncentracije antioksidanasa prisutnih u uzorku. Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata/lipozoma ovom metodom zasniva se na redukciji slobodnih radikala pod dejstvom polifenolnih antioksidativnih komponenata, uz obezbojavanje rastvora radikala (Slika 12) [159]. Za izvođenje testa, rastvor DPPH pripremljen je mešanjem 9 mL etil alkohola sa 0,252 mg DPPH. Ekstrakti latica/lipozomi sa inkapsuliranim ekstraktom (200 μ L) su potom pomešani sa 2.8 mL ovog rastvora, koji je potom ostavljen da se inkubira u mraku, na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min.



Slika 12 Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata primenom DPPH metode

Nakon što je apsorbanca izmerena na 517 nm, sposobnost neutralizacije DPPH[•] (SC_{DPPH}) je izračunata upotrebom sledeće jednačine:

$$SC_{DPPH} = \frac{(A_{cont} - A_{sample})}{A_{cont}} \times 100 \% \quad (4)$$

gde je A_{cont} apsorbanca slepe probe (DPPH rastvor sa ekstrakcionim agensom ili vodom), a A_{sample} vrednost apsorbance uzorka. Svaki uzorak je pripremljen u tri ponavljanja. Rezultat analize izražen je kao IC_{50} (mg/mL) vrednost, tj koncentracija ekstrakta/lipozoma neophodna za neutralizaciju 50% prisutnih DPPH[•].

ABTS metoda je korišćena u cilju određivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata latica *P. tenuifolia*, kao i lipozoma u koje je ekstrakt inkapsuliran. U osnovi metode je redukcija ABTS^{•+}, koja se zasniva na prevođenju plavo-zelenog radikal-katjona (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)) u redukovan, bezbojan oblik. Što je nivo obezbojenja veći, sadržaj antioksidanasa je viši (slika 13). Rastvor ABTS radikala priprema se mešanjem

vodenog rastvora ABTS reagensa (0,019 g ABTS u 5 mL destilovane vode), sa 88 μ L rastvora $K_2S_2O_8$ (0,378 g $K_2S_2O_8$ u 10 mL destilovane vode), zbog sposobnosti kalijum-peroksidisulfata da aktivira ABTS radikale [160]. Rastvor pripremljen na ovaj način obložen je aluminijumskom folijom, a potom ostavljen na 24-časovnoj inkubaciji u frižideru. Pre početka analiza, rastvor je neophodno razblažiti rastvaračem koji je korišćen za pripremu ekstrakata, tako da apsorbanca rastvora bude $0,700 \pm 0,020$, na talasnoj dužini 734 nm. Izvođenje testa se zasniva na mešanju 200 μ L ekstrakta latica/lipozoma sa 2800 μ L rastvora $ABTS^{\bullet+}$ radikalskog katjona i inkubaciji na 25 ± 5 °C u mraku, u trajanju od 30 min. Kontrolni rastvor je pripremljen mešanjem 2800 μ L $ABTS^{\bullet+}$ rastvora sa 200 μ L ekstrakcionog agensa. Merenja su vršena u tri ponavljanja. Apsorbance svakog uzorka su izmerene na 734 nm. Sposobnost neutralizacije radikala se određuje prema jednačini 5:

$$SC_{ABTS} = \frac{A_{cont} - A_{sample}}{A_{cont}} \times 100\% \quad (5)$$

gde A_{cont} predstavlja vrednost apsorbance slepe probe, dok A_{sample} predstavlja vrednost apsorbance za uzorak ekstrakta/lipozoma tretiranog $ABTS^{\bullet+}$ katjonom. Rezultati su prikazani kao IC_{50} (mg/mL), koncentracije ekstrakata neophodne da se neutrališe 50% $ABTS^{\bullet+}$ radikala.



Slika 13 Antioksidativna aktivnost ekstrakata određena ABTS metodom

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*) je test kojim se ispituje redukujuća aktivnost uzoraka. Metoda može da kvantifikuje redukcionu sposobnost polifenolnih jedinjenja da prevedu kompleks fericijanida ($[Fe(CN)_6]^{3-}$) u ferocijanid ($[Fe(CN)_6]^{4-}$) doniranjem elektrona ili atoma vodonika od strane antioksidansa. Ekstrakt latica (10 μ L) pomešan je sa 1 mL rastvora $K_3Fe(CN)_6$ i 1 mL fosfatnog pufera (pH \approx 6,6), a smeša je potom inkubirana 4 h na 50 °C. Nakon perioda inkubacije, 0,25 mL 10% rastvora trihlorsirćetne kiseline rastvoreno je u 0,5 mL prethodno pripremljenog uzorka. Zatim je dodato 0,75 mL destilovane vode i 0,17 mL $FeCl_3$ (0,1% m/w). Svi reagensi, osim ekstrakta, bili su prisutni u slepoj probi. Sprovedena su tri paralelna ciklusa eksperimenta, dok je apsorbanca je merena na 750 nm. Rezultati su izraženi kao μ mol Fe^{2+} /g osušenog biljnog materijala i izračunati su na osnovu kalibracione krive za rastvor gvožđe sulfata (10-1000 μ mol Fe^{2+} /L). Antioksidativna aktivnost lipozoma nije ispitana ovom metodom zbog interferencije fosfolipida sa reagensima koji se koriste u ovoj metodi.

CUPRAC (engl. *CUPric Reducing Antioxidant Capacity*) metoda zasniva se na sposobnosti reagensa bakar(II)-neokuproina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) da oksiduje antioksidativna jedinjenja rastvorna u vodi ili ulju, stvarajući obojeni kompleks helata bakra(I)-neokuproina [161]. Radna smeša je pripremljena mešanjem 0,8 mL ekstrakta sa 1

mL $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (bakar(II) hlorid dihidrat), 1 mL neokuproina i 1,2 mL amonijum acetatnog pufera ($\text{pH} \approx 7$). Uzorak je zatim inkubiran 30 min na sobnoj temperaturi u potpunom mraku pre nego što je određena apsorbancija na 450 nm. Za svaki ekstrakt rezultat testa je verifikovan tri puta. Troloks je korišćen za dobijanje kalibracione krive za ovu metodu ($0,03125-1$ mmol/mL). Dobijene vrednosti su predstavljene kao mol TE (Troloks ekvivalent)/g osušenog biljnog materijala.

3.1.11.2. Metode ispitivanja antibakterijske aktivnosti

Mikrodiluciona metoda Antibakterijska aktivnost ekstrakta i lipozoma sa ekstraktom je testirana na Gram-pozitivnim bakterijama (*Staphylococcus aureus* ATCC 11632 i *Staphylococcus lugdunensis* Ibis 2996), kao i na Gram-negativnoj bakteriji (*Proteus vulgaris* IBR P004). Metoda mikrodilucije (mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića) je korišćena za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) [162]. Ekstrakti su razblaženi u 30% etanolu, dok su lipozomi korišćeni u sveže pripremljenoj formi ($c=10$ mg/mL). Uzorci su dodati u medijum triptične soje (TSB, Torlak, Srbija), a zatim inokulisani bakterijama u konačnoj koncentraciji od 1×10^6 jedinica koje formiraju kolonije (CFU) po bunarčiću. Pozitivna kontrola je bila gentamicin (Panfarma, Beograd, Srbija). Kao negativna kontrola korišćeni su 30% etanol (za ekstrakte) i voda (za lipozome). Vrednosti za MIK i MBK izražene su u mg/mL.

Disk difuziona metoda Antibakterijska aktivnost filmova u koje su inkorporirani lipozomi sa ekstraktom i čist ekstrakt određena je disk difuzionom metodom primenom istih bakterijskih sojeva kao u slučaju mikrodilucione metode [163]. Inokulumi bakterija su pripremljeni na isti način kao i u mikrodilucionoju metodi. Na Mueller-Hinton agar ploči, 300 mL inokuluma je korišćeno za formiranje uniformnih bakterijskih površina. U centar Petrijeve posude umetnuti su uzorci biopolimernih filmova, kvadratnog oblika ($10,0 \times 10,0$ mm). Ploče su inkubirane 24 h na 37°C . Zona inhibicije (mm) je korišćena za kvantifikaciju aktivnosti. Neto zona inhibicije je izračunata oduzimanjem dužine stranice kvadrata (tj. $10,0$ mm) od ukupne zone inhibicije koju je izazvao uzorak, u smislu čiste zone koja okružuje uzorak filma. Kao pozitivna kontrola korišćen je streptomycin. Kao negativna kontrola korišćeni su prazni filmovi.

3.1.11.3. Metode ispitivanja antifungalne aktivnosti

Mikrodiluciona metoda Aktivnost ekstrakta i lipozoma sa ekstraktom je testirana na sledećim sojevima *Candida*: *Candida albicans* (Y177), *Candida kefyr* (Y289) i *Candida krusei* (Y454). Antikandidalni test je sproveden po modifikovanoj EUCAST proceduri (EUCAST, 2002). Metoda mikrodilucije (mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića) je korišćena za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne fungicidne koncentracije (MFK). Ekstrakti su razblaženi u 30% etanolu, dok su lipozomi korišćeni u svom osnovnom obliku. Uzorci su dodati u medijum sastavljen od kvasca – peptona – dekstroze (YPD, Torlak, Srbija), a zatim inokulisani gljivicama u konačnoj koncentraciji od 1×10^6 jedinica koje formiraju kolonije (CFU) po bunarčiću [164]. Vrednosti za MIK i MBK izražene su u mg/mL. Ketokonazol je korišćen kao pozitivna kontrola. Negativna kontrola za ekstrakte bio je 30% etanol, dok je u slučaju lipozoma bila voda.

Disk difuziona metoda Antikandidalna aktivnost filmova sa lipozomima sa ekstraktom i čistim ekstraktom određena je disk difuzionim testom primenom istih sojeva gljivica, kao u slučaju mikrodilucione metode [163]. Inokulumi sojeva *Candida* pripremljeni su na isti način kao i u mikrodilucionoju metodi. Na TSB ploči formirani su uniformni slojevi *Candida* koristeći 300 mL inokuluma. U centar Petrijeve posude umetnuti su kvadrati biopolimernog filma dimenzija 10,0 × 10,0 mm. Ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Zona inhibicije (mm) je korišćena za kvantifikaciju aktivnosti. Neto zona inhibicije je izračunata oduzimanjem 10,0 mm od ukupne zone inhibicije koju je ostvario uzorak u smislu čiste zone oko diska. Kao pozitivna kontrola korišćen je ketokonazol. Kao negativna kontrola korišćeni su prazni filmovi.

3.1.11.4. Ispitivanje antibiofilm aktivnosti

Procenjeni su efekti šest različitih ekstrakata i svih pripremljenih lipozoma na biofilm koji formira bakterija *S. lugdunensis*. Da bi se ispitaio uticaj uzoraka na biofilm, *S. lugdunensis* je kultivisan u TSB-u sa 2% glukoze u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića sa lepljivim dnom (Sarsedt, Nemačka) sa MIK, MIK/2 i MIK/4 koncentracijama ekstrakata na 37 °C tokom 24 h. Nakon inkubacije, bunarčići su dva puta isprani sterilnim PBS-om (rastvor forfatnog pufera). Nakon toga, biofilm je fiksiran metil alkoholom, osušen na vazduhu i svaki bunarčić dva puta ispran PBS-om. Kristal violet (Bio-Merieux, Francuska) je korišćena za bojenje biofilma u trajanju od 30 min. Nakon inkubacije, kristal violet je eliminisan, bunarčići su očišćeni vodom, osušeni na vazduhu, a zatim je korišćen 96% etanol (Zorka, Srbija). Multiscan FC Microplate fotometar kompanije Thermo Scientific (Sjedinjene Američke Države) je korišćen za merenje apsorbancije na 620 nm, a jednačina (6) je korišćena za određivanje procenta supresije biofilma:

$$\% \text{ inhibicije biofilma} = \frac{A_{620, \text{control}} - A_{620, \text{sample}}}{A_{620, \text{control}}} \times 100\% \quad (6)$$

gde je $A_{620, \text{cont}}$ apsorbanca uzorka koji je sadržao inokulum bakterije i podlogu, dok je $A_{620, \text{sample}}$, bila apsorbanca uzorka koji je pored podloge i inokuluma bakterije sadržao i ekstrakt/lipozom sa ekstraktom. Kao pozitivna kontrola korišćen je gentamicin, a kao negativna kontrola prazni lipozomi.

3.1.11.5. Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata

Primenom kristal violet tehnike, citotoksični efekat ekstrakata latica je ispitan na ćelijskim linijama keratinocita (HaCaT). Ekstrakti su rastvoreni u PBS-u, do konačne koncentracije od 8 mg/mL. HaCaT ćelije su uzgajane u visokoglukožnom DMEM (Dulbekov Modifikovani "Eagle" Medijum) sa dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), 2 mM L-glutamina i 1% penicilina i streptomicina (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Masačusets, SAD) na 37 °C u 5% CO₂ u inkubatoru. Ćelije su zasejane u mikrotitarsku lepljivu ploču sa 96 bunarčića, tokom 48 h. Posle tog perioda, medijum je eliminisan, a ćelije su tretirane naredna 24 h u duplim bazenčićima sa različitim koncentracijama ekstrakta. Nakon uklanjanja ekstrakta/lipozoma, ćelije su isprane dva puta PBS-om pre nego što su obojene tokom 20 min na sobnoj temperaturi primenom 0,4% kristal violet rastvora za bojenje. Ćelije su zatim isprane u mlazu vode iz slavine kojom je uklonjen rastvor kristal violet boje i

ostavljen da se osuši na vazduhu na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena na 570 nm (OD₅₇₀) u čitaču ploča (Multiscan FC Microplate fotometar kompanije Thermo Scientific, Sjedinjene Američke Države). Rezultati su izraženi kao vrednost IC₅₀, što ukazuje na 50% inhibiciju rasta HaCaT ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom.

3.1.11.6. Ispitivanje efekata na kapacitete adhezije i invazije *Staphylococcus lugdunensis* na HaCaT ćelijama

Kako su ekstrakti latica prikupljeni na lokalitetu Gulenovci pokazali najniže vrednosti MIK u testu antimikrobne aktivnosti, odabrani su za dalje ispitivanje potencijalnih efekata na adheziju i invaziju kapacitete *S. lugdunensis* prema HaCaT ćelijama. Potencijal odabranih ekstrakata je procenjen u smislu smanjenja kapaciteta *S. lugdunensis* da se pričvrsti i prodre u HaCaT ćelije.

HaCaT ćelije su postavljene do spajanja u ploče sa 24 bunara sa lepljivim dnom. Nakon uklanjanja medijuma, ćelijama je dodat svež DMEM bez FBS-a koji sadrži ekstrakt/lipozom sa ekstraktom. Kako bi se procenila sposobnost bakterijskih ćelija da prijanjaju na HaCaT ćelijama, 100 µL kulture *S. lugdunensis* (10⁸ CFU/ml) je uneto u ćelije nakon 15 min inkubacije na 37 °C. U cilju ispitivanja invazivnog kapaciteta bakterija, HaCaT ćelije su kultivisane sa bakterijama tokom 2 h na 37 °C. Prilepljene bakterije su zatim ubijene tretiranjem HaCaT ćelija gentamicinom (300 µg/mL) tokom 1 h. Ćelije su zatim lizirane primenom 1 mL 1% (v/w) Tween 20 (Sigma Aldrich, Nemačka) na 37 °C tokom 30 min. Nakon tri kruga ispiranja sa DMEM-om bez FBS-a, ćelije su korišćene za ispitivanje. Nakon toga, ploče sa tripton sojinim agarom su zasejane razblaženim verzijama suspenzije *S. lugdunensis* iz svakog bunarčića. Posle 18 h inkubacije na 37 °C, izračunata je CFU vrednost. CFU vrednost je određena brojanjem kolonija u svakom bunarčiću, kako bi se našla srednja vrednost tretmana, a potom je procenat inhibicije izračunat prema jednačini 7:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{\text{kontrola} - \text{uzorak}}{\text{kontrola}} \times 100\% \quad (7)$$

3.1.11.7. *In vitro* ispitivanje efekta uzoraka na zarastanje rana

U cilju ispitivanja potencijala ekstrakata i lipozoma sa ekstraktom u pospešivanju zarastanja rana, proizvedene su konfluentne HaCaT ćelije. Za stvaranje oštećenja na monosloju ćelija korišćen je vrh nastavka od 200 µL. Posle ispiranja ćelija koje su se odvojile, zalepljene ćelije su kultivisane u DMEM medijumu koji sadrži 250 µg/mL ili IC₂₅ doze ekstrakata/lipozoma. Ovaj DMEM je dopunjen sa 1% FBS, 2 mM L-glutamina i 1% antibiotik-antimikotika, a 24 h nakon formiranja oštećenja, migracija ćelija je ispitana korišćenjem Nikon Eclipse TS2 mikroskopa (Nikon Instruments, Amsterdam, Holandija). Ćelije koje nisu tretirane služile su kao kontrola. Procenti zatvaranja rana tokom izlaganja ekstraktima/lipozomima korišćeni su za prikaz rezultata. Sprovedena su tri odvojena eksperimenta.

3.1.12. Statistička analiza

Statistička obrada svih podataka urađena je u statističkom softveru STATISTICA 7.0. primenom analize varijanse (*one-way ANOVA*) i Dankanovog *post hoc* testa. Podaci u

tabelama i graphicima su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, dok su razlike smatrane statistički značajnim pri $p < 0,05$. Ovaj princip statističke obrade podataka nije korišćen kod rezultata vezanih za antimikrobnu aktivnost, zbog primene pravila strožijih uslova.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Optimizacija procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenata

Ukupan sadržaj polifenola (TPC). Vrednosti TPC utvrđene za ekstrakte latica *P. tenuifolia* sakupljene na različitim lokalitetima u Srbiji prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1 Sadržaj ukupnih polifenola (TPC) i sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) *Paeonia tenuifolia* L. (sa različitih lokaliteta) ekstrakata dobijenih različitim metodama ekstrakcije i ekstrakcionim medijumima.

Poreklo biljnog materijala	Ekstrakcioni medijum	Metoda ekstrakcije	TPC [mg GAE/L]	TFC [mg CE/L]
Gulenovci	H ₂ O	Maceracija	31.34±0.23 ^e	24.62±0.11 ^b
		UAE	22.82±0.21 ^c	15.75±0.20 ^f
		MAE	28.22±0.27 ^a	23.09±0.21 ^a
	MeOH	Maceracija	31.85±0.31 ^e	24.50±0.19 ^c
		UAE	32.14±0.22 ^d	20.23±0.25 ^e
		MAE	35.24±0.23 ^b	21.44±0.11 ^d
Pančevo	H ₂ O	Maceracija	24.04±0.32 ^c	16.54±0.23 ^f
		UAE	18.91±0.47 ^e	12.31±0.19 ^e
		MAE	22.51±0.25 ^d	16.78±0.25 ^d
	MeOH	Maceracija	18.43±0.24 ^e	12.69±0.18 ^f
		UAE	22.08±0.26 ^d	15.78±0.27 ^f
		MAE	28.15±0.33 ^b	19.73±0.23 ^c
Deliblatska peščara	H ₂ O	Maceracija	30.15±0.33 ^d	24.61±0.32 ^d
		UAE	32.94±0.26 ^e	25.44±0.37 ^c
		MAE	33.26±0.15 ^e	28.48±0.18 ^d
	MeOH	Maceracija	23.54±0.20 ^d	16.01±0.29 ^{ef}
		UAE	32.83±0.19 ^e	23.72±0.44 ^e
		MAE	26.04±0.26 ^c	20.84±0.41 ^f

*Vrednosti sa različitim slovima (a-f) u svakoj koloni ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$; $n=3$; analiza varijanse, Dankanov *post hoc* test); Ekstrakcija primenom ultrazvuka (UAE); Ekstrakcija primenom mikrotalasa (MAE), metil alkohol (MeOH), ekvivalent galne kiseline (GAE); ekvivalent katehina (CE).

I proces ekstrakcije i medijum za ekstrakciju imali su značajan uticaj na vrednosti TPC, koje su takođe varirale u zavisnosti od porekla biljnog materijala. Kada je voda korišćena kao medijum za ekstrakciju, najveće vrednosti TPC su izmerene u laticama iz Deliblatske peščare (33,26 i 32,94 mg GAE/L za ekstrakte iz MAE i UAE). TPC navedenih ekstrakata je značajno veća u poređenju sa vodenim maceratima i ekstraktima (dobijenim ultrazvučnom i mikrotalasnoum ekstrakcijom) latica iz Gulenovaca i Pančeva. U vodenim ekstraktima latica iz Gulenovaca i Pančeva, najveći TPC su zabeleženi pri primeni maceracije (31,34 i 24,04 mg GAE/L), dok je vrednost TPC za uzorke Gulenovaca bila značajno veća u poređenju sa pančevačkim paralelama. Pored toga, u uzorcima iz Gulenovaca i Pančeva, UAE i MAE su dali značajno niže prinose polifenola. Kada je kao medijum za ekstrakciju korišćen metil alkohol (MeOH), najveće vrednosti TPC su zabeležene primenom MAE metode za laticu iz Gulenovaca i Pančeva (35,24 i 28,15 mg GAE/L) i UAE metode za laticu iz Deliblatske peščare (32,83 mg GAE/L). Kada je metanol korišćen kao rastvarač za ekstrakciju, ekstrakti latica iz Gulenovca su imali veći TPC u odnosu na one sa druga dva lokaliteta.

Kada se uzmu u obzir sve vrednosti za TPC, čini se da je metil alkohol bolji ekstrakcioni medijum za sve procese ekstrakcije korišćene u ovom istraživanju. Međutim, postojala su dva izuzetka u kojima je voda kao rastvarač dala bolje rezultate naspram metil-alkohola; MAE ekstrakt latica iz Deliblatske peščare i macerat latica iz Pančeva. Naime, metil alkohol je znatno manje polaran od vode, što omogućava lakšu ekstrakciju rastvaranjem većeg broja fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala [165]. Osim toga, za metil alkohol je već dokazano da lako ekstrahuje manje polarne fenolne kiseline i katehin [166]. Odstupanje koje je nastalo tokom maceracije latica sakupljenih u Pančevu i MAE latica iz Deliblatske peščare može se pripisati sadržaju nekih nefenolnih jedinjenja (ugljenih hidrata, proteina ili terpena) u ekstraktu koji mogu da daju pozitivnu Folin-Čiklteu reakciju ili međusobnom formiranju kompleksa [167]. Najviše TPC vrednosti su očekivane kada je korišćena metoda UAE jer proces kavitacije koji se javlja tokom ultrazvučne ekstrakcije izaziva bubrenje i pucanje zidova biljnih ćelija, omogućavajući veće stope difuzije kroz ćelije i ispiranje sadržaja [168]. Činjenica da je to uočeno samo kod latica iz Deliblatske peščare može se objasniti njihovim različitim hemijskim sastavom; moguće je da u laticama postoje određena hemijska jedinjenja u unutrašnjim strukturama biljne ćelije koja se mogu ekstrahovati samo metil alkoholom kada se koristi metoda UAE.

Kada je metil alkohol korišćen kao rastvarač, najbolji rezultati su postignuti MAE metodom, što se može pripisati sposobnosti mikrotalasa da prodiru kroz ćelijske zidove biljnog materijala i stupaju u interakciju sa polarnim molekulima, dovodeći do zagrevanja čitave zapremine biomaterijala i povećanja pritiska unutar ćelija i izazivajući rupturu ćelijskih zidova i oslobađanje fenolnih analita [169]. Pored toga, više vrednosti TPC mogu se postići razdvajanjem većih fenolnih jedinjenja na manja uz zadržavanje njihovih originalnih karakteristika, koja će takođe dati pozitivan ishod u Folin-Čiklteu testu [170]. Više TPC vrednosti vodenih ekstrakata dobijenih maceracijom od onih dobijenih MAE postupkom iz latica Gulenovaca i Pančeva mogu se pripisati razgradnji fenolnih jedinjenja koju Folin-Čiklteu test nije uspeo da detektuje [171]. Osim toga, vrednosti TPC se mogu smanjiti ne samo kao rezultat interakcije između fenolnih i nefenolnih jedinjenja (šećeri, masne kiseline, itd.), već i kao rezultat procesa oksidacije tokom ekstrakcije [172]. U literaturi postoji vrlo malo studija koje govore o vrednosti TPC u laticama zeljastih božura. U nekoliko sorti *P. lactiflora* određen je TPC od 11,16-32,23 mg GAE/g [173-175], dok je kod *P. peregrina* var. *romanica* izmeren visok sadržaj TPC (642,03 mg GAE/g). Sadržaj TPC u etanolnim ekstraktima latica *P. lactiflora* dobijenim MAE metodom bio je 54,45 mg GAE/g i UAE metodom 83,16 mg GAE/g. Ovo se može pripisati upotrebi različitog rastvarača za ekstrakciju (korišćen je etanol) i višim temperaturama ekstrakcije [176]. Vrednosti TPC metanolnih ekstrakata latica različitih sorti *P. delavaii* kao drvenastog božura bile su u rasponu od 388,35 do 469,4 mg GAE/g [176], dok su se u vodenim ekstraktima latica sorte *P. suffruticosa* vrednosti kretale od 23,94 do 130,78 mg GAE/g [177]. Rezultati TPC dobijeni u ovoj disertaciji bili su najbliži onima kod hibrida *P. suffruticosa* sa belim laticama, poznatog kao „Danfeng Bai“ [177].

Ukupan sadržaj flavonoida (TFC). Vrednosti TFC utvrđene za ekstrakte latica *P. tenuifolia* sakupljene na različitim lokalitetima u Srbiji takođe su prikazane u tabeli 1. Kada je voda korišćena kao medijum za ekstrakciju, MAE se pokazao kao najpogodnija tehnika ekstrakcije za sva tri lokaliteta u Srbiji; laticice iz Deliblatske peščare su pokazale najveći TFC (28,48 mg CE/L), što se razlikovalo ne samo od latica iz Gulenovaca (23,09 mg CE/L) i Pančeva (16,78 mg CE/L), već i od svih ostalih metoda ekstrakcije. Međutim, trend za metanolne ekstrakte bio je nešto drugačiji. Kada je kao medijum za ekstrakciju korišćen metil alkohol, najveći TFC je kvantifikovan u maceratima latica Gulenovaca (24,50 mg CE/L), koji se ne razlikuje od najvećeg TFC dobijenog iz MAE latica iz Pančeva (19,73 mg CE/L), ali se razlikovao od najviših TFC dobijenih u UAE i maceraciji latica iz Deliblatske peščare, koje se međusobno statistički značajno razlikuju (23,72 i 16,01 mg CE/L).

Niži sadržaji TFC u MAE metanolnim ekstraktima u poređenju sa MAE vodenim ekstraktima pripisuju se činjenici da su flavonoidi jedinjenja bogata hidroksilnim grupama, što im obezbeđuje veću rastvorljivost u polarnijim rastvaračima. U većini slučajeva, prisustvo vode u rastvaraču za ekstrakciju povećalo je efikasnost MAE, verovatno zato što je dodatna voda izazvala intenzivnije bubrenje biljnog materijala, povećavajući kontaktnu površinu između rastvarača i biljnog matriksa [178,179]. Vrednost TFC od 123,48 mg CE/g za etanolni MAE ekstrakt *P. lactiflora* [176] bila je značajno veća u poređenju sa metanolnim i vodenim ekstraktima latica *P. tenuifolia* dobijenih u ovom istraživanju, što se može pripisati razlikama u hemijskom sastavu latica različitih vrsta *Paeonia*.

4.2. Hemijski profil latica stepskog božura

Hemijski profil latica *P. tenuifolia* koje rastu samoniklo u Srbiji, do sada nije ispitan. U ispitivanom metanolnom ekstraktu latica sakupljenih u Gulenovcima, identifikovana su 83 jedinjenja i dalje klasifikovana u sledeće velike grupe (tabela 2): fenolne kiseline (jedinjenja 1–39), flavonoidni glikozidi i aglikoni (jedinjenja 40–58), antocijanini i antocijanidini (jedinjenja 59–69), derivati terpena (jedinjenja 70–80) i druga jedinjenja (81–83).

Tabela 2 HRMS i MS⁴ podaci za metabolite identifikovane u metanolnom ekstraktu *Paeonia tenuifolia* L.

Br.	Naziv jedinjenja	<i>t</i> _R , min	Molekulska formula, [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	Izračunata masa, [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	Tačna masa, [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	Δ ppm	MS ² Fragmenti, (% baznog pika)	MS ³ Fragmenti, (% baznog pika)	MS ⁴ Fragmenti, (% baznog pika)
<i>Fenolne kiseline</i>									
1	Galoil heksozid 1	0.57	C ₁₃ H ₁₅ O ⁻	331.06707	331.06580	3.82	125(8), 151(4), 169(100), 170(4), 193(11), 211(21), 271(42)	125(100)	68(15), 81(63), 97(48), 107(100)
2	Galoil heksozid 2	1.22	C ₁₃ H ₁₅ O ⁻	331.06707	331.06622	2.56	125(7), 169(100), 170(4), 193(6), 211(17), 271(41), 272(3)	125(100)	69(10), 81(6), 97(35), 107(100)
3	Galna kiselina	1.28	-	169.01425	169.01426	-0.09	125(100)	81(100), 97(9)	
4	Galoil heksozid 3	1.78	-	331.06707	331.06629	2.35	168(8), 169(26), 211(5), 241(10), 271(11), 313(8)	169(13), 211(100)	124(27), 125(7), 139(3), 165(11), 167(30), 168(100), 183(9)
5	Galoil heksozid 4	2.13	-	331.06707	331.06612	2.86	125(8), 169(100), 170(6), 211(3), 241(8), 271(5), 313(6)	125(100)	81(36), 97(55), 107(100)
6	Dihidroksibenzoil heksozid 1	2.52	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ ⁻	315.07216	315.07134	2.59	108(11), 109(13), 152(50), 153(100), 163(8), 165(14), 278(14)	109(100)	
7	Dihidroksibenzoeva kiselina 1	2.56	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	153.01933	153.01930	0.21	109(100), 110(5)	65(36), 67(13), 81(100)	
8	Galoil-di-O-heksozid 1	2.58	C ₁₉ H ₂₅ O ⁻	493.11989	493.11896	1.89	169(18), 241(16), 271(16), 283(22), 313(100), 314(13), 331(28)	125(22), 151(8), 169(100), 223(32), 241(10), 283(77), 295(12)	125(100)
9	Galoil heksozid 5	3.17	-	331.06707	331.06646	1.85	125(5), 169(100), 170(6)	125(100)	81(68), 97(47), 107(100)
10	Galoil-šikiminska kiselina	3.22	C ₁₄ H ₁₃ O ₉ ⁻	325.05651	325.05591	1.84	125(13), 164(4), 169(100), 170(8), 236(17), 278(9), 281(6)	125(100)	81(100), 97(18)
11	Dihidroksibenzoil-heksozid 2	3.26	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ ⁻	315.07216	315.07151	2.06	109(11), 147(13), 152(44), 153(100)	109(100)	81(100)

							165(12), 295(12)	191(87),			
12	Galoil-di-O-heksozid 2	3.29	C ₁₉ H ₂₅ O ⁻	493.11989	493.11934	1.13	169(13), 313(100), 331(4)	271(8), 314(15),	125(24), 169(100), 223(39), 295(14)	151(18), 211(16), 241(20),	125(100)
13	Digaloil-heksozid 1	3.29	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄ ⁻	483.07803	483.07733	1.45	169(100), 193(5), 271(7), 331(31), 332(4)	170(6), 313(16),	125(100)	79(16), 81(100), 107(7)	
14	Hidroksibenzoil-heksozid	3.43	C ₁₃ H ₁₅ O ⁻	299.07724	299.07690	1.14	137(100), 179(61), 239(97), 253(21)	169(14), 209(32), 240(10),	93(100)		
15	Digaloil-heksozid 2	3.49	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄ ⁻	483.07803	483.07729	1.52	169(100), 193(6), 211(3), 313(14), 331(17)	170(6), 271(6),	125(100)	69(76), 79(7), 81(100), 83(5), 97(12), 125(6)	
16	Ramnozid galne kiseline	3.62	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ ⁻	315.07216	315.07184	1.02	125(14), 153(43), 191(12), 211(25), 255(9)	151(18), 169(100),	125(100)	107(100)	
17	1,7-di-O-Galoil- sedoheptuloza	3.67	C ₂₁ H ₂₁ O ⁻	513.08859	513.08866	-0.13	329(6), 332(11)	331(100),	125(11), 169(100), 211(37), 241(4), 271(82)	151(6), 193(14),	125(100)
18	Metil galoil-heksozid	3.67	C ₁₄ H ₁₇ O ⁻	345.08272	345.08244	0.80	124(21), 151(38), 183(40), 313(48)	125(38), 169(100), 281(20),	107(3), 125(100)	53(100), 107(34)	
19	Digalna kiseline 1	3.70	C ₁₄ H ₉ O ₉ ⁻	321.02521	321.02490	0.94	125(3), 169(100), 170(7)	169(100), 170(7)	125(100)	69(75), 81(50), 97(100), 125(15)	
20	Vaniloil-heksozid (Mudanozid A)	3.76	C ₁₄ H ₁₇ O ₉ ⁻	329.08781	329.08752	0.87	149(19), 169(20), 211(14), 269(25)	167(100), 209(83), 239(16),	108(10), 123(100), 149(26), 152(40)	108(100)	
21	Digaloil-heksozid 3	4.02	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄ ⁻	483.07803	483.07735	1.40	169(6), 193(7), 211(8), 271(100), 313(13), 331(13)	272(6),	169(8), 211(100)	124(18), 125(6), 139(5), 165(9), 167(30), 168(100), 183(6)	

22	Galoil-norbergenin	4.03	$C_{20}H_{19}O^+$	467.08202	467.08083	2.54	153(100), 237(13), 279(10), 449(16)	154(5), 261(5), 297(19),	79(4), 143(27)	125(100),	79(59), 97(100), 107(14)
23	Digalna kiselina 2	4.07	$C_{14}H_9O_9^-$	321.02521	321.02503	0.55	169(100), 170(4)		125(100)		69(46), 81(100), 97(18), 107(16)
24	HHDP-heksozid	4.44	$C_{21}H_{21}O^-$	481.09877	481.10014	-2.87	165(4), 319(14)	301(100),	165(100)		97(7), 121(21), 137(100)
25	Dihidroksibenzoeva kiselina 2	4.44	$C_7H_5O_4^-$	153.01933	153.01954	-1.37	97(8), 107(11), 109(100), 111(7), 125(11)	108(13), 110(14),	65(50), 81(100)		
26	Tetragaloil-heksozid 1	4.82	$C_{34}H_{27}O_{22}^-$	787.09995	787.09964	0.39	465(4), 617(16), 635(100), 636(13)	618(4),	271(14), 313(11), 405(7), 423(63), 465(100), 483(67), 617(23)	169(30), 193(9), 235(15), 271(4), 295(16), 313(100), 421(15)	
27	Trigaloil-heksozid	4.83	$C_{27}H_{23}O^-$	635.08899	635.08869	0.47	465(17), 483(100), 484(12)	466(4),	169(8), 193(6), 211(10), 271(100), 313(21), 331(20), 465(3)	169(13), 211(100)	
28	Tetragaloil-heksozid 2	4.95	$C_{34}H_{27}O_{22}^-$	787.09995	787.09896	1.25	617(100), 635(14), 636(3)	618(15),	277(12), 295(21), 313(7), 447(31), 449(6), 465(100), 573(6)	169(20), 193(6), 235(5), 247(4), 271(9), 295(17), 313(100)	
29	Elaginska kiselina	5.18	-	300.99899	300.99872	0.90	157(3), 201(15), 229(90), 257(6)	185(100), 213(18),	133(7), 141(14), 147(14), 157(31), 157(100), 175(8), 185(21)		
30	Metil estar digalne kiseline 1	5.19	$C_{15}H_{11}O_9^-$	335.04086	335.04000	2.56	183(100), 184(5)		124(88), 183(4)	168(100),	124(100)
31	Tetragaloil-heksozid 3	5.22	$C_{34}H_{27}O_{22}^-$	787.09995	787.09845	1.90	465(4), 617(100), 619(4), 635(12), 636(3)	574(3), 618(15), 619(4), 635(12), 636(3)	211(11), 403(59), 447(64), 573(73)	295(10), 421(17), 465(100),	169(24), 207(3), 235(15), 295(11), 313(100), 421(3), 447(11)
32	Digaloil-HHDP-protokvercitol	5.60	$C_{34}H_{27}O_{21}^+$	771.10394	771.10324	0.90	233(22), 261(79), 305(100), 601(42)	237(20), 279(48), 431(72),	153(100)		79(4), 125(100), 143(27)
33	Metil estar digalne kiseline 2	5.74	$C_{15}H_{11}O_9^-$	335.04086	335.04023	1.87	183(100), 184(5)		124(86), 183(3)	168(100),	124(100)

34	Trigaloil-HHDP-protokvercitol	5.87	C ₄₁ H ₃₁ O ⁺	923.11489	923.11456	0.36	305(100), 431(59), 457(74), 771(40)	413(41), 456(18), 583(43),	153(100)		79(4), 125(100), 143(19)		
35	Pentagaloil-heksozid	5.80	C ₄₁ H ₃₁ O ₂₆ ⁻	939.11091	939.10895	2.08	617(5), 770(33), 787(100), 788(19)	769(50), 771(3),	403(3), 447(3), 465(7), 573(5), 635(17)	617(100),	235(13), 403(46), 447(61), 573(75)	295(14), 421(18), 465(100),	
36	<i>p</i> -kumarinska kiselina	6.30	-	163.04007	163.04024	-1.04	119(100)		91(100)				
37	Hidroksibenzoil-galoil-heksozid	6.44	C ₂₀ H ₁₉ O ⁻	451.08820	451.08875	-1.22	137(6), 169(6), 227(4), 313(100), 314(10), 331(89), 332(12)	125(22), 151(16), 169(100), 295(15)	137(52), 168(58), 269(37),		125(42), 151(100)		
38	Ferulinska kiselina	6.50	C ₁₀ H ₉ O ₄ ⁻	193.05063	193.05064	-0.03	134(3), 193(100), 259(3)	169(33), 124(96), 125(5),	134(74), 178(65)	149(100),	134(100)		
39	Methyl galat	7.43	C ₈ H ₇ O ⁻	183.02990	183.02900	4.92	153(44), 168(100), 183(10)	167(7), 169(6),	124(100)		54(12), 78(100)		
<i>Flavonoidni glycozidi i aglikoni</i>													
40	Taksifolin heksozid	3,7-di-O-	3.77	C ₂₇ H ₃₁ O ⁻	627.15667	627.15641	0.42	267(7), 303(10), 447(18), 466(11)	285(13), 355(8), 465(100),	167(3), 285(100), 329(3), 339(9)	241(14), 303(59),	149(13), 217(23), 242(7), 243(28), 257(8)	199(12), 241(100),
41	Kaempferol heksozid	3,7-di-O-	3.77	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609.14611	609.14654	-0.70	285(7), 448(27)	447(100),	284(5), 309(3)	285(100),	125(49), 199(28), 217(53), 257(100)	163(57), 213(29), 241(70),
42	Krisoeriol 7-O-heksozid		4.08	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	461.10894	461.10849	0.96	293(4), 297(3), 298(5), 299(100), 300(22), 301(7), 415(3)	147(8), 240(3), 256(7), 271(6), 283(20), 284(100)		147(13), 214(10), 239(11), 240(21), 256(62), 267(11)	255(100),	
43	Kvercetin heksozid	3,7-di-O-	4.24	C ₂₇ H ₂₉ O ⁻	625.14102	625.14160	-0.93	301(21), 462(10), 464(11), 505(3)	302(3), 463(100),	271(3), 301(100), 343(7)	300(37),	107(9), 179(70), 229(7), 255(13), 273(10), 301(16)	151(100),

44	Luteolin 7- <i>O</i> -heksozid	4.30	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447.09329	447.09333	-0.09	284(18), 286(12), 299(4), 321(3), 327(3), 429(3)	285 (100), 321(3)	125(46), 213(29), 241 (100), 257(98)	163(35), 217(55), 243(53), 241(13)	185(11), 198(24), 213 (100), 241(13)	197(47), 199(28), 223(14),
45	Kvercetin 3- <i>O</i> -heksozid-7- <i>O</i> -pentozid	4.31	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆ ⁻	595.13046	595.13068	-0.38	301(34), 433 (100), 462(74), 464(17)	302(7), 434(20), 463(72),	179(3), 300 (100), 343(10), 344(3)	271(7), 301(35), 254(12), 271 (100), 272(12)	121(3), 151(8), 227(11), 255(15),	254(12), 255(15),
46	Kaempferol 3- <i>O</i> -(2"-heksozil)-heksozid	4.54	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609.14611	609.14635	-0.40	285(14), 448(11), 489(10)	447 (100), 448(11)	151(4), 227(3), 255(15), 256(4), 284 (100), 285(48), 327(19)	227(14), 256(19)	255 (100),	
47	Kvercetin 3- <i>O</i> -heksozid-7- <i>O</i> -ramnozid	5.00	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609.14611	609.14627	-0.26	301(31), 447 (100), 463(59), 464(6)	302(4), 448(11),	301 (100)		107(11), 179(62), 255(13), 273(9), 301(13)	151 (100), 229(14),
48	Kaempferol 3- <i>O</i> -pentozid-7- <i>O</i> -heksozid	5.07	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅ ⁻	579.13554	579.13625	-1.22	263(30), 407(72), 446(85), 448(18)	301(27), 433(87), 447 (100),	299(9), 300 (16), 301(100)	300 (16),	151 (100), 179(62), 211(14), 255(38), 301(14)	179(62), 229(30), 257(12),
49	Kaempferol 3- <i>O</i> -heksozid-7- <i>O</i> -ramnozid	5.26	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593.15119	593.15042	1.31	285(16), 431(37), 447 (100), 448(10)	286(3), 432(6),	151(3), 227(3), 255(16), 256(3), 284 (100), 285(29), 327(19)	227(12), 256(23)	255 (100),	
50	Isorhamnetin 3- <i>O</i> -heksozid-7- <i>O</i> -ramnozid	5.34	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆ ⁻	623.16176	623.16160	0.25	315(7), 461(28), 462(4), 477 (100), 478(11)		271(5), 285(7), 299(5), 314 (100), 315(21), 329(3), 357(18)	243(28), 271(81), 286(46), 300(17)	257(13), 285 (100), 299(12),	
51	Kvercetin 3- <i>O</i> -heksozid	5.44	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463.08820	463.08826	-0.13	300(38), 302(12)	301 (100),	151(81), 193(6), 229(6), 257(12), 272(8), 273(16)	179 (100), 151 (100)		
52	Kvercetin 3- <i>O</i> -pentozid	5.62	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁ ⁻	433.07764	433.07732	0.74	300 (100), 302(10), 315(3), 343(5)	301(94),	151(6), 179(8), 254(4), 255(53), 256(4), 271 (100), 272(12)	199(24), 203(9), 215(22), 227(60), 242(8), 243 (100), 271(32)	215(22), 242(8),	
53	Kaempferol 3- <i>O</i> -heksozid	5.77	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447.09329	447.09258	1.57	227(4), 255(19), 256(6), 284 (100), 285(95), 286(15), 327(17)		227(13), 255 (100), 256(21)	167(3), 183(3), 211(66), 213(3), 255(37)	211(66), 227 (100),	

54	6-Hidroksikaempferol	5.98	C ₁₅ H ₉ O ⁻	301.03538	301.03517	0.69	257(100), 283(3)	258(9), 189(69), 213(59), 229(100)	147(55), 171(46), 211(30), 215(54),	159(9), 185(25), 187(20), 201(100), 211(49), 214(8), 229(8)
55	Kvercetin	6.80	C ₁₅ H ₉ O ⁻	301.03538	301.03521	0.55	107(5), 151(79), 152(5), 179(100), 180(8), 257(12), 273(14)	151(100)		63(4), 65(3), 83(13), 107(100)
56	Onopordin	7.41	-	315.05103	315.05087	0.49	283(100), 284(11)	195(3), 211(12), 215(7), 227(4), 239(15), 255(100), 265(3)	183(16), 187(4), 209(3), 211(64), 213(13), 227(100), 237(21)	
57	Limocitrin	7.68	C ₁₇ H ₁₃ O ⁻	345.06159	345.06141	0.53	281(24), 331(14)	330(100), 285(15), 301(9), 316(12)	271(22), 287(13), 315(100), 151(100),	165(67), 175(23), 199(30), 243(100), 259(33), 271(21), 287(50)
58	Isorhamnetin	7.69	C ₁₆ H ₁₁ O ⁻	315.05103	315.05084	0.59	300(100), 301(10)	228(25), 271(85), 283(32)	227(49), 255(41), 272(73),	65(3), 83(5), 107(100)
Antocijanini i antocijanidini										
59	Cijanidin 3,5-di-O-heksozid 1	3.79	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆ ⁺	611.16066	611.16022	0.71	287(84), 449(100), 288(11), 450(13)	287(100)		137(41), 175(29), 185(30), 213(100), 231(55), 241(50), 287(92)
60	Peonidin 3,5-di-O-heksozid	4.06	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₆ ⁺	625.17631	625.17494	2.20	301(69), 463(100), 302(10), 464(17)	301(100)		258(4), 286(100)
61	Cijanidin 3-O-heksozid	4.22	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁺	449.10784	449.10637	3.26	287(100), 288(12)	137(38), 185(28), 231(52), 287(100)	175(30), 213(87), 241(45),	129(4), 141(21), 157(28), 167(9), 171(9), 185(100), 213(7)
62	Peonidin 3-O-heksozid	4.67	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁ ⁺	463.12349	463.12236	2.43	301(100), 302(12)	258(3), 287(7)	286(100),	202(9), 213(5), 229(5), 230(29), 257(17), 258(100), 268(23)
63	Cijanidin 3,5-di-O-heksozid 2	5.05	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆ ⁺	611.16066	611.16009	0.93	303(24), 449(100)	448(11), 303(100)		137(23), 153(22), 165(59), 229(85),

												247(28), 285(52)	257(100), 285(52)
64	Delphinidin 3-O-ramnozid	5.05	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁺	449.10784	449.10560	4.98	153(10), 303(100), 418(60), 430(8), 431(5)	287(12), 304(18), 247(30), 285(50)	137(28), 165(71), 247(30), 285(50)	153(25), 229(94), 257(100),	161(4), 201(8), 229(100)		
65	Cijanidin 3-O-ramnozid	5.23	C ₂₁ H ₂₁ O ⁺	433.11292	433.11202	2.08	287(100), 288(8)		121(41), 165(100), 231(32), 258(49)	153(71), 213(89), 241(92),	69(17), 137(89), 183(7)	109(100),	
66	Petunidin 3-O-ramnozid	5.40	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁ ⁺	463.12349	463.12190	3.43	301(13), 318(22), 395(9), 444(5), 445(10)	317(100), 347(11), 285(36), 303(16)	139(10), 261(7), 285(36), 303(16)	257(10), 274(10), 302(100),	153(26), 246(8), 273(14), 274(100), 275(5), 284(11), 285(16)		
67	Delfinidin	5.50	C ₁₅ H ₁₁ O ⁺	303.04993	303.04919	2.45	137(28), 229(93), 257(100), 303(34)	165(65), 247(27), 285(75),	161(3), 173(4), 201(10), 215(3), 229(100)		145(9), 159(7), 161(22), 173(27), 183(12), 187(22), 201(100)		
68	Cijanidin	5.82	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁺	287.05502	287.05416	2.99	153(68), 213(85), 258(46), 287(47)	165(100), 241(89), 269(40),	69(12), 137(97), 183(5)	109(100),			
69	Petunidin 3-O-heksozid	6.02	⁺	479.11840	479.11644	4.10	317(100), 318(8)		139(9), 165(7), 257(10), 274(7), 285(38), 302(100), 303(8)	153(25), 228(4), 246(9), 273(18), 274(100), 284(10), 285(20)			

Derivati terpene

70	Desbenzoilpaeoniflorin	1.82	C ₁₆ H ₂₃ O ⁻	375.12967	375.12916	1.36	195(6), 205(20), 215(7), 329(5), 341(100), 343(11), 345(15)		101(18), 119(26), 143(26), 179(100)	113(26), 131(15), 161(34),	119(100)		
71	Mudanpiozid F	3.45	C ₁₇ H ₂₅ O ⁻	389.14532	389.14491	1.06	161(38), 325(24), 343(100), 351(6)	181(20), 341(14), 344(11),	113(24), 143(29), 161(100), 181(49)	125(15), 151(33), 163(59),			

72	Oksipaeoniflorin	4.18	$C_{23}H_{27}O^-$	495.15080	495.15049	0.63	281(4), 333(20), 465 (100), 477(9)	299(4), 334(4), 466(24),	137(78), 179(16), 281(43), 327(31)	165(33), 209(12), 299 (100),	113(6), 137(54), 151(6), 179 (100), 209(19), 239(32)	
73	Paeonin B	4.37	$C_{16}H_{21}O_9^-$	357.11911	357.11815	2.68	191(4), 196(11)	195 (100),	119(7), 123(14), 135(32), 136 (100), 151(74), 177(17), 180(4)		107(5), 121 (100)	
74	Mudanpiozid E	4.42	$C_{24}H_{29}O^-$	525.16137	525.16104	0.62	167(90), 479(14), 495 (100), 507(19)	363(41), 491(13), 496(21),	165(25), 209(23), 311(33), 329(50)	167 (100), 239(16), 327(31),	108(10), 123 (100), 152(27)	
75	Albiflorin + HCOOH	5.35	$C_{24}H_{29}O^-$	525.16137	525.16099	0.72	449 (100), 478(5), 479(34)	450(6),	165(25), 327 (100)	309(7),	113(5), 123(8), 149(4), 165 (100), 207(3), 309(20)	
76	Paeoniflorin	6.83	$C_{23}H_{27}O_{11}^-$	479.15589	479.15605	-0.35	269(3), 432(8), 433(38)	271 (100),	183 (100), 211(15), 213(8), 225(7), 235(10), 253(77)	195(43),	85(3), 97(19), 165 (100), 183(8)	
77	Benzoil paeoniflorin HCOOH 1	+	7.55	$C_{31}H_{33}O_{14}^-$	629.18758	629.18745	0.21	535(3), 582(18), 583(71)	553 (100),	165(21), 245(4), 413(6), 431 (100)	165 (100), 179(3), 217(3), 265(5), 291(3), 309(11), 413(21)	
78	Paeoniflorigenon	7.67	$C_{17}H_{19}O^+$	319.11762	319.11683	2.45	179(57), 257(7), 285(24), 301(7), 302(69), 303(11)	197 (100), 301(7),	123(3), 137(5), 151(4), 161(6), 179 (100)	167(11),	133 (100), 151(17), 161(57)	
79	Benzoil paeoniflorin HCOOH 2	+	8.27	$C_{31}H_{33}O_{14}^-$	629.18758	629.18792	-0.53	553 (100), 582(17), 584(8)	554(17), 583(100),	165(14), 431 (100), 535(3)	413(6), 413(7)	123(5), 150(4), 165 (100), 227(5), 249(4), 309(11), 413(7)
80	Benzoil paeoniflorin HCOOH 3	+	9.36	$C_{31}H_{33}O_{14}^-$	629.18758	629.18760	-0.03	445(3), 583 (100), 584(27)	582(12),	177(22), 299(19), 387(8), 461(9), 461 (100), 565(5)	195(26), 461(9),	133(36), 151(22), 165(9), 177 (100), 195(58), 545(31)
Druha jedinjenja												
81	Šikiminska kiselina	0.78	$C_7H_9O^-$	173.04555	173.04548	0.38	93(58), 127(29), 137(19), 155(58)	111 (100), 129(43), 143(22),	57(15), 67(11), 81(5), 93 (100)			

82	Limunska kiselina	1.01	$C_7H_{11}O_6^-$	191.05611	191.05597	0.74	85(63), 111 (100), 145(13), 173(48)	93(34), 127(47), 171(18),	67(79), 81(10), 83(32), 93 (100), 96(21)	
83	Pinoresinol heksozid	5.80	$C_{26}H_{31}O_{11}^-$	519.18719	519.18716	0.04	357 (100), 469(4), 485(4)	358(13),	136(40), 311(10), 327(7), 342(11)	151 (100), 136 (100)

Fenolne kiseline. Ovo je najzastupljenija grupa, sa 39 identifikovanih jedinjenja odabranom u ekstraktu latica stepskog božura. Za pozitivnu identifikaciju jedinjenja **3**, **29** i **36** korišćene su hromatografske karakteristike koje odgovaraju standardima galne kiseline, elaginske kiseline i *p*-kumarinske kiseline. Fenolne kiseline **3**, **29**, **36** i **38** su prethodno identifikovane u taksonima *Paeonia*, dok su jedinjenja **10**, **16**, **24**, **32** i **37** prvi put otkrivena u laticama *P. tenuifolia* u ovom istraživanju. Galna kiselina (**3**) i ferulanska kiselina (**38**) su ranije identifikovane u korenu zeljaste vrste *P. lactiflora* [180,181]. Elaginska (**29**) i *p*-kumarinska kiselina (**36**) pronađene su u prašnicima drvenaste vrste *P. ostii* [182]. Treba napomenuti da je takodje izvršena kvantifikacija ovih jedinjenja (tabela 3), a količina *p*-kumarinske kiseline bila je u rasponu od 0,253–15,04 mg/L. U metanolnom maceratu latica iz Gulenovaca i maceratu i UAE metanolnog ekstrakta latica iz Deliblatske peščare, *p*-kumarinska kiselina nije kvantifikovana. Sa druge strane, u svim analiziranim ekstraktima nađena je elaginska kiselina, čiji je sadržaj varirao od 30,67 do 166,33 mg/L (najveća koncentracija je izmerena u vodenom maceratu latica sakupljenih u Gulenovcima). Jedinjenje **37** (hidroksibenzoil-galoil-heksozid) je primećeno na 6,44 min sa molekularnim jonom na 451 *m/z*. MS² bazni pik na 313 *m/z* formiran je gubitkom heksozil grupe (138 Da). Njegov bazni pik MS³ pojavio se na 169 *m/z* (gubitak galoil grupe—144 Da), dok je njegov bazni pik MS⁴ generisan daljim gubitkom H₂O (18 Da). Jedinjenja **19** (3,70 min), **23** (4,07 min), **30** (5,19 min) i **33** (5,74 min) identifikovana su kao derivati digalne kiseline, a njihova fragmentacija je nedavno potvrđena [183,184]. Utvrđeno je da su jedinjenja **13** (3,29 min), **15** (3,49 min) i **21** (4,02 min), sa istim egzaktnim masama (483 *m/z*) i sličnim obrascima fragmentacije, izomeri digaloil-heksozida. Bazni pik MS² u sva tri slučaja pronađen je na 169 *m/z*, što može odgovarati ili ostatku digalne kiseline ili ostatku heksoze. Pet drugih jedinjenja, **1** (0,57 min), **2** (1,22 min), **4** (1,78 min), **5** (2,13 min) i **9** (3,17 min), sa istim egzaktnim masama (331 *m/z*) i sličnim obrascima fragmentacije, prepoznati su kao izomeri galoil-heksozida. Za sve njih, MS² bazni pik je primećen na 125 *m/z*, što može odgovarati ostacima galne kiseline ili heksoze. Takođe je pronađeno da su slični obrasci fragmentacije kod izomera tetragaloil-heksozida, unutar jedinjenja **26** (4,82 min), **28** (4,95 min) i **31** (5,22 min), koji se odlikuju istim tačnim masama (787 *m/z*). Za sve njih, detektovan je bazni pik MS² na 617 *m/z*, što je verovatno posledica ostatka tetragalne kiseline ili heksozida. Što se tiče preostalih jedinjenja prikazanih u tabeli 2, takodje su identifikovani izomeri dihidroksibenzoil-heksozida (**6**, **11**), dihidroksibenzoeve kiseline (**7**, **25**) i galoil-di-*O*-heksozida (**8**, **12**), a njihovi MS² pikovi su 153, 109 i 313 *m/z*. Ostalih deset jedinjenja iz grupe fenolnih kiselina (**14**, **17**, **18**, **20**, **22**, **27**, **34**, **35** i **39**) identifikovano je na osnovu njihovih karakterističnih MS spektara i obrazaca fragmentacije.

Flavonoidni glikozidi i aglikoni. Ovo je sledeća najbrojnija grupa jedinjenja, sa 19 jedinjenja identifikovanih u ispitivanom ekstraktu. Jedinjenja **41** i **43** su nedavno identifikovana u semenu zeljaste vrste *P. lactiflora* [185]. U korenu zeljastih božura otkrivena su jedinjenja **54** kod vrsta *P. lactiflora* i *P. veitchii* [186] i **56** (onopordin) kod *P. anomala* [187]. Osim u korenu, jedinjenja **47** i **57** su identifikovana i u nadzemnim delovima *P. kesrounansis* [188] i *P. parnassica* [189]. Ranije je utvrđeno da samo božuri (nekoliko sorti) sadrže jedinjenja **42**, **45**, **48**, **49** i **52** [190], dok su jedinjenja **44**, **46**, **51**, **53**, **55** i **58** ranije

otkrivena u cvetovima zeljastih biljaka *P. delavaii* ili drvenastoj vrsti *P. rockii* [191]. Jedinjenja **55** i **58** su kvantifikovana, a količina jedinjenja **55** varirala je od 0,159 do 3,15 mg/L (najveća količina je određena u metanolnom maceratu latica iz Deliblatske peščare), dok je izorhamnetin bio prisutan u količinama od 0,26 do 7,22 mg/L (najveći sadržaj otkriven je u UAE vodenom ekstraktu latica iz Pančeva).

Antocijanini i antocijanidini. Identifikovano je 11 jedinjenja koja pripadaju ovoj grupi. Kod drvenastih božura samo dva (**61** i **62**) pronađena su kod vrste *P. delavaii* [192]. Međutim, najviše ih je zabeleženo u cvetovima zeljastih božura, i to **59** i **63** kod vrsta *P. peregrina* i *P. lactiflora* [193], **60** samo kod vrste *P. lactiflora* [194], a **67** i **68** samo kod vrste *P. tenuifolia* [195]. Antocijanidini, delfinidin (**67**) i cijanidin (**68**), takođe su identifikovani u laticama nekih božura: *P. jishanensis*, *P. ostii*, *P. ostii* var. *lishizhenii*, *P. kiui*, *P. rockii*, *P. decomposita*, *P. potaninii* i *P. delavaii* [191].

Derivati terpena. Slično kao u slučaju antocijanina i antocijanidina, otkriveno je 11 jedinjenja iz ove grupe, a sva su već prijavljena kao karakteristična za taksone *Paeonia*. Kod zeljastih božura jedinjenja **77–80** otkrivena su u svim biljnim organima [196], jedinjenja **70–73** samo u korenu vrste *P. lactiflora* [196], **70–71** takođe u korenu vrste *P. veitchii* [180], **78** u korenu vrste *P. daurica* [197], a **74–76** samo u cvetovima vrste *P. tenuifolia* [198]. Nekoliko jedinjenja identifikovanih u ovom istraživanju je takođe ranije prijavljeno kod drvenastih božura; **74–76** u stabljikama vrste *P. ostii* [182] i **77–80** u svim biljnim organima vrste *P. suffruticosa* [199]. U ovom istraživanju, molekularni joni izomernih jedinjenja **77**, **79** i **80** (7,55, 8,27 i 9,36 min) su pronađeni na 629 *m/z*, a njihovi obrasci fragmentacije su bili veoma slični. Probna identifikacija ova tri jedinjenja, tačnije benzoil paeoniflorin + HCOOH 1 (**77**), benzoil paeoniflorin + HCOOH 2 (**79**) i benzoil paeoniflorin + HCOOH 3 (**80**), postignuta je zahvaljujući njihovim hromatografskim karakteristikama [199].

Ostala jedinjenja. U ovom istraživanju, sledeća tri jedinjenja su takođe potencijalno identifikovana po prvi put u laticama *P. tenuifolia*: šikiminska kiselina (**81**), limunska kiselina (**82**) i pinorezinol heksozid (**83**). Sva ostala jedinjenja su prethodno bila prijavljena u taksonima *Paeonia*, ali ni jedno od njih kao sastavni deo latica. Jedinjenje **82** je ranije otkriveno u korenu zeljastih vrsta *P. lactiflora* i *P. veitchii* [180], dok je kod drveća božura jedinjenje **81** pronađeno u sadnicama vrste *P. suffruticosa* [200], a jedinjenje **83** u prašnicima vrste *P. ostii* [182].

4.3. Kvantifikacija ciljanih komponenata ekstrakata latica *Paeonia tenuifolia* L.

U cilju određivanja tačne količine nekih biološki aktivnih komponenata prisutnih u ekstraktima latica stepskog božura koje su prikupljene na tri lokaliteta u Srbiji izvršena je analiza ekstrakata primenom ultravisoko efikasne tečne hromatografije (UHPLC/MS). Njihova kvantifikacija izvršena je na osnovu podudaranja sa analitičkim standardima (tabela 3).

Tabela 3 Kvantifikacija aktivnih jedinjenja u ekstraktima latica *Paeonia tenuifolia* L. primenom UHPLC/MS metode

Poreklo biljnog materijala	Ekstrakcioni medijum	Metoda ekstrakcije	<i>p</i> -kumarinska kiselina, mg/L	Elaginska kiselina, mg/L	Kvercetin, mg/L	Isorhamnetin, mg/L
Gulenovci	H ₂ O	Maceracija	0.253±0.008 ^l	166.33±14.62 ^a	0.386±0.006 ⁱ	0.52±0.02 ^j
		UAE	0.70±0.02 ^g	143.10±12.58 ^{ab}	0.312±0.004 ^j	0.43±0.02 ^k
		MAE	NP	124.00±10.90 ^{bc}	0.159±0.002 ^o	0.26±0.01 ^m
	MeOH	Maceracija	0.456±0.014 ^h	80.03±7.03 ^e	0.188±0.001 ⁿ	0.45±0.02 ^k
		UAE	0.290±0.009 ^k	84.87±7.46 ^e	0.595±0.009 ^f	1.87±0.08 ^f
		MAE	1.56±0.05 ^e	47.24±4.15 ^g	0.411±0.006 ^h	1.54±0.06 ^g
Pančevo	H ₂ O	Maceracija	15.04±0.45 ^a	72.63±6.38 ^{ef}	0.209±0.003 ^m	5.23±0.21 ^b
		UAE	2.30±0.07 ^d	35.49±3.12 ^h	1.34±0.02 ^c	7.22±0.29 ^a
		MAE	1.52±0.05 ^e	102.41±9.00 ^d	0.947±0.014 ^d	3.19±0.13 ^d
	MeOH	Maceracija	4.57±0.14 ^b	81.83±7.19 ^e	0.502±0.007 ^g	3.65±0.15 ^c
		UAE	4.28±0.13 ^b	85.86±7.55 ^e	0.619±0.009 ^e	3.54±0.14 ^c
		MAE	2.70±0.08 ^c	75.04±6.60 ^{ef}	0.321±0.005 ^j	2.37±0.10 ^e
Deliblatska peščara	H ₂ O	Maceracija	0.79±0.02 ^f	106.49±9.36 ^{cd}	0.244±0.003 ^l	0.64±0.03 ⁱ
		UAE	0.257±0.008 ^l	103.81±9.13 ^d	0.265±0.004 ^k	0.39±0.02 ^l
		MAE	NP	50.35±4.43 ^g	0.585±0.008 ^f	0.64±0.03 ⁱ
	MeOH	Maceracija	NP	125.26±11.01 ^{bc}	3.15±0.05 ^a	6.77±0.28 ^a
		UAE	0.386±0.01 ⁱ	63.49±5.58 ^f	1.85±0.03 ^b	3.61±0.15 ^c
		MAE	0.415±0.012 ^j	30.67±2.30 ^h	0.581±0.008 ^f	1.078±0.04 ^h

* Vrednosti sa različitim slovima (a-o) u svakoj koloni ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$; $n=3$; analiza varijanse, Dankanov *post hoc* test); Nije pronađeno (NP); Ekstrakcija primenom ultrazvuka (UAE); Ekstrakcija primenom mikrotalasne pećnice (MAE), metil alkohol (MeOH).

U ekstraktima latica stepskog božura izvršena je kvantifikacija četiri komponente (*p*-kumarinska kiselina, elaginska kiselina, kvercetin i isorhamnetin) koje su važne za njihovu biološku aktivnost. Sve ekstrakte karakteriše prisustvo relativno visoke količine elaginske kiseline (30,67–166,33 mg/L) koja može da izazove lizu ćelijskih membrana, omogućavajući antimikrobnu aktivnost ekstrakata [201]. Najveća količina elaginske kiseline je detektovana u vodenim ekstraktima latica prikupljenih na Gulenovcima, koji takođe pokazuju najbolju antibakterijsku aktivnost. Kvercetin, komponenta koja je takođe prisutna u svim ekstraktima, ukoliko je prisutna u većim količinama, umanjuje potencijal ekstrakata da pospeše zarastanje rana i da spreče adheziju i invaziju bakterije *S. lugdunensis* na HaCat ćelije. Isorhamnetin pripada flavonolima, podgrupi flavonoida, a karakteriše ga antiviralna, antikancerogena, antioksidativna, antiinflamatorna i antimikrobna aktivnost [202]. Ovo jedinjenje je u uzorcima prisutno u količinama koje variraju od 0,26 mg/L do 7,22 mg/L; sa povećanjem njegove količine, pospešuje se biološka aktivnost ekstrakata, kao što se može videti kroz rezultate prikazane u ovoj disertaciji. Od svih kvantifikovanih jedinjenja, najmanji je sadržaj *p*-kumarinske kiseline, koju karakteriše antioksidativna, antikancerogena, antimikrobna, antivirusna, antiinflamatorna, antiagregacijska, anksiolitična, antipiretička, analgetička i antiartritisna aktivnosti, kao i blagotvorni efekti na simptome dijabetesa, gojaznosti, hiperlipidemije i gihta [203].

4.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata

Antioksidans je hemijsko jedinjenje koje ima sposobnost odloži ili ograniči oksidaciju lipida ili drugih molekula sprečavanjem nastupanja ili nastavljanja oksidativnih lančanih reakcija, čime se sprečavaju ili popravljaju oštećenja izazvana dejstvom slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost se ostvaruje kroz sledeće mehanizme: smanjenje aktivnosti slobodnih oksidativnih vrsta, uklanjanje slobodnih radikala, kompleksiranje prooksidativnih metala i neutralizacija slobodnog kiseonika [204]. Antioksidativni testovi korišćeni u ovoj disertaciji funkcionišu po principu neutralizacije slobodnih radikala i redukcije jona. Mehanizam delovanja ekstrakata koji pokazuju aktivnost uklanjanja slobodnih radikala, kao što su ABTS^{•±} ili DPPH[•], temelji se na sposobnosti tih ekstrakata da deluju kao donori vodonika. Dalje, ekstrakt sa pozitivnim rezultatom FRAP ili CUPRAC testa funkcioniše kao donor elektrona i prekida lančanu reakciju oksidacije redukovanjem oksidovanih intermedijera u stabilan oblik [204]. Međutim, u zavisnosti od primenjenog testa, hemijska složenost ekstrakata mogla bi da dovede do nedoslednih rezultata, te se preporučuje da se skrining ekstrakata sprovede korišćenjem više različitih antioksidativnih testova [205–207].

Rezultati četiri ispitivanja antioksidativne aktivnosti sprovedena na ekstraktima latica *P. tenuifolia* sakupljenim na različitim lokalitetima u Srbiji primenom četiri testa prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4 Antioksidativna (DPPH, ABTS, CUPRAC i FRAP) aktivnost vodenih i metanolnih ekstrakata latica *Paeonia tenuifolia* L.

Poreklo biljnog materijala	Ekstrakcioni medijum, metoda ekstrakcije	Antioksidativna aktinost			
		DPPH IC ₅₀ [mg/mL]	ABTS IC ₅₀ [mg/mL]	CUPRAC [mol TE/g]	FRAP [μmol Fe ²⁺ /g]
Gulenovci	H ₂ O, maceracija	0.088±0.001 ^c	0.090±0.001 ^b	0.386±0.002 ^a	834.24±6.4 ^e
	H ₂ O, UAE	0.051±0.001 ^a	0.074±0.002 ^a	0.378±0.001 ^b	843.39±5.6 ^e
	H ₂ O, MAE	0.063±0.001 ^b	0.092±0.001 ^b	0.327±0.001 ^f	796.56±10.5 ^c
	MeOH, maceracija	0.123±0.001 ^d	0.099±0.000 ^c	0.345±0.000 ^e	830.22±11.6 ^e
	MeOH, UAE	0.124±0.001 ^d	0.099±0.001 ^c	0.349±0.001 ^d	776.43±9.9 ^d
	MeOH, MAE	0.124±0.002 ^d	0.098±0.001 ^c	0.358±0.002 ^b	840.46±7.0 ^e
Pančevo	H ₂ O, maceracija	0.074±0.002 ^b	0.089±0.001 ^b	0.341±0.001 ^f	715.33±5.8 ^e
	H ₂ O, UAE	0.058±0.001 ^a	0.070±0.002 ^a	0.371±0.001 ^b	832.4±13.9 ^b
	H ₂ O, MAE	0.061±0.001 ^c	0.088±0.002 ^b	0.385±0.002 ^a	751.19±5.4 ^d
	MeOH, maceracija	0.126±0.001 ^d	0.097±0.001 ^c	0.346±0.001 ^e	724.84±10.3 ^e
	MeOH, UAE	0.126±0.001 ^d	0.099±0.000 ^c	0.357±0.001 ^d	777.16±9.8 ^c
	MeOH, MAE	0.125±0.002 ^d	0.099±0.000 ^c	0.367±0.001 ^c	748.99±8.2 ^d

Deliblatska peščara	H ₂ O, maceracija	0.103±0.003 ^c	0.098±0.001 ^c	0.319±0.001 ^e	759.24±2.3 ^e
	H ₂ O, UAE	0.094±0.003 ^b	0.092±0.001 ^b	0.344±0.001 ^c	815.58±1.9 ^b
	H ₂ O, MAE	0.067±0.001 ^a	0.094±0.001 ^{b,a}	0.391±0.000 ^b	791.43±7.8 ^c
	MeOH, maceracija	0.125±0.001 ^d	0.098±0.001 ^c	0.353±0.001 ^f	769.11±10.8 ^e
	MeOH, UAE	0.125±0.001 ^d	0.097±0.001 ^c	0.337±0.001 ^d	559.5±11.3 ^d
	MeOH, MAE	0.125±0.002 ^d	0.097±0.001 ^c	0.358±0.001 ^f	833.88±8.6 ^a

*Vrednosti sa različitim slovima (a-f) u svakoj koloni su pokazale statistički značajne razlike ($p < 0,05$; $n = 3$; analiza varijanse, Dankanov *post hoc* test); Ekstrakcija primenom ultrazvuka (UAE); Ekstrakcija primenom mikrotalasa (MAE), Metil alkohol (MeOH), Troloks ekvivalent (TE); koncentracija ekstrakta potrebna za neutralizaciju 50% DPPH• i ABTS•⁺ radikala (IC₅₀).

Aktivnost uklanjanja slobodnih radikala. Kako DPPH i ABTS testovi pokazuju sposobnost testiranih ekstrakata da uklone slobodne radikale i redukuju ih u neaktivan oblik, dobijeni rezultati se mogu posmatrati istovremeno. U ovoj studiji, kada je voda korišćena kao agens za ekstrakciju, ekstrakti sa najvećom aktivnošću uklanjanja DPPH• radikala (najniži IC₅₀) nisu se značajno razlikovali između regiona iz kojih su sakupljene latice. Pored toga, najjača ABTS• redukciona aktivnost vodenih ekstrakata određena je za ekstrakte koje su dobijeni primenom UAE na sva tri geografska lokaliteta, dok je za Deliblatsku peščaru MAE ekstrakt pokazao istu aktivnost kao UAE. U slučaju metanolnih ekstrakata, aktivnost uklanjanja DPPH bila je najveća za gulenovačke MAE ekstrakte, kao i istu vrstu ekstrakata iz Deliblatske peščare (0,123 i 0,125 mg/mL), dok su za Pančevo najbolju aktivnost imali ekstrakti dobijeni maceracijom (0,125 mg/mL), ali ni jedan od metanolnih ekstrakata, bez obzira na proces ekstrakcije, nije se međusobno razlikovao. Za aktivnost neutralizacije ABTS radikala najefikasniji su bili MAE ekstrakti iz Gulenovaca i Deliblatske peščare (0,098 i 0,097 mg/mL), dok se za ekstrakt iz Pančeva maceracija pokazala kao najefikasnija metoda, iako se vrednost ne razlikuju značajno. Pored toga, kada je metil alkohol korišćen kao rastvarač za ekstrakciju, ekstrakti latica iz Gulenovaca i Deliblatske peščare koji su najefikasniji u redukciji obe vrste slobodnih radikala dobijeni su istom metodom ekstrakcije (macerate latica sa oba lokaliteta za ABTS test i MAE ekstrakti latica za DPPH).

Vodeni ekstrakti latica iz Gulenovaca i Pančeva pokazali su najveću aktivnost u neutralizaciji DPPH• radikala kada je primenjena UAE metoda, a zatim MAE, što proces maceracije čini najmanje efikasnom za ekstrakciju jedinjenja odgovornih za antioksidativnu aktivnost ostvarenu u DPPH testu. Iako je TPC vodenih ekstrakata bio najveći za uzorke dobijene maceracijom, DPPH test je pokazao najnižu aktivnost pomenutih ekstrakata. Prema nekim literaturnim podacima, postojanje korelacije između količine ukupnih fenolnih jedinjenja i sposobnosti neutralizacije DPPH radikala nije slučaj kod svih biljnih ekstrakata [208]. Naime, neka fenolna jedinjenja koja funkcionišu kao antioksidansi i reaguju sa Folin-Čiklteovim reagensom možda neće reagovati sa slobodnim radikalima DPPH. Postojanje veze između najniže vrednosti IC₅₀ (najveći antioksidativni potencijal) u vodenim ekstraktima latica *P. tenuifolia* i najniže vrednosti TPC izmerene u pomenutim ekstraktima, može se objasniti sposobnošću drugih jedinjenja, pored polifenola, iz ekstrakata da smanje količinu DPPH• radikala. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, gde je studija

pokazala da čak u 223 biljna infuza postoji veoma slaba korelacija između antioksidativne aktivnosti i vrednosti TPC [209]. Isti fenomen je takođe primećena u biljnom čaju *Cosmos caudatus* [210]. Stoga, antioksidativnoj aktivnosti biljnog materijala doprinose i druga fitohemijska jedinjenja [211]. Aktivnost uklanjanja DPPH• radikala u etanolnim ekstraktima latica hibrida *P. lactiflora* kretala se od 70 do 79% [176], u metanolnim ekstraktima ljubičastih i žutih latica *P. delavaii* iznosila je 324,24 i 336,08 µg TE/mg [212], dok se u vodenim ekstraktima raznobojnih latica vrste *P. suffruticosa* kretao od 35,47 do 130,78 mg TE/g [177]. Iako se razlika u sposobnosti uklanjanja DPPH• radikala možda može pripisati različitom hemijskom sastavu ekstrakta latica različitih vrsta božura koje su pomenute, nijedan od prikazanih rezultata nije mogao međusobno da se uporedi ili sa odgovarajućima u ovoj disertaciji, zbog razlika u načinu na koji su rezultati predstavljeni.

Antioksidativna aktivnost jedinjenja na slobodne radikale proizvedene smogom, zagađenjem pesticidima, dimom cigareta i hemijskim reagensima može se *in vitro* ispitati njihovom sposobnošću da uklanjaju ABTS slobodne radikale [213]. Pomenuta antioksidativna aktivnost ekstrakata latica ispitivanih u ovoj disertaciji pokazala je značajne varijacije (vrednosti IC₅₀ kretale su se od 0,070 do 0,099 mg/mL). Najviši ABTS antioksidativni kapacitet ekstrakata dobijen kada je korišćena metoda UAE i voda kao rastvarač, što se može objasniti činjenicom da je povećanje temperature verovatno izazvalo povećanu rastvorljivost analita u rastvaraču za ekstrakciju i njihovu bržu difuziju iz čvrste matrice [214,215]. Pored toga, ultrazvučni talasi utiču na ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja smanjenjem pritiska tečnosti, što se dešava kao rezultat ekspanzije. Kada pritisak pređe zateznu čvrstoću tečnosti, formiraju se mehurići pare i implozivno pucaju usled kavitacije, koju izazivaju jaka ultrazvučna polja [216]. Mikroporozne čestice biomase su poremećene makroturbulencijom, velikim sudarima među česticama i makroturbulencijom usled pucanja kavitacionih mehurića. U interakcijama između tečnosti i čvrstog materija, kavitacija uzrokuje da se struja tečnosti koja se brzo kreće pojavi na površini [217]. Udar ovih mikromlaznica dovodi do površinskog ljuštenja, erozije i razlaganja čestica, što olakšava oslobađanje bioaktivnih sastojaka iz biološke matrice. Ovaj uticaj povećava efikasnost ekstrakcije antioksidativnih komponenata povećanjem prenosa mase preko mehanizama vrtložne i unutrašnje difuzije [218,219]. Sve ovo je moglo doprineti povećanju aktivnosti uklanjanja ABTS•⁺ radikala. Sa druge strane, rezultati ovog istraživanja su pokazali da su za lokalitete Deliblatske peščare i Gulenovaca najniže vrednosti IC₅₀ bile za ekstrakte dobijene MAE sa metil alkoholom kao rastvaračem. Studija Mohapatre i sar. [220] je pokazala da su fenolna jedinjenja primarni antioksidansi u biljnim ekstraktima. Oni mogu funkcionisati kao antioksidansi na različite načine, imajući ulogu hvatača radikala, redukcionih agenasa, donora vodonika i helatora metala [221]. Prisustvo nekih nefenolnih jedinjenja, kao što su askorbati, karotenoidi i terpeni, koji takođe mogu doprineti ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti, može objasniti zašto je u nekim slučajevima sposobnosti uklanjanja ABTS•⁺ radikala veća kada je TPC niži [222]. Pošto su laticе ugroženih zeljastih božura nedovoljno istražene, postoji vrlo malo studija koje su ispitivale njihov antioksidativni kapacitet na osnovu aktivnosti uklanjanja slobodnih ABTS•⁺ radikala. Prema literaturi, aktivnost uklanjanja ABTS•⁺ kod latica vrste *P. lactiflora*

iznosila je 30,14 μmol Troloksa/g [222], dok su se u etanolnom ekstraktu latica hibrida *P. lactiflora* vrednosti neutralizacije kretale od 75 do 83% [176].

Antioksidativna aktivnost redukcije jona. Test redukujućeg potencijala se obično koristi za procenu sposobnosti antioksidansa da donira elektron, što je ključni mehanizam antioksidativnog delovanja polifenola. Dobijene vrednosti u CUPRAC testu značajno su se razlikovale kada su korišćene latice iz različitih geografskih oblasti i različite tehnike ekstrakcije. Uzorci vodenih ekstrakata koji su pokazali najveće CUPRAC redukcione vrednosti su MAE ekstrakti latica iz Pančeva i Deliblatske pešćare (0,385 i 0,391 mol TE/g) i macerat latica iz Gulenovca (0,386 mol TE/g). Kada je kao rastvarač korišćen metanol, metoda MAE je najefikasnija za latice sva tri porekla; CUPRAC vrednosti za MAE ekstrakte latica Gulenovaca, Pančeva i Deliblatske pešćare su bile 0,358, 0,367 i 0,354 mol TE/g. Rezultati FRAP testa za vodene ekstrakte pokazali su da je UAE metoda dala najbolje rezultate za latice sa sva tri lokaliteta (843,4, 832,4 i 815,6 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, za Gulenovce, Pančevo i Deliblatsku pešćaru). Kada je kao rastvarač korišćen metanol, najefikasniji su bili MAE ekstrakti latica Gulenovaca i Deliblatske pešćare (840,46 i 833,88 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$,) i ekstrakt UAE iz Pančeva (777,16 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), koji su se značajno razlikovali.

Rezultati CUPRAC testa varirali su u širokom opsegu, te se takav fenomen može objasniti oslobađanjem različitih hemijskih jedinjenja koja su prisutna u laticama, a koja su odgovorna za sposobnost ekstrakata da redukuju jone bakra. Epikatehin galat, epigalokatehin galat, kvercetin, fisetin, katehin, kafeinska kiselina, epikatehin, galna kiselina, rutin i hlorogenska kiselina su jedinjenja za koja je ranije pokazano da poseduju najveći kapacitet redukcije jona bakra, zbog položaja i broja hidroksilnih grupa u molekulu, kao i stepena konjugacije unutar celog molekula, koji olakšava transport elektrona [223]. Odstupanje koje je nastalo kod vodenog ekstrakta latica iz Gulenovaca, gde najveći antioksidativni kapacitet nije bio povezan sa najvišim TFC vrednostima, može se objasniti činjenicom da određena fenolna jedinjenja ne reaguju sa Al^{3+} prisutnim u AlCl_3 soli koja se koristi u TFC testu i stoga se ne može kvantifikovati ovom kolorimetrijskom analizom [224]. U osnovi, flavoni i flavonoli reaguju sa Al(III), dok flavanoni i flavanonoli ne stvaraju komplekse u istom stepenu. Neki flavoni i flavonoli koji reaguju sa Al(III) su kvercetin, miricetin, morin i rutin [224]. Vrednost rezultata CUPRAC testa su veće za vodene nego za metanolne ekstrakte, što se može pripisati razlici u rastvorljivosti određenih hemijskih jedinjenja u ovim rastvaračima [225]. Različita jedinjenja, uključujući polifenole, tiole, *D*-askorbinsku kiselinu, manitol, glukozu i druge, mogu takođe da redukuju jone bakra [161]. Pored toga, specifični faktori životne sredine, kao što su klima, lokalitet i temperatura, mogu značajno uticati na akumulaciju jedinjenja koja nose antioksidativni potencijal u različitim biljnim organima [226], čime se objašnjava razlika u antioksidativnom kapacitetu između uzoraka iste biljne vrste prikupljenih na različitim geografskim lokacijama. Detaljnim pregledom literature utvrđeno je da CUPRAC metoda nikada nije korišćena za merenje antioksidativne aktivnosti latica bilo koje vrste božura.

Važna karakteristika FRAP metode je da procenjuje antioksidativni kapacitet samo hidrofилnih komponenata ekstrakata i nije pouzdana za komponente koje su rastvorljivije u

organskim rastvaračima, kao što su alkoholi [227]. Time se objašnjava najviša FRAP vrednost uočena u vodenim UAE ekstraktima latica sakupljenih u Gulenovcima. Odstupanja u FRAP vrednostima metanolnih ekstrakata iz Gulenovaca i Pančeva, gde je MAE ekstrakt bio efikasniji u antioksidativnom delovanju od ekstrakta UAE, mogu se objasniti činjenicom da je povećanje temperature verovatno unapredilo efikasnost MAE. Naime, povećanje temperature uzrokuje povećanu brzinu difuzije i poboljšanu rastvorljivost jedinjenja u rastvaračima.

U najvećem broju *P. tenuifolia* ekstrakata kada je voda korišćena kao sredstvo za ekstrakciju, UAE se pokazao kao najbolji metod, jer je davao povoljnije rezultate za većinu antioksidativnih aktivnosti, dok je u većini slučajeva kada se koristio metil alkohol kao sredstvo za ekstrakciju, MAE se pokazao kao najpogodniji metod ekstrakcije.

4.5. Antimikrobna i antibiofilm aktivnost ekstrakata

Rezultati antibakterijske efikasnosti vodenih i metanolnih ekstrakata latica *P. tenuifolia*, sakupljenih iz različitih regiona Srbije i testiranih na bakterije *S. lugdunensis*, *S. aureus* i *P. vulgaris*, prikazani su u tabeli 5.

Tabela 5 Antibakterijska aktivnost vodenih i metanolnih ekstrakata latica *Paeonia tenuifolia* L. (MIK and MBK, mg/mL).

Poreklo biljnog materijala	Ekstrakcioni medijum, metoda ekstrakcije	Bakterija					
		<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Proteus vulgaris</i>	
		MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
Gulenovci	H ₂ O, maceracija	0.125	0.25	0.5	1	0.5	1
	H ₂ O, UAE	0.5	1	2	4	2	4
	H ₂ O, MAE	0.5	1	2	4	0.125	0.25
	MeOH, maceracija	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5
	MeOH, UAE	0.25	0.5	0.5	1	0.25	0.5
	MeOH, MAE	0.5	1	1	2	0.5	1
Pančevo	H ₂ O, maceracija	0.5	1	4	8	2	4
	H ₂ O, UAE	1	2	0.25	0.5	2	4
	H ₂ O, MAE	0.5	1	2	4	1	2
	MeOH, maceracija	0.5	1	1	2	1	2
	MeOH, UAE	0.5	1	0.5	1	0.5	1
	MeOH, MAE	0.5	1	1	2	0.5	1
Deliblatska peščara	H ₂ O, maceracija	0.5	1	2	4	2	4

	H ₂ O, UAE	0,5	1	1	2	1	2
	H ₂ O, MAE	0,5	1	2	4	2	4
	MeOH, maceracija	1	2	2	4	1	2
	MeOH, UAE	1	2	0,5	1	0,5	1
	MeOH, MAE	0,5	1	0,5	1	0,5	1
Kontrola	Gentamicin	0.008	0.016	1.33	2.66	0.066	0.133

*Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK); Minimalna baktericidna koncentracija (MBK), Ekstrakcija primenom ultrazvuka (UAE); Ekstrakcija primenom mikrotalasa (MAE), metil alkohol (MeOH).

Ekstrakti latica *P. tenuifolia* iz Gulenovaca pokazali su najbolju antibakterijsku aktivnost, pri čemu su bili najefikasniji protiv *S. lugdunensis* (MIK 0,125–1 mg/mL). Najveću otpornost na uticaj ekstrakata latica sa ovog lokaliteta pokazala je bakterija *S. aureus* (MIK 0,25–2 mg/mL). S druge strane, ekstrakti latica iz Pančeva i Deliblatske peščare pokazali su sličnu aktivnost prema sve tri bakterije, pri čemu su vrednosti MIK obe grupe ekstrakata protiv *S. lugdunensis* varirale od 0,5-1 mg/mL, te su bile najaktivnije u inhibiciji rasta pomenutog soja. Takođe, metanolni ekstrakti latica sa sva tri lokaliteta pokazali su bolju aktivnost protiv *S. aureus* (MIK 0,25–1 mg/mL) u odnosu na pozitivnu kontrolu, antibiotik gentamicin (MIK 1,33 mg/mL).

Prema Riosu i Reciju [228], fenoli su jedinjenja biljnog porekla koja su primarno povezana sa antimikrobnom aktivnošću ekstrakata. Njihova antimikrobna aktivnost se pripisuje postojanju hidroksilnih grupa u benzenovom prstenu fenolnih kiselina, te zavisi od njihovog položaja i broja. Kako se broj -OH grupa povećava, tako se povećava i antimikrobna aktivnost, koja se može izraziti kao najmanja inhibitorna i baktericidna koncentracija [58]. U ovoj disertaciji su ispitani vodeni i metanolni ekstrakti latica *P. tenuifolia* kao potencijalni izvor antimikrobnih agenasa namenjenih za upotrebu u terapijskom tretmanu bolesti ljudske kože. Ekstrakti latica iz Gulenovaca imali su najveću antibakterijsku aktivnost protiv *S. lugdunensis*, zatim *S. aureus*, a naposljetku *P. vulgaris* (tabela 5), kojima je bila potrebna veća koncentracija ekstrakta za inhibiciju rasta bakterija. Ekstrakti latica iz Pančeva i Deliblatske peščare pokazali su manju sposobnost inhibicije rasta bakterija u odnosu na gorepomenute, a bili su najefikasniji protiv *S. lugdunensis*. Antibakterijska aktivnost taksona *Paeonia* je ranije istraživana. Metanolni UAE ekstrakti plodova drvenastog božura *P. rockii*, koji su takođe bogati galnom kiselinom, pokazali su zadovoljavajuću aktivnost protiv *S. aureus* i *P. vulgaris* (test je rađen metodom difuzije diska, a rezultati su varirali između 6 i 14 mm) [182], što je u skladu sa dobijenim rezultatima u ovoj tezi. Suprotno nalazima u ovoj disertaciji, u istoj studiji [182], metanolni ekstrakti su imali veći kapacitet da spreče rast bakterija *P. vulgaris* i *S. aureus*, što se može pripisati razlici u hemijskom sastavu između proučavanih vrsta božura. Vrednosti MIK i MBK za ekstrakte latica u ovoj disertaciji bile su mnogo veće od vrednosti dobijenih za pozitivnu kontrolu (antibiotik). Dobijeni rezultati ne iznenađuju s obzirom da je dobro poznato da su ekstrakti složene mešavine mnogih jedinjenja koja mogu imati i sinregistično dejstvo. Dodatno, koncentracija svakog aktivnog jedinjenja je verovatno mnogo niža nego u slučaju antibiotika, što može sprečiti pojavu

neželjenih reakcija pri primeni ekstrakata. Naime, kako gentamicin namenjen za lokalnu upotrebu može negativno da utiče na osteogenezu [229] i da izazove nefrotoksičnost [229], čini se da prirodni preparati imaju potencijal u budućnosti zahvaljujući manjoj incidenci neželjenih efekata, kao i mogućem sinergizmu više aktivnih komponenata čime se smanjuje verovatnoća nastanka rezistencije.

Antifungalna aktivnost ekstrakta je testirana na tri medicinski važne vrste roda *Candida* (tabela 6). Efikasnost svakog ekstrakta je poređena sa ketonazolom, standardnim antifungalnim agensom. Svi ekstrakti latica *P. tenuifolia* korišćeni u studiji imali su različite stepene antifungalne aktivnosti na sojeve *Candida*. Međutim, najznačajniji antifungalni efekat postignut je prema *C. kefyr*, važnom gljivičnom patogenu sposobnom da izazove invazivnu kandidijazu kod imunokompromitovanih pacijenata, posebno onih sa onkohematološkim oboljenjima. MIK vrednosti ekstrakata u slučaju *C. kefyr* kretale su se u rasponu od 0,5–1 mg/mL, dok su se vrednosti MFK kretale 1–2 mg/mL. *C. krusei* je bio najotporniji, sa MIK vrednošću od 2 mg/mL i MFK vrednošću od 4 mg/mL. Otpornost *Candida* prema dejstvu ekstrakata opadala je sledećim redosledom: *C. kefyr* > *C. albicans* > *C. krusei*. Antifungalna aktivnost svih ekstrakata bila je najviša prema *C. kefyr*.

Tabela 6 Antikandidalna aktivnost vodenih i metanolnih ekstrakata *Paeonia tenuifolia* L. (MIK i MFK, mg/mL).

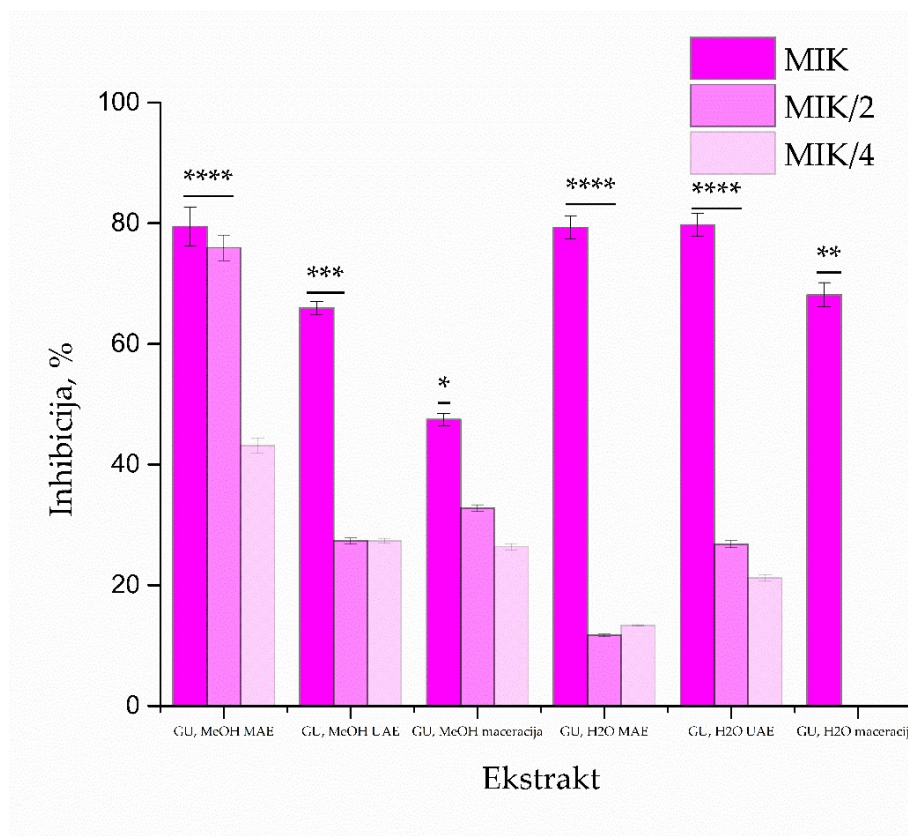
Poreklo biljnog materijala	Ekstrakcioni medijum, metoda ekstrakcije	Vrsta <i>Candida</i>					
		<i>Candida kefyr</i>		<i>Candida krusei</i>		<i>Candida albicans</i>	
		MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK
Gulenovci	H ₂ O, maceracija	1	2	0.5	1	1	2
	H ₂ O, UAE	0.5	1	2	4	1	2
	H ₂ O, MAE	0.5	1	1	2	1	2
	MeOH, maceracija	1	2	0.5	1	1	2
	MeOH, UAE	0.5	1	1	2	1	2
	MeOH, MAE	0.5	1	1	2	0.5	1
Pančevo	H ₂ O, maceracija	0.5	1	2	4	1	2
	H ₂ O, UAE	1	2	2	4	1	2
	H ₂ O, MAE	0.5	1	1	2	1	2
	MeOH, maceracija	0.5	1	1	2	0.5	1
	MeOH, UAE	0.5	1	1	2	1	2
	MeOH, MAE	1	2	1	2	0.5	1
Deliblatska peščara	H ₂ O, maceracija	0.5	1	2	4	1	2
	H ₂ O, UAE	1	2	1	2	1	2
	H ₂ O, MAE	0.5	1	2	4	1	2

	MeOH, maceracija	1	2	0.5	1	1	2
	MeOH, UAE	1	2	1	2	1	2
	MeOH, MAE	0.5	1	1	2	0.5	1
Kontrola	Ketokonazol	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1

*Ekstrakcija primenom ultrazvuka (UAE); Ekstrakcija primenom mikrotalasa (MAE), metil alkohol (MeOH); Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK); Minimalna fungicidna koncentracija (MFK).

Patogeni gljivica nisu izuzetak u doba povećane rezistencije na postojeće antimikrobne agense, zbog čega su brojne studije istraživale efikasnost antigljivičnih biljnih jedinjenja [230]. U ovom istraživanju razmatrana je upotreba prirodnih jedinjenja prisutnih u vodenim i metanolnim ekstraktima latica stepskog božura efikasnih protiv gljivičnih infekcija uzrokovanih najčešćim ljudskim gljivičnim patogenima, *C. albicans*, *C. kefyr* i *C. krusei*. Biljne komponente za koje je dokazano da pokazuju antifungalno dejstvo su razna fenolna jedinjenja, uključujući galnu kiselinu, timol, flavonoide, posebno katehin, tanine, kao i terpenoide i saponine. S obzirom da svi ekstrakti latica sadrže galnu kiselinu, ostvarili su zadovoljavajuću antifungalnu aktivnost; ekstrakti su bili najefikasniji u inhibiciji *C. kefyr*, zatim *C. albicans*, a najmanje efikasni u suzbijanju *C. krusei*. Slično antibakterijskoj aktivnosti, latice sakupljene u Gulenovcima pokazale su najviši antifungalni kapacitet, jer su imale najniže vrednosti MIK i MFK za sve ispitivane mikrogljive. Ovo se može pripisati razlici u hemijskom sastavu između ekstrakata, jer su svi vodeni ekstrakti latica iz Gulenovaca imali najveći sadržaj elaginske kiseline, dok je kod metanolnih ekstrakata količina ovog jedinjenja bila primetno manja. Elaginska kiselina pripada fenolnim kiselinama, za koje je utvrđeno da su slabe kiseline sa sposobnošću da liziraju ćelijsku membranu, pokazujući tako antifungalnu aktivnost [201]. I ranije su ispitani efekti nekih ekstrakata iz taksona *Paeonia* na različite gljivične patogene. Picerno i sar. [231] su pokazali da ekstrakti korena vrste *P. rockii* veoma efikasni protiv *C. albicans* ($MIK_{50}=30 \mu\text{g/ml}$), i za 88% efikasniji od ekstrakta latica iz Gulenovaca dobijenih u ovom istraživanju. S druge strane, Yuan i sar. [232] su ispitivali efekte ekstrakata korena sedam populacija zeljaste *P. veitchii* na *C. albicans*, a rezultati su bili slični rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji (MIK 0,25–1 mg/mL); najdominantniji sastojci ekstrakta korena, kao što su galna, elaginska i ferulanska kiselina, takođe su primećeni u svim ekstraktima latica koji su ispitivani u ovom istraživanju.

S obzirom da su ekstrakti latica iz Gulenovaca pokazali najbolju inhibitornu aktivnost prema *S. lugdunensis*, izabrani su za dalje ispitivanje njihove antibiofilm aktivnosti, a rezultati su prikazani na slici 14. Metanolni ekstrakt latica iz Gulenovaca, koji je dobijen MAE metodom pokazao je inhibiciju formiranja biofilma za 79% pri vrednosti MIK, za 76% pri $\frac{1}{2}$ MIK vrednosti i 43% pri $\frac{1}{4}$ MIK vrednosti. Za vodene ekstrakte, uzorak dobijen metodom UAE pokazao je najveću sposobnost da inhibira formiranje biofilma kod *S. lugdunensis*, sa 80% inhibicije pri MIK vrednosti.

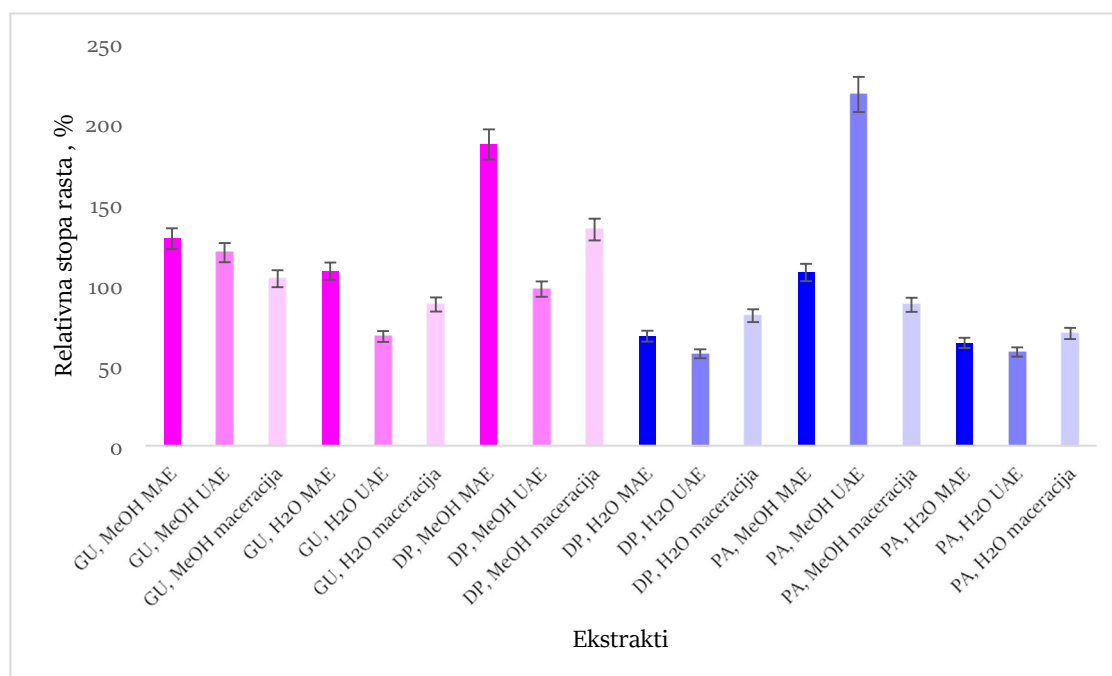


Slika 14 Formiranje biofilma *Staphylococcus lugdunensis* (Ibis 2996) nakon tretmana ekstraktima *Paeonia tenuifolia* L. *Zvezdice predstavljaju statističku značajnost: * $p \leq 0,05$; **, ***, $p \leq 0,001$, ****, $p \leq 0,0001$. Gulenovci (GU); Ekstrakcija primenom ultrazvuka (UAE); Ekstrakcija primenom mikrotalasa (MAE), metil alkohol (MeOH)

Ekstrakti biljaka sa visokim sadržajem polifenola pokazuju antimikrobnu aktivnost, kao i sposobnost suzbijanja formiranja biofilma i adhezije *S. lugdunensis* i drugih bakterijskih vrsta na veštačkim površinama i epitelnim ćelijama [233]. Rezultati ovog istraživanja (tabele 5 i 6) su pokazali da su ekstrakti latica iz Gulenovaca imali najvišu aktivnost protiv svih ispitivanih patogena i bili najefikasniji u inhibiciji rasta *S. lugdunensis*, te su korišćeni za dalje ispitivanje efekta na formiranje biofilma (slika 14). Među metanolnim ekstraktima, uzorak dobijen primenom MAE pokazao je najbolji potencijal u inhibiciji formiranja biofilma, te je kapacitet za 17% bio veći od ekstrakta UAE i 37,5% veći od ekstrakta dobijenog maceracijom. Među vodenim ekstraktima, uzorak koji je dobijen pomoću UAE pokazao je najbolju antibiofilm aktivnost i bio je skoro identičan aktivnosti MAE i za 15% imao veću aktivnost od ekstrakta dobijenog metodom maceracije. Imajući u vidu da su ekstrakti sa najboljom aktivnošću, odnosno metanolni MAE i vodeni UAE, pokazali gotovo identičnu supresiju formiranja biofilma *S. lugdunensis*, oba rastvarača bi se podjednako uspešno mogla koristiti za ekstrakciju bioaktivnih sastojaka iz latica uskolisnog božura, odgovornih za ovu vrstu aktivnosti. Kako su količine kvantifikovanih jedinjenja značajno varirale između dva ekstrakta koji su pokazali najveću inhibiciju formiranja biofilma, moguće je da su određena jedinjenja koja nisu kvantifikovana doprinela ovoj vrsti aktivnosti.

4.6. Citotoksičnost ekstrakata

Na brzinu rasta HaCaT ćelijske linije nisu negativno uticali ekstrakti latica. Rezultati su pokazali da nijedan od ekstrakata nije imao citotoksično dejstvo, u ispitanim koncentracijama jer su njihove vrednosti IC_{50} bile veće od 400 μ g/mL.



Slika 15 Relativna stopa rasta HaCaT ćelija pod dejstvom ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L.. *Gulenovci (GU); Pančevo (PA); Deliblatska peščara (DP), Ekstrakcija primenom ultrazvuka (UAE); Ekstrakcija primenom mikrotalasa (MAE), metil alkohol (MeOH)

Uticaj bilo kog biljnog ekstrakta na metabolizam i vijabilnost ćelije je ključan za određivanje bezbednosti i toksičnosti ekstrakta. Kako je fokus ovog istraživanja bila procena citotoksičnih svojstava ekstrakta latica na keratinocite (preovlađujući tip ćelija u površinskom sloju kože zvanom epidermis), dobijeni rezultati bi se mogli smatrati obećavajućim jer su prvenstveno pokazali odsustvo citotoksičnosti. Osim toga, iako su svi testirani uzorci pokazali sličan uticaj na održivost HaCaT ćelija, neki su dodatno pokazali sposobnost podsticanja rasta ćelija, dok su drugi smanjili njihovu vitalnost (slika 15). Pozitivan ili negativan efekat ekstrakta latica na proliferaciju ćelija može biti povezan sa visokim koncentracijama pojedinačnih fenolnih i flavonoidnih jedinjenja [232].

4.7. Dejstvo ekstrakata latica stepskog božura na *in vitro* migraciju HaCaT ćelija

U cilju ispitivanja potencijalnih efekata ekstrakata latica stepskog božura na pospešivanje procesa zarastanja rana, odabrani ekstrakti ispitani su primenom *in vitro* metode migracije HaCaT ćelija. Na osnovu rezultata za proliferaciju keratinocita pod uticajem ekstrakta latica (slika 15), u *in vitro* test simulacije zarastanja rana (migracija HaCaT ćelija) uključeni su samo uzorci koji su pokazali veću stopu rasta ćelija u odnosu na kontrolu. U tabeli 7 prikazani

su efekti ekstrakata na *in vitro* migraciju keratinocita u poređenju sa kontrolom (monosloj keratinocita koji je oštećen, a nije tretiran ekstraktom).

Tabela 7 Efekti ekstrakata *Paeonia tenuifolia* L. na kapacitet migracije HaCaT ćelija (*in vitro* simulacija zarastanja rana).

Poreklo biljnog materijala	Ekstrakcioni medijum	Metoda ekstrakcije	Zarastanje rana (%)
	H ₂ O	MAE	26.14 ± 0.04
Gulenovci	MeOH	Maceracija	5.38 ± 1.2
		UAE	8.04 ± 0.11
		MAE	0.08 ± 0.7
Pančevo	MeOH	UAE	NA
		MAE	5.56 ± 0.09
Deliblatska peščara	MeOH	Maceracija	19.19 ± 1.3
		MAE	NA
Kontrola			0.08 ± 0.12

*Bez aktivnosti (NA), ekstrakcija primenom ultrazvuka (UAE); Ekstrakcija primenom mikrotalasa (MAE), metil alkohol (MeOH).

Primena vodenog MAE ekstrakta latica *P. tenuifolia* iz Gulenovaca na sloj HaCaT ćelija sa mehaničkim oštećenjem rezultirala je приметnim poboljšanjem zatvaranja rane *in vitro*, tj. intenzivnijom migracijom keratinocita (26,14%) u odnosu na kontrolu. U slučaju metanolnih ekstrakata, najbolji se pokazao uzorak dobijen maceracijom latica Deliblatske peščare (za 19,9%), ali manje efikasan u odnosu na vodeni ekstrakt. Kada su u pitanju preostali ekstrakti (tabela 7), UAE metanolni ekstrakt latica iz Gulenovaca pokazao je izvesnu efikasnost u poređenju sa kontrolom i bio je efikasniji od MAE metanolnih ekstrakata iz Pančeva i macerata latica iz Gulenovaca, čiji su uticaji na migraciju ćelija bili slični.

Zahvaljujući niskim troškovima razvoja i manjoj incidenci neželjenih efekata, prednosti biljaka i njihovih ekstrakata za upotrebu u proizvodima za brže zarastanje rana i oštećenjakože su intenzivno proučavane, u cilju proizvodnje agenasa koji stimulišu zarastanje rana [234,235]. U ovom istraživanju, samo ekstrakti koji su pokazali pozitivan efekat na rast ćelija (slika 15) su dalje podvrgnuti *in vitro* testu simulacije zarastanja rana. Mogući mehanizam pomoću kojeg ekstrakti pomažu zarastanje rana uključuje održavanje rane vlažnom uz istovremeno pospešivanje migracije epitelnih ćelija, ubrzanje sazrevanja kolagena i smanjenje inflamacije [236,237]. Nakon toga, uočava se povećanje količine kolagena, hijaluronske kiseline i dermatan sulfata u granulacionom tkivu rane koja zarasta, kao i povećanje snabdevanja krvlju kao rezultat poboljšane oksigenacije [236].

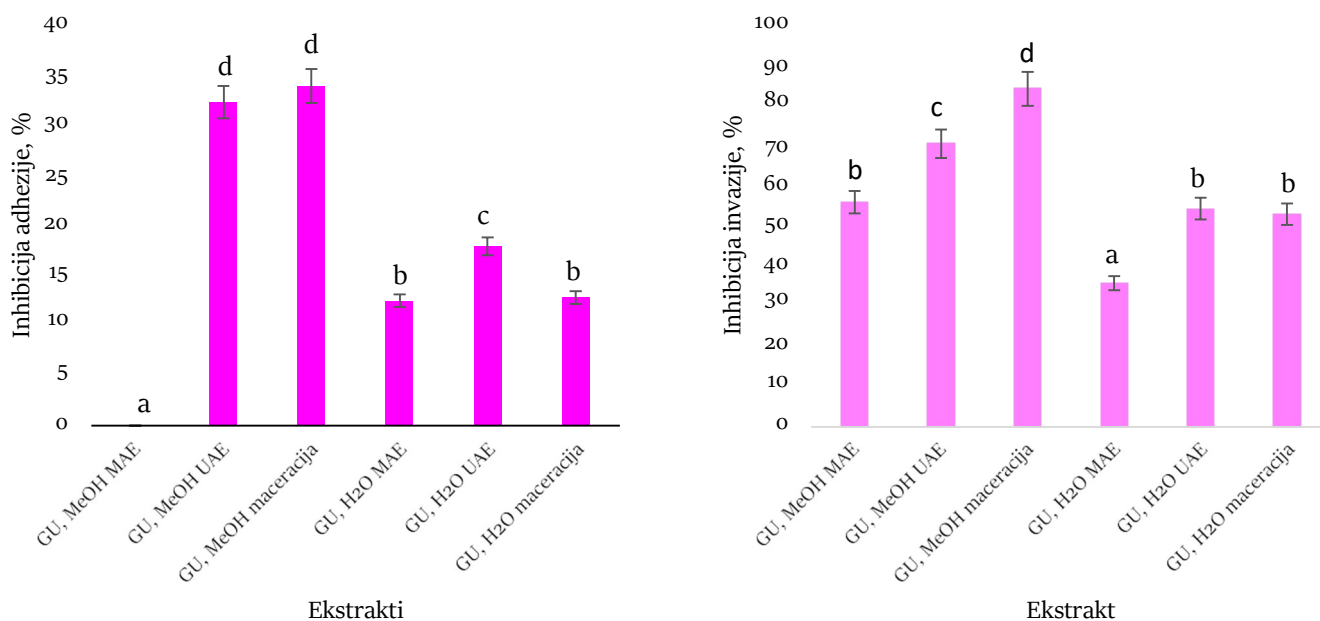
Rezultati predstavljeni u tabeli 7, potvrdili su da ekstrakti latica uskolisnog božura mogu stimulisati rast i migraciju keratinocita; najefikasniji je bio vodeni ekstrakt latica iz Gulenovaca dobijen MAE metodom, a zatim ekstrakt latica Deliblatske peščare dobijen metodom maceracije. Nešto manje efikasan bio je UAE metanolni ekstrakt latica iz Gulenovaca (8,04% efikasniji u odnosu na kontrolu), zatim metanolni ekstrakti latica iz

Pančeva (MAE) i Gulenovaca (maceracija), koji su imali sličan uticaj na migraciju ćelija (5,56% i 5,38%).

Detaljno je proučeno da su migracija i proliferacija keratinocita neophodni za reepitelizaciju oštećene kože [238], što je ključni korak za obnavljanje novog sloja epiderma u cilju lečenja povređene kože [239]. Vodeni MAE ekstrakt latica imao je najbolju aktivnost u pospešivanju zarastanja rana sa najmanjim sadržajem kvercetina i izorhamnetina (0,159 mg/L, odnosno 0,26 mg/L), dok *p*-kumarinska kiselina u njemu nije otkrivena. Ostali ekstrakti sa potencijalom zarastanja rana su imali različite koncentracije kvantifikovanih komponenti (*p*-kumarinska kiselina, elaginska kiselina, kvercetin i izorhamnetin), što je dovelo do razlike u njihovim aktivnostima. Stoga, ovi rezultati pokazuju da laticice *P. tenuifolia* mogu ubrzati zarastanje rana na koži.

4.8. Efekti uzoraka na adheziju i invaziju *Staphylococcus lugdunensis* prema HaCaT ćelijama

Ekstrakti latica sakupljenih u Gulenovcima odabrani su za dalje proučavanje bioloških efekata na *S. lugdunensis* jer su se pokazali kao najefikasniji u inhibiciji njenog rasta (tabela 5). Efekti šest ekstrakata iz latica koji potiču sa ovog lokaliteta su ispitani u smislu njihove sposobnosti da inhibiraju adheziju i invaziju *S. lugdunensis* na HaCaT ćelije. Rezultati su pokazali da su i invazija i adhezija značajno smanjene u prisustvu ekstrakata, osim u slučaju metanolnog MAE ekstrakta, koji nije pokazao inhibitorni efekat na adheziju bakterije na keratinocitima (slika 16). Vodeni ekstrakti su pokazali manju inhibiciju bakterijske adhezije (20%), dok su macerat i UAE metanolni ekstrakti bili efikasniji, sa 33% i 32%. Inhibitorni efekat metanolnih ekstrakata na invaziju *S. lugdunensis* bio je veći; više od 50% inhibicije je postignuto MAE ekstraktom, imajući postepeni porast, do dostizanja najveća vrednosti za metanolni ekstrakt latica dobijen maceracijom (83,7%).



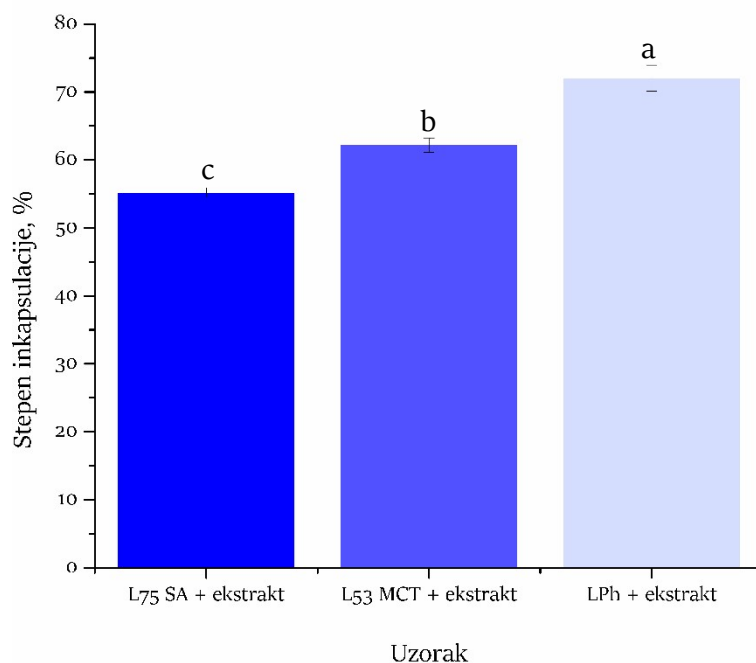
Slika 16 Uticaj odabranih ekstrakata latica *Paeonia tenuifolia* L. na kapacitete adhezije (levo) i invazije (desno) *Staphylococcus lugdunensis* na HaCaT ćelijama. *Prikazani kao procenat inhibicije adhezije i invazije u poređenju sa kontrolom. fali stubic za prvi grafik kod slova a, napisati i koja je statistika

Bakterije su sposobne da infiltriraju i kolonizuju površine ćelija i tkiva domaćina, uprkos postojanju širokog spektra mehanizama otpornosti ćelija ili tkiva. Ovo istraživanje je obuhvatalo i ispitivanje antibakterijske aktivnosti vodenih i metanolnih ekstrakata *P. tenuifolia* protiv *S. lugdunensis* u inficiranoj HaCaT ćelijskoj liniji. Aktivnost bakterijske invazije u HaCaT ćelijama je procenjena korišćenjem subtoksičnih i minimalnih inhibitornih koncentracija ekstrakta. Kao rezultat, sposobnost inhibicije adhezije i invazije *S. lugdunensis* na HaCaT ćelije je testirana pri koncentraciji od 0,125 mg/mL (slika 16). Najviša inhibitorna aktivnost ekstrakata može biti povezana sa prisustvom najnižeg sadržaja kvercetina i izorhamnetina među svim ispitivanim ekstraktima, što može dovesti do ove vrste biološkog potencijala. Zbog obećavajućih rezultata, ispitivani ekstrakti su mogući kandidati za stvaranje inovativnih topikalnih formulacija za lečenje kožnih infekcija.

4.9. Lipozomi sa inkapsuliranim ekstraktom – fizičko-hemijske karakteristike, stabilnost i biološki potencijal

4.9.1. Stepen inkapsulacije polifenola latica *Paeonia tenuifolia* L. u lipozome

Budući da je stepen inkapsulacije jedan od najznačajnijih parametara vezanih za pomenuti proces [240], efikasnost inkapsulacije polifenola latica *P. tenuifolia* unutar lipozoma je određena i rezultati su prikazani na slici 17. Efikasnost inkapsulacije je određena odmah nakon pripreme lipozoma.



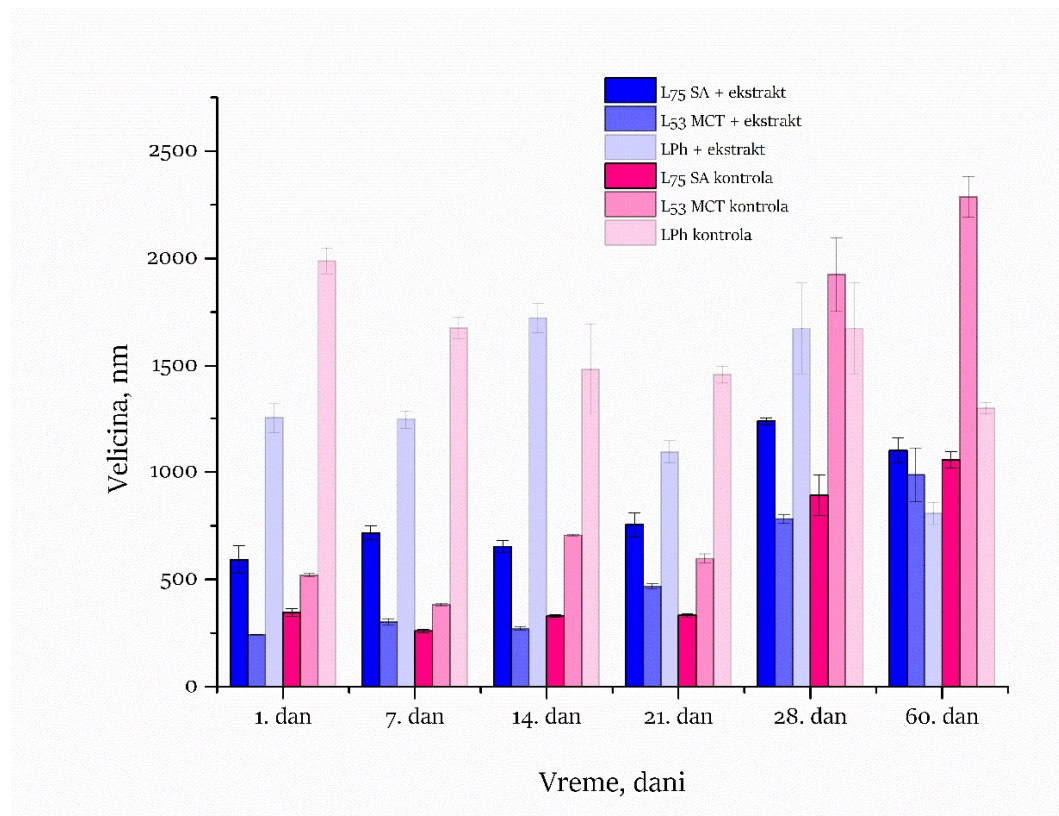
Slika 17 Efikasnost inkapsulacije ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L. u lipozome dobijene primenom različitih fosfolipida. *Vrednosti sa različitim slovima (a-c) su pokazale statistički značajne razlike ($p < 0,05$; $n=3$; analiza varijanse, Dankanov post hoc test)

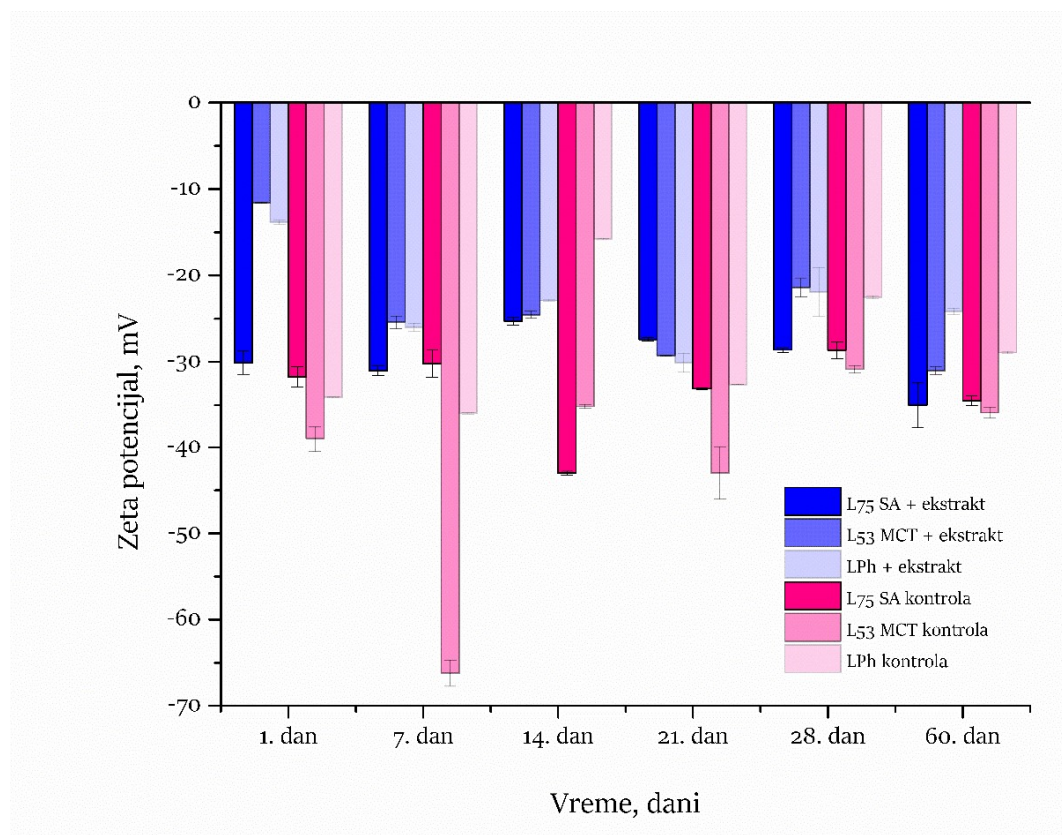
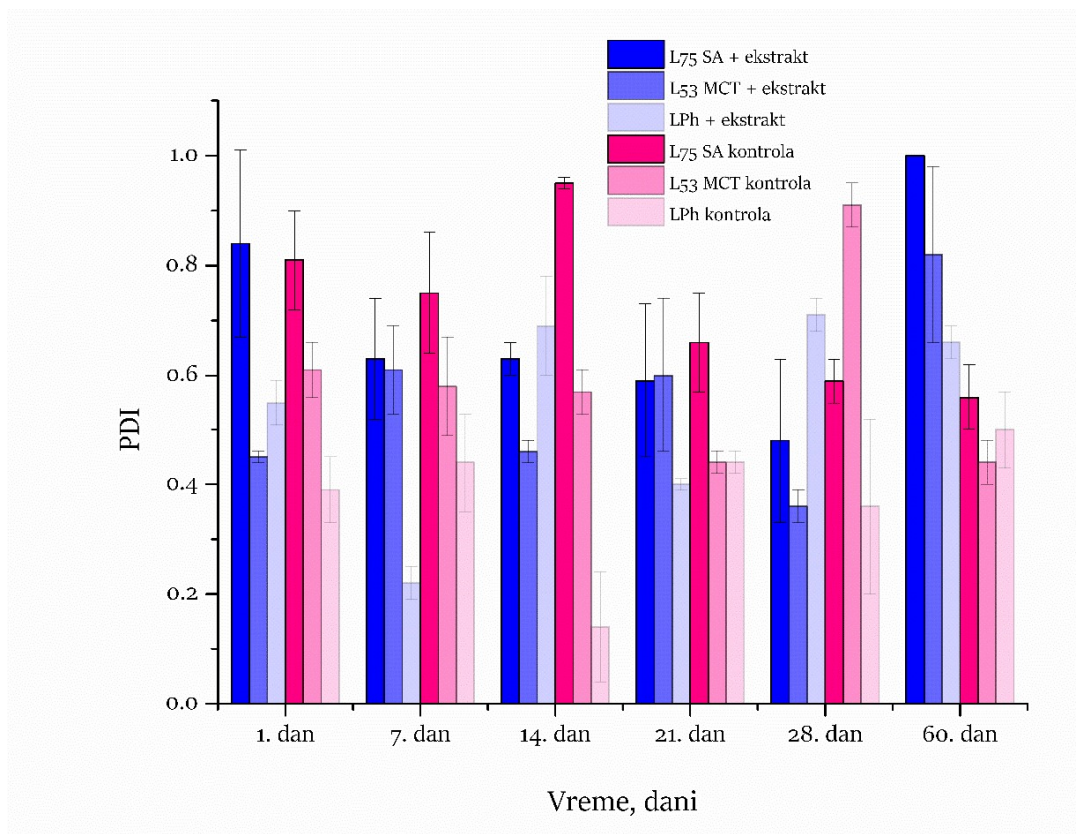
Efikasnost inkapsulacije ekstrakata *P. tenuifolia* u tri različita tipa lipozoma bila je $55,20 \pm 0,70\%$ za SA 75, a zatim MCT 53 sa $62,26 \pm 1,10\%$, što čini Ph lipozome najefikasnijim za inkapsulaciju bioaktivnih jedinjenja latica *P. tenuifolia*, sa stepenom efikasnosti od $72,04 \pm 1,9\%$.

Prema literaturi, hidrofobne i hidrofilne bioaktivne supstance mogu biti inkapsulirane u lipidne vezikule sa efikasnošću inkapsulacije od 80 do 90%. Međutim, efikasnost inkapsulacije polifenola iz ekstrakta latica u lipozomima je često niža, ~78% za ekstrakt latica plavog graška (*Clitoria ternatea*) [241] i 64–87% za ekstrakt latica šafrana (*Crocus sativus*) [242], u zavisnosti od korišćene metode inkapsulacije. U ovom slučaju, korišćena je jednostavna i jednostepena prolipozomna metoda kako bi se uspešno inkapsulirali polifenoli latica *P. tenuifolia*. Prolipozomna metoda korišćena u ovom istraživanju može se koristiti za inkapsulaciju i hidrofobnih i hidrofilnih bioaktivnih jedinjenja iz različitih biljnih ekstrakata zbog jedinstvene strukture i sastava lipozomalnih čestica, koje mogu da zarobe ciljna jedinjenja (u vodenoj fazi unutar lipozoma za hidrofilna jedinjenja ili između fosfolipidnih repova za lipofilna jedinjenja) [243]. Razlika u efikasnosti inkapsulacije između lipozoma pripremljenih korišćenjem Fosfolipona (čvrsta fosfolipidna smeša) i onih sa Fosol fosfolipidima (tečna smeša) može biti posledica krutosti membrane. Fosfolipon je mešavina samo lipida, što dovodi do čvršće membrane, te je inkapsulacija polifenola u njegovu strukturu stabilnija [244], dok je oslobađanje prvobitno inkapsuliranih polifenola iz lipozoma koji pored lipida sadrže i uljanu fazu (u slučaju Fosala) lakše.

4.9.2. Stabilnost lipozoma

Veličina čestica, PDI i ζ potencijal lipozoma su praćeni tokom 60 dana kako bi se testirala stabilnost u toku skladištenja praznih lipozoma, kao i lipozoma koji su sadržali ekstrakt latica stepskog božura na 4 °C, a rezultati su prikazani na slici 18a-c.





Slika 18 Veličina lipozoma (a), indeks polidisperznosti (PDI) (b) i zeta-potencijal (c) praznih lipozoma (kontrola) i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L. tokom 60 dana skladištenja na 4 °C.

U slučaju uzorka L75 SA i L53 MCT, veličina lipozoma koji sadrže ekstrakt latica *P. tenuifolia* nije se značajno promenila nakon 14 dana skladištenja na 4 °C (Slika 18a). Posle 21. dana, veličina vezikula je porasla sa $653,13 \pm 29,25$ nm na $754,7 \pm 56,38$ nm za L75 SA lipozome i iznosila je $1100 \pm 58,53$ nm 60. dana; PDI se kontinuirano smanjivao do 28. dana (slika 18b), a zatim je eksponencijalno porastao do 60. dana. U slučaju lipozoma koji se sastoje od L53 MCT i ekstrakta latica, veličina čestica se značajno promenila nakon 21 dana skladištenja i povećala se sa $242,53 \pm 0,61$ na $467,70 \pm 12,87$ nm, dostižući veličinu od $987,50 \pm 125$ nm nakon 60 dana. PDI je varirao tokom 60 dana skladištenja, jer je tokom ovog perioda imao opadanja i povećanja vrednosti. Lipozomi koji su imali najveće vezikule su pripremljeni korišćenjem ekstrakta latica stepskog božura i Fosfolipona, pošto je početna veličina vezikula bila $1555,33 \pm 24,28$ nm. Veličina je rasla do 14. dana, dostigavši vrednost od $1722,00 \pm 68,19$ nm, a zatim se polako smanjivala, te pala na $806,23 \pm 50,50$ nm nakon 60 dana. PDI je imao nestabilan trend, sličan L53 MCT lipozomima, jer je imao povećanje i smanjenje vrednosti tokom perioda skladištenja.

Prema literaturi, procesi koji ulažu visok nivo agitacije, kao što je prolipozomna metoda koja je primenjena u ovom radu, rezultiraju stvaranjem manjih čestica u poređenju sa drugim metodama, kao što je postupak tankog filma [140,157]. Prema Isailović i sar. [140], pri izradi lipozoma prolipozomnom metodom koristi se mala količina etanola koja može da utiče na veličinu lipozoma, tj. da izazove smanjenje pomenutog parametra. Etanol posebno menja neto naelektrisanje sistema, što stabilizuje sternu tečnost. Lipozomi sa ekstraktima latica imali su značajno manji prečnik od njihovih praznih paralela, u slučaju kada je kao lipidna baza korišćen Phosal 75 SA ($591,53 \pm 64,57$ nm, slika 18a). Međutim, u slučaju druga dva tipa lipozoma, prazni su imali veću vrednost veličine vezikula od onih koji sadrže ekstrakte, što bi moglo biti posledica činjenice da su bili međusobno povezani interakcijama različitih od onih sa Phosalom 75 SA.

Kao što se može videti na slici 18a, prvog dana ispitivanja stabilnosti, prazni L75 SA lipozomi su bili primetno manji od paralele sa ekstraktom, dok su L53 MCT i LPh lipozomi pratili sličan trend kao njihovi analozi sa ekstraktom. Prečnici vezikula svih praznih lipozoma su se promenili nakon 60 dana skladištenja na 4 °C, ali su se L75 SA i L53 MCT povećali, dok su LPh lipozomi postali manji. Najznačajnija promena u veličini posle perioda od 60 dana na 4 °C može se videti kod L53 MCT kontrolnog lipozoma, pošto je povećana za 77,29%.

Vrednost PDI je mera raspodele veličine čestica [248]. Dobijeni rezultati za lipozome sa ekstraktom bili su niži ($\sim 0,615$, slika 18b), dok je za prazne lipozome vrednost bila znatno veća ($\sim 0,923$, slika 18b). Prema Zhao i sar. [249], veći sadržaj lipida može dati višu vrednost PDI lipozomalne suspenzije. Vrednost PDI od $\sim 1,0$ implicira veoma širok raspon veličina čestica ili prisustvo velikih čestica ili agregata, što može doprineti sedimentaciji lipozoma [250]. Pojave u ovom istraživanju, gde su se vrednosti PDI smanjile dodavanjem ekstrakta latica, dovodeći do srednje homogenosti sistema, svedoče o pozitivnom uticaju aktivnih principa na užu raspodelu veličina lipozomalne suspenzije.

Negativan ζ potencijal implicira da su molekuli fosfolipida organizovani na taj način da se negativno naelektrisane glave fosfolipida nalaze u kontaktu sa tečnom fazom (vodom), dok visoke vrednosti zeta potencijala sugerisu da je suspenzija lipozoma elektrostatički stabilizovana, čineći agregaciju čestica sporijom i dužom, te stoga lipozomi ostaju stabilni duži vremenski period [157].

Međutim, zeta potencijal je varirao i u praznim lipozomima i lipozomima sa ekstraktom latica, kao što se može videti na slici 18c. Zeta potencijal lipozoma L75 SA sa ekstraktom latica se značajno promenio do 28. dana, menjajući se od $-30,10 \pm 1,34$ mV i eksponencijalno povećavajući na $-35,00 \pm 2,65$ mV (povećanje apsolutne vrednosti). Što se tiče promena u vrednosti zeta potencijala L53 MCT i LPh lipozoma koji sadrže ekstrakt latica nije postojao trend, pošto je njihov zeta potencijal imao i povećanje i smanjenje vrednosti tokom perioda skladištenja od 60 dana. U slučaju praznih lipozoma, najviše se istakao L53 MCT, koji je imao veliki pad u vrednosti zeta potencijala izmerene 7. dana, sa smanjenjem vrednosti od 50,37%, nakon čega je porastao do 60. dana, dostižući vrednost od $-35,90 \pm 0,62$ mV.

Pošto inkapsulacija jedinjenja iz ekstrakata može značajno uticati na zeta potencijal lipozomalne suspenzije, pomenuti parametar je meren i za čisti ekstrakt. Zeta potencijal ekstrakta laticе iznosio je $-15,9 \pm 0,9$ mV.

Zeta potencijal određen odmah nakon što su pripremljeni lipozomi sa ekstraktom kretao se od $-30,1$ do $-11,60$ mV u zavisnosti od primenjenih fosfolipidnih komponenti, kao i od prisustva/odsustva inkapsuliranih jedinjenja latica stepskog božura (Slika 18c). Zeta potencijal, kao mera naboja na granici difuzionog sloja koloida može značajno uticati na fizičku stabilnost vezikula, uzrokujući veću stabilnost ili pak destabilizaciju sistema u zavisnosti od izmerene vrednosti [157]. Negativna i visoka vrednost zeta potencijala (kao mera stabilnosti lipozoma) određena u ovom istraživanju svedoči o elektrostatički stabilnom sistemu, omogućavajući odbijanje čestica i time sprečavajući njihovu agregaciju i fuziju [157,245]. Na ponašanje nanočestica, njihov inkapsulirani sadržaj i njihovo uklanjanje *in vivo* takođe značajno utiče površinski naboj. Anjonske nanočestice mogu snažno intereagovati sa ćelijama retikuloendotelnog sistema, hvatajući endotelne ćelije i makrofage u krvi, dok se katjonski lipozomi brzo uklanjaju iz cirkulacije kroz kombinaciju nespecifičnih ćelijskih interakcija (adsorpcija na anjonsku površinu zidova krvnih sudova) i eliminišu od strane specijalizovanih ćelija retikuloendotelnog sistema [246]. Lipozomi sa ekstraktom latica *P. tenuifolia* pokazali su niži zeta potencijal (apsolutnu vrednost) u poređenju sa praznim lipozomalnim dvoslojem (u rasponu od $-30,1$ do $-34,13$ mV, slika 18c). Pomenuta pojava bi mogla biti posledica činjenice da ekstrakti kao dodatna komponenta lipozoma mogu biti podvrgnuti oksidativnoj i hidrolitičkoj degradaciji tokom pripreme, što dovodi do njihovog kraćeg roka trajanja [247].

4.9.3. Reološka svojstva lipozoma

Tabela 8 prikazuje reološke karakteristike (gustina, površinski napon i viskozitet) lipozoma sa ekstraktom latica izmerene 1. i 60. dana. S obzirom da navedene karakteristike lipozomalne suspenzije imaju važnu ulogu u proizvodnji farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda, potrebno ih je ispitati u cilju poboljšanja kvaliteta proizvoda i provere stabilnosti sistema.

Tabela 8 Gustina (ρ), površinski napon (γ) i viskozitet (η) lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L.

Uzorak	1. dan			60. dan		
	ρ , g/cm ³	γ , mN/m	η , mPa·s	ρ , g/cm ³	γ , mN/m	η , mPa·s
L75 SA + ekstrakt	1.056±0.02 ^{b,1*}	22.15±0.87 ^{a,2}	130.0±3.11 ^{b,2}	1.132±0.07 ^{b,2}	9.23±0.18 ^{c,1}	121.72±2.15 ^{b,1}
L53 MCT + ekstrakt	1.031±0.02 ^c	22.13±0.93 ^a	96.97±1.58 ^c	1.098±0.05 ^c	18.33±0.07 ^b	91.57±3.03 ^c
LPh + ekstrakt	1.066±0.02 ^a	22.76±1.12 ^a	268.4±2.84 ^a	1.151±0.08 ^a	19.57±0.08 ^a	229.97±4.12 ^a

*različita slova u svakoj koloni pokazuju statistički značajnu razliku, dok različiti brojevi u superskriptu svedoče o statistički značajnoj razlici između 1. i 60. dana ($p < 0,05$; $n = 3$, *one-way ANOVA*, Dankanov *post hoc* test).

Kao što se vidi iz tabele 8, gustina lipozoma sa ekstraktom se kretala od 1,031 do 1,066 g/cm³ prvog dana u zavisnosti od sastava fosfolipidne smeše, dok se pomenuti parametar povećao nakon 60 dana, u rasponu od 1,098 do 1,151 g/cm³. Površinski napon svih pripremljenih lipozoma sa ekstraktom latica *P. tenuifolia* smanjio se sa ~22,5 mN/m, na raspon od 9,23 do 19,57 mN/m nakon 60-dnevnog perioda skladištenja na 4 °C. Viskoizitet lipozoma sa ekstraktom latica odmah nakon što su pripremljeni bio je u rasponu od 96,97 do 268,40 mPa·s u zavisnosti od lipida koji je korišćen kao baza za pripremu lipozoma, dok se nakon 60-dnevnog skladištenja lipozoma njihov viskoizitet smanjio, u rasponu od 101,57 do 329,97 mPa·s.

Povećanje gustine ima tendenciju smanjenja debljine opne lipozoma, što je povoljno za njihovu primenu. Pored toga, pad debljine opne lipozoma izazvan povećanjem gustine, ima direktan uticaj na performanse lipozoma, jer dolazi do promene ključnih faktora, uključujući neprozirnost lipozomalne suspenzije, boju i propustljivost za gasove i vodu [145,251]. Rezultati iz tabele 8 pokazuju da su lipozomi LPh + ekstrakt imali najveću gustinu prvog dana, sa najznačajnijim povećanjem vrednosti nakon 60 dana skladištenja u odnosu na druga dva tipa lipozoma; ovo bi moglo biti posledica degradacije vezikula tokom skladištenja [252]. Smanjenje gustine lipozoma dovodi do veće tečljivosti, što ih čini manje stabilnim za upotrebu u formulacijama koje su predviđene za duže periode skladištenja [253].

Tabela 8 pokazuje da je samo za lipozome L SA 75 sa ekstraktom latica period skladištenja od 60 dana prouzrokovao značajno smanjenje vrednosti površinskog napona, dostižući vrednost od 9,23 ± 0,185 mN/m, što predstavlja smanjenje od 58,33%. Razlog može biti u formulaciji koja sadrži drugačiji tip lipidnih baza sa većim procentom fosfatidilholina (delimično odvojenim od sojinog lecitina), koji u sebi ipak sadrži ostatke sojinog lecitina koji deluje kao surfaktant, tj. komponenta koja snižava površinski napon

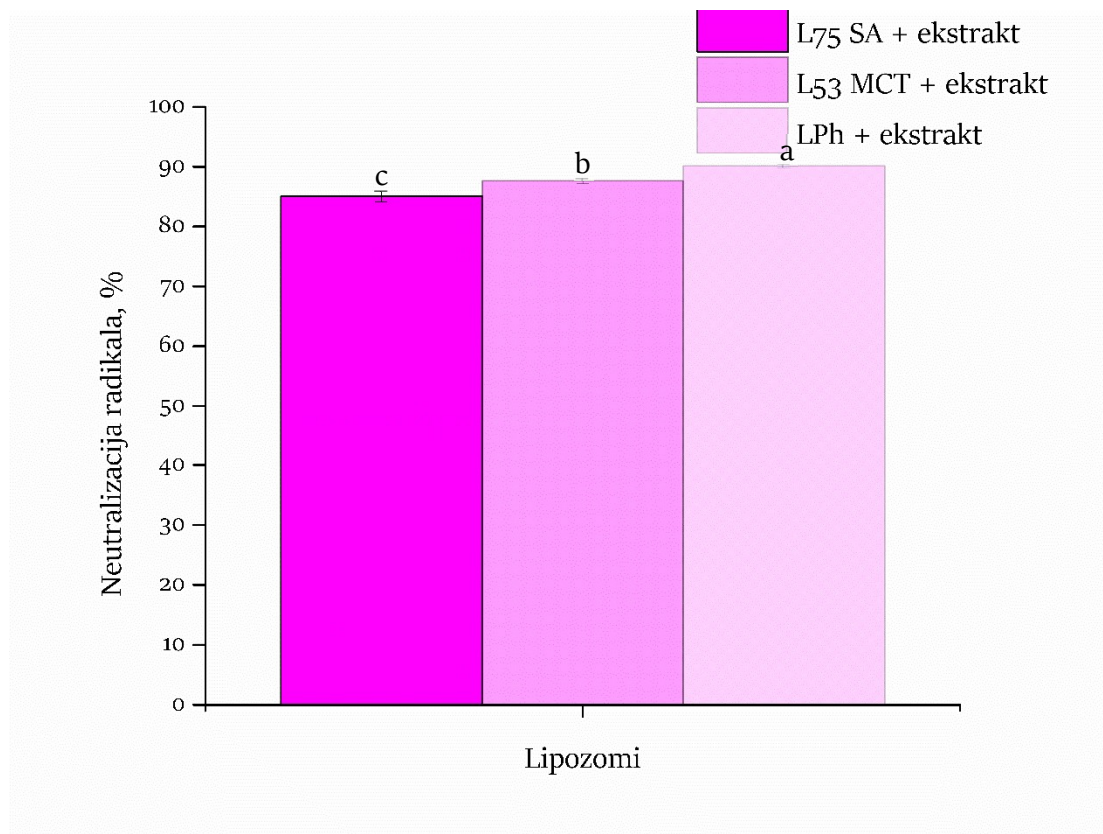
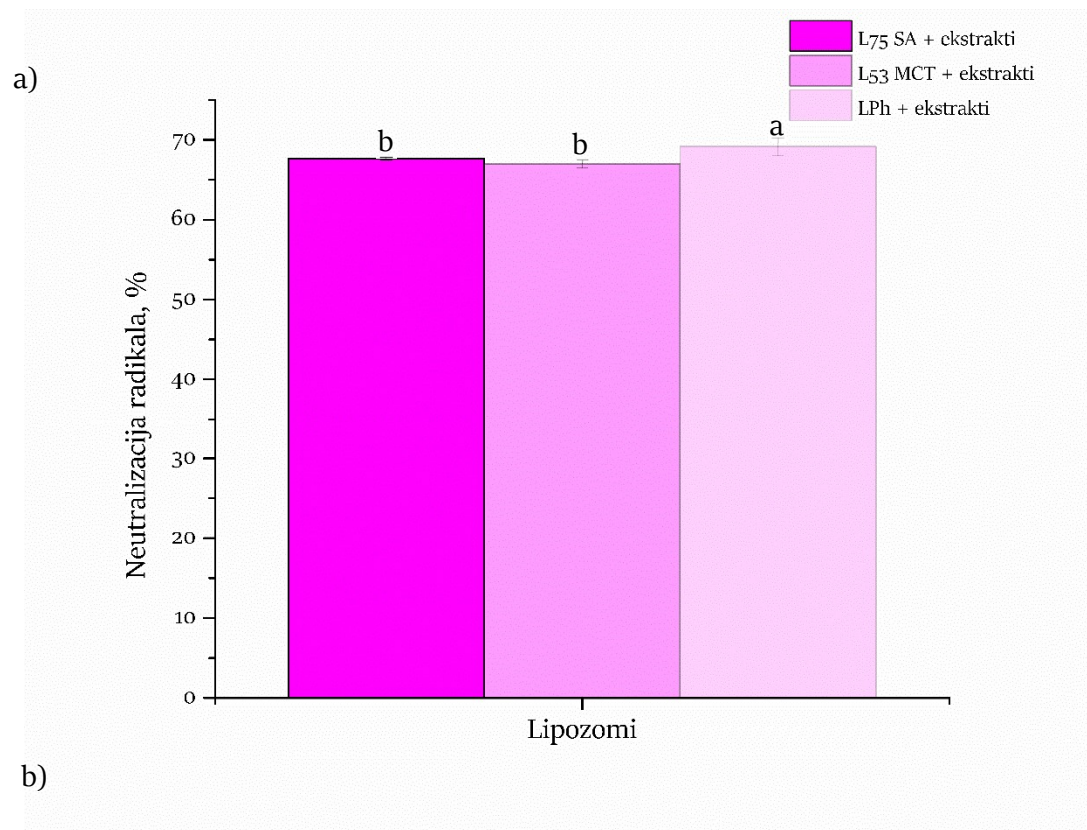
[254]. Veća koncentracija sojinog lecitina rezultira nižom vrednošću površinskog napona lipozoma jer površinski aktivni sastojci inhibiraju formiranje vodoničnog mosta i druge sile uključene u molekularnu adheziju, što uzrokuje smanjenje površinskog napona sa povećanjem koncentracije surfaktanta [255]. Štaviše, otkriveno je da dodavanje masnih kiselina, koje su prisutne u fosfolipidnoj smeši Fosol 75 SA, posebno onih sa dugim lancima, menja vrednost površinskog napona lipozoma [256]. Manje promene u površinskom naponu druga dva tipa lipozoma mogu se pripisati činjenici da oni imaju manje količine sojinog lecitina u svom sastavu od SA 75 lipozoma.

Sa modifikacijom lipida koji se koristi kao baza lipozoma, viskoznost lipozoma sa ekstraktom se menjala: L53 MCT < L75 SA < LPh. Poznato je i da lipidi deluju kao surfaktanti, jer njihove mešavine imaju mnogo niži površinski napon (72 mN/m na 25 °C) od čiste vode [257]. Pored toga, očekuje se da lipozomi koji sadrže različite lipide, kao što je ovde slučaj, nemaju isti viskozitet zbog različitog sastava mešavine lipida [257].

Smanjenje viskoziteta smanjuje stabilnost lipozoma dovodeći do povećane sedimentacije čestica [258]. S obzirom da smanjenje viskoziteta lipozoma nakon 60 dana nije bilo drastično, može se zaključiti da je stabilnost suspenzije na zadovoljavajućem nivou.

4.9.4. *Antioksidativna aktivnost lipozoma*

Antioksidativni potencijal lipozoma sa ekstraktom latica stepskog božura, pripremljenih korišćenjem prolipozomne metode, određena je upotrebom dva antioksidativna testa koja se baziraju na uklanjanju slobodnih ABTS i DPPH radikala. Rezultati antioksidativne aktivnosti dobijenih lipozoma prikazani su na slici 19.



Slika 19 Antioksidativna aktivnost lipozoma sa ekstraktom latica: a) DPPH test; b) ABTS test. *vrednosti sa istim slovom nisu pokazale značajne razlike ($p > 0,05$; $n=3$; Dankanov post hoc test).

Kao što se može videti na slici 19, kapacitet LPh da neutralizuje ABTS^{•±} radikale bio je najveći, sa $69,15 \pm 1,14\%$ neutralizacije, zatim L75 SA sa $67,68 \pm 0,24\%$, koje su bile slične lipozomu L53 MCT ($66,99 \pm 0,54\%$). Antioksidativni potencijal lipozoma izmeren u DPPH testu prati sličan trend, sa najvišim nivoom neutralizacije DPPH radikala postignutim od strane LPh + latice lipozoma ($90,11 \pm 0,3\%$), praćen sa L53 MCT + latice i L75 SA + latice kao najmanje efikasan ($85,12 \pm 0,94\%$). Razlog zašto su LPh lipozomi sa ekstraktima pokazali najbolju sposobnost da neutrališu i ABTS^{•±} i DPPH[•] radikale može biti razlika u sastavu mešavine lipida, s obzirom da je Fosfolipon čvrsta lipidna mešavina suncokretovog fosfatidilholina, dok su Phosal 75 SA i Phosal 53 MCT tečni i sadrže fosfatidilholin u etanolui ulju šafranike/ili triglicerida srednjeg lanca. Naime, postoji mogućnost da usled rastvaranja lipidne smeše u rastvoru aktiviranih radikala u slučaju Phosala dolazi do degradacije biološki aktivnih komponenata, naspram fosfatidilholina u čvrstom stanju. Dodatno, stepen inkapsulacije jedinjenja ekstrakta latica, kao nosilaca antioksidativne aktivnosti, u lipozome za čiju je pripremu korišćen Fosfolipon je viši naspram druge dve vrste lipozoma (slika 17), doprinoseći boljoj antioksidativnoj aktivnosti (slika 19).

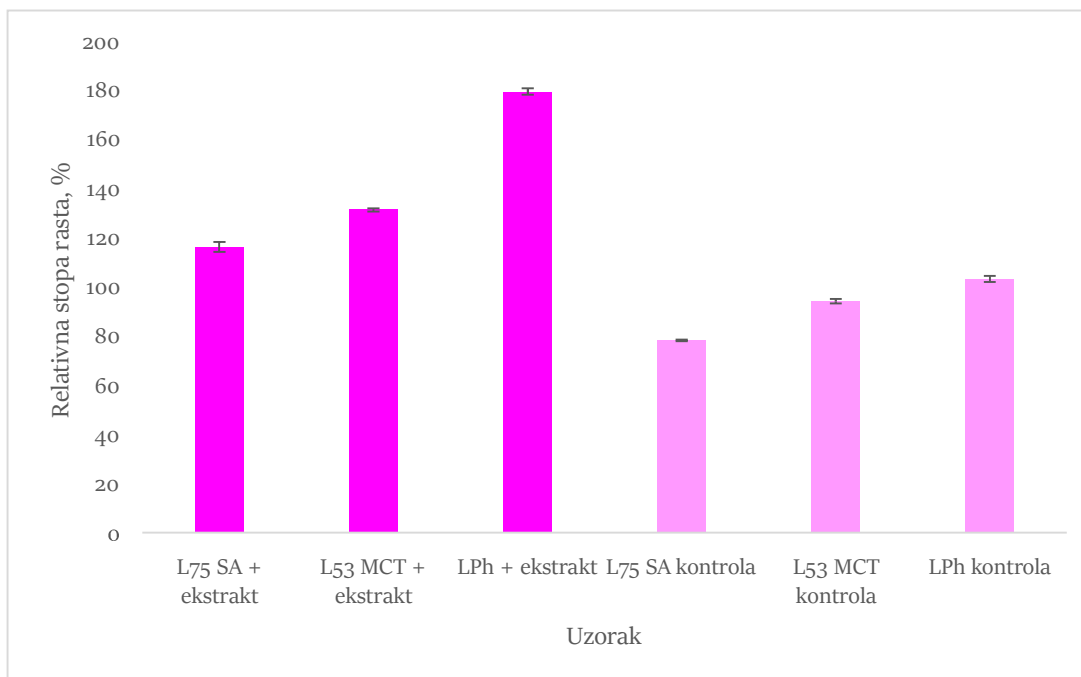
Antioksidativni potencijal čistog metanolnog ekstrakta latica *P. tenuifolia* bio je predmet prethodnog dela ovog istraživanja i pokazalo se da je vrednost IC₅₀ za neutralizaciju DPPH[•] radikala bio $0,123 \pm 0,001$ mg/mL, dok je za ABTS^{•±} radikale iznosio $0,099 \pm 0,000$ mg/mL (tabela 4). Može se videti da je inkorporacijom u lipozome promenjena antioksidativna sposobnost ekstrakata, što može biti zbog interakcije između lipida i ekstrakta [124] prilikom pripreme lipozoma, jer su bioaktivna jedinjenja odgovorna za neutralizaciju DPPH[•] radikala možda efikasnije inkapsulirana od jedinjenja koja imaju sposobnost da neutrališu ABTS^{•±} radikale u *in vitro* testu [259].

Poređenje antioksidativnog potencijala dobijenih lipozoma sa rezultatima iz literature nije uvek moguće, zbog razlike u prikazivanju (% , mg ekvivalenta antioksidativnog jedinjenja/mg ili mL ekstrakta/lipozoma, itd.) i metodologiji.

Dobijeni rezultati za aktivnost uklanjanja ABTS^{•±} radikala za sva tri tipa lipozoma sa ekstraktom bili su veći nego slučaju lipozoma sa ekstraktom šipka, gde je neutralizacija ABTS^{•±} radikala iznosila $45,4 \pm 1,8\%$ [260], što je više od 20% niže nego u slučaju najmanje efikasnog lipozoma sa ekstraktom latica *P. tenuifolia*. Razlike nastaju zbog varijacija u sastavu ekstrakata, sadržaju jedinjenja sa antioksidativnim potencijalom i upotrebljene fosfolipidne smeše. U slučaju uklanjanja DPPH[•] radikala, antioksidativni potencijal lipozoma sa ekstraktom latica stepskog božura bio je viši nego u slučaju lipozoma sa ekstraktom šipka [260], gde je stepen neutralizacije bio $57,7 \pm 1,7\%$.

4.9.5. Citotoksičnost lipozoma

Ni jedan pripremljeni lipozom nije imao negativan uticaj na stopu rasta HaCaT ćelijskih linija. Rezultati su ukazali na to da ni jedna vrsta lipozoma nema citotoksično dejstvo u ispitanoj koncentraciji (IC₅₀ > 400 µg/mL), štaviše, lipozomi sa ekstraktom imaju pozitivan efekat na rast ćelija.



Slika 20 Relativna stopa rasta HaCaT ćelija pod dejstvom praznih i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L.

Prilikom ispitivanja bezbednosti i toksičnosti inkapsulata za njegovu potencijalnu primenu u farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji, neophodno je ispitati njihovo dejstvo na metabolizam i opstanak ćelija. Kako je fokus istraživanja bila primena na površini ljudske kože, rezultati koji su dobijeni ovim ispitivanjem pokazali su se obećavajućim, jer ne samo da lipozomi ne pokazuju citotoksično dejstvo, već su pokazali i proliferativno dejstvo (slika 20). Sposobnost lipozoma da podstaknu proliferaciju HaCaT ćelija može biti povezana sa sposobnošću fosfolipida da zaštiti ćelije od mehaničkih oštećenja [261].

4.9.6. Dejstvo lipozoma na *in vitro* migraciju HaCaT ćelija

Kako bi se ispitalo potencijalno propagaciono dejstvo lipozoma na zarastanje rana na površini kože, izvršena je *in vitro* analiza dejstva lipozoma na migraciju HaCaT ćelija. Na osnovu rezultata koji su dobijeni analizom dejstva lipozoma na proliferaciju keratinocita (slika 20), u *in vitro* test simulacije zarastanja rana (migracija HaCaT ćelija) uključeni su svi lipozomi koji su pokazali veću stopu rasta ćelija u odnosu na korišćenu kontrolu. U tabeli 9 prikazano je dejstvo lipozoma na *in vitro* migraciju HaCaT u poređenju sa kontrolom (monosloj keratinocita koji je oštećen, a nije tretiran lipozomima).

Tabela 9 Efekti kontrolnih lipozoma i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L. na kapacitet migracije HaCaT ćelija (*in vitro* simulacija zarastanja rana).

Uzorak	Zarastanje rana (%)
L75 SA + ekstrakt	21,17±2,50
L53 MCT + ekstrakt	6,45±3,37
LPh + ekstrakt	30,00±1,0
L75 SA kontrola	18,30±2,2

L53 MCT kontrola	5,14±0,53
LPh kontrola	22,11±3,73
Kontrola	0,08±0,14

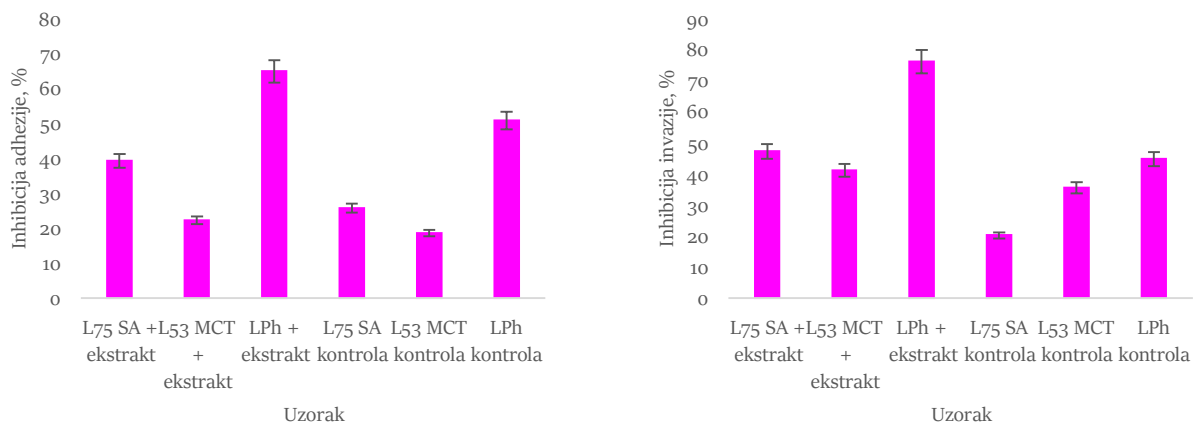
Primena LPh lipozoma koji sadrže ekstrakt latica stepskog božura na sloj HaCaT ćelija sa mehaničkim oštećenjem rezultirala je značajnim poboljšanjem zatvaranja rane *in vitro*, što se ogleda u intenzivnoj migraciji keratinocita na ozleđeno mesto (30,0%). U slučaju kontrolnih lipozoma, najefektivniji su bili oni sačinjeni of Fosfolipona (LPh kontrola), jer su od kontrole bili efikasniji za čak 22,03% (tabela 9).

U ovom istraživanju su svi lipozomi podvrgnuti ispitivanju njihovog dejstva na zarastanje rana, jer su imali pozitivan efekat na rast ćelija (slika 20). Rezultati koji su prikazani u tabeli 9 potvrdili su blagotvorno dejstvo lipozoma sa ekstraktom latica na rast i migraciju HaCaT ćelijskih linija, što dovodi do bržeg zatvaranja rana. Najefikasniji su bili LPh + latice lipozomi, praćeni sa L75 SA + latice lipozomima, dok su najmanje efikasni bili L53 MCT + latice (6,45%).

Literaturni podaci ukazuju na to da su lipozomalne čestice, u koje je inkorporiran biljni ekstrakt, doprinele višem stepenu zarastanja rana (*in vitro* i *in vivo*), naspram čistih ekstrakata, što je pripisano sposobnosti fosfolipida da hidriraju ćelije i spreče dalja mehanička oštećenja [262,263].

4.9.7. Efekti lipozoma na adheziju i invaziju *Staphylococcus lugdunensis* prema HaCaT ćelijama

Lipozomi sa ekstraktom latica stepskog božura su ispitani sa aspekta biološkog dejstva na *S. lugdunensis*. Efekti lipozoma u koje je inkorporiran ekstrakt latica *P. tenuifolia* sakupljenih u Gulenovicima, kao i kontrolnih (praznih) lipozoma ispitani u smislu njihove sposobnosti da inhibiraju adheziju i invaziju *S. lugdunensis* na HaCaT ćelijske linije. Rezultati su pokazali da su i invazija i adhezija značajno smanjene u prisustvu ekstrakata, (slika 21). Kontrolni lipozomi su, kao što je očekivano, pokazali niži stepen inhibicije adhezije i invazije, naspram njihovih paralela sa inkorporiranim ekstraktom. Inhibitorni efekat LPh + latice lipozoma na invaziju *S. lugdunensis* bio je najviši i iznosio je 64,71%, dok su se kao najslabija vrsta lipozoma sa ekstraktom pokazali L53 MCT lipozomi (22,18%).



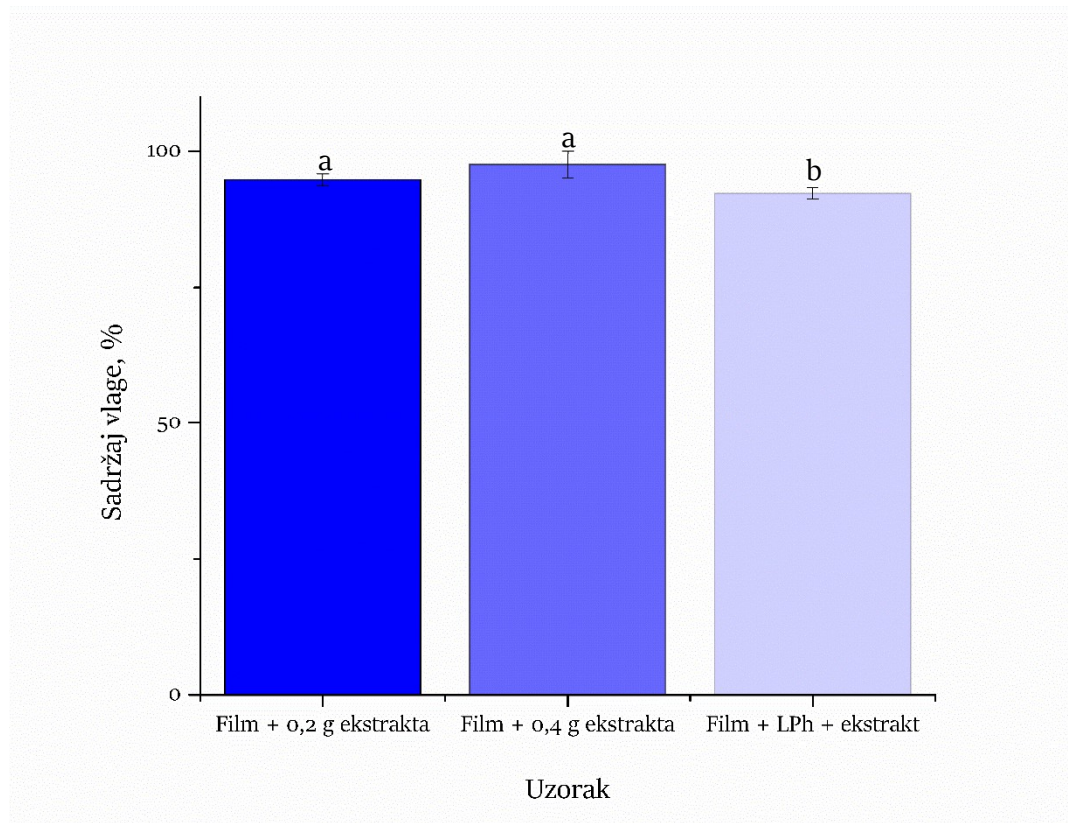
Slika 21 Uticaj kontrolnih lipozoma i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L. na kapacitete adhezije (levo) i invazije (desno) *Staphylococcus lugdunensis* na HaCaT ćelijama; *Prikazani kao procenat inhibicije adhezije i invazije u poređenju sa kontrolom.

Bakterije imaju sposobnost kolonizacije površine ćelija i tkiva domaćina, praćene njihovom daljom infiltracijom, uprkos borbi prirodne barijere koju ljudski organizam poseduje. Lipozomi koji su bili predmet istraživanja ove doktorske disertacije pokazali su pozitivno dejstvo na inhibiciju rasta bakterijskog soja *S. lugdunensis*, zbog čega su dalje podvrgnuti ispitivanju njihove sposobnosti da uspore ili potpuno onemoguće adheziju i invaziju ovog bakterijskog soja na HaCaT ćelije. Ispitane su subtoksične koncentracije lipozoma, niže od MIK koncentracije dobijene u testu antibakterijske aktivnosti, a rezultati su pokazali da se lipozomi efektivno mogu koristiti u ove svrhe. Potencijalno objašnjenje ovakvih rezultata može biti u tome da lipozomi, obzirom da u svom sastavu sadrže masnu fazu (fosfolipide) otežavaju adherenciju samih patogena, što posledično dovodi do nemogućnosti invazije.

4.10. Karakterizacija biopolimernih filmova

4.10.1. Sadržaj vlage biopolimernih filmova

S obzirom na to da količina vlage utiče na mehaničku čvrstoću filma, adhezivne kvalitete i lomljivost, neophodno je odrediti sadržaj vlage u materijalu. Higroskopni kapacitet aktivnih lekovitih jedinjenja, polimera, sistem rastvarača koji se koriste za rastvaranje polimerne smeše [264] i proizvodni procesi mogu da uzrokuju porast sadržaja vode u finalnom proizvodu, tj. filmu. Iz tog razloga su filmovi koji sadrže čist ekstrakt (0,2 i 0,4 g) i Ph lipozome sa ekstraktom podvrgnuti proceni sadržaja vlage (slika 22). Sadržaj vlage u filmovima kretao se od 92,38 do 94,73%. Kontrolni filmovi, koji su sadržali samo čiste ekstrakte, imali su neznatno veći sadržaj vlage od onih koji sadrže lipozome sa ekstraktom.



Slika 22 Sadržaj vlage biopolimernih filmova; * Film + 0,2 g ekstrakta – biopolimerni film koji sadrži 0,2 g ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L.; Film + 0,4 g ekstrakta – biopolimerni film koji sadrži 0,4 g ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L.; Film + LPh + ekstrakt – biopolimerni film koji u koji su inkapsulirani lipozomi na bazi Fosfolipona sa ekstraktom

Biopolimerni filmovi koji sadrže ekstrakte latica sadržali su nešto veću količinu vlage od onih u koje je inkapsuliran ekstrakt sa lipozomima [264]. Za uzorke sa lipozomima, izmereni sadržaj vlage bio je statistički značajno niži od onih koji sadrže čist ekstrakt latica *P. tenuifolia*. Ovo ukazuje da inkapsulacija smanjuje isparavanje ekstrakta latica tokom sušenja filma. Dodatno, filmovi koji sadrže lipozome imaju nižu sposobnost vezivanja vode. Interakcije između lipozoma i hidrofilnih regiona CMC lanaca mogu biti razlog zašto je sposobnost filma da veže vodu smanjena. Literaturni podaci takođe ukazuju da dodatak biljnog ekstrakta smanjuje sadržaj vlage u filmovima [265]. Ranija studija [143] je pokazala da je sadržaj vlage čistih CMC filmova dosta veći nego u slučaju filmova sa inkapsuliranim ekstraktima. Dodatno smanjenje sadržaja vlage kada se lipozomi koji sadrže ekstrakte latica *P. tenuifolia* inkorporiraju u CMC filmove može se pripisati intramolekulskim interakcijama u matrici filma i smanjenju dostupnosti reaktivnih hidrofilnih grupa za interakciju sa vlagom [266].

4.10.2. Mehanička svojstva biopolimernih filmova

Mehanička svojstva biopolimernih filmova formiranih iz njihovih vodenih rastvorazavise od mnogih parametara, kao što su molekulska masa i uslovi okoline (termički uslovi, vlažnost, itd.) [267,268], te moraju biti ispitana jer pokazuju koliko naprezanje film može da

izdrži, pre pucanja, što je od velikog značaja za njihovu potencijalnu upotrebu u farmaceutskoj industriji, za pripremu flastera za topikalnu primenu.

Sila loma, istezanje i zatezna čvrstoća filmova sa ekstraktom i lipozomima sa ekstraktom, kao značajnih parametara za njihovu dalju primenu, ispitana je u cilju definisanja mehaničke stabilnosti filmova.

U tabeli 10 prikazane su sledeće mehaničke karakteristike: zatezna čvrstoća (engl. *tensile strength* - TS), sila kidanja (engl. *break force* - BF) i izduženje pri kidanju (engl. *elongation at break* - EB) CMC filmova. Sila kidanja je poznata i kao sila koju je neophodno primeniti na material kako bi došlo do njegove plastične deformacije. U slučaju biopolimernih filmova ispitanih u sklopu ovog istraživanja, najviša sila kidanja je bila kod filmova koji sadrže 0,4 g čistog ekstrakta, a kod CMC filmova u koje su inkorporirani lipozomi sa ekstraktom, ova vrednost bila je 12 puta niža.

Tabela 10 Mehaničke karakteristike filmova na bazi karboksimetil celuloze sa čistim ekstraktom stepskog božura i lipozomima sa inkapsuliranim ekstraktom.

Uzorak	Debljina filma (mm)	Zatezna čvrstoća (Mpa)	Sila kidanja (N)	Izduženje (%)
Film + 0.2 g ekstrakta	0.11±0.02 ^b	29.25±2.27 ^b	16.14±2.90 ^b	42.75±2.67 ^a
Film + 0.4 g ekstrakta	0.14±0.02 ^{ab}	35.72±2.78 ^a	19.81±1.54 ^a	37.12±2.92 ^b
Film + LPh lipozom + ekstrakt	0.16±0.01 ^a	14.09±4.76 ^c	1.64±0.34 ^c	9.16±1.58 ^c

*različita slova u svakoj koloni pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$; $n = 3$, *one-way ANOVA*, Dankanov *post hoc* test). *LPh – lipozomi na bazi Fosfolipona

Pored toga, zatezna čvrstoća, koja prikazuje koliki je maksimalan napon koji materijal može da podnese pre pucanja, pratila je isti trend kao i sila kidanja, usled čega je bila najviša kod filmova u koje je inkorporirano 0,4 g čistog ekstrakta. Pored ovoga, ispitano je i izduženje biopolimernih filma, a dobijeni rezultati bili su u saglasnosti sa rezultatima za EB i TS.

Dodatak ekstrakta latica stepskog božura u CMC filmove učinio je filmove fleksibilnijim i deformabilnijim zbog molekularnih interakcija koje se mogu javiti između ekstrakta laticai polimernih lanaca prisutnih u CMC, što je i potvrđeno primenom FT-IR analize čiji rezultati slede. Zanimljivo je da inkorporacija lipozoma nije imala uticaja na poboljšanje mehaničkih karakteristika CMC filmova. Ovo može biti posledica većeg broja suprotnih efekata, s obzirom na to da bi se očekivalo da mehanička svojstva CMC filmova budu oslabljena usled dodatka lipozoma, zbog izmena u matrici [143], dok postoje nalazi u literaturi koji tvrde da dolazi do povećanja zatezne čvrstoće filmova usled dodatka lecitina (smeša komercijalnih fosfolipida i ulja/masti) [269,270] .

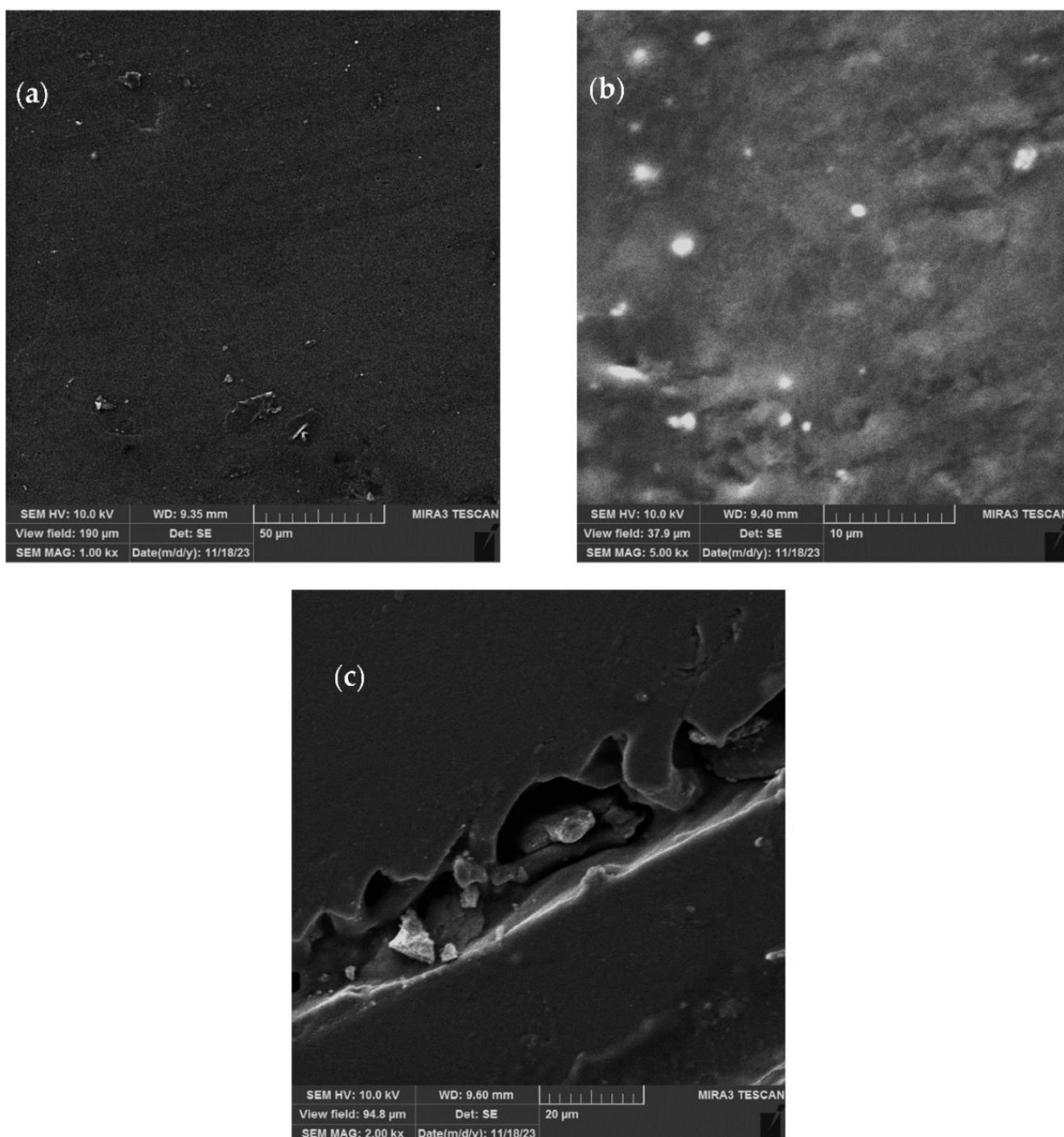
S druge strane, primećeno je da uključivanje komercijalnih plastifikatora (mešavine različitih fosfolipida i masti), samih ili u kombinaciji sa drugim tipovima surfaktanata, povećava zateznu čvrstoću CMC filmova [271]. Razlog leži u pozitivno naelektrisanim fosfolipidnim holinskim grupama koje mogu da dođu u kontakt sa CMC anjonskim grupama proizvodeći jače hemijske veze, te povećavajući zateznu čvrstoću filma. Važno je napomenuti

da je film koji sadrži liposome pokazao izuzetno visok nivo varijabilnosti mehaničkih parametara (standardna odstupanja su se kretala od 21% do 34%), što ukazuje na nehomogenu strukturu.

CMC filmovi koji sadrže 0,2 g ekstrakta latica uskolisnog božura imali su najveće izduženje pri kidanju (42,75%), što se može pripisati intermolekularnim interakcijama između CMC lanaca i ekstrakta. Dayarian i sar. [272] su primetili važnost molekularnih interakcija između komponenti filma na fleksibilnost materijala. Dodavanje lipozoma u formulaciju filmova na bazi CMC dovodi do manje elongacije filma, verovatno zbog interakcija između holinskih grupa prisutnih u fosfolipidima i CMC anjonskih grupa, što dovodi do niže fleksibilnosti.

4.10.3. Analiza biopolimernih filmova skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM)

U cilju dobijanja više detalja o strukturi materijala, kao i eventualnim promenama koje mogu nastati u slučaju inkorporacije čistog ekstrakta ili lipozoma sa ekstraktom, biopolimerni filmovi su podvrgnuti SEM analizi. Na slici 23a prikazana je površina filmova sa ekstraktom (0,4 g), gde se vidi da su homogenog sastava i kompaktni; površina filmova sa lipozomima sa inkapsuliranim ekstraktom prikazana je na slici 23b, dok je na slici 23c prikazan poprečni presek filma koji sadrži 0,2 g ekstrakta latica. Pod malim uvećanjem (SEM MAG 1000–5000×), može se videti da su polimerni biofilmovi sa ekstraktom homogenog sastava, dok lipozomi koji su ugrađeni u filmove karboksimetil celuloze (slika 23b) imaju globularnu i spljoštenu strukturu.

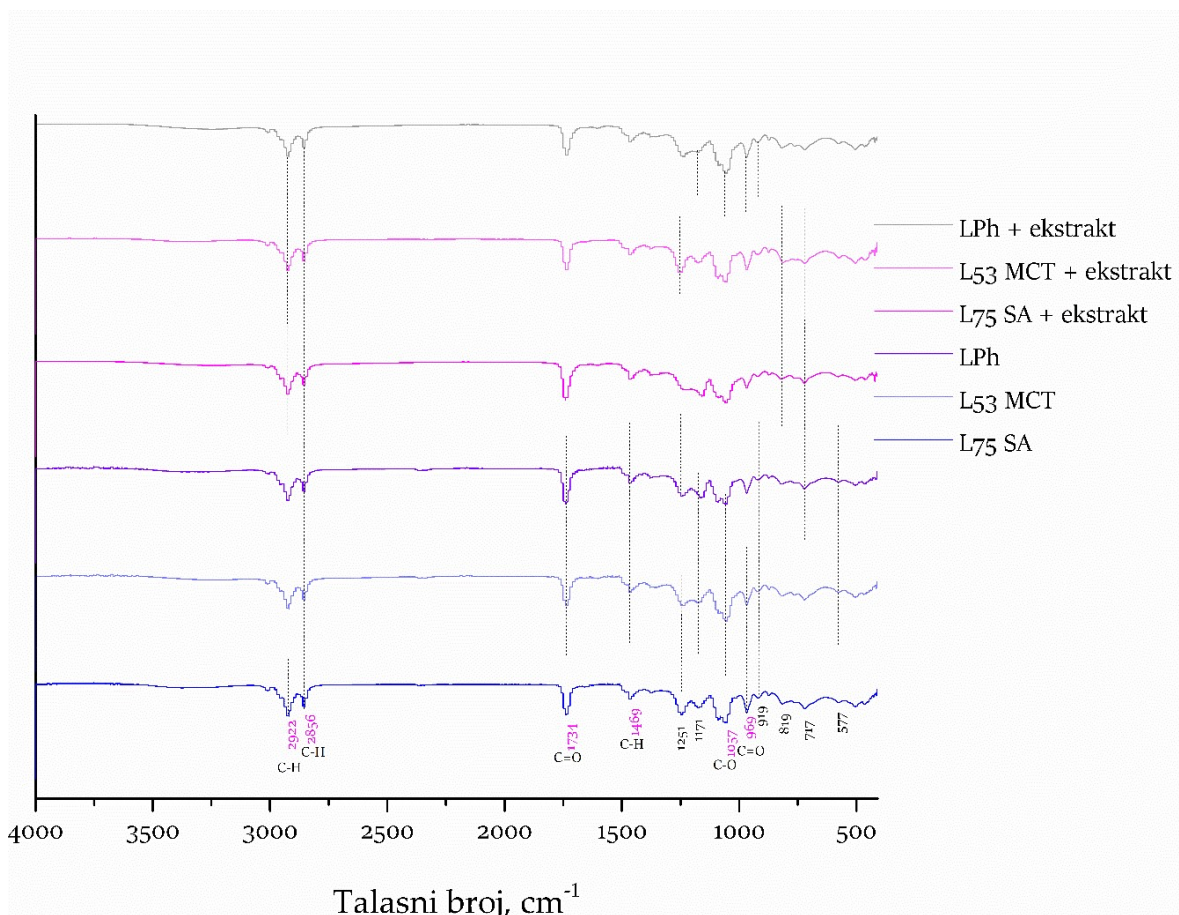


Slika 23 SEM mikrofotografije osušenih filmova karboksimetil celuloze: (a) film sa ekstraktom latica stepskog božura(0,4 g) sa malim uvećanjem ($\times 1000$); (b) filmovi sa lipozomima sa ekstraktom latica sa malim uvećanjem ($\times 5000$) i (c) film sa ekstraktom latica (0,2 g) sa malim uvećanjem ($\times 2000$).

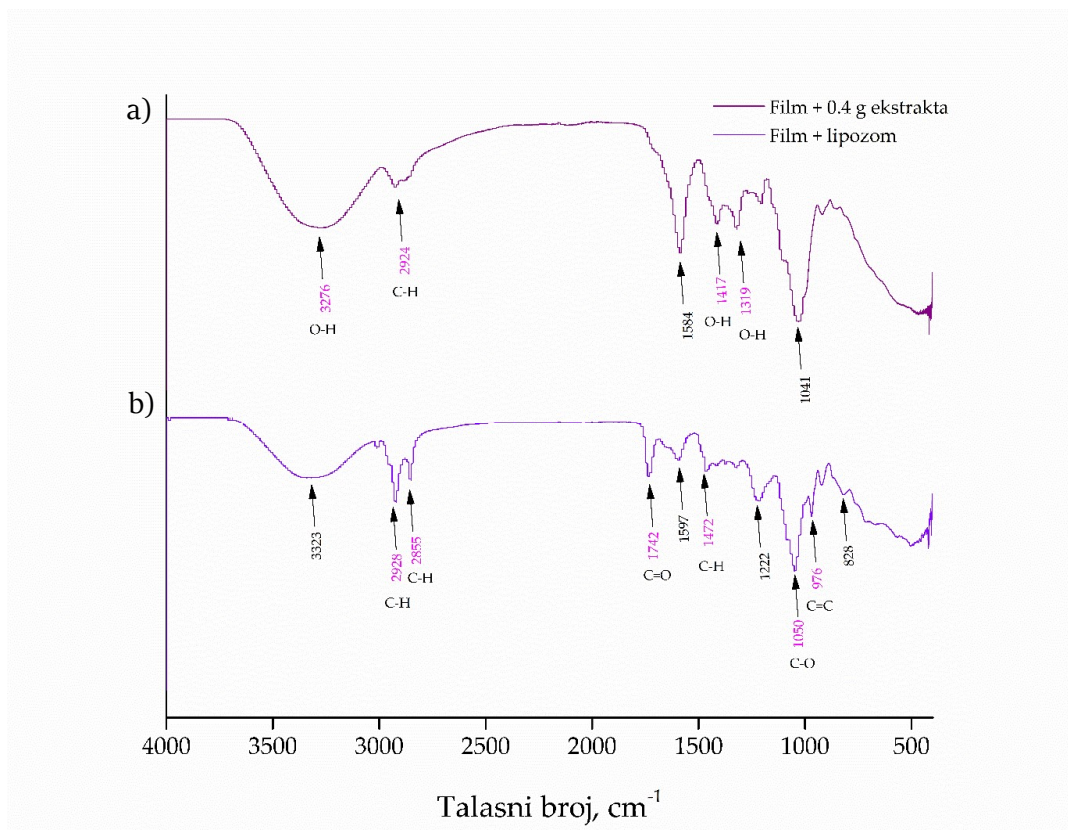
SEM ispitivanjem površine filmova sa ekstraktom latica, kao i filmova sa lipozomima, može se zaključiti da se struktura biopolimernih filmova promenila dodavanjem lipozoma, jer su vidljivi u njegovoj strukturi, dok su uzorci koji sadrže čist ekstrakt homogeni. Slika 23b pokazuje određeni nivo spljoštenosti u slučaju većih lipozoma, ali nema dokaza da su lipozomi pukli. Na slici 23c je prikazan poprečni presek biofilma sa ekstraktom, koji je kompaktan, jer su slojevi filma jednake debljine, a ekstrakt je u njih ravnomerno inkorporiran.

4.11. FT-IR spektri lipozoma i biopolimernih filmova

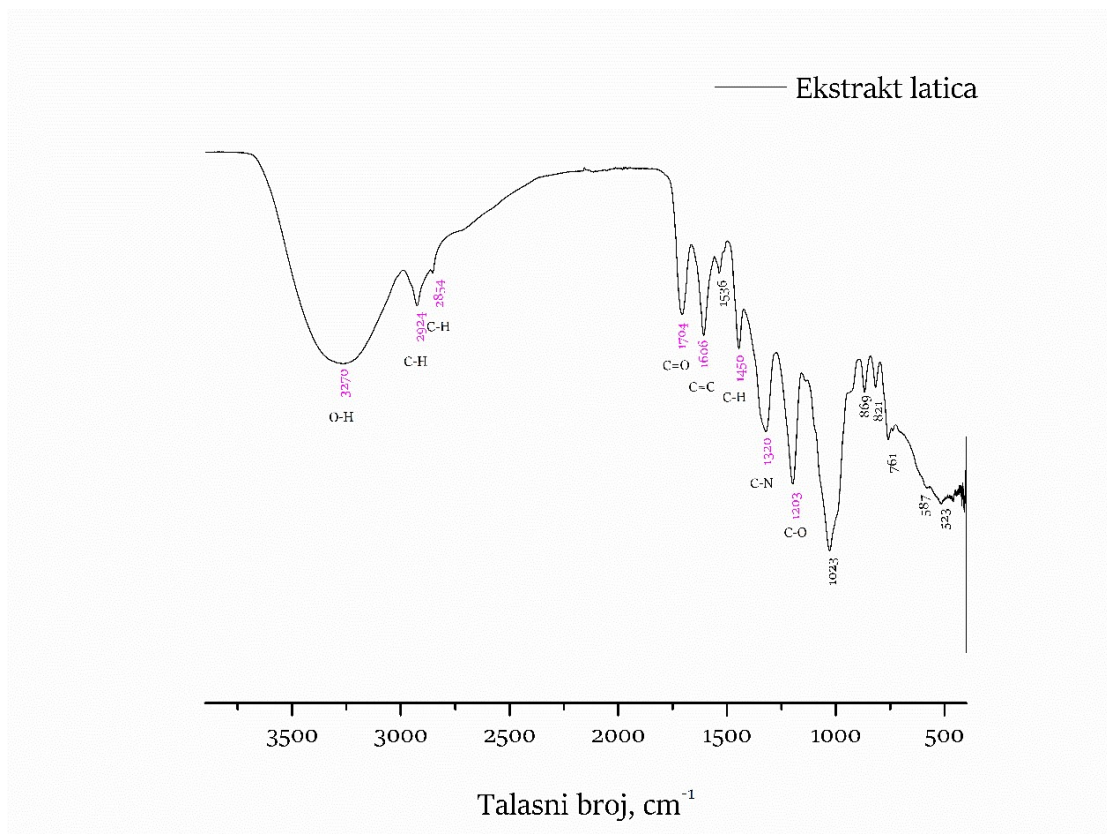
FT-IR spektroskopija je korišćena u cilju analize potencijalnog prisustva različitih interakcija između fosfolipida iz lipozoma, karboksimetil celuloze iz filmova i jedinjenja iz ekstrakta latica stepskog božura. Slike 24 i 25 prikazuju FT-IR spektre praznih lipozoma, lipozoma sa ekstraktom, kao i filmova sa ekstraktom i lipozomima sa inkapsuliranim ekstraktom.



Slika 24 FT-IR spektri praznih i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L.



Slika 25(a) FT-IR spektri filma karboksimetil celuloze sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L.; (b) FT-IR spektri filma karboksimetil celuloze sa lipozomima sa ekstraktom.



Slika 26 FT-IR spektar ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L.

Kada su u pitanju FT-IR spektri praznih (kontrolnih) lipozoma (slika 24), grupni pik na 576 cm^{-1} pripisuje se O-CO-C grupi prisutnih fosfolipida, C-N simetrično istezanje holina predstavlja pik na $\sim 721\text{ cm}^{-1}$, a na 966 cm^{-1} postoji pik karakterističan za rastezanje alkena koji je povezan sa *trans* disupstituisanom fenil grupom [158,273]. Postoji traka na 1057 cm^{-1} koja predstavlja C-O-P-O-C istezanje, modovi na 1173 i 1250 cm^{-1} su specifični za simetrično i asimetrično istezanje C-O grupa, dok pik na 1466 cm^{-1} odgovara metilenskoj grupi iz lipida. Pik na 1739 cm^{-1} predstavlja vibracije istezanja estarskih karbonilnih grupa (C=O), pik na 2922 cm^{-1} je specifičan za asimetrične vibracije istezanja u CH_3 grupama, pikovi na 2853 i 3018 cm^{-1} predstavljaju simetrično i asimetrično C-H istezanje [274]. Pošto su FT-IR spektri praznih lipozoma pokazali sve karakteristične trake fosfolipida, može se zaključiti da tokom pripreme lipozoma nije došlo do hemijske reakcije ili termičke degradacije. FT-IR spektri ekstrakta latica *P. tenuifolia* (slika 26) pokazuju istaknuti pik na 1023 cm^{-1} koji ukazuje na C-C rastezanje $(\text{CH}_2)_n$ grupe [275] i mod na 761 cm^{-1} koji se može pripisati vibraciji ugljeničnog skeleta [276]. Opseg na 1203 cm^{-1} pripisuje se C-O istezanju koje potiče od aromatičnih estara, dok je fonon koji je primećen na 1320 cm^{-1} povezan sa vibracijama savijanja CH_3 i CH_2 grupa [277], a traka na 1450 cm^{-1} je u vezi sa *d*(C-H) deformacijom. Vibracioni režim prisutan na 1606 cm^{-1} u ekstraktu može se pripisati C=C režimima istezanja specifičnim za saponine [278]. Traka na oko 1704 cm^{-1} pripisana je vibracijama istezanja karbonilne grupe i pripisuje se samo hidrolizujućim taninima [279]. Modovi na 2854 i 2924 cm^{-1} pripisani su simetričnim i asimetričnim vibracijama *n*(C-H) alifatičkih grupa CH_2 i CH_3 iz alkil funkcionalnih grupa, a široki pojas sa maksimumom na oko 3270 cm^{-1} uslovno odgovara OH režimu istezanja [280].

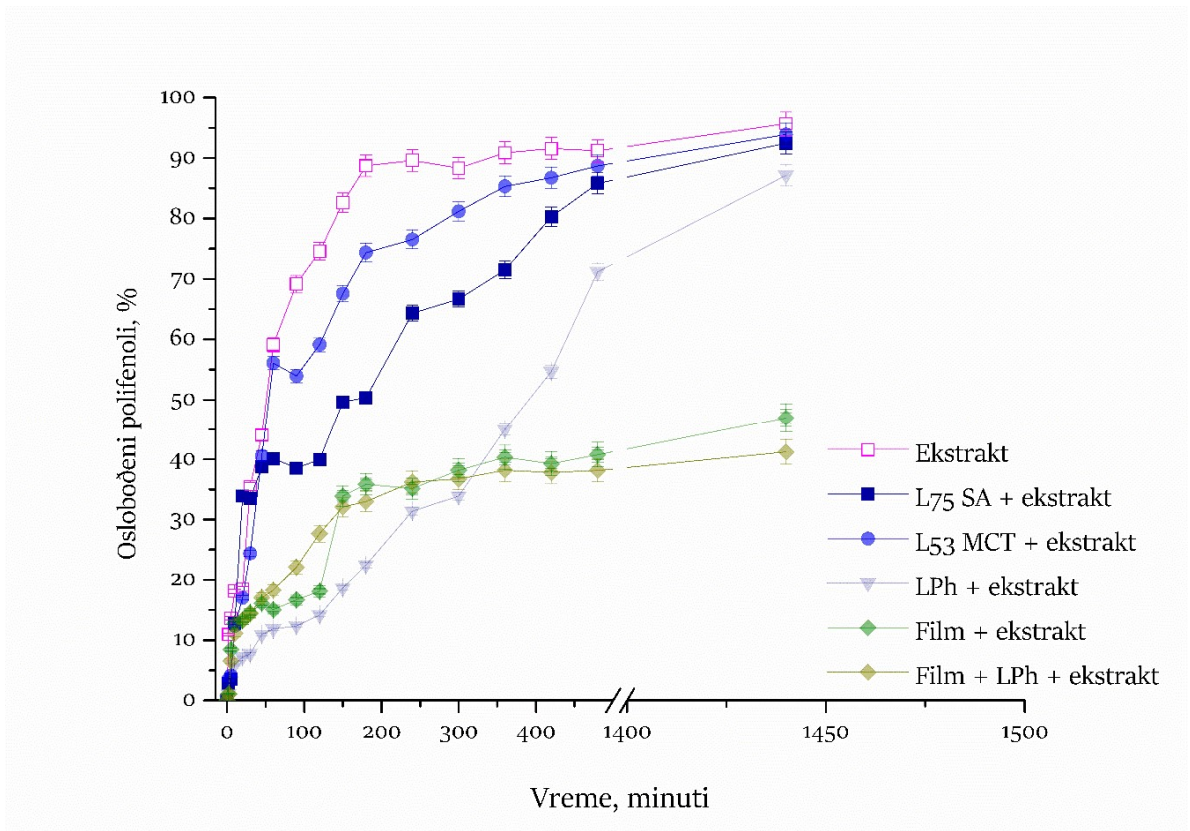
FT-IR spektri lipozoma sa ekstraktom latica stepskog božura (slika 24) pokazuju mod koji je jedinstven za pomenuti ekstrakt latica i nalazi se na 1375 cm^{-1} . Ovaj mod je povezan sa antocijaninima, koji su prethodno otkriveni prilikom analize hemijskog sastava ekstrakta latica *P. tenuifolia* (tabela 2). Antocijanini su prisutni u pojasu niskog intenziteta, što sugeriše da mogu biti „zarobljeni“ na površini lipozoma. Pored toga, primećeno je da FT-IR spektri lipozoma sa ekstraktom latica nemaju određene modove, kao što su trake na 1203 cm^{-1} povezane sa C-O koji potiču od aromatičnih estara u ekstraktu i na 1606 cm^{-1} povezane sa potencijalnim C=C modom istezanja koji ukazuju na prisustvo saponina. Moguće je da se jedinjenja koja sadrže ove funkcionalne grupe sada nalaze unutar lipozomalnog dvosloja i da se ne mogu detektovati u spektrima. Prema literaturi, kada su pikovi aktivnog jedinjenja nejasno definisani, to sugeriše da ih je nosač u potpunosti inkapsulirao, što u slučaju lipozoma sa ekstraktom latica ukazuje da su jedinjenja ekstrakta bila uspešno inkapsulirana [157]. U FT-IR spektrima lipozoma sa ekstraktom latica, takođe se primećuju modovi koji pripadaju lipozomskim fosfolipidima, uključujući modove na 2922 , 2856 , 1734 , 1469 , 1251 , 1171 , 969 i 817 cm^{-1} . Međutim, mod na 576 cm^{-1} koji je dodeljen O-CO-C funkcionalnoj grupi prisutnih fosfolipida bio je manjeg intenziteta u odnosu na prazne lipozome. Pik na 918 cm^{-1} , koji odgovara rastezanju fosfolipida C-C=O u FT-IR spektrima praznih lipozoma nije primećen u spektrima lipozoma sa ekstraktom. Na asimetrični rastezni fonon na 1241 cm^{-1} navodno utiče distribucija inkapsuliranih komponenata unutar i izvan lipozoma [273]. Traka je pomerena sa 1241 na 1250 cm^{-1} u slučaju lipozoma sa ekstraktom latica *P. tenuifolia*, što

pokazuje da su komponente ekstrakta prisutne u liposolubilnim fosfolipidnim repovima i na površini lipozoma. Dodatno, traka povezana sa simetričnim istezanjem PO_2^- (1057 cm^{-1}) je pronađena kada su inkapsulirane komponente samo na površini lipozoma [281]. Činjenica da je gore pomenuta traka ista u praznim i lipozomima sa ekstraktom daje dodatni dokaz da su komponente ekstrakta latica *P. tenuifolia* prisutne i unutar i izvan lipozoma. Dobijeni rezultati i zaključci su u skladu sa podacima iz literature, gde je FT-IR analiza otkrila da je biljni ekstrakt kombinovan sa membranskim interfejsom dvosloja, kao i unutrašnjosti lipozoma [266]. Fonon koji odgovara karbonilu n(C-H) estra u praznim lipozomima pomerio se sa 1736 na 1739 cm^{-1} u lipozomima sa ekstraktom latica. Formiranje vodonične veze između karbonil grupa fosfolipida i -OH grupa koje se nalaze u komponentama ekstrakta izazvalo je modifikacije u gore pomenutom piku [158]. Simetrično i asimetrično C-H istezanje u lipidima lipozoma sa ekstraktom predstavljeno je trakama na 2857 i 3101 cm^{-1} , dok je asimetrična vibracija istezanja u CH_3 grupama povezana sa trakom na 2922 cm^{-1} .

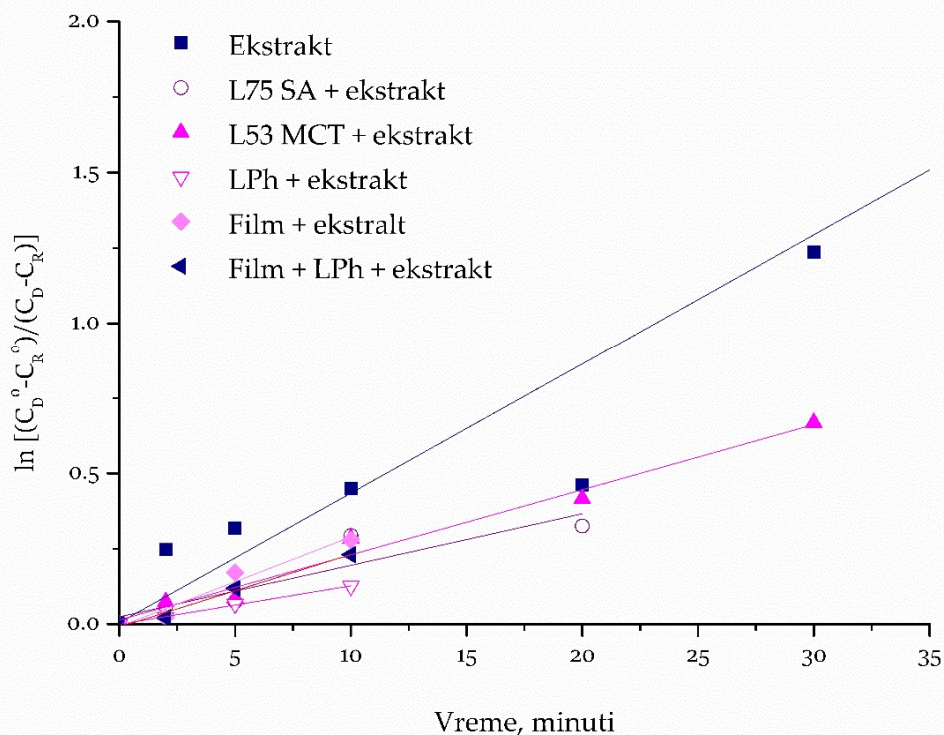
Spektri formulacije CMC filma sa ekstraktom prikazani su na slici 25a. CMC film sa ekstraktom prikazuje heterogeni šablon pikova koji na kraju prikazuje polimerne i aktivne vrhove ekstrakta latica *P. tenuifolia*. Hidrofilna funkcionalna grupa (O-H) ili N-H funkcionalna grupa je identifikovana po pikovima na 3276 cm^{-1} [282]. Rastezanje ciklične alkenske grupe C=C je predstavljeno karakterističnom trakom na 1584 cm^{-1} . Pikovi na 1417 i 1319 cm^{-1} identifikovani su kao O-H savijanje tipično za karboksilne i alkoholne kiseline [283]. Potvrda sekundarnog alkohola koji potiče iz CMC-a (-CH-OH u cikličnom alkoholu C-O) označena je trakom na 1041 cm^{-1} . Rezultati su pokazali da ne postoji interakcija između polimera i ekstrakta i da je ekstrakt latica stepskog božura uspešno inkorporiran u CMC formulacije [284]. Slika 25b predstavlja CMC filmove sa lipozomima pripremljenim od Fosfolipona i ekstrakta latica stepskog božura. Prisustvo veza na 2928 , 2855 i 1597 cm^{-1} , koje su karakteristične za korišćeni ekstrakt latica implicira da su jedinjenja iz ekstrakta prisutna i na površini CMC filmova. Naime, prilikom pripreme filmova sa lipozomima sa inkapsuliranim ekstraktom može doći do oštećenja lipozomalne membrane i posledičnog curenja inkapsuliranog sadržaja, čime se može objasniti pojava komponenta ekstrakta na površini filmova. Preostali karakteristični pikovi istaknuti na slici 25b su takođe prisutni u FT-IR spektrima praznih lipozoma, što ukazuje i na njihovo postojanje na površini filma.

4.12. Studija kontrolisanog otpuštanja

Francova difuziona ćelija je korišćena za praćenje kinetike otpuštanja i određivanje otpora prenosu mase polifenola latica *P. tenuifolia* iz lipozoma i filmova. Na slici 27, procenat oslobođenih polifenola je prikazan u funkciji vremena tokom perioda od 24 h. Koristeći istu koncentraciju ekstrakta latica kao što je korišćena za pripremu filmova i lipozoma, profil difuzije polifenola iz rastvora suvog ekstrakta latica stepskog božura u etanolu služio je kao kontrola za poređenje. U studiji su korišćeni svi pripremljeni lipozomi sa ekstraktom latica, CMC film koji sadrži 0,4 g ekstrakta latica, kao i CMC film koji sadrži Fosfolipon lipozome sa ekstraktom latica.



Slika 27 Profili oslobađanja polifenola iz ekstrakta *Paeonia tenuifolia* L., lipozoma i filmova, izraženi kao procenat oslobodjenih polifenola.



Slika 28 Difuzija polifenola iz suvog ekstrakta latica stepskog božura, lipozoma sa inkapsuliranim ekstraktom, filmova sa inkapsuliranim ekstraktom, kao i filmova sa lipozomima sa ekstraktom, na 37 °C, aproksimirana II Fikovim zakonom difuzije; c_D^0 i c_R^0 su početne koncentracije polifenola u donorskom i akceptorskom delu; c_D i c_R su koncentracije polifenola u donorskom i akceptorskom delu Francove difuzione ćelije u datom trenutku.

Koeficijenti difuzije su izračunati korišćenjem nagiba linearnog dela krive prikazane na slici 28, dok otpor difuzije pokazuje odnos između debljine uzorka i koeficijenta difuzije. U tabeli 11 se može videti da su LPh imali najniži koeficijent difuzije među svim testiranim lipozomima, što je dovelo do najmanje mase aktivnih komponenti koje su prenete iz donorskog u akceptorski deo Francove difuzione ćelije.

Koeficijenti difuzije i difuzioni otpori nastali iz dvosloja lipozoma i filma određeni su analizom podataka iz studije oslobađanja. Na osnovu nagiba linearnog dela krive utvrđenog grafikonom $\ln\left(\frac{C_D^0 - C_R^0}{C_D - C_R}\right)$, u zavisnosti od vremena, t , izračunati su koeficijenti difuzije, D , polifenola iz lipozoma i filmova (slika 28). Nalazi su prikazani u tabeli 11 (kolona 2). U koloni 3 tabele 11 prikazani su rezultati proračuna ukupnog difuzionog otpora korišćenjem sledeće jednačine: $\ln\left(\frac{C_D^0 - C_R^0}{C_D - C_R}\right) = D\beta t$ (gde C_D^0 označava početnu koncentraciju polifenola u donorskom delu Francove difuzione ćelije, C_R^0 predstavlja početnu koncentraciju polifenola u akceptorskom delu Francove ćelije, C_D i C_R označava koncentraciju polifenola u donorskom i akceptorskom delu posle određenog vremenskog perioda, t , a β predstavlja geometrijsku komponentu za standardnu Francovu difuzionu ćeliju od 20 mL, $2,49 \times 10^{-4} \text{ m}^2$).

Tabela 11 Koeficijenti difuzije i otpor difuziji polifenola iz čistog ekstrakta latica *Paeoniatenuifolia* L., lipozoma sa ekstraktom, filma sa ekstraktom i filma sa lipozomima sa ekstraktom. D —koeficijent difuzije; R —ukupni otpor prenosu mase.

Uzorak	Koeficijent difuzije, D (m^2/s)	Ukupni otpor prenosu mase, R (s/m)
Ekstrakt	$2,88 \times 10^{-8}$	*141195,8
L75 SA + ekstrakt	$1,78 \times 10^{-8}$	228779,7
L53 MCT + ekstrakt	$1,49 \times 10^{-8}$	272894,2
LPh + ekstrakt	$8,50 \times 10^{-9}$	479176,4
Film + ekstrakt	$1,91 \times 10^{-8}$	574615,4
Film + LPh + ekstrakt	$1,53 \times 10^{-8}$	851842,1

*Otpor difuziji koji potiče od aceto-celulozne membrane.

Kao što je prikazano na slici 27, polifenoli su brzo difundovali iz rastvora ekstrakta, a količina polifenola u akceptorskom odeljku dostigla je plato nakon ~200 min. Bilo je očekivano da će oslobađanje polifenola iz lipozoma biti odloženo, te je u slučaju lipozoma sa inkapsuliranim ekstraktom nakon ~500 minuta, postignut plato, tj. *steady state*. Dobijeni rezultati potvrđuju da lipozomi mogu da zaštite i zadrže polifenole i da se koriste za njihovo produženo oslobađanje, što je važno za praktičnu upotrebu. Što se tiče uticaja različitih lipida koji se koriste u pripremi lipozoma, očigledno je da za tačne lipide (Phosal 75 SA i Phosal 53 MCT), prisustvo ulja (trigliceridi srednjeg lanca ili ulje šafranike/steroidi) poboljšava fluidnost membrane, što dovodi do smanjenog zadržavanja polifenola u ovim tipovima lipozoma [285]. Pošto se Fosfolipon sastoji samo od mešavine čvrstih fosfolipida (bez dodatka sterola ili triglicerida), membrana je u ovom slučaju bila čvršća/rigidnija, što je dovelo do prolongiranog oslobađanje polifenola iz ove vrste lipozoma. Shodno tome, nakon 90 min, ~69% ukupnih polifenola je oslobođeno iz rastvora ekstrakata, ~38% polifenola je oslobođeno iz SA 75 lipozoma sa ekstraktom latica, a oko 54% polifenola je oslobođeno iz MCT 53 lipozomi sa ekstraktom u poređenju sa 12% u slučaju lipozoma koji sadrže Fosfolipon. Dobijeni rezultati su direktno vezani za fluidnost membrane, koja je povećana u slučaju tečnih lipida, prisustvom ulja.

Oslobađanje polifenola iz CMC filmova je takođe prikazano na slici 27 i može se videti da je njihovo otpuštanje bilo mnogo sporije nego u slučaju lipozoma, što je i očekivano. Maksimalna količina polifenola oslobođena nakon 24 h iz CMC filmova bila je ~47%, što je količina koja je oslobođena iz rastvora čistog ekstrakta nakon samo 45 min. Ovo može biti zbog činjenice da se ravnoteža između difundovanih i zadržanih polifenola postiže za kraće vreme, jer film počinje da bubri, zatvarajući pore acetatno-celulozne membrane [143]. Kada je u pitanju CMC film sa Ph lipozomima koji sadrže ekstrakt latica stepskog božura, oslobađanje polifenola je bilo nešto niže nego u slučaju kada je ekstrakt bio inkapsuliran samo u film. To sugeriše da dvostruko inkapsuliranje ekstrakata (u lipozome, a zatim u filmove) povećava sposobnost zadržavanja polifenola. Očekuje se da ova vrsta formulacije duže zadržava polifenole, ali lipidi iz lipozoma imaju tendenciju da reaguju sa polimernim lancem CMC-a, formirajući micelle, što dovodi do orijentacije hidrosolubilnih komponenti ka akceptorskoj jedinici Francove difuzione ćelije, dok polifenoli koji potiču od ekstrakata ostaju zarobljeni u liposolubilnom delu lipozoma.

S obzirom na uočene promene u permeabilnosti dvoslojne membrane, očigledno je da polazne sirovine korišćene za inkapsulaciju ekstrakta latica *P. tenuifolia* u lipozome značajno utiču na otpor difuziji polifenola. Kao rezultat toga, kada je formulacija koja sadrži Fosfolipon korišćena umesto Phosal 75 SA ili 53 MCT lipida za formulaciju lipozoma, otpor fosfolipidnog dvosloja difuziji je bio dva puta veći. S druge strane, kao što se i očekivalo, najveći otpor difuziji polifenola kroz acetatnoo-celuloznu membranu bio je u slučaju filmova koji sadrže LPh lipozome sa ekstraktom latica. Ovo bi moglo biti posledica interakcija između polimernog lanca CMC i lipidne komponente lipozoma, što dovodi do formiranja micela, koje usporavaju oslobađanje polifenola iz inkapsulata [143].

4.13. Biološke aktivnosti inkapsulata

4.13.1. Antibakterijska aktivnost lipozoma

Tabela 12 prikazuje rezultate antibakterijske aktivnosti praznih i lipozoma sa ekstraktom latica *P. tenuifolia* protiv *S. aureus*, *P. vulgaris* i *S. lugdunensis* koji su prirodno prisutni na ljudskoj koži.

Tabela 12 Antibakterijska aktivnost praznih lipozoma i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L. (MIK i MBK, mg/mL).

	Bakterije					
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		<i>Proteus Vulgaris</i>	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
L75 SA	2.0	4.0	2.0	4.0	1.0	2.0
L53 MCT	1.0	2.0	2.0	4.0	2.0	4.0
LPh	1.0	2.0	4.0	8.0	2.0	4.0
L75 SA + ekstrakt	1.0	2.0	1.0	2.0	0.5	1.0
L53 MCT + ekstrakt	0.5	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0
LPh + ekstrakt	0.5	1.0	1.0	2.0	0.5	1.0
Ekstrakt latica	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
Gentamicin, kontrola	1.33	2.66	0.008	0.016	0.066	0.133

*Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK); Minimalna baktericidna koncentracija (MBK). Analiza je ponovljena tri puta, a najveća dobijena vrednost je korišćena kao MIK i MBK (korišćeno je pravilo „strožih kriterijuma“, kao što je uobičajeno u antimikrobnim testovima).

Prazni lipozomi su korišćeni kao kontrola uticaja lipida na antibakterijsku aktivnost lipozomalne suspenzije i pokazali su da je najperspektivniji L53 MCT, a zatim nešto manje efikasan LPh. S druge strane, lipozomi sa Fosfoliponom i ekstraktom pokazali su najbolje antibakterijsko dejstvo, pri čemu su bili najefikasniji su protiv *S. aureus* i *P. vulgaris* (MIK 0,5 mg/mL). Bakterija koja je pokazala najveću otpornost na uticaj svih pripremljenih lipozoma sa ekstraktom latica je *S. lugdunensis* (MIK 0,5–4 mg/mL).

Kao što je prikazano u tabeli 12, vrednosti MIC lipozoma su se kretale od 0,5 do 4,0 mg/mL za sve ispitane bakterijske sojeve. Rezultati su pokazali da je inkorporacija ekstrakta latica stepskog božura u lipozome pokazala bolji efekat protiv *S. aureus* nego kontrolni lek

(gentamicin). U slučaju preostala dva soja bakterija, *S. lugdunensis* i *P. vulgaris*, lipozomi sa ekstraktom su pokazali manju sposobnost da inhibiraju njihov rast nego kontrolni lek.

Prema rezultatima, MIK vrednosti formulacija lipozoma bile su niže za Gram-pozitivne bakterije (*S. aureus*). U tabeli 5 je prikazano da su Gram-pozitivne bakterije podložnije dejstvu ekstrakta latica uskolisnog božura, u poređenju sa Gram-negativnim bakterijama. Varijacije u strukturi bakterijskih ćelija uzrokuju razlike u osetljivosti na dejstvo bioaktivnih jedinjenja iz biljnih ekstrakata. Visoke koncentracije peptidoglikana u ćelijskom zidu Gram-pozitivnih bakterija omogućavaju komponentama da prodru u ćelije. Međutim, kod Gram-negativnih bakterija, dvoslojna membrana zasnovana na lipopolisaharidima je pričvršćena za unutrašnju membranu, što ne samo da doprinosi antigenosti, toksičnosti i virulenciji pomenutih bakterija, već utiče i na smanjenje permeabilnosti, tj. prolaska aktivnih jedinjenja u unutrašnjost bakterijske ćelije [248]. Hidrofilna i hidrofobna fenolna jedinjenja, uključujući flavonoide, aromatične estre i kiseline, koja su prisutna u ekstraktu latica *P. tenuifolia* su osnova za antibakterijsku aktivnost. Osim toga, lipidne komponente lipozoma stupaju u interakciju sa hidrofobnim metabolitima iz bakterija, što dovodi do supresije njihovog rasta [286]. Kada se ekstrakti latica inkapsuliraju u liposome, formiraju se micle u kojima se hidrofobne komponente zadržavaju unutar vezikula, dok su hidrofilne u direktnom kontaktu sa bakterijskim ćelijama, pokazujući tako sinergističko antibakterijsko delovanje i lipozoma i ekstrakta. Zbog slične strukture bakterijskih ćelija i lipozoma značajno je olakšan ulazak biološki aktivnih komponenata iz ekstrakta u bakterijsku ćeliju, uz povećanje antibakterijskog potencijala.

4.13.2. Antifungalna aktivnost lipozoma

Dobijeni lipozomi sa ekstraktom latica stepskog božura su testirani na gljivice koje se nalaze na ljudskoj koži, *C. albicans*, *C. kefyri* i *C. krusei* i rezultati su prikazani u tabeli 13. MIK se definiše kao najniža koncentracija antifungalnog agensa potrebna da inhibira rast gljivica i dobija se serijskim razblaživanjem, dok MFK vrednost predstavlja minimalnu koncentraciju biološki aktivnih jedinjenja potrebnu da ubije gljivice.

Tabela 13 Antikandidalna aktivnost praznih lipozoma i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L. (MIK i MFK, mg/mL).

	Gljivice					
	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida kefyri</i>		<i>Candida krusei</i>	
	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK
L75 SA	4.0	8.0	4.0	8.0	4.0	8.0
L53 MCT	4.0	8.0	8.0	16.0	4.0	8.0
LPh	4.0	8.0	8.0	16.0	0.5	1.0
L75 SA + ekstrakt	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0
L53 MCT + ekstrakt	2.0	4.0	2.0	4.0	1.0	2.0
LPh + ekstrakt	2.0	4.0	2.0	4.0	0.25	0.5
Ekstrakt latica	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
Ketokonazol, kontrola	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1

*Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK); Minimalna fungicidna koncentracija (MFK).

Ketokonazol je korišćen kao standardni antifungalni lek u paralelnim eksperimentima kako bi se kontrolisala osetljivost ispitivanih sojeva gljiva. Svi lipozomi sa ekstraktom latica *P. tenuifolia* imali su umerenu antifungalnu aktivnost prema testiranim sojevima *Candida*. Međutim, najveći antifungalni efekat postignut je prema *C. krusei*, kada je Fosfolipon korišćen kao lipid za pripremu lipozoma sa ekstraktom latica. Vrednosti MIK lipozoma u slučaju *C. krusei* kretale su se u rasponu od 0,25–4 mg/mL, dok su se vrednosti MFK kretale od 0,5–8 mg/mL. Lipozomi su bili najmanje efikasni u inhibiciji rasta *C. kefyr*, pošto su vrednosti MIK porasle do 8 mg/mL. Antifungalna aktivnost testiranih lipozoma opadala je sledećim redosledom: LPh + ekstrakt > L53 MCT + ekstrakt > L75 SA + ekstrakt > LPh > L53 MCT ≥ L75 SA. Rezistentnost sojeva gljivica na lipozome sa ekstraktom opadala je sledećim trendom: *C. krusei* > *C. albicans* > *C. kefyr*.

Fosfolipidi predstavljaju odgovarajuće nosače za biljne ekstrakte, jer mogu da smanje njihovu isparljivost i povećaju efikasnost. Dodatno, dvoslojna lipidna struktura koja oponaša ćelijske membrane može da omogući fuziju sa membranama gljivica, oslobađajući inkapsulirani ekstrakt na ćelijske membrane ili u unutrašnji deo mikroorganizama. Vrednosti MFK su se kretale od 1,0 do 16,0 mg/mL za prazne lipozome, dok je za one sa ekstraktom, opseg bio od 0,5 do 4,0 mg/mL. Među vrstama *Candida* koje su korišćene za testiranje, sve tri su bile podjednako osetljive na uticaj čistog ekstrakta latica, dok je u slučaju lipozoma sa ekstraktom, *C. krusei* bila najpodložnija njihovom uticaju, a zatim *C. albicans*, što čini *C. kefyr* najotpornijim sojem *Candida*. Prosečna MFK za lipozome sa ekstraktom je generalno bila udvostručena vrednost MFK čistog ekstrakta (zbog razblaženja ekstrakta koje nastaje pripremom lipozoma). Sposobnošću lipozoma da oponašaju ćelijske membrane, olakšava se interakcija bioaktivnih jedinjenja, kako iz smeše fosfolipida, tako i iz ekstrakta latica, sa ćelijama gljivica, čime se omogućava antifungalni potencijal [287]. Ekstrakti inkapsulirani u lipozome imaju produženu aktivnost, u poređenju sa slobodnim ekstraktom latica, zbog kontrolisanog oslobađanja bioaktivnih sastojaka.

4.13.3. Antibakterijska aktivnost biopolimernih filmova

Antibakterijska aktivnost filmova sa ekstraktom i lipozomima sa inkapsuliranim ekstraktom je ispitana i na Gram-pozitivne (*S. aureus* i *S. lugdunensis*) i na Gram-negativne bakterije (*P. vulgaris*) u disk difuzionoj metodi. Rezultati antibakterijskog potencijala filmova prikazani su u tabeli 14.

Tabela 14 Prečnici zona inhibicije u disk difuzionoj metodi za bakterijske sojeve.

Bakterija	Uzorak	Zona inhibicije, mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	Film sa lipozomima i ekstraktom	/
	Film sa ekstraktom (0.2 g)	15.34±4.77
	Film sa ekstraktom (0.4 g)	27.83±9.13
	Streptomycin	26.00±1.21
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Film sa lipozomima i ekstraktom	/
	Film sa ekstraktom (0.2 g)	9.34±1.67
	Film sa ekstraktom (0.4 g)	23.00±4.46
	Streptomycin	27.24±2.44
<i>Proteus</i>	Film sa lipozomima i ekstraktom	7.50±1.10

<i>vulgaris</i>	Film sa ekstraktom (0.2 g)	13.66±5.32
	Film sa ekstraktom (0.4 g)	30.16±13.19
	Streptomycin	27.33±4.53

*Film + 0,2 g (0,4 g) ekstrakta biopolimerni filmovi sa različitom količinom ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L. (0,2 g i 0,4 g), Film+ LPh + ekstrakt - biopolimerni film u koji su inkorporirani lipozomi na bazi Fosfolipona, u koje je inkapsuliran ekstrakt latica *Paeonia tenuifolia* L.

U disk difuzionoj metodi merene su zone inhibicije nastale nakon primene filmova. Zone inhibicije su bile u opsegu od 7,50 mm – 30,16 mm (Tabela 14). Najosetljivija bakterija bila je *P. vulgaris* sa zonom inhibicije od 30,16 mm, a zatim *S. aureus* sa zonom inhibicije od 27,83 mm, kada su testirani u prisustvu filma sa ekstraktom koji sadrži 0,4 g ekstrakta latica *P. tenuifolia*. Biopolimerni film koji je sadržao lipozome sa inkapsuliranim ekstraktom nije pokazao aktivnost protiv *S. aureus* i *S. lugdunensis* (nije postojala zona inhibicije), dok je protiv *P. vulgaris* aktivnost bila vrlo niska (zona inhibicije je iznosila 7,50 mm).

Činilo se da film koji sadrži čist ekstrakt latica stepskog božura pokazuje značajnu antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus* i *S. lugdunensis*, kao i *P. vulgaris*. Filmovi pripremljeni sa čistim ekstraktom latica imali su zonu inhibicije u rasponu od 13,7 do 30,17 mm u zavisnosti od testiranog soja bakterija i količine ekstrakta ugrađenog u filmove, što je bilo znatno veće nego u slučaju filmova sa lipozomima, koji nisu imali nikakvu aktivnost u suzbijanju rasta ispitivanih sojeva stafilokoka. Kao što se očekivalo, ugradnja lipozoma u koje je inkorporiran ekstrakt u filmove smanjila je antimikrobni kapacitet filmova.

Zona inhibicije filmova pripremljenih sa slobodnim ekstraktom latica *P. tenuifolia* bila je mnogo veća nego kod filmova pripremljenih sa inkapsuliranim ekstraktom latica, kao što je prikazano u Tabeli 14. Ovi rezultati se mogu pripisati inkapsulaciji biološki aktivnih jedinjenja unutar lipozoma, što ograničava njihovo oslobađanje na površinu podloge i dovodi do toga da prisutna jedinjenja pokazuju minimalnu antibakterijsku aktivnost [288]. Imran [289] je imao slične nalaze, pošto je otkriveno da je oslobađanje bioaktivnih supstanci zarobljenih na nanolipozomima veoma dugotrajan proces.

4.13.4. Antifungalna aktivnost biopolimernih filmova

Dobijeni biopolimerni filmovi su podvrgnuti ispitivanju antifungalne aktivnosti na dva soja *Candida* (*C. kefyr* i *C. krusei*), a prečnici zona inhibicije rasta su prikazani u tabeli 15. *C. albicans* je takođe testirana, ali nije rasla na korišćenim podlogama, tako da rezultati za ovaj soj nisu dobijeni.

Tabela 15 Prečnici zona inhibicije u testu difuzije diska za sojeve *Candida*.

Gljivice	Uzorak	Zona inhibicije, mm
<i>Candida kefyr</i>	Film sa lipozomima i ekstraktom	/
	Film sa ekstraktom (0.2 g)	15.16±3.70
	Film sa ekstraktom (0.4 g)	35.16±11.22
	Ketokonazol	25.42±1.22
<i>Candida krusei</i>	Film sa lipozomima i ekstraktom	/
	Film sa ekstraktom (0.2 g)	10.33±1.25

Film sa ekstraktom (0.4 g)	20.83±5.10
Ketokonazol	27.48±3.34

*Film + 0,2 g (0,4 g) ekstrakta biopolimerni filmovi sa različitim količinom ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L. (0,2 g i 0,4 g), Film+ LPh + ekstrakt - biopolimerni film u koji su inkorporirani lipozomi na bazi Fosfolipona, u koje je inkapsuliran ekstrakt latica *Paeonia tenuifolia* L.

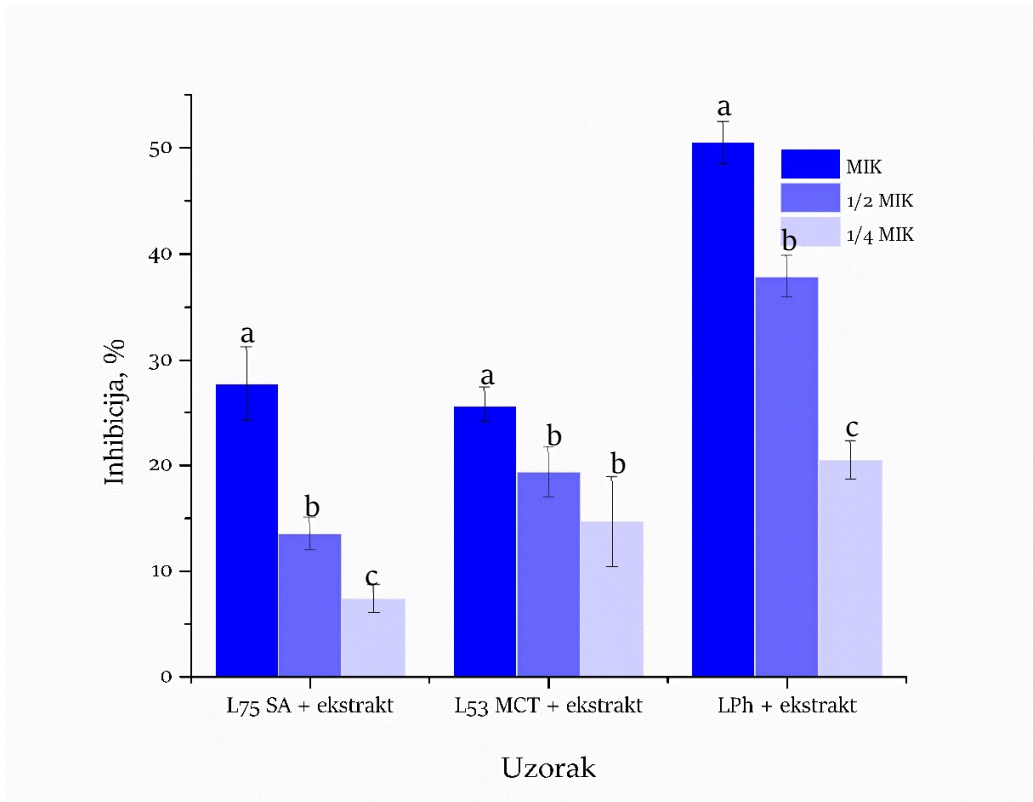
Kada je sproveden test difuzije diska na sojevima *Candida* od interesa, zone inhibicije su varirale od 10,33 mm – 35,16 mm (tabela 15). U slučaju filmova koji su sadržali ekstrakt u njegovoj slobodnoj formi, antifungalna aktivnost je postajala veća, sa povećanjem količine ekstrakta prisutne u filmu. Film sa ekstraktom pokazao je povećanje njihove sposobnosti da inhibiraju rast gljivica kako je količina ekstrakta inkapsuliranog u filmovima postajala veća. Zona inhibicije je bila najveća kada je korišćen film koji sadrži 0,4 g ekstrakta latica *P. tenuifolia* na soju *C. kefyra*.

Tabela 15 prikazuje prečnik zone inhibicije rasta *C. kefyra* i *C. krusei* na medijumu sa filmovima u koji su inkorporirani lipozomi i onima koji sadrže samo čiste ekstrakte latica *P. tenuifolia*. Zona inhibicije bila je najveća za filmove koji sadrže 0,4 g ekstrakta latica, dostižući vrednost od 35,17 mm u zoni na kojoj je rast *C. krusei* onemogućen. Veći rast mikroba u pločama na kojima je upotrebljen film sa lipozomima, nego u onima koje sadrže one sa ekstraktom, može se primetiti u tabeli 15. Ovo ukazuje na to da oni nisu posedovali antimikrobnu aktivnost, kao što se očekivalo za filmove sa lipozomima. Ugradnja lipozoma nije poboljšala antifungalni potencijal filmova. U ovom slučaju, potrebno je još nekoliko dana analize kako bi se procenilo da li postoji značajna antimikrobna aktivnost. Ovi ishodi se mogu objasniti lipozomalnom inkapsulacijom aktivnih supstanci, koja sprečava njihovo oslobađanje na površini podloge, kao i ograničenom antifungalnom aktivnošću ekstrakta latica stepskog božura nakon inkapsulacije.

Studija koju je sproveo Imran [289] otkrila je da je sastav lipozoma važan faktor koji treba uzeti u obzir kako bi se kontrolisalo oslobađanje aktivnih jedinjenja. Pored toga, Imran i sar. [290] primetili su da najveća antimikrobna aktivnost odgovara filmovima koji sadrže i slobodni inkapsulirani antimikrobni jedinjenja. Ovaj rezultat pokazuje da je u početnom trenutku neophodno da mala količina bioaktivnih jedinjenja bude u slobodnom obliku, tako da se rast mikroba može suzbijati sve dok se bioaktivne supstance ne oslobode iz lipozoma.

4.13.5. Antibiofilm aktivnost lipozoma

Ekstrakti latica koji su inkorporirani u lipozome u ovom istraživanju, prethodno su testirani na njihovu antibiofilm aktivnost u slučaju bakterije *S. lugdunensis*. Stoga su svi pripremljeni lipozomi sa ekstraktom latica testirani u smislu antibiofilm aktivnosti protiv gorepomenute bakterije. Rezultati su predstavljeni na slici 29.



Slika 29 Formiranje biofilma *Staphylococcus lugdunensis* (nakon tretmana lipozomima sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L.) *različita slova u svakoj grupi podataka (SA 75 + latice, MCT 53 + latice i Ph + latice) pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$; $n = 3$, one-way ANOVA, Dankanov post hoc test)

S obzirom da su ekstrakti latica prikupljenih u Gulenovcima u prethodnom koraku istraživanja pokazali najbolju inhibitornu aktivnost protiv sojeva bakterija *S. lugdunensis* [124], ova bakterija je izabrana za procenu antibiofilm aktivnosti ekstrakata latica kada su inkapsulirani u lipozome. Lipozomi pripremljeni korišćenjem Fosfolipona pokazali su najviši nivo inhibicije formiranja biofilma, sa 50,52% inhibicije pri koncentraciji jednakoj MIK, a zatim slede lipozomi koji sadrže SA 75, koji su bili bolji od najmanje efikasnih (L53 MCT + ekstrakt) zasamo 2%. Nivo inhibicije je primetno opao upotrebom nižih koncentracija lipozoma.

U prethodnom stupnju istraživanja, koji je prikazan kroz rad Čutović i sar. [124] primećena je obećavajuću sposobnost ekstrakta latica *P. tenuifolia* sakupljenih u Gulenovcima da inhibira stvaranje biofilma *S. lugdunensis*. Rezultati ovog testa, izvršenog na lipozomima, prikazani su na slici 29 i ukazuju na to da lipozomi pripremljeni sa ekstraktom latica stepskog božura i Fosfolipona poseduju najveći antibiofilm potencijal. Ovaj tip lipozoma je pokazao efekat antibiofilm delovanja koji je dvostruko veći nego kod preostala dva tipa. Dakle, moglo bi se pretpostaviti da je to zbog sinergističkog efekta visokog sadržaja polifenola u ekstraktu [124] i lipida prisutnih u Fosfoliponu. Kombinovani efekat lipozoma sačinjenih od Phosal 75 SA ili Phosal 53 MCT i ekstrakta latica *P. tenuifolia* bi mogao biti posledica složenijih interakcija između lipida i ekstrakta, što rezultira dužim periodom potrebnim da bioaktivne komponente dodju u kontakt sa patogenima [289].

5. Zaključak

Ispitivanja koja su izvršena u okviru doktorske disertacije uključivala su optimizaciju procesa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz latica stepskog božura, hemijsku i biološku karakterizaciju dobijenih ekstrakata i inkapsulaciju odabranog ekstrakta u lipozome i biopolimerne filmove. Na osnovu postavljenih ciljeva, urađenih analiza, dobijenih rezultata i njihove detaljne analize, doneti su sledeći zaključci:

- ~ Kada je voda korišćena kao medijum za ekstrahovanje polifenolnih jedinjenja iz latica, ekstrakcija mikrotalasima se pokazala najpogodnija metoda za dobijanje ekstrakata sa blagotvornim efektima vezanim za promene na ljudskoj koži.
- ~ Hemijska karakterizacija ekstrakta latica stepskog božura pokazala je da fenolne kiseline čine najdominantniju grupu bioaktivnih komponenata, uključujući galnu, elaginsku, *p*-kumarinsku i ferulansku kiselinu. U ekstraktu su detektovane i komponente koje su specifične za *Paeonia* takson, kao što su paeonin B, paeoniflorin i paeoniflorigenon.
- ~ Ekstrakti latica ispoljavaju dobru antimikrobnu aktivnost na patogene ljudske kože. Najefikasniji su u inhibiciji rasta bakterije *S. lugdunensis* i gljivice *C. kefyri*.
- ~ Rezultati su pokazali da ekstrakti nisu toksični i da neki od njih (vodeni ekstrakt latica iz Gulenovaca dobijen mikrotalasnom ekstrakcijom, metanolni ekstrakti latica iz Gulenovaca dobijeni primenom sve tri ispitane metode, metanolni ekstrakti latica iz Pančeva, dobijenih ekstrakcijama potpomognutim ultrazvukom i mikrotalasima, kao i metanolni ekstrakti latica iz Deliblatske peščare dobijeni maceracijom i ekstrakcijom potpomognutom mikrotalasima) dovode do ubrzanog rasta ćelija.
- ~ Vodeni ekstrakt latica sakupljenih na Gulenovcima dobijen MAE metodom pokazao je sposobnost pospešivanja zarastanja rana.
- ~ Rezultati bioloških testova su utvrdili da su latice sa najvećim biološkim potencijalom prikupljene sa lokaliteta Gulenovci i da je metil alkohol najpodesniji ekstrakcioni medijum. Optimalna metoda ekstrakcije varirala je u zavisnosti od primenjenog biološkog testa, ali je u najvećem broju slučajeva najbolje rezultate dala ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima.
- ~ Efikasnost inkapsulacije polifenola latica stepskog božura u lipozome je varirala u zavisnosti od lipidne smeše koja se koristila za pripremu, te je pokazala najveću vrednost kada je korišćen Fosfolipon.
- ~ Dodavanje ekstrakata latica u lipozome dovodi do smanjenja stabilnosti; smanjuje se vrednosti zeta potencijala uz povećanje veličine čestica, što dovodi do agregacije čestica i taloženja. Najstabilniji su bili lipozomi LPh + ekstrakt i L53 MCT + ekstrakt.
- ~ Hemijska karakterizacija svih lipozoma i filmova potvrdila je da je proces inkapsulacije bio uspešan, čineći oslobađanje bioaktivnih komponenti ekstrakta sporijim.
- ~ Lipozomi sa inkapsuliranim ekstraktom latica, koji sadrže Fosfolipon kao polaznu fosfolipidnu smešu, pokazali su se kao najefikasniji u inhibiciji rasta bakterija i gljivica i formiranja bakterijskog biofilma. Ipak, daljom inkapsulacijom u CMC filmove nije postignuta inhibicija rasta bakterija ni gljivica, što sugeriše da se oslobađa nedovoljna količina bioaktivnih supstanci.

- ~ Ispitivanje morfoloških svojstava biopolimernih filmova primenom skenirajuće elektronske mikroskopije pokazalo je da su lipozomi sa inkorporiranim ekstraktom latica zadržali svoj globularni oblik prilikom dalje inkapsulacije u filmove, čuvajući svoju strukturu.
- ~ Rezultati ispitivanja mehaničkih svojstava biopolimernih filmova upućuju na zaključak da se dodavanjem veće količine ekstrakata latica značajno poboljšava čvrstina sistema. Kod biopolimernih filmova sa lipozomima u koje su inkapsulirani ekstrakti, to nije bio slučaj.
- ~ Fosfolipon je bolja fosfolipidna smeša za pripremu lipozoma u koje su inkapsulirani ekstrakti latica *P. tenuifolia* nego Phosal 75 SA ili Phosal 53 MCT. Ipak, inkapsulacija ovih lipozoma u biopolimerne filmove se ne može preporučiti za oslobađanje bioaktivnih supstanci za primenu na kožu. Stoga je dalja istraživanja potrebno usmeriti ka razvoju drugačijih, čvrstih ili polučvrstih formulacija sa lipozomima na bazi Fosfolipona u kojima su inkorporirani ekstrakti latica stepskog božura.

Na osnovu dobijenih rezultata, detaljnog i sveobuhvatnog pregleda literature, naučni doprinos ove doktorske disertacije ogleda se u definisanju postupka izrade transdermalnog sistema za otpuštanje polifenolnih jedinjenja latica stepskog božura, usled čega se može obezbediti viši nivo njihove bioraspodivnosti, ali i poboljšan profil otpuštanja. Zbog svega pomenutog, rezultati dobijeni tokom izrade ove doktorske disertacije imaju, pre svega, fenomenološki značaj za opisivanje jednog savremenog i ekološki prihvatljivog proizvoda sa prirodnim bioaktivnim jedinjenjima i biokompatibilnim nosačima.

6. Literatura

1. Ji, L.; Wang, Q.; da Silva, J.A.T.; Yu, X.N. The Genetic Diversity of *Paeonia* L. *Sci Hortic* **2012**, *143*, 62–74.
2. De-Yuan, H.; Kai-Yu, P.A.N.; De-Yuan, H.; Kai-Yu, P.A.N. Taxonomical History and Revision of *Paeonia* Sect. Moutan (Paeoniaceae). *J Syst Evol* **1999**, *37*, 351.
3. Marković, T.; Prijić, Ž.; Xue, J.; Zhang, X.; Radanović, D.; Ren, X.; Filipović, V.; Lukić, M.; Gordanić, S. The Seed Traits Associated with Dormancy and Germination of Herbaceous Peonies, Focusing on Species Native in Serbia and China. *Horticulturae* **2022**, *8*, 585.
4. Hong, D.-Y.; Zhou, S.-L. *Peonies of the World: Phylogeny and Evolution*; Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew, 2021; ISBN 1842467379.
5. *Paeonia: Classification and Overview of Peony Species*.
6. Lazarević, P.; Stojanović, V. Wild Peonies (*Paeonia* L.): In Serbia: The Distribution, State of Populations, Threats and Protection. *Zaštita prirode* **2012**, *62*, 19–44.
7. Stevanović, V. *The Red Data Book of Flora of Serbia 1. Extinct and Critically Endangered Taxa*; Stevanovic Vladimir, Ed.; 1st ed.; Ministry of Environmental Protection of Republic of Serbia: Belgrade, 1999;
8. Službeni glasnik Republike Srbije Zakon o Zaštiti Prirode (“Službeni Glasnik Republike Srbije”, Br. 36/09, 88/10, 91/10, 14/16 i 95/18).
9. Kvashin, V.; Tsakhkhaeva, Z.; Shamarina, M.; Toguzova, A.; Morozova, E. Phytochemical Composition of the Underground Part of *Paeonia tenuifolia* L. and Leaves of *Petrocoma hoefftiana* (Fisch.) Rupr. In Proceedings of the E3S Web of Conferences; EDP Sciences, 2023; Vol. 411, p. 02034.
10. S.E. Sokolov; I.P. Zamotaev *Handbook of Medicinal Plants, Phytotherapy* ; Metallurgy: Moscow, 1989;
11. Zhang, J.-J.; Li, W.; Wang, L.-L.; Huang, Y.-F.; Wang, C.; Wang, J.-X.; Huang, B.; Gao, X.-M. Varieties, Functions and Clinical Applications of Chishao and Baishao: A Literature Review. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2013**, *38*, 3595–3601.
12. Wu, X.M.; Yang, Y.Y.; Zhao, L.H. Exploration about the Clinical Application and Dosage of Rhizoma *Dioscorea nipponicae*. *Jilin J Chin Med* **2019**, *39*, 165–168.
13. Zhu, X.-L.; Chen, J.-J.; Han, F.; Pan, C.; Zhuang, T.-T.; Cai, Y.-F.; Lu, Y.-P. Novel Antidepressant Effects of Paeonol Alleviate Neuronal Injury with Concomitant Alterations in BDNF, Rac1 and RhoA Levels in Chronic Unpredictable Mild Stress Rats. *Psychopharmacol (Berl)* **2018**, *235*, 2177–2191.
14. Ahmad, M.; Malik, K.; Tariq, A.; Zhang, G.; Yaseen, G.; Rashid, N.; Sultana, S.; Zafar, M.; Ullah, K.; Khan, M.P.Z. Botany, Ethnomedicines, Phytochemistry and Pharmacology of Himalayan Paeony (*Paeonia emodi* Royle.). *J Ethnopharmacol* **2018**, *220*, 197–219.

15. Ahmad, F.; Tabassum, N.; Rasool, S. Medicinal Uses and Phytoconstituents of *Paeonia officinalis*. *Int Res J Pharm* **2012**, *3*, 85–87.
16. Riaz, N.; Anis, I.; Malik, A.; Ahmed, Z.; Muhammad, P.; Nawaz, S.A.; Choudhary, M.I. Paeonins A and B, Lipoxxygenase Inhibiting Monoterpene Galactosides from *Paeonia emodi*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2003**, *51*, 252–254.
17. Uphof, J.C.T. Dictionary of Economic Plants. *Dictionary of economic plants*. **1959**.
18. *Paeonia officinalis* Subs. Officinalis. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77173114-1>. Posećeno 20.03.2024.
19. Liu, P.; Shao, X.Q.; Ding, Y.F.; Liu, X.D.; Wang, T.L.; Wang, X.R. Comparison of Nutrient Contents in Petals of Different Herbaceous Peony Cultivars. *North Hortic* **2014**, *1*, 151–153.
20. Sun, J.; Jiang, Y.; Tao, J. Research Progress on Edible Value of *Paeonia suffruticosa* and *Paeonia lactiflora*. *Jiangsu Agric. Sci* **2018**, *46*, 10–14.
21. Akula, R.; Ravishankar, G.A. Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. *Plant Signal Behav* **2011**, *6*, 1720–1731.
22. Teoh, E.S. Medicinal Orchids of Asia. **2016**.
23. Hussein, R.A.; El-Ansary, A.A. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. *Her Med* **2019**, *1*.
24. Goławska, S.; Sprawka, I.; Łukasik, I.; Goławski, A. Are Naringenin and Quercetin Useful Chemicals in Pest-Management Strategies? *J Pest Sci (2004)* **2014**, *87*, 173–180.
25. Harborne, J.B.; Baxter, H.; Moss, G.P.A. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. *Phytochemical dictionary* **1993**, *35*, 36–37.
26. Evans, W.C. *Trease and Evans' Pharmacognosy*; Elsevier Health Sciences, 2009; ISBN 0702041890.
27. Zbigniew, S.; Beata, Ż.; Kamil, J.; Roman, F.; Barbara, K.; Andrzej, D. Antimicrobial and Antiradical Activity of Extracts Obtained from Leaves of Three Species of the Genus *Pyrus*. *Microbial Drug Resistance* **2014**, *20*, 337–343.
28. Amann, R.; Peskar, B.A. Anti-Inflammatory Effects of Aspirin and Sodium Salicylate. *Eur J Pharmacol* **2002**, *447*, 1–9.
29. Pelczar, M.J.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R. Control of Microorganisms, the Control of Microorganisms by Physical Agents. *Microbiology (N Y)* **1988**, *469*, 509.
30. Montanher, A.B.; Zucolotto, S.M.; Schenkel, E.P.; Fröde, T.S. Evidence of Anti-Inflammatory Effects of *Passiflora edulis* in an Inflammation Model. *J Ethnopharmacol* **2007**, *109*, 281–288.

31. Serafini, M.; Peluso, I.; Raguzzini, A. Flavonoids as Anti-Inflammatory Agents. *Proceedings of the Nutrition Society* **2010**, *69*, 273–278.
32. Hoffmann, D. *Medical Herbalism: The Science and Practice of Herbal Medicine*; Simon and Schuster, 2003; ISBN 1594778906.
33. Chen, D.; Daniel, K.G.; Kuhn, D.J.; Kazi, A.; Bhuiyan, M.; Li, L.; Wang, Z.; Wan, S.B.; Lam, W.H.; Chan, T.H. Green Tea and Tea Polyphenols in Cancer Prevention. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **2004**, *9*, 2618–2631.
34. Lainé, E.; Hano, C.; Lamblin, F. Lignans. Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors 2009.
35. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 586–621.
36. Nayak, B.; Liu, R.H.; Tang, J. Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains—a Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2015**, *55*, 887–918.
37. Tungmunnithum, D.; Thongboonyou, A.; Pholboon, A.; Yangsabai, A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines* **2018**, *5*, 93.
38. Younas, M.; Hano, C.; Giglioli-Guivarc’h, N.; Abbasi, B.H. Mechanistic Evaluation of Phytochemicals in Breast Cancer Remedy: Current Understanding and Future Perspectives. *RSC Adv* **2018**, *8*, 29714–29744.
39. Ratnam, D.V.; Ankola, D.D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D.K.; Kumar, M.N.V.R. Role of Antioxidants in Prophylaxis and Therapy: A Pharmaceutical Perspective. *J Control release* **2006**, *113*, 189–207.
40. Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M.; Aggarwal, B.B. Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked? *Free Radic Biol Med* **2010**, *49*, 1603–1616.
41. Fraga, C.G.; Galleano, M.; Verstraeten, S. V; Oteiza, P.I. Basic Biochemical Mechanisms behind the Health Benefits of Polyphenols. *Mol Aspects Med* **2010**, *31*, 435–445.
42. Perron, N.R.; Brumaghim, J.L. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem Biophys* **2009**, *53*, 75–100.
43. Compaore, M.; Bakasso, S.; Meda, R.N.T.; Nacoulma, O.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Fractions from *Bidens engleri* OE Schulz (Asteraceae) and *Boerhavia erecta* L.(Nyctaginaceae). *Medicines* **2018**, *5*, 53.
44. Nwidu, L.L.; Alikwe, P.C.N.; Elmorsy, E.; Carter, W.G. An Investigation of Potential Sources of Nutraceuticals from the Niger Delta Areas, Nigeria for Attenuating Oxidative Stress. *Medicines* **2019**, *6*, 15.

45. Minami, M.; Konishi, T.; Makino, T. Effect of Hochuekkito (Buzhongyiqitang) on Nasal Cavity Colonization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Murine Model. *Medicines* **2018**, *5*, 83.
46. Hano, C.; Tungmunnithum, D. Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases. *Medicines* **2020**, *7*, 26.
47. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios AEMPS LOS LÍDERES MUNDIALES REUNIDOS EN LA ASAMBLEA GENERAL DE LAS NACIONES UNIDAS SE COMPROMETEN A ADOPTAR UNA ESTRATEGIA CONTRA LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.
48. Asokan, G. V; Ramadhan, T.; Ahmed, E.; Sanad, H. WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman Med J* **2019**, *34*, 184.
49. Rice, L.B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis* **2008**, *197*, 1079–1081.
50. Mulani, M.S.; Kamble, E.E.; Kumkar, S.N.; Tawre, M.S.; Pardesi, K.R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 539.
51. WHO WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed.
52. Fraga, C.G.; Croft, K.D.; Kennedy, D.O.; Tomás-Barberán, F.A. The Effects of Polyphenols and Other Bioactives on Human Health. *Food Funct* **2019**, *10*, 514–528.
53. Daglia, M. Polyphenols as Antimicrobial Agents. *Curr Opin Biotechnol* **2012**, *23*, 174–181.
54. Skroza, D.; Šimat, V.; Smole Možina, S.; Katalinić, V.; Boban, N.; Generalić Mekinić, I. Interactions of Resveratrol with Other Phenolics and Activity against Food-borne Pathogens. *Food Sci Nutr* **2019**, *7*, 2312–2318.
55. Efenberger-Szmechtyk, M.; Nowak, A.; Czyzowska, A. Plant Extracts Rich in Polyphenols: Antibacterial Agents and Natural Preservatives for Meat and Meat Products. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2021**, *61*, 149–178.
56. Olszewska, M.A.; Gędas, A.; Simões, M. Antimicrobial Polyphenol-Rich Extracts: Applications and Limitations in the Food Industry. *Int Food Res J* **2020**, *134*, 109214.
57. Papuc, C.; Goran, G. V; Predescu, C.N.; Nicorescu, V.; Stefan, G. Plant Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-life Extension of Meat and Meat Products: Classification, Structures, Sources, and Action Mechanisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **2017**, *16*, 1243–1268.
58. Cowan, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* **1999**, *12*, 564–582.

59. Wu, T.; Zang, X.; He, M.; Pan, S.; Xu, X. Structure–Activity Relationship of Flavonoids on Their Anti-*Escherichia coli* Activity and Inhibition of DNA Gyrase. *J Agric Food Chem* **2013**, *61*, 8185–8190.
60. Liu, H.; Mou, Y.; Zhao, J.; Wang, J.; Zhou, L.; Wang, M.; Wang, D.; Han, J.; Yu, Z.; Yang, F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Molecules* **2010**, *15*, 7933–7945.
61. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The scientific world journal* **2013**, *2013*.
62. Field, J.A.; Lettinga, G. Toxicity of Tannic Compounds to Microorganisms. In *Plant polyphenols: Synthesis, properties, significance*; Springer, 1992; pp. 673–692.
63. Donlan, R.M.; Costerton, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **2002**, *15*, 167–193.
64. Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic Resistance of Bacterial Biofilms. *Int J Antimicrob Agents* **2010**, *35*, 322–332.
65. Maisonneuve, E.; Gerdes, K. Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters. *Cell* **2014**, *157*, 539–548.
66. Rutherford, S.T.; Bassler, B.L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2*, a012427.
67. Ventola, C.L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 2: Management Strategies and New Agents. *Pharmacy and Therapeutics* **2015**, *40*, 344.
68. Pereira, D.M.; Valentão, P.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules* **2009**, *14*, 2202–2211.
69. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 586–621.
70. Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. Recent Advances in Understanding the Antibacterial Properties of Flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* **2011**, *38*, 99–107.
71. Gyawali, R.; Ibrahim, S.A. Natural Products as Antimicrobial Agents. *Food Control* **2014**, *46*, 412–429.
72. Silva, L.N.; Zimmer, K.R.; Macedo, A.J.; Trentin, D.S. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chem Rev* **2016**, *116*, 9162–9236.
73. Samanta, A.; Das, G.; Das, S.K. Roles of Flavonoids in Plants. *Carbon N Y* **2011**, *100*, 12–35.

74. Mirzoeva, O.K.; Grishanin, R.N.; Calder, P.C. Antimicrobial Action of Propolis and Some of Its Components: The Effects on Growth, Membrane Potential and Motility of Bacteria. *Microbiol Res* **1997**, *152*, 239–246.
75. Wu, D.; Kong, Y.; Han, C.; Chen, J.; Hu, L.; Jiang, H.; Shen, X. D-Alanine: D-Alanine Ligase as a New Target for the Flavonoids Quercetin and Apigenin. *Int J Antimicrob Agents* **2008**, *32*, 421–426.
76. Ávila, H.P.; Smânia, E. de F.A.; Delle Monache, F.; Júnior, A.S. Structure–Activity Relationship of Antibacterial Chalcones. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 9790–9794.
77. Sansonetti, P.J. Bacterial Pathogens, from Adherence to Invasion: Comparative Strategies. *Med Microbiol Immunol* **1993**, *182*, 223–232.
78. Finlay, B.B. Cell Adhesion and Invasion Mechanisms in Microbial Pathogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **1990**, *2*, 815–820.
79. Hoepelman, A.I.; Tuomanen, E.I. Consequences of Microbial Attachment: Directing Host Cell Functions with Adhesins. *Infect Immun* **1992**, *60*, 1729–1733.
80. Howell, A.B.; Vorsa, N.; Marderosian, A. Der; Foo, L.Y. Inhibition of the Adherence of P-Fimbriated *Escherichia coli* to Uroepithelial-Cell Surfaces by Proanthocyanidin Extracts from Cranberries. *N Engl J Med* **1998**, *339*, 1085–1086.
81. Howell, A.B.; Reed, J.D.; Krueger, C.G.; Winterbottom, R.; Cunningham, D.G.; Leahy, M. A-Type Cranberry Proanthocyanidins and Uropathogenic Bacterial Anti-Adhesion Activity. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2281–2291.
82. Coleman, C.M.; Auken, K.M.; Killday, K.B.; Azadi, P.; Black, I.; Ferreira, D. Arabinoxyloligolucan Oligosaccharides May Contribute to the Antiadhesive Properties of Porcine Urine after Cranberry Consumption. *J Nat Prod* **2019**, *82*, 589–605.
83. Ramirez-Hernandez, A.; Rupnow, J.; Hutkins, R.W. Adherence Reduction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains to HEP-2 Cells by Mannan Oligosaccharides and a High-Molecular-Weight Component of Cranberry Extract. *J Food Prot* **2015**, *78*, 1496–1505.
84. Lewis, A.J.; Richards, A.C.; Mendez, A.A.; Dhakal, B.K.; Jones, T.A.; Sundsbak, J.L.; Eto, D.S.; Mulvey, M.A. Plant Phenolics Inhibit Focal Adhesion Kinase and Suppress Host Cell Invasion by Uropathogenic *Escherichia coli*. *BioRxiv* **2023**, 2011–2023.
85. Esteban-Fernández, A.; Zorraquín-Peña, I.; Ferrer, M.D.; Mira, A.; Bartolomé, B.; Gonzalez de Llano, D.; Moreno-Arribas, M.V. Inhibition of Oral Pathogens Adhesion to Human Gingival Fibroblasts by Wine Polyphenols Alone and in Combination with an Oral Probiotic. *J Agric Food Chem* **2018**, *66*, 2071–2082.
86. Różalska, B.; Sadowska, B.; Żuchowski, J.; Więckowska-Szakiel, M.; Budzyńska, A.; Wójcik, U.; Stochmal, A. Phenolic and Nonpolar Fractions of *Elaeagnus rhamnoides* (L.)

- A. Nelson Extracts as Virulence Modulators—in Vitro Study on Bacteria, Fungi, and Epithelial Cells. *Molecules* **2018**, *23*, 1498.
87. Bunel, V.; Ouedraogo, M.; Nguyen, A.; Stévigny, C.; Duez, P. Methods Applied to the in Vitro Primary Toxicology Testing of Natural Products: State of the Art, Strengths, and Limits. *Planta Med* **2014**, *80*, 1210–1226.
 88. O'Brien, P.J.; Irwin, W.; Diaz, D.; Howard-Cofield, E.; Krejsa, C.M.; Slaughter, M.R.; Gao, B.; Kaludercic, N.; Angeline, A.; Bernardi, P. High Concordance of Drug-Induced Human Hepatotoxicity with *in vitro* Cytotoxicity Measured in a Novel Cell-Based Model Using High Content Screening. *Arch Toxicol* **2006**, *80*, 580–604.
 89. Abraham, V.C.; Taylor, D.L.; Haskins, J.R. High Content Screening Applied to Large-Scale Cell Biology. *Trends Biotechnol* **2004**, *22*, 15–22.
 90. Zanella, F.; Lorens, J.B.; Link, W. High Content Screening: Seeing Is Believing. *Trends Biotechnol* **2010**, *28*, 237–245.
 91. Domingos, M.C.; Davies, A.M.; O'Brien, P.J. Application of High-Content Analysis in Clinical Cytology for Translational Safety Biomarkers of Drug-Induced Toxicity for Lymphoma Chemotherapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2014**, *115*, 145–153.
 92. Xu, J.J.; Henstock, P. V; Dunn, M.C.; Smith, A.R.; Chabot, J.R.; de Graaf, D. Cellular Imaging Predictions of Clinical Drug-Induced Liver Injury. *Toxicological sciences* **2008**, *105*, 97–105.
 93. Paswan, S.K.; Srivastava, S.; Rao, C.V. Wound Healing Activity of Ethanolic Extract of *Selaginella bryopteris* on Rats. *Pharmacogn J* **2020**, *12*.
 94. Biswas, T.K.; Pandit, S.; Chakrabarti, S.; Banerjee, S.; Poyra, N.; Seal, T. Evaluation of *Cynodon dactylon* for Wound Healing Activity. *J Ethnopharmacol* **2017**, *197*, 128–137.
 95. Majewska, I.; Gendaszewska-Darmach, E. Proangiogenic Activity of Plant Extracts in Accelerating Wound Healing—a New Face of Old Phytomedicines. *Acta Biochim Pol* **2011**, *58*.
 96. Wagener, F.A.; Carels, C.E.; Lundvig, D.M.S. Targeting the Redox Balance in Inflammatory Skin Conditions. *Int J Mol Sci* **2013**, *14*, 9126–9167.
 97. Hsu, S. Green Tea and the Skin. *J Am Acad Dermatol* **2005**, *52*, 1049–1059.
 98. Bhattacharjee, S.; Mandal, D.P. Angiogenesis Modulation— The " Spice Effect". *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **2012**, *31*.
 99. Vanden Berghe, W.; Haegeman, G. Epigenetic Remedies by Dietary Phytochemicals against Inflammatory Skin Disorders: Myth or Reality? *Curr Drug Metab* **2010**, *11*, 436–450.

100. Sen, C.K.; Gordillo, G.M.; Roy, S.; Kirsner, R.; Lambert, L.; Hunt, T.K.; Gottrup, F.; Gurtner, G.C.; Longaker, M.T. Human Skin Wounds: A Major and Snowballing Threat to Public Health and the Economy. *Wound Repair Regen* **2009**, *17*, 763–771.
101. Aukhil, I. Biology of Wound Healing. *Periodontol 2000* **2000**, *22*, 44–50.
102. Thangapazham, R.L.; Sharad, S.; Maheshwari, R.K. Skin Regenerative Potentials of Curcumin. *Biofactors* **2013**, *39*, 141–149.
103. Sidhu, G.S.; Singh, A.K.; Thaloor, D.; Banaudha, K.K.; Patnaik, G.K.; Srimal, R.C.; Maheshwari, R.K. Enhancement of Wound Healing by Curcumin in Animals. *Wound Repair Regen* **1998**, *6*, 167–177.
104. Mani, H.; Sidhu, G.S.; Kumari, R.; Gaddipati, J.P.; Seth, P.; Maheshwari, R.K. Curcumin Differentially Regulates TGF-B1, Its Receptors and Nitric Oxide Synthase during Impaired Wound Healing. *Biofactors* **2002**, *16*, 29–43.
105. MC, R. Wound Healing; Biologic Features and Approaches to Maximize Healing Trajectories. *Curr Problems Surg* **2001**, *38*, 61–140.
106. Mohanty, C.; Das, M.; Sahoo, S.K. Sustained Wound Healing Activity of Curcumin Loaded Oleic Acid Based Polymeric Bandage in a Rat Model. *Mol Pharm* **2012**, *9*, 2801–2811.
107. Rostagno, M.A.; Prado, J.M. *Natural Product Extraction: Principles and Applications*; The Royal Society of Chemistry, 2013;
108. Tsuchiya, H.; Sato, M.; Miyazaki, T.; Fujiwara, S.; Tanigaki, S.; Ohyama, M.; Tanaka, T.; Iinuma, M. Comparative Study on the Antibacterial Activity of Phytochemical Flavanones against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* **1996**, *50*, 27–34.
109. Gomathi, K.; Gopinath, D.; Ahmed, M.R.; Jayakumar, R. Quercetin Incorporated Collagen Matrices for Dermal Wound Healing Processes in Rat. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2767–2772.
110. Fu, S.C.; Hui, C.W.C.; Li, L.C.; Cheuk, Y.C.; Qin, L.; Gao, J.; Chan, K.-M. Total Flavones of *Hippophae rhamnoides* Promotes Early Restoration of Ultimate Stress of Healing Patellar Tendon in a Rat Model. *Med Eng Phys* **2005**, *27*, 313–321.
111. Gupta, A.; Kumar, R.; Pal, K.; Singh, V.; Banerjee, P.K.; Sawhney, R.C. Influence of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Flavone on Dermal Wound Healing in Rats. *Mol Cell Biochem* **2006**, *290*, 193–198.
112. Li, K.; Diao, Y.; Zhang, H.; Wang, S.; Zhang, Z.; Yu, B.; Huang, S.; Yang, H. Tannin Extracts from Immature Fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. Promote Cutaneous Wound Healing in Rats. *BMC Complement Altern Med* **2011**, *11*, 1–9.
113. Brogden, K.A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3*, 238–250.
114. Budovsky, A.; Yarmolinsky, L.; Ben-Shabat, S. Effect of Medicinal Plants on Wound Healing. *Wound Repair Regen* **2015**, *23*, 171–183.

115. Milić Maja Optimizacija Procesa Ekstrakcije Fenolnih Jedinjenja Iz Semena Bundeve, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu: Niš, 2017.
116. Savić, L. Metode Ekstrakcije Biljnih Materijala: Usporedna Analiza Cirkulatorne Ekstrakcije i Ekstrakcije Primenom Superkritičnog Ugljen-Dioksida. *Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić"*, Beograd **2014**.
117. Khan, Z.; Troquet, J.; Vachelard, C. Sample Preparation and Analytical Techniques for Determination of Polyaromatic Hydrocarbons in Soils. *Intl J Environ Sci Technol* **2005**, *2*, 275-286.
118. Milan Stanković Ultrazvučna Ekstrakcija Fenolnih Jedinjenja i Antioksidativne Aktivnosti Ekstrakata Maline, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu: Niš, 2016.
119. Anđelković, M.Z. Optimizacija Ekstrakcije i Karakterizacija Fenolnih Jedinjenja i Bio Ulja Iz Sorti Vranac i Merlo (*Vitis vinifera* L.) i Njihova Potencijalna Primena. *Универзитет у Хууу* **2016**.
120. Simić, V.M. Optimizacija Mikrotalasne Ekstrakcije Polifenolnih Jedinjenja Iz Ploda Aronije (*Aronia melanocarpa* L.). *Univerzitet u Nišu* **2018**.
121. Zobot, G.L.; Schaefer Rodrigues, F.; Polano Ody, L.; Vinícius Tres, M.; Herrera, E.; Palacin, H.; Córdova-Ramos, J.S.; Best, I.; Olivera-Montenegro, L. Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications. *Polymers* **2022**, *14*, 4194.
122. Quirós-Sauceda, A.E.; Ayala-Zavala, J.F.; Olivas, G.I.; González-Aguilar, G.A. Edible Coatings as Encapsulating Matrices for Bioactive Compounds: A Review. *J Food Sci Technol* **2014**, *51*, 1674-1685.
123. Rubió, L.; Motilva, M.-J.; Romero, M.-P. Recent Advances in Biologically Active Compounds in Herbs and Spices: A Review of the Most Effective Antioxidant and Anti-Inflammatory Active Principles. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2013**, *53*, 943-953.
124. Čutović, N.; Marković, T.; Kostić, M.; Gašić, U.; Prijić, Ž.; Ren, X.; Lukić, M.; Bugarski, B. Chemical Profile and Skin-Beneficial Activities of the Petal Extracts of *Paeonia tenuifolia* L. from Serbia. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1537.
125. Čutović, N.; Marković, T.; Carević, T.; Stojković, D.; Bugarski, B.; Jovanović, A.A. Liposomal and Liposomes-Film Systems as Carriers for Bioactives from *Paeonia tenuifolia* L. Petals: Physicochemical Characterization and Biological Potential. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2742.
126. El-Desoky, N.I.; Hashem, N.M.; Elkomy, A.G.; Abo-Elezz, Z.R. Improving Rabbit Doe Metabolism and Whole Reproductive Cycle Outcomes via Fatty Acid-Rich Moringa Oleifera Leaf Extract Supplementation in Free and Nano-Encapsulated Forms. *Animals* **2022**, *12*, 764.
127. Subczynski, W.; Wisniewska, A. Physical Properties of Lipid Bilayer Membranes: Relevance to Membrane Biological Functions. *Acta Biochim Pol* **2000**, *47*, 613-625.

128. Huang, Z.; Li, X.; Zhang, T.; Song, Y.; She, Z.; Li, J.; Deng, Y. Progress Involving New Techniques for Liposome Preparation. *Asian J Pharm Sci* **2014**, *9*, 176–182.
129. Emami, S.; Azadmard-Damirchi, S.; Peighambaridou, S.H.; Valizadeh, H.; Hesari, J. Liposomes as Carrier Vehicles for Functional Compounds in Food Sector. *J Exp Nanosci* **2016**, *11*, 737–759.
130. Oussoren, C.; Eling, W.M.C.; Crommelin, D.J.A.; Storm, G.; Zuidema, J. The Influence of the Route of Administration and Liposome Composition on the Potential of Liposomes to Protect Tissue against Local Toxicity of Two Antitumor Drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1998**, *1369*, 159–172.
131. Medina-Alarcón, K.P.; Voltan, A.R.; Fonseca-Santos, B.; Moro, I.J.; de Oliveira Souza, F.; Chorilli, M.; Soares, C.P.; Dos Santos, A.G.; Mendes-Giannini, M.J.S.; Fusco-Almeida, A.M. Highlights in Nanocarriers for the Treatment against Cervical Cancer. *Mat Sci Eng: C* **2017**, *80*, 748–759.
132. Becker, P.S.; Gooley, T.A.; Green, D.J.; Burwick, N.; Kim, T.Y.; Kojouri, K.; Inoue, Y.; Moore, D.J.; Nelli, E.; Dennie, T. A Phase 2 Study of Bortezomib, Cyclophosphamide, Pegylated Liposomal Doxorubicin and Dexamethasone for Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Blood Cancer J* **2016**, *6*, e422–e422.
133. Coltelli, L.; Fontana, A.; Lucchesi, S.; Ginocchi, L.; Bocci, G.; Filidei, M.; Scalese, M.; Arrighi, G.; Finale, C.; Marcucci, L. Cardiac Safety of Adjuvant Non-Pegylated Liposomal Doxorubicin Combined with Cyclophosphamide and Followed by Paclitaxel in Older Breast Cancer Patients. *The Breast* **2017**, *31*, 186–191.
134. Cohen, A.; Spektor, T.M.; Stampleman, L.; Bessudo, A.; Rosen, P.J.; Klein, L.M.; Woliver, T.; Flam, M.; Eshaghian, S.; Nassir, Y. Safety and Efficacy of Pomalidomide, Dexamethasone and Pegylated Liposomal Doxorubicin for Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Br J Haematol* **2018**, *180*, 60–70.
135. Zakrewsky, M.; Kumar, S.; Mitragotri, S. Nucleic Acid Delivery into Skin for the Treatment of Skin Disease: Proofs-of-Concept, Potential Impact, and Remaining Challenges. *J Control Release* **2015**, *219*, 445–456.
136. Kumar, L.; Verma, S.; Vaidya, B. Liposomes for the Delivery of Streptokinase. *Ther Deliv* **2017**, *8*, 855–866.
137. Bowles, E.A.; Feys, D.; Ercal, N.; Sprague, R.S. Liposomal-Delivery of Phosphodiesterase 5 Inhibitors Augments UT-15C-Stimulated ATP Release from Human Erythrocytes. *Biochem Biophys Rep* **2017**, *12*, 114–119.
138. Maurer, N.; Fenske, D.B.; Cullis, P.R. Developments in Liposomal Drug Delivery Systems. *Expert Opin Biol Ther* **2001**, *1*, 923–947.
139. Fathi, M.; Mozafari, M.R.; Mohebbi, M. Nanoencapsulation of Food Ingredients Using Lipid Based Delivery Systems. *Trends Food Sci Technol* **2012**, *23*, 13–27.

140. Isailović, B.D.; Kostić, I.T.; Zvonar, A.; Đorđević, V.B.; Gašperlin, M.; Nedović, V.A.; Bugarski, B.M. Resveratrol Loaded Liposomes Produced by Different Techniques. *Innov Food Sci Emerg Techno* **2013**, *19*, 181–189.
141. Šturm, L.; Poklar Ulrih, N. Basic Methods for Preparation of Liposomes and Studying Their Interactions with Different Compounds, with the Emphasis on Polyphenols. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 6547.
142. Elhissi, A.M.A.; Karnam, K.K.; Danesh-Azari, M.; Gill, H.S.; Taylor, K.M.G. Formulations Generated from Ethanol-based Proliposomes for Delivery via Medical Nebulizers. *J Pharm Pharmacol* **2006**, *58*, 887–894.
143. Batinić, P.M.; Đorđević, V.B.; Obradović, N.S.; Krstić, A.D.; Stevanović, S.I.; Balanč, B.D.; Marković, S.B.; Pjanović, R. V; Mijin, D.Ž.; Bugarski, B.M. Polymer-Lipid Matrices Based on Carboxymethyl Cellulose/Solagum and Liposomes for Controlled Release of Folic Acid. *Eur J Lipid Sci Technol* **2023**, 2200169.
144. Floroian, L.; Ristoscu, C.; Candiani, G.; Pastori, N.; Moscatelli, M.; Mihailescu, N.; Negut, I.; Badea, M.; Gilca, M.; Chiesa, R. Antimicrobial Thin Films Based on Ayurvedic Plants Extracts Embedded in a Bioactive Glass Matrix. *Appl Surf Sci* **2017**, *417*, 224–233.
145. Silva-Weiss, A.; Ihl, M.; Sobral, P.J. do A.; Gómez-Guillén, M.C.; Bifani, V. Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. *Food Eng Rev* **2013**, *5*, 200–216.
146. Bonilla, J.; Atarés, L.; Vargas, M.; Chiralt, A. Edible Films and Coatings to Prevent the Detrimental Effect of Oxygen on Food Quality: Possibilities and Limitations. *J Food Eng* **2012**, *110*, 208–213.
147. Rhim, J.-W.; Ng, P.K.W. Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2007**, *47*, 411–433.
148. Tyuftin, A.A.; Kerry, J.P. Gelatin Films: Study Review of Barrier Properties and Implications for Future Studies Employing Biopolymer Films. *Food Packag Shelf Life* **2021**, *29*, 100688.
149. Lee, B.H.; Park, S.H.; Back, H.; Lee, K. Novel Film-casting Method for High-performance Flexible Polymer Electrodes. *Adv Funct Mater* **2011**, *21*, 487–493.
150. Rhim, J.-W.; Ng, P.K.W. Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2007**, *47*, 411–433.
151. Charpentier, D.; Mocanu, G.; Carpov, A.; Chapelle, S.; Merle, L.; Müller, G. New Hydrophobically Modified Carboxymethylcellulose Derivatives. *Carbohydr Polym* **1997**, *33*, 177–186.
152. Pettignano, A.; Charlot, A.; Fleury, E. Carboxyl-Functionalized Derivatives of Carboxymethyl Cellulose: Towards Advanced Biomedical Applications. *Polymer Reviews* **2019**, *59*, 510–560.

153. Skotti, E.; Anastasaki, E.; Kanellou, G.; Polissiou, M.; Tarantilis, P.A. Total Phenolic Content, Antioxidant Activity and Toxicity of Aqueous Extracts from Selected Greek Medicinal and Aromatic Plants. *Ind Crops Prod* **2014**, *53*, 46–54.
154. Barros, L.; Baptista, P.; Ferreira, I.C.F.R. Effect of *Lactarius piperatus* Fruiting Body Maturity Stage on Antioxidant Activity Measured by Several Biochemical Assays. *Food Chem Toxicol* **2007**, *45*, 1731–1737.
155. Waterhouse, A.L. Determination of Total Phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry* **2002**, *6*, I1-1.
156. Aghakhani Kaaji, F.; Kharazian, N. Flavonoid Diversity and Morphological Variations among Seven Phlomis Species in Zagros, Iran. *Iran J Sci Technol Trans A: Sci* **2019**, *43*, 415–431.
157. Jovanović, A.A.; Ćujić, D.; Stojadinović, B.; Čutović, N.; Živković, J.; Šavikin, K. Liposomal Bilayer as a Carrier of *Rosa canina* L. Seed Oil: Physicochemical Characterization, Stability, and Biological Potential. *Molecules* **2022**, *28*, 276.
158. Batinić, P.M.; Đorđević, V.B.; Stevanović, S.I.; Balanč, B.D.; Marković, S.B.; Luković, N.D.; Mijin, D.Ž.; Bugarski, B.M. Formulation and Characterization of Novel Liposomes Containing Histidine for Encapsulation of a Poorly Soluble Vitamin. *J Drug Deliv Sci Technol* **2020**, *59*, 101920.
159. Miguel, M.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules* **2010**, *15*, 9252–9287.
160. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic Biol Med* **1999**, *26*, 1231–1237.
161. Özyürek, M.; Güçlü, K.; Tütem, E.; Başkan, K.S.; Erçağ, E.; Çelik, S.E.; Baki, S.; Yıldız, L.; Karaman, Ş.; Apak, R. A Comprehensive Review of CUPRAC Methodology. *Analytical methods* **2011**, *3*, 2439–2453.
162. Kostić, M.; Ivanov, M.; Stojković, D.; Ćirić, A.; Soković, M. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Selected Polyphenolic Compounds: An *in vitro* Study on *Staphylococcus aureus*. *Lekovite sirovine* **2020**, *40*, 57–61.
163. Soković, M.D.; Glamočlija, J.; Ćirić, A.; Grubišić, D.; Stojković, D.; Ristić, M. Antimicrobial Activity of Essential Oils Isolated from Different Parts of Endemic Plant *Portenschlagiella ramosissima* Tutin. *J Essential Oil Res* **2008**, *20*, 369–372.
164. Stojković, D.; Dias, M.I.; Drakulić, D.; Barros, L.; Stevanović, M.; CFR Ferreira, I.; D. Soković, M. Methanolic Extract of the Herb *Ononis spinosa* L. Is an Antifungal Agent with No Cytotoxicity to Primary Human Cells. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 78.

165. Siddhuraju, P.; Becker, K. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 2144–2155.
166. Mokrani, A.; Madani, K. Effect of Solvent, Time and Temperature on the Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Peach (*Prunus persica* L.) Fruit. *Sep Purif Technol* **2016**, *162*, 68–76.
167. Chandola, V.; Chandra, S.; Nautiyal, A.R.; Concenço, G. Antioxidant Potential and Impact of Different Extraction Solvents on the Free, Esterified and Insoluble-Bound Phenolics, Flavonoid and Tannin Content of *Trillium govianum* Wall Ex D. Don, a Rare Himalayan Herb. *Vegetos* **2022**, 1–8.
168. Khan, M.K.; Abert-Vian, M.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Dangles, O.; Chemat, F. Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols (Flavanone Glycosides) from Orange (*Citrus sinensis* L.) Peel. *Food Chem* **2010**, *119*, 851–858.
169. Nayak, B.; Dahmoune, F.; Moussi, K.; Remini, H.; Dairi, S.; Aoun, O.; Khodir, M. Comparison of Microwave, Ultrasound and Accelerated-Assisted Solvent Extraction for Recovery of Polyphenols from *Citrus sinensis* Peels. *Food Chem* **2015**, *187*, 507–516.
170. Nayak, B.; Liu, R.H.; Tang, J. Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains—a Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2015**, *55*, 887–918.
171. Pingret, D.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Chemat, F. Degradation during Application of Ultrasound in Food Processing: A Review. *Food Control* **2013**, *31*, 593–606.
172. Pingret, D.; Durand, G.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Rockenbauer, A.; Ginies, C.; Chemat, F. Degradation of Edible Oil during Food Processing by Ultrasound: Electron Paramagnetic Resonance, Physicochemical, and Sensory Appreciation. *J Agric Food Chem* **2012**, *60*, 7761–7768.
173. Chen, G.-L.; Chen, S.-G.; Xie, Y.-Q.; Chen, F.; Zhao, Y.-Y.; Luo, C.-X.; Gao, Y.-Q. Total Phenolic, Flavonoid and Antioxidant Activity of 23 Edible Flowers Subjected to *in vitro* Digestion. *J Funct Foods* **2015**, *17*, 243–259.
174. Weixing, L.; Shunbo, Y.; Hui, C.; Yanmin, H.; Jun, T.; Chunhua, Z. Nutritional Evaluation of Herbaceous Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) Petals. *Emir J Food Agric* **2017**, 518–531.
175. WU, Y.; WEI, M.; ZHAO, D.; Jun, T.A.O. Flavonoid Content and Expression Analysis of Flavonoid Biosynthetic Genes in Herbaceous Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) with Double Colors. *J Integr Agric* **2016**, *15*, 2023–2031.
176. Batinic, P. *In vitro* Evaluation of Antioxidative Activities of the Extracts of Petals of *Paeonia lactiflora* and *Calendula officinalis* Incorporated in the New Forms of Biobased Carriers. *Food and Feed Research* **2022**, 23–35.

177. Gao, Y.; Li, X.; Liu, X.; Yang, W.; Li, M.; Li, J.; Li, F. Aqueous Extracts of Tree Peony Petals: Renin and Angiotensin L-Converting Enzyme Inhibitory Activities in Different Colours and Flowering Stages. *RSC Adv* **2022**, *12*, 7735–7741.
178. Guo, Z.; Jin, Q.; Fan, G.; Duan, Y.; Qin, C.; Wen, M. Microwave-Assisted Extraction of Effective Constituents from a Chinese Herbal Medicine Radix *Puerariae*. *Anal Chim Acta* **2001**, *436*, 41–47.
179. Li, H.; Chen, B.; Zhang, Z.; Yao, S. Focused Microwave-Assisted Solvent Extraction and HPLC Determination of Effective Constituents in *Eucommia ulmodies* Oliv.(E. Ulmodies). *Talanta* **2004**, *63*, 659–665.
180. Yang, S.; Zhang, X.; Dong, Y.; Sun, G.; Jiang, A.; Li, Y. Cleavage Rules of Mass Spectrometry Fragments and Rapid Identification of Chemical Components of Radix *Paeoniae Alba* Using UHPLC-Q-TOF-MS. *Phytochem Anal* **2021**, *32*, 836–849.
181. Gao, X.; Li, Y.; Meng, M.; Wang, P.; Feng, Y.; Jia, J.; Qin, X. Exploration of Chemical Composition and Absorption Characteristics of Chaigui Granules Based on UHPLC-Q-Orbitrap-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* **2020**, *187*, 113293.
182. Bai, Z.-Z.; Yu, R.; Tang, J.-M.; Zhou, Y.; Zheng, T.-T.; Ni, J.; Sun, D.-Y.; Liu, P.; Niu, L.-X.; Zhang, Y.-L. Comparative Investigation on Metabolites and Biological Activities of *Paeonia ostii* Stamens from Different Geographical Regions of China. *Ind Crops Prod* **2021**, *172*, 114038.
183. Xiong, P.; Qin, S.; Li, K.; Liu, M.; Zhu, L.; Peng, J.; Shi, S.; Tang, S.; Tian, A.; Cai, W. Identification of the Tannins in Traditional Chinese Medicine *Paeoniae Radix Alba* by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS. *Arab J Chem* **2021**, *14*, 103398.
184. Sun, M.; Wang, Y.; Yang, Y.; Lv, M.; Li, S.; Teixeira da Silva, J.A.; Wang, L.; Yu, X. Analysis of Chemical Components in the Roots of Eight Intersubgeneric Hybrids of *Paeonia*. *Chem Biodivers* **2021**, *18*, e2000848.
185. Nie, R.; Zhang, Y.; Jin, Q.; Zhang, S.; Wu, G.; Chen, L.; Zhang, H.; Wang, X. Identification and Characterisation of Bioactive Compounds from the Seed Kernels and Hulls of *Paeonia lactiflora* Pall by UPLC-QTOF-MS. *Food Res Int* **2021**, *139*, 109916.
186. Chen, X.; Wang, Y.; Ma, Y.; Wang, R.; Zhao, D. To Explore the Radix *Paeoniae Rubra*-Flos Carthami Herb Pair's Potential Mechanism in the Treatment of Ischemic Stroke by Network Pharmacology and Molecular Docking Technology. *Medicine* **2021**, *100*.
187. Oidovsambuu, S.; Kim, C.Y.; Kang, K.; Dulamjav, B.; Jigjidsuren, T.; Nho, C.W. Protective Effect of *Paeonia anomala* Extracts and Constituents against Tert-Butylhydroperoxide-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Planta Med* **2013**, *29*, 116–122.
188. Sut, S.; Zengin, G.; Dall'Acqua, S.; Gazdová, M.; Šmejkal, K.; Bulut, G.; Dogan, A.; Haznedaroglu, M.Z.; Aumeeruddy, M.Z.; Maggi, F. *Paeonia arietina* and *Paeonia*

- kesrounansis* Bioactive Constituents: NMR, LC-DAD-MS Fingerprinting and *in vitro* Assays. *J Pharm Biomed Anal* **2019**, *165*, 1–11.
189. Michalea, R.; Stathopoulou, K.; Polychronopoulos, P.; Benaki, D.; Mikros, E.; Aligiannis, N. Efficient Identification of Acetylcholinesterase and Hyaluronidase Inhibitors from *Paeonia parnassica* Extracts through a HeteroCovariance Approach. *J Ethnopharmacol* **2020**, *257*, 111547.
 190. Li, C.; Du, H.; Wang, L.; Shu, Q.; Zheng, Y.; Xu, Y.; Zhang, J.; Zhang, J.; Yang, R.; Ge, Y. Flavonoid Composition and Antioxidant Activity of Tree Peony (*Paeonia* Section Moutan) Yellow Flowers. *J Agric Food Chem* **2009**, *57*, 8496–8503.
 191. Wang, L.-S.; Hashimoto, F.; Shiraishi, A.; Aoki, N.; Li, J.-J.; Sakata, Y. Chemical Taxonomy of the Xibei Tree Peony from China by Floral Pigmentation. *J Plant Res* **2004**, *117*, 47–55.
 192. Hua, M.; Ma, H.; Tan, R.; Yuan, X.; Chen, J.; Yang, W.; Wang, Y.; Kong, J.; Hu, Y.; Yang, Y. Determination of Anthocyanins and Flavonols in *Paeonia delavayi* by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array and Mass Spectrometric Detection. *Anal Lett* **2018**, *51*, 2331–2339.
 193. Ulubelen, A.; Çetin, E.T.; Isildatici, S.; Ozturk, S. Phytochemical Investigation of *Paeonia decora*. *Lloydia* **1968**, *31*, 249-+.
 194. Wu, Y.-Q.; Zhao, D.-Q.; Han, C.-X.; Tao, J. Biochemical and Molecular Responses of Herbaceous Peony to High Temperature Stress. *Can J Plant Sci* **2016**, *96*, 474–484.
 195. Du, H.; Wu, J.; Ji, K.-X.; Zeng, Q.-Y.; Bhuiya, M.-W.; Su, S.; Shu, Q.-Y.; Ren, H.-X.; Liu, Z.-A.; Wang, L.-S. Methylation Mediated by an Anthocyanin, O-Methyltransferase, Is Involved in Purple Flower Coloration in *Paeonia*. *J Exp Bot* **2015**, *66*, 6563–6577.
 196. Wang, H.-B.; Gu, W.-F.; Chu, W.-J.; Zhang, S.; Tang, X.-C.; Qin, G.-W. Monoterpene Glucosides from *Paeonia lactiflora*. *J Nat Prod* **2009**, *72*, 1321–1324.
 197. Demir, A.; Turumtay, H.; Emirik, M.; Sandalli, C.; Kanbolat, Ş.; Özgen, U.; Turumtay, E.A. Paeoniflorigenone Purified from *Paeonia daurica* Roots Potently Inhibits Viral and Bacterial DNA Polymerases: Investigation by Experimental Validation and Docking Simulation. *Med Chem Res* **2019**, *28*, 2232–2245.
 198. Stosic, D.; Gorunovic, M. Peoniflorine in the underground organs of the peony, *Paeonia tenuifolia* L. (Paeoniaceae). *Pharmazie* 1989, *44*, 510.
 199. Pan, Y.; Gao, Z.; Huang, X.-Y.; Chen, J.-J.; Geng, C.-A. Chemical and Biological Comparison of Different Parts of *Paeonia suffruticosa* (Mudan) Based on LCMS-IT-TOF and Multi-Evaluation in Vitro. *Ind Crops Prod* **2020**, *144*, 112028.
 200. Shang, W.; Wang, Z.; He, S.; He, D.; Liu, Y.; Fu, Z. Research on the Relationship between Phenolic Acids and Rooting of Tree Peony (*Paeonia suffruticosa*) Plantlets in Vitro. *Sci Hortic* **2017**, *224*, 53–60.

201. Choi, S.H.; Gu, M.B. Phenolic Toxicity—Detection and Classification through the Use of a Recombinant Bioluminescent Escherichia Coli. *Environ Toxicol Chem: Int J* **2001**, *20*, 248–255.
202. Khaled, R. Biological Activities of Isorhamnetin: A Review. *Plantae Scientia* **2020**, *3*, 78–81.
203. Pei, K.; Ou, J.; Huang, J.; Ou, S. P-Coumaric Acid and Its Conjugates: Dietary Sources, Pharmacokinetic Properties and Biological Activities. *J Sci Food Agric* **2016**, *96*, 2952–2962.
204. Tachakittirungrod, S.; Okonogi, S.; Chowwanapoonpohn, S. Study on Antioxidant Activity of Certain Plants in Thailand: Mechanism of Antioxidant Action of Guava Leaf Extract. *Food Chem* **2007**, *103*, 381–388.
205. Schlesier, K.; Harwat, M.; Böhm, V.; Bitsch, R. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different *in vitro* Methods. *Free Radic Res* **2002**, *36*, 177–187.
206. Aruoma, O.I. Methodological Considerations for Characterizing Potential Antioxidant Actions of Bioactive Components in Plant Foods. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* **2003**, *523*, 9–20.
207. Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R. Comparative Evaluation of 11 Essential Oils of Different Origin as Functional Antioxidants, Antiradicals and Antimicrobials in Foods. *Food Chem* **2005**, *91*, 621–632.
208. Sagdic, O.; Ozturk, I.; Ozkan, G.; Yetim, H.; Ekici, L.; Yilmaz, M.T. RP-HPLC–DAD Analysis of Phenolic Compounds in Pomace Extracts from Five Grape Cultivars: Evaluation of Their Antioxidant, Antiradical and Antifungal Activities in Orange and Apple Juices. *Food Chem* **2011**, *126*, 1749–1758.
209. Li, S.; Li, S.-K.; Gan, R.-Y.; Song, F.-L.; Kuang, L.; Li, H.-B. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of Infusions from 223 Medicinal Plants. *Ind Crops Prod* **2013**, *51*, 289–298.
210. Dian-Nashiela, F.; Noriham, A.; Nooraain, H.; Azizah, A.H. Antioxidant Activity of Herbal Tea Prepared from *Cosmos caudatus* Leaves at Different Maturity Stages. **2015**.
211. Piluzza, G.; Bullitta, S. Correlations between Phenolic Content and Antioxidant Properties in Twenty-Four Plant Species of Traditional Ethnoveterinary Use in the Mediterranean Area. *Pharm Biol* **2011**, *49*, 240–247.
212. Song, J.; Zhang, H.; Wang, Z.; Wang, J. The Antioxidant Activity, α -Glucosidase and Acetylcholinesterase Inhibition Activity, and Chemical Composition of *Paeonia delavayi* Petal. *Food Quality and Safety* **2022**, *6*.
213. Li, X.; Wang, L. Effect of Extraction Method on Structure and Antioxidant Activity of *Hohenbuehelia serotina* Polysaccharides. *Int J Biol Macromol* **2016**, *83*, 270–276.

214. González-Montelongo, R.; Lobo, M.G.; González, M. The Effect of Extraction Temperature, Time and Number of Steps on the Antioxidant Capacity of Methanolic Banana Peel Extracts. *Sep Purif Technol* **2010**, *71*, 347–355.
215. Ghafoor, K.; Choi, Y.H.; Jeon, J.Y.; Jo, I.H. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *J Agric Food Chem* **2009**, *57*, 4988–4994.
216. Luque-Garcia, J.L.; De Castro, M.D.L. Ultrasound: A Powerful Tool for Leaching. *Trends Anal Chem* **2003**, *22*, 41–47.
217. Shirsath, S.R.; Sonawane, S.H.; Gogate, P.R. Intensification of Extraction of Natural Products Using Ultrasonic Irradiations—A Review of Current Status. *Chem Eng Proces: Process Intens* **2012**, *53*, 10–23.
218. Jovanović, A.A.; Đorđević, V.B.; Zdunić, G.M.; Pljevljakušić, D.S.; Šavikin, K.P.; Gođevac, D.M.; Bugarski, B.M. Optimization of the Extraction Process of Polyphenols from *Thymus serpyllum* L. Herb Using Maceration, Heat-and Ultrasound-Assisted Techniques. *Sep Purif Technol* **2017**, *179*, 369–380.
219. Vilkuh, K.; Manasseh, R.; Mawson, R.; Ashokkumar, M. Ultrasonic Recovery and Modification of Food Ingredients. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*; Springer, 2011; pp. 345–368.
220. Mohapatra, P.; Ray, A.; Jena, S.; Nayak, S.; Mohanty, S. Influence of Extraction Methods and Solvent System on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Centella asiatica* L. Leaves. *Biocatal Agric Biotechnol* **2021**, *33*, 101971.
221. Zengin, G.; Cvetanović, A.; Gašić, U.; Stupar, A.; Bulut, G.; Senkardes, I.; Dogan, A.; Seebaluck-Sandoram, R.; Rengasamy, K.R.R.; Sinan, K.I. Chemical Composition and Bio-Functional Perspectives of *Erica arborea* L. Extracts Obtained by Different Extraction Techniques: Innovative Insights. *Ind Crops Prod* **2019**, *142*, 111843.
222. Babbar, N.; Oberoi, H.S.; Uppal, D.S.; Patil, R.T. Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Extracts Obtained from Six Important Fruit Residues. *Food Res Int* **2011**, *44*, 391–396.
223. Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S.E.; Bektaşoğlu, B.; Berker, K.I.; Özyurt, D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* **2007**, *12*, 1496–1547.
224. Chang, C.-C.; Yang, M.-H.; Wen, H.-M.; Chern, J.-C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J Food Drug Anal* **2002**, *10*.
225. Jayasinghe, C.; Gotoh, N.; Aoki, T.; Wada, S. Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 4442–4449.

226. Kratchanova, M.; Denev, P.; Ciz, M.; Lojek, A.; Mihailov, A. Evaluation of Antioxidant Activity of Medicinal Plants Containing Polyphenol Compounds. Comparison of Two Extraction Systems. *Acta Biochim Pol* **2010**, *57*.
227. Arnao, M.B. Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen Radicals: A Practical Case. *Trends Food Sci Technol* **2000**, *11*, 419–421.
228. Rios, J.-L.; Recio, M.C. Medicinal Plants and Antimicrobial Activity. *J Ethnopharmacol* **2005**, *100*, 80–84.
229. Isefuku, S.; Clive J. Joyner; A. Hamish RW Simpson Gentamicin May Have an Adverse Effect on Osteogenesis. *J Orthop Trauma* **2003**, *17*, 212–216.
230. Hsu, H.; Sheth, C.C.; Veses, V. Herbal Extracts with Antifungal Activity against *Candida albicans*: A Systematic Review. *Mini Rev Med Chem* **2021**, *21*, 90–117.
231. Picerno, P.; Mencherini, T.; Sansone, F.; Del Gaudio, P.; Granata, I.; Porta, A.; Aquino, R.P. Screening of a Polar Extract of *Paeonia rockii*: Composition and Antioxidant and Antifungal Activities. *J Ethnopharmacol* **2011**, *138*, 705–712.
232. Yuan, T.; Yang, T.; Chen, H.; Fu, D.; Hu, Y.; Wang, J.; Yuan, Q.; Yu, H.; Xu, W.; Xie, X. New Insights into Oxidative Stress and Inflammation during Diabetes Mellitus-Accelerated Atherosclerosis. *Redox Biol* **2019**, *20*, 247–260.
233. Palíková, I.; Heinrich, J.; Bednář, P.; Marhol, P.; Křen, V.; Cvak, L.; Valentová, K.; Růžička, F.; Holá, V.; Kolář, M. Constituents and Antimicrobial Properties of Blue Honeysuckle: A Novel Source for Phenolic Antioxidants. *J Agric Food Chem* **2008**, *56*, 11883–11889.
234. Negahdari, S.; Galehdari, H.; Kesmati, M.; Rezaie, A.; Shariati, G. Wound Healing Activity of Extracts and Formulations of *Aloe vera*, Henna, *Adiantum capillus-veneris*, and *Myrrh* on Mouse Dermal Fibroblast Cells. *Int J Prev Med* **2017**, *8*.
235. Pazyar, N.; Yaghoobi, R.; Rafiee, E.; Mehrabian, A.; Feily, A. Skin Wound Healing and Phytomedicine: A Review. *Skin Pharmacol Physiol* **2014**, *27*, 303–310.
236. Santoro, M.M.; Gaudino, G. Cellular and Molecular Facets of Keratinocyte Reepithelization during Wound Healing. *Exp Cell Res* **2005**, *304*, 274–286.
237. Chithra, P.; Sajithlal, G.B.; Chandrakasan, G. Influence of *Aloe vera* on Collagen Turnover in Healing of Dermal Wounds in Rats. *Indian J Exp Biol* **1998**, *36*, 896–901.
238. Guo, S. al; DiPietro, L.A. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res* **2010**, *89*, 219–229.
239. Zengin, G.; Cvetanović, A.; Gašić, U.; Stupar, A.; Bulut, G.; Şenkardes, I.; Dogan, A.; Sinan, K.I.; Uysal, S.; Aumeeruddy-Elalfi, Z. Modern and Traditional Extraction Techniques Affect Chemical Composition and Bioactivity of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. *Ind Crops Prod* **2020**, *146*, 112202.
240. Bryła, A.; Lewandowicz, G.; Juzwa, W. Encapsulation of Elderberry Extract into Phospholipid Nanoparticles. *J Food Eng* **2015**, *167*, 189–195.

241. Chen, H.-W.; Chang, Y.-W.; Fang, W.-P. A New Approach for the Microencapsulation of *Clitoria ternatea* Petal Extracts by a High-Pressure Processing Method. *Pharmaceutics* **2020**, *13*, 23.
242. Ahmadian, Z.; Niazmand, R.; Pourfarzad, A. Microencapsulation of Saffron Petal Phenolic Extract: Their Characterization, *in vitro* Gastrointestinal Digestion, and Storage Stability. *J Food Sci* **2019**, *84*, 2745–2757.
243. Hızır-Kadı, İ.; Gültekin-Özğüven, M.; Altın, G.; Demircan, E.; Özçelik, B. Liposomal Nanodelivery Systems Generated from Proliposomes for Pollen Extract with Improved Solubility and *in vitro* Bioaccessibility. *Heliyon* **2020**, *6*.
244. Alexander, M.; Lopez, A.A.; Fang, Y.; Corredig, M. Incorporation of Phytosterols in Soy Phospholipids Nanoliposomes: Encapsulation Efficiency and Stability. *Lwt* **2012**, *47*, 427–436.
245. Jovanović, A.A.; Balanč, B.D.; Ota, A.; Ahlin Grabnar, P.; Djordjević, V.B.; Šavikin, K.P.; Bugarski, B.M.; Nedović, V.A.; Poklar Ulrih, N. Comparative Effects of Cholesterol and β -sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics. *Eur J Lipid Sci Technol* **2018**, *120*, 1800039.
246. Arias-Alpizar, G.; Kong, L.; Vlieg, R.C.; Rabe, A.; Papadopoulou, P.; Meijer, M.S.; Bonnet, S.; Vogel, S.; van Noort, J.; Kros, A. Light-Triggered Switching of Liposome Surface Charge Directs Delivery of Membrane Impermeable Payloads *in vivo*. *Nat Commun* **2020**, *11*, 3638.
247. Grit, M.; Crommelin, D.J.A. Chemical Stability of Liposomes: Implications for Their Physical Stability. *Chem Phys Lipids* **1993**, *64*, 3–18.
248. Ardani, H.K.; Imawan, C.; Handayani, W.; Djuhana, D.; Harmoko, A.; Fauzia, V. Enhancement of the Stability of Silver Nanoparticles Synthesized Using Aqueous Extract of *Diospyros discolor* Willd. Leaves Using Polyvinyl Alcohol. In Proceedings of the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering; IOP Publishing, 2017; Vol. 188, p. 012056.
249. Zhao, L.; Temelli, F.; Curtis, J.M.; Chen, L. Preparation of Liposomes Using Supercritical Carbon Dioxide Technology: Effects of Phospholipids and Sterols. *Food Research International* **2015**, *77*, 63–72.
250. Baranauskaite, J.; Duman, G.; Corapcıoğlu, G.; Baranauskas, A.; Taralp, A.; Ivanauskas, L.; Bernatoniene, J. Liposomal Incorporation to Improve Dissolution and Stability of Rosmarinic Acid and Carvacrol Extracted from Oregano (*O. onites* L.). *Biomed Res Int* **2018**, *2018*.
251. Ali, A.; Maqbool, M.; Ramachandran, S.; Alderson, P.G. Gum Arabic as a Novel Edible Coating for Enhancing Shelf-Life and Improving Postharvest Quality of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Fruit. *Postharvest Biol Technol* **2010**, *58*, 42–47.

252. Kim, K.; Park, J.; Sohn, Y.; Oh, C.-E.; Park, J.-H.; Yuk, J.-M.; Yeon, J.-H. Stability of Plant Leaf-Derived Extracellular Vesicles According to Preservative and Storage Temperature. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 457.
253. Narenji, M.; Talaei, M.R.; Moghimi, H.R. Investigating the Effects of Size, Charge, Viscosity and Bilayer Flexibility on Liposomal Delivery under Convective Flow. *Int J Pharm* **2016**, *513*, 88–96.
254. Rodríguez, M.; Osés, J.; Ziani, K.; Maté, J.I. Combined Effect of Plasticizers and Surfactants on the Physical Properties of Starch Based Edible Films. *Food Research International* **2006**, *39*, 840–846.
255. Raiger Iustman, L.J.; López, N.I. Los Biosurfactantes y La Industria Petrolera. **2009**.
256. Ly, H. V.; Longo, M.L. The Influence of Short-Chain Alcohols on Interfacial Tension, Mechanical Properties, Area/Molecule, and Permeability of Fluid Lipid Bilayers. *Biophys J* **2004**, *87*, 1013–1033.
257. Ota, A.; Istenič, K.; Skrt, M.; Šegatin, N.; Žnidaršič, N.; Kogej, K.; Ulrih, N.P. Encapsulation of Pantothenic Acid into Liposomes and into Alginate or Alginate–Pectin Microparticles Loaded with Liposomes. *J Food Eng* **2018**, *229*, 21–31.
258. Zheng, L.; Li, B.; Lin, P.; Zhang, X.; Zhang, C.; Zhao, B.; Wang, T. Sedimentation and Precipitation of Nanoparticles in Power-Law Fluids. *Microfluid Nanofluidics* **2013**, *15*, 11–18.
259. Nikolic, I.; Lunter, D.J.; Randjelovic, D.; Zugic, A.; Tadic, V.; Markovic, B.; Cekic, N.; Zivkovic, L.; Topalovic, D.; Spremo-Potparevic, B. Curcumin-Loaded Low-Energy Nanoemulsions as a Prototype of Multifunctional Vehicles for Different Administration Routes: Physicochemical and *in vitro* Peculiarities Important for Dermal Application. *Int J Pharm* **2018**, *550*, 333–346.
260. Jovanović, A.A.; Balanč, B.; Volić, M.; Pećinar, I.; Živković, J.; Šavikin, K.P. Rosehip Extract-Loaded Liposomes for Potential Skin Application: Physicochemical Properties of Non- and UV-Irradiated Liposomes. *Plants* **2023**, *12*, 3063.
261. Skóra, B.; Piechowiak, T.; Szychowski, K.A.; Gmiński, J. Entrapment of Silver Nanoparticles in L- α -Phosphatidylcholine/Cholesterol-Based Liposomes Mitigates the Oxidative Stress in Human Keratinocyte (HaCaT) Cells. *Eur J Pharm Biopharm* **2021**, *166*, 163–174.
262. Erdoğmuş, S.F.; Altıntaş, Ö.E.; Demirel, H.H.; Okumuş, N. Fabrication of Wound Dressings: Herbal Extract-loaded Nanoliposomes Embedded in Fungal Chitosan/Polycaprolactone Electrospun Nanofibers for Tissue Regeneration. *Microsc Res Tech* **2024**, *87*, 360–372.

263. Nasab, M.E.; Takzaree, N.; Saffari, P.M.; Partoazar, A. *In vitro* Antioxidant Activity and *in vivo* Wound-Healing Effect of Lecithin Liposomes: A Comparative Study. *J Comp Eff Res* **2019**, *8*, 633–643.
264. Haghju, S.; Beigzadeh, S.; Almasi, H.; Hamishehkar, H. Chitosan Films Incorporated with Nettle (*Urtica dioica* L.) Extract-Loaded Nanoliposomes: I. Physicochemical Characterisation and Antimicrobial Properties. *J Microencapsul* **2016**, *33*, 438–448.
265. Ali, A.; Ahmed, S. Eco-Friendly Natural Extract Loaded Antioxidative Chitosan/Polyvinyl Alcohol Based Active Films for Food Packaging. *Heliyon* **2021**, *7*.
266. Wang, L.; Dong, Y.; Men, H.; Tong, J.; Zhou, J. Preparation and Characterization of Active Films Based on Chitosan Incorporated Tea Polyphenols. *Food Hydrocoll* **2013**, *32*, 35–41.
267. Dai, C.-A.; Liu, M.-W. The Effect of Crystallinity and Aging Enthalpy on the Mechanical Properties of Gelatin Films. *Mat Sci Eng: A* **2006**, *423*, 121–127.
268. Bigi, A.; Panzavolta, S.; Rubini, K. Relationship between Triple-Helix Content and Mechanical Properties of Gelatin Films. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5675–5680.
269. Nieto, M.B. Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. *Edible films and coatings for food applications* **2009**, 57–112.
270. Rodríguez, M.; Osés, J.; Ziani, K.; Maté, J.I. Combined Effect of Plasticizers and Surfactants on the Physical Properties of Starch Based Edible Films. *Food Res Int* **2006**, *39*, 840–846.
271. Nieto, M.B. Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. *Edible films and coatings for food applications* **2009**, 57–112.
272. Dayarian, S.; Zamani, A.; Moheb, A.; Masoomi, M. Physico-Mechanical Properties of Films of Chitosan, Carboxymethyl Chitosan, and Their Blends. *J Polym Environ* **2014**, *22*, 409–416.
273. Šeremet, D.; Štefančić, M.; Petrović, P.; Kuzmić, S.; Doroci, S.; Mandura Jarić, A.; Vojvodić Cebin, A.; Pjanović, R.; Komes, D. Development, Characterization and Incorporation of Alginate-Plant Protein Covered Liposomes Containing Ground Ivy (*Glechoma hederacea* L.) Extract into Candies. *Foods* **2022**, *11*, 1816.
274. Erami, S.R.; Amiri, Z.R.; Jafari, S.M. Nanoliposomal Encapsulation of Bitter Gourd (*Momordica charantia*) Fruit Extract as a Rich Source of Health-Promoting Bioactive Compounds. *Lwt* **2019**, *116*, 108581.
275. Shi, L.; Liu, Z.; Li, J.; Qin, Z. Analysis of Edible Vegetable Oils by Infrared Absorption Spectrometry. In Proceedings of the 2017 2nd International Conference on Electrical, Automation and Mechanical Engineering (EAME 2017); Atlantis Press, 2017; pp. 286–289.
276. Qiu, J.; Hou, H.-Y.; Yang, I.-S.; Chen, X.-B. Raman Spectroscopy Analysis of Free Fatty Acid in Olive Oil. *Applied Sciences* **2019**, *9*, 4510.

277. Kumar, G.; Karthik, L.; Rao, K.V.B. Antimicrobial Activity of Latex of *Calotropis gigantea* against Pathogenic Microorganisms-an *in vitro* Study. *Pharmacologyonline* **2010**, *3*, 155-163.
278. Segura, R.; Vásquez, G.; Colson, E.; Gerbaux, P.; Frischmon, C.; Nestic, A.; García, D.E.; Cabrera-Barjas, G. Phytostimulant Properties of Highly Stable Silver Nanoparticles Obtained with Saponin Extract from *Chenopodium quinoa*. *J Sci Food Agric* **2020**, *100*, 4987-4994.
279. Ricci, A.; Olejar, K.J.; Parpinello, G.P.; Kilmartin, P.A.; Versari, A. Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in the Characterization of Tannins. *Appl Spectrosc Rev* **2015**, *50*, 407-442.
280. Lucarini, M.; Durazzo, A.; Kiefer, J.; Santini, A.; Lombardi-Boccia, G.; Souto, E.B.; Romani, A.; Lampe, A.; Ferrari Nicoli, S.; Gabrielli, P. Grape Seeds: Chromatographic Profile of Fatty Acids and Phenolic Compounds and Qualitative Analysis by FTIR-ATR Spectroscopy. *Foods* **2019**, *9*, 10.
281. Frías, M.A.; Díaz, S.B.; Ale, N.M.; Altabef, A. Ben; Disalvo, E.A. FTIR Analysis of the Interaction of Arbutin with Dimyristoyl Phosphatidylcholine in Anhydrous and Hydrated States. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2006**, *1758*, 1823-1829.
282. Burki, I.K.; Khan, M.K.; Khan, B.A.; Uzair, B.; Braga, V.A.; Jamil, Q.A. Formulation Development, Characterization, and Evaluation of a Novel Dexibuprofen-Capsaicin Skin Emulgel with Improved *in vivo* Anti-Inflammatory and Analgesic Effects. *AAPS PharmSciTech* **2020**, *21*, 1-14.
283. Mirzaei-Mohkam, A.; Garavand, F.; Dehnad, D.; Keramat, J.; Nasirpour, A. Physical, Mechanical, Thermal and Structural Characteristics of Nanoencapsulated Vitamin E Loaded Carboxymethyl Cellulose Films. *Prog Org Coat* **2020**, *138*, 105383.
284. Ballesteros, L.F.; Cerqueira, M.A.; Teixeira, J.A.; Mussatto, S.I. Production and Physicochemical Properties of Carboxymethyl Cellulose Films Enriched with Spent Coffee Grounds Polysaccharides. *Int J Biol Macromol* **2018**, *106*, 647-655.
285. Hartmann, M.-A. Plant Sterols and the Membrane Environment. *Trends Plant Sci* **1998**, *3*, 170-175.
286. Bakker-Woudenberg, I.; Lokerse, A.F.; Ten Kate, M.T.; Melissen, P.M.B.; Van Vianen, W.; Van Etten, E.W.M. Liposomes as Carriers of Antimicrobial Agents or Immunomodulatory Agents in the Treatment of Infections. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* **1993**, *12*, S61-S67.
287. Abuhammour, W.; Habte-Gaber, E. Newer Antifungal Agents. *Ind J Ped* **2004**, *71*, 253-259.
288. Jiménez, A.; Sánchez-González, L.; Desobry, S.; Chiralt, A.; Tehrany, E.A. Influence of Nanoliposomes Incorporation on Properties of Film Forming Dispersions and Films Based on Corn Starch and Sodium Caseinate. *Food Hydrocoll* **2014**, *35*, 159-169.

289. Mohammad Imran Active Packaging Containing Nano-Vectorized Antimicrobial Peptides, Institute National Polytechnique de Lorraine, Universite de Lorraine: Lorraine, 2011.
290. Imran, M.; Revol-Junelles, A.-M.; René, N.; Jamshidian, M.; Akhtar, M.J.; Arab-Tehrany, E.; Jacquot, M.; Desobry, S. Microstructure and Physico-Chemical Evaluation of Nano-Emulsion-Based Antimicrobial Peptides Embedded in Bioactive Packaging Films. *Food Hydrocoll* **2012**, *29*, 407-419.

Spisak slika

Slika 1 *Paeonia tenuifolia* L. u punom cvetu, Gulenovci, Srbija (maj 2023. godine)

Slika 2 Hemijska struktura nekih fenolnih jedinjenja (3- galna kiselina; 29 – elaignska kiselina; 36 – *p* – kumarinska kiselina; ferulanska kiselina; 39 – metil galat; 55 – kvercetin; 58 – isorhamnetin; 68 – cijanidin)

Slika 3 Struktura molekula fosfolipida (levo) i lipozoma (desno)

Slika 4 Hemijska struktura natrijum-karboksimetil-celuloze

Slika 5 Maceracija latica *Paeonia tenuifolia* L.

Slika 6 Određivanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima latica *Paeonia tenuifolia* L.

Slika 7 Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima latica *Paeonia tenuifolia* L.

Slika 8 Lipozomi sa inkapsuliranim ekstraktom latica stepskog božura

Slika 9 Biopolimerni film na bazi karboksimetil-celuloze sa inkapsuliranim ekstraktom *Peonia tenuifolia* L.

Slika 10 Ispitivanje istezanja filmova na bazi karboksimetil-celuloze korišćenjem univerzalne mašine za ispitivanje; uzorak između hvataljki koji sadrže ekstrakt latica (levo) i lipozome u koje je inkorporiran ekstrakt (desno).

Slika 11 Francova difuziona ćelija.

Slika 12 Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata primenom DPPH metode

Slika 13 Antioksidativna aktivnost ekstrakata određena ABTS metodom

Slika 14 Formiranje biofilma *Staphylococcus lugdunensis* (Ibis 2996) nakon tretmana ekstraktima *Paeonia tenuifolia* L.

Slika 15 Relativna stopa rasta HaCaT ćelija pod dejstvom ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L.

Slika 16 Uticaj odabranih ekstrakata latica *Paeonia tenuifolia* L. na kapacitete adhezije (levo) i invazije (desno) *Staphylococcus lugdunensis* na HaCaT ćelijama

Slika 17 Efikasnost inkapsulacije ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L. u lipozome dobijene primenom različitih fosfolipida.

Slika 18 Veličina lipozoma (a), indeks polidisperznosti (PDI) (b) i zeta-potencijal (c) praznih lipozoma (kontrola) i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L. tokom 60 dana skladištenja na 4 °C.

Slika 19 Antioksidativna aktivnost lipozoma sa ekstraktom latica: a) DPPH; b) ABTS.

Slika 20 Relativna stopa rasta HaCaT ćelija pod dejstvom praznih i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L.

Slika 21 Uticaj kontrolnih lipozoma i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L. na kapacitete adhezije (levo) i invazije (desno) *Staphylococcus lugdunensis* na HaCaT ćelijama

Slika 22 Sadržaj vlage biopolimernih filmova

Slika 23 SEM mikrofotografije osušenih filmova karboksimetil celuloze: (a) film sa ekstraktom latica stepskog božura (0,4 g) sa malim uvećanjem ($\times 1000$); (b) filmovi sa lipozomima sa ekstraktom latica sa malim uvećanjem ($\times 5000$) i (c) film sa ekstraktom latica (0,2 g) sa malim uvećanjem ($\times 2000$).

Slika 24 FT-IR spektri praznih i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L.

Slika 25(a) FT-IR spektri filma karboksimetil celuloze sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L.; (b) FT-IR spektri filma karboksimetil celuloze sa lipozomima sa ekstraktom.

Slika 26 FT-IR spektar ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L.

Slika 27 Profili oslobađanja polifenola iz ekstrakta *Paeonia tenuifolia* L., lipozoma i filmova, izraženi kao procenat oslobođenih polifenola.

Slika 28 Difuzija polifenola iz suvog ekstrakta latica stepskog božura, lipozoma sa inkapsuliranim ekstraktom, filmova sa inkapsuliranim ekstraktom, kao i filmova sa lipozomima sa ekstraktom, na 37 °C, aproksimirana II Fikovim zakonom difuzije; c_d^0 i c_r^0 su početne koncentracije polifenola u donorskom i akceptorskom delu; c_d i c_r su koncentracije polifenola u donorskom i akceptorskom delu Francove difuzione ćelije u datom trenutku.

Slika 30 Formiranje biofilma *Staphylococcus lugdunensis* (nakon tretmana lipozomima sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L.

Spisak tabela

Tabela 1 Sadržaj ukupnih polifenola (TPC) i sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) *Paeonia tenuifolia* L. (sa različitih lokaliteta) ekstrakata dobijenih različitim metodama ekstrakcije i ekstrakcionim medijumima.

Tabela 2 HRMS i MS⁴ podaci za metabolite identifikovane u metanolnom ekstraktu *Paeonia tenuifolia* L.

Tabela 3 Kvantifikacija aktivnih jedinjenja u ekstraktima latica *Paeonia tenuifolia* L. primenom UHPLC/MS metode

Tabela 4 Antioksidativna (DPPH, ABTS, CUPRAC, and FRAP) aktivnost vodenih i metanolnih ekstrakata latica *Paeonia tenuifolia* L.

Tabela 5 Antibakterijska aktivnost vodenih i metanolnih ekstrakata latica *Paeonia tenuifolia* (MIK and MBK, mg/mL)

Tabela 6 Antikandidalna aktivnost vode i metanolnih ekstrakata *Paeonia tenuifolia* L. (MIK i MFK, mg/mL).

Tabela 7 Efekti ekstrakata *Paeonia tenuifolia* L. na kapacitet migracije HaCaT ćelija (*in vitro* simulacija zarastanja rana).

Tabela 8 Gustina (ρ), površinski napon (γ) i viskozitet (η) lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L..

Tabela 9 Efekti kontrolnih lipozoma i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L. na kapacitet migracije HaCaT ćelija (*in vitro* simulacija zarastanja rana). **Tabela 10** Mehaničke karakteristike filmova na bazi karboksimetil celuloze sa čistim ekstraktom stepskog božura i lipozomima sa inkapsuliranim ekstraktom.

Tabela 11 Koeficijenti difuzije i otpor difuziji polifenola iz čistog ekstrakta latica *Paeonia tenuifolia* L., lipozoma sa ekstraktom, filma sa ekstraktom i filma sa lipozomima sa ekstraktom. D —koeficijent difuzije; R —ukupni otpor prenosu mase.

Tabela 12 Antibakterijska aktivnost praznih lipozoma i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L. (MIK i MBK, mg/mL).

Tabela 13 Antikandidalna aktivnost praznih lipozoma i lipozoma sa ekstraktom latica *Paeonia tenuifolia* L. (MIK i MFK, mg/mL).

Tabela 14 Prečnici zona inhibicije u disk difuzionoj metodi za bakterijske sojeve.

Tabela 15 Prečnici zona inhibicije u testu difuzije diska za sojeve *Candida*.

Spisak skraćenica

MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima

UAE – ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MBK – minimalna baktericidna koncentracija

MFK – minimalna fungicidna koncentracija

IC₅₀ – koncentracija potrebna za neutralizaciju 50% radikala

MeOH – metil alkohol

CUPRAC – Antioksidativni potencijal za neutralizaciju jona bakra

FRAP – Antioksidativni potencijač za redukciju gvožđa

ABTS – (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sumporna kiselina)

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

ROS – reaktivne kiseonične vrste

RNS – reaktivne azotne vrste

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

HCS – tehnologija visokog sadržaja

HCA – analiza visokog sadržaja

HaCaT – humani epidermalni keratinociti

KS – kvorum senzibilizacije

UV – ultra ljubičasta

UHPLC – tečna hromatografija ultra visokih performansi

UHPLC/MS – tečna hromatografija ultra visokih performansi/masena spektrometrija

FT – IR – Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

CE – ekvivalent katehina

GAE – ekvivalent galne kiseline

LC/MS – tečna hromatografija/masena spektrometrija

L53 MCT + ekstrakt – lipozomi čija je osnova Phosal 53 MCT, u koje je inkapsuliran ekstrakt latica

L75 SA + ekstrakt – lipozomi čija je osnova Phosal 75 SA, u koje je inkapsuliran ekstrakt latica

LPh + ekstrakt – lipozomi čija je osnova Fosfolipon, u koje je inkapsuliran ekstrakt latica

L53 MCT – lipozomi čija je osnova Phosal 53 MCT

L75 SA – lipozomi čija je osnova Phosal 75 SA

LPh – lipozomi čija je osnova Fosfolipon

SI – stepen inkapsulacije

PDI – indeks polidisperzije

CMC – karboksimetil-celuloza

SV – sadržaj vlage

TS – zatezna čvrstoća

BF – sila kidanja

EB – izduženje pri lomu

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija

A_{cont} – apsorbanca kontrole

A_{sample} – apsorbanca uzorka

CFU – broj živih bakterija

TSB – tripton soja bujon

PBS – rastvor fosfatnog pufera

FBS – fetalni goveđi serum

DMEM - Dulbekov Modifikovani "Eagle" Medijum

TPC – ukupan sadržaj polifenola

TFC – ukupan sadržaj flavonoida

TE – Troloks ekvivalent

Biografski podaci

Natalija M. Čutović, master inženjer tehnologije, rođena je 26.02.1997. godine u Čačku. Osnovnu školu „dr Dragiša Mišović“ završila je u Čačku, dok je srednje obrazovanje stekla u Čačku, završivši prirodno-matematički smer Gimnazije u Čačku, u junu 2016. godine.

Diplomirala je 2020. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Organska hemijska tehnologija, u okviru studijskog programa Hemijsko inženjerstvo, sa prosečnom ocenom 9,55. Master studije je nastavila na istom studijskom programu, odbranivši završni master rad pod rukovodstvom prof. dr Aleksandra Marinkovića, redovnog profesora Katedre za organsku hemiju.

Doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijsko izbornu područje - hemijsko inženjerstvo upisala je u oktobru 2021. godine pod rukovodstvom prof. dr Branka Bugarskog i dr Aleksandre A. Jovanović. Položila je sve ispite predviđene planom i programom studijskog programa i odbranila završni ispit pod nazivom „Biološke aktivnosti ekstrakata latica *Paeonia tenuifolia* L. i njihova potencijalna primena na koži”.

U Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, u Odseku za Poljoprivredna istraživanja i razvoj, zaposlila se u maju 2022. godine i iste godine je stekla zvanje istraživač pripravnik. Odlukom Naučnog veća Instituta u novembru 2023. godine stekla je zvanje istraživač saradnik.

Kao rezultat rada na doktorskoj disertaciji, kandidat je objavio dva naučna rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jedan naučni rad u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (M24), kao i jedno saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34).

Lista objavljenih radova

Naučni radovi proizašli kao rezultat istraživanja kandidata u vezi sa doktorskom disertacijom:

- M 21 (Časopis koji je prema IF2 rangiran u JCR u svojoj oblasti nauka među prvih 10% časopisa):
 1. Čutović, N., Marković, T., Kostić, M., Gašić, U., Prijjić, Ž., Ren, X., Lukić, M., Bugarski, B., 2022. Chemical profile and skin-beneficial activities of the petal extracts of *Paeonia tenuifolia* L. from Serbia. *Pharmaceutics*, 15(12), p.1537.
 2. Čutović, N., Marković, T., Carević, T., Stojković, D., Bugarski, B., Jovanović, A.A., 2023. Liposomal and liposomes-film systems as carriers for bioactives from *Paeonia tenuifolia* L. Petals: physicochemical characterization and biological potential. *Pharmaceutics*, 15(12), p.2742.
- M 24 (Časopis koji se prema bibliometrijskim pokazateljima Nacionalnog indeksa u svojoj oblasti nauka nalazi u prvih 5%, a u oblasti društvenohumanističkih nauka i časopisi označeni kao kao Q2 i Q3 u SJR):
 3. Čutović, N., Marković, T., Žugić, A., Batinić, P., Bugarski, B., Jovanović, A., 2023. Antioxidant activity of *Paeonia tenuifolia* L. petal extract-loaded liposomes, *Lekovite sirovine*, 43(1), e167C.
- M 34 (Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu):
 4. Čutović, N., Marković, T., Carević, T., Stojković, D., Bugarski, B., Jovanović, A. 2023. Evaluation of the anti-inflammatory potential of *Paeonia tenuifolia* L. petal extract. Twenty-First Young Researchers Conference – Materials Science and Engineering, 29.11.– 1.12., 2023. Belgrade Serbia. Book of abstracts, p.5.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Наталија Чутовић**

Број индекса **4027/2021**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Оптимизација екстракције латица *Paeonia tenuifolia* L., биолошки ефекти на кожи и имобилизација у носаче

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

Потпис аутора

У Београду, 06.03.2024.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада

Име и презиме аутора **Наталија Чутовић**

Број индекса **4027/2021**

Студијски програм **Хемијско инжењерство**

Наслов рада **Оптимизација екстракције латица *Paeonia tenuifolia* L., биолошки ефекти на кожи и имобилизација у носаче**

Ментор **др Бранко Бугарски, редовни професор**

Ментор **др Александра Јовановић, виши научни сарадник**

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 06.03.2024.



Изјава о коришћењу

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

Оптимизација екстракције латица *Raeonia tenuifolia* L., биолошки ефекти на кожи и имобилизација у носаче

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

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

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

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 06.03.2024.



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

PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, korišćenjem programa iThenticate izvršena je provera originalnosti doktorske disertacije kandidata Natalije M. Čutović, master inženjera tehnologije, pod nazivom **„Optimizacija ekstrakcije latica *Paeonia tenuifolia* L., biološki efekti na koži i imobilizacija ekstrakata u nosače“**. Izveštaj koji sadrži rezultate provere originalnosti mentori su dobili dana 14.03.2024. godine. Utvrđeni procenat podudarnosti je 2%. Ovaj procenat je posledica upotrebe stručnih termina i naziva korišćenih metoda i njihovih skraćenica, ličnih imena, citata i instrumenata koji se nalaze u navedenoj tezi. Deo podudarnosti se odnosi i na prethodno publikovane rezultate istraživanja, koji su proistekli iz disertacije doktoranda, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izjavljujemo da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije, te se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti (pozitivna ocena).

U Beogradu, 18.03.2024.

Mentori:

prof. dr Branko Bugarski, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Aleksandra A. Jovanović, viši naučni saradnik
Univerziteta u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije INEP