



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



Valentina G. Nikolić

**OPTIMIZACIJA POSTUPKA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE
BIOAKTIVNIH JEDINJENJA IZ KIČICE (*Centaurium erythraea* Rafn)
VODENIM RASTVORIMA PROPILEN-GLIKOLA I ETANOLA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2025.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY, LESKOVAC



Valentina G. Nikolić

**OPTIMIZATION OF ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF
BIOACTIVE COMPOUNDS FROM COMMON CENTAURY
(*Centaureum erythraea* Rafn) AERIAL PARTS USING AQUEOUS
PROPYLENE-GLYCOL AND ETHANOL**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2025.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:

Prof. dr Sandra Konstantinović, redovni profesor
Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

Naslov:

Optimizacija postupka ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz kičice (*Centaurium erythraea* Rafn) vodenim rastvorima propilen-glikola i etanola

Rezime:

Usled povećanog zahteva tržišta za proizvodima prirodnog porekla, težnja ka dizajniranju istih je naročito istaknuta i izražena u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Uopšteno priznati kao bezbedni, različiti proizvodi planinskog bilja (ekstrakti, tinkture, lekovita vina i slično) smatraju se poželjnim za konzumaciju, ali predstavljaju i prirodne aditive u farmaceutskim, prehrambenim i kozmetičkim proizvodima. Među planinskim biljem, kičica je poznata po viševjekovnoj primeni u tradicionalnoj medicini i fitofarmaciji.

Predmet istraživanja doktorske disertacije je dobijanje ekstrakata iz nadzemnih delova kičice (*Centaurium erythraea* Rafn, Gentianaceae) šaržnim tehnološkim postupkom, odnosno ultrazvučnom ekstrakcijom u ekološki prihvatljivim sistemima rastvarača voda/propilen-glikol i voda/etanol. Izvršena je optimizacija uslova dveju ekstrakcija (koncentracija alkohola, solvomodula, temperature i vremena ekstrakcije), karakterizacija i poređenje sastava ekstrakata proizvedenih pri optimalnim uslovima.

Ultrazvučnom ekstrakcijom pri blagim uslovima tehnoloških procesa postignuta je veća efikasnost difuzije polifenolnih jedinjenja u odabrane rastvarače (voda/propilen-glikol i voda/etanol), uz poboljšanje sadržaja fitokomponenti u ekstraktima i minimalnu potrošnju rastvarača. Primećene su i razlike u kvantitativnom sadržaju ekstrakata dobijenih pri optimalnim uslovima. Propilen-glikolni ekstrakt sadrži više bioaktivnih jedinjenja. Osim toga, etanol u odnosu na propilen-glikol ima nižu tačku ključanja, lakše isparava, zapaljiv je na nižoj temperature, itd. Stoga se preporučuje upotreba voda/propilen-glikol sistema, koji je mnogo bezbedniji, obezbeđuje ekstrakt sa više biološki funkcionalnih fitohemijskih jedinjenja i većim sadržajem polifenolnih jedinjenja pri nižoj temperaturi, za ekološki prihvatljivu buduću industrijsku upotrebu.

Obe tehnike (ultrazvučna ekstrakcija vodenim rastvorom propilen-glikola (UE/aPPG) i vodenim rastvorom etanola (UE/aEtOH)) zahtevaju blage uslove rada, upotrebu jeftinih, bezbednih i ekološki prihvatljivih rastvarača, minimalnu potrošnju rastvarača i energije, čineći oba šaržna tehnološka procesa prihvatljivim i opravdanim sa ekološke i ekonomske tačke gledišta. Dobijeni ekstrakti mogu se konzumirati, ali i primeniti kao aditivi u fitofarmaceutskim i fitokozmetičkim proizvodima.

S obzirom da se ovi ekstrakti mogu koristiti u različitim proizvodima kao prirodni aktivni sastojci, protokoli ekstrakcije će verovatno osigurati jednostavan prenos na proizvodnju većeg obima i dalju upotrebu u različitim granama industrije, posebno osiguravajući čistiju proizvodnju sa smanjenim

uticajem na životnu sredinu.

Naučna oblast:
Naučna disciplina:

Tehnološko inženjerstvo

Hemija i hemijske tehnologije

Ključne reči:

Centaurium erythraea, Box-Behnken eksperimentalni dizajn, optimizacija, ultrazvučna ekstrakcija, UHPLC–DAD–ESI–MS/MS analiza, sekoiridoidni glikozidi, ksantoni, flavonoidi.

UDK:

66.061:582.923.1:543.5 (043.3)

CERIF
klasifikacija:

T350 Hemijska tehnologija i inženjering

Tip licence
Kreativne
zajednice:

Odabrani tip licence: **CC BY-NC-ND**

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Sandra Konstantinović, Full Professor,
University of Niš, Faculty of Technology in Leskovac

Title:

Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from common centaury (*Centaureum erythraea* Rafn) aerial parts using aqueous propylene-glycol and ethanol

Abstract:

Due to the growing demand for natural-origin products, the tendency to design such products is particularly prominent in the pharmaceutical and cosmetic industries. Generally recognized as safe, various products derived from mountain herbs (extracts, tinctures, medicinal wines, etc.) are considered desirable for consumption but also serve as natural additives in pharmaceutical, food, and cosmetic products. Among mountain herbs, centaury has attracted significant interest due to its centuries-long use in traditional medicine and phytopharmacy.

The subject of this doctoral dissertation is the extraction of compounds from the aerial parts of centaury (*Centaureum erythraea* Rafn, Gentianaceae) ultrasound-assisted extraction in environmentally friendly solvent systems—water/propylene-glycol and water/ethanol. The study includes the optimization of extraction conditions (alcohol concentration, solvent-to-solid ratio, temperature, and extraction time), as well as the characterization and comparison of the composition of extracts obtained under optimal conditions.

Ultrasound-assisted extraction under mild conditions of technological processes achieved a higher efficiency of diffusion of polyphenolic compounds into the selected solvents (water/propylene-glycol and water/ethanol), enhancing the phytochemical content of the extracts while minimizing solvent consumption. Differences in the quantitative composition of extracts obtained under optimal conditions were observed, with the propylene-glycol extract containing a higher concentration of bioactive compounds. Additionally, compared to propylene-glycol, ethanol has a lower boiling point, evaporates more easily, is flammable at a lower temperature, etc.

Therefore, the water/propylene-glycol system is recommended as a much safer alternative. It provides an extract with a higher concentration of biologically functional phytochemicals and polyphenolic compounds at lower temperatures, making it a more environmentally friendly option for future industrial applications.

Both techniques (ultrasound-assisted extraction using aqueous propylene-glycol (UE/aPPG) and ethanol (UE/aEtOH)) and require mild operating conditions, the use of inexpensive, safe, and environmentally friendly solvents, as well as minimal solvent and energy consumption, making both batch technological processes environmentally and economically justified. The obtained extracts can be used for consumption, but also as additives in phytopharmaceutical and phytocosmetic products.

Since these extracts can be used in various products as natural active ingredients, the extraction protocols are likely to ensure easy transfer to large-scale production and further use in various industries, especially ensuring cleaner production with reduced environmental impact.

Scientific Field:
Scientific
Discipline:

Technological engineering

Chemistry and chemical technologies

Key words:

Centaurium erythraea, Box-Behnken experimental design, optimization, Ultrasound-assisted extraction, UHPLC–DAD–ESI–MS/MS analysis, secoiridoid glycosides, xanthones, flavonoids.

UDC:

66.061:582.923.1:543.5 (043.3)

CERIF
Classification:

T350 Chemical technology and engineering

Creative Commons
License Type:

Selected Licence Type: **CC BY-NC-ND**

Zahvalnica

Najsrdačnije se zahvaljujem mentoru dr Sandri Konstantinović, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta, na nesebičnoj pomoći, korisnim savetima, sugestijama i prenesenom znanju tokom izrade ove doktorske disertacije. Vaša posvećenost, strpljenje i podrška bili su od neprocenjivog značaja za uspešan završetak mog rada.

Posebno se zahvaljujem svim članovima komisije, profesorima sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, dr Ivani Savić Gajić i dr Ivanu Saviću, višem naučnom saradniku dr Draganu Troteru i profesorima sa Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, dr Aleksandru Marinkoviću i dr Jasmini Nikolić, na pažljivom čitanju doktorske disertacije i korisnim savetima i sugestijama.

Na ukazanoj pomoći u eksperimentalnoj fazi disertacije, zahvaljujem profesorima sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, dr Jeleni Zvezdanović, dr Sanji Petrović, dr Saši Saviću, dr Jeleni Stanojević i dr Ivani Radojević sa Prirodno-matematičkog fakuleta u Kragujevcu.

Na kraju, najdublju zahvalnost dugujem porodici, suprugu Milanu, majci Gordani i ocu Goranu, koji su mi bili najveći oslonac tokom svih godina studija. Vaša ljubav, strpljenje i neiscrpna podrška pomogli su mi da istrajem u najtežim trenucima. Bez vaše podrške, saveta i ljubavi, danas ne bih stajala među doktorima nauka.

SPISAK SIMBOLA

X	Stvarna vrednost faktora
X_{max}	Maksimalna stvarna vrednost faktora
X_{min}	Minimalna stvarna vrednost faktora
R	Faktor fitovanja
R^2	Koeficijent determinacije
p	Nivo statističke značajnosti
x	Molarna frakcija
$E \text{ (kW}\cdot\text{h)}$	Potrošnja energije
$t \text{ (min)}$	Vreme ekstrakcije
n_i^e	Eksperimentalna vrednost
n_i^p	Predviđena vrednost
n	Ukupan broj ekstrakcija u eksperimentalnom dizajnu
$T \text{ (}^\circ\text{C)}$	Temperatura ekstrakcije
$P \text{ (W)}$	Snaga ultrazvuka
$f \text{ (kHz)}$	Frekvencija ultrazvuka
$\lambda \text{ (nm)}$	Talasna dužina

SPISAK SKRAĆENICA

ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
Adj. R ²	Prilagođeni koeficijent determinacije (R ²)
aEtOH	Vodeni rastvor etanola
ALT	Alanin amino-transferaza
ANOVA	Analiza varijanse
aPPG	Vodeni rastvor propilen-glikola
ARP	Antiradikalska snaga (<i>antiradical power</i>)
AST	Aspartat amino-transferaza
BBD	Box-Behnken dizajn
BHT	Butilovani hidroksitoluen
CAT	Katalaza
CFU	Jedinica formiranja kolonije (<i>Colony forming unit</i>)
CO ₂	Ugljen(IV)-oksid
CoA	Koenzim A
CV	Koeficijent varijacije
DAD	Detektor diodnog niza (<i>Diode – Array Detection</i>)
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EE	Enzimska ekstrakcija
EC ₅₀	Efektivna koncentracija
ESI	Elektrosprej jonizacija
EtOH	Etanol
FRAP	Antioksidativna snaga redukovanja gvožđa
G10H	Geraniol 10-hidroksilaza
GAE	Ekvivalent galne kiseline
GC-MS	Gasna hromatografija-masena spektrometrija
GPx	Glutation peroksidaza
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi

HS-SPME	Headspace mikroekstrakcija u čvrstoj fazi
IC ₅₀	Koncentracija koja inhibira 50% aktivnosti
ICP-OES	Induktivno spregnuta plazma-optička emisiona spektrometrija
InA	Kinetička zavisnost
LCQ	Tečna hromatografija sa kvadrupolnim masenim spektrometrom (<i>Liquid Chromatography Quadrupole</i>)
LD	Limit detekcije
LDH	Laktat dehidrogenaza
ME	Mikrotalasna ekstrakcija
MBK	Minimalna baktericidna koncentracija
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MMK	Minimalna mikrobiocidna koncentracija
MnSOD	Mangan superoksid dismutaza
MS	Masena spektrometrija
MSE	Srednja kvadratna greška
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PPG	Propilen-glikol
<i>Pred. R</i> ²	Predviđeni koeficijent determinacije
RMSE	Koren srednje kvadratne greške
ROS	Reaktivne vrste kiseonika
RSM	Metodologija površine odgovora (<i>Response Surface Methodology</i>)
SE	Superkritična ekstrakcija
SSE	Suma kvadrata grešaka
TPC	Sadržaj ukupnih polifenola (<i>Total Polyphenol Content</i>)
UE	Ultrazvučna ekstrakcija
UHPLC	Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom
UV	Ultraljubičasto zračenje
UV-Vis	Ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija

SADRŽAJ

1. UVOD	13
2. TEORIJSKI DEO	17
2.1 Biljne vrste roda <i>Centaurium</i> S.L.	17
2.2 Prirodni i biotehnološki resursi roda <i>Centaurium</i> S.L.	19
2.3 <i>C. erythraea</i> Rafn (kičica)	21
2.4 Hemijska raznovrsnost <i>C. erythraea</i> Rafn	24
2.4.1 Terpenoidi	24
2.4.2 Fenoli	28
2.4.3 Ksantoni	29
2.5 Biološka aktivnost <i>C. erythraea</i> Rafn	32
2.5.1 Antimikrobna aktivnost <i>C. erythraea</i>	32
2.5.2 Antioksidativna aktivnost <i>C. erythraea</i>	33
2.5.3 Hepatoprotektivna i gastroprotektivna aktivnost <i>C. erythraea</i>	34
2.5.4 Uticaj <i>C. erythraea</i> na metabolizam lipida i ugljenih hidrata	34
2.5.5 Toksičnost <i>C. erythraea</i>	37
2.6 Metode ekstrakcije	38
2.6.1 Konvencionalne i moderne metode ekstrakcije	38
2.6.2 Ultrazvučna ekstrakcija	40
2.6.3 Faktori koji utiču na UE bioaktivnih jedinjenja	41
2.6.3.1 Snaga ultrazvuka	42
2.6.3.2 Frekvencija ultrazvuka	42
2.6.3.3 Uticaj temperature ekstrakcije	43
2.6.3.4. Uticaj vremena ekstrakcije	43
2.6.4 Optimizacija uslova ekstrakcije	43
2.6.4.1 Izbor odgovora i faktora i njihovih nivoa	44
2.6.4.2 Izbor eksperimentalnog dizajna, izvođenje eksperimenata prema definisanom planu, statistička analiza dobijenih podataka i formiranje matematičkog modela	45
2.6.4.3 Grafički prikaz matematičkog modela i optimizacija bazirana na modelu	46
3. EKSPERIMENTALNI DEO	47
3.1 Materijal	47
3.1.1 Biljni materijal	47
3.1.2 Hemikalije	47
3.1.3 Instrumenti	48
3.2 Metode	48
3.2.1 Određivanje sadržaja vlage	48
3.2.2 Priprema i analiza infuzije	48
3.2.3 UE etanolom i propilen-glikolom	48
3.2.4 Određivanje mineralnog sastava etanolnog i propilen-glikolnog ekstrakta kičice	49
3.2.4.1 Induktivno spregnuta plazma - optička emisiona spektrometrija (ICP-OES)	49

3.2.4.2 Priprema uzoraka za ICP-OES analizu.....	49
3.2.4.3 Analiza uzoraka.....	50
3.2.5 UHPLC-DAD-MS/MS analiza bioaktivnih jedinjenja.....	51
3.2.6 Određivanje sadržaja ukupnih polifenola.....	51
3.2.7 Statistička analiza i optimizacija UE.....	52
3.2.8 Procena antimikrobne aktivnosti.....	53
3.2.8.1. Mikrodiluciona metoda.....	53
3.2.8.2 Određivanje osetljivosti bakterija.....	53
3.2.9 Određivanje antiradikalske aktivnosti uzoraka primenom DPPH testa.....	54
3.2.10 UV-A ozračivanje.....	55
3.2.11 Dinamička viskoznost smeše dve tečnosti.....	56
3.2.12 Električna potrošnja i emisija ugljen(IV)-oksida.....	56
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	57
4.1 Sadržaj vlage u biljnom materijalu.....	57
4.2 Karakterizacija infuzije kičice.....	57
4.2.1 Hemijski sastav infuzije kičice.....	57
4.2.2 Mineralni sastav infuzije kičice.....	63
4.3 Modelovanje i optimizacija sistema UE/aEtOH i UE/aPPG.....	65
4.4 UHPLC-DAD-MS/MS analiza sistema UE/aEtOH i UE/aPPG.....	77
4.5 Mineralni sastav UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta kičice.....	84
4.6 Razlike u efikasnosti ekstrakcije između UE/aEtOH i UE/aPPG sistema.....	86
4.7 Evaluacija i upoređivanje predloženih metodologija UE.....	87
4.8 Antimikrobna aktivnost UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta.....	89
4.9 Antiradikalska aktivnost UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta.....	90
4.10 Fotoliza UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta pod uticajem UV-A zračenja.....	93
5. ZAKLJUČAK.....	98
6. LITERATURA.....	102

1. UVOD

Usled povećane potražnje tržišta za proizvodima prirodnog porekla, težnja ka dizajniranju istih je posebno izražena u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Uopšteno priznati kao bezbedni, različiti proizvodi planinskog bilja (ekstrakti, tinkture, lekovita vina i slično) smatraju se poželjnim za konzumaciju, ali predstavljaju i prirodne i bezbedne aditive u farmaceutskim, prehrambenim i kozmetičkim proizvodima. Među planinskim biljem, kičica je predmet izrazitog interesovanja usled njene viševjekovne primene u tradicionalnoj medicini i fitofarmaciji.

Crveni kantarion, kičica (*Centaurium erythraea* Rafn, Gentianaceae) je cvetna lekovita biljka i dragocena industrijska kultura. Prirodno je rasprostranjena na području Evrope, zapadne Azije i severne Afrike (Teke i Kuete, 2014). Uglavnom raste na krečnjačkim zemljištima i suvim travnatim mestima, uključujući i peščane dine (Guedes *i sar.*, 2019). Kičica je biljka glatke, uspravne stabljike (10 – 50 cm) sa malim, cevastim, ružičastim cvetovima i razgranatim cvastima na vrhu stabljike (Tobyn *i sar.*, 2016). Listovi su postojani tokom cvetanja, eliptično-ovalni, sa glatkim rubovima i pet uzdužnih nerava (Paniagua-Zambrana, 2020).

Nadzemni delovi kičice pokazuju antimikrobno, antioksidativno, gastroprotektivno i antiinflamatorno dejstvo (Guedes *i sar.*, 2019). U etnomedicini se koristi za lečenje različitih kožnih oboljenja (ekcemi, povrede i rane), reumatizma, edema, astme, žutice, crevnih parazitskih infestacija, smetnji u varenju, hiperholesterolemije i hipertenzije, febrilnih stanja, hepatitisa, dijabetesa, hepatoaktivnosti i aktivnosti žučne kese, kao i za stimulaciju motiliteta gastrointestinalnog trakta (Guedes *i sar.*, 2019; Mazimba *i sar.*, 2013; Teke & Kuete, 2014). Tinkture, tonici, losioni i čajevi napravljeni od različitih delova biljke, tradicionalno se koriste za lečenje gastrointestinalnih poremećaja, dispepsije, opstipacije, groznice, anemije, anoreksije, podsticanje apetita, i za čišćenje krvi i bubrega (Kumarasamy *i sar.*, 2003; Merghem & Dahamna, 2020; Subotić *i sar.*, 2006). Ekstrakti *C. erythraea* takođe pokazuju antimutagena, diuretička, antikancerogena, analgetička, antipiretička, antiinflamatorna, antiulkusna, antioksidativna, antibakterijska i antifungalna svojstva (Merghem & Dahamna, 2020; Siler *i sar.*, 2014).

Brojna jedinjenja poput ksantona, flavonoida, fenolnih kiselina, triterpena i sekoiridoidnih glikozida (Mazimba *i sar.*, 2013; Teke & Kuete, 2014), čine ovu biljku vrednom sirovinom za proizvodnju prirodnih lekova, kozmetičkih proizvoda i bioterapeutika.

Ekstrakti *C. erythraea* su bogati sekoiridoidnim glikozidima (gorkim jedinjenjima), koji su karakteristični za porodicu Gentianaceae, pre svega sverozid, sverciamarin i genciopikrozid (Tobyn *i sar.*, 2016) i odgovorni su za inhibiciju spontane kontrakcije mišića ileuma, kao i za neke analgetske, antiinflamatorne i antiacetilholinesterazne aktivnosti ove biljke (Molina *i sar.*, 2000). Nadzemni delovi biljke su bogati sterolima (β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol, brasikasterol, Δ -7-stigmastenol), fenolnim kiselinama (*p*-kumarinska kiselina, ferulna kiselina, sinapinska kiselina), kumarinima (izokumarin), flavonoidima (kaempferol), i ksantonima (metoksilovani i tetraoksigenovani ksantoni) (El Menyiy *i sar.*, 2021; Valentão *i sar.*, 2002).

Čajevi napravljeni od različitih lekovitih biljaka konzumiraju se širom sveta, zbog svojih bioloških aktivnosti, poput antioksidativne, antiinflamatorne i antimikrobne (Chou *i sar.*, 2021). Lekovita svojstva biljaka pripisuju se prisustvu bioaktivnih jedinjenja, koja predstavljaju jedinstvene resurse za farmaceutske i kozmetičku industriju (Zhao *i sar.*, 2005). Ova jedinjenja se nalaze u biljkama i okružena su nerastvorljivim strukturama poput vakuola biljnih ćelija i lipoproteinskih dvostrukih slojeva, što otežava njihov proces ekstrakcije (Corrales *i sar.*, 2008). Prinos ekstrakcije u značajnoj meri zavisi ne samo od prirode bioaktivnih jedinjenja, nego i od izabrane metode ekstrakcije, vrste rastvarača, temperature, solvomodula i vremena ekstrakcije (Pandey *i sar.*, 2018).

Tradicionalne metode ekstrakcije poput Soxhlet ekstrakcije, maceracije, perkolacije i sličnih, poznate su po velikoj potrošnji rastvarača, vremena i energije (Pandey *i sar.*, 2018). Nove tehnologije ekstrakcije, kao što je ultrazvučna ekstrakcija (UE), omogućavaju veći prinos vrednih bioaktivnih jedinjenja uz manju upotrebu rastvarača, kraće vreme ekstrakcije i niže temperature (Barba *i sar.*, 2015; Bouras *i sar.*, 2015; Deng *i sar.*, 2015).

UE jedna je od obećavajućih metoda za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja. Prihvaćena je kao tehnika „zelene“ ekstrakcije, zbog svoje visoke efikasnosti uz manju potrošnju rastvarača i vremena, kao i zbog pogodnosti za termooosetljiva jedinjenja (Yusoff *i sar.*, 2022). Ona se koristi kako bi se smanjio gubitak ekstrakta pri procesu ekstrakcije biljnih materijala. Njenom primenom se povećava stopa prenosa mase pomoću kavitacione energije, gde mehurići u tečnosti ili smeši, eksplozivno kolapsiraju, stvarajući lokalizovani pritisak koji uzrokuje pucanje tkiva biljke i poboljšava oslobađanje intracelularnih supstanci u rastvaraču (Pandey *i sar.*, 2018).

Predmet ovog istraživanja je dobijanje ekstrakata iz nadzemnih delova kičice (*C. erythraea* Rafn, Gentianaceae) šaržnim tehnološkim postupkom, odnosno tehnikom ultrazvučne ekstrakcije u ekološki prihvatljivim sistemima rastvarača voda/propilen-glikol (aPPG) i voda/etanol (aEtOH).

Izvršena je optimizacija uslova ekstrakcije (koncentracija alkohola, solvomodul, temperatura i vreme ekstrakcije), karakterizacija i poređenje sastava ekstrakata proizvedenih pri optimalnim uslovima. Obe tehnike zahtevale su blage uslove rada, upotrebu jeftinih, bezbednih i ekološki prihvatljivih rastvarača, minimalnu potrošnju rastvarača i energije, čineći oba šaržna tehnološka procesa prihvatljivim i opravdanim sa ekološke i ekonomske tačke gledišta.

Cilj ovog istraživanja bio je da se UE pri optimalnim uslovima tehnoloških procesa postigne veća efikasnost difuzije polifenolnih jedinjenja u odabrane rastvarače, uz poboljšanje sadržaja fitokomponenti u ekstraktima i minimalnu potrošnju rastvarača. Poređen je i kvantitativni sadržaj ekstrakata dobijenih pri predloženim optimalnim uslovima kako bi se procenila efikasnost korišćenih rastvarača. Ovom tehnikom ekstrakcije teži se postizanju nižih energetske zahteva, uz dodatnu benefit u vidu smanjenja štetnog uticaja na životnu sredinu. Na osnovu dobijenih rezultata procenjena je i potencijalna mogućnost primene ekstrakata kao konzumenata, ali i aditiva u fitofarmaceutskim i fitokozmetičkim proizvodima.

Nadzemni delovi kičice su osušeni u sušnici na 105 °C do postizanja konstantne mase, samleveni u električnom blenderu do stanja finog i uniformnog praha, prosejani kroz sito (veličina otvora 0,5 mm), prebačeni u zatvorenu tamnu staklenu bocu i čuvani na hladnom mestu bez svetlosti. Ekstrakti biljne droge su proizvedeni šaržnim postupkom ultrazvučne ekstrakcije.

Kao rastvarači korišćeni su vodeni rastvori dva alkohola (EtOH i PPG) različitih koncentracija. Ekstrakcija je vršena na tačno definisanim temperaturama u jednogrlim staklenim balonima od 50 cm³ uz refluks u ultrazvučnoj kadi (Sonic, Niš, Srbija) pri konstantnoj snazi i radnoj frekvenciji ultrazvuka od 150 W i 40 kHz, respektivno. Nakon završenih ekstrakcija, uzorci su centrifugirani na 4000 obr·min⁻¹ tokom 10 min na centrifugi (TH16B, Hong Kong, Kina).

U cilju određivanja koncentracije ekstrakata, alikvoti ekstrakata (3 cm³) su osušeni na 105 °C u laboratorijskoj peći do postizanja konstantne mase. Pre dalje analize, preostali delovi ekstrakata čuvani su u frižideru na 4 °C.

Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima je određen spektrofotometrijskom metodom (Varian Cary-100 spektrofotometar; Mulgrave, VIC, Australija) na $\lambda_{\text{max}} = 760 \text{ nm}$ sa Folin Ciocalteu-ovim reagensom.

Metodologija površine odgovora (eng. *Response Surface Methodology*, RSM) zasnovana na Box-Behnken dizajnu (eng. *Box-Behnken Design*, BBD) korišćena je za modelovanje i optimizaciju UE prema maksimalnom prinosu ukupnih polifenola variranjem koncentracije alkohola, solvomodula, temperature i vremena ekstrakcije. Analizom varijanse (ANOVA) procenjena je statistička značajnost članova polinomnih jednačina, koje se koriste za opisivanje postupaka ekstrakcije ukupnih polifenola.

Sastav ekstrakata dobijenih pri optimalnim uslovima je određen UHPLC–DAD–ESI–MS/MS i ICP-OES analizom.

Ciljevi i noviteti ovog istraživanja su:

- a) razvoj „zelenijih“ i ekološki prihvatljivijih UE bioaktivnih jedinjenja iz nadzemnih delova kičice primenom dva različita sistema rastvarača, odnosno aEtOH i aPPG;
- b) optimizacija obe UE vršena je primenom BBD dizajna; optimalni faktorski nivoi su određeni za četiri analizirana faktora, i to za vreme ekstrakcije, temperaturu, solvomodul i koncentraciju alkohola (aEtOH ili aPPG);
- c) UHPLC-DAD-MS/MS analiza sastava oba ekstrakta dobijena pri optimalnim uslovima i njihovo poređenje;
- d) ICP-OES analiza oba ekstrakta dobijena pri optimalnim uslovima i njihovo poređenje;
- e) procena i upoređivanje energetske potrebe i uticaja na životnu sredinu kod obe UE.

Prema saznanju autora, do sada nije bilo izveštaja u literaturi o optimizaciji UE bioaktivnih jedinjenja iz nadzemnih delova kičice u aPPG ili aEtOH primenom BBD. Takođe, nije bilo detaljnih istraživanja identifikacije i poređenja jedinjenja u ovim ekstraktima, niti poređenja potrošnje energije i ekoloških uticaja tokom ovih procesa.

2. TEORIJSKI DEO

2.1 Biljne vrste roda *Centaurium* S.L.

Centaurium, stari naziv lekovite biljke, potiče od grčke reči „Κένταυρος“ („Kéntauros“) i latinske reči „centaurus“, koju je, prema legendi, Hiron (biće pola čovek, pola bik), koristio da izleči sebe od povrede zadobijene strelom zaraženom krvlju Hidre (Šiler & Mišić, 2016).

Rod *Centaurium* Hill (S.L.), porodica Gentianaceae (slika 1) jedan je od biljnih rodova sa najdužom tradicijom u istoriji humane medicine, a kao biljni lek pod nazivom „*Centaurii herba*“, često se koristi kao sastojak mnogih komercijalnih formulacija (Botion i sar., 2005; Naber, 2013) za olakšavanje želudačnih problema, regulaciju problema sa varenjem (gubitak apetita, nadimanje) povećavajući produkciju pepsina i hlorovodonične kiseline, zbog čega se preporučuje i kao tonik za čišćenje digestivnog trakta.

Takođe se može koristiti u terapiji astme, ekcema, žutice, groznice, crevnih parazita, reumatizma, hipertenzije, grčeva gastrointestinalnih mišića, edema i kao stimulans aktivnosti jetre i žučne kese. Odvar i oblog od listova biljnog roda *Centaurium* se mogu topikalno primeniti u tretiranju rana i uklanjanju fleka na koži (Mars, 2007).



Slika 1 Rod *Centaurium* Hill (S.L.) (<https://gobotany.nativeplanttrust.org/genus/centaurium/>)

Ekstrakt biljaka iz roda *Centaurium* poseduje purgativna, sedativna, antipiretička, antihelmintička, antiinflamatorna, analgetička i diuretička svojstva (Šiler & Mišić, 2016), snažan je antioksidans i koristi se za prevenciju dijabetesa (Sefi i sar., 2011).

Značaj ove biljke se ogleda u činjenici da se njena upotreba u tradicionalnoj medicini opisuje u farmakopejama 23 različitih zemalja, kao i u referentnim svetskim farmakopejama, dok je 2004. godine proglašena i lekovitom biljkom (Tahraoui, 2010). Takođe se širom sveta koristi i kao prirodna aroma u proizvodnji komercijalnih gorkih alkoholnih i bezalkoholnih pića sa dozvoljenom maksimalnom dozom od 0,0002% do 0,0008%. Evropski savet je biljke iz roda *Centaurium* svrstao u kategoriju N2 kao prirodnu aromu u prehrambenoj industriji, tako da je, u malim količinama, dozvoljena u hrani (EMA, 2009; Newall i sar., 1996).

Rod *Centaurium* S.L. je do nedavno obuhvatao oko 50 vrsta (Struwe, 2002), ali je nakon detaljnog cvetnog opisa i morfometrijske analize, Mansion predložio podelu polifiletskog roda *Centaurium* u četiri nova roda: *Centaurium* Hill (pretežno evropske vrste), *Schenkia* Griseb. (Mediterranski region, Australija i Havaji), *Zeltnera* Mans. (Severna i Centralna Amerika) i *Gyrandra* Griseb. (Centralna Amerika) (Mansion, 2004) (slika 2). Crveni kantaron (*C. erythraea* Rafn) je jedna od najvažnijih farmakoloških vrsta iz porodice Gentianaceae (Šiler & Mišić, 2016).



Slika 2 Rod *Zeltnera* Mans, *Schenkia* Griseb., *Gyrandra* Griseb.
(<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:16708-1>)
(<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77061737-1>)
(<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:16580-1>)

Brojna istraživanja vezana za biološku aktivnost nekoliko vrsta iz roda *Centaurium* S.L. su nastala još šezdesetih godina prošlog veka. U moderno vreme, biljke roda *Centaurium* i jedinjenja koja proizvode i dalje predstavljaju predmet mnogih medicinskih i farmakoloških istraživanja. Njihov značaj je istaknut meta-analizom: Google Scholar pokazuje 72 akademska naslova (bez citata) koji u isto vreme sadrže ili termin „*Centaurium*“ ili „centauri“ i bave se fitohemijskom analizom i medicinskim aspektima ekstrakata iz ovih biljaka. U proteklih pet godina, ukupno 15 studija se bavilo njihovim lekovitim ili biološkim svojstvima, kao što su antidiijabetička aktivnost - 5 studija, antimikrobna aktivnost – 4 studije, toksičnost (uključujući citotoksičnost) – 3 studije, i hepatoprotektivni, gastroprotektivni i vazodilatatorni efekti – po jedna studija. Postoji očigledna tendencija i naučni interes za dublje istraživanje fitohemije roda *Centaurium* S.L. i detaljnije razumevanje njihovih mehanizama delovanja na ljudsko zdravlje (Šiler & Mišić, 2016).

2.2 Prirodni i biotehnoški resursi roda *Centaurium* S.L.

Sa rastućom potražnjom za bioaktivnim jedinjenjima, razvijaju se i novi koncepti sa idejama o alternativnom dobijanju željenih jedinjenja iz neiskorišćenih biljnih vrsta, kao i o unapređenju tehnologije gajenja biljaka i ekstrakcije takvih jedinjenja. Centauri (rod *Centaurium* S.L., odnosno rodovi *Centaurium*, *Zeltnera*, *Gyrandra* i *Schenkia*) su jednogodišnje ili dvogodišnje zeljaste biljke sa neupadljivim izgledom i relativno malom proizvodnjom biomase. Zbog prisustva farmakološki značajnih bioaktivnih jedinjenja, biljke ovog roda se često prikupljaju iz prirodnih izvora. Neodrživa eksploatacija dovela je do prekomernog sakupljanja, pri čemu broj divljih populacija i njihova veličina opadaju. *C. erythraea*, jedna od najvažnijih farmakoloških vrsta iz porodice Gentianaceae, navedena je kao ugrožena vrsta u mnogim zemljama i čak je zaštićena zakonom u nekima od njih (Šiler & Mišić, 2016).

Upotreba biljnog materijala iz prirodnih izvora nije jednostavna kako se čini na prvi pogled. Naime, sadržaj bioaktivnih jedinjenja varira tokom ontogenetskog razvoja i pod uticajem je promenljivih uslova okoline, uključujući biotske i abiotske stresove i sezonske promene. Pokazano je za *C. erythraea* (Šiler i sar., 2012) i *C. pulchellum* (Šiler i sar., 2010) da varijacije u kvalitativnom i kvantitativnom sadržaju sekoiridoidnih glikozida među populacijama i individuumama zavise od porekla biljnog uzorka, genotipa i faktora sredine.

Kako bi se obezbedio standardizovan kvalitet biljnog materijala, sverciamarin, koji je dominantan sekoiridoidni glikozid u *C. erythraea*, predložen je od strane Evropske farmakopeje kao hemijsko jedinjenje koje treba koristiti za karakterizaciju zvaničnog leka „*Centaurii herba*“. Iako su metode i protokoli za kontrolu kvaliteta neophodni kako bi se zadovoljili zahtevi potrošača, oni ne rešavaju problem neodržive eksploatacije prirodnih izvora (European Pharmacopoeia, 2010).

Gajenje biljaka iz roda *Centaurium* S.L. može smanjiti pritisak na divlje populacije i poboljšati kvalitet proizvodnje leka „*Centaurii herba*“. Kako je pokazano u studiji Šiler i saradnika, razumevanje fenotipskih i genetičkih varijacija među populacijama ovih biljnih vrsta može biti ključno za izbor izvornog materijala za njihov uzgoj (Šiler i sar., 2012). Međutim, do danas nije uspostavljen široko rasprostranjen i komercijalni uzgoj ovih biljaka, što se može pripisati niskoj rentabilnosti postojećih plantaža. Ovo je rezultat niske proizvodnje biomase, dugogodišnjeg uzgoja ove dvogodišnje vrste koja cveta tek u drugoj godini, kao i teškoća u manipulaciji semenkama i sadnicama, kao i specifičnim uslovima koji su potrebni za njihov rast. Sve ove prepreke moraju biti prevaziđene kako bi se uspostavio uspešan i ekonomski profitabilan uzgoj ove biljke (Radušienė, 1995).

Ove poteškoće su navele naučnike da istražuju alternativne metode za proizvodnju bioaktivnih metabolita, između ostalog razvoj sistema za kultivaciju ćelija i „hairy root“ (koren) sa povećanom proizvodnjom važnih sekundarnih metabolita. *Agrobacterium rhizogenes* posredovani transfer gena sve više se koristi za dobijanje „hairy root“ (korena) nekoliko *Centaurium* vrsta koje su podložne genetskim transformacijama. „Hairy root“ (koreni) su sposobni da brzo rastu bez fitohormona i da proizvode metabolite matičnih biljaka (ksantoni i sekoiridoidni glikozidi), što je dokazano u slučaju *C. erythraea*, *C. maritimum* i *C. pulchellum*, uz tačno definisane uslove transformacije, kao što su priroda i starost eksplanata, bakterijski soj, gustina bakterija i protokol infekcije, koji utiču na efikasnost transformacionih procesa, kao i na rast i produktivnost „hairy root“ (korena) (Janković i sar., 2002; Mišić i sar., 2013; Piatczak i sar., 2006; Subotić i sar., 2009).

Dalja optimizacija parametara rasta kulture (sastav medijuma, izazivanje biotskim ili abiotskim stresom) može povećati sposobnost „hairy root“ (korena) da intenzivno raste i proizvodi vredna jedinjenja. Regeneracija izdanaka na „hairy root“ (korenima) vrsta *Centaurium* je čest fenomen, i ovi transgeni izdanci zadržavaju sposobnost proizvodnje sekundarnih metabolita (Piatczak i sar., 2006; Subotić i sar., 2003; Subotić i sar., 2009). Netransformisane kulture izdanaka nekih vrsta *Centaurium* i *Zeltnera* takođe su pogodne za proizvodnju sekoiridoidnih glikozida i mogu služiti kao alternativni izvor ovih vrednih jedinjenja. Osim toga, ove kulture se mogu proširiti za rast u bioreaktorima, što dovodi do znatno veće proizvodnje biomase i standardizovanog kvaliteta.

Neke studije su pokazale da je moguća i proizvodnja sekundarnih metabolita u izdancima i „hairy root“ kulturama vrsta *Centaurium* i *Zeltnera* u bioreaktorima (Mišić i sar., 2013; Piatczak i sar., 2006; Radović i sar., 2013).

Ipak, potrebno je bolje razumevanje ovih mehanizama, kako bi se razmotrile i testirale strategije za povećanu proizvodnju ciljanih fitohemijskih jedinjenja, uključujući sekoiridoidne glikozide i ksantone, pre nego što se uspostavi komercijalna proizvodnja na industrijskom nivou. Sastav medijuma i pH vrednost, dostupnost i apsorpcija hranljivih materija, razmena gasova, kvalitet svetlosti, temperatura, mešanje i osetljivost na smicanje su faktori koji mogu značajno uticati na rast, razvoj i produktivnost „hairy root“ (korena) u bioreaktorima. Dodatna prednost je da se biljni materijal dobijen putem bioreaktora smatra ekološki prihvatljivim i bez patogena. Kultivacija „hairy root“ (korena) vredne, ali komercijalno nedovoljno iskorišćene vrste *Centaurium maritimum* u bioreaktorima, mogla bi smanjiti eksploataciju divljih populacija *C. erythraea* i tako doprineti očuvanju biodiverziteta (Mišić i sar., 2013).

2.3 *C. erythraea* Rafn (kičica)

C. erythraea Rafn (slika 3) je dvogodišnja ili jednogodišnja biljka koja je rasprostranjena širom Evrope, severne Afrike i jugozapadne Azije (Guedes i sar., 2019), pretežno na krečnjačkim zemljištima i suvim travnatim mestima. Na slici 4, prikazana je mapa distribucije *C. erythraea* u Evropi i mediteranskom regionu. U Evropi postoji oko 14 *Centaurium* vrsta. Flora Turske navodi pet *Centaurium* vrsta, uključujući i *C. erythraea* (Tobyn i sar., 2016).

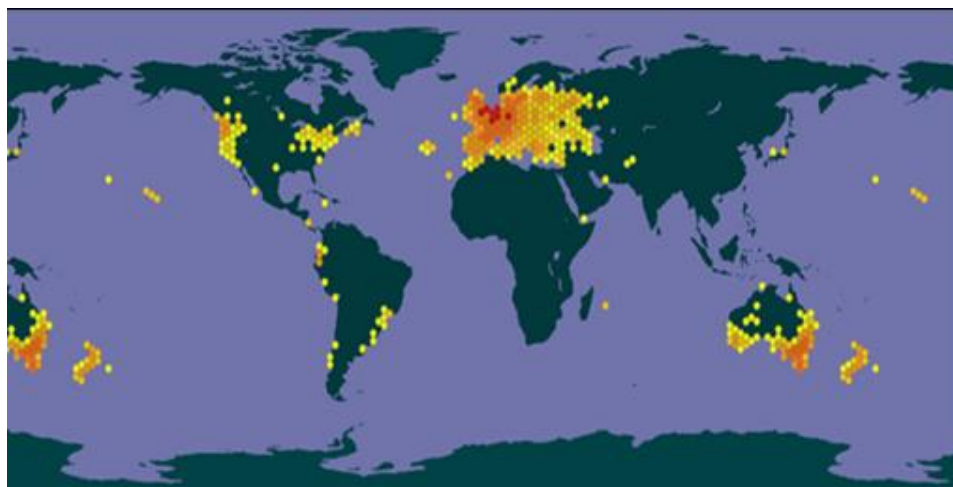
C. erythraea je u narodu poznata i kao kičica, crvena kičica, crveni kantarion, gorka kitica, gorko zelje, grozničavka, drago cveće, dupčić, zlatna žuč, jezernica, kinin, kitičica, mala semenčina, mali stozlatnik, svedrc i sunčani cvet. Drevni Grci su ovu biljku zvali „žuč zemlje“, a narodi istočne polulopte su je smatrali čudotvornom. Kineski pripovedači inspirisani lekovitim dejstvima prenosili su generacijama divne priče o moćnoj kičici.

Prema jednom verovanju, njen latinski naziv potiče od Kentaura Hirona, Ahilovog učitelja, a prema drugom, od reči centum, što znači sto i aurum, što znači zlato. Drugim rečima, kičica je lek koji vredí stotinu zlatnika (Tobyn i sar., 2016).

C. erythraea raste na vlažnim i peščanim brdskim livadama i pašnjacima, oranicama, šumskim čistinama i obroncima, kao jednogodišnja ili dvogodišnja biljka. Stabljika je četvorougona, šuplja, glatka, uspravna, 10 – 50 cm visoka i raste iz bazalne rozete glatkih, ovalnih, sivkastozelenih listova i nosi suprotne, uske, jajoliko duguljaste i glatke listove sa tri žila.



Slika 3 *C. erythraea* u fazi cvetanja (Mediflora, 2016)



Slika 4 Mapa distribucije *C. erythraea* u Evropi i regionu Mediterana (2018) (Mifsud, 2022)

Mali, cevasti, ružičasti cvetovi sa pet latica mogu se pronaći tokom leta u razgranatom cvatu na vrhu stabljike i otvaraju se samo na suncu, oko podneva (slika 5). Mnogo malih semenki formira se u cilindričnim kapsulama, a prašnici se uvijaju nakon otvaranja (Tobyn *i sar.*, 2016).

Biljka se najčešće bere kada je u cvetu i to kada je izražena gorčina ove biljke koja potiče od dva sverozidna estra prisutna u cvetnom jajniku (Bisset & Wichtl, 2001; Bradley, 2006). Veoma je pogodna za gajenje na plodnom zemljištu, pri čemu su ovako kultivisane vrste značajno više i gorče od divljih (Tobyn *i sar.*, 2016).



Slika 5 *C. erythraea* (Botanical Illustration Collection, 2004)

U prošlosti su biljke sakupljane iz lokalnih divljih populacija širom Evrope, dok se danas zajednica *C. erythraea* u Centralnoj Evropi sve više smanjuje zbog prekomernog sakupljanja i degradacije njihovih prirodnih staništa. *C. erythraea* se danas smatra ugroženom vrstom u većini evropskih zemalja, zbog čega se sve više kontroliše i čak zabranjuje njeno branje. Stoga se preporučuje kultivisanje kičice, kako bi se zadovoljila velika potražnja na tržištu za ovom biljkom i istovremeno zaštitila njena divlja staništa (Pataczek i sar., 2017).

Pored *C. erythraea* u upotrebi su i druge vrste: *C. uliginosum*, *C. littorale*, *C. pulchellum*. *Blackstonia perfoliata* je jednogodišnja biljka sa žutim cvetovima, tamnozelenim listovima i stabljikom koja prolazi kroz sredinu lista i koja je lokalno česta na kamenitim travnjacima i *C. tenuiflorum*, jednogodišnja biljka slična *C. pulchellum*, koja obično ima roze cvetove, ali ponekad i bele. Ugroženim vrstama smatraju se *C. tenuiflorum* i *C. scilloides* u Velikoj Britaniji, *C. erythraea* zbog divljeg sakupljanja, u Mađarskoj i *C. uliginosum* u Češkoj Republici (Tobyn i sar., 2016).

2.4 Hemijska raznovrsnost *C. erythraea* Rafn

Vrste koje pripadaju rodu *Centaurium* su u početku retko bile predmet fitohemijskih studija i većina istraživanja bila je usmerena ka proučavanju iridoida i ksantona, najzastupljenijim sekundarnim metabolitima ove grupe biljaka. Kasnija istraživanja su pokazala da vrste roda *Centaurium* sadrže i druge sekundarne biljne metabolite, uključujući terpenoide (monoterpenoide, seskviterpenoide, diterpenoide i triterpenoide), fenole (fenolne kiseline, flavonoide i ksantone), alkaloidne i steroide (Šiler & Mišić, 2016).

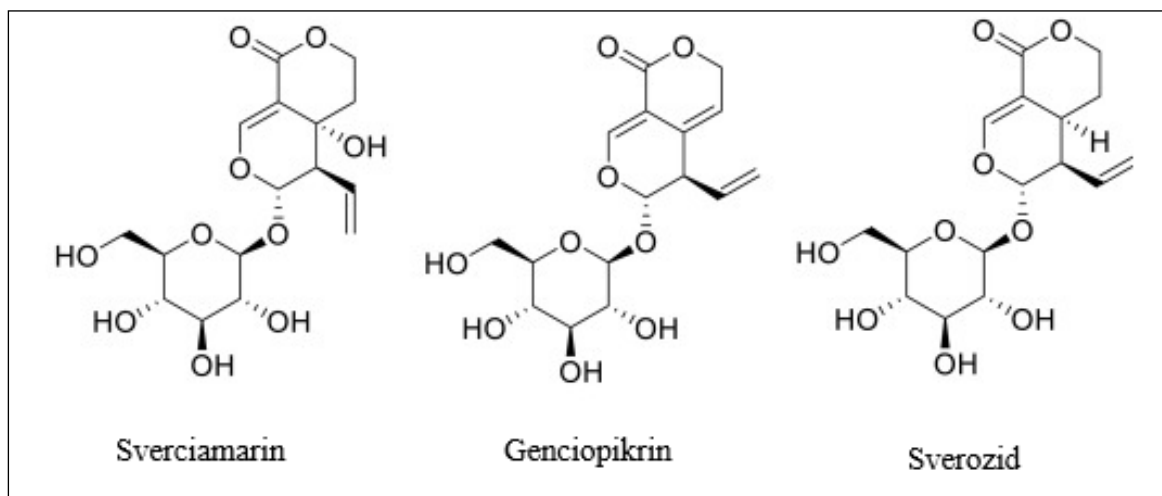
2.4.1 Terpenoidi

Vrste iz roda *Centaurium* nisu klasifikovane kao aromatične biljke i to je verovatno razlog oskudnih fitohemijskih studija o sastavu njihovih isparljivih organskih jedinjenja. Analize pomoću gasne hromatografije-masene spektrometrije (GC-MS) i headspace mikroekstrakcije u čvrstoj fazi (HS-SPME) esencijalnih ulja *C. erythraea*, ukazale su na prisustvo terpenoida koji uključuju monoterpenoide, seskviterpenoide, diterpenoide i triterpenoide (Jovanović *i sar.*, 2009; Jerković *i sar.*, 2012; Loizzo *i sar.*, 2008). U zavisnosti od vrste analize, njihov kvalitativni i kvantitativni sadržaj varirao je među različitim uzorcima.

Monoterpenoidni ugljovodonici su česti u *C. erythraea*, gde pripadaju α - i β -pinen, *p*-cimen, α - i γ -terpinen, terpinolen, sabinen, mircen i limonen (Jovanović *i sar.*, 2009; Jerković *i sar.*, 2012). Od oksidovanih monoterpenoida, identifikovani su terpinen-4-ol, menton, linalol, β -tujon, kamfor, izomenton, mentol, mentil acetat, 1,8-cineol, borneol, bornil acetat, *p*-cimen-8-ol, α -terpineol, *trans*-anetol, pulegon, nerol, karvon, geraniol i verbenon. Monoterpenoidni alkohol prisutan u esencijalnom ulju ove biljne vrste je prekursor u biosintetskom putu sekoiridoidnih glikozida (Geu-Flores *i sar.*, 2012; Miettinen *i sar.*, 2014). Monoterpenski fenoli timol, metiltimol i karvakrol takođe su prisutni u esencijalnom ulju *C. erythraea* (Dudareva *i sar.*, 2013; Vranová *i sar.*, 2013).

Sekoiridoidi su najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti u vrstama *Centaurium*. Biosinteza iridoidnih monoterpenoida odvija se preko iridoida sekologanina, koji pripada sekoiridoidima (Jensen & Schripsema 2002). Biosinteza sekologanina započinje oksidacijom geraniola u reakciji koju katalizuje sistem citohroma P450, geraniol 10-hidroksilaza (G10H) (Ikeda *i sar.*, 1991), da bi se preko nekoliko intermedijera, uključujući i logansku kiselinu, nagradio sekologanin, koji se dalje pretvara u genciopikrin i druge sekoiridoide. Kako su pokazala brojna istraživanja, biosintetski put koji vodi od sverozida, preko genciopikrina, do sverciamarina univerzalan je za sve biljke iz porodice Gentianaceae (Schwartz *i sar.*, 2009).

Sverciamarin, genciopikrin i sverozid, zajedno sa njihovim derivatima, su sekoiridoidni glikozidi koji su u velikoj meri prisutni u svim vrstama *Centaurium* (tabela 1 i slika 6).



Slika 6 Najrasprostranjeniji sekoiridoidni glikozidi u vrstama *Centaurium* (El Menyiy i sar., 2021)

Sverciamarin je obično prisutan kao dominantno sekoiridoidno jedinjenje u nadzemnim delovima većine vrsta *Centaurium*, uključujući i kičicu, dok genciopikrin preovladava u korenima (Šiler i sar., 2012; Šiler i sar., 2014). Sekoiridoidi su najčešće prisutni u glikozidnom obliku, dok je sverozid prisutan u svim *Centaurium* vrstama (Parra i sar., 1985).

Seskviterpenoidi (tabela 1) su takođe prisutni u *C. erythraea*, i ukupno je zabeleženo 48 jedinjenja koja pripadaju ovoj potklasi terpenoida, među kojima su najzastupljeniji α - i β -kopaen, α -kubeben, β -kariofilen, *trans*- β -farnesen, γ - i δ -kadenen, α - i γ -murolen, Ar-kurkumen, β -bisabolen i longifolen.

Od oksidovanih seskviterpena, najviše je prisutan α -kadinolo, kariofilen oksid, akoren B, spatulenol, α -kalakoren, farnesol i viridiflorol (Jovanović i sar., 2009; Jerković i sar., 2012). Iako je do sada identifikovano samo četiri diterpenoida (tabela 1) u vrsti *C. erythraea* (Jovanović i sar., 2009) i dva triterpenoida u *C. pulchellum* (Bibi i sar., 2000), smatra se da je njihov broj mnogo veći, imajući u vidu ograničen broj istraživanja ovih grupa jedinjenja u vrstama *Centaurium*.

Tabela 1 Terpenoidi identifikovani u vrstama *Centaurium* (Šiler & Mišić, 2016)

R. Br.	Jedinjenje	Vrsta <i>Centauriuma</i>	Literatura
Monoterpenoidi			
1	α -Tujen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
2	α -Pinen	<i>C. erythraea</i>	Loizzo i sar. (2008); Jerković i sar. (2012)
3	β -Pinen	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
4	Mircen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
5	<i>p</i> -Cimen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
6	Limonen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
7	1,8-Cineol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
8	Sabinen	<i>C. erythraea</i>	Loizzo i sar. (2008)
9	α -Terpinen	<i>C. erythraea</i>	Loizzo i sar. (2008)
10	γ -Terpinen	<i>C. erythraea</i>	Loizzo i sar. (2008); Jerković i sar. (2012)
11	α -Terpinolen	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
12	<i>cis</i> -Linalol oksid	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
13	<i>trans</i> -Linalol oksid	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
14	Linalol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
15	β -Tujon	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
16	Kamfor	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
17	Menton	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
18	Borneol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
19	Mentol	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
20	<i>p</i> -cimen-8-ol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
21	<i>A</i> -Terpineol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
22	β -ciklocitral	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
23	Nerol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
24	Metil timol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
25	Metil karvakrol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
26	Karvon	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
27	Piperiton	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
28	Geraniol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
29	Timol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)

Tabela 1, nastavak

R. Br.	Jedinjenje	Vrsta <i>Centauriuma</i>	Literatura
30	Karvakrol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
31	Geranil aceton	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
32	α -Tujon	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
33	Sekologanin*	<i>C. erythraea</i>	Takagi & Yamaki (1982)
34	Centapikrin*	<i>C. erythraea</i>	Aberham i sar. (2011); Stefkov i sar. (2014)
36	Sverozid*	<i>C. erythraea</i>	Aberham i sar. (2011); Stefkov i sar. (2014)
37	Genciopikrin* (Genciopikrozid)	<i>C. erythraea</i>	Aberham i sar. (2011); Stefkov i sar. (2014); Valentão i sar. (2003)
38	Sverciamarin*	<i>C. erythraea</i>	Aberham i sar. (2011); Stefkov i sar. (2014)
<u>Seskviterpenoidi</u>			
39	α -Kopaen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
40	Longifolen	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
41	α -Ilangen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
42	β -Kariofilen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
43	β -Kopaen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
44	α -Humulen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
45	α -Amorfen	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
46	γ -Murolen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
47	Ar-kurkumen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
48	α -Selinen	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
49	Germakren D	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
50	α -Murolen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
51	β -Bisabolen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
52	γ -Kadinen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
53	δ -Kadinen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
54	α -Kalakoren	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
55	Spatulenol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
56	Cariofilen oksid	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
57	Torilenol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
58	τ -Kadinol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
59	τ -Murolol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)

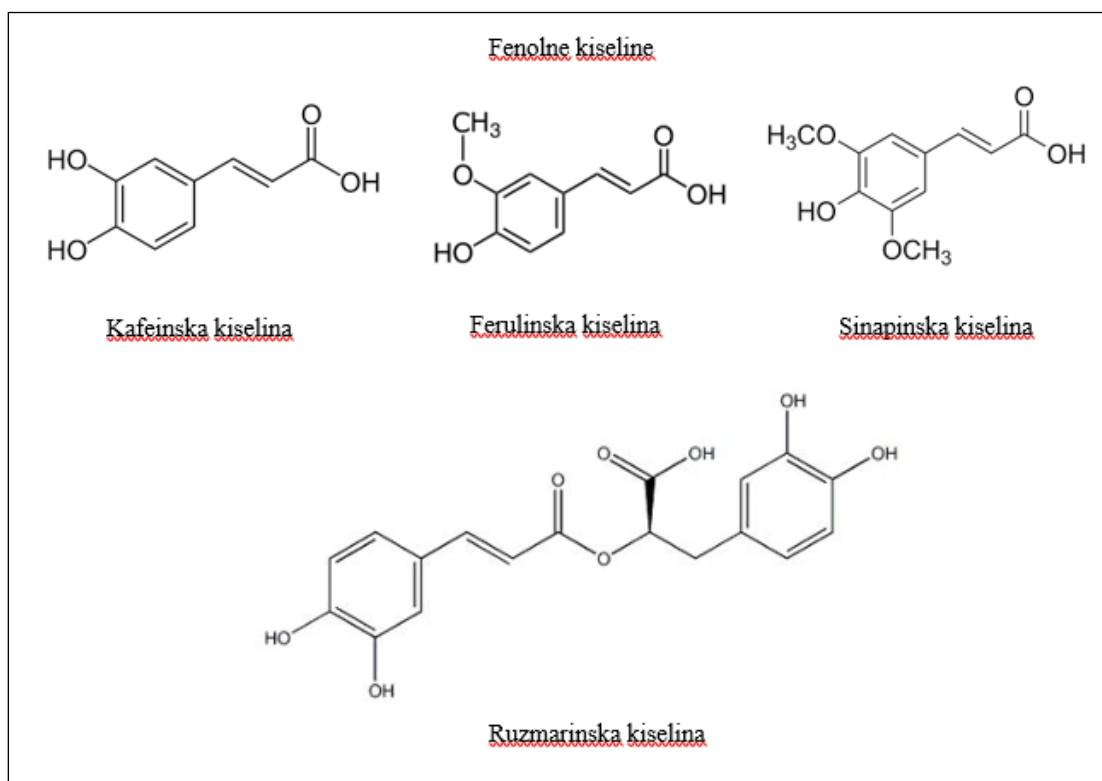
Tabela 1, nastavak

R. Br.	Jedinjenje	Vrsta <i>Centauriuma</i>	Literatura
60	β -Eudesmol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
61	α -Kadinol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
62	Akorenol B	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
63	<i>cis</i> -kalamenen-10-ol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
64	<i>trans</i> -Kalamenen-10-ol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
65	Kadalen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
66	<i>cis</i> , <i>trans</i> -Farnezol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
67	<i>trans</i> , <i>trans</i> -Farnezol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009); Jerković i sar. (2012)
68	Aristolon	<i>C. erythraea</i>	Jerković i sar. (2012)
69	Heksahidrofarnezil aceton	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
<u>Diterpenoidi</u>			
70	Kubiten	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
71	<i>p</i> -Kamforen	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
72	4,8,13-Duvatrien-1,3-diol	<i>C. erythraea</i>	Jovanović i sar. (2009)
<u>Triterpenoidi</u>			
73	Centauriol	<i>C. pulchellum</i>	Bibi i sar. (2000)

Skraćenice: C. = *Centurium*; *Sekoiridoidi

2.4.2 Fenoli

Fenolne kiseline su retko istraživane u vrstama *Centaurium*. Do sada je ukupno identifikovano devet jedinjenja u vrsti *C. erythraea*, od kojih sedam pripada grupi hidroksicimetnih kiselina, a dve su derivati hidroksibenzoevih kiselina (tabela 2). U vrsti *C. erythraea*, pronađene su ferulinska kiselina, sinapinska kiselina (Valentão i sar., 2001), kafeinska kiselina, *p*-kumarna kiselina i njeni derivati, ruzmarinska kiselina (estar kafeinske kiseline), umbeliferon i 5-formil-2,3-dihidroizokumarin (Valentão i sar., 2003; Valentão i sar., 2001). Na slici 7 prikazane su hemijske strukture fenolnih kiselina. Benzoeve kiseline su prekursori u biosintezi ksantona, a zanimljivo je da je 3-hidroksibenzoeva kiselina (*m*-hidroksibenzoeva kiselina) početni supstrat u ćelijskim kulturama *C. erythraea* (El-Mawla i sar., 2001).

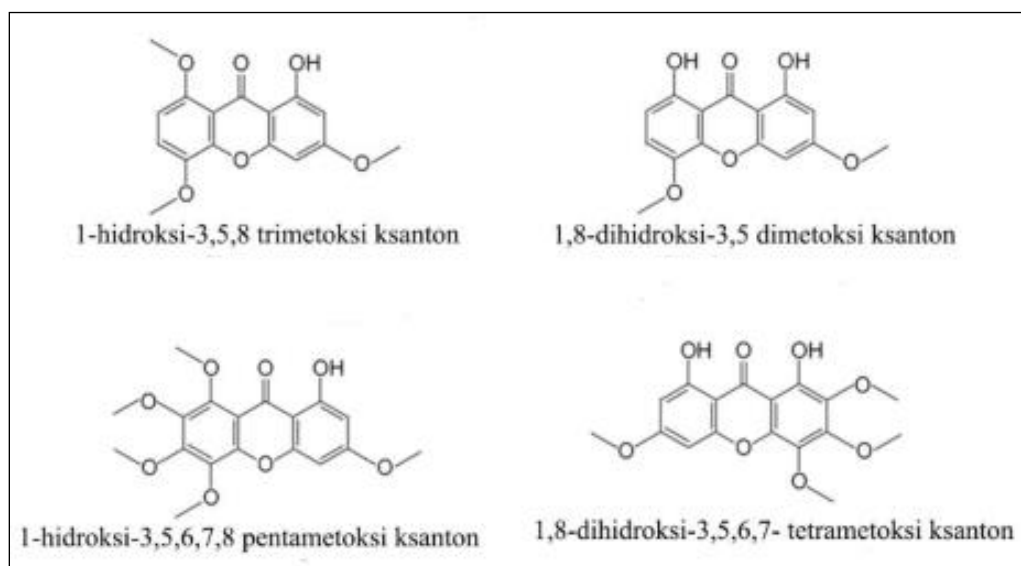


Slika 7 Hemijske strukture fenolnih kiselina (Valentão i sar., 2001)

Vrste *Centaurium*, sadrže dve potklase flavonoida: flavone i flavonole. Flavonoidi se formiraju šikimatno-acetatnim putem. Ukratko, senilalanin se pretvara u cimetnu kiselinu i dalje oksidiše do *p*-kumarinske kiseline, čime nastaje 4-kumaroil-CoA (sinonim: *p*-kumaroil-CoA), koji ulazi u putanju biosinteze flavonoida. Kondenzacijom tri molekula malonil-CoA sa jednim molekulom *p*-kumaroil-CoA nastaje intermedijerno jedinjenje, halkon, koji se dalje može konvertovati u odgovarajuće flavonoide (Martens & Mithöfer, 2005). U vrstama *Centaurium* (tabela 2), identifikovani su flavoni poput luteolina, apigenina i apigenin glikozida, dok su najrasprostranjeniji flavonoli, kvercetin, kaempferol i njihovi derivati (Stefkov i sar., 2014; Valentão i sar., 2001).

2.4.3 Ksantoni

Ksantoni, koji su isključivo prisutni u porodicama biljaka Gentianaceae i Clusiaceae (Guttiferae), uglavnom se mogu naći kao polihidroksilna jedinjenja, ali češće su to *O*-supstituisani derivati. Većina ksantona je prisutna u obliku mono-metil estara, poli-metil estara i glikozida. Prema podacima iz literature, trenutno je identifikovano oko 26 različitih ksantona za rod *Centaurium*, i to tri-, tetra-, penta- i heksa-oksigenovani ksantoni (slika 8, tabela 2) (Šiler & Mišić, 2016).

Slika 8 Hemijska struktura ksantona (Valentão *i sar.*, 2002)Tabela 2 Fenoli identifikovani u vrstama *Centaureum* (Šiler & Mišić, 2016)

R. Br.	Jedinjenje	Vrsta <i>Centaureum</i>	Literatura
<u>Fenolne kiseline</u>			
<u>Hidroksibenzoeve kiseline</u>			
1	3-Hidroksibenzoeva kiselina	<i>C. erythraea</i>	El-Mawla <i>i sar.</i> (2001)
2	Galna kiselina	<i>C. erythraea</i>	
<u>Hidroksicimetne kiseline</u>			
3	Ferulinska kiselina	<i>C. erythraea</i>	Valentão <i>i sar.</i> (2001)
4	Sinapinska kiselina	<i>C. erythraea</i>	Valentão <i>i sar.</i> (2001)
5	Kafeinska kiselina	<i>C. erythraea</i>	Marčišin & Stoiko (2014)
6	Rozmarinska kiselina	<i>C. erythraea</i>	Marčišin & Stoiko (2014)
7	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	<i>C. erythraea</i>	Valentão <i>i sar.</i> (2001)
8	Umbeliferon (7-Hidroksikumarin)	<i>C. erythraea</i>	Marčišin & Stoiko, (2014)
9	5-Formil-2,3-dihidroizokumarin	<i>C. erythraea</i>	Valentão <i>i sar.</i> (2003)
<u>Flavonoidi</u>			
<u>Flavoni</u>			
10	Luteolin	<i>C. erythraea</i>	Marčišin & Stoiko (2014)
11	Apigenin	<i>C. erythraea</i>	Marčišin & Stoiko (2014)

Tabela 2, nastavak

R. Br.	Jedinjenje	Vrsta <i>Centaurea</i>	Literatura
12	Apigenin glikozid (Apigenin-6-C-glukozid, Izoviteksin)	<i>C. erythraea</i>	Marčišin & Stoiko, (2014); Stefkov <i>i sar.</i> (2014)
<u>Flavonoli</u>			
13	Kvercetin	<i>C. erythraea</i>	Marčišin & Stoiko (2014)
14	Kvercetin 3-O-rutinozid (Rutin)	<i>C. erythraea</i>	Stefkov <i>i sar.</i> (2014)
15	Kvercetin 3-O-glukozid (Izokvercitrin)	<i>C. erythraea</i>	Marčišin & Stoiko (2014); Stefkov <i>i sar.</i> (2014)
16	Kvercetin 3-O-ramnozid-7-glukozil-(1-2)-ramnozid	<i>C. erythraea</i>	Stefkov <i>i sar.</i> (2014)
17	Kaempferol	<i>C. erythraea</i>	Valentão <i>i sar.</i> (2001)
18	Kaempferol 3-O-glukozid (Astragalin)	<i>C. erythraea</i>	Stefkov <i>i sar.</i> (2014)
19	Kaempferol 3-O-ramnozid-7-glukozil-(1-2)-ramnozid	<i>C. erythraea</i>	Stefkov <i>i sar.</i> (2014)
20	Kaempferol 3-O-glikozil-(1-2)-ramnozid	<i>C. erythraea</i>	Stefkov <i>i sar.</i> (2014)
<u>Ksantoni</u>			
Tri- supstituisani ksantoni			
21	1,3,5-Trihidroksi-ksanton	<i>C. erythraea</i>	Banjanac <i>i sar.</i> (2017)
22	1-Hidroksi-3,5-dimetoksiksanton	<i>C. erythraea</i>	Banjanac <i>i sar.</i> (2017)
23	1,5-Dihidroksi-3-metoksiksanton (mesuaksanton A)	<i>C. erythraea</i>	Banjanac <i>i sar.</i> (2017)
<u>Tetra- supstituisani ksantoni</u>			
24	1-Hidroksi-3,5,6-trimetoksiksanton	<i>C. erythraea</i>	Radović <i>i sar.</i> (2013)
25	1-Hidroksi-3,7,8-trimetoksiksanton (Dekusatin)	<i>C. erythraea</i>	Valentão <i>i sar.</i> (2002)
26	1,6-Dihidroksi-3,5-dimetoksiksanton	<i>C. erythraea</i>	Banjanac <i>i sar.</i> (2017)
27	1,8-Dihidroksi-3,5-dimetoksiksanton (Metilbelidifolin, Sverhirin)	<i>C. erythraea</i>	Aberham <i>i sar.</i> (2011); Banjanac <i>i sar.</i> (2017)
28	1,2,3-Trihidroksi-5-metoksiksanton	<i>C. erythraea</i>	Banjanac <i>i sar.</i> (2017)
28	1,3,5-Trihidroksi-2-metoksiksanton (Tovopirifolin C)	<i>C. erythraea</i>	Banjanac <i>i sar.</i> (2017)
30	1,5,8-Trihidroksi-3-metoksiksanton (Belidifolin)	<i>C. erythraea</i>	Banjanac <i>i sar.</i> (2017)

Tabela 2, nastavak

R. Br.	Jedinjenje	Vrsta <i>Centauriuma</i>	Literatura
<u>Penta- supstituisani ksantoni</u>			
31	1-Hidroksi-3,5,6,7-tetrametoksiksanton	<i>C. erythraea</i>	Valentão <i>i sar.</i> (2002)
32	1,8-Dihidroksi-2,3,6-trimetoksiksanton	<i>C. erythraea</i>	Banjanac <i>i sar.</i> (2017)
<u>Heksa- supstituisani ksantoni</u>			
33	1-Hidroksi-3,5,6,7,8-pentametoksiksanton (1-Hidroksi-3,5,6,7,8-pentametoksi-9H-ksanten-9-on; Eustomin)	<i>C. erythraea</i> <i>C. linarifolium</i> <i>C. littorale</i>	Valentão <i>i sar.</i> (2002); Parra <i>i sar.</i> (1985)
34	1,6-Dihidroksi-3,5,7,8-tetrametoksiksanton	<i>C. erythraea</i>	Banjanac <i>i sar.</i> (2017)
35	1,8-Dihidroksi-3,5,6,7-tetrametoksiksanton (1,8-Dihidroksi-3,5,6,7-tetrametoksi-9H-ksanten-9-on; 8-Desmetileustomin)	<i>C. erythraea</i>	Valentão <i>i sar.</i> (2002)
36	1,6,8-Trihidroksi-3,5,7-trimetoksiksanton	<i>C. erythraea</i>	Banjanac <i>i sar.</i> (2017)

2.5 Biološka aktivnost *C. erythraea* Rafn

C. erythraea, kao što je već u prethodnim poglavljima pomenuto, pokazuje različita bioaktivna svojstva, od kojih su najvažnija antimikrobna, antioksidativna, hepatoprotektivna i gastroprotektivna aktivnost kao i svojstva vezana za metabolizam lipida i ugljenih hidrata.

2.5.1 Antimikrobna aktivnost *C. erythraea*

Studije su pokazale da različiti ekstrakti biljaka iz roda *Centaurium* poseduju značajnu antimikrobnu aktivnost prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijskim vrstama/sojevima, i gljivicama. Rezultati minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBK) su pokazali da metanolni ekstrakt *C. erythraea*, poseduje sličnu antibakterijsku aktivnost kao i neki komercijalni antibiotici, što se objašnjava prisustvom sekoiridoidnih glikozida (monoterpeni), flavonoida i ksantona (Šiler *i sar.*, 2014). Studije su pokazale i da esencijalno ulje biljke *C. erythraea* ima gotovo identičnu antibakterijsku aktivnost prema *Escherichia coli* kao i ampicilin, te da je mnogo efikasniji kada su u pitanju gram-negativne bakterije (Jerković *i sar.*, 2012).

Biljke roda *Centaurium*, konzumirane preko hrane i pića, mogu značajno doprineti endogenim odbrambenim mehanizmima ljudskog organizma u zaštiti od oksidativnog stresa, patogenih bakterija i kvasca.

U kontekstu bezbednosti hrane i njenog očuvanja, kao aditivi u hrani i piću, ove vrste bi mogle sprečiti i kontrolisati rast patogena, poboljšavajući time njihovo očuvanje. Rezultati objavljeni u ovoj studiji ukazuju da *C. erythraea*, koji je zvanični lek „*Centaurii herba*“ i prirodni izvor aromatičnih sastojaka u hrani, može biti bezbedno zamenjen drugim vrstama iz ovog roda, koje su okarakterisane u studiji Šiler i sar. (2014).

2.5.2 Antioksidativna aktivnost *C. erythraea*

C. erythraea je bogata jedinjenjima koja poseduju antioksidativnu aktivnost, zahvaljujući polifenolnim jedinjenjima, pre svega ksantonima i fenolnim kiselinama. Studije su pokazale, da metanolni ekstrakti nadzemnih delova *C. erythraea* imaju i do nekoliko puta veće antioksidativne aktivnosti od korena, upravo zbog veće količine polifenolnih jedinjenja u ovim delovima biljke (Sefi i sar., 2011).

Liofilizovana infuzija *C. erythraea* poseduje snažnu sposobnost uklanjanja hidroksilnih radikala u zavisnosti od koncentracije i može da helira jone gvožđa (Valentão i sar., 2003). Efikasnu antioksidativnu aktivnost pokazuje i liofilizovana infuzija cvetova *C. erythraea*, u smislu hvatanja $O_2^{\bullet-}$ radikala, a što se ogleda u inhibiciji ksantin oksidaze (Valentão i sar., 2001). Antioksidativna aktivnost može biti posledica prisustva fenolnih jedinjenja u ovom ekstraktu, kao što su estri *p*-kumarinske kiseline, ferulinske kiseline, sinapinske kiseline i kaempferola.

Za razliku od flavonoida i fenolnih kiselina, prisutni monoterpenoidi, odnosno sekoiridoidni glikozidi, dominantni sekundarni metaboliti u rodu *Centaurium* S.L., nisu pokazali značajnu antiradikalnu aktivnost, testiranu DPPH testom (Šiler i sar., 2014). Pretpostavlja se da glikozilacija sekoiridoidnih glikozida suspenduje njihov antioksidativni potencijal, što rezultira odsustvom njihove antioksidativne aktivnosti. Istraživanja pokazuju da sverciamarin i sverozid nemaju antiradikalnu aktivnost testiranu DPPH testom, dok rezultati dobijeni ABTS testom ukazuju na veoma dobar antioksidativni potencijal sverciamarina (Kumarasamy i sar., 2003).

Antioksidativni kapacitet fenolnih jedinjenja uglavnom potiče od njihovog redoks svojstva, koji im omogućava da deluju kao redukcionni agensi, donori vodonika i neutralizatori singlet kiseonika. Iako je antioksidativna aktivnost nekih polifenolnih jedinjenja već poznata, ostaje neizvesno kako se složena mešavina dobijena iz ekstrakata biljaka ponaša prema reaktivnim vrstama kiseonika (Šiler & Mišić, 2016).

2.5.3 Hepatoprotektivna i gastroprotektivna aktivnost *C. erythraea*

Ekstrakti *C. erythraea* poseduju značajnu hepatoprotektivnu aktivnost. Studija, koju su sprovedi Mroueh i sar. (2004) podrazumevala je intoksikaciju pacova acetaminofenom u količini od $750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ telesne mase, što je rezultiralo značajnim povećanjem aktivnosti enzima AST (97,0%), ALT (96,6%) i LDH (89,1%) u poređenju sa kontrolnom grupom eksperimentalnih pacova. Predtretman gastričnom sondom sa suvim metanolnim ekstraktom *C. erythraea* u dozi od $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, tokom 6 dana, značajno je smanjilo povišene nivoe AST, ALT i LDH enzima na 10,4%, 31,9%, i 22,9%, respektivno. Približni rezultati (osim za AST) dobijeni su kada je data pojedinačna doza od $900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, sa smanjenjem od 47,0%, 45,3% i 48,3% za AST, ALT i LDH, respektivno. Ekstrakt je takođe aplikovan kako bi se isključile eventualne komplikacije u jetri, a rezultati su pokazali da nema značajne razlike u nivou enzima u poređenju sa kontrolnom grupom. Histološka analiza jetre je upravo potvrdila hepatoprotektivno dejstvo ekstrakta.

C. erythraea poseduje i gastroprotektivni potencijal. Tuluze i sar. (2011) su pokazali da oralna primena etanolnog ekstrakta *C. erythraea* može blokirati aspirinom izazvane lezije na želucu pacova, pokazujući značajnu zaštitu od 77%, pri dozi od $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Pomenuti ekstrakt je takođe inhibirao lipidnu peroksidaciju, povećanjem nivoa glutationa i vitamina A. Povećanje aktivnosti mijeloperoksidaze kod pacova tretiranih aspirinom značajno je inhibirano primenom ekstrakta *C. erythraea*. Ovo dovodi do smanjenja oštećenja sluznice od strane aktiviranih neutrofila što ukazuje na značajan antiulcerozni efekat ekstrakta *C. erythraea*. Moguće je da blokiranjem oksidativnih oštećenja putem lipidne peroksidacije i oksidacije proteina, ekstrakt sprečava gubitak propustljivosti membrane i disfunkciju ćelijskih proteina, što dovodi do opstanka funkcionalno aktivnih ćelija.

2.5.4 Uticaj *C. erythraea* na metabolizam lipida i ugljenih hidrata

Istraživanja su pokazala da su se određeni ekstrakti *C. erythraea*, pokazali značajnim u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata i lipida. Tako na primer, kratkotrajno lečenje dijabetesa izazvanog streptozotocinom kod pacova, metanolnim ekstraktom *C. erythraea* ($125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) dovodi do maksimalnog smanjenja proizvedene hiperglikemije od 74%. Najveći hipoglikemijski efekat od 50% primećen je 8 h nakon jednokratne intragastrične primene ekstrakta ($250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), što je bilo slično efikasnosti kontrolnog leka glibenklamida (57%). Osim toga, 12 h nakon primene iste koncentracije ekstrakta, efikasnost je premašila efikasnost glibenklamida (38% prema 30%, respektivno).

Međutim, pojedinačna dnevna doza od 250 mg ekstrakta po kilogramu telesne mase nije bila dovoljna da reguliše nivo glukoze u krvi tokom 24 h (Stefkov *i sar.*, 2014). S druge strane, slična studija je pokazala da su nivoi glukoze i triglicerida u krvi značajno smanjeni ($p < 0,05$) kod pacova koji su oralno tretirani većim dozama ekstrakta (doze od $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i $1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nakon 60 dana tretmana) i da je ovaj efekat održan do kraja perioda lečenja od 90 dana (Tahraoui, 2010).

Prema Sefi *i sar.* (2011), intraperitonealna primena vodenog ekstrakta listova *C. erythraea* ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) kod pacova sa dijabetesom indukovanim streptozotocinom tokom 30 dana značajno ($p < 0,001$) je smanjila glikemiju (-63%) i povećala nivoe insulina u serumu ($+78\%$), u poređenju sa kontrolnom grupom pacova sa dijabetesom. Isti autori su pokazali da ekstrakt lista *C. erythraea* ne samo da snižava nivo glukoze u krvi, već i poboljšava nivoe insulina u serumu i metabolizam lipida tako što uzrokuje značajno smanjenje nivoa triglicerida i ukupnog holesterola u serumu. Autori smatraju da ekstrakt može ispoljiti aktivnost snižavanja ukupnog holesterola smanjenjem njegove biosinteze, posebno smanjenjem aktivnosti 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A reduktaze, ključnog enzima u biosintezi holesterola i/ili smanjenjem NADPH potrebnog za sintezu masnih kiselina i holesterola. Sefi *i sar.* (2011), takođe smatraju da ekstrakt lista *C. erythraea* može da preokrene kataboličke karakteristike nedostatka insulina tako što (i) stimuliše perifernu upotrebu glukoze, (ii) povećava uklanjanje glukoze iz krvi ili (iii) smanjuje apsorpciju glukoze iz gastrointestinalnog trakta. U tom kontekstu, metabolizam glukoze i lipida može se poboljšati usled povećane sekrecije insulina od strane preostalih β -ćelija u pankreasu, koje su u mogućnosti da sintetizuju i izluče više insulina kako bi normalizovale nivoe glukoze i metabolizam lipida. Pošto su autori primetili da je primena ekstrakta kod pacova sa dijabetesom značajno povećala nivoe glutaciona, to bi moglo ukazivati na to da ekstrakt biljke može povećati biosintezu glutaciona ili smanjiti oksidativni stres, što dovodi do manje degradacije glutaciona, ili može imati oba efekta.

U studiji koju su sprovedi Stefkov *i sar.* (2014), pacovi sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom su imali značajno povećanu koncentraciju glukoze u jetri i aktivnost glukoneogenih enzima (glukoza-6-fosfataza i fruktoza-1,6-bisfosfataza), ali su takođe imali smanjenu količinu glikogena u jetri i smanjenu aktivnost glikogen fosforilaze, dok je intragastrična primena ekstrakta *C. erythraea* dovela do izlečenja testiranih životinja. Primećena je normalizacija koncentracije glukoze i obnavljanje sadržaja glikogena u jetri i normalizacija aktivnosti glikogen fosforilaze, zajedno sa normalizacijom glukoneogenih enzima, glukoza-6-fosfataze i fruktoza-6-fosfataze, praćeno resintezom glukoza-6-fosfata.

Ovi rezultati su pokazali da suvi ekstrakt nadzemnih delova *C. erythraea* (koji sadrži iridoide, ksantone i flavonoide) izaziva antihiperglikemijske i antilipidemijske efekte kada se primeni na pacove u kratkotrajnom i dugotrajnom lečenju. Autori sugerišu da zbog gorkog ukusa *C. erythraea*, može se intenzivirati ekskrecija u gastrointestinalnom traktu. Takođe se pretpostavlja da smanjenje koncentracije glukoze u krvi može biti posledica povećane sekrecije insulina iz stimulisanih β -ćelija pankreasa. U tom smislu, zaključeno je da ekstrakt *C. erythraea* štiti pankreasne β -ćelije od oksidativnog stresa izazvanog slobodnim radikalima i time stimuliše preostale β -ćelije da sintetišu i luče više insulina, čime se dodatno jača status antioksidativnog sistema (Sefi *i sar.*, 2011). Međutim, neki autori su pokazali da biljka može izazvati nuspojave, ako se uzima oralno tokom dužeg vremenskog perioda u većim dozama, pri čemu se lezije manifestuju kao kongestija, degeneracija i nekroza jetre, a posebno bubrega (Mansar-Benhamza & Djerrou, 2013).

Što se tiče metabolizma lipida, primećeno je da dijabetes izazvan streptozotocinom uzrokuje povećanje parametara lipidnog profila, dok antilipidna procena ekstrakta *C. erythraea* koji se primenjuje oralno ili intragastrično, rezultira značajnim smanjenjem nivoa ukupnog holesterola i triglicerida u krvi, kao i smanjenjem kapaciteta peroksidacije lipida (Stefkov *i sar.*, 2014).

Tretman ekstraktom, poboljšava redoks status β -ćelija pankreasa pacova tretiranih streptozotocinom (Rin5F), smanjujući oštećenje DNK, peroksidaciju lipida i oksidaciju proteina. Istovremeno inhibira povećanje aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) i mangan superoksid dismutaze (MnSOD) i delimično obnavlja smanjenu aktivnost katalaze (CAT). Ovo poboljšanje redoks statusa praćeno je povećanjem vitalnosti Rin5F ćelija i ekspresijom insulina. Takođe, u istoj studiji, primena ekstrakta *C. erythraea* (oralno, 100 mg·kg⁻¹, dve nedelje pre i četiri nedelje nakon indukcije dijabetesa) kod streptozotocin indukovanim dijabetičkim pacovima antioksidativno je delovala na jetru i bubrege. Tretman je smanjio oštećenje DNK, lipida i proteina i obnovio aktivnost katalaze, Mn/CuZnSOD i GPx koja je bila narušena u jetri i bubrezima kod dijabetičkih pacova. Ovo poboljšanje se odrazilo u očuvanju funkcionalnog integriteta pomenutih organa kod dijabetičkih pacova. Isti tretman je smanjio nivo uree u krvi i aktivnost jetrinih transaminaza (ALT i AST) (Đorđević *i sar.*, 2018).

Vodeni ekstrakt *C. erythraea* pokazao je značajan porast aktivnosti superoksid dismutaze i stimulaciju insulina kod pacova sa indukovanim dijabetesom, zahvaljujući antioksidativnim svojstvima. U navedenoj studiji, oralna primena ekstrakta dijabetičkim pacovima inicirala je značajno povećanje aktivnosti katalaze, budući da je stimulisala preostale β -ćelije da luče više insulina radi normalizacije streptozotocinom izazvane hiperglikemije.

Sa produženom primenom tokom 30 dana, aktivnost glutation peroksidaze je povećana kod dijabetičkih pacova, što se može pripisati svojstvima ovog ekstrakta za stimulaciju insulina (Sefi i sar., 2011).

2.5.5 Toksičnost *C. erythraea*

Tahraoui i sar. (2010) su sa ciljem eliminisanja eventualnih štetnih uticaja na humani organizam, uradili *in vivo* studiju, u kojoj su testirali akutnu i subhroničnu toksičnost *C. erythraea* na glodarima. Rezultati su pokazali da nije bilo smrtnog ishoda i znakova toksičnosti nakon oralne primene pojedinačnih doza liofilizovanog ekstrakta *C. erythraea* čak i do najviše testirane doze od 15 g·kg⁻¹ telesne mase. Međutim, stopa mortaliteta, kao i akutna toksičnost ekstrakta *C. erythraea* intraperitonealnom primenom progresivno su se povećavale sa povećanjem doze. Stopa mortaliteta od 0% na dozi do 8 g·kg⁻¹ postepeno se povećala na 80% kod najviše testirane doze od 14 g·kg⁻¹, tako da se pokazalo da je akutna toksična doza (LD₅₀) intraperitonealno primenjenog ekstrakta kod miševa iznosila 12,13 g·kg⁻¹. Na osnovu efekata subhronične oralne primene ekstrakta *C. erythraea* na hematološke parametre, zaključeno je da je samo srednja zapremina crvenih krvnih zrnaca (MCV) bila niža, kod tretiranih grupa (600 mg·kg⁻¹ i 1200 mg·kg⁻¹ doza) u poređenju sa kontrolama. Svi ostali hematološki parametri (RBC, WBC, trombociti, HGB, HCT, MCH i MCHC) ostali su unutar normalnih granica tokom celog perioda tretmana. Ponovljena oralna primena ekstrakta *C. erythraea* (do dnevne doze od 1200 mg·kg⁻¹ telesne mase tokom 90 dana) nije izazvala značajne promene u kreatininu plazme, urei, ukupnim proteinima, ukupnom bilirubinu, holesterolu i enzimima jetre (ALT i AST). Ovo pokazuje da subhronična primena ekstrakta *C. erythraea* nije dovela do oštećenja jetre i bubrega, što su potvrdile i histopatološke analize pomenutih organa tretiranih i kontrolnih životinja. Zaključak autora je da ne postoje štetni efekti i morfološke smetnje uzrokovane dnevnim oralnim uzimanjem biljnog ekstrakta tokom 90 dana, čak ni pri visokim dozama od 1200 mg·kg⁻¹ telesne mase (Mansar-Benhamza & Djerrou, 2013).

S obzirom na humanu dozu *C. erythraea* u tradicionalnoj medicini, koja iznosi 1 – 2 šolje tečnog preparata (2 – 4 g biljnog materijala na dm³ vode), i na činjenicu da se lek nikada ne uzima intraperitonealnim putem, Tahraoui i sar. (2010) su mišljenja da je tradicionalna upotreba *C. erythraea* bezbedna bez rizika od toksičnosti.

2.6 Metode ekstrakcije

Biljni materijal se široko koristi za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja sa farmakološkim aktivnostima, posebno antioksidativnom (Zhang *i sar.*, 2021d), neuroprotektivnom (Chen *i sar.*, 2021a) i antimikrobnom (Pham *i sar.*, 2021). Iz tog razloga, nezaobilazni su sastojci u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Yusoff *i sar.*, 2022).

2.6.1 Konvencionalne i moderne metode ekstrakcije

Sa ciljem postizanja visoke efikasnosti i efektivnosti, kontinualno se radi na poboljšanju postojećih i pronalaženju novih metoda ekstrakcije. Pri tome, efikasnost se odnosi na prinos ekstrakcije, dok se efektivnost odnosi na jačinu (intenzitet bioaktivnosti/sposobnost da proizvede efekat) ekstrakta (da Silva *i sar.*, 2022).

Metode ekstrakcije se mogu klasifikovati kao konvencionalne i nekonvencionalne ili savremene metode. Konvencionalne metode se koriste već decenijama iako imaju ograničenja u pogledu dužeg vremena ekstrakcije i veće potrošnje rastvarača, kao i upotrebi toksičnih organskih rastvarača (da Silva *i sar.*, 2022). Uglavnom, konvencionalne metode ekstrakcije mogu uzrokovati degradaciju termoosetljivih jedinjenja usled dugog vremena obrade i visoke temperature ekstrakcije (Yusoff *i sar.*, 2022). Pod konvencionalnim metodama ekstrakcije se podrazumevaju destilacija, ekstrakcija rastvaračem i hladno ceđenje.

- Destilacija se najčešće koristi za dobijanje etarskih ulja.
- Ekstrakcija rastvaračem se može postići kroz nekoliko različitih procesa, uključujući perkolaciju, maceraciju, Soxhlet ekstrakciju, infuziju, dekokciju i enfloraciju.
- Hladno ceđenje (ceđenje biljnog materijala da bi se iz njega izvukao tečni sadržaj) uglavnom se koristi za ekstrakciju biljnog ulja (Vinatoru *i sar.*, 2017).

Bioaktivna jedinjenja poseduju veliki broj raznovrsnih korisnih bioloških aktivnosti, što ih čini izuzetno privlačnim za eksploataciju u različitim granama industrije (farmaceutska, kozmetička, hemijska i prehrambena) (Ivanović *i sar.*, 2021). Izolacija, oporavak i prečišćavanje ovakvih bioaktivnih jedinjenja sa konvencionalnim pristupima ima nedostatke u smislu korišćenja velike količine sirovina i materijala, kao i velike količine problematičnih organskih rastvarača (opasni, toksični, zapaljivi, niskoselektivni, ekološki neprikladni i obično dobijeni iz neodrživih izvora). Ovi procesi zahtevaju visoku temperaturu, troše puno energije i vremena (Stupar *i sar.*, 2021).

Neadekvatan i pogrešan izbor metode ekstrakcije i rastvarača dovodi do manje efikasnosti ekstrakcije i ugrožava stabilnost ciljanih bioaktivnih jedinjenja koja se izoluju (Ivanović *i sar.*, 2021). Ovi faktori dovode do nepoželjnih posledica u smislu neuspešnog tehnološkog procesa, nižeg kvaliteta proizvoda i neizbežnih ekonomskih gubitaka. Neophodno je preduzeti dodatne mere, jer neki potrošači pokazuju snažan stav i odbijaju kupovinu i upotrebu proizvoda koji sadrže sintetičke aditive. Da bi se rešili ovi problemi, ključno je dizajnirati nove efikasne procese za izolaciju željenih bioaktivnih jedinjenja, koji bi rešili izazove u vezi sa ekološkim pitanjima i inkorporirali principe „zelene“ hemije u metode ekstrakcije i osigurali njihovu dugoročnu održivost (Armenta *i sar.*, 2019).

Dizajniranje novih „zelenih“ procesa zahteva korišćenje bezbednih i ekološki prihvatljivih jedinjenja, posebno rastvarača. Primena toksičnih organskih rastvarača za izolaciju bioaktivnih jedinjenja je strogo nepoželjna u nekim granama industrije, posebno onih specifičnih u dizajniranju farmaceutskih, nutritivnih i kozmetičkih proizvoda. Iako se voda smatra krajnjim „zelenim“ rastvaračem, njena upotreba je neadekvatna za ciljanu izolaciju nepolarnih i slabo polarnih jedinjenja (Ivanović *i sar.*, 2021).

EtOH i PPG su prihvatljivi „zeleni“ rastvarači, budući da su jeftini, netoksični, ekološki prihvatljivi i obično se koriste kao rastvarači u mnogim farmaceutskim formulacijama (oralnim, injekcionim i topikalnim). U poređenju sa metanolom, EtOH je manje toksičan i može se proizvoditi iz poljoprivrednih obnovljivih izvora bogatih skrobom i celulozom (Bušić *i sar.*, 2018; Tse *i sar.*, 2021). PPG, kao netoksični poliol, se široko koristi za proizvodnju farmaceutskih, kozmetičkih i prehrambenih proizvoda (Ramamoorthi *i sar.*, 2020; Trotter *i sar.*, 2017). Osim toga, njihova upotreba ne zahteva dodatni proces separacije od čvrstog matriksa pre dalje primene, čime se doprinosi uštedi energije nakon povećanja obima procesa.

Osim toga, „zeleni“ rastvarači se mogu kombinovati sa naprednim i inovativnim „zelenim“ tehnikama ekstrakcije, što je ključni cilj u proizvodnji hrane, farmaceutskih, nutritivnih i kozmetičkih formulacija, u kojima je prisustvo toksičnih rastvarača zabranjeno. Ove sofisticirane tehnike uključuju superkritičnu ekstrakciju (SE) (Baldino *i sar.*, 2018; Casas-Cardoso *i sar.*, 2021; Demirkol *i sar.*, 2022), mikrotalasnu ekstrakciju (ME) (Kusuma i Mahfud, 2017), ultrazvučnu ekstrakciju (UE) (Demirkol *i sar.*, 2022) i enzimsku ekstrakciju (EE) (Khan *i sar.*, 2010). Njihove zajedničke prednosti su veća efikasnost, održivost, brži rad i poboljšani prinosi željenih jedinjenja uz minimalnu potrošnju rastvarača. Međutim, moraju se poštovati mere predostrožnosti pri korišćenju ovih metoda i pored navedenih prednosti. Metode koje zahtevaju visok pritisak i veću energetska potrošnju obično su skuplje.

Duže trajanje procesa pri višim temperaturama može uzrokovati degradaciju termolabilnih jedinjenja i denaturaciju enzima, što negativno utiče na kvalitet i biološku aktivnost ekstrakta (Chien *i sar.*, 2022; Khan *i sar.*, 2010).

Postupci „zelene“ hemije imaju za cilj dizajniranje hemijskih procesa koji su ekološki prihvatljivi, kako bi se eliminisala ili smanjila upotreba opasnih i toksičnih hemikalija u bilo kojoj fazi proizvodnje, u industriji i laboratoriji. Tehnike ekstrakcije se definišu kao „zelene“ ako koriste „zelene“ rastvarače, smanjuju potrošnju energije, uz obezbeđivanje bezbednosti i visokog kvaliteta ekstrakta lekovite biljke. Budući da je razvoj ekoloških metoda jeftiniji od čišćenja zagađene životne sredine, ekološke analitičke metodologije moraju biti vrlo atraktivne sa estetskog i ekonomskog stanovišta. U poslednjoj deceniji, „zelene“ tehnike ekstrakcije su veoma aktuelne, budući da podstiču eliminaciju toksičnih supstanci i organskih rastvarača (da Silva *i sar.*, 2022).

2.6.2 Ultrazvučna ekstrakcija

Savremene metode ekstrakcije su postupci koji smanjuju upotrebu toksičnih organskih rastvarača i vremena ekstrakcije (da Silva *i sar.*, 2022). UE, koja se smatra nekonvencionalnom metodom ekstrakcije, predstavlja jednu od obećavajućih alternativa za ekstrakciju jedinjenja. (Yusoff *i sar.*, 2022). Prednosti UE jedinjenja iz biljaka su brojne. Ova metoda je jeftina i pristupačna, fleksibilna i jednostavna za korišćenje, ekološki prihvatljiva, brza i visokoeffikasna za dobijanje željenih jedinjenja iz različitih materijala, omogućava manju potrošnju energije i rastvarača, pruža širi izbor rastvarača, obezbeđuje povećan prinos ekstrakcije, visok prinos aktivnih jedinjenja i proizvoda visoke čistoće (Chien *i sar.*, 2022; Demirkol *i sar.*, 2022; Khan *i sar.*, 2010), a zahteva manja ulaganja u poređenju sa drugim tehnikama ekstrakcije, omogućavajući lakši transfer sa laboratorijskog na industrijski nivo (Chien *i sar.*, 2022; Demirkol *i sar.*, 2022; Irakli *i sar.*, 2018; Osorio-Tobon, 2020). UE se ističe u odnosu na druge tehnike kao poželjna za ekstrakciju termolabilnih jedinjenja; pošto temperatura ostaje niska, proizvode se ekstrakti fenolnih jedinjenja visokog kvaliteta i bez zagađivača (Chien *i sar.*, 2022; Medina-Torres *i sar.*, 2017). U poređenju sa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, mehurići generisani kavitacionom energijom usled dejstva ultrazvuka (mehanički talasi u opsegu frekvencije 20 – 100 kHz) omogućavaju bolju penetraciju rastvarača u biljna tkiva i ćelije, što rezultira njihovom degradacijom i efikasnijim oslobađanjem intracelularnog sadržaja (Marhamati *i sar.*, 2020; Stupar *i sar.*, 2021).

UE može se izvoditi pomoću ultrazvučne kade i ultrazvučne sonde. Za razliku od ultrazvučne kade, kod ultrazvučne sonde, snaga i frekvencija mogu varirati tokom optimizacije procesa. Nakon ekstrakcije, čvrsti ostaci biljnog materijala bogati nerastvorljivim celuloznim jedinjenjima mogu se reciklirati i valorizovati kao prekursori biomase za proizvodnju energije, bioetanola, bioloških derivata i aditiva u stočnoj hrani (Rombaut *i sar.*, 2014), uspešno industrijalizujući tehnološki proces i uvećavajući profit.

2.6.3 Faktori koji utiču na UE bioaktivnih jedinjenja

Različiti faktori utiču na efikasnost UE o čemu treba voditi računa prilikom planiranja pomenutog procesa. Najvažniji faktori koji utiču na UE prikazani su u tabeli 3. Na sposobnost ultrazvuka da izazove kavitaciju utiču parametri direktno povezani sa ultrazvučnom opremom (frekvencija, talasna dužina, amplituda, snaga i intenzitet), kao i veličina i oblik reaktora (Pingret *i sar.*, 2013; Tiwari, 2015). S druge strane, parametri, poput vremena ekstrakcije, temperature ekstrakcije, izbora rastvarača, odnosa materijala i rastvarača mogu definisati efikasnost ekstrakcije (Caldas *i sar.*, 2018; Wang *i sar.*, 2007).

Tabela 3 Uticaj faktora na UE (Dabetić, 2023; Flannigan & Suslick, 2010; Paniwnyk, 2017; Santos & Capelo, 2007; Tiwari, 2015)

Vrsta faktora	Uticaj faktora na efikasnost UE
Amplituda	Visoka amplituda izaziva eroziju sonde; smanjuje stvaranje kavitacije Visoka amplituda je poželjna kod izrazito viskoznih tečnosti (npr. ulja)
Intenzitet	Visok intenzitet može podstaći degradaciju ekstrahovanih jedinjenja Izabrana frekvencija zajedno sa ultrazvučnim intenzitetom određuje stvaranje
Frekvencija	kavitacionih mehurića Veći prinosi ekstrakcije postižu se pri nižim frekvencijama Više frekvencije povećavaju stvaranje slobodnih radikala
Temperatura	Visoka temperatura povećava brzinu difuzije rastvarača Niska temperatura pojačava kavitaciju
Vreme	Dugo vreme ekstrakcije povećava prinos; može uzrokovati degradaciju ekstrahovanih jedinjenja Viskozni rastvarač smanjuje prag kavitacije
Rastvarač	Lako isparljivi rastvarač može ispariti ukoliko ekstrakcija na visokoj temperaturi traje dugo Polaritet i rastvorljivost ciljanog jedinjenja u rastvaraču Pritisak pare i površinski napon rastvarača utiču na kavitaciju (niži napon pare povezan je sa intenzivnijom implozijom mehurića)
Matriks	Veličina čestica Interakcija matriksa i rastvarača Odnos rastvarača i biljnog materijala (solvomodul)

2.6.3.1 Snaga ultrazvuka

Snaga koja se primenjuje za UE bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala zavisi od jedinjenja koje se ekstrahuje i vrste biljnog materijala odabranog za ekstrakciju i varira u rasponu od 20 do 700 W. Rezultati ekstrakcije primenom ultrazvuka prvo rastu sa povećanjem snage, a potom opadaju nakon dostizanja optimalnog nivoa.

Efekat snage ultrazvuka na prinos dobijenih jedinjenja zavisi od temperature i vremena. Prinos se povećava sa povećanjem snage, bilo da se ekstrakcija izvodi na visokim ~50 °C ili na niskim temperaturama ~20 °C. Pri kraćem vremenu obrade, prinos se povećava sa povećanjem snage, dok se pri dužem trajanju ultrazvučnog tretmana prinos smanjuje sa povećanjem snage (Kumar *i sar.*, 2021).

2.6.3.2 Frekvencija ultrazvuka

Frekvencija ultrazvuka koja se koristi za UE bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala obično je između 20 i 120 kHz i značajno utiče na proces ekstrakcije.

- Niska frekvencija visokog intenziteta (20 kHz) ultrazvuka, generiše snažne mehaničke sile i mehaničko delovanje, što je poželjno za proces ekstrakcije. Ove sile pomažu u razbijanju ćelijskih zidova i oslobađanju bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala.
- Visoka frekvencija niskog intenziteta (>20 kHz) ultrazvuka, proizvodi veliki broj reaktivnih radikala. Ovo može biti korisno u nekim procesima ekstrakcije, ali možda ne pruža istu mehaničku disrupciju biljnih ćelija kao niskofrekventni ultrazvuk.

Veliki broj mehurića, formiranih pri visokoj frekvenciji, pruža više otpora za prenos materijala, usporavajući proces ekstrakcije. Pri visokoj frekvenciji kavitacionom mehuriću je veoma kratko vreme za rast, što ometa njihov implozijski efekat. Pri niskoj frekvenciji, kao što je 20 kHz, formiraju se veći kavitacioni mehurići, ali u manjem broju. Veći kavitacioni mehurići mogu imati značajan uticaj na proces ekstrakcije, s obzirom da pomažu u razbijanju ćelija i prenosu materijala.

Važno je napomenuti da izbor frekvencije ultrazvuka zavisi od specifičnih bioaktivnih jedinjenja koja se ekstrahuju, vrste biljnog materijala i željenih rezultata. Istraživači često optimizuju parametre ultrazvuka, uključujući frekvenciju, kako bi postigli najbolji prinos ekstrakcije i kvalitet za ciljane jedinjenja (Kumar *i sar.*, 2021).

2.6.3.3 Uticaj temperature ekstrakcije

Povećanje temperature ekstrakcije na početku procesa UE obično povećava prinos ekstrakcije, što može biti posledica povećane rastvorljivosti ili smanjenja viskoznosti.

Povećana rastvorljivost: Viša temperatura ekstrakcije pomaže rastvoru da bolje rastvara ciljane supstance iz biljnog materijala, što povećava prinos.

Smanjenje viskoznosti: Toplota takođe smanjuje viskoznost rastvarača, što olakšava prodiranje rastvarača u biljno tkivo i oslobađanje bioaktivnih jedinjenja.

Međutim, postoji tačka nakon koje dalje povećanje temperature može dovesti do smanjenja prinosa, što se dešava zbog oslabljenog efekta kavitacije, koji je ključan za proces UE. Na veoma visokim temperaturama, kavitacija može biti oslabljena, usled čega se smanjuje efikasnost ekstrakcije (Kumar *i sar.*, 2021).

2.6.3.4 Uticaj vremena ekstrakcije

Uticaj vremena UE na prinos bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala detaljno je istražen. Uopšteno, povećanje vremena ekstrakcije utiče na povećanje prinosa proizvoda, ali nakon izvesnog vremena dolazi do njegovog smanjenja. Pri povećanju vremena UE, efekat kavitacije poboljšava hidrataciju, fragmentaciju i formiranje pora u strukturi biljnog tkiva iz koga se ekstrahuju bioaktivne supstance. Svi ovi faktori povećavaju difuziju bioaktivnih jedinjenja u rastvarač. Međutim, dugotrajna izloženost ultrazvuku može uzrokovati oštećenja strukture bioaktivnih jedinjenja, što dovodi do smanjenja prinosa ekstrakcije (Kumar *i sar.*, 2021).

2.6.4 Optimizacija uslova ekstrakcije

S obzirom da ne postoji univerzalno standardizovan skup optimalnih uslova za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz različitih biljaka, neophodna je optimizacija uslova ekstrakcije specifičnih za vrstu kako bi se obezbedilo poboljšanje efikasnosti procesa. Pristup optimizacije „jednog faktora u vremenu” analizira uticaj samo jednog parametra, dok su svi ostali parametri konstantni. Ovaj pristup ima nekoliko nedostataka: dugotrajan je, zahteva intenzivan rad, zahteva mnogo eksperimentalnih ponavljanja, može pružati netačne optimalne uslove, ne može uzeti u obzir interakcije između parametara i može biti skup kako za akademske tako i za industrijske svrhe (Babota *i sar.*, 2022; Kusuma *i sar.*, 2021; Pandey *i sar.*, 2018). Zbog toga se kao alternativni multifaktorski pristup preferira metodologija površine odgovora (RSM) za optimizaciju širokog spektra složenih procesa, uključujući ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz različitih biljnih materijala.

RSM povezana je sa grafičkim predstavljanjem matematičkog modela (Baş & Boyacı, 2007) i značajno je razvijena pedesetih godina XX veka (Bezerra *i sar.*, 2008). RSM pruža prednosti u smislu smanjenog broja potrebnih eksperimentalnih ponavljanja, procene uticaja više parametara istovremeno na definisani odgovor sistema i analiza njihovih međusobnih interakcija, kao i identifikacije prave optimalne tačke. Takođe, primena ovog modela olakšava definisanje eksperimentalnog prostora – izbor faktora i kodiranje njihovih limita, izbor dizajna i generisanje matrice eksperimenta, modelovanje, ocenu adekvatnosti modela i određivanje optimalne vrednosti za svaki analizirani faktor (Ansori *i sar.*, 2019; Babota *i sar.*, 2022; Kusuma *i sar.*, 2022; Pandey *i sar.*, 2018). Ove prednosti rezultiraju kraćim trajanjem zadatka i uštedom materijala, hemikalija, energije i novca.

RSM potpuno objašnjava ponašanje analiziranog sistema, tako što se kombinovanjem matematičkih i statističkih metoda generiše matematički model koji predviđa odgovore. Pomoću njega se najadekvatnije prikazuje posmatrani proces i istovremeno omogućava njegova optimizacija, predlažući faktorske nivoe koji će dati željeni odgovor sistema (Bezerra *i sar.*, 2008; Dabetić, 2023; Vining *i sar.*, 2005). Osim za optimizaciju, RSM se koristi i za određivanje kinetičkih konstanti procesa (Boyacı, 2005; Mustafa Beyan *i sar.*, 2021). RSM se oslanja na metodologiju eksperimentalnog dizajna čime se omogućava smanjenje broja eksperimenata, a povećava količina relevantnih i statistički značajnih podataka.

2.6.4.1 Izbor odgovora i faktora i njihovih nivoa

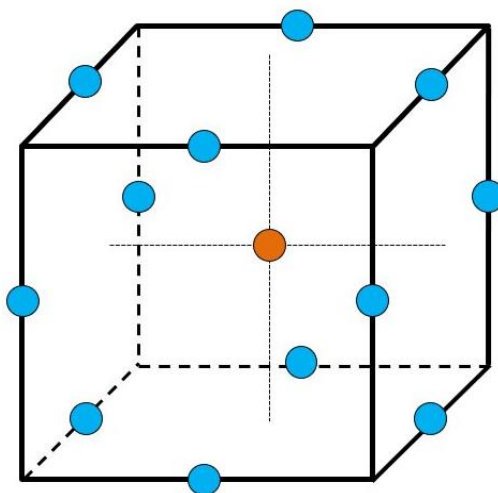
Izbor odgovora i faktora, kao i njihovih nivoa, zavisi od tehnike ekstrakcije i iskustva istraživača. Na proces ekstrakcije utiče veliki broj faktora, tako da je teško kontrolisati svaki od njih ponaosob. Prilikom izbora faktora, treba voditi računa o onima koji imaju najveći uticaj na definisani odgovor sistema. Vrednosti odgovora i faktorski nivoi su u direktnoj zavisnosti, što znači da njihov pogrešan odabir dovodi do neuspešne optimizacije. Nakon izbora odgovarajućih faktora, sistem generiše njihove kodirane vrednosti, na osnovu jednačine (1):

$$x = \frac{X - X_{min}}{X_{max} - X_{min}} \quad (1)$$

gde su, x – kodirana vrednost faktora; X – stvarna vrednost faktora; X_{max} – maksimalna stvarna vrednost faktora; i X_{min} – minimalna stvarna vrednost faktora.

2.6.4.2 Izbor eksperimentalnog dizajna, izvođenje eksperimenata prema definisanom planu, statistička analiza dobijenih podataka i formiranje matematičkog modela

Nakon izbora faktora i njihovih nivoa, neophodno je izabrati odgovarajući eksperimentalni dizajn, odnosno set eksperimenata definisan matricom, formiranom kombinacijom različitih faktorskih nivoa. S obzirom na veliki izbor eksperimentalnih tačaka, broj faktorskih nivoa, broj blokova i eksperimenata, postoji i veliki broj eksperimentalnih dizajna, među kojima i Box-Behnkenov dizajn (BBD). BBD ne sadrži kombinacije parametara kod kojih su faktori na najvišim ili najnižim nivoima. Na taj način se izbegavaju ekstremni radni uslovi pri kojima može doći do znatnih odstupanja i proces optimizacije se postiže uz manji broj eksperimenata (slika 9). U poređenju sa ostalim optimizacionim metodama, BBD nudi mnoge prednosti: lakši je za izvođenje i interpretaciju, istovremeno analizira efekte različitih faktora na odgovor, omogućava efikasno prilagođavanje kvadratnih površina odgovora koje su tipične za većinu eksperimenata u oblasti hemijskog inženjeringa, pruža optimalne uslove sa manjim brojem izvedenih eksperimenata, smanjujući i vreme i troškove (Ansori *i sar.*, 2019; Ferreira *i sar.*, 2007; Kusuma *i sar.*, 2021; Nekkaa *i sar.*, 2021; Pandey *i sar.*, 2018).



Slika 9 Šematski prikaz BBD sa tri faktora (Xu *i sar.*, 2023)

Odabirom BBD, faktori se variraju na 3 nivoa (-1 , 0 , 1) i to na podjednako udaljenosti između nivoa i kombinuju faktore u tzv. blokove, čime se značajno smanjuje broj eksperimenata. Nakon odabira dizajna, izvode se eksperimenti prema definisanoj matrici odnosno planu. Dobijeni rezultati se zatim statistički analiziraju. Odnos između faktora i odgovora opisuje se matematičkim modelom, čiju adekvatnost je moguće proveriti primenom analize varijanse (ANOVA), koja poredi varijacije u okviru eksperimentalnih rezultata.

Izvori varijabilnosti u ovom slučaju mogu biti model, faktori, interakcije među faktorima, kvadratni članovi faktora, ostaci (reziduali), odstupanje od modela, greška i ukupna korekcija modela (Bezerra *i sar.*, 2008; Dabetić, 2023).

Najvažniji parametri za procenu statističke značajnosti analiziranih parametara su F i p vrednosti. Veća F -vrednost ukazuje na veću značajnost parametra, dok p -vrednosti manje od 0,05 (interval poverenja od 95%) ili 0,01 (interval poverenja od 99%) ukazuju na nivo statističke značajnosti (Bezerra *i sar.*, 2008; Dabetić, 2023). Odstupanje od modela analizira da li su razlike između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti statistički neznačajne ($p > 0,05$), odnosno da li se neslaganje može objasniti eksperimentalnom greškom. Procenat ukupnih varijacija predloženog modela, odnosno fitovanje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti, testira se pomoću koeficijenta determinacije (R^2), njegove prilagođene ($Adj. R^2$) i predviđene vrednosti ($pred. R^2$). Adekvatnost matematičkog modela se postiže ukoliko su R^2 i $Adj. R^2$ bliži jedinici, a razlika između $Adj. R^2$ i $pred. R^2$ manja od 0,2 (Bezerra *i sar.*, 2008; Dabetić, 2023).

Uticaj glavnih i interakcija testiranih faktora analiziraju se pomoću apsolutnih vrednosti koeficijenata matematičkog modela. Što je apsolutna vrednost koeficijenta veća, to je i veći uticaj faktora na odgovore sistema. Ukoliko je predznak pozitivan, onda povećanje vrednosti faktora dovodi do povećanja odgovora sistema, dok negativan predznak ukazuje da povećanje vrednosti faktora dovodi do smanjenja odgovora (Bezerra *i sar.*, 2008; Dabetić, 2023).

2.6.4.3 Grafički prikaz matematičkog modela i optimizacija bazirana na modelu

Grafički prikaz jednačine modela može biti u obliku dvodimenzionalnog (2D) i trodimenzionalnog (3D) dijagrama (Nwabueze, 2010). 2D dijagram je u konturnom obliku i predstavlja prikaz odgovora sistema na variranje jednog faktora (x -osa), dok druga dva faktora ostaju konstantna na nultom nivou, pri čemu centar elipsi ili krugova na kontur dijagramu predstavlja maksimum ili minimum odgovora (Baş & Boyacı, 2007).

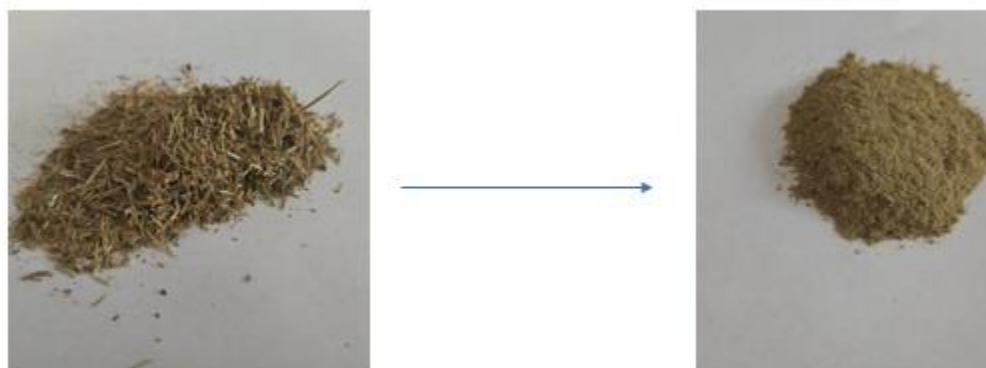
3D dijagram prikazuje interakcije dva faktora i odgovor sistema za sve nivoe ovih promenljivih, pa se nekada može koristiti i za određivanje optimalnih uslova posmatranog procesa. Na osnovu matematičkog modela i njegovih grafičkih prikaza vrši se optimizacija procesa, odnosno definisanje uslova pri kojima se postiže maksimalni odgovor sistema (Baş & Boyacı, 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Materijal

3.1.1 Biljni materijal

Nadzemni delovi kičice su ubrani na Staroj planini, Srbija (43°22'10" N, 22°36'32" E) u fazi cvetanja. Biljni materijal je opran destilovanom vodom radi uklanjanja prašine i sitnih čestica prljavštine, isprskan 70% (v/v) EtOH radi dezinfekcije, osušen na sterilnoj gazi u provetrenoj prostoriji na sobnoj temperaturi i čuvan u zatvorenoj papirnoj kesi. Osušeni biljni materijal (slika 10) je samleven u električnom mlinu u toku 2 min pri atmosferskom pritisku do dobijanja finog praha. Nakon toga, prosejan je kroz vibraciono sito i frakcija od 0,5 mm je prenetu u zatvorenu tamnu bocu do korišćenja za potrebe eksperimenata.



Slika 10 *C. erythraea* osušena i samlevana

3.1.2 Hemikalije

U ovom radu su korišćeni: apsolutni EtOH (Sani-Hem doo, Novi Bečej, Srbija), PPG (Ph Eur kvalitet) (MeiLab, Beograd, Srbija), Folin-Ciocalteu-ov reagens (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska), natrijum-karbonat, kalcijum-hlorid-dihidrat, sirćetna kiselina (Zorka Pharma, Šabac, Srbija), galna kiselina (čistoća 97%), mravlja kiselina (HPLC čistoće), metanol (HPLC čistoće), 65% (m/m) koncentrovana azotna kiselina (p.a), multistandard IV – multielementarni standardni rastvor (Merck, Darmštat, Nemačka), destilovana voda (HPLC čistoće) (Fisher Chemical, Voltam, MA, SAD) i BHT (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). Referentni standardi za limunsku kiselinu, 3-O-kafeoilhininsku kiselinu, 5-O-kafeoilhininsku kiselinu, kvercetin-3-O-galaktozid, izokvercitrin i rutin (analitički proizvod) nabavljeni su od Sigma Aldrich (Sent Luis, MO, SAD).

3.1.3 Instrumenti

Električni mlin za kafu SMK150WI (Gorenje, Slovenija), induktivno spregnuta plazma-optički emisijski spektrometar ARCOS FHE12 (SPECTRO, Kleve, Nemačka), ultrazvučna kada (Sonic, Niš, Srbija), centrifuga TH16B (Hong Kong, Kina), laboratorijska peć, Hypersil Gold C18 (50×2,1 mm, 1,9 μm), Dionex Ultimate 3000 UHPLC+ sistem opremljen detektorom diodnog niza (DAD) i masenim spektrometrom sa kvadrupolnim analizatorom (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD) i spektrofotometar Varian Cary-100 (Mulgrave, VIC, Australija).

3.2 Metode

3.2.1 Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage u biljnom materijalu je određen gravimetrijski iz razlike mase droge pre i posle sušenja (European Pharmacopeia, 2005). Odmerena količina biljne droge (1 g) je u vegeglasu čuvana otklopljeno 2 h u sušnici na 105 °C, nakon čega je izvađena, ohlađena u eksikatoru, merena i ponovo sušena do konstantne mase.

Sadržaj vlage se računa prema jednačini (2):

$$\% \text{ vlage} = 100 \frac{(a-b)}{a} \quad (2)$$

gde su, a – masa droge (g) pre sušenja (1 g) i b – masa droge (g) posle sušenja (odmerena masa droge nakon sušenja do konstantne mase).

Dobijena vrednost sadržaja vlage je srednja vrednost tri merenja i predstavljena je kao gram vlage po 100 g uzorka.

3.2.2 Priprema i analiza infuzije

Infuzija je pripremljena na tradicionalan način. Jedna supena kašika suvog biljnog materijala je prelivena sa 200 cm³ ključale vode i ostavljena da odstoji poklopljena 15 min, nakon čega je procedena i spremljena za dalju analizu.

3.2.3 UE etanolom i propilen-glikolom

UE bioaktivnih komponenti iz *C. erythraea* izvedena je u ultrazvučnoj kadi, zapremine 6 dm³. U cilju sprečavanja gubitka rastvarača i promene solvomodula, ekstrakcija je izvedena u balonima od 50 cm³ uz refluks. Samleven biljni material je preliven aEtOH ili aPPG. Snaga i radna frekvencija ultrazvuka iznosili su 150 W i 40 kHz, respektivno.

Nakon završene ekstrakcije, čvrsti matriks je odvojen od ekstrakta u centrifugi, pri 4000 obr·min⁻¹ tokom 10 min. Tečni ekstrakt (3 cm³) je sušen u laboratorijskoj peći na 105 °C do postizanja konstantne mase uzorka (slika 11).



Slika 11 Tečni ekstrakti *C. erythraea*

3.2.4 Određivanje mineralnog sastava infuzije, etanolnog i propilen-glikolnog ekstrakta kičice

3.2.4.1 Induktivno spregnuta plazma – optička emisiona spektrometrija (ICP-OES)

Za određivanje koncentracija makro- i mikroelemenata, pripremljeni su kalibracioni standardi, odnosno Multistandard IV, koji sadrži Ag, B, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Na, Ni, Pb, Tl i Zn u koncentracijama od 1000 ppm. Uzorci su razblaživani destilovanom vodom, a kao noseći gas korišćen je Argon 5,0 (čistoće 99,999%). Ca, K, Mg, P, S, Sr i Si su određeni upotrebom specifičnih kalibracionih standarda (1000 ppm).

3.2.4.2 Priprema uzoraka za ICP-OES analizu

Uzorci su pripremljeni postupkom vlažne digestije. Tačno određene mase/zapremine uzoraka prelivene su sa 2,5 cm³ koncentrovane azotne kiseline. Nakon toga vršeno je zagrevanje smeše na vodenom kupatilu do obezbojenja rastvora i prestanka izdvajanja pare. Rastvori su dopunjeni destilovanom vodom u normalnim sudovima od 25 cm³, filtrirani celuloznim filterima prečnika 0,45 μm (Sigma Aldrich, Sent Luis, MO, SAD) i analizirani.

3.2.4.3 Analiza uzoraka

Sva merenja su vršena na ICP-OES instrumentu, metodom kvantitativne analize, u skladu sa uputstvima proizvođača. Radni uslovi ICP-OES instrumenta i parametri za određivanje koncentracije odabranih elemenata su dati u tabeli 5, dok su u tabeli 4 prikazane odabrane talasne dužine detekcije za svaki analizirani element, korelacioni koeficijent (R), limit detekcije (LD), kao i opseg linearnosti.

Tabela 4 Parametri kalibracione prave za određivane elemente

Naziv Elementa	Talasne dužine za detekciju (nm)	Korelacioni koeficijent (R)	Limit detekcije ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	Opseg linearnosti ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)
Ag	224,641	0,99993	0,39	$1,45\times 10^{-2}$ –12,00
	328,068	0,99995		$3,99\times 10^{-4}$ –12,00
B	182,641	0,99999	6,43	$7,37\times 10^{-3}$ –12,00
	249,773	0,99999		$6,43\times 10^{-3}$ –12,00
Ca	183,801	0,99995	2,14	1,6–480,00
	396,847	0,99946		$2,14\times 10^{-3}$ –2,41
Cd	214,438	0,99994	0,127	$1,27\times 10^{-4}$ –12,00
Co	228,616	0,99980	0,327	$3,27\times 10^{-4}$ –12,00
Cr	283,563	0,99998	0,435	$4,35\times 10^{-4}$ –12,00
Cu	224,700	0,99999	0,259	$9,07\times 10^{-4}$ –12,00
	324,754	0,99999		$2,59\times 10^{-4}$ –12,00
Fe	259,941	0,99997	0,118	$1,18\times 10^{-4}$ –12,00
K	404,721	0,99998	0,378	0,798–300,00
	766,491	0,99999		$3,78\times 10^{-4}$ –1,20
Li	323,261	1,00000	0,058	$7,98\times 10^{-2}$ –12,00
	670,780	0,99997		$5,75\times 10^{-5}$ –1,20
Mg	279,553	0,99997	0,115	$1,15\times 10^{-4}$ –6,04
	285,213	0,99994		4,03–120,00
Mn	257,611	0,99992	0,036	$3,57\times 10^{-5}$ –12,00
Na	330,237	0,99994	4,75	7,98–480,00
	598,592	0,99989		$4,75\times 10^{-3}$ –12,00
Ni	231,604	0,99994	0,474	$4,74\times 10^{-4}$ –12,00
Pb	220,353	0,99998	1,78	$1,78\times 10^{-3}$ –12,00
Sr	407,771	0,99998	$6,23\times 10^{-3}$	$6,23\times 10^{-6}$ –2,41
Tl	190,864	0,99998	1,72	$1,72\times 10^{-3}$ –12,00
Si	288,158	0,99998	1,6	$1,6\times 10^{-3}$ –120
Zn	213,856	0,99997	0,082	$8,2\times 10^{-5}$ –12,00
P	214,914	0,99992	3,5	$3,5\times 10^{-3}$ –240,00
S	180,731	1,00000	2,903	$2,9\times 10^{-3}$ –24,00

Tabela 5 Operativni uslovi za ICP-OES

Snaga plazme (W)	1400
Protok gasa ($\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$)	13
- rashladni	0,80
- pomoćni	
Tip nebulajzera	Poprečni protok
Protok nebulajzera ($\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$)	0,95
Brzina pumpe	30
Stabilizaciono vreme (s)	0

3.2.5 UHPLC-DAD-MS/MS analiza bioaktivnih jedinjenja

Tečna hromatografija visokih performansi (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) kombinovana sa masenom spektrometrijom i apsorpcionom UV-Vis detekcijom (MS i DAD, respektivno) korišćena je za kvalitativno određivanje sastava analiziranog uzorka. DionexUltimate 3000 UHPLC+ sistem je opremljen DAD detektorom, koji je povezan sa kvadrupolnim jon trap masenim spektrometrom (Thermo Fisher Scientific, MA, Voltam, SAD). Korišćeni UV-Vis detektor daje mogućnost spektralne analize komponenata na svim retencionim vremenima dobijenih hromatograma, u celokupnom spektralnom opsegu $\lambda = 200 - 800$ nm zahvaljujući DAD-komponenti, koja predstavlja sistem umreženih foto-dioda. Razdvajanje je vršeno na temperaturi 25 °C, na koloni tipa Hypersil gold C18 ($50 \times 2,1$ mm, $1,9 \mu\text{m}$), od istog proizvođača. Mobilnu fazu je činila smeša dva rastvarača: (A) 0,1% mravlja kiselina u vodi i (B) 0,1% mravlja kiselina u metanolu, sa gradijentnim režimom rada. Linearni gradijent pri protoku eluenta od $0,250 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ je bio 10% – 30% (B) prva 2 min, 35% – 40% (B) od 4 do 5 min, 45 – 55% od 6 do 8 min, 60% – 90% (B) od 8 do 11 min, praćeno izokratskim segmentom u sastavu 90% (B) od 11 do 14 min i nakon promene 90% – 10% (B) od 14 do 14,01 min, nakon čega sledi izokratski segment 10% (B) do 20 min. Zapremina analiziranog uzorka je bila 4 mm^3 , sa parametrima MS-detekcije u negativnom jonizacionom modu: elektrosprej jonski izvor (Electro Spray Ionization) sa naponom 4,5 kV, naponom i temperaturom kapilare –41 V i 350 °C, respektivno, za negativni i pozitivni mod. Xcalibur softver (verzija 2,1, Thermo Fisher Scientific, MA, Voltam, SAD) je korišćen za prikupljanje i obradu podataka. Identifikacija nekih od detektovanih komponenti je vršena korišćenjem standarda limunske, 3-O-kafeoilhininske i 5-O-kafeoilhininske kiseline, hiperozida, izokvercitrina i rutin dihidrata. Odgovarajući apsorpcioni UV-Vis i maseni spektri su upoređeni sa onim dostupnim u literaturi.

3.2.6 Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola (SUP) u ekstraktima određen je spektrofotometrijski korišćenjem Folin-Ciocalteuovog reagensa (Boškov *i sar.*, 2024; Savić *i sar.*, 2022). Uzorak je pripremljen dodatkom 1 cm^3 desetostruko razblaženog vodenog rastvora Folin-Ciocalteuovog reagensa i 1 cm^3 7% (m/v) Na_2CO_3 u $0,1 \text{ cm}^3$ ekstrakta. Tako pripremljeni uzorak inkubiran je 90 min, nakon čega je izmerena apsorbanca na $\lambda_{\text{max}} = 765$ nm na spektrofotometru. SUP izražen je kao gram ekvivalenta galne kiseline po 100 g suve materije (g GKE/100 g s.m.). Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja galne kiseline konstruisana je u opsegu koncentracija od 0,005 do $0,300 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Serijski rastvor pripremljen iz osnovnog rastvora koncentracije $1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$. Sva merenja su vršena u kvarcnim kivetama $1 \times 1 \text{ cm}$ na Varian Cari-100 spektrofotometru. Za određivanje sadržaja ukupnih fenola korišćena je jednačina (3) kalibracione krive za galnu kiselinu:

$$y = 3,40498x + 0,04825 \quad (3)$$

3.2.7 Statistička analiza i optimizacija UE

RSM zasnovana na BBD sa četiri faktora (vreme ekstrakcije, koncentracija rastvarača, solvomodul i temperatura ekstrakcije) korišćena je za određivanje optimalnih uslova UE. Faktori su varirani na tri nivoa ($-1, 0, +1$) sa 29 eksperimentalnih serija. SUP u ekstraktima je definisan kao odgovor sistema. Eksperimentalni podaci su prilagođeni polinomnom jednačinom drugog reda (4):

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_4D + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{14}AD + b_{23}BC + b_{24}BD + b_{34}CD + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2 + b_{44}D^2 \quad (4)$$

Regresioni koeficijenti su izračunati korišćenjem metode najmanjih kvadrata. Statistička značajnost faktora u polinomnoj jednačini i adekvatnost odgovarajućeg modela procenjeni su pri intervalu poverenja od 95% ($p < 0,05$) korišćenjem ANOVA. Pojmovi su smatrani statistički značajnim za $p < 0,05$. Generisanje BBD i statistička evaluacija izvršeni su pomoću softvera Design Expert (verzija 13.0.5.0, Stat-Ease, Inc., Mineapolis, MN, SAD). Nakon modelovanja sistema i njihove optimizacije, ekstrakcije su izvršene pri optimalnim uslovima u cilju provere validnosti modela. Takođe, nezavisni set ekstrakcija koji nije ušao u generisanje matematičkih modela, a predstavlja kombinaciju faktorskih nivoa unutar dizajniranog prostora, iskorišćen je za proveru njihove validnosti. Ovi uslovi ekstrakcije su takođe važni za dodatnu proveru sposobnosti predviđanja analiziranih modela.

Parametri greške regresionih modela korišćeni su za procenu adekvatnosti modela i upoređivanje dobijenih regresionih modela prema datim jednačinama 5-7:

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i^e - y_i^p)^2 \quad (5)$$

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i^e - y_i^p)^2}{n} \quad (6)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^e - y_i^p)^2}{n}} \quad (7)$$

gde je, SSE – zbir kvadratne greške, MSE – srednja kvadratna greška, RMSE – koren srednje kvadratne greške, n_i^e – eksperimentalna vrednost, n_i^p – predviđena vrednost i n – ukupan broj eksperimenata u dizajnu.

3.2.8 Procena antimikrobne aktivnosti

3.2.8.1. Mikrodilucionna metoda

Mikrodilucionna metoda predstavlja jednu od najčešće korišćenih metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti nekog jedinjenja, koja se vrši u nekoliko koraka. Antibakterijski efekat se testira na tačno određenom, standardizovanom broju bakterijskih ćelija. Taj broj iznosi 5×10^5 CFU·cm⁻³. CFU (eng. *Coloni Forming Unit*) je skraćenica za jedinicu formiranja kolonije. Prvi korak jeste priprema i standardizacija bakterijskih suspenzija.

Bakterijske kulture su pred sam eksperiment presejane sa -70 °C na hranljivi agar. Period inkubacije trajao je 18 h – 20 h na temperaturi od 37 °C. Suspenzija je pripremana sa primarnog hranljivog agara, od bakterijskih kultura starih 18 h – 20 h. Postupak je vršen pod sterilnim uslovima i sastoji se iz nekoliko koraka. Ezom se zahvate 3 – 4 morfološki istovetne kolonije određene bakterije i prenesu u 5 cm³ fiziološkog rastvora, pomoću vorteksa dobro promeša da bi se razdvojile ćelije i formirala suspenzija. Zamućenost suspenzije podešena je pomoću denzitometra (DEN-1, BioSan, Rigi, Letonija), McFarland 0,5 tako da odgovara 10^8 CFU·cm⁻³ za bakterije. Bakterijske suspenzije treba pripremiti neposredno pred eksperiment, jer bi trebalo da se iskoriste u periodu do 30 min od pripreme (Andrews, 2001; Andrews, 2005).

Analizirana jedinjenja su rastvorena u koncentrovanom DMSO (10% od ukupne zapremine), a zatim razblažena tečnom podlogom, tj. Mueller-Hintonovim bujonom (do 100% ukupne zapremine). Koncentrovani DMSO je baktericidan, zato je postavljena kontrola rastvarača kojom je potvrđeno da 10% DMSO nema negativnog uticaja na rast bakterija.

3.2.8.2 Određivanje osetljivosti bakterija

Određivanje osetljivosti bakterija mikrodilucionom metodom se zasniva na određivanju minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) koja predstavlja najnižu koncentraciju analiziranog jedinjenja koja inhibira rast bakterije. Dobijeni rezultati omogućavaju kvalitativnu i kvantitativnu procenu efekta analiziranog jedinjenja.

Mueller-Hintonov bujon je standardizovana podloga propisana od strane Nacionalnog komiteta za kliničke laboratorijske standarde Amerike (NCCLS). Koristi se za testiranje antibakterijske aktivnosti raznih jedinjenja, prvenstveno antibiotika, jer obezbeđuje optimalne uslove za većinu brzorastućih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija.

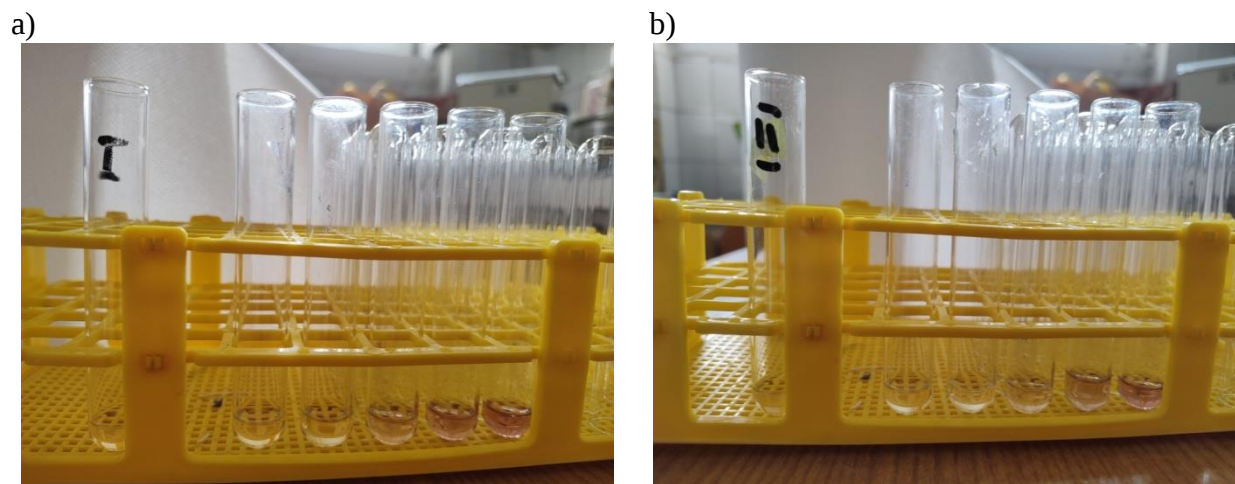
Mikrodiluciona metoda se izvodi u sterilnim uslovima u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića. U ovoj doktorskoj disertaciji primenjena je mikrodiluciona metoda sa resazurinom (Sarker i sar., 2007). Resazurin je indikator ćelijskog rasta. Netoksičan je za bakterijsku ćeliju i ima plavo-ljubičastu, nefluorescentnu boju. U periodu inkubacije, resazurin plavo-ljubičaste boje pod uticajem oksidoreduktaza žive ćelije prelazi u rezorufin roze fluorescentne boje, što znači da se redukuje. Rezorufin dalje može da se redukuje do bezbojnog i nefluorescentnog hidrozorufina.

U bunariće sterilnih mikrotitracionih ploča pod sterilnim uslovima stavlja se po 100 mm^3 Mueller-Hintonovog bujona. U prvi red doda se po 100 mm^3 analiziranog jedinjenja početne koncentracije, a zatim pravi serija dvostrukih razblaženja. Iz prvog reda u naredni red odpipetira se 100 mm^3 i tako iz svakog sledećeg do poslednjeg reda. Za svaku bakteriju analizira se po 10 koncentracija (početna koncentracija analiziranih jedinjenja bila je 10 mg, tako da je opseg koncentracija bio 5 mg - 0,078 mg). U bunariće mikrotitracionih ploča se zatim u odgovarajuće kolone doda po 10 mm^3 razblažene bakterijske suspenzije i na kraju se u svaki bunarić doda po 10 mm^3 rastvora resazurina. Vodeni rastvor resazurina se priprema rastvaranjem 270 mg praha u 40 cm^3 sterilne destilovane vode. Inkubacija je 24 h na 37°C . Svaki eksperiment sadrži i kontrolu bakterijskog rasta, kontrolu sterilnosti i negativnu kontrolu (10% DMSO) i pozitivnu kontrolu (antibiotik). Rezultati se očitavaju vizuelno, a kao pokazatelj služi promena boje indikatora iz plavo-ljubičaste u roze. Najniža koncentracija na kojoj nije došlo do promene boje indikatora označena je kao MIK.

3.2.9 Određivanje antiradikalske aktivnosti uzoraka primenom DPPH testa

Antiradikalska aktivnost EtOH i PPG ekstrakta nadzemnih delova *C. erythraea* analizirana je DPPH testom. Ovaj test se zasniva na određivanju sposobnosti jedinjenja da „hvata“ slobodne DPPH radikale, koji se tom prilikom redukuju pomoću molekula donora vodonika. Ova metoda je odabrana zbog svojih prednosti u merenju antiradikalske aktivnosti na sobnoj temperaturi, čime se smanjuje verovatnoća termičke degradacije analiziranih molekula (Bouyahya i sar., 2017).

Napravljena je serija EtOH rastvora uzoraka različitih koncentracija u opsegu $0,2 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ – $6,67 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$, za oba ekstrakta (slika 12). Butilovani hidroksitoluen (BHT, EtOH rastvor, opseg koncentracija: $0,03 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ – $1,00 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$) je korišćen kao pozitivna kontrola.



Slika 12 Određivanje antiradikalske aktivnosti uzoraka a) EtOH i b) PPG ekstrakta primenom DPPH testa

EtOH rastvor DPPH radikala ($0,3 \text{ cm}^3$, $1,7 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) je dodat u $0,75 \text{ cm}^3$ rastvora ekstrakta različitih koncentracija. Uzorci su inkubirani 20 min na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svetlosti. Apsorbancija uzoraka (A_U) je merena na talasnoj dužini $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$. Apsorbancija je određena i za čist EtOH rastvor DPPH radikala ($0,3 \text{ cm}^3$ DPPH radikala date koncentracije + $0,75 \text{ cm}^3$ EtOH – „kontrola”) (A_K), kao i za EtOH ekstrakt pre tretiranja DPPH radikalom ($0,75 \text{ cm}^3$ ekstrakta + $0,3 \text{ cm}^3$ EtOH – „blank”) (A_B). EtOH je korišćen kao slepa proba.

Stepen neutralizacije DPPH radikala se izračunava prema jednačini (8):

$$\text{Stepen neutralizacije DPPH radikala (\%)} = 100 - \left[(A_U - A_B) \cdot \frac{100}{A_K} \right] \quad (8)$$

Eksperiment je rađen u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

3.2.10 UV-A ozračivanje

Ekstrakti su ozračivani kumulativno, pomoću 10 simetrično postavljenih UV-A lampi, sa emisionim maksimumom na $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$. Ozračivanje uzoraka zapremine $2,5 \text{ cm}^3$ je vršeno u kvarcnim kivetama sa hermetičkim poklopcem, dimenzija $1 \times 1 \times 4,5 \text{ cm}$, smeštenih u rotacioni držač za kivete. Držač je pozicioniran vertikalno u osu reaktora, rotira brzinom od $5 \text{ obr} \cdot \text{min}^{-1}$ čime se obezbeđuje ravnomerno ozračivanje uzoraka iz svih pozicija, tj. prosečno jednak broj UV-fotona u jedinici vremena po jedinici ozračivane površine. Ukupni izmereni energetski fluks koji uzorci primaju na ovaj način je oko $18 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ i izračunat je iz odnosa energija UV-fotona.

3.2.11 Dinamička viskoznost smeše dve tečnosti

Dinamička viskoznost za smešu dve tečnosti se računaju prema jednačini (9):

$$\mu_{MIX} = \frac{1}{\left(\frac{x_A}{\mu_A}\right) + \left(\frac{x_B}{\mu_B}\right)} \quad (9)$$

gde μ_{MIX} , μ_A i μ_B predstavljaju viskoznost smeše i čistih komponenti A i B, dok su x_A i x_B molarne frakcije komponenti.

3.2.12 Električna potrošnja i emisija ugljen(IV)-oksida

Potrošnja energije tokom procesa ekstrakcije izračunata je prema jednačini (10) (Boudraa i sar., 2021):

$$E = P \cdot t \quad (10)$$

gde E (kW·h) predstavlja potrošnju energije, P (kW) primenjenu snagu i t (h) vreme ekstrakcije.

Potrošnja električne energije od 1 kW·h rezultira emisijom 800 g ugljen(IV)-oksida u atmosferu (Ma i sar., 2012). Emitovani ugljen(IV)-oksid koji se oslobađa u atmosferu tokom ekstrakcije procenjen je prema jednačini (11) (Boudraa i sar., 2021):

$$E_{CO_2} = E \cdot 800 \quad (11)$$

gde je E_{CO_2} (g) emisija ugljen(IV)-oksida i E (kW·h) potrošnja energije.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Sadržaj vlage u biljnom materijalu

Sadržaj vlage u biljnom materijalu dobijen je na osnovu tri merenja i određen kao njihova srednja vrednost i iznosi $13,37\% \pm 0,18\%$. Dobijena vrednost je u okviru predviđenih vrednosti (European Pharmacopeia, 2005), odnosno 7% – 16%.

4.2 Karakterizacija infuzije kičice

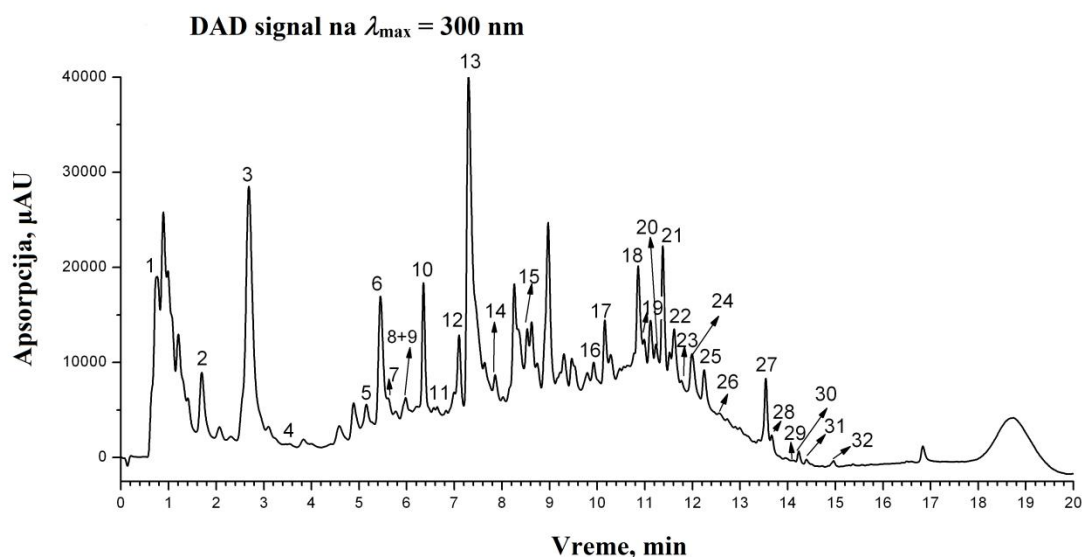
4.2.1. Hemijski sastav infuzije kičice

C. erythraea jedna je od najčešće korišćenih gorkih biljaka zbog svojih lekovitih svojstava. Farmakološki efekti *C. erythraea* uključuju antiinflamatorno, antipiretičko, hipoglikemijsko, antioksidativno, antimikrobno, hepatoprotektivno, gastroprotektivno, kardio-regulatorno, antikancerogeno, sedativno, analgetičko i antimutageno dejstvo.

Poznavanje hemijskog sastava infuzije *C. erythraea* je od izuzetnog značaja, kako bi se na pravi način procenila efikasnost tradicionalno pripremljenog čaja, kao najčešćeg načina konzumiranja biljnih napitaka. Identifikacija bioaktivnih jedinjenja u infuziji *C. erythraea* izvršena je pomoću UHPLC-DAD-MS/MS analize. Na slici 13, prikazan je UHPLC hromatogram snimljen sa DAD detektorom na $\lambda_{\max} = 300$ nm. Lista detektovanih jedinjenja u analiziranom uzorku prikazana je u tabeli 6 (Nikolić i sar., 2022).

Nadzemni delovi *C. erythraea* bogati su sekoiridoidnim glikozidima i fenolima. Limunska kiselina, 5-*O*-kafeoilhinska kiselina i rutin su identifikovani korišćenjem referentne standardne metode zasnovane na vremenima zadržavanja i preklapanja odgovarajućih UV-Vis i MS/MS spektra (jedinjenja br. 1, 5 i 15, respektivno, tabela 6, slika 13) (Nikolić i sar., 2022).

Derivati sekoiridoidnih glikozida, sekologanozid i sverozid, prisutni su u infuziji *C. erythraea* (tabela 6). Sekologanozid sa molekularnim jonom $[M-H]^-$ na m/z 389 i jonima na m/z 345(100%), 209, 165 i 121 u MS/MS spektru, detektovan je kao pik br. 10 na UHPLC hromatogramu (tabela 6, slike 13 i 14a), dok je odgovarajući UV/Vis ($\lambda_{\max} = 232$ nm) prikazan na slici 14b. Sverozid sa molekularnim jonom $[M+H]^+$ na 359 m/z je detektovan kao pik br. 11 na UHPLC hromatogramu (tabela 6, slika 13). Odgovarajući MS/MS i UV/VIS spektri ovog jedinjenja prikazani su na slici 15 (Nikolić i sar., 2022; Guedes i sar., 2019).



Slika 13 UHPLC hromatogram infuzije *C. erythraea* procenjen na osnovu DAD signala na $\lambda_{\max} = 300$ nm

U uzorku infuzije, karboksilni derivat *p*-kumaroil-sekologanozida, sverciamarin, sekoksiloganin i kafeoil-*O*-sekologanozid detektovani su u negativnom jonizacionom modu na m/z 581, 433, 403 i 551, respektivno (pikovi br. 7, 12, 14 i 17, tabela 6) (Božunović *i sar.*, 2018; Nikolić *i sar.*, 2022). Visok sadržaj gorkih materija, sekoiridoidnih glikozida (najviše korišćenih u lečenju dispeptičkih poremećaja i gubitka apetita) ima veliki uticaj na lekovitu efikasnost biljke (Pataczek *i sar.*, 2017). Kiseline, poput limunske ($[M-H]^-$, m/z 191), 3- ili 4-hidroksi-2-oksooglutarne, siringinske, i 5-*O*-kafeoilhinske, kao i derivati cimetne i kaftarinske kiseline (hidroksi-metoksi-cinamat i heksozid kaftarinske kiseline) detektovani su u uzorku infuzije (pikovi br. 1, 2, 3, 5, 6 i 13), kao što je prikazano u tabeli 6, slika 13 (Nikolić *i sar.*, 2022).

Siringinska kiselina, detektovana u pozitivnom jonizacionom modu na m/z 155, (pik br. 3, tabela 6, slika 16), je fenolno jedinjenje, koje poseduje antioksidativno, antimikrobno, antiinflamatorno, antiendotoksično, neuroprotektivno i hepatoprotektivno delovanje, kao i sposobnost efikasnog hvatanja slobodnih radikala i smanjenje oksidativnih stres markera (Srinivasulu *i sar.*, 2018). Heksozid kaftarinske kiseline je detektovan kao pik br. 13 (tabela 6) u negativnom jonizacionom modu na m/z 311 i 179 (slika 17) (Nikolić *i sar.*, 2022). Kaftarinska kiselina, kao fenolna kiselina, takođe poseduje antioksidativno, antimikrobno, antiinflamatorno i antimutageno dejstvo, a povećava i apsorpciju kiseline u intestinalnim ćelijama ljudskog kolon adenokarcinoma, Caco-2 ćelijama (Koriem, 2020).

Infuzija sadrži flavonoide poput rutina i kvercetin-pentozida (pikovi br. 15 i 16) na m/z 609 i 447 (tabela 6) (Božunović *i sar.*, 2018; Nikolić *i sar.*, 2022), kao i ksantone i njihove derivate, poput izomera genciozida, odnosno 1-hidroksi-7-metoksi-3-*O*-primverozil ksanton, (pikovi 18, 20 i 22). U ekstraktu su prisutni i dihidroksi-tetrametoksi-ksanton, trihidroksi-monometoksi-ksanton, dihidroksi-dimetoksi-ksanton, dihidroksi-tetrametoksi-ksanton, monohidroksi-trimetoksi-ksanton, trihidroksi-dimetoksi-ksanton, trihidroksi-trimetoksi-ksanton, dihidroksi-tetrametoksi-ksanton (pikovi br. 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 i 32 respektivno, tabela 6) (Božunović *i sar.*, 2018; Guedes *i sar.*, 2019). Odgovarajući MS/MS spektar u pozitivnom jonizacionom modu i UV/Vis spektar prikazani su na slici 18 za jedinjenje br. 27, koje je identifikovano kao izomer dihidroksi-tetrametoksi-ksantona. Ksantoni, uključujući i njihove glikozidne derivate, pokazuju između ostalog, antioksidativno, antikancerogeno i antiinflamatorno dejstvo (Guedes *i sar.*, 2019; Huang *i sar.*, 2021).

Rezultati UHPLC-DAD-MS/MS analize pokazuju da infuzija *C. erythraea* predstavlja dobar izvor bioaktivnih jedinjenja i bio-antioksidanasa.

Tabela 6 Spisak detektovanih jedinjenja u infuziji *C. erythraea* UHPLC-DAD-MS/MS analizom

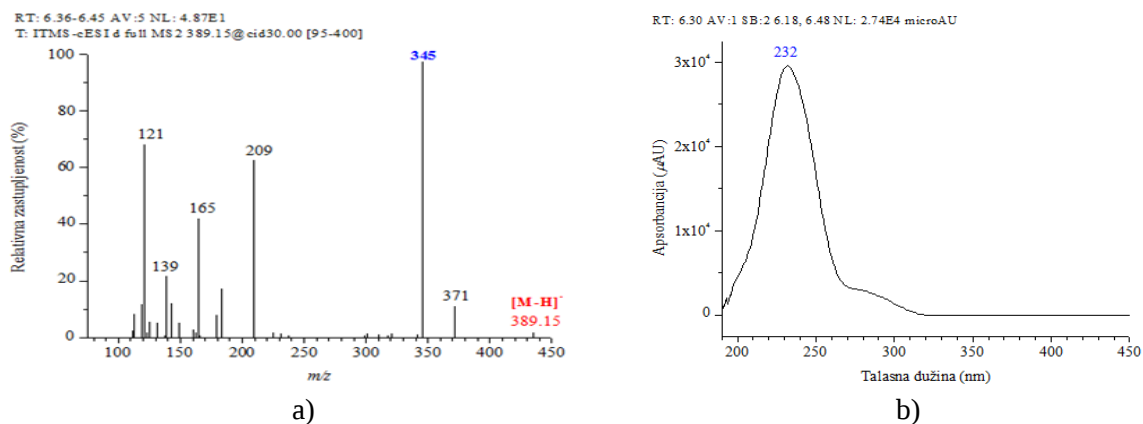
Pik Br.	t_R , min (MS signal)	λ_{max} , nm	Molekularni jon $[M-H]^-$ $^a[M+H]^+$ m/z	MS/MS fragmentni joni	Identifikovano jedinjenje	Literatura
1	0,90	-	191	173, 111(100%), 85	Limunska kiselina	standard
2	2,09	-	161	143(100%), 115, 71	3- ili 4-Hidroksi-2-oksoglutarina kiselina	Fratemale <i>i sar.</i> (2015)
3	2,75	297	^a 199	^a 155(100%)	^b Siringinska kiselina	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
4	3,50	-	407	179(100%), 161, 143, 131		n.i.
5	5,28	328	353	191(100%)	5-O-kafeoilhinska kiselina	standard
6	5,53	328	325	193(100%), 134	Hidroksi-metoksi-cinamat derivat	^c (MB: KO001109) https://massbank.eu
		300sh				
7	5,72	240	581	535(100%), 517, 341	Karboksilni derivat <i>p</i> -kumaroil-sekologanozida	Božunović <i>i sar.</i> (2018)
8	6,01	-	419	355, 179(100%), 161, 143		n.i.
9	6,04	-	^a 771	^a 397(100%)		n.i.
10	6,40	232	389	345(100%), 209, 165, 121	Sekologanozid	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
11	6,76	248	^a 359	^a 197(100%), 179, 127	Sverozid	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
12	7,22	297	433	179(100%)	Sverciamarin derivat	Božunović <i>i sar.</i> (2018)
13	7,37	329	473	311, 293(100%), 179	Heksozid kaftame kiseline	Barros <i>i sar.</i> (2013)
		300sh				
14	7,85	320	403	371(100%), 227, 179, 165, 121	^b Sekoksiloganin	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
15	8,96	365	609	301(100%), 255	Rutin	standard
16	9,91	-	447	301(100%), 285	Kvercetin-pentozid	^c (MB: FIO00586) https://massbank.eu
17	10,36	336	551	507(100%), 489, 389, 220	Kafeoil-O-sekologanozid	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
18	10,73	-	551	389, 357(100%), 161	Genciozid, izomer	Aberham <i>i sar.</i> (2007)

Tabela 6, nastavak

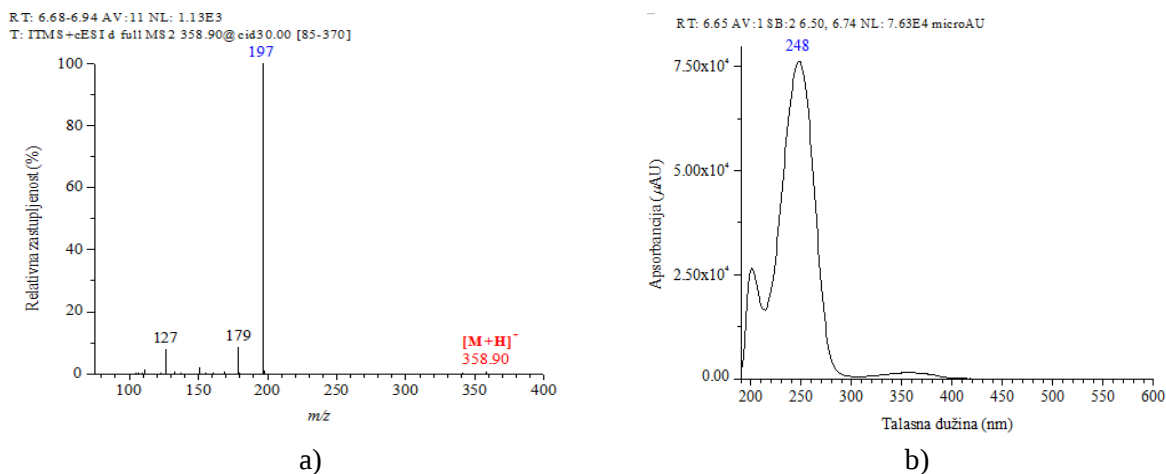
Pik Br.	t_R , min (MS signal)	λ_{max} , nm	Molekularni jon $\frac{[M-H]^-}{^a[M+H]^+}$ m/z	MS/MS fragmentni joni	Identifikovano jedinjenje	Literatura
19	10,95	317	885	739(100%)	Kaempferol-glikozid derivat	Božunović <i>i sar.</i> (2018)
20	11,25	321	551	357(100%)	Genciozid, izomer	Aberham <i>i sar.</i> (2007)
21	11,37	309	^a 349	^a 334(100%), 319, 301	Dihidroksi-tetrametoksi-ksanton, izomer 1	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
22	11,47	329	551	389, 357(100%), 329, 179	Genciozid, izomer	Aberham <i>i sar.</i> (2007)
23	12,10	332	273	258(100%)	Trihidroksi-monometoksi-ksanton, izomer 1	Božunović <i>i sar.</i> (2018)
24	12,34	314	273	258(100%)	Trihidroksi-monometoksi-ksanton, izomer 2	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
25	12,62	330	273	258(100%)	Trihidroksi-monometoksi-ksanton, izomer 3	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
26	12,80	315	287	272(100%), 257	Dihidroksi-dimetoksi-ksanton, izomer 1	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
27	13,53	316	^a 349	^a 334(100%), 319, 301	Dihidroksi-tetrametoksi-ksanton, izomer 2	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
28	13,75	321	287	272(100%)	Dihidroksi-dimetoksi-ksanton, izomer 2	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
29	14,05	-	^a 303	^a 288(100%), 271, 227	Monohidroksi-trimetoksi-ksanton	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
30	14,10	-	303	288(100%), 273	Trihidroksi-dimetoksi-ksanton	Božunović <i>i sar.</i> (2018)
31	14,47	315	333	318(100%), 303	Trihidroksi-trimetoksi-ksanton	Božunović <i>i sar.</i> (2018)
32	15,04	334	^a 349	^a 334(100%), 319, 301	Dihidroksi-tetrametoksi-ksanton, izomer 3	Guedes <i>i sar.</i> (2019)

^a - pozitivan mod^b - <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>^c - <https://massbank.eu>

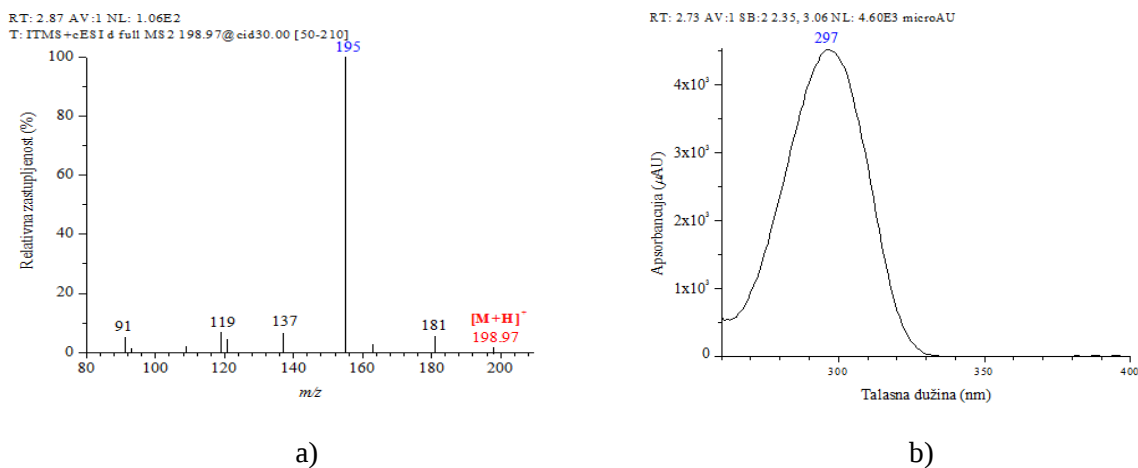
sh -prevoj



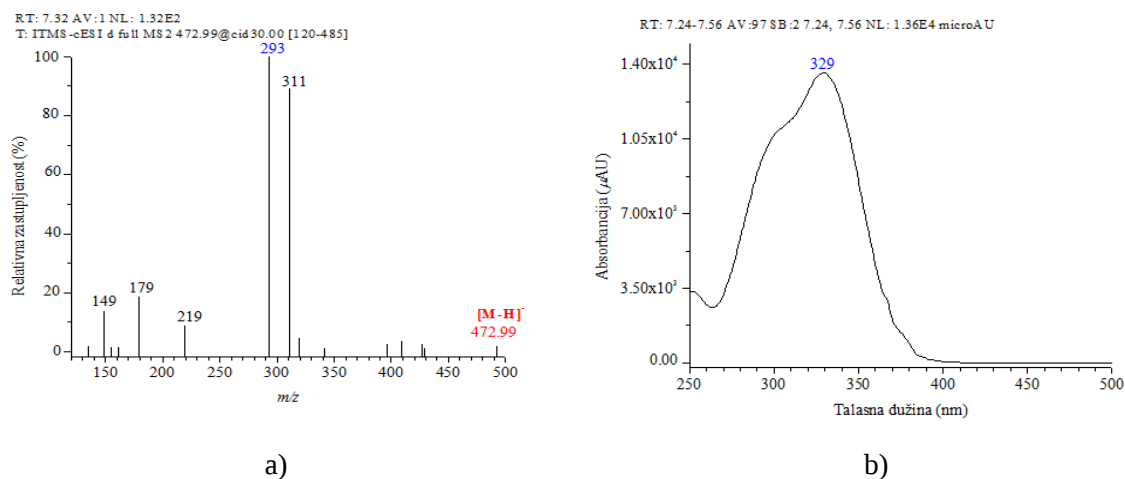
Slika 14 (-)ESI MS/MS (a) i UV-Vis (b) spektri jedinjenja br. 10 identifikovanog kao sekologanozid (tabela 6)



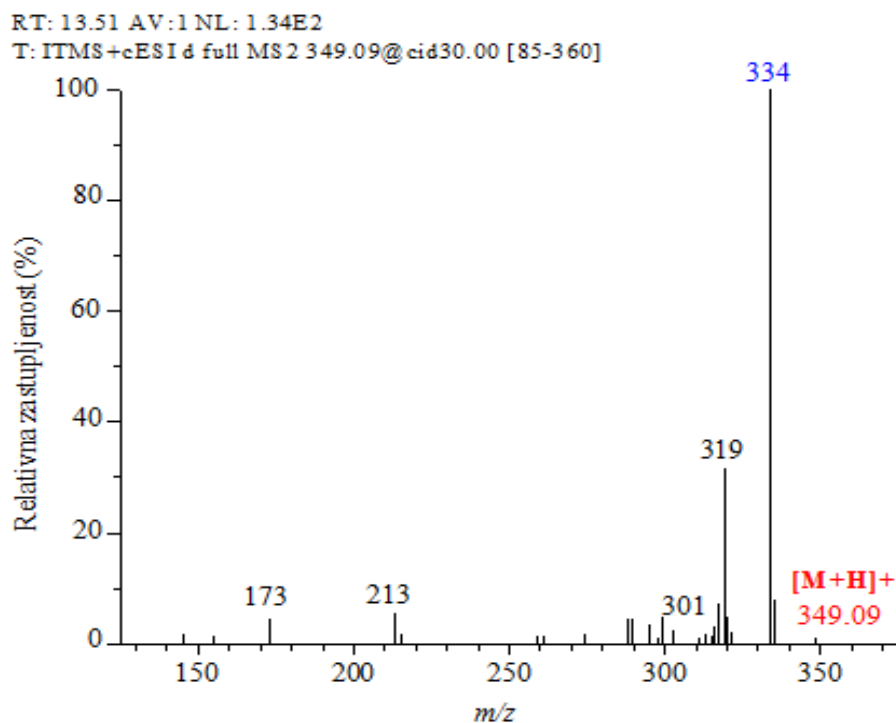
Slika 15 (-)ESI MS/MS (a) i UV-Vis (b) spektri jedinjenja br. 11 identifikovanog kao sverozid (tabela 6)



Slika 16 (+)ESI MS/MS (a) i UV-Vis spektar (b) jedinjenja br. 3 identifikovanog kao siringinska kiselina (tabela 6)



Slika 17 (–)ESI MS/MS (a) i UV-Vis spektar (b) jedinjenja br. 13 identifikovanog kao heksozid kaftarne kiseline (tabela 6)



Slika 18 (+)ESI MS/MS spektar jedinjenja br. 27 identifikovanog kao izomer dihidroksi-tetrametoksi-ksantona (tabela 6)

4.2.2 Mineralni sastav infuzije kičice

C. erythraea sadrži različite minerale koji su bitni za održavanje normalnih fizioloških funkcija i imaju različite metaboličke uloge u ljudskom organizmu. Infuzija *C. erythraea* je bogat izvor makro- i mikroelemenata. Sadržaj minerala Ag, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn, Si, P i S u infuziji *C. erythraea*, određen je ICP-OES metodom, a rezultati su prikazani u tabeli 7 (Nikolić i sar., 2023).

Detektovani esencijalni minerali u infuziji su K ($92,35 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), Na ($37,4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), Mg ($5,85 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), P ($69,775 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i S ($21,675 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Najzastupljeniji makroelementi su K ($92,35 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i P ($69,775 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), dok je najčešći mikroelement Si ($3,375 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Od teških metala u infuziji *C. erythraea* je identifikovano tri (Cu, Zn i Pb). Iz tabele 7, vidi se da je sadržaj Zn ($2,675 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) znatno veći u odnosu na druge prisutne teške metale. Teški metali su nerazgradivi sa tendencijom bioakumulacije i ispoljavaju toksične efekte. Inače, Cu, Zn, Mn, Fe spadaju u grupu mikroelemenata, čije je prisustvo u tragovima neophodno za rast i razvoj biljnih i drugih živih organizama (Petrović *i sar.*, 2020). Koncentracija Pb strogo je kontrolisana, a njegova maksimalna dozvoljena količina je $1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (Serbian regulations, 1992). Na osnovu ovoga može se zaključiti da infuzija *C. erythraea* nije opasna po ljudsko zdravlje. Ag, B, Ca, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Ni i Tl nisu detektovani u uzorcima. Dobijeni rezultati ukazuju na dobar kvalitet čaja pripremljenog od *C. erythraea*.

Tabela 7 Rezultati analize infuzije. Sadržaj elemenata je prikazan u $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Naziv elementa	Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	Naziv elementa	Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	Naziv elementa	Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)
K	92,35	Li	0,125	Ca	0
Na	37,4	Sr	0,75	Ag, B	0
Mg	5,85	Cu	0,15	Cd, Co	0
P	69,775	Zn	2,675	Ni	0
S	21,675	Pb	0,075	Cr	0
Si	3,375	Fe, Mn	0	Tl	0

Na i K su najčešći katjoni u ljudskom telu koji učestvuju u metabolizmu vode i regulaciji osmotskog pritiska, prenosu nervnih impulsa i kontrakciji mišića (Petrović *i sar.*, 2020). P je veoma važna strukturna komponenta kostiju i zuba (Zamberlin *i sar.*, 2012). Unos magnezijuma smanjuje učestalost pojave stresa, aritmije, migrene, osteoporoze, pozitivno utiče na eklampsiju i preeklampsiju, smanjuje pojavu grčeva u nogama kod trudnica (Guerrera *i sar.*, 2009). Zn ima antiartritično, antiinfektivno, antivirusno, adstringentno i imunostimulativno dejstvo. Cu je esencijalni metal u ljudskom telu za proizvodnju hemoglobina, čiji nedostatak može izazvati anemiju (Petrović *i sar.*, 2020). Nedovoljan unos minerala prouzrokuje pojavu raznih bolesti (Savić *i sar.*, 2019). Sadržaj minerala u različitim delovima kičice (cvet, list, stabljika, koren), može da varira u zavisnosti od karakteristika zemljišta, kao i od porekla i starosti biljke.

UHPLC-DAD-MS/MS i ICP-OES analiza infuzije *C. erythraea*, je pokazala značajan farmakološki i medicinski potencijal biljke, u smislu identifikovanih bioaktivnih jedinjenja i minerala, a što je bila i polazna tačka za dalji ekperimentalni rad, u cilju poboljšanja ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz kičice. Kako bi se to postiglo, izvršena je optimizacija uslova UE polarnijim sistemima rastvarača, etanol/voda (UE/aEtOH) i propilen-glikol/voda (UE/aPPG).

4.3 Modelovanje i optimizacija sistema UE/aEtOH i UE/aPPG

Za dobijanje što većih prinosa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz biljnih materijala na najekonomičniji način, poželjna je primena matematičko-statističkih metoda i kompjuterskih softvera koji omogućavaju, da se kroz relativno mali broj eksperimenata, dobije veliki broj korisnih informacija. Modelovanje i optimizacija sistema UE/aEtOH i UE/aPPG su složeni procesi koji uključuju analizu uticaja različitih procesnih faktora na efikasnost ekstrakcije SUP. Za ova modelovanja korišćena je RSM zasnovana na BBD, koja omogućava analizu uticaja više faktora istovremeno i identifikaciju optimalnih uslova ekstrakcije. Prema BBD matricama (tabele 8 i 9), optimizacija četiri parametara ekstrakcije (vremena ekstrakcije, koncentracije rastvarača, solvomodula i temperature ekstrakcije), zahtevala je izvođenje 29 eksperimenata, koja je u skladu sa studijom Nikolić *i sar.* (2023). Ekstrakcija pri eksperimentalnim uslovima koji odgovaraju centralnoj tački dizajna, ponavljana je 5 puta, u cilju određivanja statističkih parametara regresionog modela.

Sa UE/aEtOH sistemom, minimalni prinos SUP (1,2 g GKE/100 g s.m.) postignut je nakon 25 min ekstrakcije sa 50% (v/v) EtOH i solvomodulom od $5 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ na temperaturi ekstrakcije od 40°C . Maksimalni prinos SUP (4,06 g GKE/100 g s.m.) dobijen je nakon 25 min ekstrakcije sa 30% (v/v) EtOH i solvomodulom od $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ na 55°C (Nikolić *i sar.*, 2023). Korišćenjem UE/aPPG sistema, minimalni prinos SUP (2,51 g GKE/100 g s.m.) postignut je nakon 20 min ekstrakcije sa 30% (v/v) PPG i solvomodulom od $5 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ na temperaturi ekstrakcije od 55°C . Maksimalni prinos SUP (4,11 g GKE/100 g s.m.) je postignut nakon 20 min ekstrakcije sa 30% (v/v) PPG i solvomodulom od $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ na 55°C (Nikolić *i sar.*, 2023).

Tabela 8 Matrica Box-Behnkenovog dizajna sa četiri faktora za sistem UE/aEtOH

Std.	R. br.	Parametri ekstrakcije				Odgovor (SUP) [g/100 g s.m.]	
		Faktor 1 A: vreme ekstrakcije [min]	Faktor 2 B: koncentracija EtOH [%, v/v]	Faktor 3 C: solvomodul [cm ³ g ⁻¹]	Faktor 4 D: temperatura ekstrakcije [°C]	Eksp.	Pred.
2	1	30 (+1)	30 (-1)	10 (0)	55 (0)	3,00 ± 0,03	3,02
21	2	25 (0)	30 (-1)	10 (0)	40 (-1)	2,94 ± 0,05	2,94
17	3	20 (-1)	50 (0)	5 (-1)	55 (0)	1,46 ± 0,03	1,47
12	4	30 (+1)	50 (0)	10 (0)	70 (+1)	2,81 ± 0,04	2,82
4	5	30 (+1)	70 (+1)	10 (0)	55 (0)	2,89 ± 0,03	2,90
27	6*	25 (0)	50 (0)	10 (0)	55 (0)	2,78 ± 0,05	2,75
15	7	25 (0)	30 (-1)	15 (+1)	55 (0)	4,06 ± 0,06	4,06
13	8	25 (0)	30 (-1)	5 (-1)	55 (0)	1,65 ± 0,03	1,65
7	9	25 (0)	50 (0)	5 (-1)	70 (+1)	1,30 ± 0,04	1,29
29	10*	25 (0)	50 (0)	10 (0)	55 (0)	2,78 ± 0,06	2,75
22	11	25 (0)	70 (+1)	10 (0)	40 (-1)	1,65 ± 0,05	1,66
16	12	25 (0)	70 (+1)	15 (+1)	55 (0)	3,07 ± 0,05	3,06
11	13	20 (-1)	50 (0)	10 (0)	70 (+1)	2,09 ± 0,07	2,08
23	14	25 (0)	30 (-1)	10 (0)	70 (+1)	2,20 ± 0,03	2,19
5	15	25 (0)	50 (0)	5 (-1)	40 (-1)	1,20 ± 0,02	1,20
3	16	20 (-1)	70 (+1)	10 (0)	55 (0)	2,13 ± 0,04	2,12
19	17	20 (-1)	50 (0)	15 (+1)	55 (0)	3,72 ± 0,02	3,74
6	18	25 (0)	50 (0)	15 (+1)	40 (-1)	3,30 ± 0,05	3,31
10	19	30 (+1)	50 (0)	10 (0)	40 (-1)	2,44 ± 0,03	2,44
1	20	20 (-1)	30 (-1)	10 (0)	55 (0)	3,16 ± 0,02	3,16
14	21	25 (0)	70 (+1)	5 (-1)	55 (0)	1,50 ± 0,03	1,50
18	22	30 (+1)	50 (0)	5 (-1)	55 (0)	2,08 ± 0,02	2,07
9	23	20 (-1)	50 (0)	10 (0)	40 (-1)	2,56 ± 0,04	2,54
26	24*	25 (0)	50 (0)	10 (0)	55 (0)	2,72 ± 0,05	2,75
28	25*	25 (0)	50 (0)	10 (0)	55 (0)	2,74 ± 0,03	2,75
24	26	25 (0)	70 (+1)	10 (0)	70 (+1)	2,31 ± 0,02	2,32
8	27	25 (0)	50 (0)	15 (+1)	70 (+1)	3,14 ± 0,03	3,15
25	28*	25 (0)	50 (0)	10 (0)	55 (0)	2,70 ± 0,02	2,75
20	29	30 (+1)	50 (0)	15 (+1)	55 (0)	3,79 ± 0,02	3,77

Std. – Standardni redosled, **SUP** – Sadržaj ukupnih polifenola, * – Centralna tačka; **Eksp.** – Eksperimentalna vrednost;

Pred. – Predviđena vrednost

Tabela 9 Matrica Box-Behnkenovog dizajna sa četiri faktora za sistem UE/aPPG

Std	R. br.	Parametri ekstrakcije				Odgovor (SUP) [g/100 g s.m.]	
		Faktor 1 A: vreme ekstrakcije [min]	Faktor 2 B: koncentracija PPG [% v/v]	Faktor 3 C: solvomodul [cm ³ g ⁻¹]	Faktor 4 D: temperatura ekstrakcije [°C]	Eksp.	Pred.
20	1	30 (+1)	30 (0)	15 (+1)	55 (0)	3,08 ± 0,02	3,08
15	2	25 (0)	20 (-1)	15 (+1)	55 (0)	3,11 ± 0,03	3,11
7	3	25 (0)	30 (0)	5 (-1)	70 (+1)	2,64 ± 0,05	2,67
12	4	30 (+1)	30 (0)	10 (0)	70 (+1)	3,05 ± 0,06	3,07
2	5	30 (+1)	20 (-1)	10 (0)	55 (0)	2,63 ± 0,02	2,64
6	6*	25 (0)	30 (0)	15 (+1)	40 (-1)	3,48 ± 0,03	3,46
17	7	20 (-1)	30 (0)	5 (-1)	55 (0)	2,51 ± 0,04	2,49
25	8	25 (0)	30 (0)	10 (0)	55 (0)	3,21 ± 0,05	3,18
21	9	25 (0)	20 (-1)	10 (0)	40 (-1)	2,52 ± 0,03	2,53
27	10*	25 (0)	30 (0)	10 (0)	55 (0)	3,23 ± 0,03	3,18
23	11	25 (0)	20 (-1)	10 (0)	70 (+1)	3,13 ± 0,02	3,10
19	12	20 (-1)	30 (0)	15 (+1)	55 (0)	4,11 ± 0,04	4,11
28	13	25 (0)	30 (0)	10 (0)	55 (0)	3,12 ± 0,05	3,18
1	14	20 (-1)	20 (-1)	10 (0)	55 (0)	2,96 ± 0,02	2,98
13	15	25 (0)	20 (-1)	5 (-1)	55 (0)	2,55 ± 0,01	2,53
14	16	25 (0)	40 (+1)	5 (-1)	55 (0)	2,70 ± 0,03	2,71
4	17	30 (+1)	40 (+1)	10 (0)	55 (0)	3,17 ± 0,05	3,16
24	18	25 (0)	40 (+1)	10 (0)	70 (+1)	3,10 ± 0,06	3,07
18	19	30 (+1)	30 (0)	5 (-1)	55 (0)	2,98 ± 0,04	2,96
16	20	25 (0)	40 (+1)	15 (+1)	55 (0)	3,84 ± 0,05	3,86
26	21	25 (0)	30 (0)	10 (0)	55 (0)	3,14 ± 0,06	3,18
10	22	30 (+1)	30 (0)	10 (0)	40 (-1)	2,97 ± 0,03	2,97
8	23	25 (0)	30 (0)	15 (+1)	70 (+1)	3,75 ± 0,02	3,75
11	24*	20 (-1)	30 (0)	10 (0)	70 (+1)	3,32 ± 0,04	3,33
22	25*	25 (0)	40 (+1)	10 (0)	40 (-1)	3,49 ± 0,05	3,49
5	26	25 (0)	30 (0)	5 (-1)	40 (-1)	2,81 ± 0,06	2,81
29	27	25 (0)	30 (0)	10 (0)	55 (0)	3,20 ± 0,03	3,18
3	28*	20 (-1)	40 (+1)	10 (0)	55 (0)	3,37 ± 0,02	3,38
9	29	20 (-1)	30 (0)	10 (0)	40 (-1)	3,28 ± 0,03	3,27

Std. – Standardni redosled, **SUP** – Sadržaj ukupnih polifenola, * – Centralna tačka; **Eksp.** – Eksperimentalna vrednost;

Pred. – Predviđena vrednost

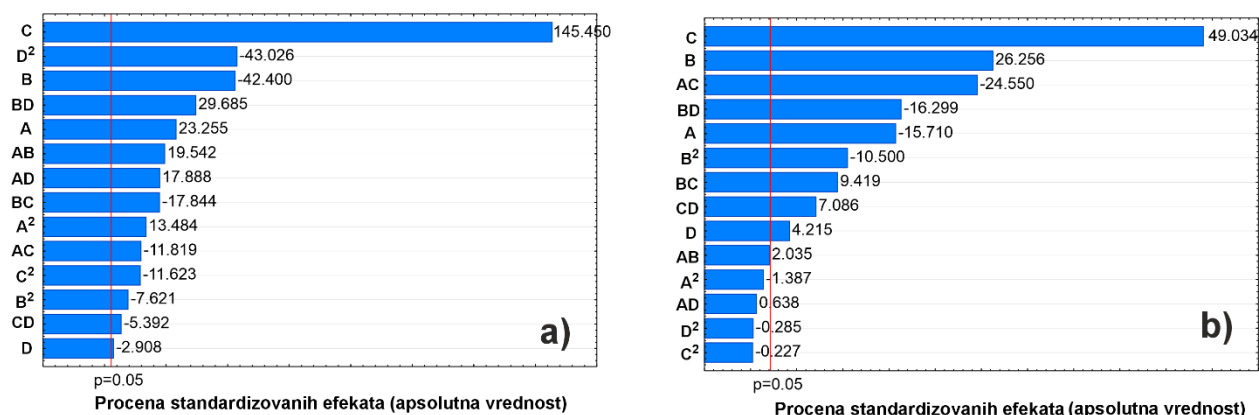
Nakon određivanja SUP, fitovani su dobijeni podaci polinomnim modelima. Polinomni model drugog reda pokazao se najboljim kod fitovanja podataka, jer je u tom slučaju greška modela bila najmanja, odnosno dobijen je najveći koeficijent determinacije. Regresioni koeficijenti dobijenih jednačina koji opisuju sisteme UE/aEtOH (jednačina 12) i UE/aPPG (jednačina 13) u smislu kodiranih vrednosti predstavljeni su kao:

$$Y = 2.745 + 0.159A - 0.289B + 0.992C - 0.020D + 0.231AB - 0.140AC + 0.211AD - 0.211BC + 0.351BD - 0.064CD + 0.125A^2 - 0.071B^2 - 0.108C^2 - 0.399D^2 \quad (12)$$

$$Y = 43160 - 0.138A + 0.231B + 0.432C + 0.037D + 0.031AB - 0.375AC + 0.010AD + 0.144BC - 0.249BD + 0.108CD - 0.017A^2 - 0.126B^2 - 0.003C^2 - 0.003D^2 \quad (13)$$

U ovim jednačinama, Y , A , B , C i D predstavljaju SUP, vreme ekstrakcije, koncentraciju izabranog rastvarača, solvomodul i temperaturu ekstrakcije, respektivno. Analiza regresionih koeficijenata u jednačini 12 implicira da su i vreme i solvomodul imali pozitivan uticaj na SUP, dok su koncentracija EtOH i temperatura izrazili negativne efekte na SUP. U jednačini 13, pozitivni efekti na SUP bili su povezani sa koncentracijom PPG, solvomodulom i temperaturom, dok je vreme ekstrakcije negativno uticalo na SUP. Jedina razlika između ovih modela bila je u regresionim koeficijentima koji se odnose na koncentraciju korišćenog rastvarača. ANOVA predloženih modela koji opisuju UE/aEtOH i UE/aPPG sisteme pri stepenu poverenja od 95%, prikazana je u tabelama 10 i 11.

Radi bolje procene analiziranih efekata, konstruisani su Pareto grafikoni za regresioni model koji opisuje ekstrakciju sa UE/aEtOH (slika 19a) i UE/aPPG sistemom (slika 19b) u softveru StatSoft STATISTICA (Verzija 12, Tulsa, SAD). Pareto grafikon, predstavlja trakasti grafikon, koji je pogodan za razmatranje efekata termina u polinomskim jednačinama na odgovor sistema. U oba slučaja, najveći pozitivan efekat imao je solvomodul na SUP u poređenju sa drugim analiziranim faktorima (Nikolić *i sar.*, 2023).



Slika 19 Pareto grafikoni za regresioni model koji opisuje ekstrakciju sa sistemom UE/aEtOH (a) i UE/aPPG (b)

Sa UE/aEtOH sistemom (tabela 10), F-vrednost modela od 1997,48 je statistički značajan, dok je F-vrednost neusaglašenosti od 0,19 statistički neznačajan u odnosu na čistu grešku (0,05). Što se tiče UE/aPPG sistema (tabela 11), F-vrednost modela od 320,41 takođe je statistički značajna. F-vrednost neusaglašenosti od 0,24 je statistički neznačajna u odnosu na čistu grešku (0,008), jer je njena vrednost bila niža od kritične vrednosti $F_{(0.05,10,4)} = 5,96$ (Nikolić *i sar.*, 2023).

Vrednosti koeficijenta determinacije bile su veće od 0,997, što ukazuje na to da ovi modeli mogu objasniti više od 99,7% varijacije u SUP. Svi članovi jednačine su bili statistički značajni kada je EtOH bio prisutan u sistemu rastvarača.

Interakcije AB i AD , kao i kvadratni članovi A^2 , C^2 i D^2 bili su statistički neznačajni u polinomnom modelu koji se odnosi na sistem sa PPG. Statistički neznačajni članovi mogu se isključiti iz jednačine kako bi se poboljšala sposobnost modela za predviđanje. Na osnovu F-vrednosti, najveći efekat na SUP imao je solvomodul, zatim koncentracija EtOH, vreme ekstrakcije i temperatura ekstrakcije.

Tabela 10 ANOVA predloženog regresionog modela za sistem UE/aEtOH

Parametar	F-vrednost	p-vrednost	Parametar	F-vrednost	p-vrednost
Model	1997,48	< 0,001	B²	58,08	< 0,001
A	540,81	< 0,001	C²	135,08	< 0,001
B	1797,77	< 0,001	D²	1851,23	< 0,001
C	21156,04	< 0,001	Nedostatak fitovanja	0,19	0,98
D	8,45	0,011469	ANOVA		
AB	381,89	< 0,001	R²	0,999	
AC	139,69	< 0,001	Adj. R²	0,999	
AD	319,99	< 0,001	Pred. R²	0,999	
BC	318,41	< 0,001	Aдекватna preciznost	168,1	
BD	881,19	< 0,001	SSE	0,00781	
CD	29,07	< 0,001	MSE	0,00027	
A²	181,82	< 0,001	RMSE	0,01641	

^aA: Vreme ekstrakcije, min; B: Koncentracija EtOH, %; C: Solvomodul, cm³·g⁻¹; D: Temperatura ekstrakcije, °C

U tabeli 11, se fidi da je solvomodul ključni parametar koji u najvećoj meri utiče na SUP. Efekti linearnih članova na definisani odgovor u padajućem redosledu bio je: solvomodul, koncentracija PPG, vreme ekstrakcije i temperatura ekstrakcije.

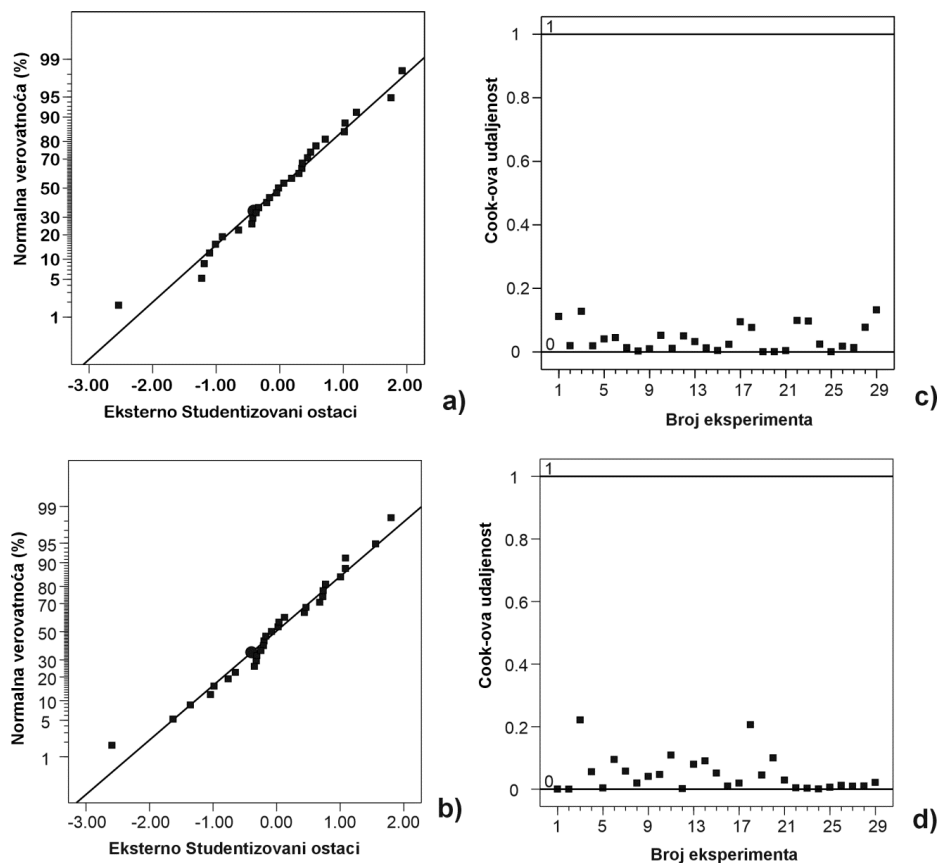
Tabela 11 ANOVA predloženog regresionog modela za sistem UE/aPPG

Parametar	F-vrednost	p-vrednost	Parametar	F-vrednost	p-vrednost
Model	320,41	< 0,001	B²	110,26	< 0,001
A	246,82	< 0,001	C²	0,05	0,824
B	689,39	< 0,001	D²	0,08	0,78
C	2404,33	< 0,001	Nedostatak fitovanja	0,24	0,97
D	17,77	< 0,001	ANOVA		
AB	4,14	0,0612	R²	0,997	
AC	602,69	< 0,001	Adj. R²	0,994	
AD	0,41	0,533	Pred. R²	0,990	
BC	88,71	< 0,001	Aдекватna preciznost	73,5	
BD	265,65	< 0,001	SSE	0,01305	
CD	50,21	< 0,001	MSE	0,00045	
A²	1,92	0,187	RMSE	0,02121	

^aA: Vreme ekstrakcije, min; B: Koncentracija PPG, %; C: Solvomodul, cm³·g⁻¹; D: Temperatura ekstrakcije, °C

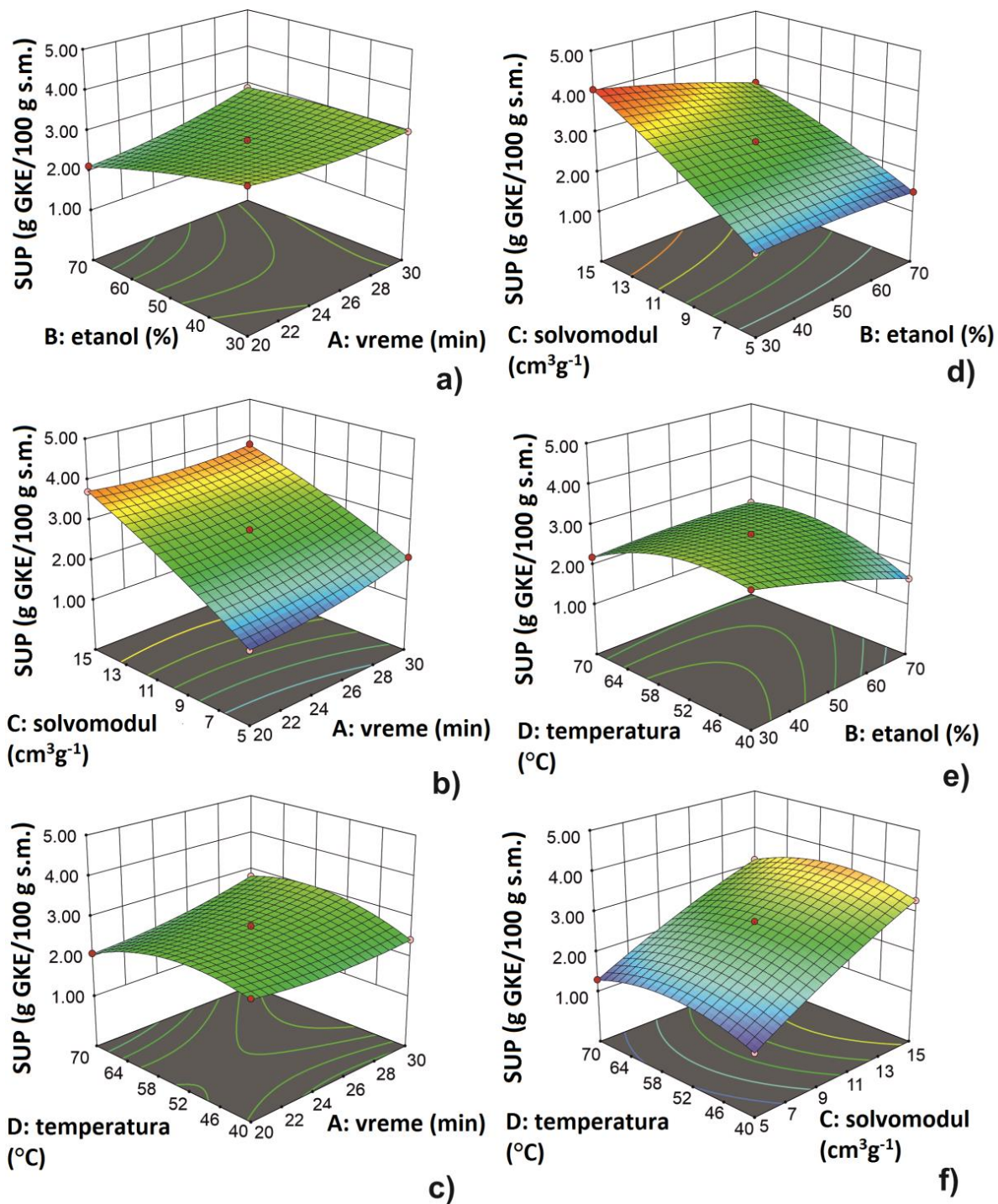
Poređenjem oba modela, redosled uticaja linearnih članova na SUP bio je isti. Koeficijent varijacije (CV) treba da bude manji od 5%, što ukazuje na preciznost (ponovljivost i srednja preciznost) modela prilikom predviđanja SUP (Aliaño-González *i sar.*, 2020). U ovim sistemima, CV je bio manji od 1%, što je bilo prihvatljivo za oba predložena modela. Adekvatne preciznosti, kao mera odnosa signal-šum, bile su veće od 4, što ukazuje na to da se predloženi modeli mogu koristiti za predviđanje SUP. Razlike između $Adj. R^2$ i $Pred. R^2$ bile su manje od 0,2 i u razumnoj su saglasnosti (Hosseini *i sar.*, 2018). Parametri koji se odnose na greške modela (SSE, MSE i RMSE) prikazani su u tabelama 10 i 11. Regresioni model za UE/aEtOH sistem imao je niže vrednosti greške u poređenju sa UE/aPPG sistemom, što znači da se SUP u dizajniranom prostoru može bolje predvideti (Nikolić *i sar.*, 2023).

Na osnovu grafičke zavisnosti normalne verovatnoće od eksterno Studentizovanih ostataka procenjeno je da li se ostaci pokoravaju normalnoj raspodeli. S obzirom da nije bilo većih odsupanja od linearne zavisnosti, može se zaključiti da podaci imaju normalnu raspodelu (slika 20a i 20b). Cookova udaljenost je kod svih podataka bila manja od granične vrednosti 1, tako da među dobijenim podacima nije bilo autlajera (20c i 20d) (Nikolić *i sar.*, 2023).

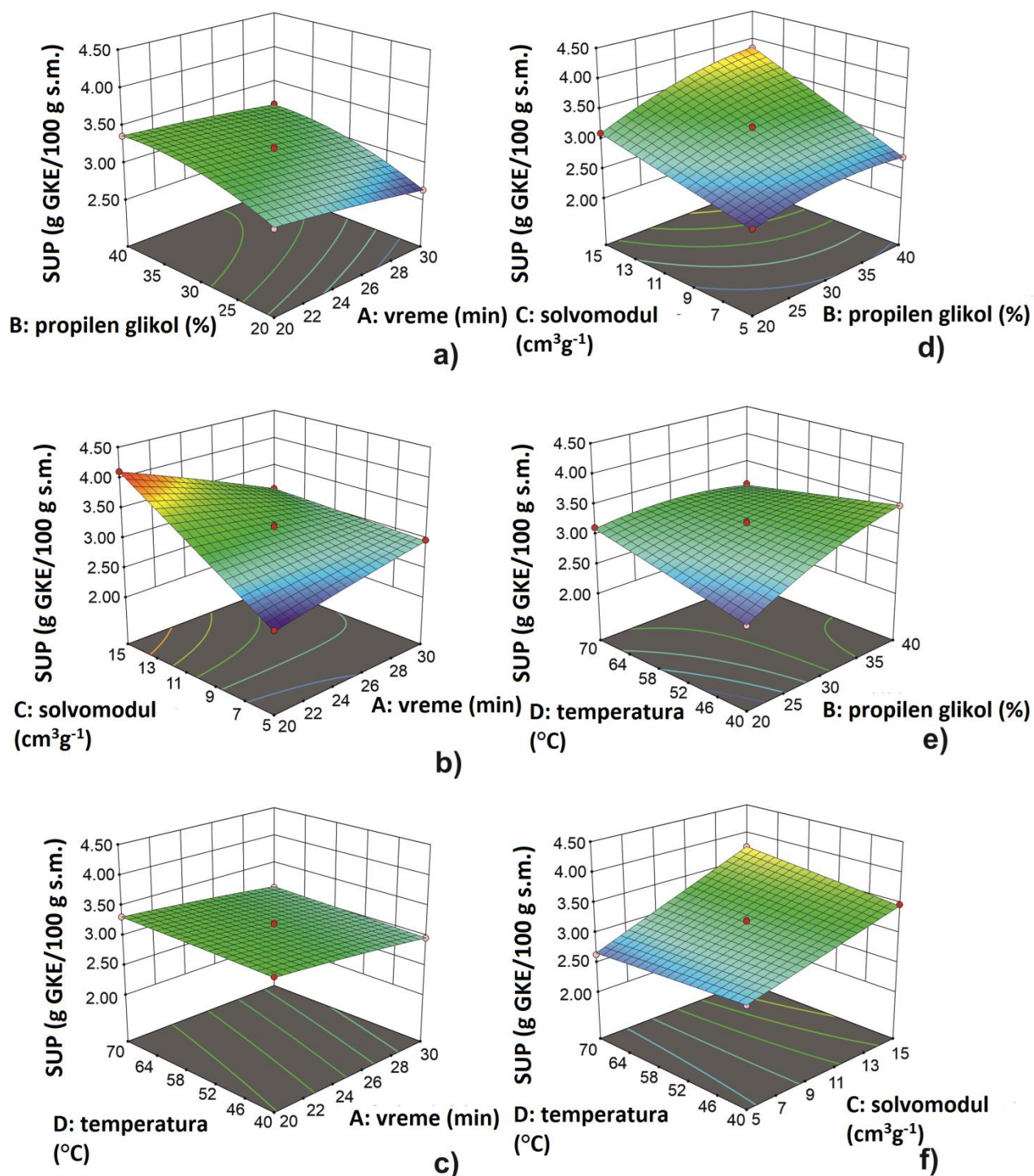


Slika 20 Ocena normalne raspodele ostataka za regresioni model koji opisuje ekstrakciju sa UE/aEtOH sistemom (a) i UE/aPPG sistemom (b). Cookova udaljenost za model koji se odnosi na UE/aEtOH sistem (c) i UE/aPPG sistem (d)

U cilju boljeg razumevanja uticaja parametara ekstrakcije na prinos polifenola, kao i utvrđivanja tipa interakcije između njih, dat je trodimenzionalni prikaz za sisteme UE/aEtOH (slika 21) i UE/aPPG (slika 22).



Slika 21 Uticaj parametara ekstrakcije na SUP za sistem UE/aEtOH



Slika 22 Uticaj parametara ekstrakcije na SUP za sistem UE/aPPG

Što se tiče sistema UE/aEtOH, uticaj vremena ekstrakcije je izraženiji pri većim koncentracijama EtOH (slika 21a). Na SUP više utiče promena koncentracije EtOH pri kraćem vremenu ekstrakcije. Promena solvomodula ima značajniji uticaj na SUP od vremena ekstrakcije (slika 21b). Vreme ekstrakcije ima veći uticaj na SUP pri višim temperaturama (slika 21c).

Povećanje temperature ekstrakcije dovodi do većeg SUP, sa postizanjem zasićenja pri srednjoj vrednosti, nakon čega SUP opada sa daljim zagrevanjem. Ovo ponašanje u vezi sa temperaturom ekstrakcije takođe je primetno na slikama 21e i 21f. Za razliku od većeg solvomodula, uticaj koncentracije EtOH na SUP gotovo je zanemarljiv pri nižem solvomodulu (slika 21d). Solvomodul ima pozitivan uticaj na SUP pri bilo kojoj temperaturi ekstrakcije (slika 21f) (Nikolić *i sar.*, 2023).

Za sistem UE/aPPG, povećanje vremena ekstrakcije je dovelo do smanjenja SUP (slika 22a), dok je veća koncentracija PPG imala pozitivan efekat na SUP. Pri nižem solvomodulu, vreme ekstrakcije ima pozitivan uticaj na SUP i obrnuto; pri kraćim vremenima ekstrakcije solvomodul ima značajniji uticaj na SUP (slika 22b). Vreme ekstrakcije takođe ima isti uticaj na SUP pri različitim temperaturama ekstrakcije (slika 22c). Pozitivan uticaj temperature ekstrakcije na SUP primećuje se pri različitim vremenima ekstrakcije. Koncentracija PPG ima jak efekat pri većem solvomodulu (slika 22d). Slično ponašanje primećeno je i za uticaj solvomodula pri većim koncentracijama PPG. Koncentracija PPG ima veći efekat na SUP pri nižim temperaturama ekstrakcije (slika 22e). Sa nižim koncentracijama PPG, povećanje temperature ekstrakcije uzorkuje povećanje SUP. Ovaj efekat je suprotan pri većim koncentracijama PPG. Uticaj solvomodula na SUP je izraženiji od uticaja temperature ekstrakcije (slika 22f). Slično ponašanje primećeno je i kod F-vrednosti linearnih članova polinomnog modela (tabela 11) (Nikolić *i sar.*, 2023).

Analiza trodimenzionalnih dijagrama pokazuje da duže izlaganje kavitacionoj energiji verovatno dovodi do degradacije bioaktivnih jedinjenja. Negativna korelacija vremena sa SUP implicira degradaciju bioaktivnih jedinjenja. Tokom UE, umereno zagrevanje poboljšava efikasnost ekstrakcije, dok kontinualno zagrevanje pri produženom vremenu ekstrakcije može dovesti do degradacije ekstrahovanih termolabilnih bioaktivnih jedinjenja (kao što su fenolne kiseline), tako da tehnike UE za dobijanje ove vrste jedinjenja treba koristiti sa oprezom (Chien *i sar.*, 2022; Kumar *i sar.*, 2021; Ma *i sar.*, 2008). Kod oba sistema, povećanje temperature na početku procesa ekstrakcije povećava sadržaj bioaktivnih jedinjenja usled smanjenja viskoznosti rastvarača, što omogućava bolju penetraciju rastvarača u ćelije biljke. Na ovaj način, povećava se rastvorljivost bioaktivnih jedinjenja pri višim temperaturama. Pored toga, povećanje solvomodula, povećava maseni prenos, rezultirajući većim prinosom bioaktivnih jedinjenja. Manipulacija sadržajem vode u rastvaraču menja njegov polaritet i efikasnost ekstrakcije. Na primer, 50% EtOH se preporučuje za UE fenolnih jedinjenja iz divljeg timijana (Babotă *i sar.*, 2022), dok, prekomerno zagrevanje negativno utiče na UE, izazivajući degradaciju termolabilnih bioaktivnih jedinjenja (Kumar *i sar.*, 2021).

Optimalni uslovi ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz nadzemnih delova kičice za oba sistema (UE/aEtOH i UE/aPPG) dobijeni su primenom metode numeričke optimizacije. Primenjena je funkcija poželjnosti za definisanje optimalnih nivoa analiziranih faktora, u cilju postizanja maksimalnog SUP. Za sistem UE/aEtOH dobijeni su sledeći optimalni uslovi: solvomodul $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 37% (v/v) EtOH, temperatura ekstrakcije $56 \text{ }^\circ\text{C}$ i vreme ekstrakcije 20 min, što je rezultovalo predviđenim i eksperimentalno dobijenim SUP od 4,11 g GKE/100 g s.m. i $4,13 \pm 0,02 \text{ g GKE/100 g s.m.}$, respektivno. Što se tiče sistema UE/aPPG, dobijeni su sledeći optimalni uslovi: solvomodul $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 38% (v/v) PPG, temperatura ekstrakcije $49 \text{ }^\circ\text{C}$ i vreme ekstrakcije 22 min, obezbeđujući predviđeni i eksperimentalno dobijeni SUP od 4,12 g GKE/100 g s.m. i $4,16 \pm 0,04 \text{ g GKE/100 g s.m.}$, respektivno.

Validacioni skupovi podataka (tabela 12) korišćeni su kako bi se potvrdila sposobnost predviđanja SUP korišćenjem predloženih regresionih modela. Ovi podaci predstavljaju dodatne eksperimentalne serije, izvedene kako bi se proverili modeli u dizajniranom prostoru. U tabeli 12 primećene su male razlike između eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti SUP, tako da se modeli mogu smatrati adekvatnim za predviđanje SUP. Takođe, optimalni uslovi za oba UE modela su bili u dobroj saglasnosti (Nikolić *i sar.*, 2023).

Efikasnost predloženih sistema UE/aEtOH i UE/aPPG u pogledu ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz nadzemnih delova kičice upoređena je sa drugim metodama ekstrakcije objavljenih u literaturi (tabela 13). Na osnovu literature o ekstraktima iz nadzemnih delova kičice dobijenih različitim metodama ekstrakcije, vrednosti SUP se kreću unutar širokog raspona, od $1,23 \pm 0,02 \text{ mg GKE/g s.m.}$ do $105,54 \pm 0,84 \text{ mg GKE/g s.m.}$ Ovaj raspon se može objasniti različitim faktorima. S obzirom na to da je kičica biljka koja obilno raste u Evropi, Aziji i Africi, očekuje se da i vrsta i sadržaj fenolnih jedinjenja u tkivima ove biljke varira. Ova varijabilnost je rezultat brojnih faktora: oplemenjivanje biljaka, genetske karakteristike, lokacija, klima, faza razvoja biljke, rukovanje pre i nakon berbe, prisustvo i vrsta upotrebljenih đubriva, itd. Različiti ekstrakcioni rastvarači (voda, metanol, EtOH, aEtOH i aPPG, etil acetat i *n*-heksan), primenjene tehnike ekstrakcije (infuzija, dekokcija, maceracija, UE, i mikrotalasna ekstrakcija) i radni uslovi (vreme ekstrakcije, solvomodul, temperatura ekstrakcije, vrsta i intenzitet zračenja i mešanja) takođe utiču na SUP (Nikolić *i sar.*, 2023).

Tabela 12 Skupovi podataka za validaciju za predložene regresione modele sa eksperimentalnim i predviđenim SUP

UE/aEtOH sistem					
A: vreme ekstrakcije [min]	Eksperimentalne varijable			Odgovor (SUP)	
	B: koncentracija EtOH [%, v/v]	C: solvomodul [cm ³ g ⁻¹]	D: temperatura ekstrakcije [°C]	Eksperimentalno	Predviđeno
22	70	10	50	2,06 ± 0,03	2,08
25	40	7	45	2,09 ± 0,03	2,10
30	60	12	60	3,33 ± 0,04	3,33
28	30	8	65	2,19 ± 0,02	2,18
26	50	13	60	3,25 ± 0,05	3,27
UE/aPPG sistem					
A: vreme ekstrakcije [min]	Eksperimentalne varijable			Odgovor (SUP)	
	B: koncentracija PPG [%, v/v]	C: solvomodul [cm ³ g ⁻¹]	D: temperatura ekstrakcije [°C]	Eksperimentalno	Predviđeno
22	25	10	50	3,08 ± 0,02	3,07
25	35	7	45	3,06 ± 0,01	3,06
30	22	12	60	2,82 ± 0,03	2,81
28	38	8	65	2,95 ± 0,02	2,95
26	40	13	60	3,49 ± 0,05	3,51

SUP – Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja (g GKE/100 g s.m.)

U poređenju sa rezultatima iz ove disertacije, Bentahar *i sar.* (2016) su dobili nešto viši SUP u ekstraktu, dobijenom dekokcijom iz nadzemnih delova alžirske kičice, pri kraćem vremenu ekstrakcije i višoj temperaturi ekstrakcije (100 °C). Za isto vreme dekokcije, temperaturu i solvomodul, Guedes *i sar.* (2019) su dobili nižu vrednost SUP u ekstraktu portugalske kičice, kao i Mihaylova *i sar.* (2019) u ekstraktu bugarske kičice dobijenom dekokcijom tokom dužeg vremena i većeg solvomodula. Mikrotalasnom ekstrakcijom iz istog biljnog materijala dobijen je ekstrakt sa nižim SUP u poređenju sa SUP kod 70% (v/v) EtOH ekstrakta dobijenog na sobnoj temperaturi tokom 7 dana. Bouyahya *i sar.* (2017) su izveli maceraciju marokanske kičice na sobnoj temperaturi tokom 72 h. Metanolni, *n*-heksanski i EtOH ekstrakti imali su veći SUP od onog dobijenog etil acetatom. UE polifenola iz makedonskog biljnog materijala sa metanolom (Tusevski *i sar.*, 2014) i vodom (Gadjalova & Mihaylova, 2019), izvedena pod različitim uslovima, rezultirala je nižim SUP u ekstraktima.

Ova studija fokusirala se na projektovanje ekološki prihvatljivih postupaka ekstrakcije korišćenjem vode, PPG i EtOH pri umerenim radnim uslovima (Nikolić *i sar.*, 2023), pošto se polifenoli rastvaraju u hidroglikolnim i hidroetanolnim smešama kao polarno protičnim medijumima (Karakashov *i sar.*, 2015).

Niža temperatura i kraće vreme ekstrakcije obezbedili su visok SUP u oba ekstrakta. Blaga prednost korišćenja PPG kao ekstrakcionog rastvarača je ta da se može direktno uključiti u različite kozmetičke i farmaceutske proizvode (Nikolić *i sar.*, 2023).

Tabela 13 Bibliografski podaci o efikasnosti različitih metoda ekstrakcije u odnosu na SUP iz nadzemnih delova kičice

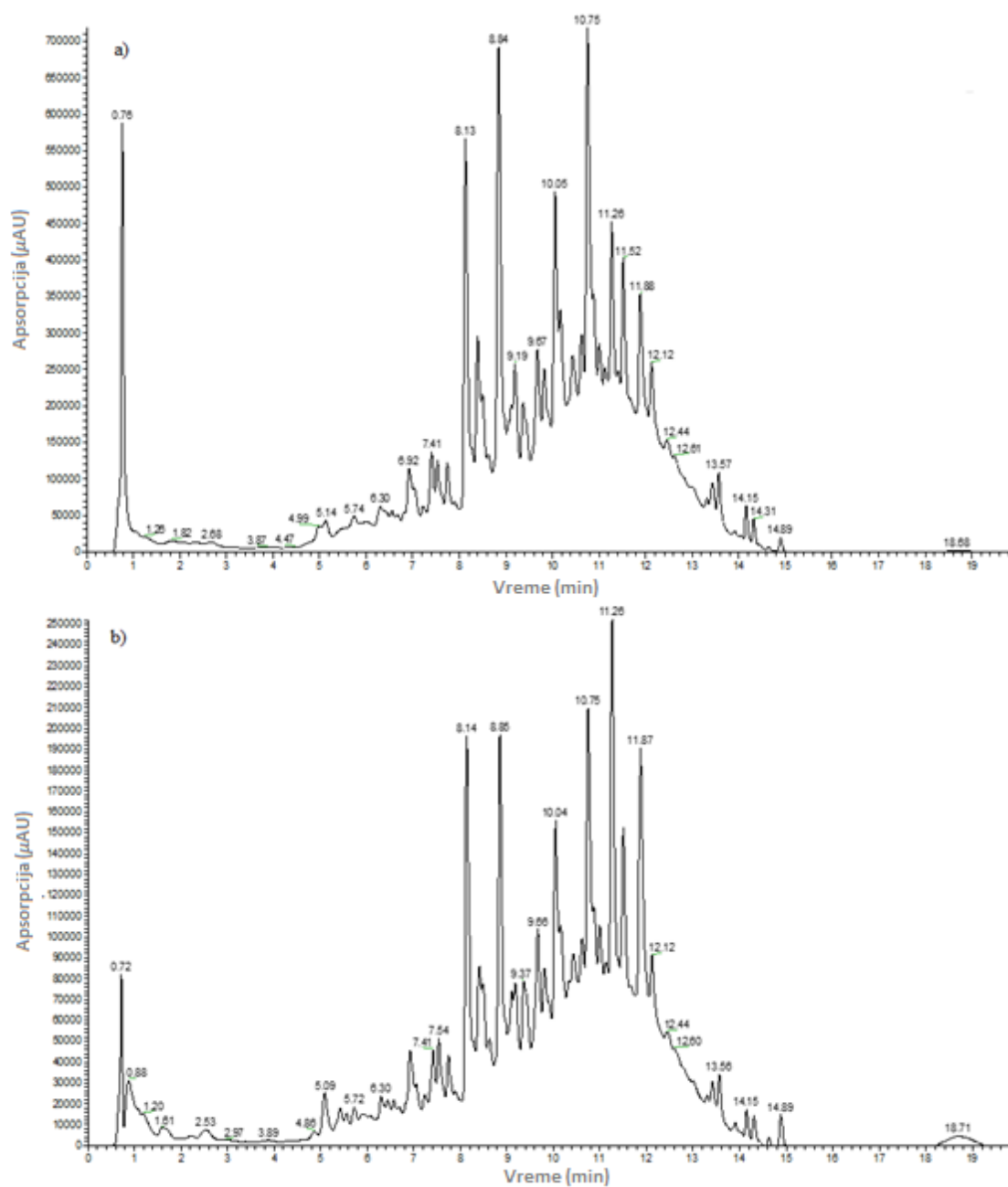
Biljno poreklo	Metoda ekstrakcije	Uslovi rada	SUP (mg GKE/g s.m.)	Literatura
Srbija	UE	20 min, 37% (v/v) EtOH i destilovana voda, solvomodul $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 56°C , 150 W	41,1 (predviđeno), 41,3 (eksperimentalno)	Nikolić <i>i sar.</i> (2023)
		22 min, 38% (v/v) PPG i destilovana voda, solvomodul $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 49°C , 150 W	41,2 (predviđeno), 41,6 g (eksperimentalno)	
Bugarska	Infuzija Dekokcija Mikrotalasna ekstrakcija Etanolna ekstrakcija	30 min, voda, solvomodul $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	$3,41 \pm 0,04$ $3,11 \pm 0,10$ $1,23 \pm 0,02$ $12,46 \pm 0,15$	Mihaylova <i>i sar.</i> (2019)
		30 min, voda, solvomodul $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 100°C		
		30 s, voda, solvomodul $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 2.450 MHz, 800 W		
		7 dana, 70% EtOH, solvomodul $10 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, sobna temperatura		
Makedonija	UE	30 min, 80% metanol, 0,02 g biljni materijal	$22,28 \pm 1,07$	Tusevski <i>i sar.</i> (2014)
Alžir	Dekokcija	10 min, destilovana voda, solvomodul $10 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 100°C , magnetno mešanje	$49,629 \pm 0,279$	Bentahar <i>i sar.</i> (2016)
Makedonija	UE	30 min, voda, solvomodul $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 60°C , 35 kHz, 240 W	$4,08 \pm 0,03$	Gadjalova & Mihaylova (2019)
Portugal	Dekokcija	10 min, destilovana voda, solvomodul, $10 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 100°C	$22,37 \pm 0,36$	Guedes <i>i sar.</i> (2019)
Maroko	Maceracija	72 h, sobna temperatura, Metanol	$22,37 \pm 0,36$	Bouyahya <i>i sar.</i> (2017)
		EtOH	$105,54 \pm 0,84$	
		Etil acetat	$69,42 \pm 0,55$	
		<i>n</i> -Heksan	$23,21 \pm 0,34$	

4.4 UHPLC-DAD-MS/MS analiza sistema UE/aEtOH i UE/aPPG

Nakon optimizacije, ponovo je vršena ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz nadzemnih delova kičice pomoću sistema UE/aEtOH pod optimalnim uslovima: solvomodul $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 37% (v/v) EtOH, na temperaturi ekstrakcije 56°C i vremenu ekstrakcije 20 min, odnosno pomoću sistema UE/aPPG pod optimalnim uslovima: solvomodul $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 38% (v/v) PPG, na temperaturi ekstrakcije 49°C i vremenu ekstrakcije 22 min. Identifikacija polifenolnih jedinjenja u ekstraktima *C. erythraea*, izvršena je pomoću UHPLC-DAD-MS/MS analize. UHPLC hromatogrami ekstrakata dobijenih pri optimalnim uslovima pomoću sistema UE/aEtOH i UE/aPPG prikazani su na slici 23, dok je lista detektovanih jedinjenja prikazana u tabeli 14 (Nikolić *i sar.*, 2023). UHPLC-DAD-MS/MS analiza je pokazala da oba ekstrakta sadrže organske kiseline i njihove derivate, flavanole, ksantone i sekoiridoidne glikozide. Kvalitativni sastav ekstrakata se razlikovao; od ukupno 47 jedinjenja, 42 i 45 su detektovana u ekstraktima dobijenim pomoću UE/aEtOH i UE/aPPG sistema, respektivno (tabela 14).

Derivati sekoiridoidnih glikozida, genipozid, sekoksiloganin i derivat sverozida 2 prisutni su samo u UE/aPPG ekstraktu. Genipozid sa molekularnim jonom $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 433 i jonima na m/z 387, 225(100%) u MS/MS spektru, detektovan je kao pik br. 16 na UHPLC hromatogramu (tabela 14, slika 23b). Sekoksiloganin sa molekularnim jonom $[\text{M}+\text{H}]^-$ na m/z 403 i jonima na m/z 371(100%), 227, 179, 165, 121 u MS/MS spektru, detektovan je kao pik br. 20 na UHPLC hromatogramu (tabela 14, slika 23b). Derivat sverozida 2 sa molekularnim jonom $[\text{M}+\text{H}]^-$ na m/z 389 i jonima na m/z 357(100%), 179, 135 u MS/MS spektru, detektovan je kao pik br. 38 na UHPLC hromatogramu (tabela 14, slika 23b). Odgovarajući MS/MS spektari ovih jedinjenja prikazani su na slikama 24a – 24c (Božunović *i sar.*, 2018; Li *i sar.*, 2016; Nikolić *i sar.*, 2023). U UE/aPPG ekstraktu, derivat kafeinske kiseline i kaempferol-ramnozid detektovani su u negativnom jonizacionom modu na m/z 237, 431 respektivno (pikovi br. 22, 37, tabela 14). Odgovarajući MS/MS i UV/VIS spektri ovih jedinjenja prikazani su na slikama 25a i 25b (Nikolić *i sar.*, 2022).

Sa druge strane, izomer 1 dihidroksi-tetrametoksi-ksantona i miricetin-arabinoza ili ksiloizid prisutni su samo u UE/aEtOH ekstraktu. Izomer 1 dihidroksi-tetrametoksi-ksantona sa molekularnim jonom $[\text{M}-\text{H}]^+$ na m/z 349 i jonima na m/z 334(100%), 319, 301 u MS/MS spektru, je detektovan kao pik br. 32 na UHPLC hromatogramu (tabela 14, slika 23a). Odgovarajući MS/MS i UV/VIS spektri ovog jedinjenja prikazani su na slici 25c. Miricetin-arabinoza (ksiloizid) sa molekularnim jonom $[\text{M}+\text{H}]^-$ na m/z 449 je detektovan kao pik br. 21 na UHPLC hromatogramu (tabela 14, slika 23a) (Nikolić *i sar.*, 2023).



Slika 23 UHPLC hromatogram UE/aEtOH (a) i UE/aPPG (b) ekstrakata procenjen iz DAD signala na $\lambda_{\text{max}} = 320$ nm

Tabela 14 Lista detektovanih jedinjenja u ekstraktima dobijenim pod optimalnim uslovima korišćenjem UE/aEtOH i UE/aPPG sistema

Pik Br.	t_R , min	λ_{max} , nm	Molekularni jon [M-H] ⁻ / ^a [M+H] ⁺ m/z	MS/MS fragmentni joni	Identifikovano jedinjenje/ Literatura	Prisustvo UE/ aEtOH	UE/a PPG
1	0,90	-	191	173, 111(100%), 85	Limunska kiselina (standard)	+	+
2	2,28	-	353	191(100%), 179, 135	3-O-Kafeoilhinska kiselina (standard)	+	+
3	2,75	297	^a 199	^a 155(100%)	^b Siringinska kiselina	+	+
4	3,33	-	^a 199	^a 155(100%)	^b Hidroksi-dimetoksibenzoeva kiselina	+	+
5	3,50	-	407	179(100%), 161, 143, 131	Neidentifikovano jedinjenje	+	+
6	5,03	329	407	361, 343, 179(100%), 161	Neidentifikovano jedinjenje	+	+
7	5,10	331	581	-	Karboksil derivat <i>p</i> -kumaroil-sekologanozida, izomer 1 (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
8	5,28	328	353	191(100%)	5-O-kafeoilhinska kiselina (standard)	+	+
9	5,53	328 300sh	325	-	Hidroksi-metoksi-cinamat derivat ^c (MB: KO001109)	+	+
10	5,63	-	581	535(100%), 341, 179, 151	Karboksil derivat <i>p</i> -kumaroil-sekologanozida, izomer 2 (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
11	5,65	304	353	-	4-O-Kafeoilhinska kiselina (Clifford <i>i sar.</i> , 2003)	+	+
12	5,99	242	581	535(100%), 341	Karboksil derivat <i>p</i> -kumaroil-sekologanozida, izomer 3 (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
13	6,01	-	419	355,179(100%), 161, 143	Neidentifikovano jedinjenje	+	+
14	6,24	-	581	535(100%), 341	Karboksil derivat <i>p</i> -kumaroil-sekologanozida, izomer 4 (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
15	6,40	232	389	345(100%), 209, 165, 121	Sekologanozid (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	+
16	6,52	-	^d 433	387, 225(100%)	Genipozid (Li <i>i sar.</i> , 2016)	-	+
17	6,66	248	^a 359	^a 197(100%), 179, 127	Sverozid (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	+
18	6,68	248	403	357(100%), 195, 179, 161, 151	Sverozid derivat 1 (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
19	7,05	346	885	739(100%)	Kaempferol-glikozid derivat (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
20	7,85	320	403	371(100%), 227, 179, 165, 121	^b Sekoksiloganin	-	+
21	8,24	375	449	431, 316(100%)	Miricetin-arabinozid ili ksiloizid ^c (MB:PR100974)	+	-
22	8,24	319	237	179, 161(100%), 135	Derivat kafeinske kiseline ^c (MB:KO000511)	-	+
23	8,69	-	463	-	Kvercetin-3-O-galaktozid (standard)	+	+
24	8,83	-	463	-	Izokvercitrin (standard)	+	+
25	8,84	365	609	301(100%), 255	Rutin (standard)	+	+
26	9,19	351	433	300(100%)/301, 179	Kvercetin-arabinozid ili ksiloizid ^c (MB:PR100977)	+	+
27	9,76	-	447	301(100%), 285	Kvercetin-ramnoizid ^c (MB: PR100993)	+	+

^aVrednosti dobijene pozitivnom ESI-MS analizom; ^b<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; ^c<https://massbank.eu/>; ^d[M-H+HCOOH]⁻.

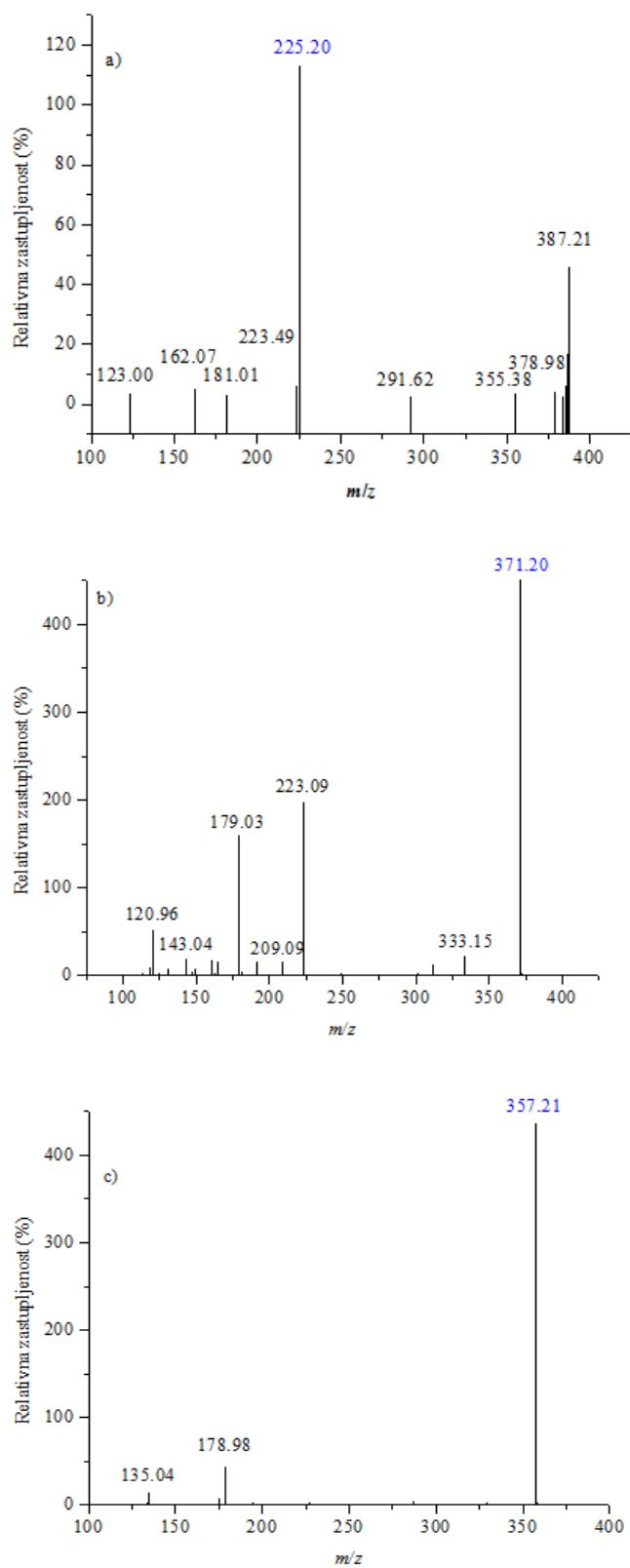
Tabela 14 nastavak

Pik Br.	t_R , min	λ_{max} , nm	Molekularni jon [M-H] ⁻ / ^a [M+H] ⁺ m/z	MS/MS fragmentni joni	Identifikovano jedinjenje/ Literatura	Prisustvo	
						UE/ aEtOH	UE/ aPPG
28	10,27	336	551	507(100%), 489, 389, 220	Kafeoil- <i>O</i> -sekologanozid, izomer (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	+
29	10,73	-	551	389, 357(100%), 161	Genciozid, izomer 1 (Aberham <i>i sar.</i> , 2007)	+	+
30	10,81	317	885	739(100%)	Kaempferol-glikozid derivat (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
31	11,09	321	551	357(100%)	Genciozid, izomer 2 (Aberham <i>i sar.</i> , 2007)	+	+
32	11,09	324	^a 349	^a 334(100%), 319, 301	Dihidroksi-tetrametoksi-ksanton, izomer 1 (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	-
33	11,30	329	551	389, 357(100%), 329, 179	Genciozid, izomer 3 (Aberham <i>i sar.</i> , 2007)	+	+
34	11,57	309	^a 349	^a 334(100%), 319, 301	Dihidroksi-tetrametoksi-ksanton, izomer 2 (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	+
35	11,60	323	885	739(100%)	Kaempferol-glikozid derivat (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
36	11,78	375	337	257(100%)	Neidentifikovano jedinjenje	+	+
37	11,80	370	431	285(100%), 257, 151	Kaempferol-ramnozid (^c PR100970)	-	+
38	11,87	-	389	357(100%), 179, 135	Sverozid derivat 2 (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	-	+
39	12,19	332	273	258(100%)	Trihidroksi-monometoksi-ksanton, izomer 1 (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
40	12,52	314	273	258(100%)	Trihidroksi-monometoksi-ksanton, izomer 2 (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	+
41	12,73	315	287	272(100%)/273	Dihidroksi-dimetoksi-ksanton, izomer 1 (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	+
42	13,56	312	273	258(100%)	Trihidroksi-monometoksi-ksanton, izomer 3 (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	+
43	13,63	321	287	272(100%)	Dihidroksi-dimetoksi-ksanton, izomer 2 (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	+
44	14,05	-	^a 303	^a 288(100%), 271, 227	Monohidroksi-trimetoksi-ksanton (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	+
45	13,99	-	303	288(100%), 273	Trihidroksi-dimetoksi-ksanton (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
46	14,38	315	333	318(100%), 303	Trihidroksi-trimetoksi-ksanton (Božunović <i>i sar.</i> , 2018)	+	+
47	14,94	309	^a 349	^a 334(100%), 319, 301	Dihidroksi-tetrametoksi-ksanton, izomer 3 (Guedes <i>i sar.</i> , 2019)	+	+

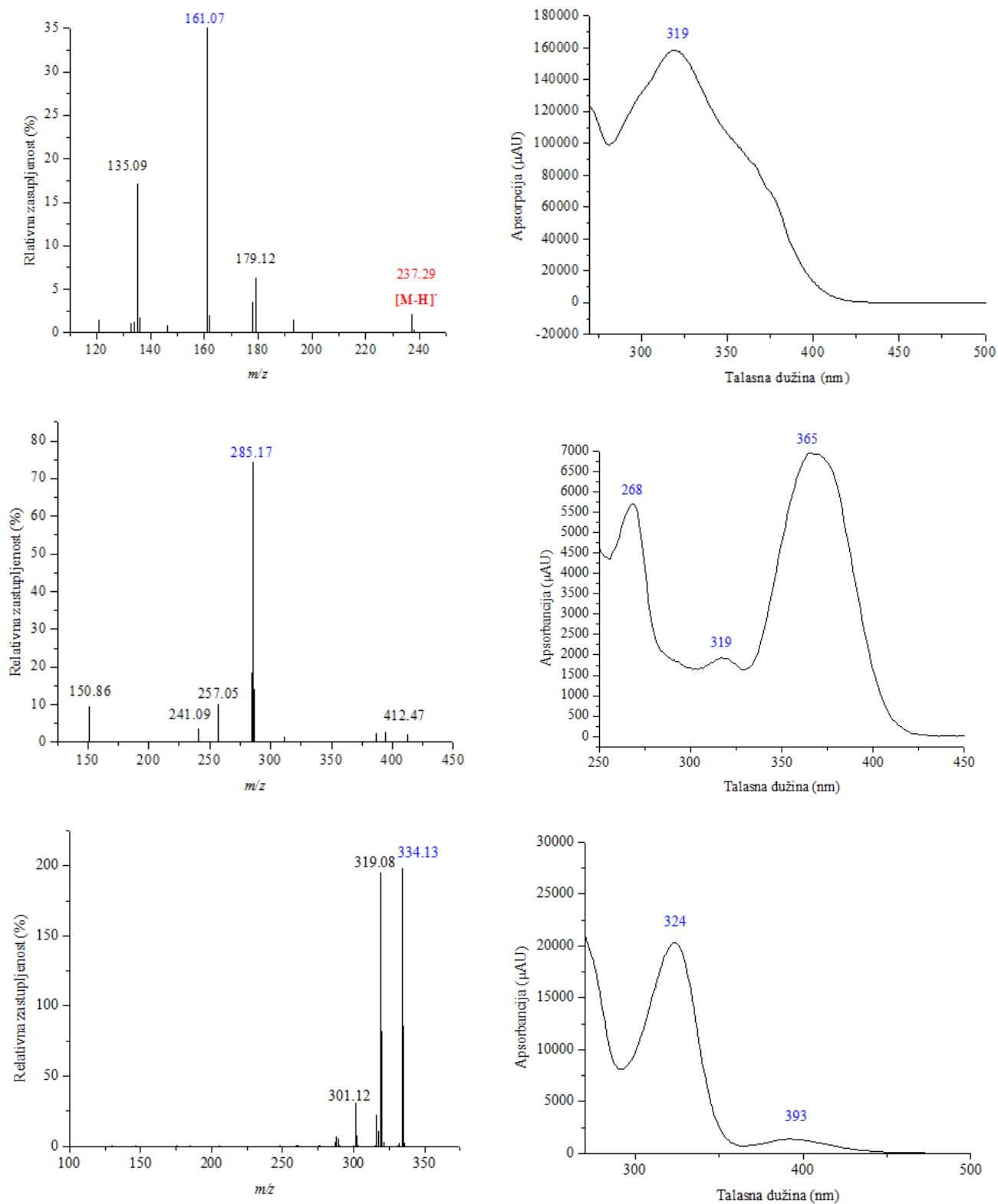
^aVrednosti dobijene pozitivnom ESI-MS analizom; ^b<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>; ^c<https://massbank.eu>; ^d[M-H+HCOOH]⁻.

Bioaktivna jedinjenja prisutna u ovim ekstraktima pokazuju brojna farmakološka dejstva. Kafeoilhininske kiseline su antiinflamatorni, antioksidativni, antimikrobni i neuroprotektivni agensi (Magaña *i sar.*, 2021), posebno 5-O-kafeoilhininska kiselina (Bajko *i sar.*, 2016), kao i siringinska kiselina, koja pored navedenih poseduje i hepatoprotektivno dejstvo (Srinivasulu *i sar.*, 2018). Flavanolli su moćni antioksidansi, dok su ksantoni i njihovi derivati antiinflamatorni, antioksidativni i antikancerogeni agensi (Guedes *i sar.*, 2019; Huang *i sar.*, 2021). Sekoiridoidni glikozidi značajno utiču na medicinsku vrednost proizvoda dobijenih iz kičice (Pataczek *i sar.*, 2017). Sverozid pokazuje alergoprotektivnu (Oku *i sar.*, 2011), citoprotektivnu (Oztürk *i sar.*, 2006), kardioprotektivnu (Li *i sar.*, 2021), antimikrobnu i hepatoprotektivnu aktivnost (Jeong *i sar.*, 2015). Sekoksiloganin, detektovan samo u UE/aPPG ekstraktu, takođe pokazuje alergoprotektivnu aktivnost (Oku *i sar.*, 2011). Genipozid, prisutan samo u UE/aPPG ekstraktu, deluje kao antidijabetik, poseduje antiinflamatornu, antitrombocitnu, antikancerogenu, antidepresivnu, anti-alergijsku, imuno-regulatornu, kardioprotektivnu, neuroprotektivnu, hepatoprotektivnu, analgetičku i antioksidativnu aktivnost (Shan *i sar.*, 2017; Zhou *i sar.*, 2019).

Ekstrakti dobijeni UE/aEtOH i UE/aPPG sadrže veću raznolikost bioaktivnih jedinjenja (42 jedinjenja u UE/aEtOH, 45 jedinjenja u UE/aPPG) nego infuzija (32 jedinjenja). Razlog za ovo može biti veća sposobnost EtOH i PPG da UE ekstrahuju bioaktivna jedinjenja u poređenju sa vodom korišćenom za infuziju. Zahvaljujući širokom spektru identifikovanih jedinjenja, ekstrakti UE/aEtOH i UE/aPPG se mogu primenjivati u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, kao prirodne komponente, dodaci i konzervansi u različitim proizvodima. Infuzija, s druge strane, može biti lakša za pripremu i koristi se kao prirodni napitak koji sadrži antioksidativna i antiinflamatorna jedinjenja, što je čini pogodnom za svakodnevnu upotrebu radi poboljšanja zdravlja.



Slika 24 MS/MS spektri genipozida (a), sekoksiloganina (b) i sverozid derivata 2 (c) pronadenih samo u UE/aPPG ekstraktu



Slika 25 MS/MS (levo) i UV/VIS (desno) spektri derivata kafeinske kiseline (a), kaempferol-ramnozida (b) i dihidroksi-tetrametoksi-ksantona, izomer 1 (c)

4.5 Mineralni sastav UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta kičice

Sadržaj minerala je veoma važan pri upotrebi biljnog materijala u proizvodnji tradicionalnih lekova i biljnih ekstrakata (Mihaljev *i sar.*, 2014), znajući da su mikro- i makroelementi od suštinskog značaja za održavanje normalnih fizioloških funkcija i da imaju različite metaboličke uloge (Veljković i Vučković 2010). Ekstrakti *C. erythraea* su bogat izvor makro- i mikroelemenata, pre svega K, Ca, Mg, P, Na, Zn, Si, S i Fe. U disertaciji, određivana je koncentracija Ag, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn, Si, P i S u dva različita ekstrakta *C. erythraea* (UE/aEtOH i UE/aPPG). Mineralni sadržaj *C. erythraea* ekstrakta analiziran je ICP-OES metodom, a rezultati su prikazani u tabeli 15 (Nikolić *i sar.*, 2023). Oni pokazuju da najveći udeo minerala u ekstraktima *C. erythraea* čine esencijalni minerali, čiji sastav opada u nizu $\text{Ca} > \text{K} > \text{P} > \text{Mg} > \text{Na}$. Iz grupe makroelemenata (K, Ca, Mg, i Na), najviši sadržaj Ca ($852,95 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) bio je u UE/aPPG ekstraktu, dok je UE/aEtOH ekstrakt sadržao samo $3,625 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ Ca. Koncentracija Mg ($68,85 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) bila je najveća u UE/aPPG ekstraktu, dok je UE/aEtOH ekstrakt sadržao $25,65 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ Mg. Najveće koncentracije makroelemenata, $852,95 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ Ca i $68,85 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ Mg, prisutne su u UE/aPPG ekstraktu, dok su koncentracije S ($55,825 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i P ($322,55 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) veće u UE/aEtOH ekstraktu. Koncentracija K ($270,475 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ u UE/aPPG i $461,625 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ u UE/aEtOH ekstraktu) je najveća u svim analiziranim uzorcima. Rezultati su pokazali da su esencijalni minerali najzastupljeniji u UE/aPPG ekstraktu (Nikolić *i sar.*, 2023).

Od mikroelemenata je identifikovano šest (Fe, Si, Mn, B, Zn i Cu). Najčešći mikroelement je Fe ($144,675 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i detektovan je u UE/aPPG ekstraktu. Teški metali, kao što su Cu, Zn, Mn i Fe pripadaju grupi mikroelemenata u tragovima, jer su toksični u višim koncentracijama, a u nižim koncentracijama neophodni su za rast i razvoj živih organizama (Petrović *i sar.*, 2020). Od esencijalnih minerala, Zn je detektovan u tragovima u svim analiziranim uzorcima *C. erythraea*, sa sadržajem koji se kretao u opsegu od $1,275 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ u UE/aEtOH do $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ u UE/aPPG ekstraktu.

Prisustvo Cu u uzorcima *C. erythraea* takođe je detektovano ($0,425 - 0,725 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). B je detektovan samo u UE/aEtOH ekstraktu u koncentraciji od $2,475 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Dobijene vrednosti sadržaja Mn bile su u rasponu od $0,175 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ u UE/aEtOH do $6,675 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ u UE/aPPG ekstraktu. U UE/aPPG ekstraktu prisutan je i Sr u koncentraciji $9,775 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, koji u ljudskom organizmu zamenjuje Ca zbog sličnih karakteristika i može dovesti do hipokalcemiju. Stabilni oblici Sr mogu biti korisni i pokazali su se kao pomoć u rastu kostiju i povećanju gustine kostiju. Pb je detektovan u malim količinama u UE/aPPG ekstraktu u koncentraciji $0,45 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Koncentracija Pb strogo je kontrolisana, a maksimalna dozvoljena količina Pb je $1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (Serbian regulations, 1992). Ag, Cd, Co, Ni i Tl nisu detektovani u uzorcima. Može se zaključiti da analizirani ekstrakti *C. erythraea* nisu opasni po ljudsko zdravlje. Sadržaji minerala ukazuje na kvalitet ekstrakta *C. erythraea* poreklom iz Srbije.

Tabela 15 Rezultati analize UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta. Sadržaj elemenata je prikazan u $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Naziv elementa	Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) UE/aEtOH	Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) UE/aPPG	Naziv elementa	Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) UE/aEtOH	Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) UE/aPPG
Ag	0	0	Mn	0,175	6,675
B	2,475	0	Na	47,3	36,875
Ca	3,625	852,95	Ni	0	0
Cd, Co	0	0	Pb	0	0,45
Cr	0	0,05	Sr	0,675	9,775
Cu	0,425	0,725	Tl	0	0
Fe	0,1	144,675	Zn	1,275	2
K	461,625	270,475	Si	2,375	14,35
Li	0,125	0,25	P	322,55	202,875
Mg	25,65	68,85	S	55,825	52,975

Zahvaljujući prisustvu minerala, kičica ima remineralizujuće dejstvo i njena upotreba može biti korisna kod osteoartritisa i osteoporoze. Ca igra važnu ulogu u mnogim regulatornim procesima, kao što je održavanje normalnog srčanog ritma, lučenje hormona, kontrakcija mišića i aktivacija enzima. Nedostatak Ca u telu može dovesti do osteoporoze, bolesti koja se uglavnom javlja zbog nedovoljnog unosa Ca u mladosti (Zamberlin *i sar.*, 2012). P, Mn i Sr su takođe veoma važne strukturne komponente kostiju, povećavaju gustinu kostiju i smanjuju prelome (Meunier *i sar.*, 2004; Oliveira *i sar.*, 2012; Zamberlin *i sar.*, 2012). B je esencijalni nutrijent za apsorpciju Ca, Mg i P. B je važan za održavanje mineralne gustine kostiju i ima značajan uticaj na metaboličke procese, kao što su artritis i osteoporoza (Devirian & Volpe, 2003). K je važan za održavanje acido-bazne ravnoteže i osmotskog pritiska u telu. Na zajedno sa K učestvuje u prenosu nervnih impulsa, održava tonus mišića i utiče na propustljivost membrane (Barker & Pilbeam, 2015; Veljković & Vučković, 2010). Unos Mg pozitivno utiče na eklampsiju i preeklampsiju, aritmiju, astmu, migrenu i sprečava osteoporozu (Guerrera *i sar.*, 2009).

Zn je esencijalni mikroelement za normalno funkcionisanje mozga, kao i za lečenje mentalnih poremećaja. Zn ima antiaritmično, antiinflamatorno, antivirusno i imunostimulativno dejstvo (Veljković & Vučković, 2010). Fe je važan element u delovanju nekih enzima koji proizvode energiju, a kao posledica nedostatka Fe nastaju Mikrocitne i hipohromne anemije (Velimirović *i sar.*, 2013). Cu je važan element za proizvodnju hemoglobina i njegov nedostatak može izazvati anemiju, depigmentaciju kose i deformitete kostiju (Zamberlin *i sar.*, 2012).

Poređenjem mineralnog sastava UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakata (tabela 15) i infuzije (tabela 7) *C. erythraea*, uočavaju se značajne razlike kada su u pitanju i mikro- i makroelementi. Iako infuzija sadrži esencijalne minerale poput K, Na, Mg, P i S, ona ne sadrži Ca i Fe, koji su prisutni u znatno većim koncentracijama u ekstraktima, naročito onog dobijenog ekstrakcijom UE/aPPG sistema. Kod infuzije su primetne niže koncentracije mikroelemenata (Zn i Cu), što kod ekstrakata nije slučaj. Naročito je prisutna visoka koncentracija Ca, Mg i Fe kod UE/aPPG ekstrakta ($852,95 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $68,85 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, i $144,675 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, respektivno). Ekstrakt UE/aEtOH, ne samo što sadrži najveće koncentracije S i P, već jedini u sastavu ima B. On značajno doprinosi apsorpciji Ca, Mg i P, korisnih za zdravlje kostiju, ukoliko je naravno prisutan u dozvoljenim koncentracijama, a što je ovde i slučaj.

Rezultati ove analize ukazuju da ekstrakti sadrže veće količine esencijalnih minerala i imaju veći nutritivni potencijal u poređenju sa infuzijom, što ih čini pogodnijim za primenu u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima.

4.6 Razlike u efikasnosti ekstrakcije između UE/aEtOH i UE/aPPG sistema

Ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala je proces koji se odvija na površini između čvrste i tečne faze i obuhvata prenos mase iz biljnog materijala u rastvarač, rastvaranje bioaktivnih jedinjenja u odabranom rastvaraču ili sistemu rastvarača (zbog sličnog polariteta) i hemijske interakcije između bioaktivnih jedinjenja i odabranog rastvarača ili sistema rastvarača (Vasylijev *i sar.*, 2022). Faktori koji utiču na efikasnost ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja su hemijski sastav prilagođenog sistema rastvarača i hemijska struktura ciljanih bioaktivnih jedinjenja (Ivanović *i sar.*, 2021). Najprikladniji rastvarač ili sistem rastvarača se bira na osnovu specifičnog slučaja.

Mehanizam za poboljšanje ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz različitih biljnih materijala je komplikovan i uključuje višestruke fizičko-hemijske procese. Veći stepen ekstrakcije bioaktivnih fenolnih jedinjenja sa sistemom rastvarača je u korelaciji sa H-vezujućim interakcijama koje se odvijaju između molekula sistema rastvarača i ciljanih bioaktivnih jedinjenja (Vasylijev *i sar.*, 2022).

Što su specifičnije hemijske grupe prisutne u komponentama sistema rastvarača, to je veći stepen H-vezivnih interakcija.

Difuzija rastvarača u biljni materijal se povećava sa višom temperaturom i nižom viskoznošću rastvarača. Na 25 °C, EtOH i PPG imaju dinamičku viskoznost 1,074 mPa·s i 40,4 mPa·s, respektivno, što je više od vrednosti za vodu (0,89 mPa·s) (Lide, 2003).

Izračunata dinamička viskoznost za optimalne vodene sisteme sa 37% (v/v) EtOH i 38% (v/v) PPG na 25 °C iznosila je 0,9141 mPa·s i 1,0206 mPa·s, odnosno 2,70% i 14,68% više u odnosu na vodu, respektivno. Na prvi pogled, mešanje PPG sa vodom bi negativno uticalo na difuziju zbog povećanja viskoznosti smeše. S druge strane, budući da EtOH i PPG imaju slične dielektrične konstante (25,3 pri 20 °C za EtOH i 27,5 pri 30 °C za PPG) (Lide, 2003), oba rastvarača će smanjiti dielektričnu konstantu čiste vode (80,1 pri 20 °C). Dakle, vodene EtOH i PPG smeše će biti manje polarne i efikasnije za ekstrakciju bioaktivnih polifenolnih jedinjenja iz biljnog materijala (Karakashov *i sar.*, 2015).

4.7 Evaluacija i upoređivanje predloženih metodologija UE

Prilikom projektovanja novog postupka za buduću primenu na industrijskom nivou, posebno za proizvodnju farmaceutskih, kozmetičkih i prehrambenih proizvoda, potrebno je odrediti i troškove proizvodnje i njen uticaj na životnu sredinu. Stoga se energetske potrebe i uticaj na životnu sredinu predloženih postupaka sa UE/aPPG i UE/aEtOH sistemima upoređuju prema specifičnim faktorima, navedenim u tabeli 16 (Nikolić *i sar.*, 2023).

Zbog sličnog vremena ekstrakcije, razlika od 0,005 kW·h u ukupnoj potrošnji električne energije može se smatrati zanemarljivom. Što se tiče uticaja na životnu sredinu, izračunata količina emitovanog CO₂ u atmosferi bila je niska za oba postupka. Pored vremena, energetskog i ekološkog uticaja predloženih procesa, priroda korišćenih rastvarača takođe doprinosi smanjenju troškova predloženih tehnologija ekstrakcije. Upotreba destilovane vode umesto dejonizovane vode dodatno smanjuje troškove procesa. UE/aEtOH sistem zahteva veću količinu vode i nešto višu radnu temperaturu. Međutim, EtOH i PPG su jeftini, netoksični, ekološki prihvatljivi i biorazgradivi rastvarači koji se često koriste u različitim farmaceutskim, kozmetičkim i prehrambenim proizvodima. Njihova upotreba ne zahteva dodatni proces separacije od čvrste matrice pre dalje primene, čime se doprinosi uštedi energije nakon skaliranja procesa (Nikolić *i sar.*, 2023).

Oba predložena postupka UE su brze, efikasne, čiste i ekološki prihvatljive tehnologije za proizvodnju ekstrakata iz nadzemnih delova kičice, koji sadrže vredna bioaktivna jedinjenja.

Nakon ekstrakcije, čvrsti biljni ostaci bogati nerastvorljivim celuloznim jedinjenjima mogu biti reciklirani i valorizovani kao prekursori biomase za proizvodnju energije, bioetanola, bioloških derivata i aditiva u stočnoj hrani (Rombaut *i sar.*, 2014), čime se uspešno industrijalizuje tehnološki proces i povećava profit.

Tabela 16 Poređenje predloženih metodologija UE

Metoda	UE/aPPG	UE/aEtOH
Efektivna električna snaga (W)	150	150
Temperatura ekstrakcije (°C)	49	56
Toplotna provodljivost ($\text{kW} \cdot \text{K}^{-1}$)	$4,656 \cdot 10^{-4}$	$4,557 \cdot 10^{-4}$
Solvomodul ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	15	15
Potrošnja vremena (min)	22	20
Potrošnja električne energije ($\text{kW} \cdot \text{h}$)	0,055	0,05
Toplotni kapacitet ($\text{kW} \cdot \text{h} \cdot \text{K}^{-1}$)	$1,707 \cdot 10^{-4}$	$1,519 \cdot 10^{-4}$
Masa sistema rastvarača (g) po g p.m.	15,189	13,814
Masa organskog rastvarača (g) po g p.m.	5,906	4,381
Masa vode (g) po g p.m.	9,283	9,433
Specifični toplotni kapacitet ($\text{kW} \cdot \text{h} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	$11,238 \cdot 10^{-3}$	$10,996 \cdot 10^{-3}$
Uticaj na životnu sredinu, E_{CO_2} (g CO_2)	44	40
SUP u ekstraktu (mg GKE/g s.m.)	41,6	41,3
SUP u ekstraktu po $\text{kW} \cdot \text{h}$ (mg GKE/g s.m./ $\text{kW} \cdot \text{h}$)	756,37	826
SUP u ekstraktu po $\text{kW} \cdot \text{h} \cdot \text{K}$ (mg GKE/g s.m./ $\text{kW} \cdot \text{h} \cdot \text{K}$)	2,35	2,51

Trebalo bi imati na umu da EtOH ima neke nedostatke u vezi sa procesom proizvodnje (isparavanje i zapaljivost pri višim temperaturama), dok njegovo prisutvo u finalnim industrijskim proizvodima može izazvati reakcije iritacije (očne, dermalne, oralne) kod nekih potrošača. Osim toga, neki potrošači odbijaju da konzumiraju proizvode koji sadrže EtOH iz etičkih, verskih i medicinskih razloga. Konkretno, EtOH proizvodi se ne preporučuju i čak su zabranjeni nekim pacijentima zbog postojećih medicinskih stanja (npr. bolesti jetre, pankreasa, psihičkih i dermalnih poremećaja) i interakcija sa različitim propisanim lekovima (Nikolić *i sar.*, 2023).

Pošto je sistem UE/aPPG zahtevao nižu temperaturu i rezultirao dobijanjem ekstrakta sa višim SUP i većom raznovrsnošću jedinjenja, ovaj postupak se više preporučuje za buduću industrijsku upotrebu (Nikolić *i sar.*, 2023).

4.8 Antimikrobna aktivnost UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta

Antimikrobna aktivnost UE/aPPG i UE/aEtOH ekstrakta nadzemnih delova *C. erythraea* analizirana je na sojevima gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC, *Salmonella enterica* ATCC 14028), gram-pozitivnih bakterija (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), i jedne vrste gljivica *Candida albicans* ATCC 10231. Rezultati antimikrobne aktivnosti ekstrakata na sojevima odabranih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, kao i gljivicama prikazani su u tabeli 17. Rezultati ukazuju na manji antibakterijski potencijal analiziranih ekstrakata u odnosu na antifungalnu aktivnost ekstrakata. Najosetljivija bakterijska vrsta je *P. aeruginosa* ATCC 27853 na UE/aPPG ekstrakt sa MIK od 2,5 mg·cm⁻³. UE/aPPG ekstrakt *C. erythraea* sa MIK od 1,25 mg·cm⁻³ deluje antifungalno protiv *C. albicans*, dok UE/aEtOH ekstrakt ima jače antifungalno dejstvo sa koncentracijom od 0,625 mg·cm⁻³. Dobijeni rezultati se delimično poklapaju sa rezultatima drugih istraživača. Metanolni ekstrakti nadzemnih delova *C. erythraea* u koncentraciji od 0,10 mg·cm⁻³ do 0,40 mg·cm⁻³ pokazuje snažno antifungalno dejstvo prema kvascu *C. albicans* i antibakterijsko dejstvo u odnosu na *E. coli* (MIK i MBK od 0,10 mg·cm⁻³ do 0,20 mg·cm⁻³) (Šiler *i sar.*, 2014).

Tabela 17 Rezultati antimikrobnog testiranja ekstrakata UE/aPPG i UE/aEtOH

Testirani ekstrakti	UE/aPPG 10 mg·cm ⁻³		UE/aEtOH 10 mg·cm ⁻³	
	MIK*	MMK	MIK	MMK
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	5	>5	>5	>5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5	>5	>5	>5
<i>P. mirabilis</i> ATCC	5	5	>5	>5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2,5	>5	5	>5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5	5	>5	>5
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	>5	>5	>5	>5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,25	5	0,625	5

*MIK – minimalna inhibitorna koncentracija; MMK – minimalna mikrobicidna koncentracija

Inhibiciona aktivnost metanolnog, *n*-heksanskog ekstrakta i etil acetatnog ekstrakta *C. erythraea* sa severozapada Maroka, je značajna (zona inhibicije ≥ 14 mm) u odnosu na analizirane sojeve (*S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* i *P. aeruginosa*). Vrednosti MIK i MBK su u opsegu od $0,25 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ do $8,00 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, pri čemu je *E. coli* najotporniji soj u odnosu na sve analizirane bakterije, dok je *S. aureus* najosetljiviji na analizirane ekstrakte (Bouyahya i sar., 2017). S druge strane, nehidrolizovani i hidrolizovani metanolni ekstrakti *C. erythraea* pokazuju značajnu aktivnost prema testiranim bakterijama (*S. aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes* NCTC 7973, *Micrococcus flavus* ATCC 10240, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 35210, *S. typhimurium* ATCC 13311, *Enterobacter cloacae*) i gljivicama (*Aspergillus fumigatus* ATCC 9197, *A. versicolor* ATCC 11730, *A. ochraceus* ATCC 12066, *A. niger* ATCC 6275, *Trichoderma viride* IAM 5061, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839, *P. ochrochloron* ATCC 9112 i *P. verrucosum*). Aktivnost je približna onoj koju pokazuju komercijalni fungicidi (ketokonazol i bifonazol) i antibiotici (streptomycin i ampicilin). MIK vrednosti metanolnih ekstrakata *C. erythraea* su u opsegu od $0,125 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ do $0,300 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, dok je MBK u opsegu od $0,250 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ do $0,450 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ (Božunović i sar., 2018).

Vrednosti dobijene za aktivnost ovih ekstrakata su nešto bolje od rezultata koji su dobijeni za UE/aPPG i UE/aEtOH ekstrakt, ali su svakako sa aspekta „zelene“ hemije, mnogo povoljniji i bezbedniji. U svakom slučaju, dobijene MIK i MMK vrednosti, ukazuju i na to da *C. erythraea* može da podrži endogene odbrambene mehanizme i aktivno učestvuje u zaštiti ljudskog organizma od patogenih bakterija i gljivica.

4.9 Antiradikalska aktivnost UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta

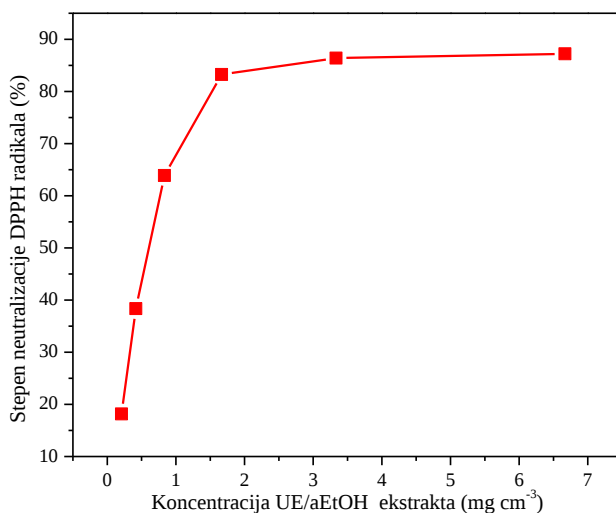
Ekstrakti nadzemnih delova *C. erythraea* pokazuju antioksidativnu aktivnost, koja je prvenstveno posledica prisustva flavonoida i fenola. Ove klase jedinjenja imaju sposobnost da doniraju atome vodonika, vrše neutralizaciju i sprečavaju proizvodnju novih slobodnih radikala, odlažu reakcije oksidativnog stresa, čime smanjuju rizik od razvoja degenerativnih bolesti i poboljšavaju opšte zdravlje organizma (Bouyahya i sar., 2017; Valentão i sar., 2003).

Antiradikalska aktivnost UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta nadzemnih delova *C. erythraea* i sintetičkog antioksidansa BHT određena je primenom DPPH testa. Zavisnost stepena neutralizacije DPPH radikala od koncentracije ekstrakata i BHT kao pozitivne kontrole prikazana je na slikama 26 – 28. Slike ilustruju neutralisanje DPPH radikala sa porastom koncentracije ekstrakata.

Koncentracija koja je neophodna za redukciju 50% od početne koncentracije DPPH radikala naziva se efektivna koncentracija (EC_{50}) (Brand-Williams *i sar.*, 1995). Recipročna vrednost efektivne koncentracije predstavlja antiradikalnu snagu (*antiradical power*) ($ARP=1/EC_{50}$) (Mishra *i sar.*, 2012). EC_{50} vrednosti oba ekstrakta i sintetskog antioksidansa BHT prikazani su u tabeli 18.

Tabela 18 EC_{50} vrednosti uzoraka UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta kičice dobijenih primenom DPPH testa

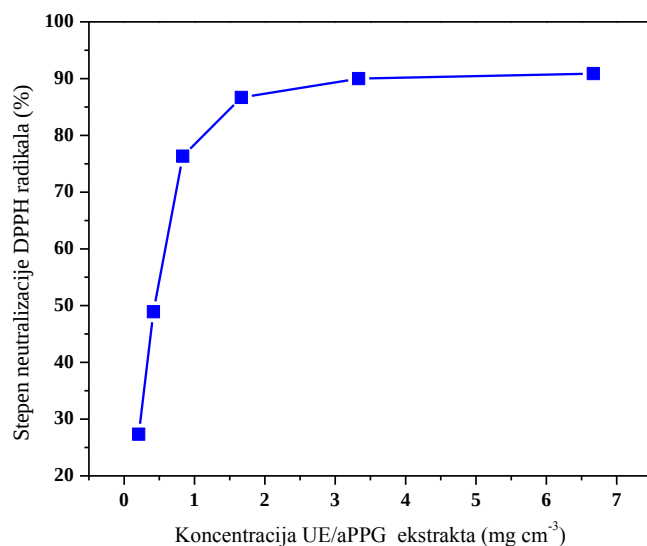
Uzorak	EC_{50} , $mg \cdot cm^{-3}$
UE/aEtOH ekstrakt	$0,61 \pm 0,001$
UE/aPPG ekstrakt	$0,43 \pm 0,061$
Sintetski antioksidans	
BHT	$0,32 \pm 0,022$



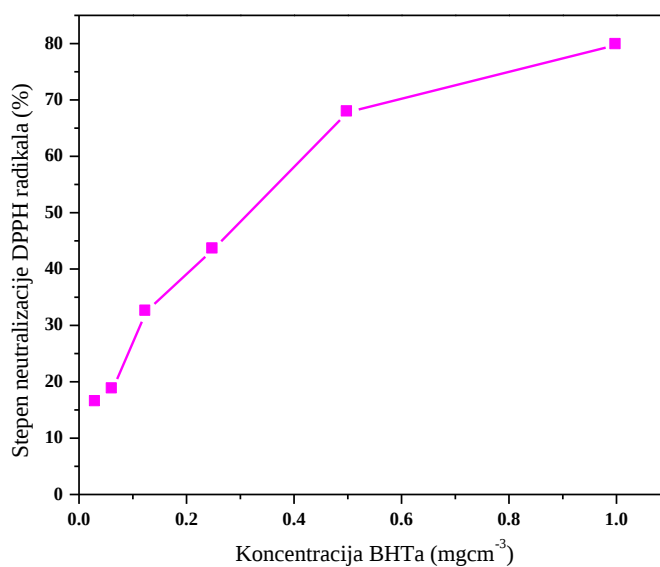
Slika 26 Zavisnost stepena neutralizacije DPPH radikala od koncentracije UE/aEtOH ekstrakta kičice

Na osnovu EC_{50} vrednosti, može se zaključiti da UE/aPPG ekstrakt ima bolju antiradikalnu aktivnost u odnosu na UE/aEtOH ekstrakt. Sintetsko jedinjenje BHT pokazalo je bolju antiradikalnu aktivnost od analiziranih uzoraka.

Trifunović-Momčilov *i sar.* (2019) testirali su potencijalnu antiradikalnu aktivnost metanolog ekstrakta *C. erythraea* na osnovu sposobnosti uklanjanja stabilnih DPPH radikala. Rezultati pokazuju da koncentracija metanolog ekstrakata od $IC_{50} = 0,65 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ sposobna da inhibira 50% početne koncentracije DPPH radikala.



Slika 27 Zavisnost stepena neutralizacije DPPH radikala od koncentracije UE/aPPG ekstrakta kičice



Slika 28 Zavisnost stepena neutralizacije DPPH radikala od koncentracije BHT

Merghem i Dahamna (2020) su određivali antiradikalnu aktivnost metanolnog i vodenog ekstrakta *C. erythraea*. Rezultati DPPH testa pokazali su snažnu antiradikalnu aktivnost sa vrlo sličnim IC_{50} za metanolni ($IC_{50} = 0,232 \pm 0,002 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) i vodeni ekstrakt ($IC_{50} = 0,208 \pm 0,002 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Iako je metanolni ekstrakt pokazao veću redukcionu sposobnost ($IC_{50} = 0,35 \pm 0,066 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) u poređenju sa vodenim ekstraktom ($IC_{50} = 1,31 \pm 0,047 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$), treba imati u vidu da je metanol toksičniji od vode, što može ograničiti njegovu primenu u određenim farmaceutskim ili prehrambenim proizvodima. Valentão *i sar.* (2001) su ukazali na efikasnu antiradikalnu aktivnost liofilizovane infuzije cvetnih vrhova biljke *C. erythraea*, koja je uspešno uklonila superoksidne jone ($O_2^{\bullet-}$), sa IC_{50} vrednošću $22,8 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Bouyahya *i sar.* (2017) istraživali su antiradikalnu aktivnost ekstrakata (metanolni, etanolni, *n*-heksanski i etil acetatni) *C. erythraea* primenom DPPH testa. Rezultati eksperimenta pokazuju da je *n*-heksanski ekstrakt ispoljio statistički značajnu sposobnost uklanjanja DPPH radikala, sa vrednošću IC_{50} od $49,54 \pm 2,43 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$. Sledeći po efikasnosti je metanolni ekstrakt sa IC_{50} vrednošću od $58,34 \pm 2,86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, dok su etil acetatni i etanolni ekstrakt ($IC_{50} = 382,25 \pm 5,59 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) pokazali nižu antiradikalnu aktivnost.

UE/aPPG ekstrakt je pokazao sličnu antiradikalnu aktivnost kao sintetski antioksidans, pa potencijalno može biti korišćen kao njegova zamena. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je EC_{50} vrednost ekstrakata veća od one određene za BHT, što ukazuje na to da ekstrakti imaju manju antiradikalnu aktivnost od sintetskog antioksidansa. Iako slabiji, antiradikalni potencijal nije zanemarljiv, tako da se može preporučiti konzumiranje pripremljenih ekstrakata u cilju smanjenja slobodnih radikala u organizmu, koji su odgovorni za mnoge bolesti kod ljudi.

4.10 Fotoliza UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta pod uticajem UV-A zračenja

UV zračenje predstavlja samo mali deo spektra elektromagnetnog zračenja i deli se na tri glavna tipa na osnovu talasnih dužina: UV-C (200 nm – 290 nm), UV-B (290 nm – 320 nm) i UV-A (320 nm – 400 nm). UV zračenje se smatra glavnim etiološkim faktorom za veliki broj slučajeva kancera kože, opekotina od sunca i oksidativnog stresa.

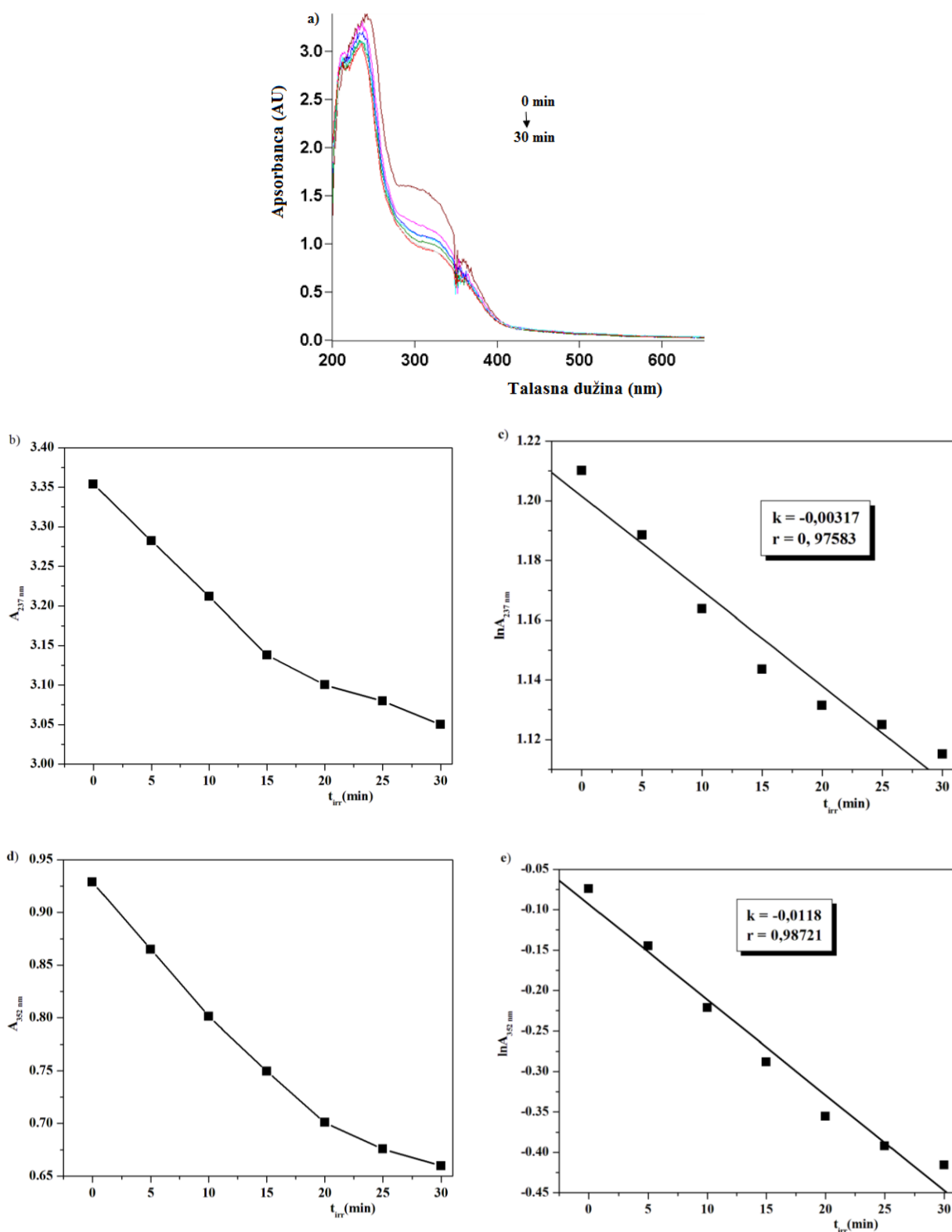
Hronično izlaganje ljudske kože sunčevom UV zračenju je ključni faktor odgovoran za fotostarenje. UV-A zračenje, talasne dužine $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm} - 400 \text{ nm}$, nanosi ozbiljna oštećenja ljudskoj koži. UV-A zračenje prodire dublje u dermis, izaziva proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika koje uzrokuju oksidativni stres, upalu i razgradnju kolagena i elastičnih vlakana kao i oštećenje DNK. Iz ovih razloga, uloga fotozaštite je od suštinskog značaja za sprečavanje kancera kože i drugih neželjenih efekata (Radice *i sar.*, 2016).

Antioksidativni efekat predstavlja ključni mehanizam fotoprotektivne aktivnosti biljnih ekstrakata, pri čemu fenoli, polifenoli i flavonoidi čine bogat izvor prirodnih antioksidanasa (Radice *i sar.*, 2016), i pokazali su se obećavajućim u ublažavanju štetnih efekata UV zračenja zahvaljujući njihovoj sposobnosti smanjenja oksidativnog stresa, modulacije inflamatornih procesa i prevencije oštećenja DNK (Shubayr, 2023). Formulacije sa antioksidativnim ekstraktima doprinose povećanoj fotoprotekciji *in vivo*, čime se pokazuje potencijalna efikasnost u zaštiti kože od UV zračenja (Michalak, 2022; Radice *i sar.*, 2016). Uprkos korisnim efektima na zdravlje kože i usporavanje procesa starenja, ovi biljni ekstrakti mogu takođe predstavljati rizike, posebno u pogledu njihove fotostabilnosti i potencijalne fototoksičnosti (Hoang *i sar.*, 2021).

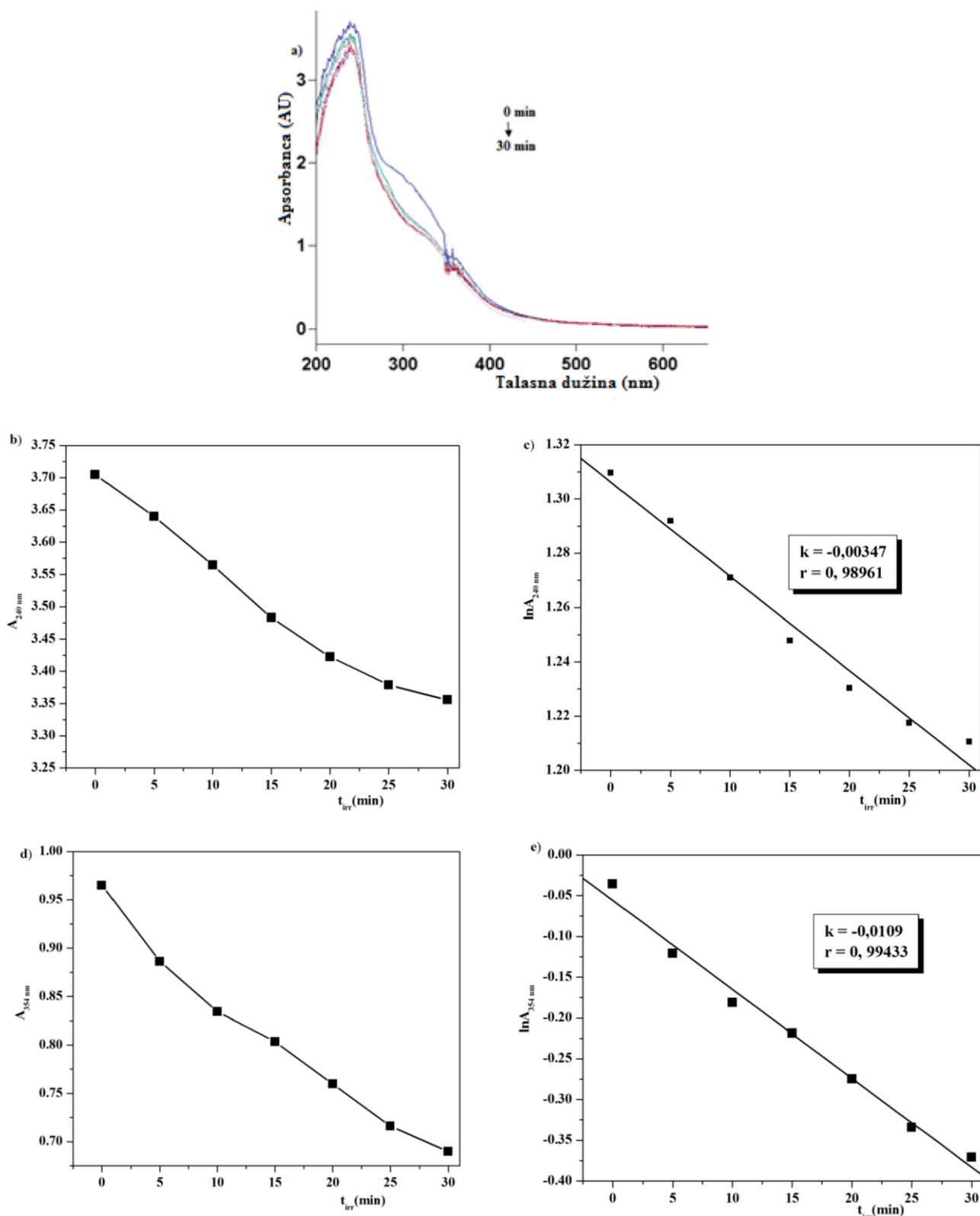
Fotostabilnost biljnih ekstrakata se odnosi na njihovu sposobnost da zadrže svoju hemijsku strukturu i aktivnost kada su izloženi svetlu, toploti, kiseoniku, pH vrednosti ili interakcijama sa drugim sastojcima. Fotostabilnost biljnih ekstrakata je važna za njihovu efikasnost i bezbednost, jer nestabilne supstance mogu izgubiti svoju aktivnost, generisati reaktivne vrste ili formirati toksična ili alergena jedinjenja. Fototoksičnost biljnih ekstrakata se odnosi na njihovu sposobnost da izazovu oštećenje kože kada su izloženi svetlu. Fototoksičnost se može manifestovati kao eritem, edem, stvaranje plikova, pigmentacija ili inflamacija (Shubayr, 2023).

Prirodni proizvodi igraju značajnu ulogu u fotoprotekciji, uz brojne studije koje potvrđuju njihovu efikasnost. Iako sunčevo zračenje ima pozitivne efekte na zdravlje, prekomerno izlaganje UV zracima može uzrokovati opekotine, starenje kože, oštećenje DNK i povećati rizik od karcinoma kože. Današnje formulacije za zaštitu od sunca zahtevaju kombinaciju apsorpcije UV zračenja, antioksidativnih svojstava i drugih zaštitnih mehanizama, uz nisku toksičnost. Brojni biljni ekstrakti pokazali su UV apsorpciju, antiinflamatorne i antioksidativne efekte, što ih čini perspektivnim za bezbednu fotoprotekciju (Radice *i sar.*, 2016).

UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakt nadzemnih delova *C. erythraea* su zračeni UV-A lampom, talasne dužine $\lambda_{\max} = 350$ nm. Ekstrakti su konstantno zračeni u odgovarajućim vremenskim intervalima, koji su definisani u odnosu na promenu apsorbancije. Promene apsorbancije u funkciji od vremena, na odgovarajućim talasnim dužinama i kinetička zavisnost $\ln A$ u funkciji od vremena zračenja data je na slikama 29 i 30, a vrednost konstante brzine degradacije uzoraka praćeno preko smanjenja maksimuma apsorbancije na talasnim dužinama $\lambda = 240$ nm i $\lambda = 354$ nm za UE/aEtOH, i $\lambda = 237$ nm i $\lambda = 352$ nm za UE/aPPG ekstrakt data je u tabeli 19.



Slika 29 a) Promena apsorpcionog spektra UE/aPPG ekstrakta kičice sa porastom vremena UV-A ozračivanja; b) Promena apsorbanije na talasnoj dužini 237 nm ($A_{237\text{ nm}}$); c) Kinetička zavisnost $\ln A$ u funkciji od vremena zračenja 237 nm ($A_{237\text{ nm}}$); d) Promena apsorbanije na talasnoj dužini 352 nm ($A_{352\text{ nm}}$) u zavisnosti od vremena UV-A ozračivanja (t_{irr}) i e) Kinetička zavisnost $\ln A$ u funkciji od vremena zračenja 352 nm ($A_{352\text{ nm}}$)



Slika 30 a) Promena apsorpcionog spektra UE/aEtOH ekstrakta kičice sa porastom vremena UV-A ozračivanja; b) Promena apsorbanije na talasnoj dužini 240 nm ($A_{240 \text{ nm}}$); c) Kinetička zavisnost $\ln A$ u funkciji od vremena zračenja 240 nm ($A_{240 \text{ nm}}$); d) Promena apsorbanije na talasnoj dužini 354 nm ($A_{354 \text{ nm}}$) u zavisnosti od vremena UV-A ozračivanja (t_{irr}) i e) Kinetička zavisnost $\ln A$ u funkciji od vremena zračenja 354 nm ($A_{354 \text{ nm}}$)

Tabela 19 Konstante brzine degradacije UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta praćene smanjenjem maksimuma apsorpcije na odgovarajućim talasnim dužinama

Ekstrakt	Talasna dužina (nm)	Konstanta brzine degradacije (min^{-1})	Faktor fitovanja R
UE/aEtOH	240	-0,00342	0,98961
	354	-0,0109	0,99433
UE/aPPG	237	-0,00317	0,97583
	352	-0,0118	0,98721

Promena apsorpcionog spektra UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta ukazuje na sličan mehanizam degradacije molekula tokom ozračivanja UV-A lampom, s obzirom da se kod oba ekstrakta vrši ireverzibilna degradacija indukovana UV-A svetlošću ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$) na šta ukazuje smanjenje apsorpcije sa maksimuma na $\lambda = 240 \text{ nm}$ i $\lambda = 354 \text{ nm}$ za UE/aEtOH, i $\lambda = 237 \text{ nm}$ i $\lambda = 352 \text{ nm}$ za UE/aPPG ekstrakt, što znači da svetlost ove talasne dužine narušava hromoforu odgovornu za apsorpciju u ovom delu UV spektra i dovodi do degradacije molekula.

Kako bi se uporedila stabilnost jedinjenja, izvršeno je linearno fitovanje zavisnosti $\ln A$ vrednosti ($\lambda = 240 \text{ nm}$ i $\lambda = 354 \text{ nm}$ za UE/aEtOH, i $\lambda = 237 \text{ nm}$ i $\lambda = 352 \text{ nm}$ za UE/aPPG ekstrakt) i vremena ozračivanja do 30 min. Veća konstanta brzine degradacije ukazuje na veću stabilnost uzorka i sporiji proces degradacije. Iz ovoga se može zaključiti da oba ekstrakta pokazuju veću brzinu degradacije i stabilniji su na višim talasnim dužinama ($\lambda = 354 \text{ nm}$ za UE/aEtOH i $\lambda = 352 \text{ nm}$ za UE/aPPG).

UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakti *C. erythraea* pokazuju značajan potencijal kao sastojci u formulacijama za UV zaštitu kože. *C. erythraea* je bogata fenolima, polifenolima i flavonoidima, koji pokazuju snažnu antioksidativnu aktivnost. Ova jedinjenja neutralizuju slobodne radikale nastale usled UV zračenja, čime se smanjuje oksidativni stres i sprečava oštećenje kože. Uvođenje UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakata u postojeće UV zaštitne formulacije može unaprediti efikasnost preparata, čineći ih prirodnijom alternativom sintetičkim UV filterima. Integracija ovih biljnih antioksidanasa doprinosi ne samo boljoj zaštiti kože, već i njenoj regeneraciji, poboljšanju elastičnosti i hidrataciji nakon izlaganja suncu. Time se otvara mogućnost za razvoj naprednijih i sigurnijih proizvoda u oblasti zaštite kože, koji istovremeno smanjuju upotrebu sintetičkih UV filtera.

5. ZAKLJUČAK

U cilju sagledavanja mogućnosti primene „zelenih“ postupaka i organskih rastvarača, projektovana su dva ekološki prihvatljiva protokola za ekstrakciju korisnih bioaktivnih jedinjenja iz nadzemnih delova kičice (*C. erythraea* Rafn, Gentianaceae) primenom UE korišćenjem vodenih „zelenih“ organskih rastvarača (EtOH i PPG). Za poređenje pozitivnih efekata ultrazvuka i „zelenih“ organskih rastvarača u procesu ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja izvršeno je poređenje prinosa ekstrakata (UE/aPPG i UE/aEtOH) i infuzije. U cilju testiranja karakteristika infuzije i ekstrakata kičice određivan je SUP, antiradikalna aktivnost primenom DPPH testa i antimikrobna aktivnost mikrodilucionom metodom. Za potrebe analize korišćeni su nadzemni delovi kičice ubrani sa područja Stare planine u fazi cvetanja. Kao rastvarači korišćeni su PPG, EtOH i destilovana voda.

U ovoj doktorskoj disertaciji na osnovu sprovedenih analiza mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Identifikacija bioaktivnih komponenti u infuziji *C. erythraea*, izvršena je pomoću UHPLC-DAD-MS/MS analize. Infuzija sadrži sekoiridoidne glikozide, fenole, ksantone i njihove derivate, kiseline, poput limunske, 3- ili 4-hidroksi-2-oksoglutarne, siringinske, i 5-O-kafeoilhinske, kao i derivate cimetne i kaftarinske kiseline. Rezultati UHPLC-DAD-MS/MS analize pokazuju da se infuzija *C. erythraea* može preporučiti kao dobar izvor bioaktivnih jedinjenja i bio-antioksidanasa sa potencijalnim lekovitim dejstvom. Sva identifikovana jedinjenja obećavaju dobar kvalitet čaja kičice.
- Infuzija *C. erythraea* je bogat izvor makro- i mikroelemenata. Sadržaj minerala Ag, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn, Si, P i S u infuziji kičice, određen je ICP-OES metodom. Najzastupljeniji makroelementi su K ($92,35 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i P ($69,775 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), dok je Si ($3,375 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) kao microelement prisutan u najvećoj koncentraciji. Od teških metala (Cu, Zn i Pb) najzastupljeniji je Zn ($2,675 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$).
- UHPLC-DAD-MS/MS i ICP-OES analiza infuzije *C. erythraea*, je pokazala značajan biološki potencijal biljke, u smislu identifikovanih bioaktivnih jedinjenja i minerala. Ovo je bila i polazna tačka za dalji eksperimentalni rad, u cilju poboljšanja ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz kičice. Kako bi se to postiglo, izvršena je optimizacija uslova UE polarnijim sistemima rastvarača, EtOH/voda i PPG/voda. Za modelovanje UE/aEtOH i UE/aPPG sistema korišćena je RSM zasnovana na BBD, koja omogućava analizu uticaja više faktora istovremeno i identifikaciju optimalnih uslova ekstrakcije.

- Metodom numeričke optimizacije dobijeni su sledeći optimalni uslovi i to za sistem UE/aEtOH: solvomodul $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 37% (v/v) EtOH, temperatura ekstrakcije 56°C i vreme ekstrakcije 20 min. Pri datim uslovima predviđena i eksperimentalno dobijena vrednost SUP iznosila je 4,11 g GKE/100 g s.m. i $4,13 \pm 0,02 \text{ g GKE/100 g s.m.}$, respektivno. Što se tiče sistema UE/aPPG, dobijeni su sledeći optimalni uslovi: solvomodul $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 38% (v/v) PPG, temperatura ekstrakcije 49°C i vreme ekstrakcije 22 min, obezbeđujući predviđeni i eksperimentalno dobijeni SUP 4,12 g GKE/100 g s.m. i $4,16 \pm 0,04 \text{ g GKE/100 g s.m.}$, respektivno. Validacioni skupovi podataka korišćeni su kako bi se potvrdila sposobnost predviđanja SUP korišćenjem predloženih regresionih modela. Primećene su male razlike između eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti SUP, tako da se regresioni modeli mogu smatrati adekvatnim za predviđanje SUP.
- Na osnovu ANOVA testa i analize regresionih koeficijenata u polinomnoj jednačini (sistem UE/aEtOH) primećeno je da su i vreme ekstrakcije i solvomodul imali pozitivan uticaj na SUP, dok su koncentracija EtOH i temperatura ekstrakcije imali negativne efekte na SUP. U polinomnoj jednačini za sistem UE/aPPG, pozitivne efekte na SUP imali su koncentracija PPG, solvomodul i temperatura ekstrakcije, dok je vreme ekstrakcije negativno uticalo na SUP. Niža temperatura ekstrakcije i kraće vreme ekstrakcije obezbedili su visok SUP u oba ekstrakta. Blaga prednost korišćenja PPG kao rastvarača je ta da se može direktno uključiti u različite kozmetičke i farmaceutske proizvode.
- Prema UHPLC-DAD-MS/MS analizi, ključni bioaktivni sastojci u oba ekstrakta (UE/aPPG i UE/aEtOH) su organske kiseline i njihovi derivati, flavanoli, ksantoni i sekoiridoidni glikozidi. UE/aPPG i UE/aEtOH ekstrakti sadrže veću raznolikost bioaktivnih jedinjenja (42 jedinjenja u UE/aEtOH, 45 jedinjenja u UE/aPPG) nego infuzija (32 jedinjenja). Razlog za ovo može biti veća sposobnost ekstraktanta (EtOH i PPG) da UE metodom ekstrahuju bioaktivna jedinjenja u poređenju sa vodom korišćenom za pripremu infuzije. Zahvaljujući širokom spektru identifikovanih jedinjenja, ekstrakti UE/aEtOH i UE/aPPG se mogu primenjivati u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, kao prirodne komponente, dodaci i konzervansi u različitim proizvodima.
Infuzija, s druge strane, može biti lakša za pripremu i koristi se kao prirodni napitak koji sadrži antioksidativne i antiinflamatorne komponente, što je čini pogodnom za svakodnevnu upotrebu radi poboljšanja zdravlja.

- Mineralni sadržaj *C. erythraea* određen je ICP-OES metodom. Koncentracija K je bila najveća u oba analizirana uzorka ($461,625 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ u UE/aEtOH i $270,475 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ u UE/aPPG ekstraktu). Najveće koncentracije makroelemenata Ca ($852,95 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i Mg ($68,85 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i mikroelementa Fe ($144,675 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) utvrđene su u ekstraktu PPG, dok su koncentracije S ($55,825 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i P ($322,55 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) bile veće u ekstraktu EtOH. Sadržaj minerala pokazuje da oba ekstrakta *C. erythraea* poseduju značajan kvalitet, što implicira njihovu moguću primenu u različitim farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima. Poređenjem mineralnog sastava UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakata i infuzije *C. erythraea*, uočavaju se značajne razlike, kada su u pitanju mikro- i makroelementi. Iako infuzija sadrži esencijalne minerale poput K, Na, Mg, P i S, ona ne sadrži Ca i Fe, koji su prisutni u znatno većim koncentracijama u ekstraktima, naročito onog dobijenog ekstrakcijom UE/aPPG sistema. Kod infuzije su приметne niže koncentracije mikroelemenata (Zn i Cu), što kod ekstrakata nije slučaj. Naročito je prisutna visoka koncentracija Ca, Mg i Fe kod UE/aPPG ekstrakta. Ekstrakt UE/aEtOH, ne samo što sadrži najveće koncentracije S i P, već jedini u sastavu ima B. Ovi podaci ukazuju na to da ekstrakti sadrže veće količine esencijalnih minerala i imaju veći nutritivni potencijal u poređenju sa infuzijom, što ih čini pogodnijim za primenu u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima.
- Prilikom projektovanja postupka za buduću primenu na industrijskom nivou, posebno za proizvodnju farmaceutskih, kozmetičkih i prehrambenih proizvoda, potrebno je odrediti i troškove proizvodnje i proceniti njen uticaj na životnu sredinu. Predloženi postupci UE su brze, efikasne, čiste i ekološki prihvatljive tehnologije za proizvodnju ekstrakata iz nadzemnih delova kičice, bogatih bioaktivnim jedinjenjima. Čvrsti biljni ostaci nakon ekstrakcije mogu se reciklirati i valorizovati, i koristiti za proizvodnju energije, bioetanol, bioloških derivata i aditiva u stočnoj hrani, čime se optimizuje proces i povećava profit. Treba uzeti u obzir da EtOH ima neke nedostatke poput isparavanja i zapaljivosti, kao i mogućih iritacija kod potrošača.

Pošto je sistem UE/aPPG zahtevao nižu temperaturu i dao ekstrakt sa višim SUP i većom raznovrsnošću jedinjenja, ovaj postupak se više preporučuje za buduću industrijsku upotrebu.
- Mikrodilucionom metodom određena je antimikrobna aktivnost UE/aPPG i UE/aEtOH ekstrakata nadzemnih delova *C. erythraea* na sojevima različitih bakterija i jedne vrste gljivica. Rezultati pokazuju slabiji antibakterijski, ali značajan antifungalni potencijal

ekstrakata. Najosetljivija bakterijska vrsta je *P. aeruginosa* ATCC 27853 na UE/aPPG ekstrakt sa MIK $2,5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, dok je UE/aEtOH ekstrakt imao najjače antifungalno dejstvo protiv *C. albicans* ATCC 10231 (MIK $0,625 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$). Dobijene MIK i MMK vrednosti ukazuju i na to da *C. erythraea* može da podrži endogene odbrambene mehanizme i aktivno učestvuje u zaštiti ljudskog organizma od patogenih bakterija i gljivica.

- Ekstrakti UE/aEtOH i UE/aPPG nadzemnih delova *C. erythraea* pokazuju antiradiokalsku aktivnost, koja je prvenstveno posledica prisustva flavonoida i fenola. Antiradikalna aktivnost ekstrakata i sintetičkog antioksidansa BHT određena je primenom DPPH testa. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ekstrakti imaju manji antiradikalni potencijal od sintetskog antioksidansa, ali i da UE/aPPG ekstrakt ima bolju antiradikalnu aktivnost u odnosu na UE/aEtOH ekstrakt. Dobijeni rezultati preporučuju konzumiranje pripremljenih ekstrakata u cilju smanjenja slobodnih radikala u organizmu, koji su odgovorni za mnoge bolesti kod ljudi.
- UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakti nadzemnih delova *C. erythraea* su zračeni UV-A lampom ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$) i pokazali su sličan mehanizam degradacije molekula, što se vidi kroz smanjenje apsorpcije sa maksimuma na $\lambda = 240 \text{ nm}$ i $\lambda = 354 \text{ nm}$ za UE/aEtOH, i $\lambda = 237 \text{ nm}$ i $\lambda = 352 \text{ nm}$ za UE/aPPG ekstrakt. Ekstrakti su bogati antioksidansima (fenoli, polifenoli, flavonoidi), koji neutralizuju slobodne radikale, smanjuju oksidativni stres i štite kožu od UV oštećenja. Njihova primena u UV zaštitnim formulacijama može povećati efikasnost proizvoda, smanjiti upotrebu sintetičkih filtera i doprineti regeneraciji, hidrataciji i elastičnosti kože. Time se otvara mogućnost za razvoj naprednijih i sigurnijih proizvoda u oblasti zaštite kože, koji istovremeno smanjuju upotrebu sintetičkih UV filtera.

UE jedna je od obećavajućih metoda za ekstrakciju biljnih bioaktivnih jedinjenja i prihvaćena je kao tehnika „zelene“ ekstrakcije zbog svoje visoke efikasnosti uz manju potrošnju rastvarača i vremena, kao i zbog pogodnosti za termooosetljiva jedinjenja, a što rezultati disertacije i pokazuju. Dobijeni ekstrakti se mogu koristiti u različitim proizvodima kao prirodni aktivni sastojci. Protokoli ekstrakcije će omogućiti jednostavan prenos na proizvodnju većeg obima i dalju upotrebu u različitim industrijama, posebno osiguravajući čistiju proizvodnju sa smanjenim uticajem na životnu sredinu.

6. LITERATURA

- Aberham A., Pieri V., Croom E.M., Ellmerer E., Stuppner H. Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaureum erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC–MS and RP-HPLC. *J. Pharmaceut. Biomed.* 54 (2011) 517–525.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.030>
- Aberham A., Schwaiger S., Stuppner H., Ganzera M. Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthenes and xanthone glycosides in *Gentiana Lutea* L. roots by RP-HPLC and LC–MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45(3) (2007) 437 - 442. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.07.001>
- Aliaño-González M.J., Jarillo J.A., Carrera C., Ferreira-González M., Álvarez J.Á., Palma M., Ayuso J., Barbero G.F., Espada-Bellido E. Optimization of a novel method based on ultrasound-assisted extraction for the quantification of anthocyanins and total phenolic compounds in blueberry samples (*Vaccinium corymbosum* L.). *Foods.* 9 (2020) 1763.
<https://doi.org/10.3390/foods9121763>
- Andrews J.M. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J. Antimicrob. Chemother.* 56 (2005) 60-76. <https://doi.org/10.1093/jac/dki124>
- Andrews J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (2001) 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Ansori A., Wibowo S.A., Kusuma H.S., Bhuana D.S., Mahfud M. Production of biodiesel from nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) using microwave with CaO catalyst from eggshell waste: Optimization of transesterification process parameters. *Open Chem.* 17 (2019) 1185–1197.
<https://doi.org/10.1515/chem-2019-0128>
- Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M., Esteve-Turrillas F.A. Green Analytical Chemistry, in: Worsfold P., Poole C., Townshend A., Miró M. (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science*, third ed. Elsevier. (2019) 356–361. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13980-0>
- Babotă M., Frumuzachi O., Găvan A., Iacoviță C., Pinela J., Barros L., Ferreira I.C.F.R., Zhang L., Lucini L., Rocchetti G., Tanase C., Crișan G., Mocan A. Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Thymus comosus* Heuff. ex Griseb. et Schenk (wild thyme) and their bioactive potential. *Ultrason. Sonochem.* 84 (2022) 1350-4177.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105954>

- Bajko E., Kalinowska M., Borowski P., Siergiejczyk L., Lewandowski W. 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 65 (2016) 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.024>
- Baldino L., Adami R., Reverchon E. Concentration of *Ruta graveolens* active compounds using SC-CO₂ extraction coupled with fractional separation. *J. Supercrit. Fluids.* 131 (2018) 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.008>
- Banjanac T., Dragičević M., Šiler B., Gašić U., Bohanec B., Nestorović Živković J., Trifunović S., Mišić D. Chemodiversity of two closely related tetraploid *Centaureum* species and their hexaploid hybrid: metabolomic search for high-resolution taxonomic classifiers. *Phytochem.* 140 (2017) 27–44. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.005>
- Barba F.J., Grimi N., Vorobiev E. New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. *Food Eng. Rev.* 7 (2015) 45–62. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9095-6>
- Barker A.V., Pilbeam D.J. Handbook of plant nutrition. CRC Press. Boca Raton (2015).
- Barros L., Dueñas M., Dias M.I., Sousa M.J., Santos-Buelga C., Ferreira I.C.F.R. Phenolic profiles of cultivated, *in vitro* cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chem.* 136 (2013) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.107>
- Baş D., Boyacı, İ. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* 78 (2007) 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>
- Bentahar A., Khennouf S., Bouaziz A., Baghiani A., Dahamna S., Amira S., Arrar L. Polyphenols content and antioxidant activities of selected Algerian plants used for gastro-duodenal ulcers. *Der Pharma Chemica.* 8 (2016) 88–99.
- Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveira E. P., Villar L. S., Escaleira, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta.* 76 (2008) 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bibi H., Anwer S., Miana G. A., Ahmad S. Two new triterpene lactones from *Centaureum pulchellum*. *Fitoterapia.* 71 (2000) 130–133. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00144-6](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00144-6)
- Bisset N.G., Wichtl M. (eds), Herbal drugs and phytopharmaceuticals. Medpharm. 2nd edn, Stuttgart. 2001.

- Boškov I. A., Savić I. M., Grozdanić Stanisavljević N. Đ., Kundaković-Vasović T. D., Radović Selgrad J. S., Savić Gajić I. M. Stabilization of Black Locust Flower Extract via Encapsulation Using Alginate and Alginate–Chitosan Microparticles. *Polymers*. 16 (2024) 688. <https://doi.org/10.3390/polym16050688>
- Botion L. M., Ferreira A.V.M., Côrtes S.F., Lemos V.S., Braga F.C. Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina® on lipid metabolism and intestinal tonus. *J. Ethnopharmacol.* 102 (2005) 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.046>
- Boudraa H., Kadri N., Mouni L., Madani K. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from fennel seeds: Optimization using Plackett–Burman design and response surface methodology. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*. 23 (2021) 2214–7861. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100307>
- Bouras M., Chadni M., Barba F.J., Grimi N., Bals O., Vorobiev E. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Quercus bark. *Ind. Crops Prod.* 77 (2015) 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.018>
- Bouyahya A., Bakri Y., Belmehdi O., Et-Touys A., Abrini J., Dakka N. Phenolic extracts of *Centurium erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 7 (2017) 433–439. <https://doi.org/10.12980/apjtd.7.2017D6-462>
- Bouyahya A., Bakri Y., Et-Touys A., Assemian I.C.C., Abrini J., Dakka N. *In vitro* antiproliferative activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco on several cancer cell lines. *Eur. J. Integr. Med.* 18 (2018) 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2018.01.001>
- Bouyahya A., Belmehdi O., El Jemli M., Marmouzi I., Bourais I., Abrini J., Bakri Y. Chemical variability of *Centaureum erythraea* essential oils at three developmental stages and investigation of their *in vitro* antioxidant, antidiabetic, dermatoprotective and antibacterial activities. *Ind Crops Prod.* 132 (2019) 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.042>
- Boyacı İ. H. A new approach for determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 25 (2005) 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.001>
- Božunović J., Živković, S., Gašić U., Glamočlija J., Ćirić, A., Matekalo D., Šiler B., Soković M., Tešić Ž., Mišić D. *In vitro* and *in vivo* transformations of *Centaureum erythraea* secoiridoid glucosides alternate their antioxidant and antimicrobial capacity. *Ind. Crops Prod.* 111 (2018) 705–721. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.040>
- Bradley P.R. British herbal compendium. British Herbal Medicine Association, vol 2. Bournemouth. 2006.

- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use Of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT – Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25-30.
- Bušić A., Mardetko N., Kundas S., Morzak G., Belskaya H., Ivančić Šantek M., Komes D., Novak S., Šantek B. Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food Technol. Biotechnol.* 56 (2018) 289–311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>
- Caldas T. W., Mazza K. E. L., Teles A. S. C., Mattos G. N., Brígida A. I. S., Conte-Junior C. A., Borguini R. G., Godoy R. L. O., Cabral L. M. C., Tonon, R. V. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Ind. Crops Prod.* 111 (2018) 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.012>
- Casas-Cardoso L., Mantell C., Obregón S., Cejudo-Bastante C., Alonso-Moraga Á., de la Ossa E.J.M., de Haro-Bailón A. Health-promoting properties of borage seed oil fractionated by supercritical carbon dioxide extraction. *Foods*. 10 (2021) 2471. <https://doi.org/10.3390/foods10102471>
- Chen F., Yu W., Lin F., Huang J., Huang W., Huang W., Shuang P., Bian Y., Luo, Y. Sesquiterpenoids with neuroprotective activities from the Chloranthaceae plant *Chloranthus henryi*. *Fitoterapia*. 151 (2021a) 104871. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104871>
- Chien W.-J., Saputri D.S., Lin H.-Y. Valorization of Taiwan's Citrus depressa Hayata peels as a source of nobiletin and tangeretin using simple ultrasonic-assisted extraction. *Curr. Res. Food Sci.* 5 (2022) 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.013>
- Chou O., Ali A., Subbiah V., arrow C.J., Dunshea F.R., Suleria H.A.R. LC-ESI-QTOF-MS/MS characterisation of phenolics in herbal tea infusion and their antioxidant potential. *Ferment.* 7 (2021) 73-97. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020073>
- Clifford M. N., Johnston K. L., Knight S., Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2900-2911. <https://doi.org/10.1021/jf026187q>
- Corrales M., Toepfl S., Butz P., Knorr D., Tauscher B. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 9 (2008), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.06.002>

- da Silva R.F., Carneiro C.N., de Sousa C.B.D.C., Gomez F.J., Espino M., Boiteux J., Fernandez M.A., Silva M.F., Dias, F.D.S. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. *Microchem. J.* 175 (2022) 107184. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107184>
- Dabetić N.Lj. Komparativna analiza hemijskog sastava i biološke aktivnosti ekstrakata plodova različitih sorti vinove loze (*Vitis vinifera* L.) dobijenih primenom organskog i eutektičkog rastvarača, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2023.
- Demirkol O., Erşatır M., Giray E.S., Kırıcı S. Comparison of the effects of green and sustainable extraction methods on the extraction yield and chemical composition of *Ruta chalepensis* roots. *Sustain. Chem. Pharm.* 29 (2022) 100750. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100750>
- Deng Q., Zinoviadou K.G., Galanakis C.M., Orlie V., Grimi N., Vorobiev E., Barba F.J. The effects of conventional and non-conventional processing on glucosinolates and its derived forms, isothiocyanates: extraction, degradation, and applications. *Food Eng. Rev.* 7 (2015), 357–381. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9104-9>
- Devirian T.A., Volpe S.L. The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 43 (2003) 219-231. <https://doi.org/10.1080/10408690390826491>
- Dudareva N., Klempien A., Muhlemann J. K., Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* 198 (2013) 16-32. <https://doi.org/10.1111/nph.12145>
- Đorđević M., Mihailović M., Arambašić Jovanović J., Grdović N., Uskoković A., Đorđević M., Dinić S. *Centaurium erythraea* Methanol Extract Attenuates SNP-Induced Oxidative Stress in Pancreatic B-Cells. *Selected Abstracts from the 3rd European Summer School on Nutrigenomics; 2018 Jun 25-29. Jesi, Italy.* (2018) 7. <https://doi.org/10.1159/000490753>
- El Menyiy N., Guaouguaou F.E., El Baaboua A., El Omari N., Taha D., Salhi N., Bouyahya A. Phytochemical properties, biological activities and medicinal use of *Centaurium erythraea* Rafn. *J. Ethnopharmacol.* 276 (2021) 114171. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114171>
- El-Mawla A.M.A., Schmidt W., Beerhues L. Cinnamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaurium erythraea* RAFN. *Planta.* 212 (2001) 288-293. <https://doi.org/10.1007/s004250000394>
- European Medicines Agency (EMA), Doc. Ref.: EMA/HMPC/105535/2008 (2009).
- European Pharmacopeia, 5th Edition. Council of Europe, Strasbourg, 2005.
- European Pharmacopoeia, 7th ed., Main Volume 7.0, DEQS, Strasbourg (2010) 1095–1096.

- Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandão G.C., da Silva E.G.P., Portugal L.A., dos Reis P.S., Souza A.S., dos Santos W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim. Acta.* 597 (2007) 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
- Flannigan D. J., Suslick, K. S. Inertially confined plasma in an imploding bubble. *Nat. Phys.* 6 (2010) 598–601. <https://doi.org/10.1038/nphys1701>
- Fraternali D., Ricci D., Verardo G., Gorassini A., Stocchi V., Sestili P. Activity of Vitisvinifera tendrils extract against phytopathogenic fungi. *Nat. Prod. Commun.* 10 (2015) 1037 - 1042. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000661>
- Gadjalova A.V., Mihaylova D. Ultrasound-assisted extraction of medicinal plants and evaluation of their biological activity. *Food Res.* 3 (2019) 530–536. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(5\).128](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(5).128)
- Geu-Flores F., Sherden N. H., Courdavault V., Burlat V., Glenn W. S., Wu C., O'Connor S. E. An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis. *Nature.* 492 (2012) 138–142. <https://doi.org/10.1038/nature11692>
- Guedes L., Reis P.B.P.S., Machuqueiro M., Ressaissi A., Pacheco R., Serralheiro M.L. Bioactivities of *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) Decoctions: Antioxidant Activity, Enzyme Inhibition and Docking Studies. *Mol.* 24 (2019) 3795 – 3813.
- Guerrera M.P., Volpe S.L., Mao J.J. Therapeutic uses of magnesium. *Am Fam Physician.* 80 (2009) 157–162.
- Hamza N., Berke B., Cheze C., Agli A. N., Robinson P., Gin, H., Moore, N. Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. *J. Ethnopharmacol.* 128 (2010) 513-518. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.004>
- Hoang H.T., Moon J.-Y., Lee Y.-C. Natural antioxidants from plant extracts in skincare cosmetics: Recent applications, challenges and perspectives. *Cosmetics.* 8 (2021) 106. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040106>
- Hosseini H., Bolourian S., Hamgini E.Y., Mahababadi E.G. Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of polyphenols from dried rosemary leaves using response surface methodology. *J. Food Process. Preserv.* 42 (2018) e13778. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13778>
<https://doi.org/10.3390/molecules24203795>
<https://massbank.eu>
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

- Huang Q., Wang Y., Wu H., Yuan M., Zheng C., Xu H. Xanthone Glucosides: Isolation, Bioactivity and Synthesis. *Molecules*. 26 (2021) 5575-5597. <https://doi.org/10.3390/molecules26185575>
- Ikeda H., Esaki N., Nakai S., Hashimoto K., Uesato S., Soda K., Fujita, T. Acyclic monoterpene primary alcohol: NADP⁺ oxidoreductase of *Rauwolfia serpentina* cells: the key enzyme in biosynthesis of monoterpene alcohols. *J. Biochem.* 109 (1991) 341-347. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123383>
- Irakli M., Chatzopoulou P., Ekateriniadou L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Ind. Crops Prod.* 124 (2018) 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.070>.
- Ivanović M., Albrecht A., Krajnc P., Vovk I., Islamčević Razboršek M. Sustainable ultrasound-assisted extraction of valuable phenolics from inflorescences of *Helichrysum arenarium* L. using natural deep eutectic solvents. *Ind. Crops Prod.* 160 (2021) 113102. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113102>
- Janković T., Krstić D., Šavikin-Fodulović K., Menković N., Grubišić D. Xanthones and secoiridoids from hairy root cultures of *Centaurium erythraea* and *C. pulchellum*. *Planta Med.* 68 (2002) 944-946. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34927>
- Jensen S.R., Schripsema J. Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. In: Struwe L., Albert V.A. (eds), *Gentianaceae: systematics and natural history*. Cambridge University Press, Cambridge. 2002.
- Jeong Y.T., Jeong S.C., Hwang J.S., Kim J.H. Modulation effects of sweroside isolated from the *Lonicera japonica* on melanin synthesis. *Chem Biol Interact.* 238 (2015) 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.05.022>
- Jerković I., Gašo-Sokač D., Pavlović H., Marijanović Z., Gugić M., Petrović I., Kovač, S. Volatile organic compounds from *Centaurium erythraea* Rafn (Croatia) and the antimicrobial potential of its essential oil. *Mol.* 17 (2012) 2058-2072. <https://doi.org/10.3390/molecules17022058>
- Jovanović O., Radulović N., Stojanović G., Palić R., Zlatković B., Gudžić B. Chemical composition of the essential oil of *Centaurium erythraea* Rafn (Gentianaceae) from Serbia. *J. Essent. Oil Res.* 21 (2009) 317-322. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700181>

- Karakashov B., Grigorakis S., Loupassaki S., Makris D.P. Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*. 2 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2014.11.002>
- 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*. 119 (2010) 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Korciem K.M.M., Caftaric acid: an overview on its structure, daily consumption, bioavailability and pharmacological effects. *Biointerface Res. Appl. Chem*. 10 (2020) 5616-5623.
- Kumar K., Srivastav S., Sharanagat V.S. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: a review. *Ultrason. Sonochem*. 70 (2021) 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Kumarasamy Y., Nahar L., Cox P.J., Jaspars M., Sarker S.D. Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaurium erythraea*, *Phytomedicine*. 10 (2003) 344 - 347. <https://doi.org/10.1078/094471103322004857>
- Kusuma H.S., Amenaghawon A.N., Darmokoesoemo H., Neolaka Y.A.B., Widyaningrum B.A., Anyalewechi C.L., Orukpe P.I. Evaluation of extract of *Ipomoea batatas* leaves as a green coagulant–flocculant for turbid water treatment: Parametric modelling and optimization using response surface methodology and artificial neural networks. *Environ. Technol. Innov*. 24 (2021) 102005. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102005>
- Kusuma H.S., Amenaghawon A.N., Darmokoesoemo H., Neolaka Y.A.B., Widyaningrum B.A., Onowise S.U., Anyalewechi C.L. A comparative evaluation of statistical empirical and neural intelligence modeling of *Manihot esculenta*-derived leaves extract for optimized bio-coagulation-flocculation of turbid water. *Ind. Crops Prod*. 186 (2022) 115194. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115194>
- Kusuma H.S., Mahfud M. Microwave-assisted hydrodistillation for extraction of essential oil from patchouli (*Pogostemon cablin*) leaves. *Period. Polytech. Chem. Eng*. 61 (2017) 82–92. <https://doi.org/10.3311/PPch.8676>
- Li J., Zhao C., Zhu Q., Wang Y., Li G., Li X., Li Y., Wu N., Ma C. Sweroside protects against myocardial ischemia–reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and pyroptosis partially via modulation of the Keap1/Nrf2 axis. *Front. Cardiovasc. Med*. 8 (2021) 650368. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.650368>

- Lide D. R. 2003. CRC Handbook of Chemistry and Physics, eighty-fourth ed., CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA. ISBN-13: 978-0849304842, ISBN-10: 0849304849.
- Loizzo M.R. Saab A.M., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Piccolo V., Statti G.A., de Cindio B., Houghton P.J., Menichini, F. *In vitro* inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 119 (2008) 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.003>
- Ma C. H., Yang L., Zu Y. G., Liu T. T. Optimization of conditions of solvent-free microwave extraction and study on antioxidant capacity of essential oil from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Food Chem.* 134 (2012) 2532–2539. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.080>
- Ma Y.Q., Ye X.Q., Fang Z.X., Chen J.C., Xu G.H., Liu D.H. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of *Satsuma mandarin* (*Citrus unshiu* Marc.) peels. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 5682–5690. <https://doi.org/10.1021/jf072474o>
- Magaña A.A., Kamimura N., Soumyanath A., Stevens J.F., Maier C.S. Caffeoylquinic acids: chemistry, biosynthesis, occurrence, analytical challenges, and bioactivity. *Plant J.* 107 (2021) 1299–1319. <https://doi.org/10.1111/tpj.15390>
- Mansar-Benhamza L., Djerrou Z. Evaluation of anti-hyperglycemic activity and side effects of *Erythraea centaurium* (L.) Pers. in rats. *Afr. J. Biotechnol.* 12 (2013) 6980. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13322>
- Mansion G. A new classification of the polyphyletic genus *Centaurium* Hill (Chironiinae, Gentianaceae): description of the New World endemic *Zeltnera*, and reinstatement of *Gyrandra* Griseb. and *Schenkia* Griseb. *Taxon.* 53 (2004) 719–740. <https://doi.org/10.2307/4135447>
- Marčišin S.M., Stoiko L.I. Definition of phenolic compounds in the grass *Centaurium erythraea* Rafn. by the TOP method. *Pharm. J.* (2014) 15–17.
- Marhamati M., Kheirati Kakhaki Z., Rezaei M. Advance in ultrasound-assisted extraction of edible oils: a review. *J Nutr Fast Health.* 8 (2020) 220–230. <https://doi.org/10.22038/JNFH.2020.51138.1288>
- Mars B. The desktop guide to herbal medicine. The Ultimate Multidisciplinary Reference to the Amazing Realm of Healing Plants. (2007) 28–29.
- Martens S., Mithöfer A. Flavones and flavone synthases. *Phytochem.* 66 (2005) 2399–2407. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.07.013>

- Mazimba, O., Nana, F., Kuete, V., Singh G.S. 11 - Xanthonenes and anthranoids from the medicinal plants of Africa, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00011-4>. In: Kuete V. (Ed), Medicinal Plant Research in Africa Pharmacology and Chemistry, first ed., ISBN 978-0-12-405927-6. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-03354-6>. Elsevier Inc, London, UK, Waltham, USA. (2013) 393–434.
- Medina-Torres N., Ayora-Talavera T., Espinosa-Andrews H., Sánchez-Contreras A., Pacheco N.M. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agron.* 7 (2017) 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
- Merghem M., Dahamna D. Antioxidant Activity of *Centaurium erythraea* Extracts. *J. Drug Deliv. Ther.* 10 (2020) 171 - 174. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i2.3935>
- Meunier P.J., Roux C., Seeman E., Ortolani S., Badurski J.E., Spector T.D., Cannata J., Balogh A., Lemmel E.M., Pors-Nielsen S., Rizzoli R., Genant H.K., Reginster J.Y. Effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 350 (2004), 459-468. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA022436>
- Michalak M. Plant-derived antioxidants: Significance in skin health and the ageing process. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 585. <https://doi.org/10.3390/ijms23020585>
- Miettinen K., Dong L., Navrot N., Schneider T., Burlat V., Pollier J., Werck-Reichhart, D. The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus*. *Nat. Commun.* 5 (2014) 3606.
- Mifsud S. (2022). *Centaurium erythraea*. Retrieved from MaltaWildPlants.com.
- Mihaljev Z., Zivkov-Balos M., Cupić Z., Jakšić, S. Levels of some microelements and essential heavy metals in herbal teas in Serbia. *Acta Pol. Pharm.* 71 (2014) 385-391.
- Mihaylova D., Vrancheva R., Popova A. Phytochemical profile and *in vitro* antioxidant activity of *Centaurium erythraea* Rafn. *Bulg. Chem. Commun.* 51 (2019) 95 - 100.
- Mishra K., Ojha H., Chaudhury N.K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem.* 130 (2012) 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
- Mišić D., Šiler B., Skorić M., Djurickovic M.S., Živković J.N., Jovanović, V., Giba Z. Secoiridoid glycosides production by *Centaurium maritimum* (L.) Fritch hairy root cultures in temporary immersion bioreactor. *Process Biochem.* 48 (2013) 1587–1591. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.015>

- Molina M.A.R., Bah M., Rojas J.I., Gutiérrez D.M. Smooth muscle relaxing activity of gentiopicroside isolated from *Gentiana spathacea*. *Planta Med.* 66 (2000) 765 - 767. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9774>
- Mroueh M., Saab Y., Rizkallah R. Hepatoprotective activity of *Centaurium erythraea* on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.* 18(5) (2004) 431 - 433. <https://doi.org/10.1002/ptr.1498>
- Mustefa Beyan S., Venkatesa Prabhu S., Mumecha T. K., Gameda M. T. Production of Alkaline Proteases using *Aspergillus* sp. Isolated from Injera: RSM-GA Based Process Optimization and Enzyme Kinetics Aspect. *Curr. Microbiol.* 78 (2021) 1823–1834. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02446-4>
- Naber K.G. Efficacy and safety of the phytotherapeutic drug Canephron® N in prevention and treatment of urogenital and gestational disease: review of clinical experience in Eastern Europe and Central Asia. *Res Rep Urol.* (2013) 39-46. <https://doi.org/10.2147/RRU.S39288>
- Nekkaa A., Benaissa A., Lalaouna A.E.D., Mutelet F., Canabady-Rochelle L. Optimization of the extraction process of bioactive compounds from *Rhamnus alaternus* leaves using Box-Behnken experimental design. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.* 25 (2021) 100345. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100345>
- Newall C.A., Anderson L.A., Phillipso J.D. The Pharmaceutical Press. London (1996) 67.
- Nikolić V. G., Troter D. Z., Savić I. M., Gajić I. M. S., Zvezdanović J. B., Konstantinović I. B., Konstantinović S. S. Design and optimization of “greener” and sustainable ultrasound-assisted extraction of valuable bioactive compounds from common centaury (*Centaurium erythraea* Rafn) aerial parts: A comparative study using aqueous propylene glycol and ethanol. *Ind. Crops Prod.* 192 (2023) 116070. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116070>
- Nikolić V. G., Zvezdanović J. B., Konstantinović S. S. UHPLC-DAD-ESI-MS analysis of the '*Centaurium erythraea*' infusion. *Advanced Technologies.* 11 (2022) 13-21. <https://doi.org/10.5937/savteh2201013N>
- Nwabueze T.U. Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems. *International Journal of Food Science & Technology.* 45(2010) 1768–1776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02256.x>
- Oku H., Ogawa Y., Iwaoka E., Ishiguro K. Allergy-preventive effects of chlorogenic acid and iridoid derivatives from flower buds of *Lonicera japonica*. *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 1330–1333. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1330>

- Oliveira M., Casal S., Morais S., Alves C., Dias F., Ramos S., Mendes E., Delerue-Matos C., Oliveira M.B.P.P. Intra-and interspecific mineral composition variability of commercial coffees and coffee substitutes: contribution to mineral intake. *Food Chem.* 130 (2012) 702–709. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.113>
- Osorio-Tobón J.F. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *J. Food Sci. Technol.* 57 (2020) 4299–4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>
- Oztürk N., Korkmaz S., Oztürk Y., Başer K.H.C. Effects of gentiopicroside, sweroside and swertiamarine, secoiridoids from gentian (*Gentiana lutea* ssp. *symphyandra*), on cultured chicken embryonic fibroblasts. *Planta Med.* 72 (2006) 289–294. <https://doi.org/10.1055/s-2005-916198>
- Pandey A., Belwal T., Sekar K.C., Bhatt I. D., Rawal R.S. Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of phenolics and antioxidant compounds from rhizomes of *Rheum moorcroftianum* using response surface methodology (RSM). *Ind. Crops Prod.* 119 (2018) 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.019>
- Paniagua-Zambrana, N.Y., Bussmann, R.W. *Centaurium erythraea* Rafn Gentianaceae. *Ethnobotany of the Andes*. (2020) 477–480. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77093-2_60-1
- Paniwnyk L. Applications of ultrasound in processing of liquid foods: A review. *Ultrason. Sonochem.* 38 (2017) 794–806. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.025>
- Parra M., Picher M. T., Seoane E., Tortajada A. Xanthoness and secoiridoids isolated from methanolic extract of *Centaurium linarifolium*. *J. Nat. Prod.* 48 (1985), 998–999. <https://doi.org/10.1021/np50042a027>
- Pataczek L., Cheilari A., Zikeli S., Sturm S., Stuppner H., Gruber S. *Centaurium erythraea* cultivation method for optimal yield and product quality. *J. Herbs Spices Med. Plants.* 23 (2017) 193–215. <https://doi.org/10.1080/10496475.2017.1295414>
- Petrović S. M., Savić S. R., Zvezdanović J. B., Mladenović-Ranisavljević I., Cvetković, D. J., Cvetanović, A. D. Benefits and risks of commercially available coffee beverages from Western Balkan. *Chem. Pap.* 74 (2020) 847–857. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00916-5>
- Pham D. Q., Pham H. T., Han J. W., Nguyen T. H., Nguyen H. T., Nguyen T. D., Nguyen T.T.T., Ho C.T., Pham H.M., Vu H.D., Choi G. J., Dang Q.L. Extracts and metabolites derived from the leaves of *Cassia alata* L. exhibit *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activities against fungal and bacterial plant pathogens. *Ind Crops Prod.* 166 (2021) 113465. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113465>

- Piatczak E., Krolicka A., Wysokinska H. Genetic transformation of *Centaurium erythraea* Rafn by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of secoiridoids. *Plant Cell Rep.* 25 (2006) 1308–1315. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0155-0>
- Pingret D., Fabiano-Tixier A.-S., Chemat F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control.* 31 (2013) 593–606. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039>
- Radice M., Manfredini S., Ziosi P., Dissette V., Buso P., Fallacara A., Vertuani S. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia.* 114 (2016) 144–162. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.003>
- Radović M., Šiler B., Živković J.N. Banjanac T., Živković S. Nikolić, M., Mišić D. Bioreactor Cultivation of *Zeltnera beyrichii* (Torr. & A. Gray) Mans.: A Novel Source of Biologically Active Compounds. *Rec. Nat. Prod.* 7 (2013) 266–280.
- Radušienė J., Judžintienė A., Pečiulytė D., Janulis V. Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum vulgare*. *Biologija.* 51(2005) 53–58.
- Ramamoorthi P., Rathinam A., Jonnalagadda R.R., Palanisamy T. Non-aqueous green solvents improve alpha-amylase induced fiber opening in leather processing. *Sci. Rep.* 10 (2020) 22274. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79406-8>
- Rombaut N., Tixier A.-S., Bily A., Chemat F. Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuel. Bioprod. Biorefin.* 8 (2014) 530–544. <https://doi.org/10.1002/bbb.1486>
- Santos H., Capelo J. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta.* 73 (2007) 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.05.039>
- Sarker S.D., Nahar I., Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 42 (2007) 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>
- Savić I. M., Savic Gajic I. M., Milovanovic M. G., Zerajic S., Gajic D. G. Optimization of ultrasound-assisted extraction and encapsulation of antioxidants from orange peels in alginate-chitosan microparticles. *Antioxidants.* 11 (2022) 297. <https://doi.org/10.3390/antiox11020297>
- Savić S., Petrović S., Petronijević M., Cvetanović A., Petronijević Ž. Determination of the mineral content of spices by ICP-OES. *Advanced Technologies.* 8 (2019) 27–32. <https://doi.org/10.5937/SavTeh1901027S>

- Schwarz H., Liu B., Peters S., Barillas W., Beerhues L. Purification, cDNA cloning and functional expression of NADPH-cytochrome P450 reductase from *Centaureum erythraea* cell cultures. *Plant Biol.* 11 (2009) 300-306. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00137.x>
- Sefi M., Fetoui H., Lachkar N., Tahraoui A., Lyoussi B., Boudawara T., Zeghal N. *Centaureum erythraea* (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *J. Ethnopharmacol.* 135 (2011) 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.02.029>
- Serbian regulations (1992) Regulation on quantities of pesticides, metals and metalloids and other toxic substances, chemotherapeutics, anabolics and other substances that can be found in food. Official Gazette of SRY no. 5/92.
- Shan M., Yu S., Yan H., Guo S., Xiao W., Wang Z., Zhang L., Ding A., Wu Q., Li S.F.Y. A review on the phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of geniposide, a natural product. *Molecules.* 22 (2017) 1689. <https://doi.org/10.3390/molecules22101689>
- Shubayr N. Phytochemicals properties of herbal extracts for ultraviolet protection and skin health: A narrative review. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 16 (2023) 100729. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2023.100729>
- Siler B., Zivković S., Banjanac T., Cvetković J., Nestorović Z., Ivković J., Ćirić A., Soković M., Misić D. Centauries as underestimated food additives: antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chem.* 147 (2014) 367 - 376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.007>
- Srinivasulu C., Ramgopal M., Ramanjaneyulu G., Anuradha C.M., Suresh Kumar C., Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. *Biomed. Pharmacother.* 108 (2018) 547-557. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.069>
- Stefkov G., Miova B., Dinevska-Kjovkarovska S., 2014. Chemical characterization of *Centaureum erythraea* L. and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 152 (2014) 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.047>
- Struwe L., Kadereit J.W., Klackenberg J., Nilsson S., Thiv M., Von Hagen K. B., Albert V.A. Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification. *Gentianaceae: systematics and natural history.* (2002) 21-309.
- Stupar A., Šeregelj V., Ribeiro B.D., Pezo L., Cvetanović A., Mišan A., Marrucho I. Recovery of β -carotene from pumpkin using switchable natural deep eutectic solvents. *Ultrason Sonochem.* 76 (2021) 105638. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105638>

- Subotić A., Budimir S., Grubišić D., Momčilović I. Direct regeneration of shoots from hairy root cultures of *Centaurium erythraea* inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. *Biol. Plant.* 47 (2003) 617-619. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000041074.81033.3a>
- Subotić A., Janković T., Jevremović S., Grubišić D. Plant Tissue Culture and Secondary Metabolites Productions of *Centaurium erythraea* Rafn, a Medical plant. In: Teixeira da Silva JA, ed. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues, 1st ed. London, Global Science Books. (2006) 564–570. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-287-2_17
- Subotić A., Jevremović S., Grubišić D., Janković, T. Spontaneous plant regeneration and production of secondary metabolites from hairy root cultures of *Centaurium erythraea* Rafn. Protocols for *in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants. (2009) 205-215. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-287-2_17
- Šiler B., Avramov S., Banjanac T., Cvetković J., Živković J.N., Patenković A., Mišić D. Secoiridoid glycosides as a marker system in chemical variability estimation and chemotype assignment of *Centaurium erythraea* Rafn from the Balkan Peninsula. *Ind Crops Prod.* 40 (2012) 336-344. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.026>
- Šiler B., Mišić D., Nestorović J., Banjanac T., Glamočlija J., Soković M., Ćirić A. Antibacterial and antifungal screening of *Centaurium pulchellum* crude extracts and main secoiridoid compounds. *Nat. Prod. Commun.* 5 (2010) 1525-1530. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000501001>
- Šiler B., Živković S., Banjanac T., Cvetković J., Nestorović Živković J., Ćirić A., Soković M., Mišić D., 2014. Centauries as underestimated food additives: antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chem.* 147 (2014) 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.007>
- Šiler, B., Mišić, D. Biologically active compounds from the genus *Centaurium* sl (Gentianaceae): current knowledge and future prospects in medicine. *Studies in natural products chemistry.* 49 (2016) 363-397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63601-0.00011-9>
- Tahraoui A., Israili Z. H., Lyoussi B. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 132 (2010) 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.038>
- Takagi S., Yamaki, M. Studies on the constituents of *Erythraea-Centaurium* (Linne) persoon. 3. isolation and structure of xanthones. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan.* 102 (1982) 546-548.

- Teke G.N., Kuete V. 5-Acute and subacute toxicities of African medicinal plants, Toxicological Survey of African Medicinal Plants, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00005-4>. In: Kuete V. (Ed), Toxicological Survey of African Medicinal Plants, first ed., ISBN 978-0-12-800018-2. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-15406-2>. Elsevier Inc, London, UK, Waltham, USA. 2014, 63–98.
- Tiwari B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Tobyn G., Denham A., Whitelegg M. *The Western Herbal Tradition: 2000 years of medicinal plant knowledge*, Churchill Livingstone, 2016, 2st ed. London, Singing Dragon. <http://lccn.loc.gov/2015039141>
- Trifunović-Momčilov M., Krstić-Milošević D., Trifunović S., Ćirić A., Glamočlija J., Jevremović, S., Subotić A. Antimicrobial activity, antioxidant potential and total phenolic content of transgenic atckx1 centaury (*Centaureum erythraea* Rafn.) plants grown *in vitro*. *Environ. Eng. Manag. J.* 18 (2019) 2063-2072. <http://www.eemj.icpm.tuiasi.ro/>; <http://www.eemj.eu>
- Troter D.Z., Todorović Z.B., Đokić-Stojanović D.R., Đorđević B.S., Todorović V.M., Konstantinović S.S., Veljković V.B. The physico-chemical and thermodynamic properties of the choline chloride-based deep eutectic solvents. *J. Serb. Chem. Soc.* 82 (2017) 1039–1052. <https://doi.org/10.2298/JSC170225065T>
- Tse T.J., Wiens D.J., Reaney M.J.T. Production of bioethanol-A review of factors affecting ethanol yield. *Ferment.* 7 (2021) 268. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>
- Tuluze Y., Ozkol H., Koyuncu I., Ine H. Gastroprotective effect of small centaury (*Centaureum erythraea* L.) on aspirin-induced gastric damage in rats. *Toxicol. Ind. Health.* 27 (2011) 760 - 768. <https://doi.org/10.1177/0748233710397421>
- Tusevski O., Kostovska A., Iloska A., Trajkovska L., Simic S.G. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Open Life Sci.* 9 (2014) 888–900. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0322-1>
- Valentão P., Andrade P.B., Silva A.M.S., Isolation and structural elucidation of 5-formyl-2,3-dihydroisocoumarin from *Centaureum erythraea* aerial parts. *Nat. Prod. Res.* 17 (2003) 361 -364. <https://doi.org/10.1080/1057563031000081938>
- Valentão P., Andrade P.B., Silva E., Methoxylated xanthenes in the quality control of small centaury *Centaureum erythraea* flowering tops. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 460 - 463. <https://doi.org/10.1021/jf0109571>

- Valentão P., Fernandes E., Carvalho F., Andrade P.B., Seabra R.M., Bastos M.L. Antioxidant activity of *Centaurea erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3476 - 3479. <https://doi.org/10.1021/jf001145s>
- Vasyliov G., Lyudmyla K., Hladun K., Skiba M., Vorobyova V. Valorization of tomato pomace: extraction of value-added components by deep eutectic solvents and their application in the formulation of cosmetic emulsions. *Biomass Convers. Biorefin.* 12 (2022) 95–111. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02337-z>
- Velimirović D., Mitić S., Tosić S., Pavlović A., Stojković, M. Determination of the Content of Some Trace Elements in Particular Samples of Grains, Flours and Breads by ICP-OES. *Oxid. Commun.* 35 (2013) 160–171. <https://doi.org/10.2298/APT1647109A>
- Veljković D., Vučković G.N. Minerali u ishrani. Hemijski pregled 51 (2010) 14–19.
- Vinatoru M., Mason T. J., Calinescu I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 97 (2017) 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- Vining G. G., Kowalski S. M., Montgomery D. C. Response Surface Designs within a Split-Plot Structure. *J. Qual. Technol.* 37 (2005) 115–129. <https://doi.org/10.1080/00224065.2005.11980310>
- Vranová E., Coman D., Gruissem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64 (2013) 665-700. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116>
- Wang S., Chen F., Wu J., Wang Z., Liao X., Hu X. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *J. Food Eng.* 78 (2007) 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.008>
- Xu P., Jia S., Li D., el Moctar O., Jiang C. Optimization study of marine energy harvesting from vortex-induced vibration using a response-surface method. *J. Mar. Sci. Eng.* 11(2023) 1-15. <https://doi.org/10.3390/jmse11030668> <https://www.mdpi.com/journal/jmse>
- Yusoff I.M., Taher Z.M., Rahmat Z., Chua L.S. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Res. Int.* 157 (2022) 111268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>
- Zamberlin Š., Antunac N., Havranek J., Samaržija D. Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo.* 62 (2012) 111–125.

- Zhang X., Zuo Z., Yu P., Li T., Guang M., Chen Z. Rice peptide nanoparticle as a bifunctional food-grade pickering stabilizer prepared by ultrasonication: Structural characteristics, antioxidant activity, and emulsifying properties. *Food Chem.* 343 (2021d) 1-33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128545>
- Zhao Y., Grout B.W., Crisp, P. Variations in morphology and disease susceptibility of micropropagated rhubarb (*Rheum rhabonticum*) PC49, compared to conventional plants. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 82 (2005), 357–361. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-1836-z>
- Zhou Y.X., Zhang R.Q., Rahman K., Cao Z.X., Zhang H., Peng C. Diverse pharmacological activities and potential medicinal benefits of geniposide. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* (2019) 4925682. <https://doi.org/10.1155/2019/4925682>

SPISAK SLIKA PRIKAZANIH U DISERTACIJI

Slika 1 Rod <i>Centaurium</i> Hill (S.L.) (https://gobotany.nativeplanttrust.org/genus/centaurium/)	17
Slika 2 Rod <i>Zeltnera</i> Mans, <i>Schenkia</i> Griseb., <i>Gyrandra</i> Griseb.	18
Slika 3 <i>C. erythraea</i> u fazi cvetanja (Mediflora, 2016).....	22
Slika 4 Mapa distribucije <i>C. erythraea</i> u Evropi i regionu Mediterana (2018) (Mifsud, 2022)	22
Slika 5 <i>C. erythraea</i> (Botanical Illustration Collection, 2004).....	23
Slika 6 Najrasprostranjeniji sekoiridoidni glikozidi u vrstama <i>Centaurium</i> (El Menyiy i sar., 2021) ...	25
Slika 7 Hemijske strukture fenolnih kiselina (Valentão i sar., 2001)	29
Slika 8 Hemijska struktura ksantona (Valentão i sar., 2002).....	30
Slika 9 Šematski prikaz BBD sa tri faktora (Xu i sar., 2023)	45
Slika 10 <i>C. erythraea</i> osušena i samlevena	47
Slika 11 Tečni ekstrakti <i>C. erythraea</i>	49
Slika 12 Određivanje antiradikalske aktivnosti uzoraka a) EtOH b) PPG ekstrakta primenom DPPH testa	55
Slika 13 UHPLC hromatogram infuzije <i>C. erythraea</i> procenjen na osnovu DAD signala na 300 nm ...	58
Slika 14 (-)ESI MS/MS (a) i UV-Vis (b) spektri jedinjenja br. 10 identifikovanog kao sekologanozid	62
Slika 15 (-)ESI MS/MS (a) i UV-Vis (b) spektri jedinjenja br. 11 identifikovanog kao sverozid.....	62
Slika 16 (+)ESI MS/MS (a) i UV-Vis spektar (b) jedinjenja br. 3 identifikovanog kao siringinska kiselina	62
Slika 17 (-)ESI MS/MS (a) i UV-Vis spektar (b) jedinjenja br. 13 identifikovanog kao heksozid kaftarne kiseline	63
Slika 18 (+)ESI MS/MS spektar jedinjenja br. 27 identifikovanog kao izomer dihidroksi-tetrametoksi-ksantona	63
Slika 19 Pareto grafikoni za regresioni model koji opisuje ekstrakciju sa sistemom UE/aEtOH (a) i UE/aPPG (b)	68
Slika 20 Ocena noramlne raspodele ostataka za regresioni model koji opisuje ekstrakciju sa UE/aEtOH sistemom (a) i UE/aPPG sistemom (b). Cook-ova udaljenost za model koji se odnosi na UE/aEtOH sistem (c) i UE/aPPG sistem (d)	70
Slika 21 Uticaj parametara ekstrakcije na SUP za sistem UE/aEtOH.....	71
Slika 22 Uticaj parametara ekstrakcije na SUP za sistem UE/aPPG.....	72

Slika 23 UHPLC hromatogram UE/aEtOH (a) i UE/aPPG (b) ekstrakata procenjen iz DAD signala na $\lambda_{\max} = 320 \text{ nm}$	78
Slika 24 MS/MS spektri genipozida (a), sekoksiloganina (b) i sverozid derivata 2 (c) pronađenih samo u UE/aPPG ekstraktu	82
Slika 25 MS/MS (levo) i UV/VIS (desno) spektri derivata kafeinske kiseline (a), kaempferol-ramnozida (b) i dihidroksi-tetrametoksi-ksantona, izomer 1 (c).....	83
Slika 26 Zavisnost stepena neutralizacije DPPH radikala od koncentracije EtOH ekstrakta kičice	91
Slika 27 Zavisnost stepena neutralizacije DPPH radikala od koncentracije PPG ekstrakta kičice	92
Slika 28 Zavisnost stepena neutralizacije DPPH radikala od koncentracije BHT	92
Slika 29 a) Promena apsorpcionog spektra UE/aPPG ekstrakta kičice sa porastom vremena UV-A ozračivanja; b) Promena apsorbanije na talasnoj dužini 237 nm ($A_{237 \text{ nm}}$); c) Kinetička zavisnost $\ln A$ u funkciji od vremena zračenja 237 nm ($A_{237 \text{ nm}}$); d) Promena apsorbanije na talasnoj dužini 352 nm ($A_{352 \text{ nm}}$) u zavisnosti od vremena UV-A ozračivanja ($t_{\text{irr.}}$) i e) Kinetička zavisnost $\ln A$ u funkciji od vremena zračenja 352 nm ($A_{352 \text{ nm}}$)	95
Slika 30 a) Promena apsorpcionog spektra UE/aEtOH ekstrakta kičice sa porastom vremena UV-A ozračivanja; b) Promena apsorbanije na talasnoj dužini 240 nm ($A_{240 \text{ nm}}$); c) Kinetička zavisnost $\ln A$ u funkciji od vremena zračenja 240 nm ($A_{240 \text{ nm}}$); d) Promena apsorbanije na talasnoj dužini 354 nm ($A_{354 \text{ nm}}$) u zavisnosti od vremena UV-A ozračivanja ($t_{\text{irr.}}$) i e) Kinetička zavisnost $\ln A$ u funkciji od vremena zračenja 354 nm ($A_{354 \text{ nm}}$).....	96

SPISAK TABELA PRIKAZANIH U DISERTACIJI

Tabela 1 Terpenoidi identifikovani u vrstama <i>Centaurium</i> (Šiler & Mišić, 2016).....	26
Tabela 2 Fenoli identifikovani u vrstama <i>Centaurium</i> (Šiler & Mišić, 2016).....	30
Tabela 3 Uticaj faktora na UE (Dabetić, 2023; Flannigan & Suslick, 2010; Paniwnyk, 2017; Santos & Capelo, 2007; Tiwari, 2015)	41
Tabela 4 Parametri kalibracione prave za određivane elemente	50
Tabela 5 Operativni uslovi za ICP-OES	50
Tabela 6 Spisak detektovanih jedinjenja u infuziji <i>C. erythraea</i> UHPLC-DAD-MS/MS analizom	60
Tabela 7 Rezultati analize infuzije. Sadržaj elemenata je prikazan u $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	64
Tabela 8 Matrica Box-Behnken dizajna sa četiri faktora za sistem UE/aEtOH	66
Tabela 9 Matrica Box-Behnken dizajna sa četiri faktora za sistem UE/aPPG	67
Tabela 10 ANOVA predloženog regresionog modela za sistem UE/aEtOH.....	69
Tabela 11 ANOVA predloženog regresionog modela za sistem UE/aPPG.....	69
Tabela 12 Skupovi podataka za validaciju za predložene regresione modele sa eksperimentalnim i predviđenim SUP	75
Tabela 13 Bibliografski podaci o efikasnosti različitih metoda ekstrakcije u odnosu na SUP iz nadzemnih delova kičice	76
Tabela 14 Lista detektovanih jedinjenja u ekstraktima dobijenim pod optimalnim uslovima korišćenjem UE/aEtOH i UE/aPPG sistema.....	79
Tabela 15 Rezultati analize UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta. Sadržaj elemenata je prikazan u $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	85
Tabela 16 Poređenje predloženih metodologija UE.....	88
Tabela 17 Rezultati animikrobnog testiranja ekstrakata UE/aPPG i UE/aEtOH.....	89
Tabela 18 EC_{50} vrednosti uzoraka UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta kičice dobijenih primenom DPPH testa	91
Tabela 19 Konstante brzine degradacije UE/aEtOH i UE/aPPG ekstrakta praćene smanjenjem maksimuma apsorpcije na odgovarajućim talasnim dužinama	97

BIOGRAFIJA AUTORA

Valentina Nikolić rođena je 7.5.1991. godine u Leskovcu, gde je završila osnovnu školu „Vuk Karadžić“ završila je u Leskovcu sa odličnim uspehom i Vukovom diplomom. Godine 2006. upisala je srednju Medicinsku školu u Leskovcu i završila sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet, studijski program Farmacija, u Nišu, upisala je 2010. godine. Integrisane akademske studije drugog stepena završava u roku sa prosečnom ocenom 8,17 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Stiće akademski naziv Magistar farmacije.



Tokom studija učestvovala je na 6. Nacionalnom kongresu studenata farmacije na Zlatiboru 2013. godine sa temom: „Farmaceutska delatnost – šanse i izazovi 7. Nacionalnom kongresu studenata farmacije na Zlatiboru 2014. godine sa temom: „Farmacija budućnosti – novi pristupi starim izazovima“. Bavila se naučno-istraživačkim radom u toku studija. U okviru 55. Kongresa studenata biomedicinskih nauka Srbije održanim u Vrnjačkoj Banji 2014. godine, imala je jedan autorski rad sa temom: „Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata biljne vrste *Cachrys cristata* DC. “ i jedan koautorski rad sa temom: „Antimikrobna aktivnost ekstrakata biljne vrste *Eryngium serbicum*“.

Doktorske studije na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, studijski program Tehnološko inženjerstvo, upisala je 2017. godine i položila sve ispite sa prosečnom ocenom 10. Autor je jednog rada koji je objavljen u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a), jednog rada u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja M24, tri saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M34), i dva saopštenja sa nacionalnog skupa štampano u izvodu (M64).

Nakon završetka Medicinskog fakulteta, studijski program Farmacija, 2015. godine i polaganja stručnog ispita, profesionalnu karijeru započela je 2016. godine u Apotekarskoj ustanovi, gde je radila kao odgovorni farmaceut i šef apoteke. Karijeru je 2022. godine nastavila u farmaceutsko-hemijskoj industriji „Zdravlje Leskovac AD“ gde je radila kao odgovorna osoba za procese u Sektoru proizvodnje, sa zaduženjem za nadzor proizvodnih procesa, usklađenost sa standardima kvaliteta i implementaciju GMP standarda, a od 2023. godine obavlja funkciju Supervizora proizvodnje, gde je odgovorna za organizaciju timova, optimizaciju i validaciju proizvodnih procesa i postizanje proizvodnih ciljeva uz obezbeđenje sigurnosti i efikasnosti proizvodnog procesa.

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

**ОПТИМИЗАЦИЈА ПОСТУПКА УЛТРАЗВУЧНЕ ЕКСТРАКЦИЈЕ БИОАКТИВНИХ
ЈЕДИЊЕЊА ИЗ КИЧИЦЕ (*Centaurium erythraea* Rafn) ВОДЕНИМ РАСТВОРИМА
ПРОПИЛЕН-ГЛИКОЛА И ЕТАНОЛА**

која је одбрањена на Технолошком факултету у Лесковцу, Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Лесковцу, _____ .

Потпис аутора дисертације:

(Валентина Г. Николић)

Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**ОПТИМИЗАЦИЈА ПОСТУПКА УЛТРАЗВУЧНЕ ЕКСТРАКЦИЈЕ БИОАКТИВНИХ
ЈЕДИЊЕЊА ИЗ КИЧИЦЕ (*Centaurium erythraea* Rafn) ВОДЕНИМ РАСТВОРИМА
ПРОПИЛЕН-ГЛИКОЛА И ЕТАНОЛА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Лесковцу, _____ .

Потпис аутора дисертације:

(Валентина Г. Николић)

Изјава 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ОПТИМИЗАЦИЈА ПОСТУПКА УЛТРАЗВУЧНЕ ЕКСТРАКЦИЈЕ БИОАКТИВНИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗ КИЧИЦЕ (*Centaurium erythraea* Rafn) ВОДЕНИМ РАСТВОРИМА ПРОПИЛЕН-ГЛИКОЛА И ЕТАНОЛА

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучила.

1. Ауторство **(CC BY)**
2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде **(CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство– некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство –без прераде **(CC BY-ND)**
6. Ауторство–делити под истим условима **(CC BY-SA)**

У Лесковцу, _____ .

Потпис аутора дисертације:

(Валентина Г. Николић)