



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



Marijana S. Vladimirov

**Hemijska karakterizacija i analiza
biološke aktivnosti izolata iz breze
(*Betula pendula* Roth.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2026.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC



Marijana S. Vladimirov

**Chemical characterization and analysis of
biological activity of isolates from birch
(*Betula pendula* Roth.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2026.

MENTOR:

Prof. dr Vesna Nikolić, redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Ljiljana Stanojević, redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Dr Jelena Stanojević, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Dr Ana Dinić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Dr Sanja Stojanović, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu
Medicinski fakultet, Niš

Datum odbrane: _____

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	prof. dr Vesna Nikolić, redovni profesor Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu
Naslov:	Hemijska karakterizacija i analiza biološke aktivnosti izolata iz breze (<i>Betula pendula</i> Roth.)
Rezime:	Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije obuhvataju ispitivanje hemijskog sastava, bioloških aktivnosti, kao i mogućnosti poboljšanja svojstava bioaktivnih jedinjenja iz breze (<i>Betula pendula</i> Roth.). U tu svrhu upotrebljen je različit polazni biljni materijal, uključujući pupoljke, sok, list i koru breze. Pored toga, pripremljeni su inkluzioni kompleksi standarda bioaktivnih triterpena iz kore breze, betulina (BE) i betulinske kiseline (BK), sa hidroksipropil-β-ciklodekstrinom (HP-β-CD), pri čemu je ispitana i njihova biološka aktivnost. Za izolaciju etarskih ulja iz pupoljaka i lista breze primenjen je postupak hidrodestilacije po Clevenger-u. Izolacija bioaktivnih jedinjenja iz kore i lista breze je izvršena Soxhlet ekstrakcijom, uz upotrebu 96% etanola. Sok dobijen iz stabla breze je ekstrahovan dietil-etrom i etil-acetatom, nakon čega su ekstrakti upareni do suva na vakuum-uparivaču. Karakterizacija izolata iz breze sprovedena je metodom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS). U ekstraktu kore breze identifikovani su bioaktivni triterpeni betulin i lupeol (LU). Za određivanje sadržaja mikro- i makroelemenata u soku breze korišćena je ICP-OES metoda. Mineralni sastav soka breze ukazao je na relativno visok sadržaj makroelemenata kalijuma ($58,79 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) i kalcijuma ($47,21 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), dok je od mikroelemenata najzastupljeniji bio mangan ($25,72 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kore i lista, i u soku breze određen je Folin-Ciocalteu metodom. Utvrđeno je da ekstrakt lista breze sadrži najviše fenola, dok je najmanji sadržaj zabeležen u ekstraktu soka. Ukupni flavonoidi su detektovani samo u ekstraktu lista breze. Inkluzioni kompleksi betulina i betulinske kiseline sa hidroksipropil-β-ciklodekstrinom pripremljeni su koprecipitacionom metodom, u cilju povećanja njihove rastvorljivosti u vodi. Kompleksi su okarakterisani primenom različitih instrumentalnih tehnika (FTIR, SEM, XRD, DSC) koje su potvrdile uspešnu inkluziju BE i BK u šupljine ciklodekstrina. Usled povećane rastvorljivosti u vodi, inkluzioni kompleks BE:HP-β-CD ispoljio je jaču antioksidativnu aktivnost, u poređenju sa čistim betulinom. Nasuprot tome, betulinska kiselina je u inkluzionom kompleksu pokazala slabiju antioksidativnu aktivnost, što se može pripisati jačim interakcijama njenih funkcionalnih grupa sa HP-β-CD. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja određena je disk-difuzionom metodom, dok je antimikrobna aktivnost ekstrakata i inkluzionih kompleksa određena mikrodilucionom metodom. Etarsko ulje lista breze pokazalo je širi spektar antimikrobne aktivnosti u poređenju sa etarskim

uljem pupoljaka breze. Ekstrakti kore breze ispoljili su jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakte lista, dok sok breze nije pokazao antimikrobnu aktivnost na testirane mikroorganizme. Betulin, betulinska kiselina i inkluzioni kompleksi nisu pokazali antimikrobnu aktivnost na testirane bakterije, dok je zabeleženo dejstvo betulinske kiseline i kompleksa BK:HP- β -CD na gljivicu *Candida albicans*, pri čemu je betulinska kiselina u inkluzionom kompleksu pokazala izraženiju aktivnost.

Antioksidativna aktivnost izolata i formulacija određena je primenom DPPH testa. Dobijene EC₅₀ vrednosti ukazuju na to da najveću antioksidativnu aktivnost ispoljava ekstrakt lista breze, a zatim ekstrakt kore breze, dok je u ekstraktu soka breze zabeležena najmanja antioksidativna aktivnost.

Ispitivanje efekata ekstrakta kore breze, soka breze, BE, BK i inkluzionih kompleksa BE i BK na vijabilnost i proliferaciju MDCK ćelija u kulturi *in vitro* izvršeno je primenom MTT testa. Uočen je stimulatorni efekat ispitivanih koncentracija soka breze na vijabilnost i proliferaciju ćelija, dok je ekstrakt kore breze, u određenim koncentracijama delovao citotoksično i anti-proliferativno. Betulin i betulinska kiselina pokazali su citotoksični i anti-proliferativni koncentracijski-zavisani efekat, sa izraženijim efektom betulina, a ovaj trend je uočen i u slučaju inkluzionih kompleksa BE:HP- β -CD i BK:HP- β -CD, dok kompleksirajući agens (HP- β -CD), nije ispoljio ovakve efekte, u ispitivanim koncentracijama.

Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast:	Hemija i hemijske tehnologije
Ključne reči:	Breza, <i>Betula pendula</i> , betulin, betulinska kiselina, inkluzioni kompleksi antimikrobna aktivnost, antioksidativna aktivnost, MTT test, MDCK ćelijska linija
UDK:	615.322 : 582.631.1 : 543.5 (043.3)
CERIF klasifikacija:	T 410 Farmaceutska i srodne tehnologije
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	prof. dr Vesna Nikolić, professor Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš
Title:	Chemical characterization and analysis of biological activity of isolates from birch (<i>Betula pendula</i> Roth.)
Abstract:	Research conducted within this doctoral dissertation includes the examination of the chemical composition, biological activities, as well as the potential for improving the properties of bioactive compounds derived from birch (<i>Betula pendula</i> Roth). For this purpose, different types of starting plant material were used, including birch buds, sap, leaves, and bark. In addition, inclusion complexes of standards of bioactive triterpenes from birch bark, betulin (BE) and betulinic acid (BA), with hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) were prepared, and their biological activity was also evaluated. Essential oils from birch buds and leaves were isolated by Clevenger-type hydrodistillation. Isolation of bioactive compounds from birch bark and leaves was performed by Soxhlet extraction, using 96% ethanol. The sap obtained from the birch tree was extracted by diethyl-ether and ethyl-acetate, after which the extracts were evaporated to dryness under reduced pressure using a rotary vacuum evaporator. The characterization of birch isolates was performed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The bioactive triterpenes betulin and lupeol (LU) were identified in the birch bark extract. The content of micro- and macroelements in birch sap was determined using ICP-OES method. The mineral composition of birch sap indicated a relatively high content of the macroelements potassium (58.79 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) and calcium (47.21 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$), while the most abundant microelement was manganese (25.72 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). The total phenolic and flavonoid content in bark and leaf extracts, as well as in birch sap, were determined using the Folin-Ciocalteu method. It was found that the leaf extract contained the highest amount of total phenolics, whereas the lowest content of total phenolics was recorded in the sap extract. Total flavonoids were detected only in the birch leaf extract. Inclusion complexes of betulin and betulinic acid with hydroxypropyl-β-cyclodextrin were prepared by the coprecipitation method, in order to improve their water solubility. The complexes were characterized using various instrumental techniques (FTIR, SEM, XRD, DSC), which confirmed the successful inclusion of BE and BA into the cavities of cyclodextrin. Due to the increased water solubility, the BE:HP-β-CD inclusion complex exhibited stronger antioxidant activity compared to pure betulin. In contrast, betulinic acid showed lower antioxidant activity in the inclusion complex, which may be attributed to stronger interactions of its functional groups with HP-β-CD.

The antimicrobial activity of essential oils was determined by the disk diffusion method, while the antimicrobial activity of extracts and inclusion complexes was determined using the microdilution method. Birch leaf essential oil exhibited a broader spectrum of antimicrobial activity compared to birch bud essential oil. Birch bark extracts showed stronger antimicrobial activity compared to leaf extracts, while birch sap did not exhibit antimicrobial activity against the tested microorganisms. Betulin, betulinic acid, and their inclusion complexes did not show antibacterial activity against the tested bacterial strains. However, antimicrobial activity of betulinic acid and the BA:HP- β -CD complex was observed against the fungus *Candida albicans*, with more pronounced activity of betulinic acid in the inclusion complex.

The antioxidant activity of isolates and formulations was evaluated by the DPPH assay. The obtained EC₅₀ values indicate that the birch leaf extract exhibits the highest antioxidant activity, followed by the birch bark extract, while the lowest antioxidant activity was recorded in the birch sap extract.

The effects of birch bark extract, birch sap, BE, BA, and the inclusion complexes of BE and BA on the viability and proliferation of MDCK cells *in vitro* were examined using the MTT assay. A stimulatory effect of the tested concentrations of birch sap on cell viability and proliferation was observed, whereas the birch bark extract exhibited cytotoxic and antiproliferative effects, at certain concentrations. Betulin and betulinic acid showed cytotoxic and anti-proliferative concentration-dependent effect, with a more pronounced effect observed for betulin. This trend was also observed in the case of inclusion complexes BE:HP- β -CD and BA:HP- β -CD, while the complexing agent (HP- β -CD) did not exhibit such effects at the tested concentrations.

Scientific Field:	Technological engineering
Scientific Discipline:	Chemistry and chemical technology
Key Words:	Birch, <i>Betula pendula</i> , betulin, betulinic acid, inclusion complexes, antimicrobial activity, antioxidant activity, MTT test, MDCK cell line
UDC:	615.322 : 582.631.1 : 543.5 (043.3)
CERIF Classification:	T 410 Pharmaceutical and related technologies
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

IZRAZI ZAHVALNOSTI

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije odrađen je u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Medicinskog fakulteta u Nišu, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu i Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Iskrenu i najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Vesni Nikolić, redovnom profesoru (Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu) koja je aktivno rukovodila izradom doktorske disertacije. Veliko hvala na ukazanom poverenju, bezrezervnoj pomoći, podršci, stručnim savetima i datoj slobodi tokom svih godina saradnje. Razumevanje, strpljenje i motivacija koju mi je pružala bili su presudni za uspešan završetak rada, dok je svojim znanjem i ljudskim kvalitetima, učinila da saradnja sa njom postane čast i privilegija.

Prof. dr Ljubiši Nikolić, redovnom profesoru (Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu) dugujem veliku zahvalnost za neprocenjivu stručnu pomoć, sugestije i vredne savete koji su doprineli boljem kvalitetu disertacije.

Prof. dr Ljiljani Stanojević, redovnom profesoru (Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu) se neizmerno zahvaljujem za sveobuhvatnu stručnu pomoć, podršku i brojne savete od samog početka mog istraživačkog rada.

Veliku zahvalnost dugujem dr Jeleni Stanojević, vanrednom profesoru (Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu) za izuzetnu pomoć, posvećenost i uspešnu saradnju, naročito pri eksperimentalnom delu koji se odnosi na GC-MS analizu.

Izuzetno mi je bila draga saradnja sa dr Anom Dinić, višim naučnim saradnikom (Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu) i od srca se zahvaljujem na velikoj pomoći, sugestijama, utrošenom vremenu i posvećenosti tokom pisanja ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Bojani Danilović, redovnom profesoru (Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu) na izdvojenom vremenu i saradnji pri ispitivanju mikrobiološke aktivnosti.

Deo mikrobioloških ispitivanja urađen je na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu. Prof. dr Tatjani Mihajilov-Krstev, redovnom profesoru (Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu), dugujem veliku zahvalnost za dragocenu pomoć i savete koji se odnose na ispitivanje mikrobiološke aktivnosti.

Biološke aktivnosti na ćelijskoj kulturi ispitane su u laboratoriji Medicinskog fakulteta u Nišu. Koristim priliku da se zahvalim dr Sanji Stojanović, vanrednom profesoru (Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu) za izuzetnu pomoć, korisne sugestije i uspešnu saradnju pri realizaciji eksperimenata i diskusiji u okviru dela o ćelijskim kulturama.

SEM analiza urađena je na Medicinskom fakultetu u Nišu. Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Stevi Najmanu, redovnom profesoru (Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu) za pristup uređaju, korisne savete, i angažovanje prilikom ispitivanja u okviru SEM analize.

XRD ispitivanja urađena su na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Prof. dr Srđanu Rakiću, redovnom profesoru (Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu) i prof. dr Mirjani Popsavin, redovnom profesoru u penziji (Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu) se zahvaljujem na velikoj pomoći, izdvojenom vremenu i trudu koji su uložili u okviru XRD ispitivanja.

I na kraju, veliko hvala mojoj porodici, roditeljima i bratu na pruženoj podršci, razumevanju i strpljenju tokom svih ovih godina. Posebnu zahvalnost dugujem svojim kćerkama, Heleni i Hristini, koje su svojom безусловnom ljubavlju i osmesima bile moj neiscrpan izvor snage i najlepša motivacija da ovaj rad privedem kraju. One su moj najveći podstrek da uvek težim višem i boljem.

Marijana Vladimirov

¹³ C-NMR	nuklearna magnetna rezonancija ugljenika-13
BE	betulin
BK	betulinska kiselina
DPPH	1,1-difenil-2-pikril hidrazil
DSC	diferencijalna skenirajuća kalorimetrija
EEKB	etanolni ekstrakt kore breze
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom
GC	gasna hromatografija
GC-FID	gasna hromatografija-plameno jonizujuća detekcija
GC-MS	gasna hromatografija-masena spektrometrija
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi
HP-β-CD	hidroksipropil-beta-ciklodekstrin
HS-SPME	mikroekstrakcija na čvrstoj fazi
ICP-OES	optička emisiona spektroskopija sa indukovanom kuplovanom plazmom
LC-MS	tečna hromatografija-masena spektrometrija
LU	lupeol
MDCK	ćelijska linija epitela tubula bubrega psa
ROS	reaktivne kiseonične vrste
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
TEEBK	talog u etanolnom ekstraktu kore breze
TNF	faktori tumorske nekroze
UV	ultraljubičast
UV-VIS	spektroskopija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti
XRD	difrakcija X-zraka

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ciljevi istraživanja	4
2. TEORIJSKI DEO	5
2.1. Opis, sistematika i rasprostranjenost breze (<i>Betula pendula</i> Roth.)	5
2.2. Tradicionalna upotreba breze	8
2.3. Hemijski sastav izolata i delova breze	10
2.3.1. Pupoljci breze	10
2.3.1.1. Hemijski sastav etarskog ulja pupoljaka breze	12
2.3.2. Sok breze	17
2.3.3. List breze	19
2.3.4. Kora breze	23
2.3.4.1. Biološki aktivna jedinjenja spoljašnje kore breze	28
2.3.4.1.1. Betulin	28
2.3.4.1.2. Betulinska kiselina	31
2.3.4.1.3. Lupeol	35
2.4. Ciklodekstrini i inkluzioni kompleksi	36
2.4.1. Struktura i primena ciklodekstrina	36
2.4.2. Inkluzioni kompleksi	38
3. EKSPERIMENTALNI DEO	40
3.1. Materijali i metode	40
3.1.1. Biljni materijal	41
3.1.2. Hemikalije i reagensi	41
3.1.3. Ekstrakcija	43
3.1.3.1. Ekstrakcija po Soxhlet-u	43
3.1.3.2. Ekstrakcija tečno-tečno	44
3.1.3.3. Digestija	44
3.1.3.4. Uparavanje soka breze	44
3.1.4. Hidrodestilacija	44
3.1.4.1. Izolovanje etarskog ulja po Clevenger-u	44
3.1.5. Priprema inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša	45
3.1.6. Metode karakterizacije	46
3.1.6.1. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) i gasna hromatografija sa plameno-jonizujućom detekcijom (GC-FID)	46
3.1.6.2. Optička emisiona spektroskopija sa indukovano-kuplovanom plazmom (ICP-OES)	48
3.1.6.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	48
3.1.6.4. Difrakcija rendgenskih zraka (XRD)	48
3.1.6.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	49
3.1.6.6. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	49
3.1.6.7. Ispitivanje fazne rastvorljivosti	49
3.1.6.8. Određivanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida	50
3.1.7. Metode određivanja bioloških aktivnosti	51
3.1.7.1. Antimikrobna aktivnost	51
3.1.7.1.1. Disk-difuziona metoda	51
3.1.7.1.2. Mikrodiluciona metoda	52
3.1.7.2. Antioksidativna aktivnost	53
3.1.7.3. Test vijabilnosti i proliferacije ćelija	54
4. REZULTATI I DISKUSIJA	55
4.1. Ekstrakti iz breze (<i>Betula pendula</i>)	55
4.1.1. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u etanolnim ekstraktima i soku breze	57
4.1.2. Hemijski sastav ekstrakta kore breze	60

4.1.3. Hemijski sastav ekstrakta lista breze	66
4.1.4. Hemijski sastav ekstrakta soka breze	69
4.1.4.1. Analiza mikro i makroelemenata u soku breze	70
4.2. Etarska ulja breze (<i>Betula pendula</i>)	73
4.2.1. Hemijski sastav etarskog ulja pupoljaka breze	73
4.2.2. Hemijski sastav etarskog ulja lista breze	78
4.3. Inkluzioni kompleksi betulina i betulinske kiseline	85
4.3.1. Karakterizacija inkluzionih kompleksa	85
4.3.1.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	85
4.3.1.2. Difrakcija rendgenskih zraka (XRD)	90
4.3.1.3. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	92
4.3.1.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	94
4.3.2. Ispitivanje fazne rastvorljivosti inkluzionih kompleksa	96
4.4. Biološke aktivnosti izolata breze i inkluzionih kompleksa	98
4.4.1. Antimikrobna aktivnost	98
4.4.1.1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja	98
4.4.1.2. Mikrobiološka ispitivanja ekstrakata	102
4.4.1.3. Antimikrobna aktivnost inkluzionih kompleksa	104
4.4.2. Antioksidativna aktivnost	106
4.4.2.1. Antioksidativna aktivnost etarskih ulja	107
4.4.2.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata i soka breze (<i>Betula pendula</i>)	109
4.4.2.3. Antioksidativna aktivnost inkluzionih kompleksa betulina i betulinske kiseline	113
4.4.3. Efekat na vijabilnost i proliferaciju ćelija	116
5. ZAKLJUČAK	124
6. LITERATURA	127
PRILOZI	148
BIOGRAFIJA	150
BIBLIOGRAFIJA	151

1. UVOD

Betula spp. je biljna vrsta iz familije Betulaceae (familija breza) i nastanjuje različita staništa u umerenim i severnim klimatskim zonama. Pripada grupi medicinskih biljaka i u narodu se koristi još od drevnih vremena. *Betula pendula* Roth. je poznata kao bela breza, evropska bela breza ili evropska srebrna breza. Jedna je od najčešćih vrsta iz familije Betulaceae. Prisutna je na teritoriji Evrope i u severnim delovima Azije (Demirci i sar., 2004; Mashentseva i sar., 2011).

Lekovite i aromatične biljke se koriste od davnina. U današnje vreme se prvenstveno primenjuju kao alternativna terapija, iako imaju široku upotrebu u modernoj fitoterapiji. Tokom ljudske istorije, gotovo svaki deo različitih *Betula* vrsta je našao neku medicinsku primenu. Delovi i izolati breze su se koristili u tradicionalnoj medicini u raznim oblicima (herba, ekstrakt, katran, ulje, infuz) kako za unutrašnju, tako i za spoljašnju primenu (Demirci i sar., 2004; Rastogi i sar., 2015).

Različite vrste *Betula* su pomenute u nekoliko farmakopeja uključujući Rusku, Francusku, Evropsku, Nemačku, Ajurvedsku farmakopeju, Indijsku i Jugoslovensku farmakopeju. Nekoliko klasičnih i modernih tekstova, kao i knjiga sadrže monografije koje opisuju botanička, hemijska, farmakološka svojstva i upotrebu vrsta *Betula*. Lekovitim delovima se smatraju kora, list, pupoljci, sok ili njihovi obrađeni proizvodi i koriste se za lečenje bolesti kao što su poremećaji urinarnog trakta, digestivne smetnje, kožne bolesti – ekcem, psorijaza, teške infekcije i upale (Can Başer i Demirci, 2007; Demirci i sar., 2004; Rastogi i sar., 2015).

Izolati vrste *Betula pendula* (bela breza) se, osim u medicinske svrhe, komercijalno koriste u prehrambenoj industriji kao arome i sastojci pojedinih alkoholnih (rum, pivo) i bezalkoholnih pića. Zbog karakterističnog, ugodnog mirisa, izolati breze poput etarskih ulja našli su primenu u kozmetičkim proizvodima za ličnu higijenu (šamponi, sredstva za pranje kože) (Demirci i sar., 2004).

Breza je deo ozbiljnih naučnih istraživanja u sferi ekologije, biologije, medicine, fitohemije i farmakologije. Cilj medicinskih i farmakoloških istraživanja je bliža karakterizacija hemijskog sastava i mehanizama dejstva, kako bi se došlo do šire i sigurnije primene u medicinske i terapijske svrhe. Trenutna saznanja svrstavaju brezu u grupu obećavajućih izvora bioaktivnih jedinjenja.

Fitohemijaska istraživanja pokazuju prisustvo velikog broja različitih bioaktivnih jedinjenja, uglavnom fenola, flavonoida, tanina, saponina, glikozida, sterola i terpena. Uprkos širokoj upotrebi breze u narodnoj i konvencionalnoj medicini, postojeće informacije o hemijskom sastavu različitih delova i izolata nisu dovoljne za medicinsku upotrebu. Do sada je u određenoj meri istražen hemijski sastav izolata iz pupoljaka, lista, kore i soka breze. Neophodna su detaljna fitohemijaska istraživanja za razumevanje bioloških aktivnosti, kao i mehanizama dejstva izolata breze (Can Başer i Demirci, 2007; Demirci i sar., 2004; Krasutsky, 2006; Mashentseva i sar., 2011; Rastogi i sar., 2015).

Pupoljci breze (*Betulae gemmae*) sadrže relativno visok sadržaj isparljivog etarskog ulja (0,5-3,8%). Postupci izolacije obuhvataju metode destilacije (hidrodestilacija i mikrodestilacija), metode ekstrakcije i metode simultane destilacije-ekstrakcije. Za identifikaciju jedinjenja se prvenstveno koriste gasna hromatografija (GC) i kombinacija gasne hromatografije i masene spektrometrije (GC-MS). Međutim, postoje znatne poteškoće prilikom interpretacije gasnih hromatograma, zbog činjenice da su etarska ulja obično složene višekomponentne smeše različitih jedinjenja. Mnoga od njih karakterišu slična fizičko-hemijaska svojstva, uključujući retencione hromatografske parametre. Ispitivanja bioloških aktivnosti etarskog ulja breze su usmerena na njihovu antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost (Demirci i Can Başer, 2003; Demirci i sar., 2004; Stanković i Stanojević, 2014).

Sok breze se još od davnih vremena koristi u tradicionalnoj medicini protiv prehlade, kao stimulator apetita, kod bubrežnih bolesti i topikalno za poboljšanje rasta kose. Sok se sakuplja u proleće, bušenjem stabala breze. Analiza se vrši klasičnim analitičkim metodama: tečna hromatografija visokih performansi (HPLC), GC-MS, optička emisiona spektroskopija sa indukovanom kuplovanom plazmom (ICP-OES). Rezultati većeg broja studija ukazuju da sok breze sadrži prirodne šećere (glukozu, fruktozu, saharozu), minerale (natrijum, kalcijum, kalijum, gvožđe), preko deset organskih kiselina, etarsko ulje, vitamine A i C, vitamine B kompleksa, biološki aktivna jedinjenja (fenole, flavonoide, saponine, tanine, glikozide) (Kūka i sar., 2013; Łuczaj i sar., 2014; Mashentseva i sar., 2011).

List breze (*Betulae folium*) se od davnina koristi uglavnom kod bolesti urinarnog trakta, infekcija i inflamacija (upala). Prema Evropskoj Medicinskoj Agenciji, list breze je tradicionalni lek koji povećava količinu urina i pomaže ispiranje urinarnog trakta. Koristi se kao pomoćno sredstvo kod blažih infekcija (Raal i sar., 2015). Prema 7. Evropskoj farmakopeji, osušeni listovi breze se celi ili samleveni upotrebljavaju u medicinske svrhe (Orav i sar., 2011). List najvećim delom sadrži fenolna jedinjenja (uglavnom flavonolne glikozide). Osim fenola, prisutni su i lignani, diarilheptanoidi i triterpenski alkoholi. Sadrži

takođe i etarsko ulje (0,04-0,63%), vitamine (2-8%) i to askorbinsku i nikotinsku kiselinu, karotene, kumarin, tanine (5-9%), saponine (do 3,2%), sterole (Demirci i sar., 2000; Lavrenev i Lavrenev, 1999; Turova i sar., 1987). Zbog kompleksnog sastava lista, različite su i oblasti upotrebe, a dalja istraživanja su neophodna radi boljeg razumevanja bioloških svojstava i aktivnosti, kao i potencijalne primene u terapijske svrhe.

Kora breze (*Betulae cortex*) sadrži jedinjenja sa najvećim brojem bioloških aktivnosti, i svakako je deo biljke koji se najintenzivnije proučava. Ekstrakti spoljašnje kore sadrže pentaciklične triterpene tipa lupana (više zastupljeni) i oleana (manje zastupljeni), koji su najzanimljiviji za upotrebu kao bioaktivna jedinjenja. Najzastupljenija jedinjenja su betulini (BE), lupeol (LU) i betulinska kiselina (BK). Trenutna istraživanja i primene su u sferi farmaceutske i kozmetičke industrije. Triterpenima (prirodnim i sintetskim) se pridaje sve veći značaj kao potencijalnim antikancerogenim agensima, što podržavaju ubedljivi dokazi na eksperimentalnim životinjama. BE i BK imaju i druga farmakološka dejstva (antivirusno – protiv virusa gripa i HIV virusa, antiinflamatorno, antialergijsko, hepatoprotektivno, hipolipemično i antituberkulotsko), što je potvrđeno velikim brojem eksperimentalnih studija (Hordyjewska i sar., 2019; Kosyakov i sar., 2014; Krasutsky, 2006; Rastogi i sar., 2015).

Farmakološke studije podržavaju neke od tradicionalnih upotreba ove biljne vrste, kao i upotrebu u lečenju hroničnih bolesti. Na osnovu literaturne pretrage objavljenih istraživanja, može se zaključiti da izolati breze poseduju antiinflamatornu, imunomodulatornu, antikancerogenu, antioksidativnu, antimikrobnu i antivirusnu aktivnost. Biološka aktivnost biljnog materijala (antioksidativna, antimikrobna) je često uzrokovana kombinacijom više supstanci sa različitim mehanizmima dejstva, uključujući sinergističke interakcije. Stoga je za medicinsku upotrebu potrebno istražiti celokupan kompleks ovih jedinjenja (Isidorov i sar., 2015; Rastogi i sar., 2015). Takođe je potrebno proučiti biohemijske i fiziološke mehanizme, kao i pretkliničku toksičnost, bioraspoloživost, farmakokinetiku i farmakodinamiku aktivnih supstanci.

Iako je breza veoma rasprostranjena i poznata u Srbiji prvenstveno sa aspekta tradicionalne medicine, postoji malo literaturnih podataka o fitohemijskom sastavu ove biljne vrste sa teritorije Srbije. Imajući to u vidu, evidentna je potreba za detaljnom karakterizacijom hemijskog sastava izolata breze, u cilju izrade fitopreparata za medicinsku primenu.

1.1. Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je optimizacija postupaka za dobijanje različitih izolata, određivanje hemijskog sastava i ispitivanje biološke aktivnosti izolata iz biljne vrste breza (*Betula pendula* Roth.). Rezultati istraživanja su naučno potvrdili biološke efekte izolata iz bele breze i dali osnov za potencijalnu upotrebu ove biljne vrste u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji.

U skladu sa navedenim, specifični ciljevi naučnog istraživanja su:

- izolacija etarskog ulja iz pupoljaka breze, određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava i proučavanje biološke aktivnosti etarskog ulja;
- određivanje sadržaja mikro- i makroelemenata, kao i drugih prisutnih komponenti u sakupljenom soku iz stabla breze i proučavanje biološke aktivnosti soka;
- izolacija etarskog ulja iz lista breze, određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava i proučavanje biološke aktivnosti etarskog ulja;
- ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja iz lista breze, hemijska karakterizacija i određivanje biološke aktivnosti ekstrakta lista breze;
- ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja iz spoljašnje kore breze, identifikacija bioaktivnih jedinjenja i određivanje biološke aktivnosti ekstrakta spoljašnje kore breze;
- ispitivanje biološke aktivnosti betulina i betulinske kiseline;
- inkorporacija betulina i betulinske kiseline u odgovarajuće formulacije i ispitivanje biološke aktivnosti formulacija;
- ispitivanje efekta soka breze na vijabilnost i proliferaciju MDCK ćelija u kulturi *in vitro*;
- ispitivanje efekta ekstrakta kore breze na vijabilnost i proliferaciju MDCK ćelija u kulturi *in vitro*;
- ispitivanje efekta betulina, betulinske kiseline i inkluzionih kompleksa sa betulinom i betulinskom kiselinom na vijabilnost i proliferaciju MDCK ćelija u kulturi *in vitro*.

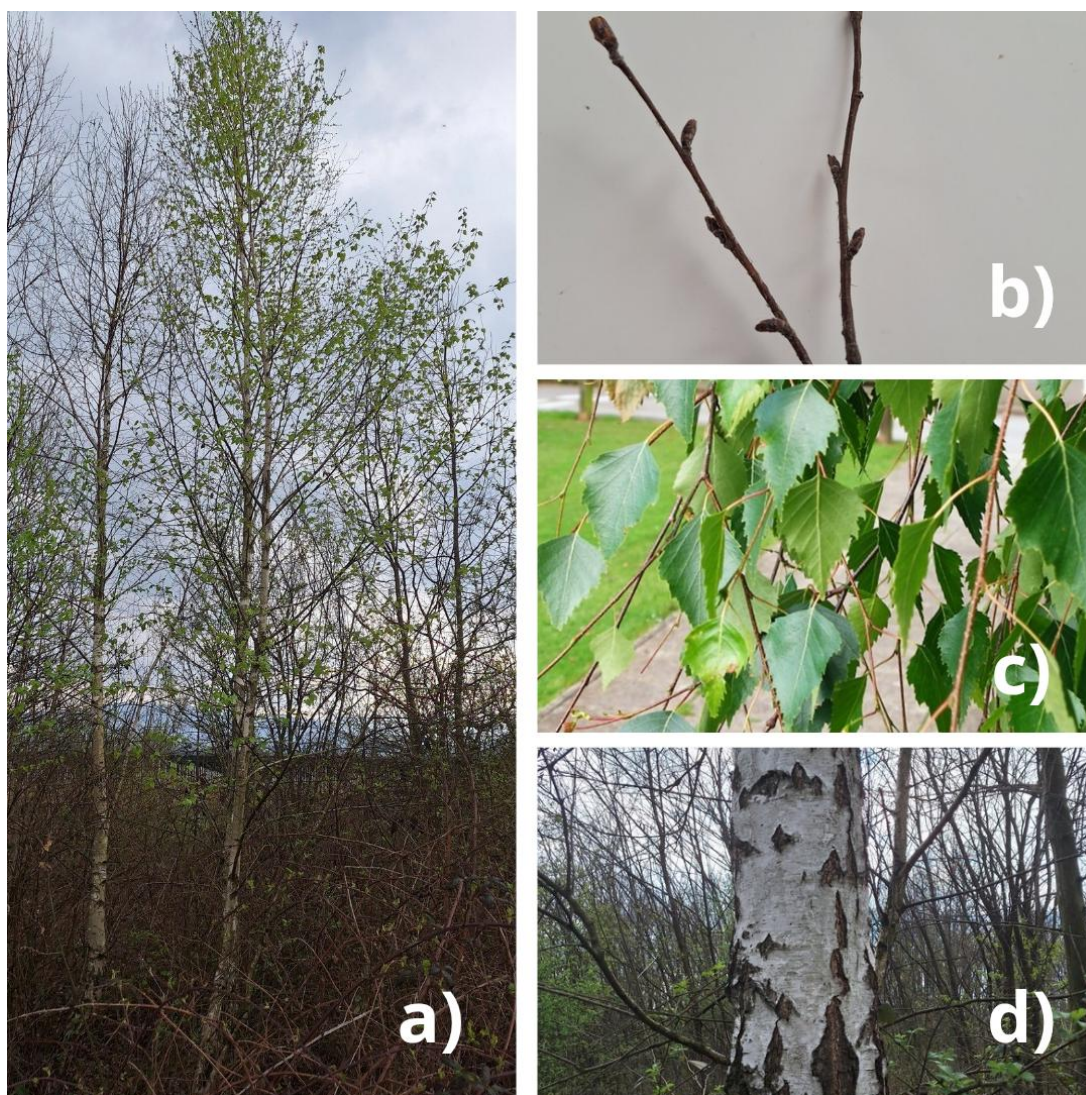
2. TEORIJSKI DEO

2.1. Opis, sistematika i rasprostranjenost breze (*Betula pendula* Roth.)

Betula (Betulaceae), breza, je drvo ili grm nalik drvetu. Vrsta je široko rasprostranjena u regijama sveta sa umerenom klimom. Opisan je veliki broj vrsta breze, a *World flora online* trenutno sadrži 502 naučna naziva biljnih vrsta iz porodice Betulaceae. Od toga je prihvaćeno 88 naziva (<http://www.worldfloraonline.org>).

Betula pendula Roth. je prihvaćen naziv za vrstu iz porodice Betulaceae, roda *Betula*. Nazivaju je još i bela breza, Evropska bela breza i srebrna breza. Bela breza je drvo srednje veličine, do 30 m visine, sa jednim ili više stabala. Životni vek joj je obično oko 100 godina, ali u povoljnim uslovima može živeti i do 150 godina (Beck i sar., 2016; Mashentseva i sar., 2011; OECD, 2006). Kora mladih stabala je svetlo braon boje, a starenjem se boja pretvara u srebrno-belu, sa horizontalnim tamnosivim lenticelama, koje vremenom potamne i razvijaju se u pukotinu. Grane mogu biti opušteno, rastu u širini ili uzlazno, ali konstantno izlaze iz stabla. Izdanci su goli, bez dlaka, braon boje, sa bledim vrhovima (1 mm u prečniku), posebno na mladim grančicama. Pupoljci nisu lepljivi. Lisna ploča je dužine 2-2,5 cm, glatka, ovalno-deltoidna, baza je skraćena ili široko klinasta, ivica je dvostruko nazubljena sa primarnim zupcima koji su veoma izraženi i zakrivljeni prema vrhu lista. Biljka je jednodomna sa muškim i ženskim cvetovima koji se razvijaju kao nehermafroditne rese, koje oprašuje vetar. Muške rese se razvijaju u letnjim mesecima, a polen daju sledećeg proleća, nekoliko dana nakon što se ženski cvetovi pojave. Ženske rese su manje, kraće i više uspravne u odnosu na duže, viseće i grupisane muške rese. Ženske rese se razvijaju u plodove koji su agregati cilindričnog oblika dužine od 1 do 4 cm i 6 mm širine. Na kraju svake sezone, u avgustu, raspršuju stotine malih krilatih plodova, a njihova količina varira u odnosu na starost drveta i uslove staništa. U gušćim staništima, breze ne cvetaju prvih 20-25 godina, ali usamljena stabla mogu dati cvet već od desete godine. Iako cvetaju svake godine, upotrebljivo seme obično proizvode tek svake 2-3 godine (Beck i sar., 2016).

Na slici 1 je prikazana bela breza (u daljem tekstu breza), i delovi biljke korišćeni u istraživanjima koja su predmet ove Doktorske disertacije.



Slika 1. a) Bela breza (*Betula pendula* Roth.), b) pupoljci bele breze, c) list bele breze i d) kora bele breze

Breza se svrstava u sledeće taksonomske kategorije (<http://www.iucnredlist.org>):

- Vrsta *Betula pendula*
- Rod *Betula*
- Familija Betulaceae
- Red Fagales
- Klasa Magnoliopsida
- Razdeo Tracheophyta
- Carstvo Plantae

Sinonimi za biljnu vrstu *Betula pendula* su (<http://www.worldfloraonline.com>):

- *Betula alba* var. *microphylla* Wallr.
- *Betula alba* var. *microphylla* Wimm.
- *Betula alba* var. *pendula* (Roth) St.-Lag.
- *Betula alba* var. *pendula* (Roth) W.T.Aiton
- *Betula alba* var. *pendula* M.E.Jones
- *Betula alba* var. *songarica* Dippel
- *Betula alba* var. *urticifolia* Spach
- *Betula alba* var. *verrucosa* (Ehrh.) Wallr.
- *Betula pendula* f. *dalecarlica* (L.f.) C.K.Schneid.
- *Betula pendula* f. *fastigiata* (Clemenc.) Dippel
- *Betula pendula* var. *pendula*
- *Betula verrucosa* f. *dalecarlica* L.f.
- *Betula verrucosa* f. *elegans* Dippel
- *Betula verrucosa* var. *bircalensis* Mela
- *Betula verrucosa* f. *serrata* Möerner

U njene podvrste spadaju: *Betula pendula* subsp. *mandshurica* (Regel) Ashburner & McAll., *Betula pendula* subsp. *pendula* i *Betula pendula* subsp. *szechuanica* (C.K.Schneid.) Ashburner & McAll (<http://www.worldfloraonline.com>).

Breza je prirodno široko rasprostranjena i raste na više kontinenata: u Severnoj Africi, nekim delovima Azije, velikom delu Evrope, Severnoj Americi i nekim delovima Južne Amerike. Ljudskim faktorom je nastanjena u Australiji i nekim područjima Severne i Južne Amerike (<http://www.worldfloraonline.com>). Što se tiče evropskog kontinenta, severno raste do centralnog Sibira, južno do Iberijskog poluostrva, južne Italije i Grčke. Može se naći i u severnim delovima Azije, do Ohotskog i Japanskog mora na istoku i planina centralne Azije na jugu (OECD, 2006). Zbog široke rasprostranjenosti, pokazuje veliku morfološku varijabilnost i opisano je više podvrsta i varijeteta. U većini delova Evrope je simpatrična vrsta i može se prirodno hibridizovati, dajući potomstvo sa sličnim morfološkim osobinama (Beck i sar., 2016; Rastogi i sar., 2015).

Breza takođe može generisati poliploidne oblike. Ova osobina, povezana sa varijabilnošću, hibridizacijom i uvođenjem veštački razmnoženih sorti, van prirodnih staništa, značajno komplikuje identifikaciju i taksonomsku klasifikaciju celog roda *Betula* (Beck i sar., 2016).

2.2. Tradicionalna upotreba breze

Tradicionalno se različite vrste *Betula* koriste u lečenju u različitim delovima sveta, a najčešće se primenjuju sok i infuzi breze. Najrasprostranjenija je upotreba u lečenju koštanih problema, uključujući reumatizam, artritis i giht, kao i u lečenju bolesti bubrega. Zabeležena je upotreba soka breze protiv hepatitisa, intestinalnih parazita i osipa. Eksterno se koristi za rast kose i protiv pega na koži (Rastogi i sar., 2015). U Ruskoj tradicionalnoj medicini se pupoljci breze koriste kao diuretik, ekspektorans, dijaforetik, antiinfektivni agens, kao i u tretmanu rana i gnojnih promena. Jedanaesto izdanje Državne farmakopeje SSSR navodi pupoljke breze kao biljni diuretik (Shikov i sar., 2014).

U tabeli 1 je prikazana etnobotanička upotreba breze u različitim regionima Evrope (Rastogi i sar., 2015).

Tabela 1. Etnobotanička upotreba breze (prevedeno i prilagođeno iz Rastogi i sar., 2015)

Narodni naziv (lokalitet)	Deo koji se upotrebljava	Etnobotanička upotreba
Breza (Zapadni Balkan, Bosna i Hercegovina, Jugoistočna Evropa)	Kora, list	Kod malarične groznice. U kombinaciji sa drugim lekovima protiv oboljenja urogenitalnog trakta: infekcije urinarnog trakta, upale bubrega, bubrežni kamenci i otežana diureza; kod aritmija, za čišćenje krvi, čišćenje pluća; kod reumatizma, artritisa, prehlade i groznice. Kod bolesti urogenitalnog trakta, reumatizma, kožnih problema; kod poremećaja sastava krvi, bolesti respiratornog sistema i infekcija virusom gripa.
Breza (Bosna i Hercegovina)	List, kora	Tečni melem za rast kose i protiv peruti (u kombinaciji sa velikom čičkom (<i>Arctium lappa</i>)). Sok protiv kamena u bubregu. Čaj za bubrežne kamence, reumatizam i čišćenje krvi. Čajna mešavina za infekcije urinarnog trakta (breza (<i>Betula</i>), beli slez (<i>Althaea officinalis</i>), rastavić (<i>Equisetum</i>), žalfija (<i>Salvia</i>), medvede grožde (<i>Uva</i>)). Čaj kod bolesti bubrega (breza (<i>Betula</i>), vrba (<i>Salix</i>), bosiljak (<i>Ocimum</i>), zlatica (<i>Solidago</i>)). Dekokt kod astme (breza (<i>Betula</i>), velika bedrenika (<i>Pimpinella major</i>), bedrenika (<i>Pimpinella saxifraga</i>), petoprsnica (<i>Potentilla</i>), ruta (<i>Ruta</i>)). Dekokt kod otežanog mokrenja (breza (<i>Betula</i>), sapunjača (<i>Saponaria</i>), zlatica (<i>Solidago</i>)). Dekokt protiv reumatizma (breza (<i>Betula</i>), bela topola (<i>Populus alba</i>), crna zova (<i>Sambucus nigra</i>), lipa (<i>Tilia</i>), kopriva (<i>Urtica</i>)). Dekokt kod uvećane slezine (breza (<i>Betula</i>), korijander (<i>Coriandrum</i>)).
Breza (Prokletije, Crna Gora)	List	Kod bakterijskih i inflamatornih bolesti urinarnog trakta i kamena u bubregu. Spoljašnja primena protiv gubitka kose i peruti.

Breza (Bugarska)	Kora	Infuz, dekokt; diuretik, holagog.
Oq qayin (Uzbekistan, Centralna Azija)	Smola	Protiv reumatskih bolova, uzima se 3 puta dnevno tokom 3 nedelje.
Batoula (Liban)	List	Artritis (direktan kontakt kože sa listovima). Artritis i reumatizam (dekokt za pripremu kupke).
Bedoll (Palars, Pirineji, Iberijsko poluostrvo)	Kora, list	Oralno; čaj (infuz ili dekokt) protiv artroze, koristan kod hiperholesterolemije, antihelmintik, antiholagog.
Bidollo betulla, silver birch (centralna i istočna Italija)	Kora	Dekokt; kao kupke, za prevenciju gubitka kose.
	Pupoljci i list	Dekokt; za spoljašnju upotrebu, protiv ožiljaka.
Betulla (Italija)	Kora	Infuz, dekokt; antipiretik, diuretik, holagog, dijaforetik. Infuz, dekokt; protiv kožnih bolesti.
Betulla (severozapadna Toskana, centralna Italija)	Sok i kora	Protiv prehlade. Protiv alopecije (dekokt kore, u kombinaciji sa sokom).
Symida (Solun, Grčka)	List	Infuz, dekokt; kod metaboličkih bolesti, sistemskih bolesti (artritis, reumatizam), kožnih bolesti (celulitis) i urogenitalnih bolesti (diuretik, poremećaji u radu bubrega).
	List	Kod prehlade. Kao kupka; protiv artritisa i reumatizma. Kod kamena u bubregu sa crnom johom (<i>Alnus glutinosa</i>), origanom (<i>Origanum vulgare</i>) i rastavićem (<i>Equisetum arvense</i>). Kod bolesti srca i jetre, flatulencije i bubrežnih bolova, kod kamena u žuči.
Silver birch (Transilvanija, Rumunija)	Kora	Za rane.
	Sok	Kod bolesti bubrega; kao stimulator apetita, kod bolesti jetre i želuca; kod prehlade; kod promrzlina.

2.3. Hemijski sastav izolata i delova breze

Breza sadrži veliki broj bioaktivnih organskih jedinjenja, kao što su terpeni, flavonoidi, katehini, lignani, neka steroidna jedinjenja, procijanidini. Izolati iz različitih delova breze se razlikuju po svom hemijskom sastavu. Hemijski sastav izolata iz istih delova može varirati u zavisnosti od brojnih faktora (načina i tehnika dobijanja, geografskog područja, klimatskih uslova) (Beck i sar., 2016; Rastogi i sar., 2015; Vladimirov i sar., 2019a).

Za sada je donekle istražen hemijski sastav izolata iz pupoljaka, lista, kore i soka breze. Potrebno je izvršiti detaljna fitohemijska istraživanja za razumevanje njihove biološke i farmakološke aktivnosti, kao i mehanizama dejstva.

2.3.1. Pupoljci breze

Pupoljci breze se koriste vekovima unazad, a njihova prednost je da u adekvatnim dozama ne ispoljavaju toksičnost i neželjene efekte, osim prilikom gutanja celih pupoljaka, zbog prisustva etarskog ulja. Tradicionalno se koriste u ruskoj i kineskoj medicini jer se smatra da imaju diuretsko, analgetsko, antiseptično i antiinflamatorno delovanje. Infuzi i dekoti se koriste u stomatologiji i otorinolaringologiji, zbog antiinflamatornih svojstava, kao i u lečenju akutnih respiratornih infekcija (Isidorov i sar., 2018; Shikov i sar., 2014).

Opšte je poznato da hemijski sastav izolata iz biljnih materijala umnogome zavisi od izbora rastvarača i tehnike ekstrakcije. Trenutna znanja o hemijskom sastavu pupoljaka breze su oskudna i baziraju se na svega nekoliko publikacija. Na osnovu dostupne literature, ekstrakti pupoljaka breze najvećim delom sadrže nepolarna biološki aktivna jedinjenja (masne kiseline, sterole, terpene), dok su polarna fenolna jedinjenja prisutna u znatno manjem procentu (Isidorov i sar., 2018; Stanciauskaite i sar., 2022; Yanevich i sar., 2023). Opisano je prisustvo monoterpena, seskviterpena, triterpena, flavonoida, fenilpropanoida, aromatičnih jedinjenja, alifatičnih C₁₆-C₂₈ masnih kiselina i njihovih estara, alifatičnih C₂₀-C₂₈ alkohola i alkana. Najzastupljenija jedinjenja su triterpeni, u koje spadaju BE, BK, damaradien-3-on, dipterokarpol, lupen-20(29)-en-28-al. Seskviterpeni su mnogo manje zastupljeni od triterpena, a do sada je potvrđeno prisustvo β-kariofilena, 6-hidroksi-β-kariofilena i 14-hidroksi-β-kariofilena (Isidorov i sar., 2014; Isidorov i sar., 2018). Od fenolnih jedinjenja su identifikovane *p*-kumarinska kiselina, cimetna kiselina, neohlorogena

kiselina, a od flavonoida apigenin, pinocembrin, kvercetin, kemferol, katehin, cirsimarin, acacetin (Isidorov i sar., 2018; Stanciauskaite i sar., 2022).

Dvojica ruskih autora su u više radova proučavala kvalitativni i kvantitativni sastav ekstrakata iz pupoljaka breze. Ekstrakcija iz pupoljaka je vršena ligarinom. Nakon izvršene ekstrakcije, ligarin je otparen, a zatim je uzorak rastvoren u dietil-etru. Dalja procedura je obuhvatala odvajanje neutralnih jedinjenja od viših masnih kiselina i analizu hromatografskim i spektroskopskim metodama. Prinos jedinjenja rastvorljivih u ligarinu je bio 28,8% u odnosu na ukupnu osušenu masu pupoljaka. Identifikovan je veliki broj jedinjenja: zasićene masne kiseline (C_{16} - C_{28}), nezasićene masne kiseline (linolna i linolenska), β -kariofilen, α -humulen, derivati kariofilena i humulena, komponente epikutikularnih voskova, kao što su *n*-alkani, estri masnih kiselina (C_{16} - C_{28} , čak i onih sa većim brojem C atoma) i masni alkoholi (C_{18} - C_{30} , čak i oni sa većim brojem C atoma). Takođe je utvrđeno prisustvo norseskviterpenskog aldehida birkenala, β -kariofilen oksida, triterpenskog jedinjenja damaradienona i acetata seskviterpenskih alkohola, seskviterpenskih diola i triola, flavonoida (3,5-dihidroksi-7,4'-dimetoksiflavon; 5,7-dihidroksi-3,4'-dimetoksiflavon; 7-metoksi-4',5-dihidroksiflavanon; 4'-metoksi-5,7-dihidroksiflavanon), triterpenskih kiselina. Prisustvo svakog jedinjenja je potvrđeno gasnom hromatografijom i retencionim indeksima. Dakle, izvršena je izolacija i identifikacija velikog broja isparljivih i neisparljivih jedinjenja različite strukture. Pojedina jedinjenja su po prvi put identifikovana u biljnim izvorima (Vedernikov i Roshchin, 2010a; Vedernikov i Roshchin, 2010b; Vedernikov i Roshchin, 2012a; Vedernikov i Roshchin, 2012b).

Ekstrakcijom različitim rastvaračima iz pupoljaka breze dobija se različit kvalitativni i kvantitativni sastav ekstrakta, što zavisi od polarnosti primenjenih rastvarača. Poredeći prinose ekstrakcije vršene različitim rastvaračima (petrol-etar, heksan, toluen, hloroform, etil-acetat i etanol), zapaženo je da ekstrakcija petrol-etrom daje najveću količinu ekstraktivnih materija (33,6%). Među polarnim rastvaračima se izdvaja etanol, sa prinosom ekstrakcije od 5,51%. Prinos ekstrakcije zavisi od sastava pupoljaka breze. S obzirom na to da je najveći broj jedinjenja nepolarnih karakteristika (masne kiseline, steroli, terpeni), rastvarač najmanje polarnosti ekstrahuje najviše aktivnih principa. Polarna fenolna jedinjenja su zastupljena u manjim količinama. Ipak, prilikom izbora rastvarača, treba voditi računa i o njegovoj toksičnosti i odabrati najadekvatniju varijantu između toksičnosti i polarnosti (Yanevich i sar., 2023).

Farmakološkim studijama je utvrđeno da pupoljci breze poseduju antimikrobno (*in vitro*), antioksidativno (*in vitro* i *in vivo*), diuretsko (*in vivo*), dozno-zavisno antikancerogeno

dejstvo (*in vitro*) i sposobnost hvatanja teških metala u životinjskim organizmima (Shikov i sar., 2014).

Primećeno je da pupoljci breze deluju diuretski kod pacijenata sa prisustvom srčanih edema, kod kojih je nakon primene došlo do značajnog smanjenja edema. Ukoliko kod pacijenata postoji funkcionalna bolest bubrega, lečenje pupoljcima breze nije preporučljivo, zbog mogućeg oštećenja bubrežnog tkiva smolastim supstancama (Shikov i sar., 2014).

Studijom na 108 pacijenata sa gnojnim ranama utvrđeno je da etanolna tinktura pupoljaka breze daje pozitivne efekte u tretmanu različitih vrsta rana, čak i onih sa florom rezistentnom na antibiotike (Zakharov i sar., 1980).

Biološkim testovima je utvrđeno da pupoljci breze imaju vremenski i dozno zavistan citotoksični efekat. Mogu biti obećavajući biljni agens protiv različitih vrsta kancera (adenokarcinom dojke, kolorektalni adenokarcinom, neke linije melanoma, gastrični adenokarcinom, fibroblasti kože, adenokarcinom endometrijuma). Grupa jedinjenja koja najviše doprinosi ovoj aktivnosti su svakako triterpeni i prilikom izolacije se može birati postupak kojim bi se u izolatu dobili u što većim prinosima (Isidorov, 2018).

2.3.1.1. Hemijski sastav etarskog ulja pupoljaka breze

Uprkos viševjekovnoj upotrebi pupoljaka breze u tradicionalnoj medicini, znanja o njihovom hemijskom sastavu i farmakološkim aktivnostima su još uvek nepotpuna i nedovoljna.

Pupoljci breze se sakupljaju u odgovarajućem vegetativnom periodu biljke, pre samog otvaranja pupoljaka. Nakon sakupljanja se suše na vazduhu do konstantne mase, a zatim se vrši njihova obrada, primenjuju postupci za dobijanje odgovarajućih izolata i njihovu analizu. Postupci dobijanja izolata obuhvataju destilacione metode (hidrodestilacija i mikrodestilacija), metode ekstrakcije i metode simultane destilacije-ekstrakcije (Likens-Nickersonova metoda). Veliki broj do sada izolovanih jedinjenja je identifikovan, pri čemu je pokazano da postoje značajne razlike u kvalitativnom i kvantitativnom hemijskom sastavu izolata u zavisnosti od primenjene metode (destilacija, ekstrakcija, mikroekstrakcija na čvrstoj fazi – headspace solid-phase microextraction, HS-SPME) (Demirci i sar., 2004; Vladimirov i sar., 2019b).

Pupoljci breze sadrže relativno visok sadržaj isparljivog etarskog ulja. Procenat etarskog ulja koji se može dobiti iz pupoljaka je različit i kreće se u opsegu od 0,5-3,8%, a zavisi od geografskog područja, stepena razvića pupoljaka (sezonske varijacije) i načina

dobijanja etarskog ulja (Demirci i Can Başer, 2003; Demirci i sar., 2004; Vladimirov i sar., 2019b).

Etarska ulja su visoko koncentrovani, lako isparljivi tečni uljasti destilati ili ekstrakti lipofilnih sastojaka sekundarnih biljnih metabolita. Sintetišu se i lokalizuju u specijalnim sekretornim strukturama biljaka. Nerastvorna su ili delimično rastvorna u vodi, a rastvorna su u organskim rastvaračima, masnim uljima i mastima. To su složene smeše prirodnih bioaktivnih organskih jedinjenja alifatične, aliciklične, aromatične i heterociklične strukture: ugljovodonika, alkohola, aldehida, ketona, karbonskih kiselina, etara, estara, laktona, fenola i fenolnih derivata, nosioca mirisnih principa biljnih delova (pupoljci, cvet, list, plod, seme, grane, stablo, koren, nadzemni delovi) (Stanković i Stanojević, 2014). Najvećim delom to su jedinjenja iz grupe monoterpena, seskviterpena, oksigenovanih seskviterpena, fenilpropana i benzenskih aromatičnih jedinjenja, ređe iz grupe diterpena, viših terpena i njihovih derivata, kao i iz grupe prirodnih aromatičnih jedinjenja (Chamorro i sar., 2012; Stanković i Stanojević, 2014). Veoma su osetljiva na toplotu, vlagu i kiseonik (Can Başer i Buchbauer, 2010).

Zbog kompleksnog hemijskog sastava, ispoljavaju različita biološka dejstva: antimikrobno, antivirusno, antiinflamatorno, antioksidativno, antikancerogeno, antinociceptivno. Poslednjih godina istraživanja etarskih ulja su dosta koncentrisana na njihovu antioksidativnu aktivnost. Neka isparljiva jedinjenja iz aromatičnog bilja i/ili etarska ulja poseduju visoki antioksidativni potencijal i koriste se kao prirodni antioksidansi u zaštiti prehrambenih proizvoda (Can Başer i Buchbauer, 2010; Stanković i Stanojević, 2014).

Postupak analize etarskih ulja sastoji se iz četiri osnovna koraka: sakupljanja uzorka, čuvanja uzoraka, pripreme uzoraka i analize, bez obzira koji analitički metod se primenjuje. Uslovi sakupljanja i čuvanja uzorka zavise od vrste biljnog materijala, željenog kvaliteta etarskog ulja i od analitičke metode (Chamorro i sar., 2012). Izbor vrste analize će zavisiti od karakteristika materijala iz koga je etarsko ulje dobijeno, jer etarska ulja mogu biti prisutna u različitim delovima biljke, poput korena, stabljike, lista, ploda i semena. Kada se etarsko ulje izoluje, pristupa se karakterizaciji, jer hemijski sastav može varirati čak i u okviru jedne botaničke vrste. Analiza etarskih ulja u osnovi ima jedan tehnički cilj: postizanje najboljih mogućih performansi odvajanja pomoću najefikasnije dostupne tehnologije. Analize se mogu koristiti i radi poređenja, gde se jedno etarsko ulje poredi sa drugim zbog kontrole kvaliteta ili ispravnosti, zatim za otkrivanje novih komponenti, ili karakterizaciju hemijskih klasa prisutnih jedinjenja (Can Başer i Buchbauer, 2010).

Prema dostupnoj literaturi, u praksi su korišćene dve metode destilacije etarskog ulja iz breze: hidrodestilacija (po Clevenger-u, u trajanju 3h ili 4h) i mikrodestilacija. Destilacija

može da se vrši iz neusitnjenog ili usitnjenog biljnog materijala. Mikrodestilacija je praktičnija i efikasnija metoda u odnosu na hidrodestilaciju (Demirci i Can Başer, 2003; Demirci i sar., 2004).

Nakon izolovanja etarskog ulja, dalja analiza se vrši instrumentalnim tehnikama. Prilikom određivanja terpenskih jedinjenja prvenstveno se koristi GC i GC-MS analiza. Međutim, postoje znatne poteškoće u fazi interpretacije gasnih hromatograma. To je zbog činjenice da su etarska ulja obično složene višekomponentne smeše različitih jedinjenja. Mnoge od njih karakterišu slične fizičko-hemijske osobine, uključujući retencione hromatografske parametre. Stoga se, za identifikaciju takvih jedinjenja, koriste posebne metode detekcije: masena spektrometrija (MS) i infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (FTIR). Međutim, čak i kombinacija GC-MS i GC-FTIR ne osigurava uvek pouzdanu identifikaciju, posebno u slučaju izomera i homologa, kao i u slučaju slabih intenziteta pikova za koje nije moguće dobiti visoko kvalitetan spektar. Kao dodatni parametar identifikacije, koristi se particioni koeficijent (K_p) da bi se povećala pouzdanost identifikacije (Demirci i Can Başer, 2003; Demirci i sar., 2000; Demirci i sar., 2004).

Analiza hemijskog sastava GC i GC-MS metodama daje uvid u isparljiva jedinjenja etarskog ulja breze. Zavisno od primenjenih tehnika, aparature, ali i biljnog materijala može se identifikovati veći ili manji broj jedinjenja. Autori pojedinih radova su uspjeli da identifikuju i preko 80 komponenti u etarskom ulju breze (Demirci i Can Başer, 2003; Demirci i sar., 2000; Demirci i sar., 2004).

Isparljiva jedinjenja u etarskom ulju breze su iz grupe terpena: monoterpenski ugljovodonici, seskviterpenski ugljovodonici, monoterpenski alkoholi, monoterpenska karbonilna jedinjenja, acetati monoterpenskih alkohola, estri monoterpenskih alkohola, seskviterpenski alkoholi, estri seskviterpenskih alkohola, seskviterpenski epoksidi. Najveći broj jedinjenja pripada grupi seskviterpenskih ugljovodonika i seskviterpenskih alkohola, a zatim slede monoterpenski ugljovodonici i monoterpenski alkoholi (Demirci i Can Başer, 2003; Demirci i sar., 2000; Demirci i sar., 2004).

U jednom ispitivanju je vršena izolacija i analiza etarskog ulja pupoljaka iz 3 varijeteta breze: *Betula pendula*, *Betula pendula* var. *carelica* i *Betula pendula* var. *dalecarlica*. Pokazano je da su seskviterpenska jedinjenja dominantna u sastavu. Izvršena je identifikacija ukupno 61 jedinjenja. U tabeli 2 je prikazan relativni procenat dominantnih terpenskih jedinjenja etarskog ulja pupoljaka analiziranih varijeteta breze. Prosečan sadržaj seskviterpenskih ugljovodonika u etarskom ulju različitih vrsta breze bio je $62,7 \pm 4,8\%$. Analiza sastava je vršena iz različitih uzoraka tokom 3 godine. Rezultati pokazuju da su

sezonske varijacije u sastavu seskviterpena etarskog ulja iz različitih varijeteta male. Sadržaj seskviterpena znatno varira u različitim varijetetima breza. Dominantno jedinjenje u jednom varijetetu može biti prisutno u zanemarljivim količinama u drugom. U svakoj od ispitivanih vrsta različito jedinjenje je zastupljeno u najvećem procentu. Sadržaj ovih glavnih grupa jedinjenja pokazuje prirodne varijacije unutar vrste. Među seskviterpenima su dominantni biciklični ugljovodonici iz grupe kadinena (13,5-20,8%), selenena (16,4-33,1%) i kariofilena (do 13,8%) (Isidorov i sar., 2004).

Tabela 2. Procentualni sastav dominantnih jedinjenja etarskog ulja pupoljaka analiziranih vrsta breze (Isidorov i sar., 2004)

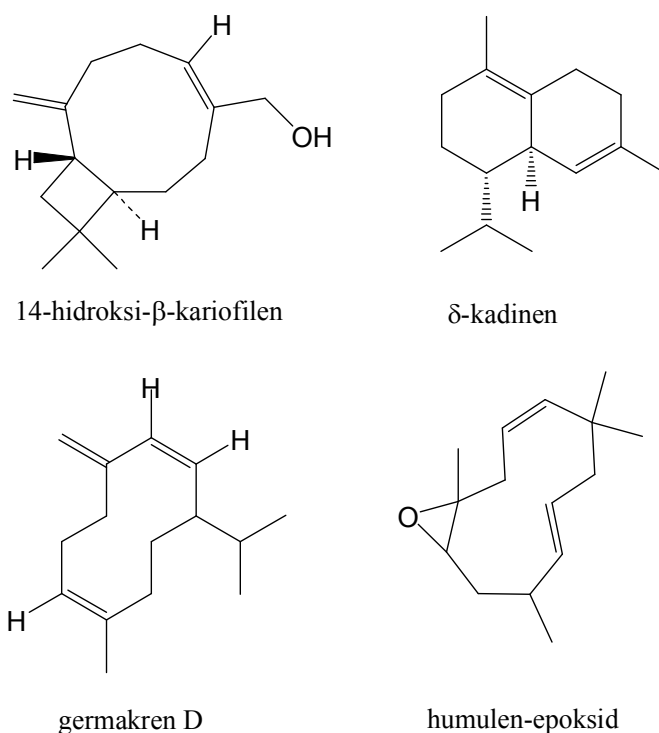
Jedinjenja	<i>Betula pendula</i>	<i>Betula pendula</i> var. <i>dalecarlica</i>	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
Monoterpeni	24,4 ± 0,6	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,3
Seskviterpenski ugljovodonici	61,8 ± 3,4	67,6 ± 4,9	59,2 ± 1,6
α-kopaen	6,4 ± 0,9	11,5 ± 1,8	7,5 ± 2,0
D-germakren	14,8 ± 4,2	0,3 ± 0,1	4,1 ± 1,2
β-selenin	2,9 ± 2,0	26,7 ± 9,0	12,5 ± 2,8
δ-kadinen	13,5 ± 2,1	17,4 ± 2,6	13,1 ± 3,8
Seskviterpenski derivati	32,0 ± 2,7	26,9 ± 1,2	36,2 ± 2,7
6-hidroksikariofilen	4,9 ± 2,2	2,4 ± 1,5	11,7 ± 1,8
14-hidroksikariofilen	8,1 ± 2,0	3,7 ± 1,6	11,3 ± 1,3

U istraživanju Demirci i Can Başer (2003) je određivan sastav etarskog ulja pupoljaka breze koja raste u Turskoj. Izolacija je izvršena hidrodestilacijom po Clevenger-u, a analiza etarskog ulja GC-MS metodom. Prinosa ulja je bio 3,8%, a identifikovano je 38 jedinjenja. Najzastupljenija jedinjenja su 14-hidroksi-β-kariofilen (α-betulenol) sa 25,3% i 14-hidroksi-4,5-dihidro-β-kariofilen sa 17,2%. Osim njih, u većoj količini su detektovane i sledeće komponente: α-humulen, β-kariofilen oksid, humulen-epoksid II (Demirci i Can Başer, 2003).

Demirci i sar. (2004) su proučavali sastav etarskog ulja pupoljaka breze dobijenog pomoću dve metode: hidrodestilacijom po Clevenger-u i mikrodestilacijom. Prinosa etarskog ulja je bio niži (0,5%) nego u ostalim istraživanjima ove grupe autora. Analiza je vršena GC i GC-MS metodama i identifikovano je 53 jedinjenja. Dominantna grupa jedinjenja bili su seskviterpenski ugljovodonici. Glavni sastojci uzoraka dobijenih hidrodestilacijom i mikrodestilacijom su isti: α-kopaen, D-germakren i δ-kadinen, ali se njihovi procentualni sadržaji razlikuju u etarskim uljima dobijenim ovim metodama. Međutim, autori su ipak

poređenjem između uzoraka zaključili da obe tehnike rezultuju identifikacijom isparljivih komponenti sličnog sastava. Mikrodestilacija je bila pogodnija metoda, jer se iz manje količine uzorka etarsko ulje može izolovati za kraće vreme (Demirci i sar., 2004).

Na slici 2 su prikazane hemijske formule nekih seskviterpena koji su zastupljeni u većem procentu u etarskom ulju pupoljaka breze.



Slika 2. Strukturne formule seskviterpena etarskog ulja iz pupoljaka breze

Analiza isparljivih komponenti iz pupoljaka se može vršiti i HS-SPME metodom. Isidorov i sar. (2014) su u jednom istraživanju koristili ovu metodu za analizu isparljivih komponenti etarskog ulja breze i identifikovali 81 jedinjenje. Zapažen je visok sadržaj seskviterpenskih ugljovodonika (C₁₅H₂₄) i nizak sadržaj njihovih kiseoničnih derivata. U znatno manjim količinama su nađeni monoterpeni, alifatični alkoholi, alifatični ugljovodonici, estri alifatičnih kiselina i aromatična jedinjenja. Najzastupljenija jedinjenja su bila α-kopaen i aromadendren (Isidorov i sar., 2014).

U svakom od postojećih istraživanja, izolovano etarsko ulje pupoljaka breze je bilo različitog sastava. Razlike su uočene između uzoraka sakupljenih sa istih biljaka tokom različitog vremenskog perioda, unutar iste biljne vrste koja raste u različitim geografskim područjima, kao i između različitih varijeteta *Betula* vrste. Takođe, dominantna jedinjenja se razlikuju u svakom istraživanju, ali im je zajedničko to da pripadaju grupi seskviterpena. Iz

svoga navedenog se može zaključiti da etarsko ulje vrste breze nema univerzalno dominantno jedinjenje, već sastav varira u zavisnosti od različitih uzroka (Can Başer i Demirci, 2007; Demirci i Can Başer, 2003; Demirci i sar., 2004; Isidorov i sar., 2014).

2.3.2. Sok breze

Sok breze je bezbojna ili slabo opalescentna tečnost bez mirisa, koja ukusom podseća na blago slatku mineralnu vodu. Dobija se sakupljanjem iz unutrašnjosti stabala breze, u odgovarajućem eksudacionom periodu. Sok breze se često koristi kao osvežavajući napitak, ali pored toga ima i lekovita svojstva. Još od davnih vremena se koristio u tradicionalnoj medicini, protiv prehlade, kao stimulator apetita, kod bubrežnih bolesti, topikalno za poboljšanje rasta kose (tabela 1). Na tržištu se može naći kao svež napitak, ali i kao sastojak hrane i napitaka. U Evropi se sok breze koristi svež, fermentisan ili pasterizovan, sa dodatkom voćnih ukusa, a potrošnja sve više raste. U pojedinim zemljama se meša sa alkoholnim pićima. Zbog svog biohemijskog sastava i bioloških dejstava, u novijem periodu postaje sve važniji u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Kûka i sar., 2013; Łuczaj, 2014; Mingalia i sar., 2020).

Sok se sakuplja u proleće, iz stabala breze. Eksudacioni period traje od početka do kraja razvića listova. Pogodnim alatom se izbuši rupa malog dijametra u stablu, pod uglom od 45°. Bakarna ili neka druga cev se lagano umetne u podnožje reza. Ispod svake cevi se postavi sterilna posuda za prikupljanje soka. Posude se zatvaraju odmah nakon prikupljanja soka, a zatim se vrši dalja obrada sakupljene biljne droge. Za ispitivanje sadržaja šećera, na primer, je potrebno zamrzavanje soka u što kraćem vremenskom intervalu (Łuczaj i sar., 2014; Ozolinčius i sar., 2016).

Zbog dugotrajne upotrebe koja, prema nekim podacima, datira još iz 10. veka, ispitivanje hemijskog sastava soka breze je počelo još krajem 19. veka u Nemačkoj. Međutim, ispitivanja su u to vreme vršena nespecifičnim klasičnim analitičkim metodama, pa se danas ne možemo oslanjati na tako dobijene rezultate. Mnogo godina kasnije je počela upotreba pouzdanijih enzimskih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje šećera. Ispitivanjem sastava soka breze koja raste u Nemačkoj utvrđeno je da sadrži 4,3% glukoze i 1,9% fruktoze (Łuczaj i sar., 2014).

Moderne analitičke metode (GC, tečna hromatografija, masena spektrometrija) ukazuju na to da je sadržaj ukupnih šećera u soku breze 0,81-2%. Količina šećera se menja u

zavisnosti od perioda eksudacije soka, najveća je na početku eksudacije, a vremenom se smanjuje. Od šećera su najviše prisutni glukoza i fruktoza (Łuczaj i sar., 2014; Mingalia i sar., 2022; Ozolinčius i sar., 2016). Primenom HPLC metode, utvrđeno je prisustvo glukoze, fruktoze i saharoze. Sadržaj fruktoze je nešto viši u odnosu na glukozu i saharozu. Sadržaj drugih ugljenih hidrata je zanemarljiv (Kūka i sar., 2013).

Rezultati većeg broja studija o sastavu soka breze pokazali su da sok sadrži: ugljene hidrate (glukoza, fruktoza, saharoza), organske kiseline, aminokiseline, proteine, minerale (natrijum, kalijum, magnezijum, kalcijum, gvožđe), etarsko ulje, saponine, vitamine A, C i vitamine B kompleksa, biološki aktivne supstance (fenolna jedinjenja, flavonoide, tanine, glikozide, triterpene) (Boroduškis i sar., 2017; Kūka i sar., 2013).

Od mineralnih materija, sok breze sadrži najviše kalijuma i kalcijuma, dok je od elemenata u tragovima najviše prisutan Mn^{2+} jon. Značajno je i prisustvo magnezijuma i cinka u izvesnim količinama. Dominantni anjoni su sulfatni joni, dok je koncentracija nitrata i nitrita zanemarljiva (Kūka i sar., 2013). Kao i većina biljaka, breza pokazuje selektivnu akumulaciju elemenata iz zemljišta. Dobar primer je odnos koncentracija jona alkalnih metala u soku breze. Dostupnost Na^+ i K^+ jona u vodama i stenama je ista, ali se u soku nalazi 100-1000 puta više K^+ od Na^+ , što znači da je kalijum vrlo bitan element za brezu (Harju, 1990).

Ukupna koncentracija antioksidanasa je istraživana koristeći kvercetin kao ekvivalent, i dobijena je umerena antioksidativna aktivnost soka breze ($0,35 \text{ mg/dm}^3$ u odnosu na kvercetin ekvivalent) (Kūka i sar., 2013).

U jednom istraživanju je određivan efekat zagrevanja na isparljiva jedinjenja u soku breze. Udeo minerala, aminokiselina i šećera je veći u sirupu nego u soku breze. Isparljiva jedinjenja su zagrevana 10 minuta na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ i analizirana su pomoću GC i GC-MS metode. Za neka alifatična karbonilna jedinjenja, posebno 3-butanal, 2-butanal i 2,3-pentandion, kao i dimetildisulfid je zabeležen znatan porast koncentracija u uzorcima koji su zagrevani. Miris sirupa je slab, a koncentracija isparljivih jedinjenja niska (Kallio i sar., 1987).

Sancho i saradnici (2022) su utvrdili da se koncentracija proteina u soku breze kreće u opsegu $3\text{-}60 \text{ mg/dm}^3$ i da vremenski uslovi za vreme perioda sakupljanja soka statistički ne utiču značajno na koncentraciju proteina. Koncentracija proteina je najmanja na početku, dok se na kraju perioda sakupljanja soka čak petostruko povećava (Sancho i sar., 2022). Neki istraživači (Kūka i sar., 2013) izveštavaju o još većoj koncentraciji proteina u soku breze (127 mg/dm^3).

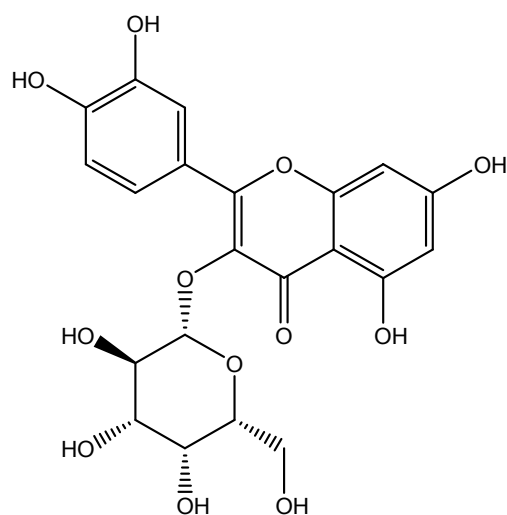
Testovima proliferacije je utvrđeno da koncentrovani sok breze blago stimuliše proliferaciju dermalnih fibroblasta, pri čemu koncentracija soka od 50% tokom 24 h ima

najstimulativniji proliferacioni efekat. Ispitivanjem na HaCaT keratinocitima, utvrđen je dozna zavistan efekat proliferacije. Komponente prisutne u soku, a pre svega aminokiseline, ugljeni hidrati i mineralne materije su uzrok stimulacije ćelijskog rasta i proliferacije. Ovakvi rezultati i direktan uticaj na ispitivane ćelijske kulture svrstava visoko koncentrovani sok breze kao potencijalni sastojak kozmetičkih preparata za regeneraciju kože i preparata sa „anti-aging“ efektom (Boroduškis i sar., 2017). Zbog rasprostranjenosti breze na severnoj hemisferi, njen sok je dostupan za detaljna istraživanja, pre svega hemijskog sastava, sadržaja bioaktivnih jedinjenja i bioloških aktivnosti.

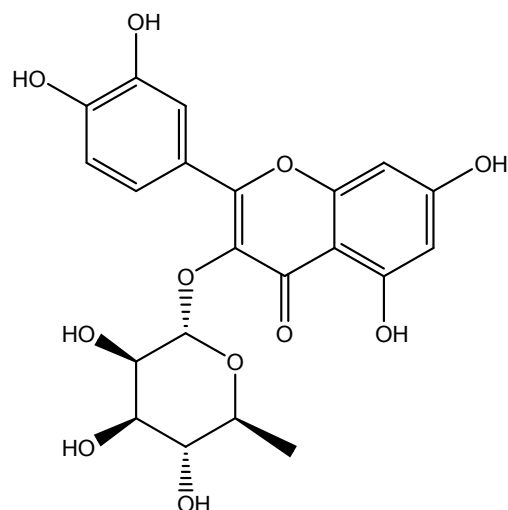
2.3.3. List breze

List breze (*Betulae folium*) se, slično drugim delovima breze, koristi još od davnina kod bolesti urinarnog trakta, infekcija i zapaljenja. Naročito je popularan kao sredstvo za povećanje diureze. Prema Evropskoj Medicinskoj Agenciji, list breze je tradicionalni medicinski lek koji povećava količinu urina i pomaže ispiranju urinarnog trakta. Koristi se kao pomoćno sredstvo kod blažih infekcija (Raal i sar., 2015). Prema 7. Evropskoj farmakopeji, osušeni listovi breze, celi ili smrvljeni, uspešno se koriste u medicinske svrhe. Listovi treba da sadrže najmanje 1,5% flavonoida, računatih kao hiperozid, u odnosu na sadržaj suve materije (Orav i sar., 2011).

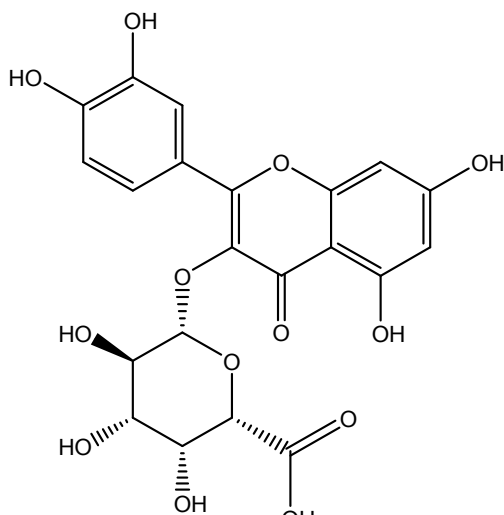
Hemijski sastav flavonoida kao glavnih fenolnih jedinjenja se intenzivno istražuje. U svojoj studiji, Hänsel i Sticher (2007) su detektovali sledeće flavonoide u listu breze: kvercetin-3-*O*-galaktozid (hiperozid), kvercetin-3-*O*-glukuronid, miricetin-3-*O*-galaktozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid (kvercitrin), kao i druge glikozide kvercetina (slika 3) (Hänsel i Sticher, 2007). Prema istraživanju Raal i saradnika (2015), list breze sadrži najviše polifenola, a hiperozid je najzastupljeniji flavonoid. Uz njega su u velikoj meri prisutni i kvercetin-glukuronid, hlorogena kiselina i kvercitrin (Raal i sar., 2015).



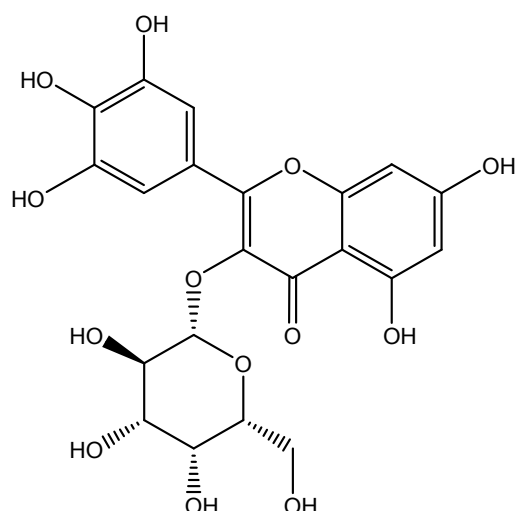
hiperozid



kvercetin-3-O-ramnozid



kvercetin-3-O-glukuronid



miricetin-3-O-galaktozid

Slika 3. Struktura flavonoida prisutnih u listu breze

List breze sadrži 1-3% flavonolnih glikozida, uglavnom hiperozida i drugih kvercetinskih glikozida, kao i glikozide kemferola i miricetina. Između ostalog, sadrži i druga fenolna jedinjenja (3,4'-dihidroksipropiofenon-3-glukozid, kafenu i hlorogensku kiselinu), lignane, diarilheptanoide, triterpenske alkohole i malonil-estar dimarenskog tipa, saponozide (Bradley, 2006; Keinänen i Julkunen-Tiitto, 1996).

Sadržaj hidrosolubilnih fenola lista breze u različitim urbanim okruženjima i vremenskim uslovima tokom vegetacionog perioda dosta se razlikuje. Najveći sadržaj fenola je zabeležen u prvoj i drugoj dekadi maja, smanjuje se sredinom jula, a raste u kasno leto i jesen. Takođe, zabeležena je tendencija smanjenja sadržaja fenola tokom sušnih godina (Kavelenova i sar., 2001). Ukupna količina polimernih proantocijanidina u listu breze može biti i do 39 mg/g (izražena kao % suve materije) (Karonen i sar., 2006).

Carnat i saradnici (1996) su analizirali sadržaj flavonoida u suvom listu breze (14 serija komercijalnog porekla). Prema njihovim rezultatima, ukupan sadržaj flavonoida je 3,29%. Hiperozid je prisutan sa 0,8%, avikularin 0,57%, galaktozil-3-mircetol 0,37%, glukuronil-3-kvercetin 0,25%, a kvercetin sa 0,14%. Sadržaj flavonoida je bio veći u mladim nego u starim listovima breze (Carnat i sar., 1996).

U ekstraktu lista breze dobijenom ekstrakcijom superkričnim ugljen-dioksidom, identifikovano je 33 jedinjenja. Najveći udeo su imali α -pinen (2,22%), bornil-acetat (2,74%), lambertinska kiselina (2,45%) i *n*-trikoza (2,50%) (Demina i sar., 2006).

Od ostalih jedinjenja, list breze sadrži etarsko ulje (0,04-0,63%), vitamine (2-8%) i to askorbinsku i nikotinsku kiselinu, karotene, saponine (do 3,2%), kumarine (0,44%), tanine (5-9%), sterole (Demirci i sar., 2000; Lavrenev i Lavrenev, 1999; Turova i sar., 1987). Sadržaj i sastav etarskog ulja u listu breze može značajno da varira. Tako su Orav i saradnici (2011) identifikovali 47 jedinjenja u etarskom ulju lista breze dobijenom hidrodestilacijom (0,11%), među kojima su dominantna jedinjenja biciklični seskviterpeni: α -betulenol (33,1%), α -betulenol-acetat (5,6%), β -betulenol (6,2%), β -betulenol (5,8%), a nađene su i visoke koncentracije nekih alifatičnih jedinjenja, poput *n*-trikoza i *n*-pentakoza (Orav i sar., 2011). Druga grupa autora je analizom etarskog ulja lista breze dobijenog hidrodestilacijom uspjela da izvrši identifikaciju 55 jedinjenja. Prinos etarskog ulja je bio nešto veći i iznosio je 0,63%. Najzastupljenije jedinjenje je 14-hidroksi- β -kariofilen (α -betulenol) sa 29,3%. Značajno je i prisustvo β -betulenala (4,7%), humulen-epoksida II (4,8%), kariofila-8(14)-en-5-ona (4,7%) i kariofilen-oksida (4,3%). Heksadekanol je prisutan sa preko 20%. Ovaj masni alkohol je sastojak voska sa površine lista (Demirci i sar., 2000). Iako se kvalitativni i kvantitativni sadržaj ovih etarskih ulja donekle razlikuje, dominantna grupa jedinjenja u oba etarska ulja su seskviterpeni, i to derivati kariofilena.

Zbog prisustva tanina i drugih polifenola, vodeni ekstrakt lista breze ima antiinflamatorni efekat. Ovo su Tunón i saradnici (1995) testirali na izolovanim ćelijama i enzimskim testovima (Tunón i sar., 1995). U drugom eksperimentu, u *in vitro* izazvanoj inflamaciji rožnjače, ekstrakt lista breze inhibira proliferaciju T limfocita indukcijom apoptoze. Ovaj efekat je potvrđen i *in vivo*, na pacovima kod kojih je izazvana inflamacija rožnjače. Dokazano je da ekstrakt lista breze značajno odlaže opacifikaciju rožnjače, značajno smanjuje infiltraciju CD45⁺ leukocita i CD4⁺ T ćelija i selektivno indukuje apoptozu aktiviranih T ćelija. Dakle, ekstrakt lista breze je obećavajući antiinflamatorni agens kod inflamacije rožnjače (Wacker i sar., 2012).

U jednoj studiji je izvršeno poređenje efekata ekstrakta lista breze sa komercijalnim antiartritičnim lekom metotreksatom u smanjenju proliferacije limfocita i deobe ćelija. Poznato je da periferni limfociti krvi igraju važnu ulogu u održavanju autoimunog procesa kod reumatoidnog artritisa, a manipulisanje ovim ćelijama može biti uzrokovano disregulacijom proliferacije i apoptoze. Ekstrakt lista smanjuje rast i deobu aktiviranih CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita, na dozno zavisani način, a ne deluje na mirujuće T limfocite. Inhibicija proliferacije limfocita zbog indukcije apoptoze i zaustavljanje ćelijskog ciklusa je uporediva sa lekom metotreksatom. Efekat smanjenja proliferacije inflamatornih limfocita daje racionalnu osnovu za upotrebu ekstrakta lista breze u lečenju reumatoidnog artritisa (Gründemann i sar., 2011).

Etanolni ekstrakt lista breze ima uticaj na izbeljivanje kože inhibicijom enzima tirozin-kinaze, pa se može smatrati korisnim sastojkom u farmaceutskim i kozmetičkim preparatima za izbeljivanje kože (Germanò i sar., 2012).

Metanolni ekstrakt lista breze pokazuje gastroprotektivne efekte u *in vivo* uslovima i inhibitornu aktivnost na lipidnu peroksidaciju u *in vitro* uslovima. Gastroprotektivni efekti su proučavani kod ulcera izazvanog etanolom kod pacova. Oralni predtretman pacova metanolnim ekstraktom lista je značajno smanjio incidencu gastričnih lezija izazvanih primenom etanola u poređenju sa lekom mizoprostolom. Pokazalo se i da inhibira peroksidaciju lipida *in vitro* (Germanò i sar., 2013).

Metanolni ekstrakt lista breze je pokazao antimikrobnu aktivnost protiv bakterija *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Ova činjenica podržava upotrebu preparata na bazi lista breze u lečenju upala urinarnog trakta, peska u bubrezima i blažih urinarnih infekcija. Antimikrobna aktivnost takođe može biti od značaja i u lečenju bakterijskih infekcija drugih regija i organa (Durić i sar., 2013).

Zbog kompleksnog sastava lista breze, različite su i oblasti njegove upotrebe. Potrebna su dalja istraživanja hemijskog sastava, radi boljeg razumevanja bioloških svojstava i aktivnosti, i kasnije upotrebe u terapijske svrhe.

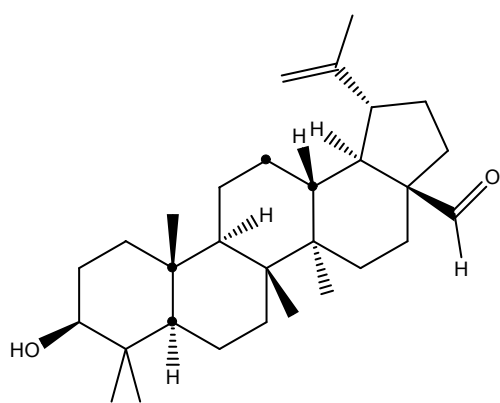
2.3.4. Kora breze

Kora breze (*Betulae cortex*) je bila predmet poštovanja i uvažavanja tokom praistorijskog i istorijskog perioda, a u današnje vreme je predmet interesovanja moderne nauke i industrije. Trenutna istraživanja i primena su u sferi farmaceutske i kozmetičke industrije, a usmerena su na tretman zapaljenja, infekcija, hepatitisa, karcinoma, HIV-a, *Herpes simplex* virusa i nekih vrsta patogena. Najveće je interesovanje za triterpene, koji predstavljaju grupu antikancerogenih i anti-HIV bioaktivnih jedinjenja sa novim mehanizmom dejstva i niskom toksičnošću. Ekstrakti kore su pronašli široku upotrebu u modernim kozmetičkim preparatima, a imaju i potencijalnu upotrebu kao dijetetski suplementi (Dehelean i sar., 2012; Kosyakov i sar., 2014; Krasutsky, 2006; Paže i sar., 2014).

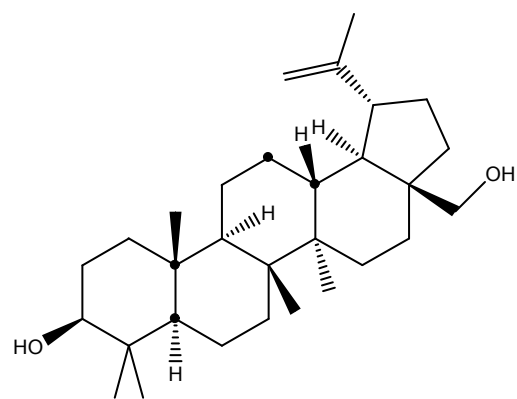
Ekstrakti kore breze sadrže mešavinu pentacikličnih tritepena, tipa lupana (više zastupljeni) i oleanana (manje zastupljeni). Značajna su bioaktivna jedinjenja za razvoj formulacija lekova, kozmetike, dijetetskih suplemenata, biocida, baktericida, itd. Najzastupljenije jedinjenje je svakako betulin (BE), od koga i potiče bela boja kore. Sadržaj betulinske kiseline (BK) i lupeola (LU) je obično oko 10% u odnosu na betulin, i u literaturi se nailazi na različitu zastupljenost ovih jedinjenja. Procentualni sastav ekstraktivnih jedinjenja dat je u tabeli 3. Hemijske formule najzastupljenijih jedinjenja prikazane su na slici 4. Hemijski sastav može varirati u određenim granicama, u zavisnosti od starosti biljke i klimatskih uslova. Upotreba različitih metoda analize i nedostatak standardne kalibracijske procedure takođe mogu biti razlog varijacija (Demets i sar., 2022; Krasutsky, 2006).

Tabela 3. Prosečan hemijski sastav (%) ekstraktivnih jedinjenja kore breze (Krasutsky, 2006)

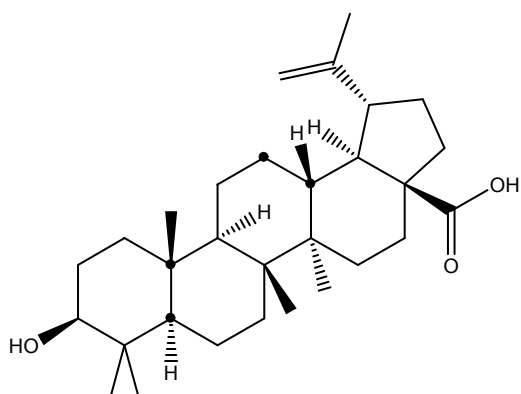
Naziv jedinjenja	Prosečna zastupljenost (%)
Betulin	78,1
Betulinska kiselina	4,3
Betulin aldehid	1,2
Lupeol	7,9
Oleanolna kiselina	2,0
Betulin-3-kafeat	0,5
Eritrodiol	2,8
Ostalo (manje zastupljena jedinjenja)	3,2



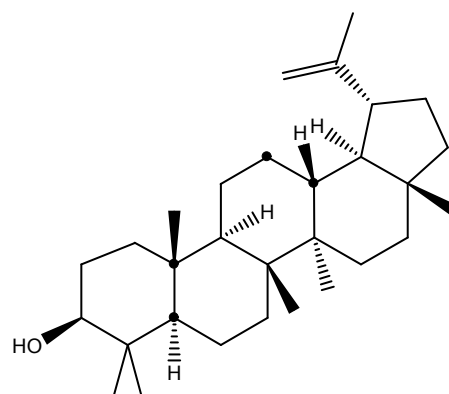
betulin aldehyd



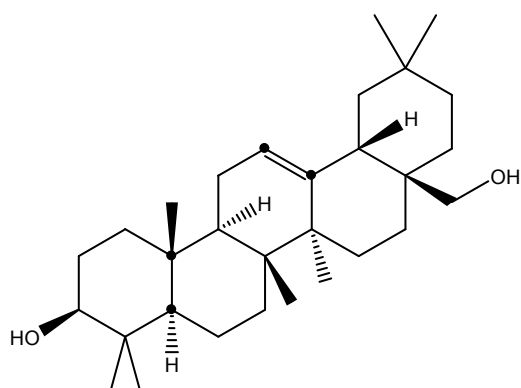
betulin



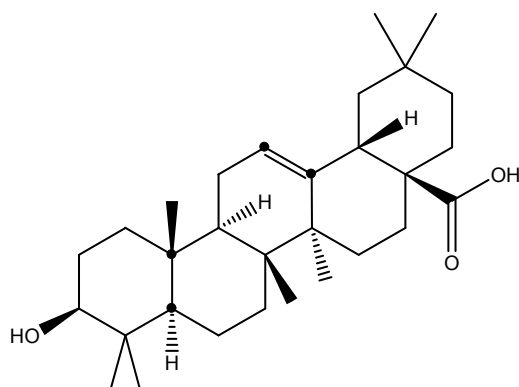
betulinska kiselina



lupeol



eritrodiol



oleanolna kiselina

Slika 4. Strukture najzastupljenijih triterpena kore breze

Od manje zastupljenih jedinjenja (ostalo u tabeli 3) treba pomenuti: betulon, betulon aldehyd, lupenon, betulonsku kiselinu, oleanol aldehyd i β -amirin (Krasutsky, 2006).

Spoljašnja kora breze iz severnih šuma sadrži najveću količinu triterpena od svih biljaka (20-35%). Veruje se da je fiziološka funkcija ovih jedinjenja odbrana biljke od biljnih

patogena (bakterija, virusa, gljivica, parazita). Ovo je dovelo do pretpostavke da triterpeni mogu takođe delovati protiv patogena koji uzrokuju bolesti ljudi i životinja. Međutim, njihova upotreba je ostala prilično ograničena, a razlozi za to su slaba rastvorljivost u vodi ($<1 \text{ mg/dm}^3$), visoke $\log P$ vrednosti (>9) i velike molekulske mase. Triterpeni kore breze se mogu smatrati prekursorima za širok raspon sintetskih derivata lupana i oleana, koji se mogu dobiti hemijskom modifikacijom molekula. Oni mogu biti ekstrahovani iz spoljašnje kore breze u prinosima od 20-40% primenom velikog broja različitih organskih rastvarača. Prinos zavisi od vrste rastvarača i tehnike ekstrakcije (Krasutsky, 2006).

Zbog brojnih bioloških aktivnosti triterpena, nametnula se potreba da se istraživanja fokusiraju na njihovu selektivnu ekstrakciju u što većim količinama. Razvoj metoda je bitan zbog iskorišćavanja triterpena iz kore breze kao prirodnog izvora. Kombinacija procedura upotrebljenih pre ekstrakcije i pažljiv odabir rastvarača daju prinose BE u suvom ekstraktu i preko 90% (Dehelean i sar., 2012; Demets i sar., 2022).

Nakon izvršene izolacije, određivanje hemijskog sastava se može vršiti različitim analitičkim metodama: HPLC, LC-MS, ^{13}C -NMR, GC-MS, Raman spektroskopija. HPLC tehnika se pokazala odličnom i veoma pogodnom pri određivanju triterpena, zbog svoje visoke osetljivosti, preciznosti i reproduktivnosti. U najvećem broju istraživanja se koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje triterpena (Can Başer i Demirci, 2007; Dehelean i sar., 2012; Demets i sar., 2022; Holonec i sar., 2012). ^{13}C -NMR spektroskopija je veoma osetljiva tehnika koja se koristi za određivanje BE. Ramanova spektroskopija može dati polukvantitativne informacije o sadržaju triterpena u ekstraktima kore breze (Dehelean i sar., 2012). GC-MS se uglavnom koristi kada se želi određivanje lako isparljivih jedinjenja (Can Başer i Demirci, 2007).

Izolacija BE kao najzastupljenijeg triterpena se može vršiti pomoću više metoda: vakuum sublimacijom nakon prethodne alkalizacije, vakuum pirolizom, superkritičnom ekstrakcijom ugljen-dioksidom ili mešavinom ugljen-dioksida sa različitim rastvaračima i ekstrakcijom organskim rastvaračima. Ekstrakcijom pomoću različitih rastvarača se uvek uz BE dobijaju i drugi triterpeni, pa ako je cilj samo ekstrakcija BE, onda je potrebno dodatno prečišćavanje ekstrakta. Prečišćavanje se najčešće postiže rekristalizacijom i/ili kolonskom hromatografijom. Ekstrakcija organskim rastvaračima je najlakši način za njegovo dobijanje, a izbor rastvarača je veliki (metanol, etanol, propan-2-ol, *n*-heptan ili *n*-heksan, etil-acetat i njegove smeše sa etanolom i vodom, dihlormetan, smeša hloroforma, dihlormetana i metanola, mešavina etanola i baza, butan-1-ol, toluen, parafin, limonen). Usitnjavanjem kore dolazi do značajnog ubrzavanja procesa ekstrakcije. Ekstrakcija se može ubrzati korišćenjem:

ultrazvučnog tretmana, vodene pare ili mikrotalasnog zračenja. Superkritična ekstrakcija ugljen-dioksidom, smešom metanola, etanola ili acetona ili ekstrakcija nakon esterifikacije BE su složenije metode od konvencionalnih metoda ekstrakcije (Demets i sar., 2022; Holonec i sar., 2012).

U jednom istraživanju je vršena izolacija triterpena iz ekstrakata kore breze pomoću različitih organskih rastvarača i ispitan je njihov uticaj na prinos i sastav ekstrakata. Ekstrakciji je prethodio tretman uzoraka pomoću tople vode i natrijum-karbonata. Ovakav pre-tretman je povećao sadržaj triterpena u etanolnim ekstraktima kore breze sa 66,7% na čak 99%. Povećanje sadržaja triterpena je rezultat toga što se toplom vodom ekstrahuju i odstranjuju fenoli i monosaharidi koji su prisutni u smešama. Dodatak natrijum-karbonata eliminiše monosaharide i fenole i značajno povećava sadržaj BE. Dakle, sadržaj fenolnih jedinjenja i monosaharida se može u velikoj meri smanjiti pre-tretmanom pomoću vruće vode i natrijum-karbonata i time doprineti povećanju prinosa BE i ostalih triterpena ekstrakcijom polarnim rastvaračima (Rizihkovs i sar., 2015).

Nakon pre-tretmana, ekstrakcija je vršena sledećim rastvaračima: etanolom, metanolom, acetonom, hloroformom, dihlormetanom, benzenom, cikloheksanom, *n*-heptanom, petrol-etrom, *n*-heksanom, a detekcija je vršena GC-MS metodom. Rezultati pokazuju da ekstrakti dobijeni polarnijim rastvaračima sadrže do 6 puta više smeše koja se sastojala iz fenolnih jedinjenja koja su bila odgovorna za braon boju ekstrakata. U slučaju nepolarnih rastvarača, boja ekstrakata je bila bela. Što se tiče LU, njegov prinos se nije znatno razlikovao između ekstrakata dobijenih polarnim i nepolarnim rastvaračima (1,2-2,5%), što ukazuje na dobru rastvorljivost u različitim rastvaračima. Sadržaj BE i ukupan prinos ekstrakcije je dosta manji u ekstraktima dobijenim nepolarnim rastvaračima u odnosu na one dobijene polarnim rastvaračima. Rezultati su prikazani u tabeli 4. Iako je ekstrakcijom nepolarnim rastvaračima dobijen manji prinos ekstrakcije i niži sadržaj BE, ovi ekstrakti ipak imaju jednu prednost. Nakon rekristalizacije ekstrakata dobijenih nepolarnim rastvaračima ne dolazi do stvaranja nepoželjnih solvata i formiranja vodonične veze između BE i rastvarača, niti između dva molekula rastvarača. Sadržaj smeše fenolnih jedinjenja je takođe dosta manji. Međutim, polarni rastvarači su manje toksični ili netoksični, i zbog toga je moguća primena ovakvih ekstrakata u kozmetičkoj, industriji dijetetskih suplemenata ili farmaceutske industriji. Opisani pre-tretman i ekstrakcija polarnim rastvaračima daje dobru osnovu za upotrebu ekstrakata kore breze i njihovu implementaciju u kozmetičke i farmaceutske preparate (Rizihkovs i sar., 2015).

Tabela 4. Prinos ekstrakcije i sadržaj triterpena u ekstraktima spoljašnje kore breze (Rizihkovs i sar., 2015)

Rastvarač	UEM (%)	BE (%)	LU (%)	Smeša (%)	Relativna polarnost
Cikloheksan	8,3 ±0,5	6,1	1,5	0,7	0,006
<i>n</i> -Heksan	4,5 ±0,4	1,5	1,8	1,2	0,009
Petrol-etar 100-140 °C	7,8 ±0,6	4,8	2,2	0,8	0,011
Benzen	17,6±0.8	11,1	2	4,5	0,111
<i>n</i> -Heptan	4,1±0,9	1,9	1,2	1	0,012
Hloroform	33,3±1.4	24,3	2,5	6,5	0,259
Dihlormetan	33,0±1,0	21,3	2,2	9,5	0,309
Aceton	33,9±1,2	25	2	6,9	0,355
Etanol	36,2±0,5	22,3	2,2	11,7	0,654
Metanol	34,5±0,9	24,3	2,4	7,8	0,762

UEM-ukupne ekstraktivne materije, Smeša - smeša fenolnih jedinjenja.

Određena količina etarskog ulja se nalazi u kori breze (odnosno u kori grana). Njegov prinos je oko 0,1%, i manji je u poređenju sa prinosom etarskog ulja iz lista i pupoljaka. Dobija se postupcima hidrodestilacije, a analizira GC i GC-MS metodama. Utvrđeno je da je u etarskom ulju dominantno jedinjenje 14-hidroksi- β -kariofilen (19,8%). Od ostalih jedinjenja zastupljeni su: 14-hidroksi-4,5-dihidro- β -kariofilen, α -humulen, *des*-4-metilkariofil-8(14)-en-5-on, β -betulenal i humulen-epoksid II. Iz ovih rezultata se vidi da je sastav etarskog ulja grana breze sličan onom iz pupoljaka (Can Başer i Demirci, 2007).

Kora breze predstavlja vredan izvor triterpena koji imaju širok spektar bioloških i farmaceutskih aktivnosti. Zbog toga su važna dalja istraživanja na ovom polju, u smislu poboljšanja tehnika ekstrakcije i izolacije bioaktivnih jedinjenja, kao i njihove buduće upotrebe.

U sledećem poglavlju će biti opisani neki od najznačajnijih triterpena kore breze.

2.3.4.1. Biološki aktivna jedinjenja spoljašnje kore breze

Najznačajnija biološki aktivna jedinjenja spoljašnje kore breze su pentaciklični triterpeni tipa lupana: BE, BK, LU, eritrodiol. Zbog svojih osobina predstavljaju grupu obećavajućih jedinjenja pogodnih za razvoj višenamenskih farmaceutskih preparata.

2.3.4.1.1. Betulin

Betulin (IUPAC naziv lup-20(29)-en-3 β ,28-diol), poznat još i pod nazivima betulinol i betulinski alkohol, je pentaciklični triterpen tipa lupana. Njegova hemijska formula je predstavljena na slici 5. Izolovao ga je Lowitz 1788. godine, sublimacijom iz kore breze, a hemijska formula je do detalja razjašnjena 1952. godine. Jedno je od prvih prirodno izolovanih jedinjenja (Alakurtti i sar., 2006). BE se prirodno može naći u preko 200 biljnih vrsta, a najznačajniji i najbogatiji izvor je svakako familija breza (*Betulaceae*) i to prevenstveno vrste *Betula pendula* i *Betula alba*. Bela boja spoljašnje kore breze potiče upravo od BE, koji je smešten u ćelijama periderma (Ostapiuk i sar., 2021). Takođe se može naći u listu breze i u spoljašnjem delu korena, ali u znatno manjim količinama u odnosu na koru (Šiman i sar., 2016). Osim breza, biljke iz familije *Betulaceae* koje sadrže BE su *Alnus* vrste, kora leske (*Corilus avellana*) i grab (*Carpinus betulus*). Nalazi se uglavnom u obliku kristalnih naslaga (grozdova) u spoljašnjim slojevima kore breze, u velikim ćelijama sa tankim zidovima, koje nastaju u toku proleća (Alakurtti i sar., 2006; Ostapiuk i sar., 2021).

Kora breze je otpadna sirovina prilikom obrade drveta u šumarstvu, ali predstavlja veoma važan resurs u industrijskoj proizvodnji BE. BE se može izolovati iz kore sublimacijom ili ekstrakcijom organskim rastvaračima (dihlormetan, hloroform, aceton, etanol, metanol), a nakon toga rekristalizacijom iz odgovarajućeg rastvarača. Nedostaci ekstrakcionih metoda u industrijskoj proizvodnji BE su: niska produktivnost, visoka cena i nedovoljna bezbednost, pa je u praksi njegova proizvodnja ekstrakcionim procesom dosta ograničena (Qi-he i sar., 2009).

Betulin karakteriše velika lipofilnost (particioni koeficijent $\log P = 5,34$) i veoma slaba rastvorljivost u vodenim medijumima, što se može predvideti na osnovu njegove hemijske formule. Takođe, penetracija BE kroz kožu je ograničena. Ovo predstavlja veliki nedostatak prilikom izrade farmaceutskih i kozmetičkih preparata (Chrobak i sar., 2019). Sa druge strane, zbog brojnih bioloških aktivnosti BE i derivati dobijeni njegovom modifikacijom imaju veliki potencijal za praktičnu primenu. Osobina koja ih nominuje za potencijalne terapijske preparate je njihova ne-toksičnost *in vitro* i *in vivo*. Postoje podaci da BE i BK ne pokazuju

toksičnost do koncentracije od 500 mg/kg telesne težine, dok LU ne izaziva neželjene efekte nakon peroralne primene u dozi od 2000 mg/kg (Urban i sar., 2004). Zbog toga se radi na usavršavanju i izradi savremenih formulacija sa BE i derivatima (inkluzioni kompleksi, nanočestice, lipozomi).

Betulin je hemijski aktivan ugljovodonik, pošto sadrži supstituente i grupe koje se modifikacijom lako mogu prevesti u funkcionalne grupe. Zato se koristi kao polazno jedinjenje od koga se dobijaju derivati koji po svojim karakteristikama mogu imati bolja svojstva u odnosu na čist BE (Günther i sar., 2021). Na ovom molekulu karakteristične su 3 pozicije na kojima se lako može izvršiti hemijska modifikacija, i to: sekundarna hidroksilna grupa na poziciji C-3, primarna hidroksilna grupa na poziciji C-20 i alkenaska grupa na poziciji C-28. BE se u dva koraka može prevesti u biološki aktivniju BK (Kim i sar., 1997).

Jedna od najvažnijih aktivnosti BE je citotoksičnost na različitim ćelijskim linijama malignih ćelija, izazivanjem apoptoze, dok zdrave ćelije ostaju neoštećene. Apoptoza, odnosno programirana ćelijska smrt, je proces koji se odigrava kod oštećenih ćelija ili ćelija izloženih stresnim faktorima, i dovodi do niza organizovanih reakcija koje rezultiraju smrću ćelije (Zhou i sar., 2018). U istraživanju grupe naučnika (Şoica i sar., 2012) je prikazano da BE pri koncentracijama 10 μ M zaustavlja ćelijski ciklus ćelijske linije B164A5 melanoma miševa i smanjuje njihov broj. BE indukuje apoptozu na ćelijskim linijama humanog adenokarcinoma pluća (A549) (Pyo i sar., 2009). Utvrđeno je da BE deluje apoptotički na ćelije karcinoma kolona (debelog creva), pankreasa, ovarijuma i nekih vrsta hepatoma (malignih tumora jetre) (Hordyevska i sar., 2019). Selektivna citotoksičnost BE, koja se odnosi samo na maligne ćelije, je velika prednost u odnosu na konvencionalne lekove.

Betulin, zajedno sa BK i LU poseduje antiinflamatorno i antialergijsko dejstvo. Kod indukovanih edema šape pacova, njegovo antiinflamatorno dejstvo je uporedivo sa standardnim supstancama (Kozioł, 2021). Neki literaturni podaci ukazuju da BE i njegovi derivati deluju na stopiranje životnog ciklusa HIV virusa u inficiranoj ćeliji u ranoj fazi i štite okolne ćelije od širenja virusa. Pretpostavka je da se njihov mehanizam dejstva sastoji u blokiranju virusnog proteinskog omotača i posledičnog blokiranja vezivanja virusa za spoljašnju membranu ćelija domaćina. Međutim, potrebna su dalja laboratorijska i klinička ispitivanja i izbor najaktivnijih jedinjenja iz ove grupe, da bi se potvrdili ovi efekti (Dzubak i sar., 2006; Ryu i sar., 2000).

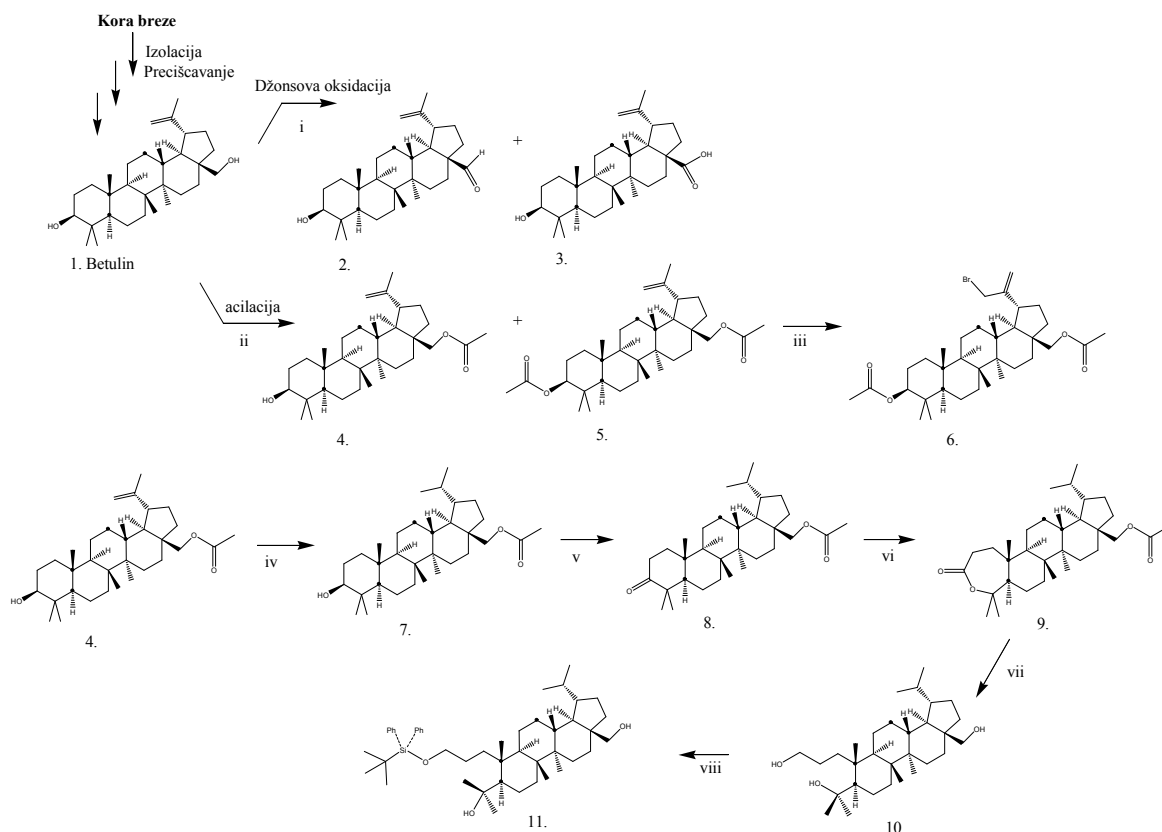
In vivo BE redukuje nivoe lipida u krvi, a svoje lipotropno dejstvo ispoljava u krvi, jetri i masnom tkivu (Kozioł, 2021). Utvrđena je i hepatoprotektivna aktivnost BE na ćelije jetre HepG2. BE je doveo do smanjenja citotoksičnosti izazvane kadmijum(II)-hloridom.

Primenom BE 24 h pre izlaganja ćelija toksičnom agensu se postiže najbolji zaštitni efekat. Pretpostavlja se da BE uzrokuje sintezu neidentifikovanog proteina koji deluje hepatoprotektivno (Dzubak i sar., 2006).

In vivo studije na pacovima sa hiperoksalurijom (povećanim izlučivanjem oksalata) su pokazale da BE i LU smanjuju oštećenje bubrežnih tubula i stopu taloženja kristala u bubrezima pacova. Povećavaju zapreminu izlučenog urina (smanjuje se prezasićenost urina) i smanjuju količinu izlučenog oksalata. Pretpostavka je da inhibiraju neke enzime koji sintetišu oksalat iz glikolne kiseline unete ishranom. Primenom BE i LU koncentracija glikozaminoglikana i magnezijuma u urinu je normalizovana. Magnezijum-oksalat ima veću rastvorljivost od kalcijum-oksalata, a glikozaminoglikani ometaju formiranje kristala. Istovremeno, koncentracija proteina u urinu se smanjuje. Ovi rezultati pokazuju da BE i LU smanjuju rizik od taloženja kalcijum-oksalata u bubrezima, a time i formiranje bubrežnih kamena (Kozioł, 2021).

Značajan je i antikonvulzivni efekat BE koji se postiže vezivanjem za receptore gama-amino buterne kiseline (GABA). GABA je glavni inhibitorski neurotransmiter u nervnom sistemu. Vezivanjem za njegove receptore, BE deluje agonistički i smanjuje mogućnost konvulzija. Ovaj efekat je potvrđen kako *in vitro*, tako i *in vivo* kod miševa (Muceniece i sar., 2008).

Günther i saradnici (2021) su proučavali antioksidativnu aktivnost derivata BE koji se dobijaju Jonesovom oksidacijom i acilovanjem BE, kao i njihovu permeabilnost kroz kožu. Izvršena je sinteza estara i ketona, koji imaju različite osobine u odnosu na čist BE (slika 5). DPPH testom je zabeležena antioksidativna aktivnost svih derivata, osim onih pod brojevima 4 (acetatna grupa na položaju 28) i 5 (acetatne grupe na položajima 3 i 28), a derivat 8 (keto grupa na položaju 3) ima najjaču antioksidativnu aktivnost. Etanol je korišćen kao nosač za kutanu aplikaciju BE i derivata 8, pri fiziološkim uslovima. Za testiranje u *in vitro* uslovima je upotrebljen uzorak svinjske kože. Zapažena je bolja permeabilnost kroz kožu derivata 8 u odnosu na BE, ali i akumulacija oba jedinjenja u koži. Utvrđeno je da etanol kao nosač povećava permeabilnost kroz kožu, kako BE, tako i derivata 8. Rezultati sugerišu potencijalnu upotrebu pojedinih derivata kao sastojka u farmaceutskim i kozmetičkim preparatima za aplikaciju na koži (Günther i sar., 2021).



Slika 5. Sinteza derivata BE. Prečišćavanje Reagensi i uslovi: i. Džonsova oksidacija, CrO_3 , razblažena H_2SO_4 , aceton, 0°C (u atmosferi azota); ii. 4-dimetilaminopiridin, piridin, Ac_2O , 0°C ; iii. N-bromosukcinimid, CCl_4 ; iv. metanol/tetrahidrofuran, 10% Pd/C, H_2 (40 psi); v. dihlorometan, piridinium-hlorohromat, 0°C ; vi. hloroform, 70% 3-hloroperbenzoeva kiselina, 35°C ; vii. tetrahidrofuran, LiAlH_4 , -40°C ; viii. imidazol, tetrahidrofuran, *tert*-butil(hloro)difenilsilan, -70°C (prevedeno i prilagođeno iz Gunther i sar., 2021).

2.3.4.1.2. Betulinska kiselina

Betulinska kiselina (IUPAC naziv: 3β -hidroksi-lup-20(29)-en-28-oilna kiselina) je derivat BE koji nastaje njegovom oksidacijom. Razlika u strukturi je samo na položaju C-28, gde BE sadrži metoksi grupu, a BK karboksilnu grupu. Prisutna je u spoljašnjoj kori breze, ali u znatno manjim količinama od BE (Ostapiuk i sar., 2021). Osim kod breze, BK se može naći i u drugim biljnim vrstama: *Ziziphus joazeiro*, *Tetracentron sinense*, *Berlinia grandiflora*, *Dorstenia convexa*, *Callistemon speciosus*, *Syzygium claviflorum*, *Vitex negundo* (Alhazmi i sar., 2017).

Betulinska kiselina se iz kore breze može izolovati na više načina. Svakako najjednostavniji način jeste ekstrakcija organskim rastvaračima, kao što su: etil-acetat, *n*-

heksan, *n*-heptan, propanol, etanol, metanol (Boryczka i sar., 2012; Jäger i sar., 2008; Orsini i sar., 2015). Ekstrakcija se može ubrzati ili poboljšati upotrebom ultrazvuka, ekstrakcijom superkritičnim ugljen-dioksidom sa određenim organskim rastvaračima ili sublimacijom (Alhazmi i sar., 2017).

Biološka dejstva BK se intenzivno proučavaju poslednjih decenija. Zajedno sa ostalim pentacikličnim triterpenima, BK ispoljava antiinflamatorni efekat i učestvuje u imunomodulaciji (Laszczyk i sar., 2006). Takođe je poznato njeno antioksidativno i antibakterijsko dejstvo (Moghaddam i sar., 2012).

Kao i kod BE, pozicije na kojima se lako može izvršiti hemijska modifikacija jesu: C-3, C-20 i C-28. Modifikacijom funkcionalnih grupa na C-3 i C-28 dobijaju se derivati koji imaju jaču antikancerogenu aktivnost u odnosu na polaznu BK. Na primer, prevođenjem alkenske grupe na C-20 u keto grupu dobija se jedinjenje sa pojačanom citotoksičnom aktivnošću (Alhazmi i sar., 2017).

Betulinska kiselina se uspešno koristi kao selektivni inhibitor tumorogeneze kod različitih vrsta karcinoma na ćelijskim linijama i primarnim uzorcima tumora. Prijavljeno je da inhibira rast kancera i deluje kao okidač apoptoze, ne samo u ćelijskim kulturama, već i *in vivo*. Još u prvim istraživanjima na ovu temu je potvrđeno posredovanje u specifičnoj citotoksičnosti u malignim ćelijama, inhibiranjem rasta tumora i podsticanjem apoptoze u ćelijskim linijama kancera, dejstvom na mitohondrije (Fulda i sar., 2000; Pisha i sar., 1995). Još nekoliko istraživanja ukazuju da BK igra značajnu ulogu u signalnim putevima stimulisanjem ili inhibiranjem ekspresije anti-apoptotičkih, pro-apoptotičkih proteina i reaktivnih vrsta kiseonika (Alhazmi i sar., 2017). Literaturni podaci govore o antikancerogenom dejstvu protiv humanih melanoma, kolorektalnih adenokarcinoma, miosarkoma, nekih tumora mozga kao što su neuroblastomi, gliomi i meduloblastomi, skvamoznih tumora glave i vrata, kancera štitne žlezde, pluća, pankreasa, prostate. Značajno antikancerogeno dejstvo je postignuto na ćelijskim linijama metastazirajućeg kancera dojke, koji zbog svojih osobina (proliferacija, migracija i invazija) ima visok rizik smrtnosti (Hordyevska i sar., 2019).

Betulinska kiselina ima jaču antikancerogenu aktivnost u odnosu na BE. Međutim, značajno je da oba jedinjenja mogu da se koriste u kombinaciji sa drugim citotoksičnim lekovima u lečenju kancera. Kombinacijom BK sa jonizujućim zračenjem, doksorubicinom, cisplatinom, vinkristinom, 5-fluorouracilom i taksolom su dobijeni zadovoljavajući terapijski rezultati. Kombinacija BE sa sorafenibom pojačava apoptozu u odnosu na terapiju samo sorafenibom kod različitih ćelijskih linija kancera pluća (Hordyevska i sar., 2019).

Drugi mehanizam kojim BK deluje jeste povećanje oksidativnog stresa kod malignih ćelija. Normalne ćelije su konstantno izložene stresnim faktorima (UV zračenje, radijacija, hipoksija) koji dovode do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. Reactive Oxygen Species, ROS). Oksidativni stres i zapaljenje igraju ključnu ulogu u razvoju i patogenezi kancera. U prisustvu oksidativnog stresa, kancerske ćelije postaju upaljene i oštećene. Dolazi do oštećenja DNK i proliferacije ćelija. Tumorske ćelije su, u odnosu na normalne ćelije, mnogo otpornije na oksidativni stres i mogu preživeti u hipoksičnim uslovima. Antioksidansi su supstance koje dovode do neutralizacije ROS efekata. Zapaženo je da se nivo ROS u ćelijskim linijama HeLa cervikalnog kancera značajno povećava nakon izlaganja ćelija BK. Povećani nivoi ROS u ćeliji dovode do njene apoptoze. To dovodi do zaključka da BK indukuje apoptozu HeLa ćelija aktivacijom ROS u njima (Xu i sar., 2014). Podaci iz literature ukazuju da na određenim ćelijskim linijama i tkivima karcinoma prostate, karcinoma dojke i multiplog mijeloma takođe deluje apoptotički, direktnim uticajem na markere apoptoze, i tim putem ispoljava antikancerogeni efekat (Alhazmi i sar., 2017).

Betulinska kiselina u *in vitro* uslovima pokazuje značajnu antioksidativnu aktivnost, a EC_{50} vrednosti dobijene DPPH i ABTS testovima su $90 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ i $105 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, redom. Takođe ima inhibitorni efekat na enzime acetilholinesterazu i butirilholinesterazu, sa EC_{50} vrednostima $67 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ i $80 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, redom. Ova vrsta enzimske aktivnosti je veoma poželjna kod nekih patoloških procesa u centralnom nervnom sistemu. EC_{50} vrednosti, iako manje od standardnih komercijalnih lekova, ipak mogu biti od značaja (Bari i sar., 2019).

Tokom inflamacije, ćelija pojačano proizvodi pro-inflamatorne citokine, kao što su faktori tumorske nekroze (TNF) i porodica interleukina, koji dovode do hipoksije i smrti ćelije. Njihova ekspresija je regulisana nuklearnim faktorom kapa B (NF- κ B), pa je praćenje i ovog medijatora jako važno. Na vaskularnoj glatkoj muskulaturi BK povećava ekspresiju ciklina i smanjuje signalizaciju ROS i NF- κ B (Vadivelu i sar., 2012) i na taj način deluje antiinflamatorno. Grupa kineskih istraživača je došla do zaključka da BK može biti od koristi pri smanjenju vaskularne inflamacije i ateroskleroze. Inhibicija aktivacije i signalnog puta NF- κ B i smanjenje otpuštanja inflamatornih citokina, redukcija aterosklerotskih lezija u *in vivo* uslovima kod miševa, indukcija efluksa holesterola i povećanje nivoa HDL holesterola su samo neki od mehanizama delovanja BK (Zhao i sar., 2013).

U literaturi se mogu naći podaci o antifungalnoj aktivnosti BK protiv velikog broja izazivača gljivičnih infekcija. Svoju aktivnost postiže oštećenjem ćelijskog zida gljivica. Rezultati su pokazali da minimalna inhibitorna koncentracija proizvodi blagi stres na ćelije gljivica i doprinosi kontrolisanoj sintezi rasta ćelija sličnim mehanizmom kao i antifungalni

lek anidulafungin. Pored toga je pokazano da BK inhibira rast gljivica pokretanjem oštećenja membrane, posebno ugrožavajući integritet nukleotida. Takođe, dalja analiza je pokazala da oštećenje na gljivičnoj membrani nakon uvođenja BK nastaje zbog vezivanja za ergosterol. Utvrđeno je dejstvo BK kod kutanih i mukokutanih mikoza pri koncentracijama 8-128 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Innocente i sar., 2014). Zhang i saradnici (2002) su utvrdili antimikotični efekat na gljivicu *Candida albicans* i inhibiciju rasta sa EC_{50} vrednošću od 6,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Zhang i sar., 2002).

Rezistencija na antibiotike je globalni problem. Nekontrolisana i neopravdana upotreba antibiotika dovodi do pojave super-bakterija rezistentnih na veliki broj ili na sve postojeće antibiotike. Zato se radi na pronalaženju lekova nove generacije i drugačijih terapijskih pristupa. Među njima je i potraga za jedinjenjima dobijenim iz biljnih izvora, kao što su flavonoidi, fenilpropanoidi i terpeni (Abdallah i sar., 2023).

Utvrđen je antibakterijski efekat BK protiv *Bacillus cereus* i potencijalni antibakterijski efekat protiv *Staphylococcus aureus*, mehanizmom koji inhibira biosintezu proteina i sintezu ćelijskog zida. Takođe deluje na *Bacillus subtilis*, a pretpostavlja se da deluje mehanizmom koji do sada nije opisan, jer se struktura BK razlikuje od svih postojećih antibiotika (Wang i sar., 2016). Neka istraživanja pokazuju da BK može izmeniti rezistenciju bakterija na oksacilin, ampicilin i β -laktamske antibiotike blokiranjem deobe ćelija i, na taj način, inhibiranjem makromolekularne i DNK sinteze, posebno kod *Bacillus subtilis*. Osim toga, inhibira recikliranje prekursora monomera mureina, smanjuje aktivnost i sekreciju β -laktamaze. Kao rezultat toga, BK može doprineti povećanju osetljivosti bakterija na β -laktamske antibiotike i to uglavnom u slučaju sojeva *Staphylococcus aureus* otpornih na meticilin. Prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti BK prema Gram-pozitivnim bakterijama poput *Listeria monocytogenes* i *Enterococcus faecalis*, otkriveno je da BK u kombinaciji sa tetraciklinima ili ampicilinom dovodi do sinergističkih antibakterijskih efekata protiv rezistentnih sojeva (Alhazmi i sar., 2017). Moghaddam i saradnici (2012) su primetili da BK ima aktivnost protiv *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Candida albicans* sa minimalnom inhibitornom koncentracijom većom od 128 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. BK se može koristiti kao potencijalni antibakterijski agens samostalno ili u kombinaciji sa komercijalnim antibioticima, zbog sinergističkog dejstva (Moghaddam i sar., 2012).

Dostupni literaturni podaci daju informacije o antivirusnoj aktivnosti BK i njenih derivata. U istraživanju Kanamota i saradnika (2001) se navodi da BK smanjuje akumulaciju virusnih antigena u kultivisanim ćelijskim linijama i da se antivirusno dejstvo zasniva na inhibiciji sazrevanja virusnih čestica (Kanamoto i sar., 2001). Nekoliko derivata sa

modifikovanim bočnim lancem pokazuju visoko selektivan inhibitoran efekat protiv HIV-1 virusa. Dokazano je da inhibiraju sazrevanje i fuziju HIV-1 virusa. Takođe sprečavaju integraciju i ulazak virusa u ćelije domaćina (Aiken i Chen, 2005). Derivati kao što su PA-457 i 3-*O*-(30,30-dimetilsukcinil)-BK su značajni zbog svog antivirusnog dejstva, EC₅₀ vrednosti 5 μM, male toksičnosti za tkivne kulture i relativno lake sinteze. 3-*O*-(30,30-dimetilsukcinil)-BK ometa replikaciju virusa i uzrokuje stvaranje nekompletnih virusnih proteina. Virusne čestice rezistentne na neke antivirusne agense su osetljive na ove derivate. Međutim, istraživanje daje podatke o tome da su ovi derivati aktivni samo na određenim tipovima virusa, kao što je HIV-1, dok kod drugih vrsta (SIV i HIV-2) uopšte ne ispoljavaju aktivnost, čak ni u mikromolarnim koncentracijama (Huang i sar., 2004). Kasnije istraživanje (Pierson i Doms, 2003), navodi da 3-*O*-(30,30-dimetilsukcinil)-BK pokazuje aktivnost protiv replikacije HIV-1 virusa u inficiranim limfocitima, sa EC₅₀ vrednošću od 1,4 μM. Svakako su potrebna dodatna istraživanja koja će detaljnije razjasniti antivirusno dejstvo BK i njenih derivata, kao i mehanizme kojima deluju.

2.3.4.1.3. Lupeol

Lupeol (IUPAC naziv lup-20(29)-en-3β-ol) je pentaciklični triterpen tipa lupana. Prirodni izvori LU su, osim familije Betulaceae, i druge biljne vrste: maslina (*Olea europaea*), smokva (*Ficus carica*), mango (*Mangifera indica*), jagoda (*Fragaria*), crveno grožđe (*Vitis vinifera* L.), lišajevica (*Hieracium pilosella*), tamarind (*Tamarindus indica*), *Crataeva nurvala* (Buch Ham), maginja (*Arbutus unedo*), ružino drvo (*Tipuana tipu*), *Leptadenia hastata*, *Anemone raddeana*, *Gossampinus malabarica*, *Acacia mellifera* (Wal i sar., 2011).

Lupeol ispoljava antiinflamatorno dejstvo, poput BE i BK. LU izolovan iz kore varune (*Crataeva nurvala*) ima antiinflamatorno dejstvo kod akutnih i hroničnih upala pacova. Smanjuje otok šapa kod pacova sa veštački izazvanim artritismom do 39%. Antiinflamatorni efekti LU su takođe primećeni kod pacova sa artritismom izazvanim formaldehidom. Aktivnost je zabeležena i u smanjenju zapremine eksudata i inhibiciji ukupnog broja leukocita kod pacova. Verovatno je antiinflamatorna aktivnost ovog jedinjenja rezultat imunosupresivne aktivnosti i povezana je sa inhibicijom migracije ćelija ka inflamatornim mestima, kao i smanjenjem proinflamatornih hemotaktičkih faktora (Koizol, 2021).

Lupeol je, pored BE i BK, pokazao visoku antivirusnu aktivnost protiv *Herpes simplex* virusa tip 1, testom na suspenziji virusa, sa EC₅₀ vrednošću 0,2 μg/cm³. Infektivnost sojeva ovog virusa osetljivih na komercijalni lek aciklovir, ali i aciklovir-rezistentnim

kliničkim sojevima je bila značajno smanjena. Dokazana je koncentracijski i vremenski zavisna antiherpesna aktivnost. Najjača aktivnost je uočena u ranoj fazi infekcije (Heidary Navid i sar., 2014).

Još jedna od njegovih prednosti je niska toksičnost. Ustanovljeno je da primena LU u dozi 2 g/kg telesne mase dnevno ne dovodi do neželjenih efekata kod pacova i miševa. Nakon praćenja u trajanju od 96 h nije zabeležen ni jedan smrtni ishod. Nakon primene LU topikalno kod miševa u dozi od 2 mg/životinji, što je ekvivalentno 80 mg/kg, 3 puta nedeljno, tokom 28 nedelja, nije zabeležen ni jedan toksični efekat (Saleem i sar., 2004).

2.4. Ciklodekstrini i inkluzioni kompleksi

2.4.1. Struktura i primena ciklodekstrina

Ciklodekstrini (CD) su porodica cikličnih oligosaharida sastavljenih od 6 (α -ciklodekstrini), 7 (β -ciklodekstrini), 8 (γ -ciklodekstrini), 9 (δ -ciklodekstrini), 10 (ϵ -ciklodekstrini) ili više α -(1,4)-vezama povezanih subjedinica glukopiranoze. Dobijaju se degradacijom skroba reakcijom transglikozilacije. CD su molekuli čija je spoljašnost hidrofilna, a unutrašnjost hidrofobna, pa su zato rastvorljivi u vodi, a istovremeno imaju hidrofobni matriks. Učestvuju u hemijskim reakcijama koje uključuju intramolekularne interakcije u kojima ne dolazi do formiranja kovalentne veze između molekula koji učestvuju u interakciji, jona ili radikala. Većina ovih interakcija su tipa „domaćin–gost“ (Brewster i Loftsson, 2007; Del Valle, 2004). Imaju sposobnost formiranja inkluzionih kompleksa, pa se osobine supstanci sa kojima formiraju komplekse mogu značajno modifikovati. U kompleksima CD zauzimaju oblik skraćenog konusa sa glukopiranoznim jedinicama u konformaciji stolice. Sekundarne hidroksilne grupe su na širem, a primarne na užem kraju konusa (Loftson i Brewster, 2011). Struktura „gosta“ ostaje nepromenjena, što je u slučaju lekova jako bitno, jer nakon oslobađanja iz kompleksa ne dolazi do promene afiniteta za biološke membrane i receptore (Loftsson i sar., 2016). CD imaju i sposobnost formiranja ne-inkluzionih kompleksa, formiranja agregata i stabilizacije prezasićenih rastvora lekova. CD se najviše koriste u industrijskim proizvodima, tehnologijama i analitičkim metodama, a zanemarljivi toksični efekti idu u prilog njihovoj širokoj upotrebi. Našli su primenu u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i tekstilnoj industriji, procesima separacije i zaštiti životne sredine (Brewster i Loftsson, 2007; Del Valle, 2004).

Upotreba prirodnih α , β i γ -CD je ograničena zbog limitirane rastvorljivosti u vodenim rastvorima, pa su zato njihovi derivati od mnogo većeg značaja (Loftson i Brewster, 2011). Sintetski derivati CD se dobijaju reakcijama esterifikacije, eterifikacije i aminacije primarnih i sekundarnih hidroksilnih grupa. Funkcionalnost CD se menja jer derivati imaju izmenjene osobine u odnosu na matične CD. Veličina hidrofobne šupljine i sposobnost formiranja inkluzionih kompleksa je promenjena u odnosu na prirodne CD. Derivatizacija se vrši u cilju poboljšanja rastvorljivosti, otpornosti na svetlost, oksidaciju i hemijske aktivnosti molekula gosta. Toksikološkim studijama je utvrđeno da su CD dati oralno netoksični, zbog veoma slabe apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta. Otporniji su na enzimsku i neenzimsku hidrolizu u odnosu na linearne analoge, zbog svoje ciklične strukture (Del Valle, 2004; Loftsson i Brewster, 2011). γ -CD, 2-hidroksipropil- β -CD (HP- β -CD), sulfobutiletar- β -CD, maltozil- β -CD su bezbedni za parenteralnu primenu. Međutim, matični α -CD i β -CD, kao i metilovani β -CD nisu bezbedni za parenteralnu primenu (Del Valle, 2004). Glavni neželjeni efekat β -CD je nefrotoksičnost pri parenteralnoj primeni, kao i slaba rastvorljivost u vodi. Derivati β -ciklodekstrina kao što su HP- β -CD i sulfobutiretar- β -CD se, za razliku od prirodnog β -CD, mogu koristiti parenteralno jer je dokazano da su netoksični u niskim i umerenim intravenskim dozama (Brewster i Loftsson, 2007).

Derivati β -CD i γ -CD su od značaja u farmaceutskoj industriji, uglavnom kao kompleksirajući agensi zbog svoje mogućnosti da povećaju rastvorljivost u vodi, stabilnost i bioraspoloživost slabo rastvornih lekova i potencijalnih kandidata za lekove. Često se koriste hidroksipropil-derivati β - i γ -CD, nasumično metilovani β -CD, sulfobutiletri β -CD i tzv. razgranati CD (Brewster i Loftsson, 2007).

Prilikom izvođenja eksperimenata sa standardima BE i BK izabran je HP- β -CD zbog njegovih odgovarajućih svojstava. Ovaj CD je od značaja u farmaceutskoj industriji zbog dobre rastvorljivosti u vodi, podnošljivosti i minimalnih neželjenih efekata (blag laksativni efekat). Inkluzija molekula gosta zavisi ne samo od njegovih fizičko-hemijskih svojstava, već i od uslova pri kojima se vrši inkluzija: pH, temperatura, rastvarač. HP- β -CD ima bolju rastvorljivost u vodi od prirodnih CD zbog prisustva hidrofilnih alkoholnih grupa. Evropska Medicinska Agencija je 2017. godine odobrila ovaj CD za oralnu i parenteralnu primenu (D'Aria i sar., 2022). Oralna bioraspoloživost je svega 0,5-3,3%, a apsorpcija se odvija uglavnom pasivnom difuzijom. Deo se nepromenjen izlučuje putem stolice, a deo metaboliše crevnim bakterijama. Na primeru formulacija itakonazola sa HP- β -CD je dokazano da je oralna bioraspoloživost manja od 1%. Ukoliko se primeni putem intravenske injekcije, skoro potpuno se izluči glomerularnom filtracijom, putem bubrega. HP- β -CD je sastojak različitih

farmaceutskih oblika (oralni: tablete, kapsule, praškovi, suspenzije, supozitorije i rastvori; kapi za oči; intravenski rastvori; intravenske infuzije) u komercijalnim lekovima. Oralno se primenjuje u dozi do 8 g po danu, a intravenski do 16 g po danu (Brewster i Loftsson, 2007; Loftsson i Brewster, 2011; Stella i He, 2008).

2.4.2. Inkluzioni kompleksi

Značaj CD se ogleda u njihovoj mogućnosti da molekulskom kompleksacijom formiraju inkluzione komplekse sa velikim brojem supstanci (čvrste, tečne i gasovite), a kompleksi se mogu formirati u kristalnom i tečnom stanju. Molekul gosta se inkorporira u šupljinu molekula domaćina CD (Del Valle, 2004). CD predstavljaju veoma značajne solubilizatore za veliki broj oralnih i parenteralnih doziranih oblika (Brewster i Loftsson, 2007).

Lipofilni molekuli gosta odgovarajuće veličine se inkorporiraju u šupljinu CD, pri čemu ne dolazi do raskidanja postojećih ili formiranja novih kovalentnih veza. Jačina vezivanja zavisi od sternih faktora, kao što su veličina šupljine molekula CD i veličina molekula gosta, i funkcionalnih grupa, pri čemu specifične molekulske interakcije između površina atoma igraju veliku ulogu. Ako je molekul gosta neodgovarajuće veličine, neće doći do pravilnog uklapanja u molekul CD. Drugi bitan faktor su termodinamičke interakcije između molekula gosta, domaćina i rastvarača, pri čemu uklapanje molekula gosta u molekul domaćina mora biti termodinamički povoljan proces. Generalno, jedan molekul gosta bude inkorporiran u jedan molekul ciklodekstrina. Međutim, molski odnos 1:1 se ne postiže uvek, posebno kod molekula gosta velike ili male molekulske mase. U slučaju molekula male molekulske mase više od jednog molekula gosta može stati u šupljinu CD, a u slučaju molekula velike molekulske mase, više od jednog molekula CD se može vezati za molekul gosta. U principu, samo deo molekula treba da stane u šupljinu CD da bi se formirao kompleks (Del Valle, 2004). Efikasnost kompleksiranja se može povećati povećanjem rastvorljivosti molekula gosta, metodama kao što su jonizacija, prevođenje u soli, formiranje kompleksa sa metalima, dodatak polimera ili dodatak organskih rastvarača (Loftsson i Duchêne, 2007). Među korišćenim metodama za formiranje inkluzionih kompleksa su koprecipitacija, metoda guste suspenzije, metoda paste, vlažno mešanje i zagrevanje, ekstruzija i mešanje na suvo (Del Valle, 2004).

Studije su pokazale da inkluzioni kompleksi i CD ne prolaze lipofilne biomembrane, već da lek mora da bude oslobođen iz kompleksa kako bi prošao kroz membranu (Loftsson i Brewster, 2011; Loftsson i sar., 2016). Disocijacija inkluzionog kompleksa je relativno brz proces obično vođen velikim povećanjem broja molekula vode u okolini. Molekul gosta se može osloboditi razblaživanjem kompleksa, supstitucijom molekula gosta nekim drugim molekulom odgovarajuće veličine ili prelaskom molekula u matriks za koji ima veći afinitet (lipofilna biološka membrana, poput oralne sluzokože) (Loftsson i Duchêne, 2007). U veoma razblaženim i dinamičnim sistemima kao što je živ organizam, molekul gosta često ima poteškoća da pronađe drugi ciklodekstrin sa kojim bi formirao kompleks i zato ostaje slobodan u rastvoru (Del Valle, 2004). Prisustvo u vodi rastvorljivih kompleksa lek/ciklodekstrin na površini hidratisanog epitela će uglavnom povećavati dostupnost rastvorenih molekula lekova, posebno lipofilnih lekova koji su slabo rastvorni u vodi (Loftsson i sar., 2006). Studije su pokazale da ciklodekstrini poboljšavaju oralnu bioraspoloživost lekova klase II po biofarmaceutskom klasifikacionom sistemu. Karakteristike klase II lekova su loša rastvorljivost u vodi i visoka permeabilnost. CD mogu da ometaju bioraspoloživost lekova klase I (visoka rastvorljivost, visoka permeabilnost) i lekova klase III (visoka rastvorljivost, loša permeabilnost) (Loftsson i sar., 2004).

U farmaceutskoj industriji veliki broj analiziranih supstanci kandidata za nove lekove ne zadovoljava biofarmaceutske uslove kao što su rastvorljivost i permeabilnost kroz biološke membrane. Slaba rastvorljivost u vodi je uvek u vezi sa slabom bioraspoloživošću lekova unetih oralnim putem, ali i drugim putevima primene (bukalni, nazalni, inhalacioni, vaginalni, rektalni) (Loftsson i Brewster, 2011). Ovi nedostaci se često prevazilaze upotrebom CD i formiranjem inkluzionih kompleksa sa potencijalnim lekovima. Koriste se u hemijskom dizajniranju lekova i u ranim fazama testiranja kandidata za lekove (Loftsson i Duchêne, 2007). Inkorporiranjem molekula gosta unutar šupljine CD dolazi do korisnih modifikacija fizičko-hemijskih osobina molekula gosta, kao što su:

- poboljšanje rastvorljivosti,
- stabilizacija supstanci osetljivih na temperaturu, vidljivu ili UV svetlost, oksidaciju,
- smanjenje isparljivosti ili sublimacije molekula,
- prevođenje tečnih supstanci u praškove,
- zaštita od degradacije mikroorganizmima,
- maskiranje neprijatnog mirisa i ukusa,
- maskiranje pigmenata ili boja,

- izolacija nekompatibilnih molekula,
- kontrolisano oslobađanje supstance u različitim medijumima (Del Valle, 2004).

Prirodni CD i njihovi derivati se takođe koriste u dispergovanim sistemima kao što su emulzije, mikrokapsule, mikrosfere, nanosfere, nanokapsule, lipozomi i niozomi (Duchêne i sar., 2005; Trichard i sar., 2006). Inkluzioni kompleksi glicerida, masnih kiselina ili masnih alkohola poseduju površinsku aktivnost i imaju sposobnost formiranja agregata što često dovodi do formiranja dispergovanih sistema. CD se koriste za povećanje količine leka u polimernim mikrosferama ili za povećanje dostupnosti lekova iz dispergovanih sistema (Loftsson i Duschene, 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Biljni materijal

Korišćeni su različiti delovi breze (*Betula pendula*, Betulaceae) sakupljeni sa lokaliteta Vrnjačka Banja, Srbija (GPS-koordinate: 43°37'30.266"N 20°53'39.077"E). Za materijal biljne vrste sa ovog lokaliteta urađen je vaučer i zaveden u Herbarijumu Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu pod brojem 16426.

Pupoljci breze (*Betulae pendulae gemmae*) su sakupljeni u martu 2018. godine. U cilju očuvanja prirodne boje i medicinskih svojstava, pupoljci breze su sušeni na tamnom i suvom mestu tokom 7 dana, a zatim usitnjeni u laboratorijskom mlinu (Braun Aromatic KSM2) i podvrgnuti hidrodestilaciji u cilju izolacije etarskog ulja.

Kora breze (*Betulae pendulae cortex*) sakupljena je tokom maja 2018. godine. Odmah nakon sakupljanja, odvojen je spoljašnji od unutrašnjeg dela kore i sušen na tamnom, suvom i promajnom mestu tokom 2 nedelje, kada je usitnjen u laboratorijskom mlinu i korišćen za ekstrakciju čvrsto-tečno za dobijanje ekstrakata kojima je određen hemijski sastav i biološke aktivnosti.

Sok breze (*Betulae pendulae succus*) je sakupljen krajem aprila 2022. godine u sterilnoj boci koja je povezana sa sterilnom cevčicom koja se ubada u stablo prečnika oko 25 cm na dubini od 3-5 cm u toku 48 h. Odmah nakon prikupljanja sok je zamrznut na temperaturi -20 °C u cilju očuvanja njegovih fizičko-hemijskih karakteristika i bioloških aktivnosti. Sok breze je korišćen za određivanje hemijskog sastava i bioloških aktivnosti (antimikrobne i antioksidativne aktivnosti, vijabilnosti i proliferacije MDCK ćelija).

List breze (*Betulae pendulae folium*) je sakupljen tokom maja 2024. godine. Nakon sakupljanja, list je sušen na tamnom, suvom i promajnom mestu tokom 2 nedelje. Suvi biljni materijal korišćen je za dobijanje ekstrakta metodom po Soxhlet-u i za dobijanje etarskog ulja metodom hidrodestilacije po Clevenger-u. Ekstrakt i etarsko ulje su podvrgnuti hemijskoj karakterizaciji, a zatim su određene biološke aktivnosti (antimikrobna i antioksidativna aktivnost).

3.1.2. Hemikalije i reagensi

U radu su korišćene sledeće hemikalije i reagensi:

- destilovana voda (Tehnološki fakultet Leskovac, Srbija);

- etil-acetat, Zorka Pharma (Šabac, Srbija);
- dietil-etar, Zorka Pharma, (Šabac, Srbija);
- etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, 96% V/V), Zorka Pharma (Šabac, Srbija);
- azotna kiselina (HNO_3 , 65%), Zorka Pharma (Šabac, Srbija);
- 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP- β -CD), 97%, približne molarne mase $M \approx 1250$ g/mol, Tokyo Chemical Industry Co (Tokio, Japan);
- kalijum-bromid (KBr), spektroskopske čistoće, >99,9%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka);
- heksan, Zorka Pharma (Šabac, Srbija);
- dimetil-sulfoksid (DMSO), 99,8%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka);
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Sigma Chemical Company (St. Louis, SAD);
- betulin (BE), >97,0%, Tokyo Chemical Industry Co (Tokio, Japan);
- betulinska kiselina (BK), >97,0%, Tokyo Chemical Industry Co (Tokio, Japan);
- hranljivi agar, Merck (Darmstadt, Nemačka);
- Mueller-Hinton agar, Torlak (Beograd, Srbija);
- Sabouraud-dextrose agar, Torlak (Beograd, Srbija);
- DMEM medijum za ćelijsku kulturu (Dulbekov modifikovani Iglov medijum - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund, Nemačka);
- MDCK ćelijska linija, imortalizovana ćelija linija dobijena iz epitela tubula bubrega psa (ATCC - American Type Culture Collection, SAD);
- fetalni goveđi serum (FBS), (Capricorn Scientific GmbH, Nemačka);
- stabilni glutamin, (Capricorn Scientific GmbH, Nemačka);
- tripsin-EDTA, (Capricorn Scientific GmbH, Nemačka);
- antibiotik-antimikotik rastvor (Capricorn Scientific GmbH, Nemačka);
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) (Carl Roth GmbH, Nemačka);
- 2-propanol (Thermo Scientific, SAD);
- tripan plavo (*Trypan Blue Exclusion Dye*), Gibco (SAD);
- trifetil tetrazolijum hlorid (TTC), Sigma-Aldrich (Poznan, Poljska);
- natrijum-karbonat (Na_2CO_3), Centrohem (Beograd, Srbija);

- natrijum-hlorid (NaCl), Centrohem (Beograd, Srbija);
- kalijum-acetat (CH₃COOK), Centrohem (Beograd, Srbija);
- Folin-Ciocalteu reagens, Sigma Chemical Company (St. Louis, SAD);
- galna kiselina, Sigma Chemical Company (St. Louis, SAD);
- aluminijum(III)-hlorid (AlCl₃ × 6H₂O), Centrohem (Beograd, Srbija);
- rutin, Sigma Chemical Company (St. Louis, SAD);
- homologne serije *n*-alkana: standardni rastvor alkana C₈-C₂₀ (~40 mg/dm³ pojedinačno, u heksanu), standardni rastvor alkana C₂₁-C₄₀ (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD).

3.1.3. Ekstrakcija

3.1.3.1. Ekstrakcija po Soxhlet-u

Dobijanje ekstrakata iz lista breze. Osušeni list breze je usitnjen u laboratorijskom mlinu. Ekstrakcija iz usitnjenog biljnog materijala vršena je etanolom (96%, V/V), u Soxhlet aparaturi, pri solvomodu (odnos biljni materijal/rastvarač, m/V) 1:15, m/V, tokom 4 h, na temperaturi ključanja rastvarača. Biljni materijal (40 g) je nakon mlevenja smešten u čauru od filter papira koja je potom smeštena u ekstrakcioni deo aparature po Soxhlet-u. U balon okruglog dna je dodato 600 cm³ etanola (96%, V/V) i ekstrakcija je vršena zagrevanjem na kaloti do tačke ključanja rastvarača. Dobijeno je 510 cm³ ekstrakta. Ekstrakt je potom uparen do minimalne zapremine na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi od 45°C, i prenet u eksikator iznad dehidratacionog sredstva do potpunog sušenja. Ukupna masa osušenog ekstrakta iznosila je 8,8 g.

Dobijanje ekstrakata iz kore breze. Biljni materijal je usitnjen u laboratorijskom mlinu. Ekstrakcija iz usitnjenog biljnog materijala (30 g) vršena je etanolom (300 cm³, 96%, V/V), primenom aparature po Soxhlet-u u toku 5 h na temperaturi ključanja rastvarača pri solvomodu 1:10, m/V. Dobijena zapremina ekstrakta je iznosila 196 cm³. Odmah nakon ekstrakcije se formirala određena količina taloga, prljavo bele boje, koji se izdvojio u vreloj etanolu. Dobijeni talog je izdvojen i sušen u sušnici na 50°C, a zatim premešten u eksikator iznad dehidratacionog sredstva, da se nastavi sušenje do konstantne mase. Etanolni ekstrakt zapremine 196 cm³ stavljen je u frižider na 4 °C da prenoći, pri čemu je velika količina ekstrakta iskristalisala u vidu taloga blede žute boje. Ekstrakt je potom uparen do suva u

rotacionom vakuum uparivaču na 45 °C i stavljen u eksikator zbog sušenja do konstantne mase. Ukupna masa osušenog ekstrakta je iznosila 12,8 g.

3.1.3.2. Ekstrakcija tečno-tečno

Sok breze (5 cm³) je mešan sa po 3 cm³ rastvarača etil-acetata i dietil-etra na sobnoj temperaturi. Smeše su ostavljene da odstoje do formiranja dve faze. Etil-acetatna i dietil-etarska frakcija su odvojene i analizirane na GC-MS hromatografu.

3.1.3.3. Digestija

Osušeni etanolni ekstrakt kore breze i talog koji se izdvojio u vreloom etanolu ekstrakta kore breze (opisani u delu 3.1.3.1.) su ekstrahovani etil-acetatom i dietil-etrom. Odmereno je po 0,05 g uzoraka kore breze, a zatim dodato po 3 cm³ etil-acetata, odnosno dietil-etra. Uzorci kore breze tretirani dietil-etrom su zagrevani na vodenom kupatilu do 30°C, a oni koji su tretirani etil-acetatom zagrevani su na 50 °C, mešani na Vortex-u (VELP Scientifica, Usmate, Italija) tokom 2 minuta i centrifugirani na centrifugi (Eppendorf AG 2231, Hamburg, Nemačka) tokom 10 minuta na 1400 o/min. Supernatanti su zatim filtrirani kroz filtere promera pora 0,45 µm (Econofilters, Agilent Technologies, Waldbronn, Nemačka) i analizirani na GC-MS hromatografu.

3.1.3.4. Uparavanje soka breze

Odmereno je 100 g soka uzetog iz stabla breze i koncentrovano na vakuum uparivaču na 40°C do minimalne zapremine. Dobijeni koncentrovani sok je sušen u eksikatoru iznad dehidratacionog sredstva (silikagel) do konstantne mase. Dobijeno je 0,3 g suvog ostatka.

3.1.4. Hidrodestilacija

3.1.4.1. Izolovanje etarskog ulja po Clevenger-u

Metodom hidrodestilacije u aparaturi po Clevenger-u su izolovana etarska ulja iz osušenih pupoljaka breze i osušenih listova breze. Hidrodestilacija je ponovljena 3 puta, da bi se obezbedila reproduktivnost rezultata.

Izolovanje etarskog ulja iz pupoljaka breze. Hidrodestilacija je vršena tokom 4 h, pri hidromodulu 1:5, m/V (odnos biljni materijal/voda, m/V). Za hidrodestilaciju je upotrebljeno 100 g osušenih i samlevenih pupoljaka breze i 500 cm³ destilovane vode. Balon sa okruglim dnom koji sadrži destilovanu vodu i biljni materijal je povezan sa aparaturom po Clevenger-u. Grejanje je bilo podešeno tako da se postigne temperatura ključanja smeše biljnog materijala i vode u balonu. Etarsko ulje i vodena para su dolazili u graduisanu cev za prijem destilata, a višak vode (vodena faza destilata) je vraćan nazad u balon. Nakon 4 h, hidrosol je uklonjen iz cevi za prijem destilata, a etarsko ulje je izdvojeno i sušeno iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Prinos etarskog ulja je iznosio 1%.

Izolovanje etarskog ulja iz lista breze. Za izolovanje etarskog ulja iz osušenog lista breze hidrodestilacijom po Clevenger-u korišćen je hidromodul 1:10, m/V. Hidrodestilacija je vršena 2 h na temperaturi ključanja. U graduisanu cev aparature dodato je 1,5 cm³ heksana, koji rastvara etarsko ulje izdvojeno tokom hidrodestilacije. Na kraju destilacije izdvojen je heksanski rastvor etarskog ulja i ostavljen da heksan otpari. Prinos etarskog ulja je iznosio 0,037%.

3.1.5. Priprema inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša

Priprema inkluzionih kompleksa metodom guste paste. Inkluzioni kompleksi BE i BK su izrađivani metodom guste paste (metodom gnječenja). Odmereno je 0,1 mmol (44,3 mg) BE, odnosno 0,1 mmol (45,7 mg) BK i po 0,2 mmol (250 mg) HP-β-CD, tako da molarni odnos aktivne supstance i ciklodekstrina bude 1:2. Odmerene mase aktivne supstance i ciklodekstrina su pomešane u tarioniku sa pistilom, uz postepeno dodavanje 150 mg smeše etanola (96%, V/V) i vode u odnosu 1:1, V/V, tokom 45 minuta uz neprestano mešanje. Nakon toga su kompleksi sušeni do suva u eksikatoru iznad dehidratacionog sredstva na temperaturi 25°C.

Priprema fizičkih smeša. Fizičke smeše su pripremljene prostim mešanjem BE, odnosno BK i HP-β-CD u molarnom odnosu 1:2, na suvo.

3.1.6. Metode karakterizacije

3.1.6.1. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) i gasna hromatografija sa plameno-jonizujućom detekcijom (GC-FID)

GC-MS i GC-FID metode su korišćene za određivanje hemijskog sastava etarskih ulja iz pupoljaka i lista breze, ekstrakata lista i kore breze, kao i soka breze. Uzorci su analizirani na Agilent Technologies 7890B gasnom hromatografu kuplovanim sa inertnim, selektivnim 5977A masenim detektorom iste kompanije. Kao noseći gas korišćen je helijum čistoće 99,999%, pri konstantnoj brzini protoka od 1 cm³/min. Komponente su razdvojene na nepolarnoj, silika kapilarnoj koloni, HP-5MS (5% difenil- i 95% dimetil-polisiloksana) dužine 30 m, unutrašnjeg prečnika 0,25 mm i debljine filma stacionarne faze od 0,25 µm (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; Agilent Technologies, SAD). Eluat je MSD transfer linijom temperature 300°C (etarsko ulje pupoljaka i ekstrakti kore, lista i soka breze) odnosno 250°C (etarsko ulje lista breze) prenešen do kvadrupolnog masenog spektrometra sa elektronskom jonizacijom. Temperature jonskog izvora i kvadrupolnog masenog analizatora su za sve analizirane uzorke bile 230°C i 150°C, redom, a energija jonizacije 70 eV. Uzorci su analizirani u režimu skeniranja (Scan mode), u opsegu m/z od 35 do 650 Da (etarsko ulje pupoljaka i ekstrakti kore, lista i soka breze) odnosno m/z od 41 do 415 Da (etarsko ulje lista breze).

GC-MS i GC-FID analiza etarskog ulja pupoljaka breze. Izolovano etarsko ulje pupoljaka breze je rastvoreno u dietil-etru do koncentracije od 1000 ppm. Jedan µl pripremljenog rastvora je injektiran u split režimu rada (split odnos 10:1) injektora zagrejanog na 250°C. Temperatura pećnice je podešena na 50°C tokom prvih 2,25 min, a zatim je linearno povećavana do 290°C brzinom od 4 °C/min.

GC-MS i GC-FID analiza etarskog ulja lista breze. Izolovano etarsko ulje lista breze je rastvoreno u dietil-etru. Jedan µl pripremljenog rastvora injektiran je u split režimu rada (split odnos 40:1) injektora zagrejanog na temperaturi od 220°C. Temperatura pećnice je linearno povećavana od 60°C do 246°C brzinom od 3 °C/min.

GC-MS i GC-FID analiza ekstrakata kore, lista i soka breze. GC-MS i GC-FID analizi podvrgnuti su ekstrakt lista breze, ekstrakt i talog koji se izdvojio pri ekstrakciji u vreloom etanolu kore breze, kao i etil-acetatna i dietil-etarska frakcija svežeg soka breze. Suvi ekstrakti su rastvoreni u etil-acetatu/dietil-etru tako da je koncentracija uzoraka iznosila 4 mg/cm³. Od pripremljenih uzoraka ubrizgan je po 1 µl u split režimu rada (split odnos 5:1) injektora zagrejanog na 300°C. Temperaturni program je otpočeo zagrevanjem i održavanjem

temperature pećnice na 160°C u toku 1 min, a onda su usledili linearni temperaturni gradijenti zagrevanja najpre do 250°C brzinom od 8 °C/min; zatim do 280°C brzinom od 2 °C/min na kojoj je održavana 10 minuta i konačno do 300°C brzinom od 8 °C/min na kojoj je temperatura pećnice održavana tokom 15 min.

GC-FID analiza uzoraka je vršena pod identičnim eksperimentalnim uslovima kao i GC-MS analiza. Protoci nosećeg gasa (He), make-up gasa (N₂), gasa za sagorevanje (H₂) i oksidacionog gasa (vazduh) bili su 1 cm³/min; 25 cm³/min; 30 cm³/min i 400 cm³/min, redom. Temperatura FID detektora je bila podešena na 300°C.

Obrada podataka je izvršena pomoću MSD ChemStation softvera (verzija F.01.00.1903) u kombinaciji sa AMDIS (verzija 2.70) i NIST MS Search (verzija 2.0g) softverima.

Za nedvosmisleni identifikaciju komponenti iz uzoraka eksperimentalno su određeni retencioni indeksi (RI) koristeći homologne nizove *n*-alkana od C₈-C₂₀ i C₂₁-C₄₀ kao standarde. Retencioni indeksi (indeksi zadržavanja) predstavljaju meru zadržavanja komponenti iz uzorka u odnosu na zadržavanje *n*-alkana na istoj temperaturi. Svrha određivanja retencionih indeksa je normalizacija varijabli instrumenata (vrsta uređaja, vrsta i protok nosećeg gasa, i unutrašnji prečnik kolone) tako da dobijeni podaci mogu da se uporede sa podacima dobijenim na drugim uređajima, sve dok je stacionarna faza ista.

Određivanje kvalitativnog sastava uzoraka (identifikacija jedinjenja iz uzoraka) je zasnovana na poređenju eksperimentalno dobijenih retencionih indeksa (RI^{exp}) sa retencionim indeksima u literaturi (RI^{lit}), kao i na poređenju masenih spektara komponenti uzoraka sa podacima iz Willey 6, NIST 2011 i RTLPEST 3 biblioteka masenih spektara.

Semi-kvantitativni sastav (procentualni sadržaj) uzoraka je određen metodom normalizacije površine GC-FID signala, bez korekcija.

Za konstrukciju kalibracione krive BE korišćeni su dietil-etarski rastvori standarda BE u opsegu koncentracija 0,375-6 mg/cm³ analizirani pod identičnim GC-MS i GC-FID uslovima opisanim za ekstrakte.

Prisustvo BE u ekstraktu je dokazano ko-injektiranjem odgovarajućeg standarda dok je identifikacija LU zasnovana na poređenju njegovog EI masenog spektra sa podacima iz Willey 6, NIST 2011 i RTLPEST 3 biblioteka masenih spektara.

3.1.6.2. Optička emisiona spektroskopija sa indukovano-kuplovanom plazmom (ICP-OES)

Sadržaj mikro- i makro-elemenata u soku breze je određen ICP-OES metodom. Za potrebe ove analize sok breze (100 cm³) je uparen na rotacionom vakuum uparivaču, na temperaturi 45 °C do minimalne zapremine, a zatim sušen u eksikatoru iznad dehidratacionog sredstva. Dobijena masa suvog ostatka soka breze je iznosila 0,265 g. Priprema uzorka za ICP-OES analizu je urađena vlažnom digestijom, primenom koncentrovane azotne kiseline (Kolundžić i sar., 2017). Odmerena masa suvog soka breze (0,01 g) je prelivena sa 1 cm³ koncentrovane azotne kiseline. Nakon stajanja smeše tokom 24 h, vršeno je zagrevanje do temperature ključanja kiseline. Zagrevanje je nastavljeno do prestanka formiranja braon pare koja potiče od azotovih oksida, odnosno do kompletne mineralizacije. Uzorak je nakon zagrevanja filtriran kroz filter veličine pora 0,45 μm. Filtrat je prenesen u normalni sud i razblažen do 10 cm³ destilovanom vodom.

Kvantitativna analiza je izvršena na ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry, ARCOS FHE12, SPECTRO, Nemačka) uređaju, prema uputstvu datom od strane proizvođača. Kao noseći gas je korišćen Argon 5.0 (čistoće 99,999%). Dobijeni su rezultati određivanja prisustva 26 elemenata. Sva merenja su izvršena tri puta. Za izradu rastvora za kalibraciju korišćen je Multistandard IV, višeelementni standardni rastvor koji sadrži Ag, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, V i Zn u koncentraciji od 1000 ppm, dok su za As, Hg, P i Si korišćeni standardni rastvori ovih elemenata iste koncentracije.

3.1.6.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri BE, BK, HP-β-CD, pripremljenih inkluzionih kompleksa BE:HP-β-CD i BK:HP-β-CD i odgovarajućih fizičkih smeša su snimljeni u opsegu talasnih brojeva od 4000–400 cm⁻¹ na FTIR spektrofotometru Bomem MB-100 (Hartmann&Braun, Baptiste, Quebec, QC, Canada) primenom tehnike KBr pastila (1 mg uzorka, 150 mg KBr). Spektri su obrađeni korišćenjem softvera Win-Bomen Easy.

3.1.6.4. Difrakcija rendgenskih zraka (XRD)

XRD spektri BE, BK, HP-β-CD, inkluzionih kompleksa BE:HP-β-CD i BK:HP-β-CD i odgovarajućih fizičkih smeša su snimljeni pod sledećim uslovima: uzorci su označeni pomoću monohromskog CuKα zračenja i analizirani pod uglom 2θ između 5 i 70 ° sa

sekvencom $0,03^\circ$ i vremenom snimanja $\tau = 5$ s. Tokom snimanja, napon i snaga su bili 40 kV i 20 mA, redom. Svi testirani uzorci su bili snimljeni na difraktometru za prah Rigaku MiniFlex 600 (Rigaku, Tokio, Japan).

3.1.6.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Termičke karakteristike BE, BK, HP- β -CD, pripremljenih inkluzionih kompleksa BE:HP- β -CD i BK:HP- β -CD, kao i odgovarajućih fizičkih smeša analizirane su u atmosferi azota u temperaturnom opsegu od 20 - 350°C sa brzinom skeniranja 10°C/min na diferencijalnom skenirajućem kalorimetru TA Instruments Q20 (TA Instruments, New Castle, DE, SAD). Svaki uzorak (2 mg) je hermetički zatvoren u aluminijumskoj posudici i analiziran istovremeno sa praznom posudicom kao referentnim uzorkom.

3.1.6.6. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija BE, BK, HP- β -CD, inkluzionih kompleksa BE:HP- β -CD i BK:HP- β -CD i odgovarajućih fizičkih smeša analizirana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Uzorci su pre analize prekriveni tankim slojem zlata pomoću raspršivača JEOL Fine Coat JFC 1100E Ion Sputter (JEOLCo., Japan) i snimani na skenirajućem elektronskom mikroskopu JEOL Scanning Electron Microscope JSM-5300 (JEOLCo., Japan).

3.1.6.7. Ispitivanje fazne rastvorljivosti

Ispitivanje fazne rastvorljivosti je izvršeno primenom Higuchi-Connors metode (Higuchi i Connors, 1965). Rastvorima HP- β -CD u etanolu (80%, V/V) koncentracije 0 - 10 mmol/dm^3 dodavan je BE, odnosno BK u višku (10 mg). Uzorci su mešani tokom 24 h na temperaturi 25°C i filtrirani kroz membranski filter veličine pora $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Količina rastvorenog BE, odnosno BK je određena korišćenjem UV-VIS metode na osnovu izrađenih kalibracionih kriva. Pripremljeni su osnovni rastvori BE i BK koncentracije $100\text{ }\mu\text{g/cm}^3$ rastvaranjem 5 mg BE odnosno BK u 50 cm^3 etanola (80%, V/V). Od osnovnih rastvora su razblaživanjem pripremljene serije rastvora BE (40 - $80\text{ }\mu\text{g/cm}^3$) i BK (50 - $100\text{ }\mu\text{g/cm}^3$). Apsorbanca uzoraka je merena na Varian Cary-100 Conc (Varian PTY LTD, Springvale, Australia) na talasnoj dužini 210 nm na sobnoj temperaturi u kvarcnim kivetama ($1\times 1\times 4,5\text{ cm}$). Kao slepa proba korišćen je etanol (80%, V/V). Prisustvo HP- β -CD nije ometalo spektrofotometrijsko određivanje BE i BK na izabranoj talasnoj dužini.

Kalibraciona kriva BE sa koeficijentom linearne korelacije $R^2 = 0,999$ predstavljena je jednačinom (1):

$$A_{BE} = 0,0043 \times C_{BE} - 0,1107 \quad (1)$$

gde je A_{BE} – apsorbanca BE na 210 nm, C_{BE} – koncentracija BE u $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Kalibraciona kriva BK sa koeficijentom linearne korelacije $R^2 = 0,9971$ predstavljena je jednačinom (2):

$$A_{BK} = 0,0037 \times C_{BK} - 0,1615 \quad (2)$$

gde je A_{BK} – apsorbanca BK na 210 nm, C_{BK} – koncentracija BK u $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Prividne konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa BE:HP- β -CD i BK:HP- β -CD ($K_{1:1}$) su izračunate koristeći dijagrame fazne rastvorljivosti BE i BK, prema sledećoj jednačini:

$$K_{1:1} = \text{nagib}/S_0 \cdot (1 - \text{nagib}) \quad (3)$$

gde je: S_0 – intrizička rastvorljivost BE, odnosno BK, a nagib – nagib dijagrama fazne rastvorljivosti BE, odnosno BK.

3.1.6.8. Određivanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida

Određivanje sadržaja ukupnih fenola. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima (list, kora) i soku breze je određen prema Folin-Ciocalteu metodi (Singleton i Rossi, 1965), sa određenim modifikacijama (Stanojević i sar., 2013). Odmereno je $0,5 \text{ cm}^3$ ekstrakata, odnosno svežeg soka breze u normalni sud zapremine 25 cm^3 , nakon čega je dodato $4,5 \text{ cm}^3$ destilovane vode. Kod slepe probe, umesto ekstrakta, korišćeno je 5 cm^3 destilovane vode. Rastvorima uzoraka dodat je Folin-Ciocalteu reagens ($0,5 \text{ cm}^3$), a nakon 5 minuta inkubacije 5 cm^3 7% rastvora Na_2CO_3 . Smeša je promešana na vorteksu, a zatim inkubirana na sobnoj temperaturi tokom 90 minuta. Nakon inkubacije, apsorbanca je izmerena na talasnoj dužini od 765 nm. Ukupni fenoli su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg GKE/g s.e.) prema jednačini (4) (Milenković i sar., 2020):

$$A_{765} = 0,01528 + 5,04832 \times C_{GK}, R^2 = 0,9991 \quad (4)$$

Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima (list i kora) i soku breze je određen spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum(III)-hloridom (Lin i Tang, 2007; Sharma i sar., 2011) uz određene modifikacije (Stanojević i sar., 2013).

U 2 cm³ ekstrakata, odnosno svežeg soka breze je dodato 0,1 cm³ 10% AlCl₃ × 6H₂O, 0,1 cm³ 1M CH₃COOK i 2,8 cm³ destilovane vode. Posle inkubacije od 40 minuta na sobnoj temperaturi merena je apsorbanca reakcione smeše na 415 nm u odnosu na slepu probu (slepa proba umesto uzorka sadrži destilovanu vodu). Ukupni flavonoidi su izraženi kao miligrami ekvivalenta rutina po gramu suvog ekstrakta (mg RE/g s.e.) na osnovu jednačine (5) (Stanojević i sar., 2009):

$$A_{415} = 0,0461 + 14,171 \times C_R, R^2 = 0,9991 \quad (5)$$

3.1.7. Metode određivanja bioloških aktivnosti

3.1.7.1. Antimikrobna aktivnost

Određena je antimikrobna aktivnost etarskih ulja (iz pupoljaka i lista breze), ekstrakata (ekstrakt kore i lista breze), soka breze, BE, BK i njihovih inkluzionih kompleksa (BE:HP-β-CD i BK:HP-β-CD) primenom disk-difuzione i mikrodilucione metode na raspoloživim mikroorganizmima.

3.1.7.1.1. Disk-difuziona metoda

U cilju određivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja izolovanih iz pupoljaka i lista breze, upotrebljeni su sledeći mikroorganizmi: Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603); Gram-pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus luteus* (klinički izolat), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19166); i gljivica *Candida albicans* (ATCC 10259). Medijumi korišćeni za rast mikroorganizama su: hranljivi agar (Merck, Nemačka) za rast bakterija i Sabouraud maltozni agar (Torlak, Beograd, Srbija) za rast gljivice. Mikroorganizmi su iz kolekcije Mikrobiološke laboratorije Tehnološkog fakulteta u Leskovcu.

Za testiranje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja pupoljaka i lista breze je korišćen agar disk-difuzioni metod. Medijumi su sterilisani u autoklavu na temperaturi od 121 °C tokom 15 min, pod pritiskom od 110 kPa. Inokulum od 0,1 cm³ kulture koncentracije približno 1-2×10⁸ CFU/ml, što odgovara 0,5 McFarlandovom standardu zamućenosti je dodat u 10 cm³ medijuma i izliven u Petrijeve šolje. Sterilisani diskovi (12,7 mm prečnik,

Schleicher & Schuell) su postavljeni na površine inokuliranih medijuma i impregnirani sa 60 μL etarskog ulja (odnos etarskog ulja i DMSO je bio 1:7, V/V). Inkubacija je vršena 24 h na 37°C za bakterije i 48 h na 25°C za gljivicu. Svaki test je izveden u triplicatu.

3.1.7.1.2. Mikrodiluciona metoda

Određivanje antimikrobne aktivnosti standarda BE, BK i inkluzionih kompleksa (BE:HP- β -CD i BK:HP- β -CD), ekstrakata kore i lista breze i soka breze, vršeno je na humanim patogenim sojevima iz referentne ATCC kolekcije (American Type Culture Collection): Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; Gram-pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *Bacillus cereus* ATCC 11778; i gljivica *Candida albicans* ATCC 24433.

In vitro antimikrobna aktivnost uzoraka je određena upotrebom mikrodilucione metode sa izvesnim modifikacijama (CLSI, 2012).

Prekonoćne kulture mikrobnih sojeva su kultivisane u odgovarajućim uslovima - bakterije na 37°C na Miler-Hinton agaru (MHA), a gljivica na 30°C na saburo-dekstroznom agaru (SDA). Od prekonoćnih kultura bakterija i gljivica su, u sterilnom fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl), pripremljene suspenzije turbiditeta 0,5 McFarlanda (što odgovara 10^8 CFU/cm³). Tako dobijenim suspenzijama su zasejane odgovarajuće hranljive podloge – Miler-Hinton bujon za bakterijske sojeve i saburo-dekstrozni bujon za gljivicu, u mikrotitar pločama sa 96 udubljenja. Od početnih rastvora uzoraka (u 100%-nom DMSO-u) su u mikrotitar pločama napravljene serije dvostrukih razblaženja. U svakom bunariću mikrotitar ploče je bila ukupna zapremina 100 μL , a finalna koncentracija mikrobnih ćelija je iznosila 10^6 CFU/cm³. Mikrotitar ploče su kultivisane na 37°C (za bakterije), odnosno na 30°C (za gljivicu) tokom 24 h. Kao negativna kontrola je korišćena serija razblaženja čistog rastvarača (DMSO), a kao pozitivne kontrole su korišćene serije razblaženja antibiotika (0,02-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$): hloramfenikola (za Gram-pozitivne bakterije), streptomcina (za Gram-negativne bakterije) i nistatina (za gljivicu). Inhibitorna aktivnost uzoraka je određena metodom vidljivog rasta tj. dodavanjem 20 μL 0,5% vodenog rastvora trifenil tetrazolijum hlorida (TTC) u svaki bunarić na mikrotitar ploči. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je definisana kao najniža koncentracija uzorka koja je inhibirala vidljivi rast mikroorganizama (pojava crvene boje nakon dodavanja TTC). Da bi se odredile minimalne baktericidne/fungicidne koncentracije (MBC/MFC), iz svakog bunarića je sadržaj prenešen na Petri ploče sa

odgovarajućim podlogama i inkubiran pod opisanim specifičnim uslovima za testirane mikrobnе sojeve. MBC/MFC se definiše kao najniža koncentracija analiziranih uzoraka pri kojoj su inokulisani mikroorganizmi ubijeni 99,9%. Svi eksperimenti su izvedeni u triplicatu.

Statistička obrada podataka

Za ove analize primenjena je statistička analiza korišćenjem analize varijanse (ANOVA) za određivanje značajnosti ($p \leq 0,05$) podataka dobijenih u svim eksperimentima. Utvrđeno je da su svi rezultati unutar nivoa pouzdanosti od 95% za reproduktivnost eksperimenta.

3.1.7.2. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost etarskih ulja pupoljaka i lista breze, ekstrakata lista i kore breze, soka breze, BE, BK i njihovih inkluzionih kompleksa određena je primenom DPPH metode.

Za potrebe ovih analiza pripremljene su serije rastvora različitih koncentracija navedenih uzoraka u etanolu (96%, V/V). Odabran je opseg koncentracija za etarsko ulje pupoljaka breze od 0,066-8,44 mg/cm³, za etarsko ulje lista breze 0,290-18,55 mg/cm³, za ekstrakt kore breze 0,15625-1 mg/cm³, za ekstrakt lista breze 0,007813-1 mg/cm³, za sok breze 0,0469-3 mg/cm³, za BE 3,125-100 µg/cm³, za BK 3,125-100 µg/cm³, za inkluzione komplekse BE:HP-β-CD 7,813-250 µg/cm³ i BK:HP-β-CD 7,813-250 µg/cm³.

Etanolni rastvor DPPH radikala (1 cm³, 3×10⁻⁴ mol/dm³) je dodat u 2,5 cm³ rastvora uzoraka različitih koncentracija. Reakcione smeše su inkubirane na sobnoj temperaturi, u mraku, 20 minuta za ekstrakt kore i lista breze, odnosno 20-60 minuta za ostale uzorke (sok breze i etarska ulja pupoljka i lista breze, BE, BK i njihovih inkluzionih kompleksa), nakon čega je merena apsorbanca na 517 nm (A_U). Apсорbanca na 517 nm je određena i za čist etanolni rastvor DPPH radikala razblažen u navedenom odnosu (1 cm³ DPPH radikala date koncentracije + 2,5 cm³ etanola) (A_K), i za sve uzorke pre tretiranja DPPH radikalom (2,5 cm³ uzorka + 1 cm³ etanola) (A_B). Etanol je korišćen kao slepa proba.

Stepen neutralisanja slobodnih radikala se izračunava po jednačini (6) (Stanojević i sar., 2013):

$$\text{Stepen neutralisanja DPPH radikala (\%)} = 100 - \left[(A_U - A_B) \times \frac{100}{A_K} \right] \quad (6)$$

pri čemu je: A_U – apsorbancija „uzorka“ na 517 nm, A_B – apsorbancija „blank-a“ na 517 nm, A_K – apsorbancija „kontrole“ na 517 nm.

3.1.7.3. Test vijabilnosti i proliferacije ćelija

Za potrebe ispitivanja efekata ekstrakata kore breze, soka breze, BE, BK i njihovih inkluzionih kompleksa na vijabilnost i proliferaciju ćelija u kulturi *in vitro*, korišćena je ćelijska linija MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) koja se često koristi kao model epitelnih ćelija. Procena uticaja ispitivanih supstanci na vijabilnost i proliferaciju ćelija izvršena je primenom MTT testa koji se bazira na redukciji žute tetrazolijumske soli MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid), od strane vijabilnih i metabolički aktivnih ćelija pomoću mitohondrijalnih dehidrogenaza, do ljubičastih kristala formazana koji su nerastvorni u vodi. Različite koncentracije ispitivanih supstanci dobijene su rastvaranjem u medijumu za kultivaciju ćelija.

MDCK ćelije su gajene u standardnim uslovima za gajenje ćelija u kulturi *in vitro*, u medijumu DMEM kome su dodati 10% FBS-a, 2 mM stabilnog glutamina i 1% antibiotik-antimikotik rastvora (kompletna DMEM), u T-25 flaskovima (Greiner Bio-One, Nemačka), u inkubatoru sa 5% CO_2 i atmosferom zasićenom vlažnošću, na 37 °C. Za potrebe esaja proliferacije i vijabilnosti, ćelije su pasažirane pri konfluentnosti ćelija od oko 70-80%. Pasaža je rađena tako što je ćelijama prvo uklonjen medijum, zatim im je dodat rastvor Trypsin-EDTA i inkubirane su oko 10 minuta u inkubatoru na 37°C. Proces tripsinizacije je prekinut dodatkom kompletnog DMEM-a. Ćelije su centrifugirane 10 minuta na +4°C i 1200 rpm. Potrebna gustina ćelija podešena je metodom *Trypan Blue Dye Exclusion Test* koja podrazumeva bojenje ćelija Tripin plavim.

U esaju vijabilnosti/citotoksičnosti u svaki bunarčić sterilne ploče sa 96 bunarčića zasađeno je po 2×10^4 ćelija/100 μ l medijuma. Nakon 24 h kultivacije ćelija u inkubatoru, u standardnim uslovima, u svaki bunarčić dodato je po 100 μ l odgovarajuće koncentracije ispitivanih supstanci, koje su bile dvostruko veće od efektivnih. Svaka koncentracija je ispitivana u tetraplikatu. Negativnu kontrolu činile su ćelije koje su inkubirane u hranljivom medijumu bez dodatka ekstrakata. Kontrola rastvarača i čistih kompleksirajućih agenasa je takođe ispitivana u tetraplikatu. Ćelije su inkubirane sa ispitivanim supstancama, kao i kontrolama, narednih 24 h u standardnim uslovima, a nakon toga urađen je MTT test.

U esaju proliferacije u svaki bunarčić sterilne ploče sa 96 bunarčića zasađeno je po 5×10^3 ćelija/100 μ l medijuma. Nakon 24 h kultivacije ćelija u standardnim uslovima, u svaki

bunarčić dodato je po 100 µl odgovarajuće koncentracije ispitivanih ekstrakata, koje su bile dvostruko veće od efektivnih. Svaka koncentracija je ispitivana u tetraplikatu. Negativnu kontrolu činile su ćelije koje su inkubirane u hranljivom medijumu bez prisustva ekstrakta. Kontrola rastvarača korišćenih za ekstrakciju je takođe ispitivana u tetraplikatu. Ćelije su inkubirane sa ispitivanim ekstraktima, kao i kontrolama, narednih 72 h u standardnim uslovima, a nakon toga urađen je MTT test.

Različite koncentracije soka breze napravljene su razblaživanjem svežeg soka, ili uparenog soka, u kompletnom DMEM medijumu. Ekstrakt kore breze i kompleksi sa BE i BK su rastvoreni i razblaženi u kompletnom DMEM medijumu, dok su različite koncentracije BE i BK dobijene razblaživanjem etanolnih štok rastvora BE i BK u kompletnom DMEM medijumu.

Po završetku inkubacije sa različitim koncentracijama ispitivanih supstanci, medijum u kojem su ćelije inkubirane, u oba eseja, uklonjen je iz svih bunarčića, ćelije su isprane sa 100 µl fosfatnog pufera (PBS), a zatim dodato po 100 µl rastvora MTT-a (koncentracije 1 mg/ml) po bunarčiću. Nakon 3 h inkubacije ćelija sa rastvorom MTT na 37°C, rastvor MTT-a je uklonjen, a nastali ljubičasti kristali formazana rastvoreni su dodatkom 100 µl 2-propanola. Rastvaranjem kristala formazana su dobijeni rastvori ljubičaste boje čiji je intenzitet meren spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm, sa korekcijom na 650 nm, na višekanalnom spektrofotometru (*Multiscan Ascent, Thermo Labsystems*).

Rezultati MTT testa predstavljeni su kao aritmetička sredina apsorbance merenog tetraplikata za svaku koncentraciju i kontrole, kao i procenat u odnosu na negativnu kontrolu za koju je uzeta vrednost 100% ćelijske vijabilnosti, odnosno 100% proliferacije ćelija. Procenat vijabilnosti/proliferacije ćelija je računat po jednačini (7):

$$\% \text{ vijabilnosti/proliferacije} = (\text{srednja vrednost apsorbance ispitivane koncentracije} / \text{srednja vrednost apsorbance negativne kontrole}) \times 100 \quad (7)$$

Rezultati MTT testa, u oba eseja, statistički su obrađeni. Mereni su sledeći statistički parametri: aritmetička sredina, standardna devijacija, relativna standardna devijacija (RSD). Rezultati su prikazani u vidu grafikona kao % vijabilnosti/proliferacije ćelija $\pm$ RSD. Statistička značajnost je procenjena primenom ANOVA testa, a za statistički značajne vrednosti uzete su one za koje je $p < 0,05$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Ekstrakti iz breze (*Betula pendula*)

Za ekstrakciju ukupnih ekstraktivnih materija koje sadrže biološki aktivna jedinjenja (ukupne fenole i flavonoide, pentaciklične triterpene kao ciljne molekule u ovom radu), iz kore i lista breze, primenjen je 96% etanol. Izbor ovog ekstragensa izvršen je na osnovu pregleda literature i na osnovu njegovih povoljnih svojstava. Etanol nije toksičan, lako je dostupan po pristupačnoj ceni i predstavlja dobar rastvarač za betulin i srodne pentaciklične triterpene, kao što je lupeol, kao i za biljne antioksidanse, fenole i flavonoide (Shambilova i sar., 2024). Postoje različite tradicionalne (maceracija, digestija, perkolacija) i savremene metode (ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija superkritičnim tečnostima) koje se koriste za dobijanje ekstrakata iz droga (Savić, 2014). U ovom radu kao pogodna metoda primenjena je cirkulatorna ekstrakcija po Soxhlet-u gde rastvarač na povišenoj temperaturi kontinuirano cirkuliše kroz stub droge i ekstrahuje željene komponente. Povišena temperatura u ovom postupku ekstrakcije je poželjna jer povećava rastvorljivost željenih molekula tj. njihovu izolaciju iz biljnog materijala. U tabeli 5 dati su prinosi suvih ekstrakata iz različitih delova breze i suvi ostatak soka dobijenog iz stabla breze.

Tabela 5. Prinosi suvih ekstrakata i suvog ostatka soka dobijenog iz stabla breze

Uzorak	Prinos, %
Kora breze	42,67
List breze	22
Suvi ostatak soka breze	0,3

Iz prikazanih rezultata u tabeli 5 vidi se da je najveći prinos suvih ekstrakata postignut ekstrakcijom 96% etanolom iz kore breze 42,67%, dok je iz lista prinos suvih ekstrakata 22%. Ukoliko se uporede prinosi ekstrakata dobijeni u ovom radu sa literaturnim podacima (Chapurin i sar., 2022) može se takođe zaključiti da su postignuti veći prinosi u ovom istraživanju. Naime, Chapurin i saradnici su odredili prinose ekstrakta iz kore breze koja je ekstrahovana vodom i etanolom kao ekstragensima. Prinos ekstrakta sa etanolom je 10,65%, a sa vodom je manji i iznosi 6,59%. Prinos ekstrakta iz lista breze sa etanolom kao ekstragensom nije pronađen u literaturi. Postoje podaci o prinosima ekstrakata koji su dobijeni ekstrakcijom sa vodom i oni variraju u zavisnosti od odnosa biljne sirovine i rastvarača, a kreću se u rasponu od 12,5% do 33% (European Medicines Agency, 2014). U literaturi nisu dostupni podaci o suvom ostatku iz soka breze, tako da rezultat dobijen u ovom radu od 0,3% suvog ostatka nije bilo moguće uporediti sa drugim istraživanjima.

postupku opisanom u delu 3.1.6.8. Ova metoda se često koristi za određivanje ukupnih flavonoida u biljnim ekstraktima i zasniva se na građenju kompleksa aluminijum(III)-hlorida sa flavonoidima, koji je žuto-narandžasto obojen. Ova reakcija pokazuje nejednaku selektivnost prema različitim flavonoidima. Daje pozitivnu reakciju samo na one flavonoide koji imaju dostupne *o*-dihidroksifenolne, *o*-hidroksikarbonilne i 3- i 5-hidroksihromonske funkcionalne grupe (Shraim i sar., 2021). Sadržaji ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima i soku breze su izraženi kao miligrami ekvivalenta rutina po gramu suvog ekstrakta (mg RE/g s.e.).

U tabeli 6 prikazan je sadržaj ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u soku iz stabla breze i etanolnim ekstraktima lista i kore breze.

Tabela 6. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u etanolnim ekstraktima i soku breze

Uzorci	Ukupni fenoli mg GKE/g s.e.	Ukupni flavonoidi mg RE/g s.e.
Ekstrakt lista breze	112,01± 0,396	91,02 ± 0,141
Ekstrakt kore breze	54,02 ± 0,198	/
Sok breze	18,01± 0,066	/

Iz tabele 6 vidi se da ekstrakt lista breze sadrži najveću (112,01 mg GKE/g s.e), a sok breze najmanju (18,01 mg GKE/g s.e) količinu ukupnih fenola. Ekstrakt kore breze sadrži 54,02 mg GKE/g s.e ukupnih fenola, dok flavonoidi nisu prisutni u ovom ekstraktu kao ni u soku breze. Za razliku od soka i etanolnog ekstrakta kore breze u etanolnom ekstraktu lista breze prisutni su flavonoidi i njihov sadržaj iznosi 91,02 mg RE/g s.e.

Dostupni literaturni podaci potvrđuju prisustvo fenola u soku breze, što je u skladu sa rezultatima prikazanim u tabeli 6 (Bilek i sar., 2017; Carpinetro i sar., 2023; Esseidu i sar., 2024; Makuch-Pietraš i sar., 2023; Norocel i Paduret, 2020). U radu Makuch-Pietraš i saradnika (2023) pokazano je da sok breze sadrži znatno manju količinu flavonoida u odnosu na list breze (Makuch-Pietraš i sar., 2023).

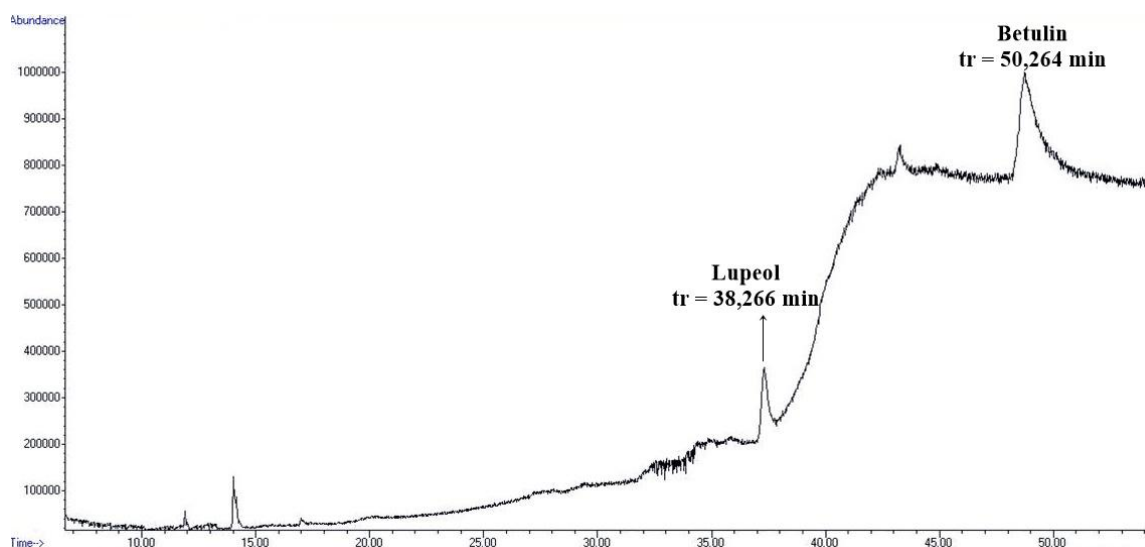
Prisustvo fenolnih jedinjenja u kori breze potvrđeno je u mnogim istraživanjima (Emrich i sar., 2022; Gruber i sar., 2021; Kähkönen i sar., 1999; Nakurte i sar., 2017; Rizhikovs i sar., 2015). U radu Nakurte i saradnika (2017) pokazano je da kora breze sadrži 74,2 mg GKE/g s.e. ukupnih fenola, što je veći sadržaj u poređenju sa vrednošću iz tabele 6 (54,02 mg GKE/g s.e). Razlog drugačijih rezultata je, osim različitog biljnog materijala, drugačiji uslovi i postupak ekstrakcije (Nakurte i sar., 2017). Još jedno istraživanje daje

podatke o većem sadržaju ukupnih fenola u kori breze, ali ne navodi da li se radi o spoljašnjoj ili unutrašnjoj kori. Autori su ekstrakcijom pomoću 80% vodenog rastvora metanola dobili 87 mg GKE/g s.e ukupnih fenola u kori breze (Kähkönen i sar., 1999). Rezultati istraživanja Gruber i saradnika (2021) pokazuju da ekstrakt kore breze sadrži 447,75 mg GKE/g s.e. Biljni materijal u tom istraživanju sastojao se od unutrašnje i spoljašnje kore breze, a primenjena je ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija metanolom, što je doprinelo većem sadržaju ukupnih fenola u kori breze (Gruber i sar., 2021). Slični rezultati su dobijeni u još jednom istraživanju, u kojem je kao biljni materijal korišćena unutrašnja i spoljašnja kora breze, a ekstrakcija vršena vodom (Emrich i sar., 2022). Na osnovu dostupnih literaturnih podataka može se zaključiti da unutrašnja kora breze sadrži znatno veću količinu fenolnih jedinjenja. Za ekstrakciju spoljašnje kore breze veoma je važan izbor rastvarača. Ukoliko je cilj ekstrakcija fenolnih jedinjenja, onda su polarni rastvarači mnogo pogodniji od nepolarnih. Rizhikovs i saradnici (2015) su poredili rastvarače za ekstrakciju na istom biljnom materijalu. Primetili su da, kada se koriste nepolarni rastvarači, ekstrakt je bele boje i sadrži veću količinu triterpena, a da primena polarnih rastvarača dovodi do promene boje ekstrakta u smeđu zbog ekstrakcije fenolnih jedinjenja (Rizhikovs i sar., 2015).

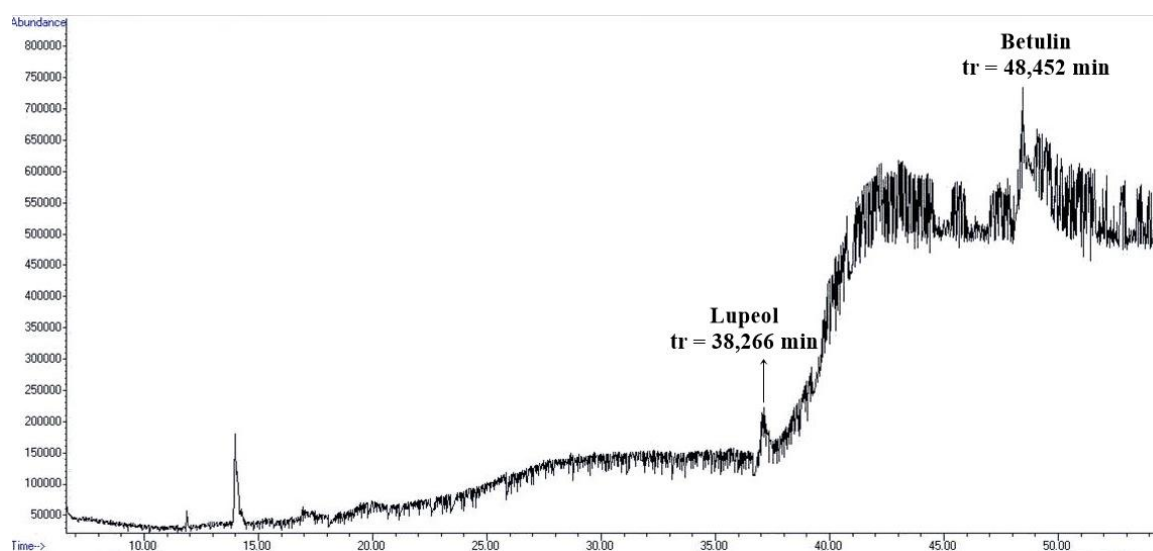
List breze bogat je izvor fenola i flavonoida, što potvrđuju brojna istraživanja (Azman i sar., 2017; Christova-Bagdassrian i sar., 2014; Costea i sar., 2016; Germanó i sar., 2012; Kähkönen i sar., 1999; Makuch-Pietraš i sar., 2023; Raal i sar., 2015; Penkov i sar., 2018), kao i istraživanja u ovom radu. Sadržaj fenolnih jedinjenja u listu breze se razlikuje u istraživanjima jer zavisi od metode ekstrakcije, upotrebljenog rastvarača za ekstrakciju biljnog materijala, geografskog područja i vegetacionog perioda biljke. Od fenolnih jedinjenja izdvajaju se 3,4-dihidroksipropiofenon-3-glukozid, kafeinska kiselina, hlorogenska kiselina, kao i lignani, diarilheptanoidi i triterpenski alkoholi (Penkov i sar., 2018). Najzastupljenija jedinjenja među flavonoidima u listu breze su kvercetin, miricetin, hiperozid i kemferol (Makuch-Pietraš i sar., 2023; Raal i sar., 2015). Fenoli su, pored BE i BK, najzastupljenija grupa sekundarnih metabolita u tkivima breze. Fenolna jedinjenja su odgovorna za antioksidativnu aktivnost ekstrakata breze, zbog mogućnosti gubitka protona, formiranja helata i dismutacije radikala. Fenoli i flavonoidi imaju i druge biološke aktivnosti (kardioprotektivna, antikancerogena, antimutagena, antimikrobna i antiinflamatorna) (Aksoy i sar., 2013; Costea i sar., 2016; Makuch-Pietraš i sar., 2023; Nakurte i sar., 2017). Veći sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu lista breze, u odnosu na ekstrakt kore breze, dobijen u ovom istraživanju, pokazuje da je list breze ne samo izvor flavonoida već veoma važan izvor ukupnih fenola.

4.1.2. Hemijski sastav ekstrakta kore breze

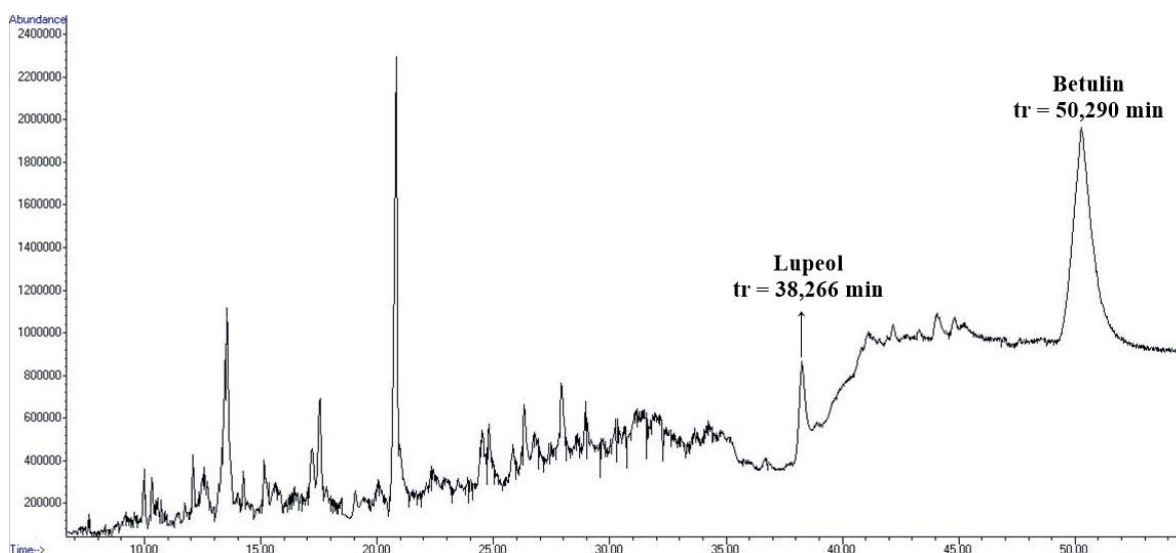
U cilju dalje karakterizacije etanolnog ekstrakata kore breze kao i taloga koji se izdvojio u vrelom etanolu pri ekstrakciji, izvršena je njihova ekstrakcija etil-acetatom i dietil-etrom i dobijeni ekstrakti su analizirani GC-MS metodom. Rezultati ovih istraživanja prikazani su na slikama 7-10.



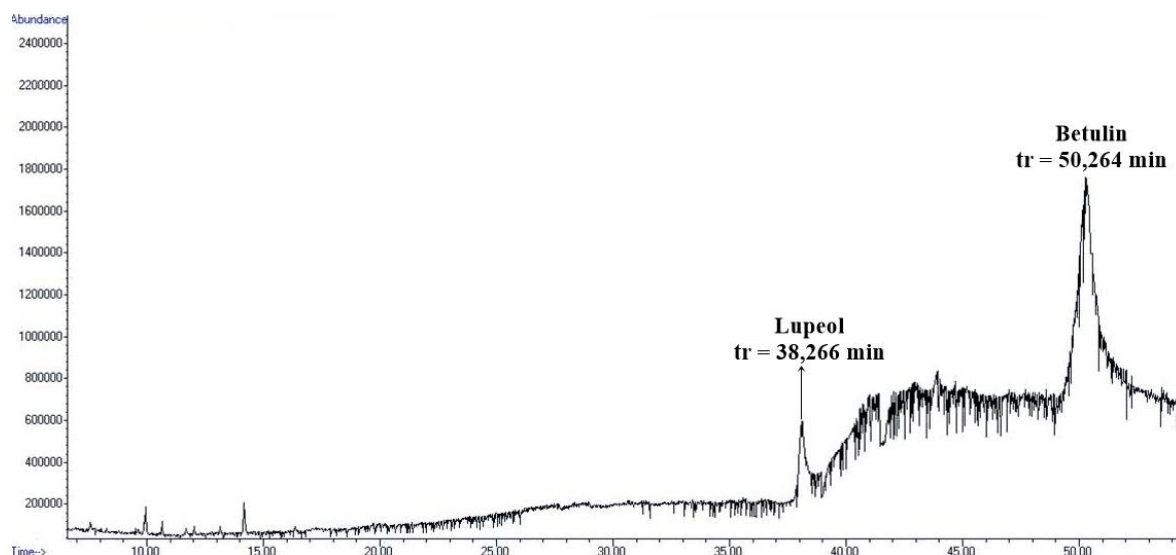
Slika 7. GC-MS hromatogram dietil-etarskog ekstrakta dobijenog iz suvog etanolnog ekstrakta kore breze



Slika 8. GC-MS hromatogram dietil-etarskog ekstrakta taloga izdvojenog u vreloom etanolu pri ekstrakciji kore breze



Slika 9. GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta dobijenog iz suvog etanolnog ekstrakta kore breze



Slika 10. GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta taloga izdvojenog u vreloom etanolu pri ekstrakciji kore breze

U svim analiziranim uzorcima, kao što se može videti na hromatogramima (slike 7-10), identifikovani su LU i BE, pentaciklični triterpeni, koji se javljaju na retencionim vremenima oko 38 minuta i 50 minuta, redom. Identifikacija ovih triterpena izvršena je poređenjem dobijenih masenih spektara sa masenim spektrima iz Willey 6, NIST11 i RTLPEST 3 baza podataka. Maseni spektar LU dat je u prilogu 1, a maseni jon i odgovarajući fragmentni joni sa mogućim tipovima fragmentacije prikazani su u tabeli 7.

Tabela 7. Maseni i fragmentni joni u MS spektru LU detektovanog u analiziranim uzorcima (dietil-etarskim i etil-acetatnim ekstraktima suvog etanolnog ekstrakta i taloga izdvojenog tokom ekstrakcije kore breze)

Fragment (<i>m/z</i>)	Empirijska formula	Poreklo	Tip fragmentacije
55	C ₄ H ₇ ⁺	Krajnji bočni lanac	Alilna fragmentacija
81	C ₆ H ₉ ⁺	Izoprenoidni bočni lanac	Alilna fragmentacija
121	~C ₉ H ₁₃ ⁺	Ciklički fragment manjih prstenova	Ciklizacija, cepanje
147	C ₁₁ H ₁₅ ⁺	Izopropil ili bočni alkil fragment	Alifatično/β-cepanje
189	C ₁₄ H ₂₁ ⁺	A/B prsten	RDA
207	C ₁₅ H ₂₇ ⁺	D/E prsten, izopropilna grupa	RDA
218	C ₁₆ H ₂₆ ⁺	Jedan od manjih cikličkih fragmenata	RDA ili alifatično cepanje
234	C ₁₆ H ₂₆ O ⁺	A/B prsteni posle cepanja	RDA, dehidracija
411	C ₂₉ H ₄₇ O ⁺ (≈426-15)	Gubitak metil grupe iz izoprenilne funkcije	Gubitak CH ₃
426	C ₃₀ H ₅₀ O ⁺	Molekulska jonizacija LU	Molekulski jon (M ⁺)

Molekulski jon koji se javlja na *m/z* 426 predstavlja molekulsku masu LU i potvrđuje identitet ovog molekula. Gubitak metil grupe daje fragment na *m/z* 411 karakterističan za lupanske triterpene kakav je i LU. Fragmenti na *m/z* 234 i 218 nastaju kombinacijom Retro-Diels-Alder-ove (RDA) razgradnje prstenova i gubitkom manjih delova strukture kao što su -CH₂, CH₄, H₂O. Fragmentni jon na *m/z* 234 je dijagnostički jon za lupanske triterpene i nastaje cepanjem A/B prstena u strukturi LU. Glavni fragmentni joni karakteristični za lupanski skelet javljaju se na *m/z* 207, 189 i nastaju cepanjem prstenova D/E i A/B, koji su karakteristični za pentaciklične triterpene. Pojava ovih pikova u MS spektru je važna za razlikovanje LU od sličnih triterpena. Fragmentni joni manjih molekulskih masa kao što su joni na *m/z* 147, 121, 81, 55 nastaju cepanjem bočnih lanaca i malih cikličkih fragmenata i potvrđuju izoprenoidnu strukturu LU. Dobijeni rezultati MS analize (tabela 7) su u skladu sa literaturnim podacima (Cheng i sar., 2021; de Carvalho i sar., 2010; Elbatanony i sar., 2024; Omara i sar., 2022) i potvrđuju prisustvo LU u analiziranim ekstraktima kore breze.

Betulin je takođe identifikovan u dietil-etarskim i etil-acetatnim ekstraktima suvog etanolnog ekstrakta i taloga izdvojenog tokom ekstrakcije kore breze. Njegovo prisustvo u ekstraktima je dokazano ko-injektiranjem odgovarajućeg standarda. MS spektar ovog jedinjenja dat je u prilogu 1, na slici 2, a maseni jon i odgovarajući fragmentni joni prikazani su u tabeli 8.

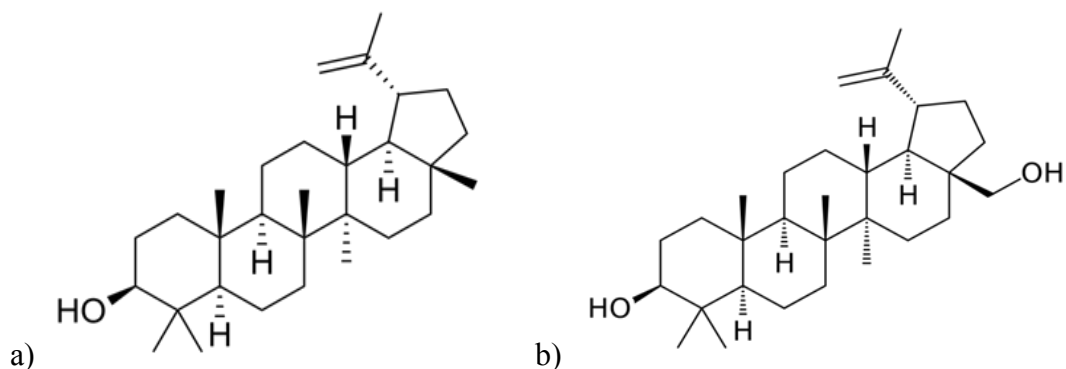
Tabela 8. Maseni i fragmentni joni u MS spektru BE detektovanog u analiziranim uzorcima (dietil-etarskim i etil-acetatnim ekstraktima suvog etanolnog ekstrakta i taloga izdvojenog tokom ekstrakcije kore breze)

Fragment (<i>m/z</i>)	Empirijska formula	Poreklo	Tip fragmentacije
55	C ₄ H ₇ ⁺	Bočni lanci	Alilna fragmentacija
81	C ₆ H ₉ ⁺	Izoprenoidni lanci	Alilna fragmentacija
97	C ₆ H ₉ O ⁺ /C ₇ H ₁₃ ⁺	-CH ₂ OH/-CHOH region	α-cepanje
121	C ₉ H ₁₃ ⁺	Ciklički deo skeleta	ciklizacija
147	C ₁₁ H ₁₅ ⁺	D/E deo	β-cepanje
189	C ₁₄ H ₂₁ ⁺	A/B prsten, -OH deo	RDA
207	C ₁₅ H ₂₇ ⁺	D/E prsten, izopropilni deo	RDA
234	C ₁₆ H ₂₆ O ⁺	RDA cepanje A/B prstenova, gubitak H ₂ O sa C-3-OH	RDA, dehidratacija
264	C ₁₉ H ₃₆ ⁺	RDA cepanje C-8/C-14 i C-9/C-11 veza (A/B deo skeleta)	RDA
339	C ₂₄ H ₄₃ O ⁺	RDA cepanje D/E prstena i eliminacija oksigenisanog dela skeleta	RDA, α-cepanje
411	C ₂₉ H ₄₇ O ⁺	Gubitak CH ₂ OH (31 Da) sa C-28	α-cepanje pored primarnog alkohola
442	C ₃₀ H ₅₀ O ₂ ⁺	Jonizacija celog molekula BE (radikalni katjon)	Dehidracija, demetilacija, RDA, alilna fragmentacija

BE pokazuje više fragmentih jona u MS spektru (prilog 1) koji su tipični za lupanske strukture koje podležu RDA degradaciji (Modugno i sar., 2006). Osnovni dijagnostički molekulski jon koji se javlja na *m/z* 442 potvrđuje njegov identitet tj. molekulsku masu BE i predstavlja polaznu strukturu za nastajanje svih drugih fragmenata. Fragmentni jon na *m/z* 411 takođe je važan za identifikaciju BE i ukazuje na prisustvo fragmenta, -CH₂OH, koji doprinosi razlikovanju BE od drugih oksidovanih triterpena. U tabeli 8 su navedeni i drugi karakteristični pikovi koji odgovaraju BE i javljaju se na *m/z* 207, 189, 264, 234. Fragmentni joni na *m/z* 189 i *m/z* 207 u masenom spektru BE su veoma karakteristični za lupanske triterpene, jer potiču od cepanja pentacikličnog jezgra lupanskog dela strukture. Fragmentni joni na *m/z* 147, 121, 97, 81, 55 nastaju kao produkti fragmentacije alifatičnih lanaca i izopropilnih grupa u procesu elektronske jonizacije u molekulu BE. Oni potvrđuju izoprenoidnu prirodu molekula BE i prisustvo hidroksilnih funkcionalnih grupa. Dobijeni GC-MS rezultati prikazani u tabeli 8 su u skladu sa literaturnim podacima (Cîntă-Pînzaru i

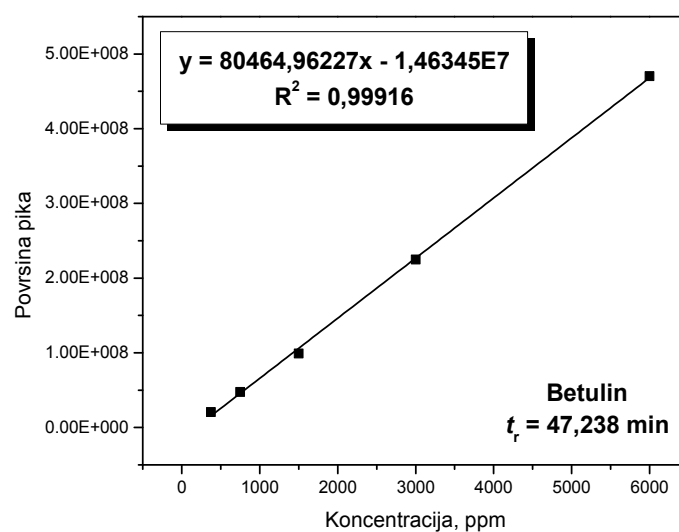
sar., 2012; Colombini i Modugno, 2009; Modugno i sar., 2006; Takibayeva i sar., 2023; Yuan i sar., 2020) i nedvosmisleno potvrđuju prisustvo BE u analiziranim uzorcima.

U istraživanjima u kojima je ekstrakt spoljašnje kore breze dobijen etanolom i karakterizacija vršena GC-MS metodom, identifikovani su takođe BE i LU (Cîntă-Pînzaru i sar., 2012; Rizhikovs i sar., 2015), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. Strukture LU i BE prikazane su na slici 11.



Slika 11. Strukturne formule a) lupeola i b) betulina

Procentualni sastav pojedinih komponenti u ekstraktu je određen na osnovu automatski integrisanih površina pikova GC-FID signala. Koncentracija BE u analiziranim uzorcima je određena na osnovu kalibracione krive (slika 12), dok je TIC hromatogram dietil-etarskih rastvora standarda BE različitih koncentracija prikazan u prilogu 1. Za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su dietil-etarski rastvori standarda betulina u opsegu koncentracija 0,375-6 mg/cm³ analizirani pod identičnim GC-MS i GC-FID uslovima.



Slika 12. Kalibraciona kriva betulina

U tabeli 9 prikazane su koncentracije BE u dietil-etarskom i etil-acetatnom ekstraktu kore breze.

Tabela 9. Koncentracija BE u etil-acetatnim i dietil-etarskim ekstraktima kore breze

Uzorak	LU	BE	Koncentracija BE, mg/cm ³
	Površina pika u GC-FID hromatogramu		
Etil-acetatni ekstrakt EEKB	73054203	478974810	6,13
Etil-acetatni ekstrakt TEEKB	71432694	530037540	6,77
Dietil-etarski ekstrakt EEKB	22599902	87210404	1,26
Dietil-etarski ekstrakt TEEKB	12463049	56904939	0,89

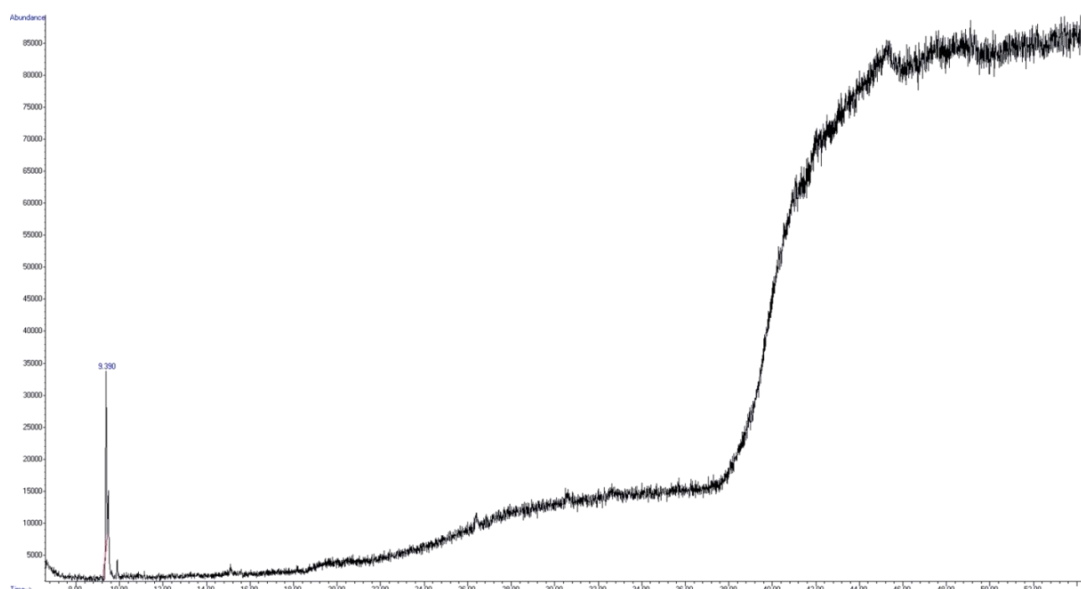
*EEKB-etanolni ekstrakt kore breze; **TEEKB-talog u etanolnom ekstraktu kore breze

Koncentracija BE u etil-acetatnom ekstraktu suvog etanolnog ekstrakta kore breze je 6,13 mg/cm³, dok je u talogu izdvojenom u vreloj etanolu koji je ekstrahovan etil-acetatom sadržaj BE 6,77 mg/cm³ (tabela 9). S obzirom da je izdvojeni talog u vreloj etanolu sastavni deo etanolnog ekstrakta kore breze ukupni sadržaj BE je 12,9 mg/cm³ u etil-acetatnom ekstraktu. Koncentracija BE u dietil-etarskim ekstraktima je manja za oba uzorka, i iznosi 1,26 mg/cm³ za suvi etanolni ekstrakt kore breze, odnosno 0,89 mg/cm³ za talog koji se izdvojio u vreloj etanolu. Ukupni sadržaj BE u dietiletarskim ekstraktima oba uzorka je 2,15 mg/cm³ što je šest puta manje nego u etil-acetatnom ekstraktu. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se postupkom digestije sa etil-acetatom iz etanolnog ekstrakta

ekstrahuje veća količina BE, što ukazuje da je etil-acetat pogodniji rastvarač za ekstrakciju BE iz kore breze.

4.1.3. Hemijski sastav ekstrakta lista breze

Etanolni ekstrakt lista breze dobijen Soxhlet ekstrakcijom koji je uparen do suva, za dalju analizu sastava GC-MS metodom, tretiran je dietil-etrom. GC-MS hromatogram etanolnog ekstrakta lista breze tretiran dietil-etrom prikazan je na slici 13.

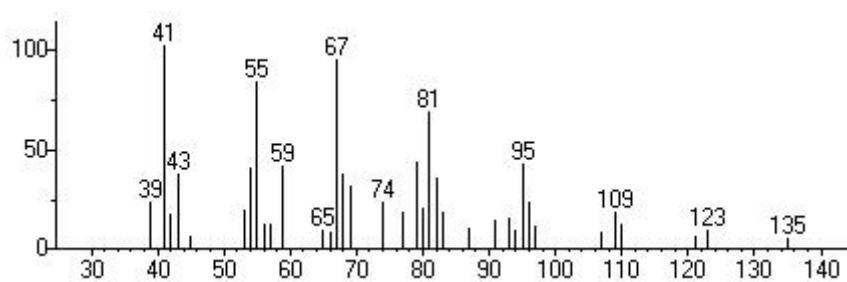


Slika 13. GC-MS hromatogram etanolnog ekstrakta lista breze tretiran dietil-etrom

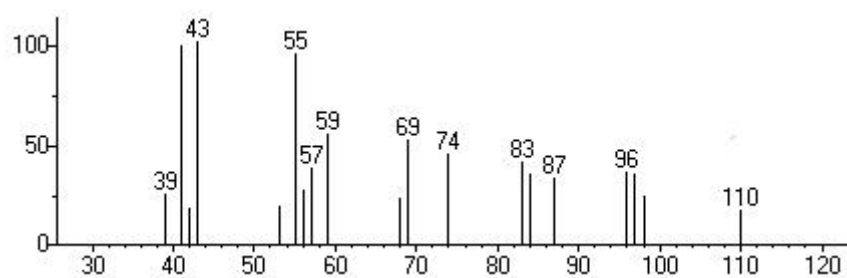
U GC-MS hromatogramu etanolnog ekstrakta lista breze (slika 13), nisu uočeni pikovi koji potiču od LU i BE. Zapaženi su pikovi na 9,39 i 9,49 min koji su zastupljeni u najvećem procentu u analiziranom ekstraktu (69,6 i 30,4%, respektivno). Procentualni sastav komponenti u ekstraktu je određen na osnovu automatski integrisanih površina pikova GC-FID signala, a identifikacija i obrada podataka je izvršena pomoću MSD ChemStation softvera (revizija F.01.00.1903) u kombinaciji sa AMDIS (verzija 2.70) i NIST MS Search softverom (verzija 2.0g). Procentualni sadržaj identifikovanih komponenti u etanolnom ekstraktu lista breze dat je u tabeli 10. MS spektri identifikovanih komponenti prikazani su na slikama 14 i 15, a strukturne formule na slici 16.

Tabela 10. Hemijski sastav dietil-etarskog rastvora ekstrakta lista breze

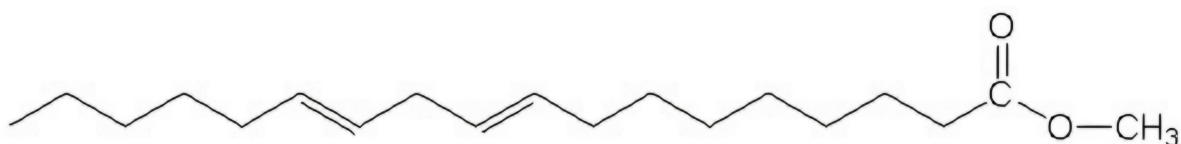
$t_{\text{ret.}}$, min	Jedinjenje	Molekulska formula	Metod identifikacije	Poklapanje sa spektrima iz NIST baze, %	Sadržaj, %
9,39	Metil estar (<i>E,E</i>)- 9,12- oktadekadienoiniske kiseline	$C_{19}H_{34}O_2$	MS	7,3	69,6
9,49	Metil estar (<i>E</i>)-9- oktadecenoinske kiseline	$C_{19}H_{36}O_2$	MS	42,9	30,4



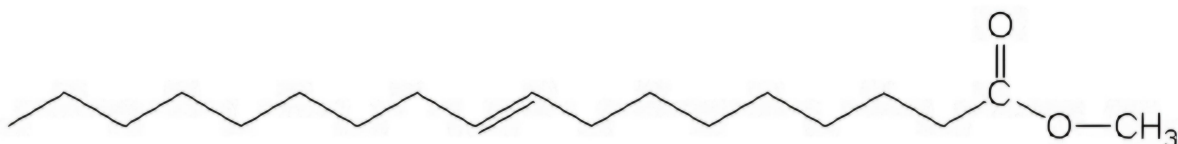
Slika 14. Maseni spektar metil estra (*E,E*)-9,12-oktadekadienoiniske kiseline



Slika 15. Maseni spektar metil estra (*E*)-9-oktadecenoinske kiseline



Metil estar (*E,E*)-9,12-oktadekadienoinske kiseline



Metil estar (*E*)-9-oktadecenoinske kiseline

Slika 16. Strukturne formule metil estra (*E,E*)-9,12-oktadekadienoinske kiseline i metil estra (*E*)-9-oktadecenoinske kiseline

U masenom spektru metil estra (*E,E*)-9,12-oktadekadienoinske kiseline najintenzivniji pikovi se pojavljuju na m/z : 41, 43, 55, 59, 65, 67, 74, 81, 95, 109, 123 i 135 (slika 14). Pik na m/z 59 nastaje od fragmenta $[-\text{COOCH}_3]^+$, dok je pik na m/z 74 od fragmenta $[-\text{CH}_2\text{COOCH}_3]^+$. Ostali pikovi uglavnom potiču od fragmentisanja ugljovodoničnog niza estra (*E,E*)-9,12-oktadekadienoinske kiseline. Pikovi i fragmenti su prikazani u tabeli 11. Slična fragmentacija se dešava i kod metil estra (*E*)-9-oktadecenoinske kiseline, a vrednosti m/z fragmentnih jona i njihove strukture prikazane su u tabeli 12.

Tabela 11. Vrednosti m/z fragmentnih jona i njihove moguće strukture iz masenog spektra metilestra (*E,E*)-9,12-oktadekadienoinske kiseline

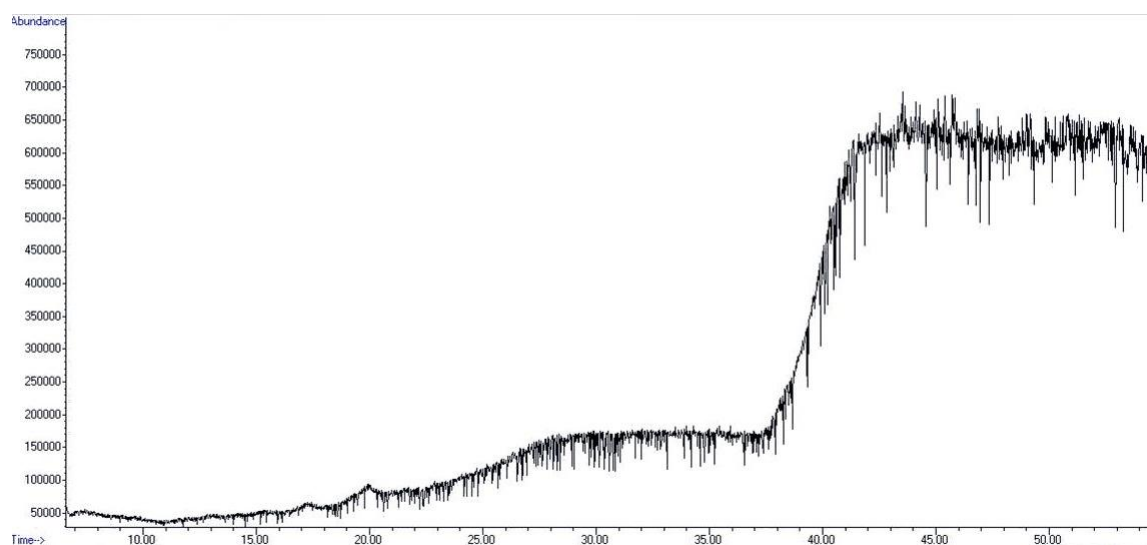
Vrednost m/z	Fragment	Struktura fragmenta
41	$[\text{C}_3\text{H}_5]^+$	$[\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}]^+$
43	$[\text{C}_3\text{H}_7]^+$	$[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2]^+$
59	$[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2]^+$	$[-\text{COOCH}_3]^+$
67	$[\text{C}_5\text{H}_7]^+$	$[\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}]^+$
74	$[\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2]^+$	$[\text{CH}_3\text{COOCH}_3]^+$
81	$[\text{C}_6\text{H}_9]^+$	$[\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2]^+$
95	$[\text{C}_7\text{H}_{11}]^+$	$[\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2]^+$
109	$[\text{C}_8\text{H}_{13}]^+$	$[\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2]^+$
123	$[\text{C}_9\text{H}_{15}]^+$	$[\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2]^+$

Tabela 12. Vrednosti m/z fragmentnih jona i njihove moguće strukture iz masenog spektra metil estra (*E*)-9-oktadecenoinske kiseline

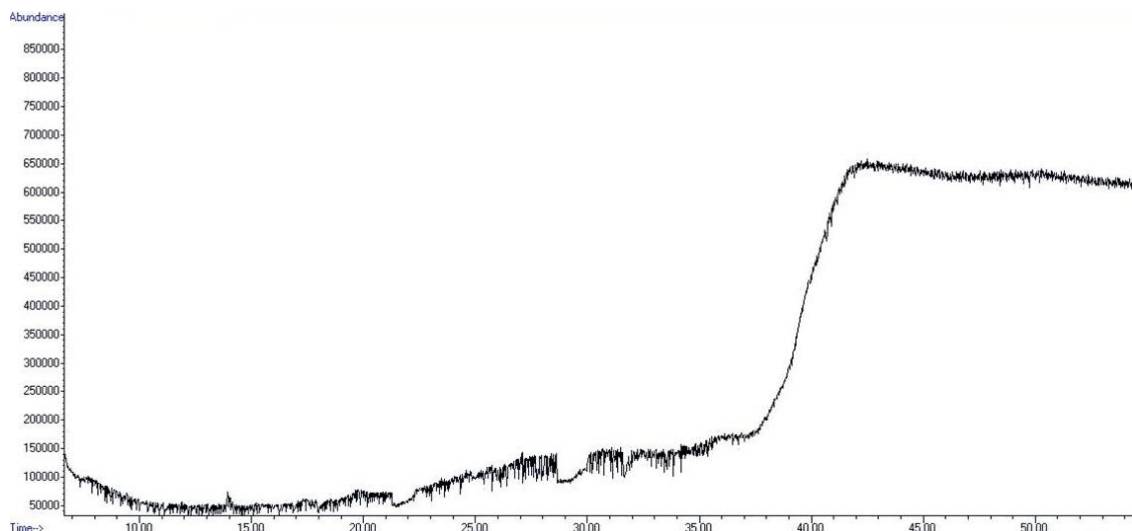
Vrednost m/z	Fragment	Struktura fragmenta
41	$[C_3H_5]^+$	$[CH_3CH=CH-]^+$
43	$[C_3H_7]^+$	$[CH_3CH_2CH_2-]^+$
55	$[C_4H_7]^+$	$[CH_2=CHCH_2CH_2-]^+$
57	$[C_4H_9]^+$	$[CH_3CH_2CH_2CH_2-]^+$
59	$[C_2H_3O_2]^+$	$[-COOCH_3]^+$
69	$[C_5H_9]^+$	$[CH_2=CHCH_2CH_2CH_2-]^+$
74	$[C_3H_6O_2]^+$	$[CH_3COOCH_3]^+$
83	$[C_6H_{11}]^+$	$[CH_2=CHCH_2CH_2CH_2CH_2-]^+$
87	$[C_4H_7O_2]^+$	$[-CH_2CH_2COOCH_3]^+$
96	$[C_7H_{12}]^+$	$[-(CH_2)_2CH=CH(CH_2)_3-]^+$
97	$[C_7H_{13}]^+$	$[CH_3(CH_2)_2CH=CH(CH_2)_2-]^+$
98	$[C_7H_{14}]^+$	$[CH_3CH_2CH=CH(CH_2)_2CH_3]^+$
110	$[C_8H_{14}]^+$	$[-(CH_2)_3CH=CH(CH_2)_3-]^+$

4.1.4. Hemijski sastav ekstrakta soka breze

Ekstrakt soka breze dobijen je postupkom ekstrakcije tečno-tečno (odjeljak 3.1.3.2.) pomoću dietil-etra i etil-acetata. Na slikama 17 i 18 prikazani su GC-MS hromatogrami etil-acetatnog i dietil-etarskog ekstrakta soka breze.



Slika 17. GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta soka breze



Slika 18. GC-MS hromatogram dietil-etarskog ekstrakta soka breze

Na osnovu GC-MS hromatograma etil-acetatnog i dietil-etarskog ekstrakta soka breze (slike 17 i 18) može se zaključiti da ekstrakt soka breze ne sadrži BE i LU. Takođe, pri navedenim hromatografskim uslovima nisu identifikovana druga jedinjenja.

4.1.4.1. Analiza mikro i makroelemenata u soku breze

U cilju dalje karakterizacije soka izolovanog iz stabla breze određen je sadržaj mikro i makroelemenata. Rezultati ovih istraživanja, dobijeni ICP-OES metodom, prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Kvalitativni i kvantitativni sastav makroelemenata i mikroelemenata soka breze

Element	Koncentracija, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
As	0,01
Ag	0
B	0,72
Ba	0,73
Bi	0,24
Ca	47,21
Cd	0,01
Co	0
Cr	0
Cu	2,66
Fe	1,26
In	0,79
K	58,79
Li	0,04
Mg	12,17
Mn	25,72
Na	17,59
Ni	0
Pb	0,12
Sr	0,91
Tl	0
Zn	2,52
Hg	0,16
Si	7,08
P	42,82

Analizom dobijenih rezultata uočava se da su od makroelemenata najzastupljeniji K ($58,79 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), zatim Ca ($47,21 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) i P ($42,82 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Od mikroelemenata najviše su zastupljeni Mn ($25,72 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) i Si ($7,08 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Takođe je značajno prisustvo mikroelemenata Zn, Cu i Fe. Interesantan je podatak da je koncentracija K skoro 3,5 puta veća u odnosu na koncentraciju Na. Na osnovu rezultata uočava se da je sok breze značajan izvor K i Ca.

Natrijum je glavni ekstracelularni katjon i veoma je bitan za održavanje volumena ekstracelularne tečnosti i osmolarnosti i regulaciju acido-baznog statusa organizma (Pantović, 2020). Kalijum je pretežno intracelularni katjon, i važan je u regulaciji neuromuskularne ekscitabilnosti, funkcionisanju enzima, deobi ćelija, ćelijskom volumenu i regulaciji acido-baznog statusa (Pantović, 2020). Postoje podaci o povezanosti unosa kalijuma i redukcije krvnog pritiska, što propratno utiče na smanjenje broja infarkta miokarda i šloga, kao i koronarnih bolesti. Dokazano je da unos kalijuma redukuje bubrežne kamence i gubitak koštane mase (Weaver, 2013).

Kalcijum je u organizmu najviše zastupljen u kostima i zubima (99%) i učestvuje u njihovoj mineralizaciji. Osim toga, determiniše ulogu većine enzima, smanjuje neuromuskularnu razdražljivost, ima ulogu sekundarnog glasnika u delovanju hormona i učestvuje u procesu koagulacije krvi (Pantović, 2020).

Sok breze takođe sadrži značajnu količinu mangana (tabela 13). Mangan je esencijalni mikroelement, koji u organizam dospeva putem hrane, najviše biljnog porekla. Iako se u organizmu nalazi u malim količinama, brojne su njegove uloge: formiranje vezivnog tkiva, razvoj kostiju, sinteza holesterola, regulacija nivoa glukoze, sastavni je deo metaloenzima i aktivator brojnih enzima. Glavna uloga kod biljaka je u procesu fotosinteze. Poznato je da, ukoliko se unosi u većim dozama, trovanje manganom (manganizam) se karakteriše apatijom, anoreksijom, bolovima u mišićima i usporenim kretanjem (Krstić i sar., 2014; Nędzarek i sar., 2013).

Od teških metala, u uzorku soka breze su najviše prisutni živa ($0,16 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) i olovo ($0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), a u koncentraciji $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ su pronađeni arsen i kadmijum (tabela 13). Poznato je da se teški metali u biljkama najčešće apsorbuju putem korena, i onda dospevaju u različite delove biljke. U zemljište dospevaju iz antropogenih izvora (izduvni gasovi motornih vozila, industrijski otpad, organska i mineralna đubriva). U većim koncentracijama imaju štetan uticaj na biljke i dovode do fizioloških, anatomskih i morfoloških poremećaja (Collin i sar., 2022; Nędzarek i sar., 2013).

Dokazano je da dugotrajno izlaganje organizma živi dovodi do toksičnih efekata na koži, na nervnom, kardiovaskularnom, plućnom, gastrointestinalnom, muskularnom i urinarnom traktu, i može biti veoma opasno (Kim i sar., 2016). Olovo kao teški metal dovodi do oštećenja bubrega, mozga, reproduktivnih organa, kostiju, centralnog i perifernog nervnog sistema (Collin i sar., 2022; Nędzarek i sar., 2013).

Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstanci, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstanci koje se mogu nalaziti u namirnicama („Sl. list

SRJ“, br. 5/92, 11/92 – ispr. i 32/2002 i „Sl. Glasnik RS“ br. 25/2010 – dr. pravilnik i 28/2011 – dr. pravilnik) daje podatke o maksimalno dozvoljenim koncentracijama teških metala u hrani. Za olovo su maksimalno dozvoljene granice u namirnicama 0,1-5 mg/kg, dok je konkretno za sokove ova granica 0,3 mg/cm³. Definisane dozvoljene granice žive u namirnicama se kreću u rasponu 0,01-3 mg/kg, dok za sokove nije definisana dozvoljena granica sadržaja žive. Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da se u soku breze ne nalaze veće koncentracije teških metala od dozvoljenih, tako da je sok bezbedan za upotrebu.

Rezultati ovog istraživanja se, po pitanju sadržaja minerala u soku breze, razlikuju od rezultata dobijenih u drugim studijama. Uzorak koji je korišćen u ovom istraživanju sadrži znatno više Na i Mn, dok je sadržaj Ca, K i Mg niži u odnosu na rezultate dobijene u radu Grabek-Lejko i saradnika (2017). Sadržaj teških metala (Pb i Cd) (Grabek-Lejko i sar., 2017) je u korelaciji sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. Autori jedne studije su analizirali sok breze, ali nakon čuvanja na temperaturi +4°C. Koncentracija makroelemenata Ca i Mg dvostruko je veća nego u uzorku koji je korišćen u ovom istraživanju, dok je koncentracija Mn skoro 25 puta manja. Mogući razlog veće koncentracije Mn jeste njegov povećan sadržaj u zemljištu ili povećana apsorpcija iz zemljišta zbog intenziviranja procesa fotosinteze u biljci, što je u skladu sa periodom sakupljanja soka (Norocel i Paduret, 2020).

Može se zaključiti da na sastav soka breze utiče geografsko područje, sastav zemljišta i okoline, period sakupljanja, način čuvanja i skladištenja soka. Kada se konzumira svež ili pasterizovan, predstavlja značajan izvor minerala koji imaju važne funkcije u ljudskom organizmu i zdravstvene benefite. Radi bezbedne upotrebe, sadržaj teških metala ne sme prelaziti zakonom dozvoljene granice (Grabek-Lejko i sar., 2017; Norocel i Paduret, 2020; Welna i sar., 2020).

4.2. Etarska ulja breze (*Betula pendula*)

Etarska ulja su izolovana iz pupoljaka i lista breze. Sastav ulja određen je GC-MS metodom, koja je najpouzadanija i najviše korišćena metoda za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava isparljivih komponenti u etarskim uljima.

4.2.1. Hemijski sastav etarskog ulja pupoljaka breze

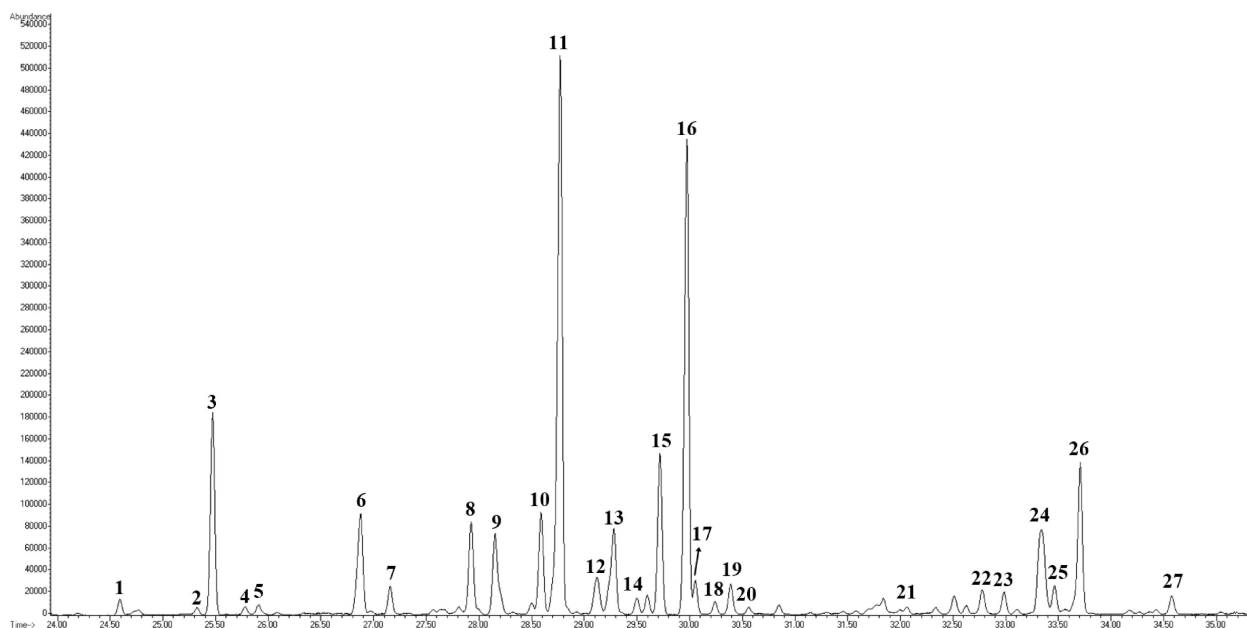
Etarsko ulje pupoljaka breze dobijeno je hidrodestilacijom po Clevenger-u (odeljak 3.1.4.1.). Prosečan prinos etarskog ulja, nakon tri ponovljene hidrodestilacije, bio je 1%.

Kvalitativni i semi-kvantitativni sastav etarskog ulja iz pupoljaka breze određen GC-MS i GC-FID metodom prikazan je u tabeli 14.

Tabela 14. Hemijski sastav etarskog ulja pupoljaka breze

Redni broj	$t_{ret.}$, min	Jedinjenje	Molekulska formula	RI ^{exp}	RI ^{lit}	Metoda identifikacije	Sadržaj, %
1	24,59	α -Kubeben	C ₁₅ H ₂₄	1351	1345	RI, MS	0,5
2	25,33	α -Ilangen	C ₁₅ H ₂₄	1375	1373	RI, MS	0,2
3	25,47	α -Kopaen	C ₁₅ H ₂₄	1379	1374	RI, MS	7,0
4	25,78	β -Burbonen	C ₁₅ H ₂₄	1389	1387	RI, MS	0,4
5	25,92	izo-Longifolen	C ₁₅ H ₂₄	1393	1389	RI, MS	0,4
6	26,88	E-Kariofilen	C ₁₅ H ₂₄	1424	1417	RI, MS	4,4
7	27,16	β -Kopaen	C ₁₅ H ₂₄	1433	1430	RI, MS	1,0
8	27,93	α -Humulen	C ₁₅ H ₂₄	1458	1452	RI, MS	3,7
9	28,16	alo-Aromadendren	C ₁₅ H ₂₄	1466	1458	RI, MS	3,6
10	28,59	γ -Murolen	C ₁₅ H ₂₄	1480	1478	RI, MS	3,8
11	28,77	Germakren D	C ₁₅ H ₂₄	1486	1484	RI, MS	21,7
12	29,13	γ -Amorfen	C ₁₅ H ₂₄	1497	1495	RI, MS	1,8
13	29,28	α -Murolen	C ₁₅ H ₂₄	1503	1500	RI, MS	4,0
14	29,50	δ -Amorfen	C ₁₅ H ₂₄	1511	1511	RI, MS	0,6
15	29,72	γ -Kadinen	C ₁₅ H ₂₄	1518	1513	RI, MS	5,8
16	29,98	δ -Kadinen	C ₁₅ H ₂₄	1527	1522	RI, MS	17,0
17	30,06	Zonaren	C ₁₅ H ₂₄	1530	1528	RI, MS	1,1
18	30,25	<i>trans</i> -Kadina-1,4-dien	C ₁₅ H ₂₄	1536	1533	RI, MS	0,4
19	30,39	α -Kadinen	C ₁₅ H ₂₄	1541	1537	RI, MS	1,1
20	30,56	α -Kalakoren	C ₁₅ H ₂₀	1547	1544	RI, MS	0,2
21	32,08	Salvial-4(14)-en-1-on	C ₁₅ H ₂₄ O	1600	1594	RI, MS	0,3
22	32,78	Junenol	C ₁₅ H ₂₆ O	1625	1618	RI, MS	1,1
23	32,99	1-epi Kubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	1633	1627	RI, MS	0,8
24	33,34	α -Murolol (Torejol)	C ₁₅ H ₂₆ O	1645	1644	RI, MS	5,0
25	33,47	Kubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	1650	1645	RI, MS	1,1
26	33,71	α -Kadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	1659	1652	RI, MS	5,8
27	34,58	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol	C ₁₅ H ₂₄ O	1691	1687	RI, MS	0,7
				Ukupno identifikovano			93,5%
Grupe jedinjenja (%)							
Seskviterpensi ugljovodonici (1-20)						78,7	
Oksigenovani seskviterpeni (21-27)						14,8	

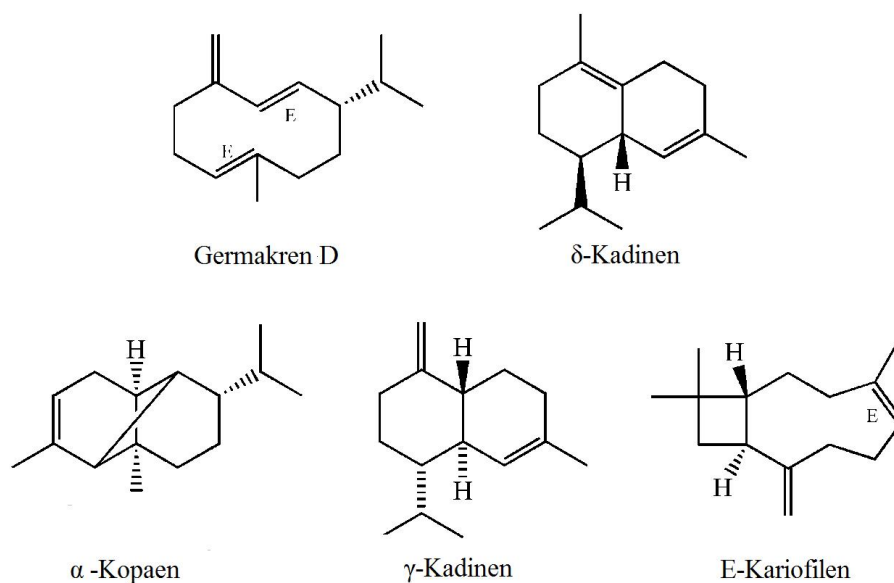
GC-FID hromatogram etarskog ulja pupoljaka breze prikazan je na slici 19. Glavni pikovi su označeni brojevima 1-27 prema redosledu elucije sa HP-5MS kolone.



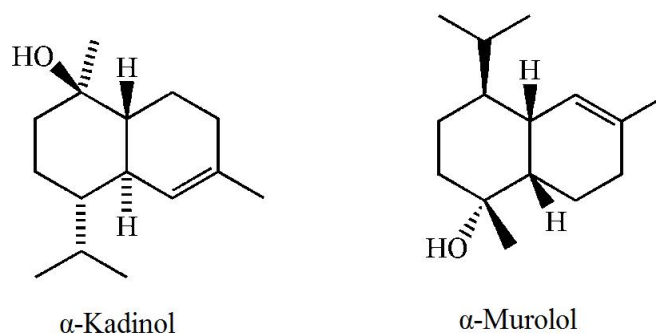
Slika 19. GC-FID hromatogram etarskog ulja pupoljaka breze

Primenom GC-MS metode identifikovano je 27 jedinjenja koja čine 93,5% ukupnog sastava etarskog ulja. Sva identifikovana jedinjenja mogu se podeliti u dve grupe: seskviterpenski ugljovodonici i oksigenovani seskviterpeni.

Seskviterpenski ugljovodonici (20 identifikovanih jedinjenja) čine 78,7% ukupnog sastava etarskog ulja pupoljaka breze. Najprisutniji seskviterpenski ugljovodonici su: germakren-D (21,7%) i δ -kadinen (17,0%), zatim α -kopaen (7,0%), γ -kadinen (5,8%) i *E*-kariofilen (4,4%). Strukture najzastupljenijih seskviterpenskih ugljovodonika prikazane su na slici 20. Oksigenovani seskviterpeni čine 14,8% ukupnog sastava izolovanog etarskog ulja pupoljaka breze. Najzastupljenija komponenta iz ove grupe je seskviterpenski alkohol α -kadinol (5,8%), a prisutan je i njegov izomer α -murolol (torejol) (5,0%). Strukture ovih jedinjenja prikazane su na slici 21.



Slika 20. Strukture najprisutnijih seskviterpenskih ugljovodonika u etarskom ulju dobijenom iz pupoljaka breze



Slika 21. Strukture najprisutnijih oksigenovanih seskviterpena u etarskom ulju dobijenom iz pupoljaka breze

U literaturi se mogu naći podaci o većem prinosu (3,82%) (Can Başer i Demirci, 2007), kao i o manjem prinosu (0,5%) etarskog ulja iz pupoljaka breze (Demirci i sar., 2004), u poređenju sa prinosom dobijenim u ovom istraživanju.

Etarska ulja su složene mešavine isparljivih organskih jedinjenja. Najzastupljenija jedinjenja u etarskim uljima su ugljovodonični terpeni (monoterpeni i seskviterpeni) i njihovi oksigenovani derivati (terpenoidi), fenolna jedinjenja i njihovi derivati, drugi oksigenovani molekuli (alkoholi, etri, kiseline, itd.), kao i fenilpropanoidi i heterociklična jedinjenja koja sadrže atome azota i sumpora (Eslahi i sar., 2017). Pupoljci breze predstavljaju značajne izvore seskviterpena, posebno germakrena D i δ-kadinena. Seskviterpeni su od posebnog

interesa za hemiju prirodnih proizvoda (Atkinson i sar., 1992; Can Başer i Demirci, 2007; Demirci i sar., 2000; Demirci i sar., 2003; Demirci i sar., 2004; Glisić i sar., 2007; Hui i sar., 2015; Isidorov i sar., 2004; Isidorov i sar., 2015; Mashentseva i sar., 2011; Noge i Becerra, 2009; Palazzo i sar., 2009; Shikov i sar., 2014). Danas je poznato više od hiljadu seskviterpenskih struktura. Oni predstavljaju najbrojniju klasu terpena dobijenih iz farnezil pirofosfata. Sastavljeni su od tri izoprenske jedinice, odnosno 15 atoma ugljenika. U poređenju sa monoterpenima, molekulima sastavljenim od dve izoprenske jedinice, seskviterpeni imaju manju isparljivost i stoga daju manji doprinos mirisu etarskih ulja. Sa druge strane, za antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost etarskih ulja često je zaslužno prisustvo seskviterpena (Eslahi i sar., 2017).

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su u skladu sa rezultatima nekih prethodnih studija koje su istraživale etarsko ulje breze (Can Başer i Demirci, 2007; Demirci i sar., 2004). Ove studije su pokazale da etarsko ulje iz svežih pupoljaka breze, dobijeno hidrodestilacijom po Clevenger-u, koji su sakupljeni u Rusiji, u periodu fiziološke hibernacije biljke (oktobar 1997. godine, mart i novembar 1998. godine i februar 1999. godine) kao najzastupljenija jedinjenja sadrži seskviterpene (67,6 % $\pm$ 4,9 % u ukupnom sastavu). Germakren D (14,8 %) i δ -kadinen (13,5 %) su procentualno najviše zastupljeni (Can Başer i Demirci, 2007; Demirci i sar., 2004).

U jednom istraživanju koje je sprovedeno na osušenim pupoljcima breze prikupljenim u Turskoj dobijen je potpuno drugačiji sastav etarskog ulja. Najzastupljenija jedinjenja bila su α -betulenol (25,3 %) i 14-hidroksi-4,5-dihidro- β -kariofilen (17,2%), koja nisu identifikovana u uzorku analiziranom u ovom istraživanju. U uzorku analiziranom u ovom radu utvrđen je visok sadržaj δ -kadinena (17,0%), dok u turskom uzorku iznosi svega (0,1%). Sa druge strane, prisustvo germakrena D, najzastupljenijeg jedinjenja u izolovanom etarskom ulju u ovom istraživanju (21,7%), autori nisu potvrdili u etarskom ulju iz osušenih pupoljaka breze (Demirci i Can Başer, 2003).

Razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu etarskog ulja izolovanog u ovom istraživanju u odnosu na rezultate sličnih studija najverovatnije su posledica različitih klimatskih i vegetacionih uslova, perioda sakupljanja biljnog materijala, načina skladištenja i prerade biljnog materijala i drugih faktora. Stoga su neophodna dalja istraživanja na ovu temu kako bi se dobilo što više podataka o mogućoj upotrebi pupoljaka breze kao izvora seskviterpena.

4.2.2. Hemijski sastav etarskog ulja lista breze

Prinos etarskog ulja lista breze dobijen hidrodestilacijom po standardnoj Clevenger proceduri u toku 120 minuta iznosi 0,037%. U tabeli 15 prikazan je hemijski sastav etarskog ulja dobijenog iz lista breze, dok je na slici 22 predstavljen GC-FID hromatogram etarskog ulja. Pikovi identifikovanih jedinjenja obeleženi su brojevima 1-107, prema redosledu eluacije sa HP-5MS kolone.

Tabela 15. Hemijski sastav etarskog ulja lista breze

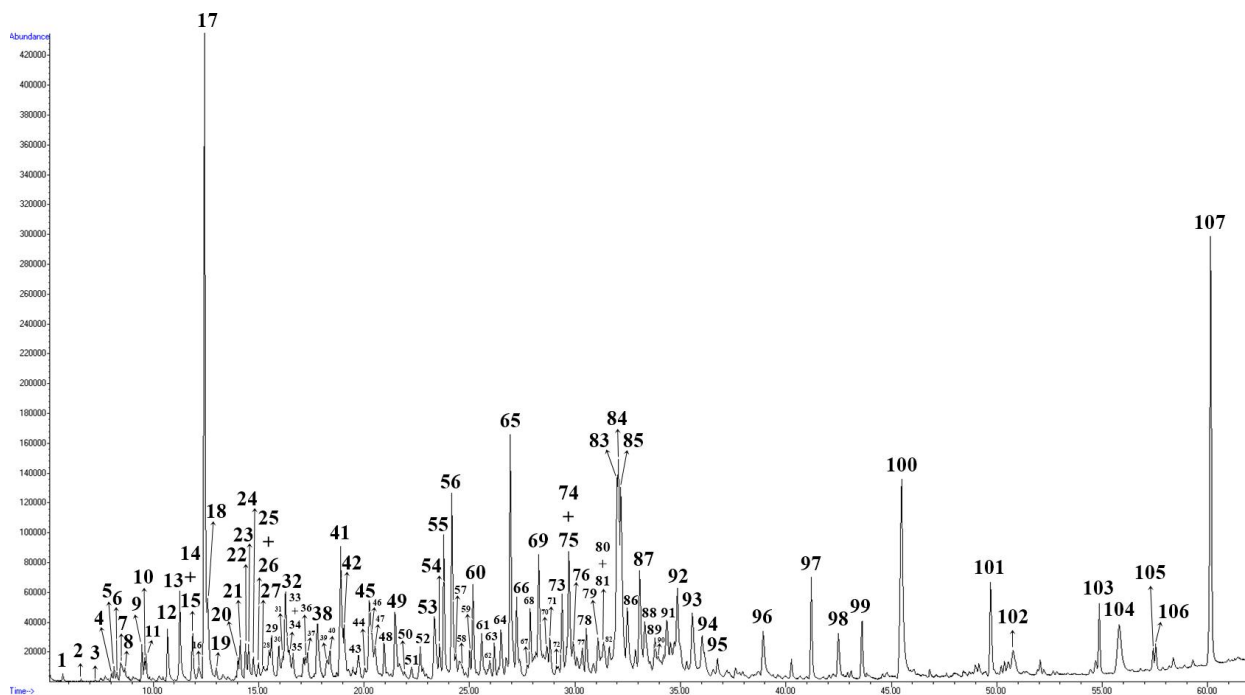
Redni broj	t_{ret} , min	Jedinjenje	RI ^{exp}	RI ^{lit}	Metoda identifikacije	Sadržaj, %
1	5,73	Heptanal	893	901 ^a	RI, MS	tr
2	6,60	α -Tujen	928	924 ^a	RI, MS	tr
3	7,52	Benzaldehid	961	952 ^a	RI, MS	tr
4	8,05	1-Okten-3-ol	980	974 ^a	RI, MS	tr
5	8,16	6-Metil-5-hepten-2-on	984	981 ^a	RI, MS	tr
6	8,30	2-Pentil furan	989	984 ^a	RI, MS	tr
7	8,47	6-Metil-5-hepten-2-ol	995	989 ^a	RI, MS	tr
8	8,67	<i>n</i> -Oktanal	1002	998 ^a	RI, MS	tr
9	9,49	<i>p</i> -Cimen	1025	1020 ^a	RI, MS	0,3
10	9,60	Limonen	1028	1024 ^a	RI, MS, Co-I	tr
11	9,68	1,8-Cineol	1030	1026 ^a	RI, MS, Co-I	tr
12	10,71	(2 <i>E</i>)-Okten-1-al	1058	1049 ^a	RI, MS	0,7
13	11,27	<i>cis</i> -Linalol oksid (furanoid)	1074	1067 ^a	RI, MS	1,3
14	11,87	Fenhon	1090	1083 ^a	RI, MS	tr
15	11,89	<i>trans</i> -Linalol oksid (furanoid)	1091	1084 ^a	RI, MS	0,8
16	12,17	Undekanal	1100	1100 ^a	RI, MS	tr
17	12,44	Linalol	1105	1095^a	RI, MS, Co-I	8,9
18	12,58	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-Oktadienal	1109	1102 ^a	RI, MS	1,8
19	13,02	<i>trans</i> -Tujon	1119	1112 ^a	RI, MS	tr
20	14,03	Lilak aldehid A	1145	1145 ^b	RI, MS	0,3
21	14,14	Kamfor	1147	1141 ^a	RI, MS, Co-I	0,5
22	14,39	Lilak aldehid B	1153	1154 ^b	RI, MS	0,5
23	14,53	Menton	1157	1148 ^a	RI, MS	0,4

24	14,77	(2E)-Nonen-1-al	1162	1157 ^a	RI, MS	tr
25	14,99	izo-Menton	1167	1158 ^a	RI, MS	tr
26	15,03	Lilak aldehid D	1168	1169 ^b	RI, MS	tr
27	15,24	Borneol	1173	1165 ^a	RI, MS	tr
28	15,49	Mentol	1180	1167 ^a	RI, MS, Co-I	tr
29	15,62	Terpinen-4-ol	1184	1174 ^a	RI, MS, Co-I	0,6
30	15,96	Kripton	1191	1183 ^a	RI, MS	0,3
31	16,13	2-Dekanon	1195	1190 ^a	RI, MS	tr
32	16,28	α -Terpineol	1196	1186 ^a	RI, MS	1,2
33	16,35	Metil salicilat (sin. Ulje betule)	1201	1201 ^c	RI, MS	tr
34	16,47	Metil kavikol	1203	1195 ^a	RI, MS	tr
35	16,66	<i>n</i> -Dekanal	1208	1201 ^a	RI, MS	tr
36	17,24	3-Cikloheksen-1-propanal	1222	1230 ^d	RI, MS	tr
37	17,34	β -Ciklocitral	1224	1220 ^e	RI, MS	tr
38	17,80	Nerol	1235	1227 ^a	RI, MS	1,4
39	18,25	Kumin aldehid	1246	1238 ^a	RI, MS	tr
40	18,39	Karvon	1249	1239 ^a	RI, MS, Co-I	0,5
41	18,91	Geraniol	1259	1249 ^a	RI, MS	2,7
42	19,08	(2E)-Decenal	1265	1260 ^a	RI, MS	0,8
43	19,76	Vitispiran	1281	1271 ^f	RI, MS	tr
44	20,04	izo-Isopulegil acetat	1288	1283 ^a	RI, MS	tr
45	20,24	(E)-Anetol	1292	1282 ^a	RI, MS	2,1
46	20,38	Dihidroedulan I	1296	1291 ^g	RI, MS	tr
47	20,53	Tridekan	1300	1300 ^a	RI, MS	0,6
48	20,95	Undekanal	1310	1305 ^a	RI, MS	0,4
49	21,47	(2E,4E)-Decadienal	1322	1315 ^a	RI, MS	1,0
50	21,92	Heksil tiglat	1333	1330 ^a	RI, MS	tr
51	22,25	(E)-2-Heksenil tiglat	1341	1338 ^g	RI, MS	tr
52	22,65	α -Kubeben	1350	1345 ^a	RI, MS	0,4
53	23,32	Eugenol	1366	1356 ^a	RI, MS, Co-I	1,5
54	23,59	α -Ilangen	1373	1373 ^a	RI, MS	0,5
55	23,78	α -Kopaen	1378	1374 ^a	RI, MS	2,0
56	24,16	β -Burbonen	1387	1387 ^a	RI, MS	2,6

57	24,37	izo-Longifolen	1392	1389 ^a	RI, MS	tr
58	24,68	<i>n</i> -Tetradekan	1400	1400 ^a	RI, MS	tr
59	25,03	Ilanga-2,4(15)-dien	1408	1400 ^h	RI, MS	0,3
60	25,14	Metil eugenol	1411	1403 ^a	RI, MS	1,4
61	25,57	(<i>E</i>)-Kariofilen	1421	1417 ^a	RI, MS, Co-I	0,7
62	25,97	β -Kopaen	1431	1430 ^a	RI, MS	tr
63	26,20	α - <i>trans</i> -Bergamoten	1437	1432 ^a	RI, MS	0,5
64	26,50	6,9-Guajadien	1445	1442 ^a	RI, MS	0,9
65	26,95	Geranil aceton	1456	1453^a	RI, MS	4,0
66	27,25	alo-Aromadendren	1463	1458 ^a	RI, MS	0,9
67	27,75	<i>trans</i> -Kadina-1(6),4-dien	1476	1475 ^a	RI, MS	tr
68	27,88	γ -Murolen	1479	1478 ^a	RI, MS	0,7
69	28,28	(<i>E</i>)- β -Jonon	1489	1487 ^a	RI, MS	1,7
70	28,69	Pentadekan	1500	1500 ^a	RI, MS	tr
71	28,83	α -Murolen	1503	1500 ^a	RI, MS	0,4
72	29,13	(<i>E, E</i>)- α -Farnezen	1511	1505 ^a	RI, MS	tr
73	29,39	γ -Kadinen	1517	1513 ^a	RI, MS	1,2
74	29,63	endo-1-Burbonanol	1524	1518 ^a	RI, MS	tr
75	29,72	δ -Kadinen	1526	1522 ^a	RI, MS	2,7
76	29,91	9-Metil- <i>trans</i> -dekalin-1,8-dion	1531	-	MS	0,7
77	30,35	Furopolargon A	1543	1540 ⁱ	RI, MS	0,5
78	30,54	α -Kalakoren	1547	1544 ^a	RI, MS	0,8
79	31,13	Salviadienol	1559	1549 ^j	RI, MS	0,7
80	31,24	1-nor-Burbonanon	1566	1561 ^a	RI, MS	tr
81	31,41	1,5-Epoksialvial-4(14)-en	1570	1572 ^k	RI, MS	1,1
82	31,62	<i>cis</i> -3-Heksenil benzoat	1576	1572 ^l	RI, MS	0,5
83	32,01	Spatulenol	1586	1577 ^a	RI, MS	3,5
84	32,08	Kariofilen oksid	1588	1582 ^a	RI, MS	3,4
85	32,18	Furopolargon B	1590	-	MS	4,4
86	32,48	Salvial-4(14)-en-1-on	1598	1594 ^a	RI, MS	1,6
87	33,09	Humulenepoksid II	1615	1614 ^m	RI, MS	2,1
88	33,34	Isolongifolan-7- α -ol	1622	1618 ^a	RI, MS	1,4
89	33,80	1-epi-Kubenol	1634	1627 ^a	RI, MS	0,4

90	33,96	epi- α -Kadinol	1637	1638 ^a	RI, MS	tr
91	34,36	α -Murolol	1650	1644 ^a	RI, MS	1,0
92	34,87	Valerianol	1664	1656 ^a	RI, MS	2,1
93	35,57	Kadalen	1683	1675 ^a	RI, MS	1,4
94	36,04	Eudezma-4(15),7-dien-1-ol	1696	1687 ^a	RI, MS	1,0
95	36,77	Pentadekanal	1716	1715 ⁿ	RI, MS	tr
96	38,93	epi-Ciklokolorenol	1779	1774 ^a	RI, MS	1,2
97	41,23	Heksahidrofarnezil aceton	1847	1842 ^o	RI, MS	1,6
98	42,50	<i>n</i> -Heksadekanol	1887	1882 ^p	RI, MS	0,8
99	43,64	(5 <i>E</i> ,9 <i>E</i>)-Farnezilaceton	1920	1912 ^a	RI, MS	0,9
100	45,52	Palmitinska kiselina	1979	1975^a	RI, MS	5,7
101	49,72	Fitol	2118	2112 ^r	RI, MS	1,8
102	50,76	Grandifloren	2164	2174 ^a	RI, MS	0,9
103	54,87	Trikozan	2300	2300 ^a	RI, MS	1,0
104	55,79	(<i>Z</i>)-2-Trikozen	2334	2325 ^s	RI, MS	2,0
105	57,41	1-Tetrakozen	2393	2394 ^t	RI, MS	0,3
106	57,57	Tetrakozan	2400	2400 ^a	RI, MS	0,4
107	60,17	Pentakozan	2500	2500^a	RI, MS	7,2
Ukupno identifikovano, %						100,0
Raspodela komponenata po grupama, %						
Monoterpenski ugljovodonici (2, 9, 10)						0,3
Oksigenovani monoterenoidi						22,6
(11, 13-15, 17, 19, 21, 23, 25, 27-30, 32, 37-41, 44, 65)						
Seskviterpenski ugljovodonici (52, 54-57, 59, 61-64, 66-68, 71-73, 75, 78)						14,6
Oksigenovani seskviterpeni (69, 74, 77, 79-81, 83-94, 96, 97, 99)						30,0
Fenilpropanoidi (34, 45, 53, 60)						5,0
Diterpeni (101)						1,8
Aldehidi (1, 3, 8, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 35, 36, 42, 48, 49, 95)						5,9
Masne kiseline (100)						5,7
<i>n</i> -Alkani (47, 58, 70, 103-107)						11,5
Ostala jedinjenja (4-7, 31, 33, 43, 46, 50, 51, 76, 82, 98, 100, 102)						2,9

*t*_{ret.}: Retenciono vreme; RI^{lit} - Retencioni indeksi dostupni u literaturi; RI^{exp}: Retencioni indeksi određeni eksperimentalno pomoću homologe serije *n*-alkana (C₈-C₂₀ i C₂₁-C₄₀) na HP-5MS koloni. MS: komponente identifikovane poređenjem masenih spektara sa masenim spektrima iz Willey 6, NIST 2011 i RTLPEST biblioteka i odabirom spektra jedinjenja sa stepenom poklapanja >75%; RI: komponente identifikovane poređenjem retencionih indeksa; Co-I: komponente identifikovane ko-injektiranjem identičnog standarda; tr: komponenta prisutna u tragovima, <0,05%.



Slika 22. GC-FID hromatogram etarskog ulja lista breze

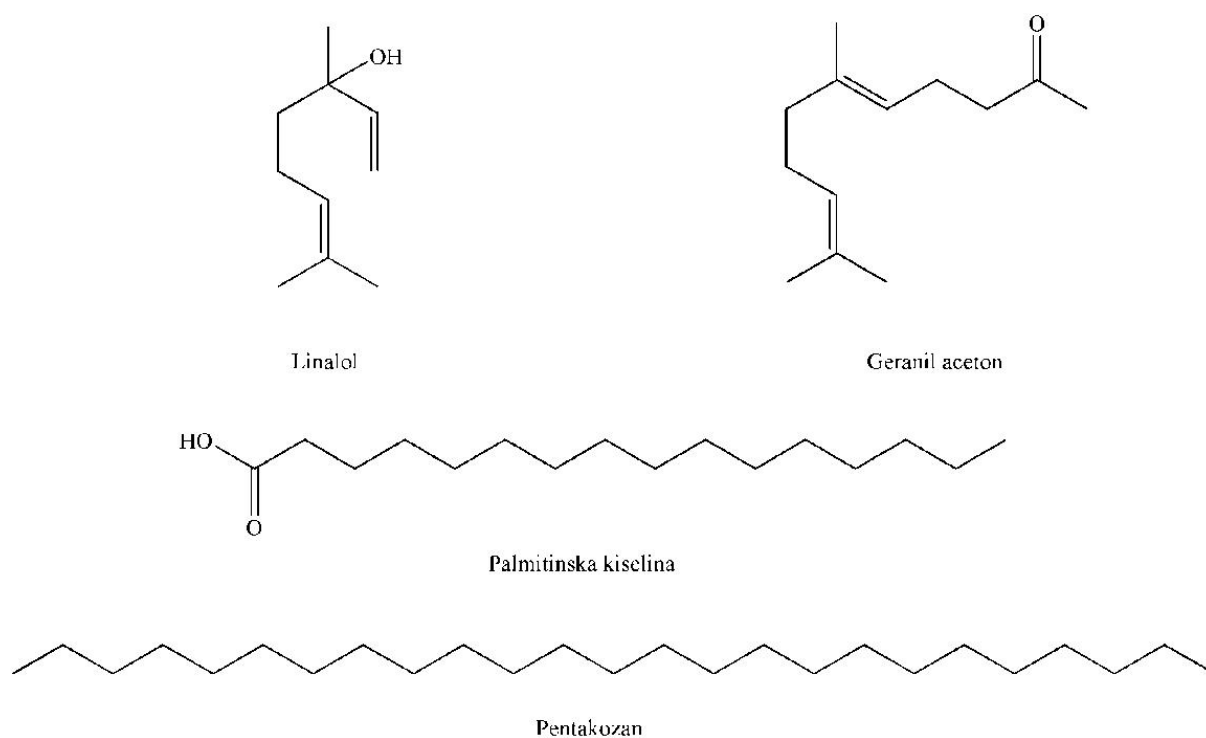
Prinos etarskog ulja lista breze od 0,037% je u skladu sa rezultatima dobijenim u nekim ranijim istraživanjima. Prema studiji Lavrenev i Lavrenev (1999), sadržaj etarskog ulja u listu breze kretao se između 0,04 i 0,05%, što je uporedivo sa rezultatima u ovom istraživanju. Sa druge strane, studija Orav i saradnika (2011) daje podatke o prinosu od 0,11%, dok su Can Başer i Demirci (2007) dobili značajno veći prinos etarskog ulja iz lista breze 0,63% (Can Başer i Demirci, 2007; Lavrenev i Lavrenev, 1999; Orav i sar., 2011).

Najzastupljenija grupa jedinjenja u etarskom ulju lista breze su oksigenovani seskviterpeni (30%), zatim slede oksigenovani monoterpenoidi (22,6%), seskviterpenski ugljovodonici (14,6%) i *n*-alkani (11,5%). Seskviterpeni su veoma brojna grupa jedinjenja i detaljnije su opisani u delu 4.1. S obzirom na to da su najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju lista breze seskviterpenski ugljovodonici, može se pretpostaviti da biološke aktivnosti etarskog ulja potiču od prisustva ovih jedinjenja.

Monoterpeni su jedinjenja sastavljena od 10 C-atoma, aciklične, monociklične ili biciklične strukture. Monoterpeni su sekundarni metaboliti biljaka, koji se sintetišu iz prekursora geranil pirofosfata (GPP). Sastavni su deo mnogih etarskih ulja, a zbog svoje velike isparljivosti su odgovorni za miris i aromu etarskih ulja (Can Basher i Buchbauer, 2010; Loza-Tavera, 1999). Neke od bioloških aktivnosti monoterpena su: antimikrobna,

antivirusna, analgetska, antiinflamatorna, antioksidativna, antikancerogena i druge (Zielińska-Błajet i Feder-Kubis, 2020).

Najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju lista breze (tabela 15) su linalol, geranil aceton, palmitinska kiselina i pentakozan. Njihove strukture su predstavljene na slici 23.



Slika 23. Strukturne formule najzastupljenijih jedinjenja u etarskom ulju lista breze

Etarsko ulje lista breze je značajan izvor linalola. Linalol je po hemijskom sastavu monoterpenski alkohol (Amakran i sar., 2024). Prisutan je u etarskim uljima mnogih biljaka, kao što su bosiljak, timijan, lovorov list, cimet, korijander i druge (Nadeem i sar., 2013). Nekim etarskim uljima se antibakterijska i antifungalna aktivnost pripisuje upravo zbog visokog procenta linalola (Amakran i sar., 2024; Jelačić i sar., 2011; Mazzanti i sar., 1998; Muller i sar., 2024). Etarsko ulje bosiljka sadrži linalol u visokom procentu, koji predstavlja njegovu glavnu komponentu i ispoljava izraženu antimikrobnu aktivnost (Beatović i sar., 2013; Jelačić i sar., 2011). Prethodna istraživanja koja su se bavila interakcijom linalola i različitih antibiotika u inhibiciji rasta MRSA (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*) izolata su došla do zaključka da postoji sinergistički efekat interakcije linalola i oksacilina, amoksicilina, gentamicina, tetraciklina ili ciprofloksacina na MRSA izolate. Takođe, u kombinaciji linalola i gentamicina, linalol povećava osetljivost *Staphylococcus aureus*,

odnosno smanjuje MIC (Aelenei i sar., 2019). Pojedini autori smatraju da je linalol odgovoran za jaku antioksidativnu aktivnost etarskih ulja (Nadeem i sar., 2013).

Geranil aceton je po hemijskom sastavu monoterpenski keton. Sastojak je mnogih biljnih vrsta koje sadrže etarska ulja, ali i voća kao što su paradajz, bundeva, lubenica, mango, papaja, kajsija, breskva (Stobiecka, 2015). Ima snažan repelentni efekat na insekte i parazite. Osim toga, ima sposobnost inhibicije rasta nekih ćelijskih linija melanoma (B-16) i leukoma (Bonikowski i sar., 2015; Wróblewska-Kurdyk i sar., 2022). Takođe, ispoljava antioksidantni efekat koji je utvrđen DPPH i ABTS testovima (Du i sar., 2020; Stobiecka, 2015). Dokazano je i njegovo antimikrobno dejstvo na Gram-pozitivne (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp.) i gljivice (*Candida albicans*) (Stobiecka, 2015). Zbog svoje antimikrobne aktivnosti, koristi se kao konzervans u prehrambenoj industriji (Al-Zharani i sar., 2021).

Palmitinska kiselina je po strukturi zasićena masna kiselina. Nalazi se u biljnim i životinjskim organizmima, a u ljudskom organizmu čini 20-30% masnih kiselina, i može se unositi kroz ishranu i *de novo* sintetisati (Carta i sar., 2017). Ranija istraživanja navode da ima antimikrobno, antioksidativno, antiinflamatorno i hipoholesterolemijsko dejstvo (smanjenje nivoa holesterola u krvi) (Siswadi i Saragih, 2021).

Pentakozan je po strukturi nerazgranati alkan koji se sastoji od 25 atoma ugljenika. Prisutan je u mnogim biljnim vrstama. Smatra se da antibakterijski i antifungalni efekat etarskih ulja pojedinih biljaka u kojima je pentakozan prisutan u velikom procentu, potiče od njegovog prisustva, ali i drugih isparljivih ugljovodonika (Ferdosi i sar., 2021; Marrufo i sar., 2013).

U etarskom ulju lista breze sa područja Turske dobijenom hidrodestilacijom najzastupljenija jedinjenja su 14-hidroksi-4,5-dihidro- β -kariofilen (21,4%) i 14-hidroksi- β -kariofilen (α -betulenol) (29,3%), koja u etarskom ulju u ovom istraživanju nisu identifikovana. Sa druge strane, sadržaj linalola je samo 0,1%, dok je u etarskom ulju u ovom istraživanju linalol prisutan sa 8,9% (Can Başer i Demirci, 2007). Orav i saradnici (2011) su u etarskom ulju iz lista breze dobijenom hidrodestilacijom, kao glavna jedinjenja identifikovali α -betulenol (33,1%) i *n*-trikoza (12,5%) (Orav i sar., 2011). Prvo jedinjenje nije identifikovano u etarskom ulju u ovom istraživanju, dok je drugo prisutno u znatno manjoj količini (1%).

Na kvalitativni i kvantitativni sastav etarskog ulja lista breze najverovatnije utiču različiti klimatski i vegetacioni uslovi, period sakupljanja biljnog materijala, način skladištenja, čuvanja i prerade biljnog materijala, itd. Zato su neophodna dalja istraživanja na

ovu temu kako bi se dobilo što više podataka o mogućoj upotrebi lista breze kao izvora monoterpena.

4.3. Inkluzioni kompleksi betulina i betulinske kiseline

Istraživanja u ovom radu su pokazala da je u ekstraktu kore breze najzastupljeniji BE kao pentaciklični triterpen sa brojnim biološkim aktivnostima i stoga je izabran kao pogodan molekul za izradu inkluzionog kompleksa sa HP- β -CD. Cilj je da se ovom molekulu poboljšaju fizičko-hemijske karakteristike u inkluzionom kompleksu, a time i efikasnost delovanja. Uporedo sa ovim inkluzionim kompleksom izrađen je i inkluzioni kompleks BK, kao derivata BE, sa HP- β -CD, kako bi se poredile ispitivane biološke aktivnosti BE i BK i odgovarajućih inkluzionih kompleksa. BK kao derivat BE razlikuje se od BE po tome što na C-28 umesto metoksi ima karboksilnu grupu, pa je stoga ovakvom uporednom analizom određen uticaj funkcionalnih grupa sa jedne strane, a sa druge strane uticaj povećane rastvorljivosti ovih molekula u inkluzionim kompleksima na biološku aktivnost.

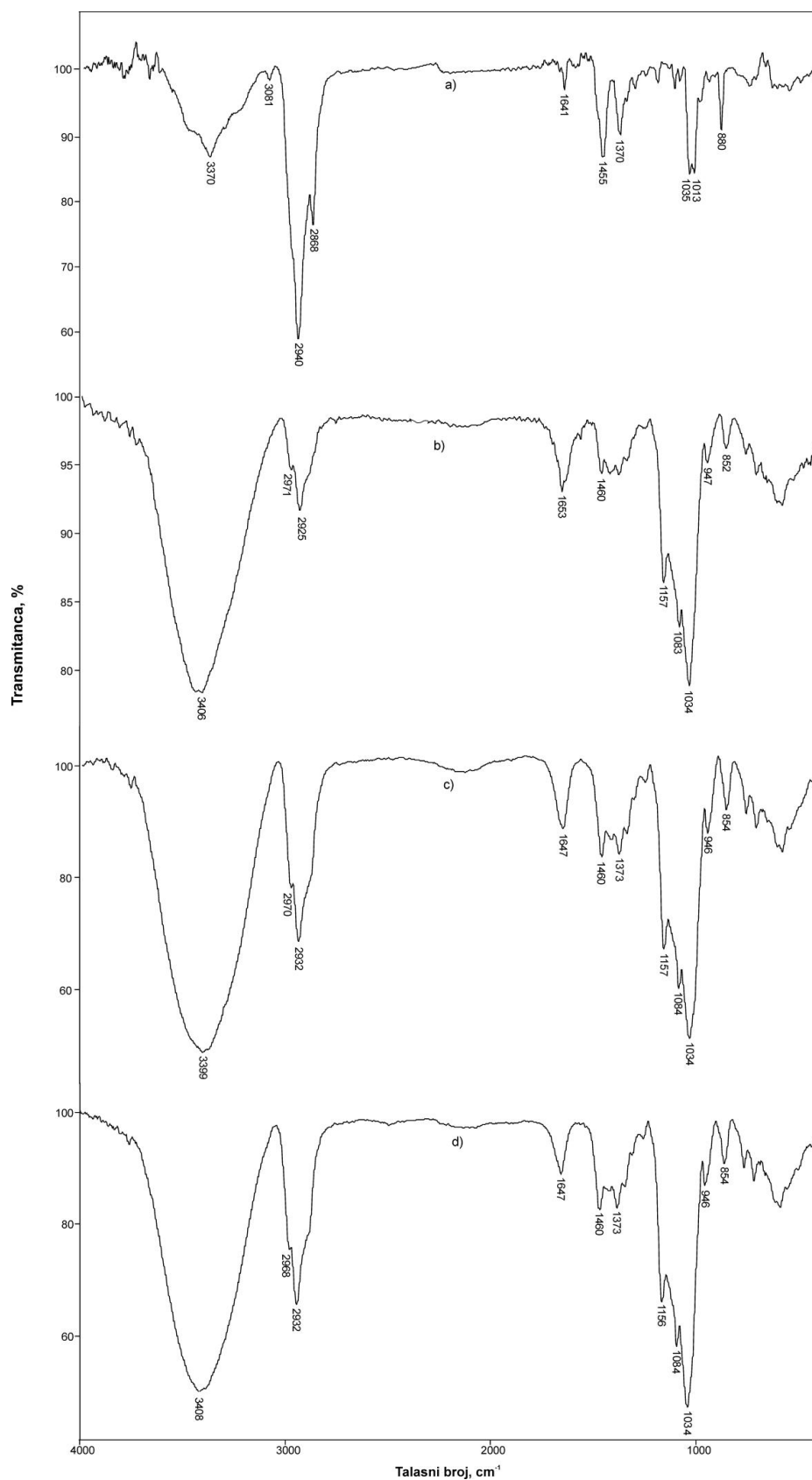
4.3.1. Karakterizacija inkluzionih kompleksa

Da bi se izvršila strukturna karakterizacija pripremljenih inkluzionih kompleksa BE:HP- β -CD, BK:HP- β -CD, molekula gosta, BE i BK, molekula domaćina, HP- β -CD i odgovarajućih fizičkih smeša BE i BK sa HP- β -CD primenjene su različite metode: infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR), difrakcija rendgenskih zraka (XRD), diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).

4.3.1.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

Formiranje inkluzionih kompleksa između aktivne supstance i ciklodekstrina je proces koji uključuje hemijske interakcije tipa vodoničnih veza i/ili hidrofobne interakcije između unutrašnje šupljine ciklodekstrina i aktivne supstance (Quilaqueo i sar., 2019), što se u FTIR spektrima inkluzionih kompleksa odražava promenom položaja ili intenziteta pojedinih karakterističnih traka čistih supstanci.

FTIR spektri BE, HP- β -CD, inkluzionog kompleksa BE:HP- β -CD i fizičke smeše su prikazani na slici 24.



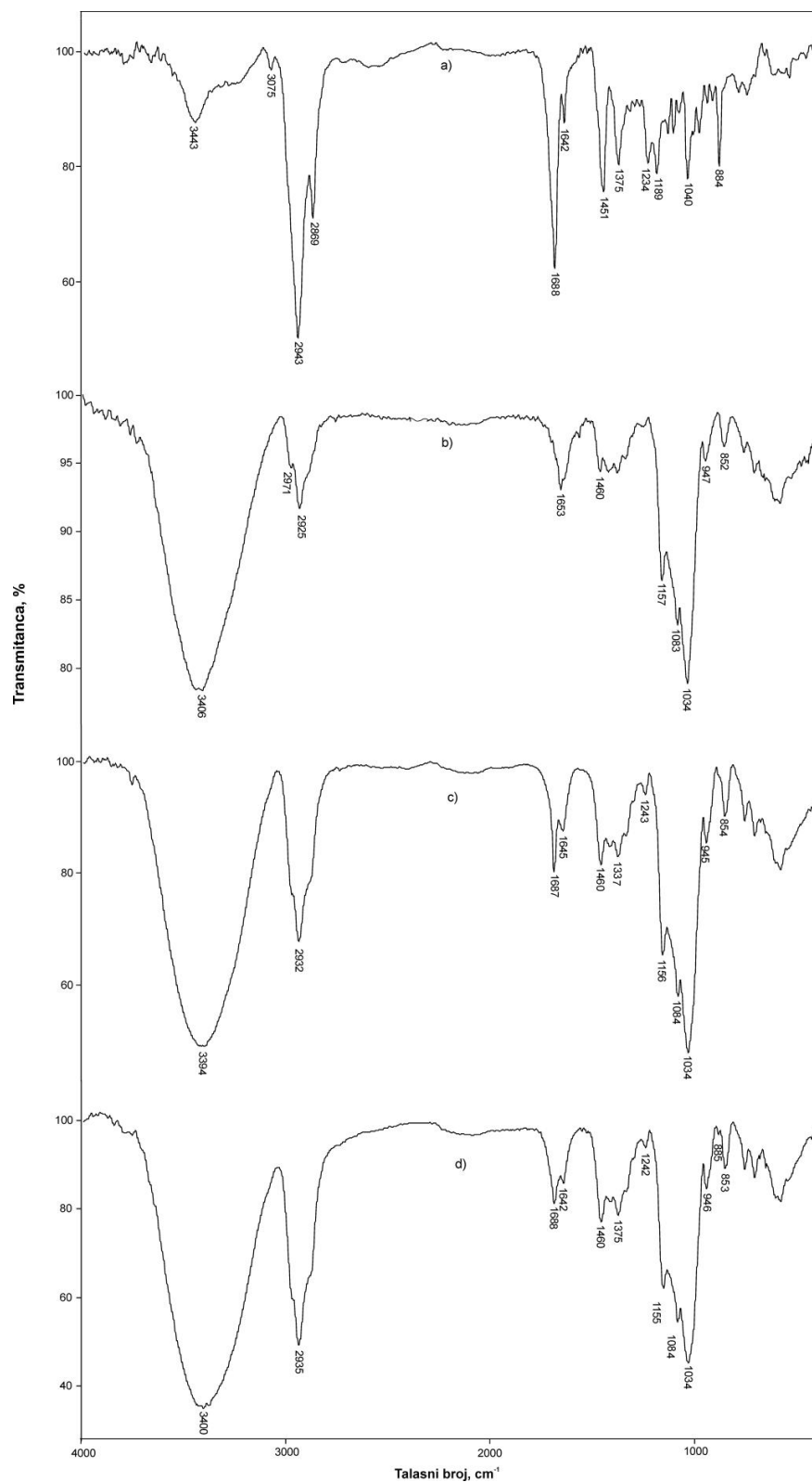
Slika 24. FTIR spektri: a) BE, b) HP-β-CD, c) inkluzionog kompleksa BE:HP-β-CD i d) fizičke smeše BE i HP-β-CD

FTIR spektar BE (slika 24a) se karakteriše širokom apsorpcionom trakom sa maksimumom na 3370 cm^{-1} , koja odgovara valencionim vibracijama OH grupe. Apsorpcione trake sa maksimumima na 2940 cm^{-1} i 2869 cm^{-1} potiču od valencionih vibracija C-H veza iz metil i metilenskih grupa, što je u skladu sa literaturnim podacima (Sbârcea i sar., 2019). Apsorpciona traka slabog intenziteta na 1641 cm^{-1} odgovara valencionim vibracijama C=C veze. Apsorpcione trake sa maksimumima na 1455 cm^{-1} i 1370 cm^{-1} odgovaraju asimetričnim i simetričnim vibracijama savijanja C-H veza iz metil grupa. Vibracije istezanja C-O veze daju apsorpcionu traku srednjeg intenziteta sa maksimumom na 1013 cm^{-1} , dok traka na 880 cm^{-1} potiče od C-H vibracija van ravni iz vinil grupe (Sbârcea i sar., 2019).

FTIR spektar HP- β -CD (slika 24b) se karakteriše širokom, intenzivnom apsorpcionom trakom sa maksimumom na 3406 cm^{-1} , koja potiče od valencionih vibracija OH grupa, $\nu(\text{OH})$. Apsorpcione trake slabog intenziteta na 2971 cm^{-1} i 2925 cm^{-1} u FTIR spektru HP- β -CD potiču od valencionih C-H vibracija. Apsorpciona traka sa maksimumom na 1653 cm^{-1} potiče od deformacionih vibracija u ravni -OH grupa. Asimetrične i simetrične C-H deformacione vibracije u ravni daju apsorpcione trake na 1460 cm^{-1} i 1375 cm^{-1} , respektivno (Nikolić i sar., 2023). Kompleksna apsorpciona traka u oblasti $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ sa maksimumima na 1157 cm^{-1} , 1083 cm^{-1} i 1034 cm^{-1} potiče od kuplovanih valencionih vibracija C-O, C-O-C, C-C-O i C-C veza. Deformacione vibracije ovih grupa daju apsorpcione trake u oblasti talasnih brojeva $1000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$.

Široka apsorpciona traka sa maksimumom apsorpcije na 3399 cm^{-1} u FTIR spektru inkluzionog kompleksa (slika 24c) potiče od valencionih vibracija hidroksilne grupe. Ova apsorpciona traka se u FTIR spektru HP- β -CD javlja na 3406 cm^{-1} . Pomeranje maksimuma apsorpcione trake za 7 jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva ukazuje da hidroksilne grupe HP- β -CD učestvuju u formiranju vodoničnih veza između BE i HP- β -CD. Apsorpciona traka koja potiče od valencionih vibracija C-H veza se u FTIR spektru inkluzionog kompleksa nalazi na 2932 cm^{-1} . Maksimum ove apsorpcione trake pomeren je za 8 jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva u odnosu na njen položaj u FTIR spektru BE, odnosno za 7 jedinica ka višim vrednostima talasnih brojeva u odnosu na položaj u FTIR spektru HP- β -CD. Takođe, može se zapaziti povećanje intenziteta pojedinih apsorpcionionih traka u FTIR spektru inkluzionog kompleksa u odnosu na HP- β -CD (trake na 2932 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} i 1373 cm^{-1}), što nije primećeno u FTIR spektru fizičke smeše (slika 24d).

FTIR spektri BK, HP- β -CD, inkluzionog kompleksa BK:HP- β -CD i odgovarajuće fizičke smeše su prikazani na slici 25.



Slika 25. FTIR spektri: a) BK, b) HP- β -CD, c) inkluzionog kompleksa BK:HP- β -CD i d) fizičke smeše BK i HP- β -CD

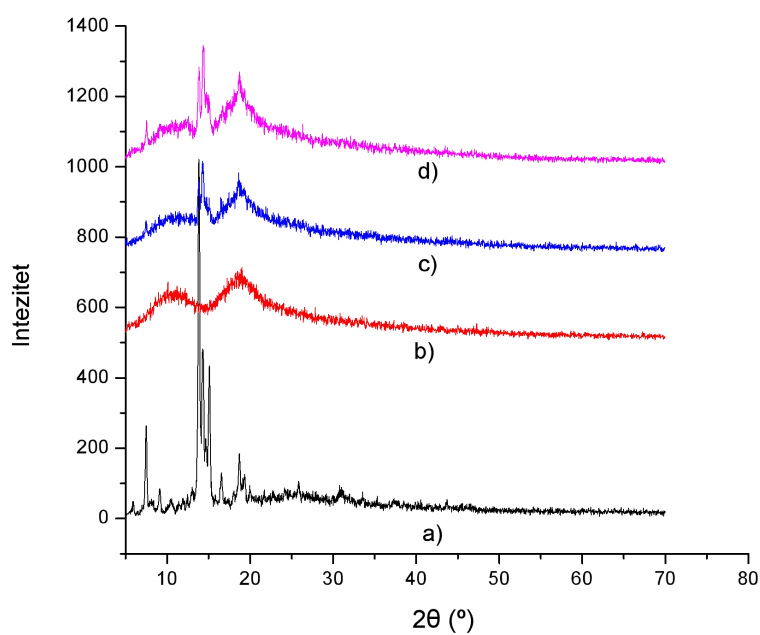
FTIR spektar BK (slika 25a) karakteriše se širokom apsorpcionom trakom slabog intenziteta sa maksimumom na 3443 cm^{-1} , koja odgovara valencionim vibracijama O-H veze (Li i sar., 2020). Oštra, intenzivna apsorpciona traka sa maksimumom na 2943 cm^{-1} , i oštra apsorpciona traka srednjeg intenziteta sa maksimumom na 2869 cm^{-1} , potiču od valencionih vibracija C-H veza iz metil i metilenskih grupa (Sbârcea i sar., 2019). Oštra apsorpciona traka jakog intenziteta sa maksimumom na 1688 cm^{-1} odgovara valencionim vibracijama C=O veze, dok apsorpciona traka znatno manjeg intenziteta na 1642 cm^{-1} odgovara valencionim vibracijama C=C veze i u skladu je sa literaturnim podacima (Li i sar., 2020). Apsorpcione trake sa maksimumima na 1451 cm^{-1} i 1375 cm^{-1} odgovaraju asimetričnim i simetričnim vibracijama savijanja C-H veza iz metil grupa. Oštra apsorpciona traka srednjeg intenziteta sa maksimumom na 884 cm^{-1} može se povezati sa savijanjem izvan ravni C-H veze koja potiče sa vinil grupe (Sbârcea i sar., 2019).

Široka, intenzivna apsorpciona traka sa maksimumom apsorpcije na 3394 cm^{-1} u FTIR spektru inkluzionog kompleksa BK:HP- β -CD (slika 25c), koja potiče od valencionih vibracija -OH grupe, pomeren je za 12 jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva u odnosu na njen položaj u FTIR spektru HP- β -CD (slika 25b), što ukazuje na učestvovanje hidroksilnih grupa u interakcijama između BK i kompleksirajućeg agensa, HP- β -CD. Apsorpciona traka koja potiče od valencionih vibracija C-H veza se u FTIR spektru inkluzionog kompleksa nalazi na 2932 cm^{-1} . Maksimum ove apsorpcione trake pomeren je za 11 jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva u odnosu na njen položaj u FTIR spektru BK, odnosno za 7 jedinica ka višim vrednostima talasnih brojeva u odnosu na položaj u FTIR spektru HP- β -CD. Apsorpcione trake koje potiču od valencionih vibracija C=O i C=C veza u strukturi BK se u spektru inkluzionog kompleksa nalaze na 1687 cm^{-1} i 1645 cm^{-1} , respektivno, i znatno su manjeg intenziteta. Pomeranje ovih apsorpcionih traka ka višim (za 1 jedinicu), odnosno nižim (za 3 jedinice) vrednostima talasnih brojeva, redom, u odnosu na njihov položaj u FTIR spektru BK, ukazuje na njihovo slabo učestvovanje u interakcijama sa kompleksirajućim agensom.

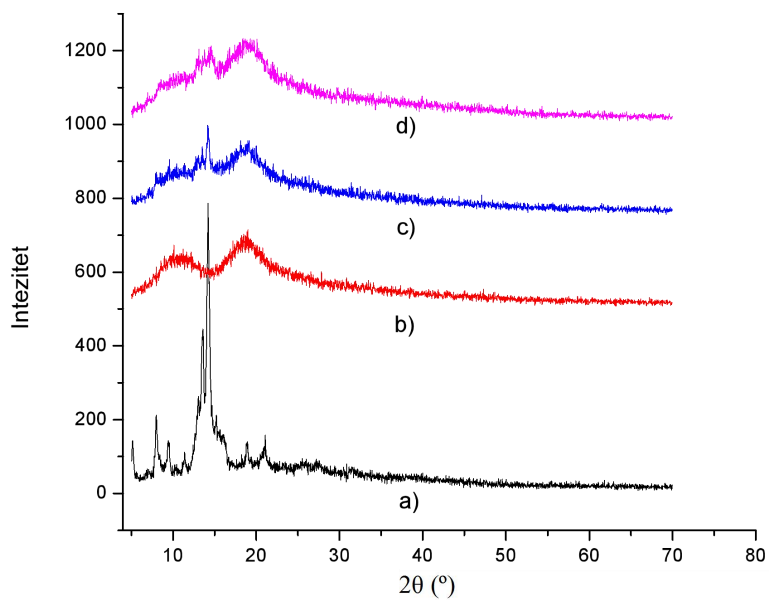
FTIR analiza inkluzionih kompleksa BE i BK i kompleksirajućih agenasa ukazuje na inkluziju BE i BK u šupljine HP- β -CD tj. na formiranje supramolekulskih struktura.

4.3.1.2. Difrakcija rendgenskih zraka (XRD)

Prilikom izrade inkluzionih kompleksa sa ciklodekstrinima, XRD se obično koristi kao pouzdana metoda da bi se okarakterisale razlike koje postoje između čiste supstance i formiranog inkluzionog kompleksa. XRD difraktogrami BE, BK, HP- β -CD, odgovarajućih fizičkih smeša, kao i pripremljenih inkluzionih kompleksa, BE:HP- β -CD i BK:HP- β -CD, prikazani su na slikama 26 i 27, respektivno. Veći broj oštih i intenzivnih pikova, koji se uočavaju na difrakcionim uglovima 2θ od 7° do 26° u difraktogramu BE (slika 28), odnosno od 5° do 22° u difraktogramu BK (slika 29), jasno ukazuju na kristalnu strukturu koju poseduju ova jedinjenja (Kazachenko i sar., 2022; Soica i sar., 2014). U difraktogramu HP- β -CD nisu prisutni oštri i izraženi pikovi. Oni su široki, slabijeg intenziteta i karakteristični su za amorfne strukture kakva je i struktura kompleksirajućeg agensa, HP- β -CD. U difraktogramima odgovarajućih fizičkih smeša BE i BK sa HP- β -CD uočavaju se i oštri pikovi od BE i BK, ali i razvučeni pikovi manjeg intenziteta koji potiču od HP- β -CD. Ovi rezultati pokazuju da u fizičkim smešama nisu ostvarene interakcije između aktivnih supstanci i kompleksirajućeg agensa, kao što je to slučaj u inkluzionim kompleksima, u kojima nisu prisutni jako izraženi pikovi od kristalnih struktura BE i BK. Velika sličnost između difraktograma inkluzionih kompleksa i kompleksirajućeg agensa ukazuje da su aktivne supstance zaklonjene u šupljine ciklodekstrina i zbog toga se gube pikovi koji potiču od refleksije sa njihovih kristalnih površina.



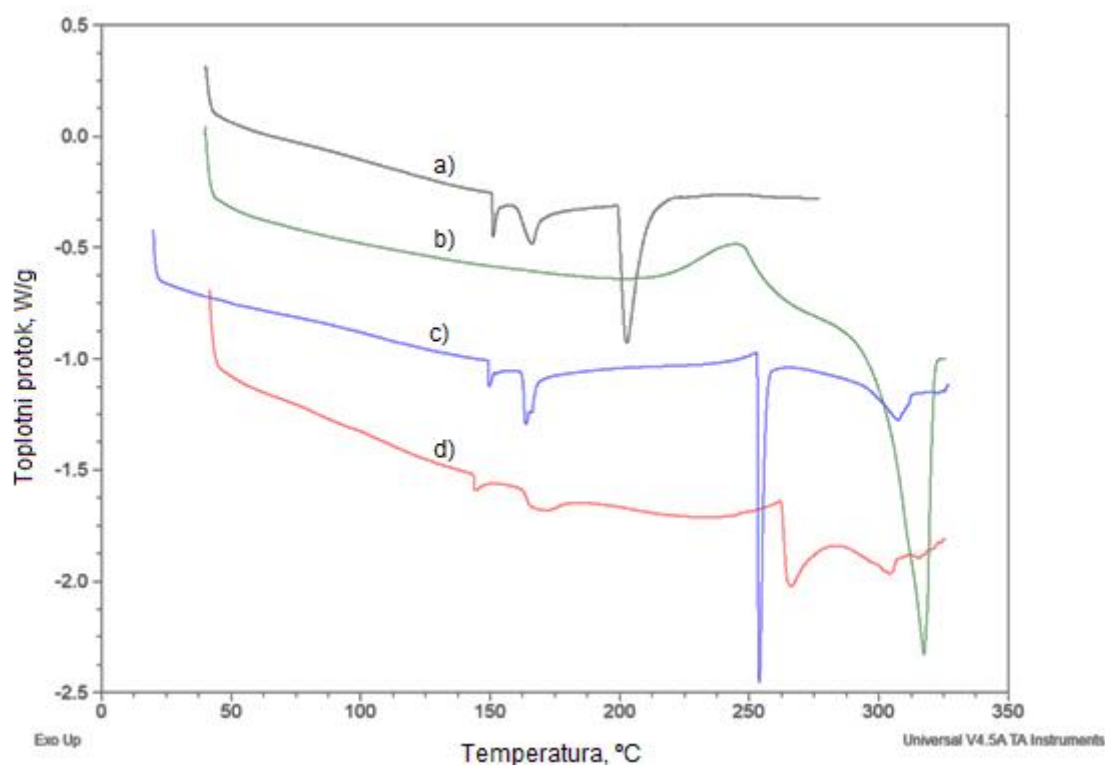
Slika 26. XRD difraktogram: a) BE, b) HP- β -CD, c) inkluzionog kompleksa BE:HP- β -CD i d) fizičke smeše BE i HP- β -CD



Slika 27. XRD difraktogram: a) BK, b) HP- β -CD, c) fizičke smeše BK i HP- β -CD i d) inkluzionog kompleksa BK:HP- β -CD

govori i smanjenje entalpije topljenja BE sa 111,9 J/g na vrednost od 23,65 J/g u kompleksu sa HP- β -CD.

DSC termogrami BK, HP- β -CD, inkluzionog kompleksa BK:HP- β -CD i njihove fizičke smeše prikazani su na slici 29.

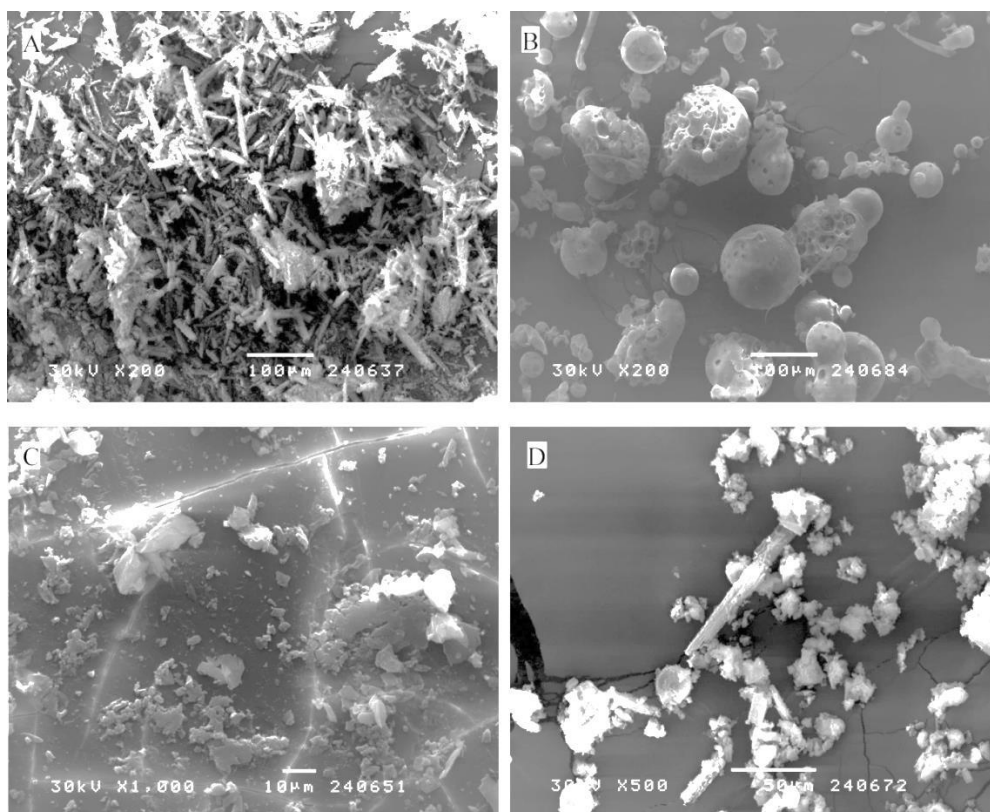


Slika 29. DSC termogrami: a) HP- β -CD, b) BK, c) fizičke smeše i d) inkluzionog kompleksa BK:HP- β -CD

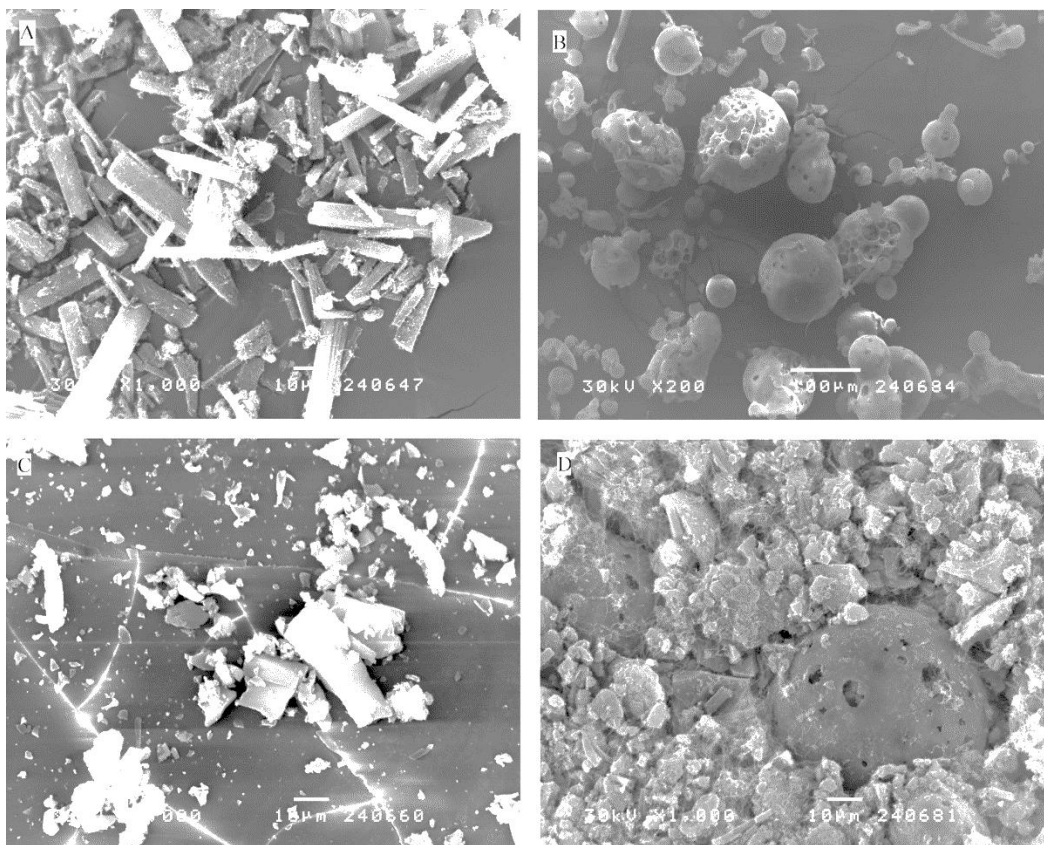
DSC termogram BK sadrži izražen endoterman pik na 317,40°C, koji odgovara temperaturi topljenja BK, što je u skladu sa literaturnim podacima (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Betulinic-Acid#section=KEGG-ID>). Ovaj pik je pomeren ka nižim vrednostima temperature u DSC termogramu inkluzionog kompleksa i nalazi se na 304,70°C, što takođe ukazuje na molekulsku inkapsulaciju i formiranje nove supramolekulske strukture, inkluzionog kompleksa BK:HP- β -CD. U prilog ovome govori i promena entalpije topljenja BK (99,41 J/g), koja se nakon inkorporiranja u šupljinu ciklodekstrina smanjila na 4,264 J/g. Dobijeni rezultati DSC analize su u skladu sa rezultatima FTIR i XRD analize.

4.3.1.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

SEM metodom ispitane su morfološke karakteristike (oblik i veličina) uzoraka inkluzionih kompleksa BE i BK, njihovih fizičkih smeša, molekula domaćina, HP- β -CD, i molekula gosta, BE i BK. SEM mikrografije ovih uzoraka prikazane su na slikama 30 i 31.



Slika 30. SEM mikrografije: (A) BE (200 $\times$), (B) HP- β -CD (200 $\times$), (C) inkluzionog kompleksa BE:HP- β -CD (1000 $\times$) i (D) fizičke smeše BE i HP- β -CD (500 $\times$)



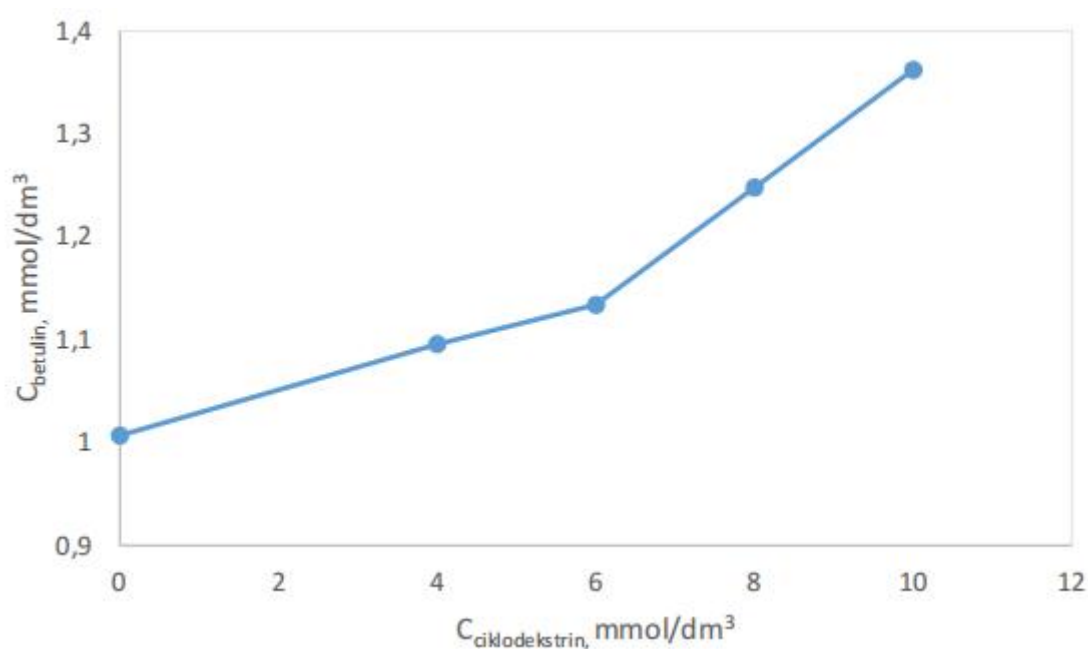
Slika 31. SEM mikrografije: (A) BK (1000×), (B) HP-β-CD (200×), (C) inkluzionog kompleksa BK:HP-β-CD (1000×) i (D) fizičke smeše BK i HP-β-CD (1000×)

Uporednom analizom prikazanih rezultata mogu se uočiti jasne razlike između oblika i veličine čestica čistih supstanci BE i BK, odgovarajućih inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša. Kod BE (slika 30a) uočavaju se nepravilno raspoređeni igličasti kristali veličine oko 100 µm, dok HP-β-CD (slika 30b) ima šupljikave i sferne čestice, koje nisu zapažene u takvom obliku kod inkluzionog kompleksa BE:HP-β-CD (slika 30c). Kod fizičke smeše BE i HP-β-CD (slika 30d) uočavaju se karakteristični igličasti kristali od BE i sferne čestice koje odgovaraju po obliku i veličini HP-β-CD-u, što ukazuje da u fizičkoj smeši nije došlo do interakcije molekula gosta i domaćina. Kod BK (slika 31a) prisutni su nepravilni pločasti štapićasti kristali veličine do 50 µm, koji u takvom obliku nisu zapaženi kod inkluzionog kompleksa BK:HP-β-CD (slika 31c). Kod fizičke smeše BK i HP-β-CD (slika 31d) uočavaju se agregati štapićastih pljosnatih kristala BK i sfernih čestica HP-β-CD. Razlike u izgledu i veličini čestica čistih supstanci i inkluzionih kompleksa pokazuju, takođe, da je došlo do inkorporacije BE i BK u šupljine CD. Dobijeni rezultati SEM analize su u skladu sa rezultatima prethodno primenjenih metoda za karakterizaciju inkluzionih kompleksa u ovoj disertaciji.

4.3.2. Ispitivanje fazne rastvorljivosti inkluzionih kompleksa

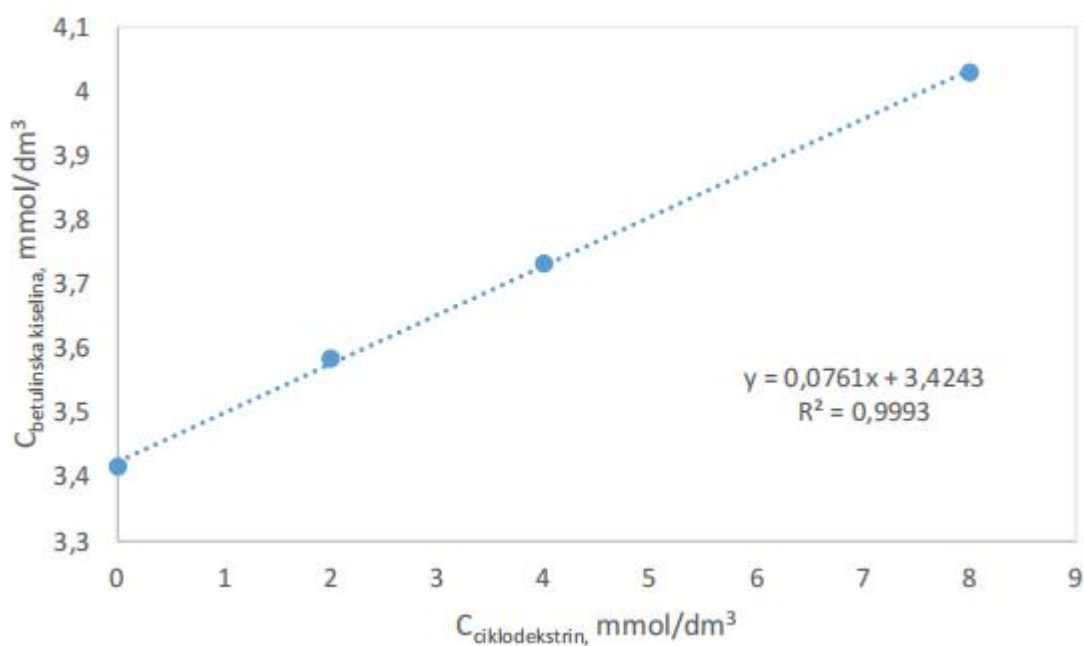
Za ispitivanje fazne rastvorljivosti primenjena je UV-VIS metoda. Koncentracija BE i BK u prisustvu HP- β -CD u vodenim medijumima određivana je na osnovu konstruisanih kalibracionih kriva za molekule gosta, kao zavisnost apsorbance od koncentracije (deo 3.1.6.7.). Rezultati koji se dobijaju na osnovu istraživanja fazne rastvorljivosti su važni jer pokazuju povećanje rastvorljivosti gostujućih komponenata, kao i molski odnos molekula gosta i molekula domaćina u inkluzionom kompleksu.

Dijagram fazne rastvorljivosti BE prikazan je na slici 32. Prema Higuchi-Connors klasifikaciji, dijagram fazne rastvorljivosti BE pripada A_P tipu (Higuchi i Connors, 1965). Ovo pozitivno odstupanje od linearnosti u faznom dijagramu BE ukazuje na formiranje inkluzionog kompleksa višeg reda, pri čemu je molski odnos BE i HP- β -CD u inkluzionom kompleksu 1:2. Rastvorljivost BE u prisustvu HP- β -CD (10 mmol/dm^3) se povećava 1,35 puta u odnosu na čist BE koji je skoro nerastvoran u vodi ($0,08 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$).



Slika 32. Dijagram fazne rastvorljivosti BE

Dijagram fazne rastvorljivosti BK prikazan je na slici 33. Prema Higuchi-Connors klasifikaciji, ovaj dijagram pripada A_L tipu, i pokazuje da rastvorljivost BK raste linearno sa povećanjem koncentracije HP- β -CD u rastvoru. Ovo ukazuje da je molarni odnos BK i HP- β -CD u inkluzionom kompleksu 1:1.



Slika 33. Dijagram fazne rastvorljivosti BK

Efikasnost solubilizacije BK iznosi 1,23 i predstavlja odnos rastvorljivosti BK u vodi u prisustvu najveće koncentracije HP- β -CD (10 mmol/dm³) i rastvorljivosti čiste BK u vodi. Uzimajući u obzir nagib dijagrama fazne rastvorljivosti i intrizičku rastvorljivost BK u vodi, a na osnovu jednačine 3 date u delu 3.1.6.7, može se izračunati konstanta stabilnosti inkluzionog kompleksa BK:HP- β -CD, i ona iznosi 25 M⁻¹. Ova numerička vrednost konstante stabilnosti ukazuje na relativno nisku stabilnost kompleksa (Buko i sar., 2020; Šoica i sar., 2010; Šoica i sar., 2012). Dobijena vrednost konstante stabilnosti je veća u odnosu na dostupna istraživanja (Šoica i sar., 2010).

Za primenjenu metodu pripreme inkluzionog kompleksa BE:HP- β -CD (metoda gnječenja) i ispitivanja fazne rastvorljivosti pokazano je da je molski odnos BE i HP- β -CD u kompleksu 1:2, što nije u saglasnosti sa ranije objavljenim podacima (Buko i sar., 2020; Šoica i sar., 2010). Sa druge strane, odnos BK i HP- β -CD u inkluzionom kompleksu je 1:1, što je u skladu sa literaturnim podacima (Šoica i sar., 2010).

Postignuta povećana rastvorljivost BE i BK u inkluzionim kompleksima u ovim ispitivanjima je u saglasnosti sa rezultatima objavljenim u literaturi (Buko i sar., 2020; Šoica i sar., 2010). Istraživanja drugih istraživača takođe ukazuju na postignutu veću rastvorljivost BE i BK u vodi prilikom kompleksiranja sa HP- β -CD (Šoica i sar., 2010; Wang i sar., 2012). Dobijene niske vrednosti konstanti stabilnosti potiču od sterne neadekvatnosti između šupljine HP- β -CD i triterpenske strukture ispitivanih supstanci. Stoga je u daljim

istraživanjima izazov koristiti i druge CD, kao što su γ -CD i drugi derivati za kompleksiranje po tipu inkluzije BE i BK (Šoica i sar., 2012).

Ipak, može se zaključiti da se HP- β -CD kao kompleksirajući agens može, uprkos niskim vrednostima konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa, uspešno upotrebiti kao nosač za BE i BK jer znatno povećava solubilizaciju ovih biološki aktivnih molekula u vodenim medijumima, što omogućava efikasniji terapijski učinak i smanjenje neželjenih dejstava.

4.4. Biološke aktivnosti izolata breze i inkluzionih kompleksa

4.4.1. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost dobijenih izolata iz breze (etarskih ulja i ekstrakata), standarda i formiranih inkluzionih kompleksa je određena disk-difuzionom i mikrodilucionom metodom (odjeljak 3.1.7.1.).

4.4.1.1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja izolovanih iz pupoljaka i lista breze je određena disk-difuzionom i mikrodilucionom metodom.

Antimikrobna aktivnost etarskog ulja iz pupoljaka breze ispitana je na devet mikroorganizama: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*. Rezultati antimikrobne aktivnosti su prikazani u tabeli 16.

Tabela 16. Antimikrobna aktivnost odabranih antibiotika i etarskog ulja pupoljaka breze

Mikroorganizam	MIC ($\mu\text{l}/\text{cm}^3$)	Prečnik zone inhibicije (mm)				
		Etarsko ulje	Antibiotik			
			A	B	C	N
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	36,7	42,1	26,0	n.t.
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Bacillus luteus</i> klinički izolat	32	18,0 $\pm$ 0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19166	-	-	n.t.	n.t.	34,0	n.t.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	128	21,0 $\pm$ 0,10	13,2	22,9	n.t.	n.t.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	64	26,0 $\pm$ 0,15	n.t.	n.t.	13,0	n.t.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	n.a.	15,0	26,0	n.t.
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	17,0

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija; A-Ampicilin; B-Baktrim; C-Cefalexin; N-Nistatin; n.t. – nije tretiran; n.a. – nema aktivnost

Etarsko ulje pupoljaka breze ispoljilo je antimikrobnu aktivnost protiv *Bacillus luteus*, *Proteus vulgaris* i *Klebsiella pneumoniae* (tabela 16). Prečnik zone inhibicije protiv *Bacillus luteus* je 18 mm, a MIC iznosi 32 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$.

Značajna antimikrobna aktivnost zapažena je protiv *Proteus vulgaris*, sa zonom inhibicije 21 mm (tabela 16). Izolovano etarsko ulje pupoljaka breze pokazalo je jaču antimikrobnu aktivnost od ampicilina, komercijalnog antibiotika širokog spektra (zona inhibicije 13,2 mm, tabela 16). MIC za ovu bakteriju iznosi 128 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$.

Etarsko ulje izolovano iz pupoljaka breze pokazalo je skoro dva puta jaču antimikrobnu aktivnost protiv *Klebsiella pneumoniae* u odnosu na komercijalni cefalosporinski antibiotik cefaleksin (prečnik zone inhibicije etarskog ulja iznosi 26 mm, a cefaleksina 13 mm, tabela 16), dok je MIC vrednost 64 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$.

Literaturni podaci o antimikrobnoj aktivnosti etarskog ulja izolovanog iz pupoljaka breze su dosta ograničeni. Utvrđeno je da određeni derivati kariofilena, kao što je npr. 14-hidroksi-4,5-dihidro- β -kariofilen, izolovani iz etarskog ulja pupoljaka breze deluju na neke bakterijske sojeve (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) i gljivice (*Candida glabrata*) (Baser i Demirci, 2007). Etarska ulja drugih vrsta breze imaju širi antimikrobni spektar. Woods i saradnici (2013) su, prilikom određivanja antimikrobne aktivnosti etarskog ulja rečne breze (*Betula nigra*) sa područja SAD, ustanovili da poseduje antimikrobnu aktivnost protiv sledećih mikroorganizama: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* (Woods i sar., 2013). Dietil-etarski ekstrakt iz pupoljaka vrste breze *Betula litwinowii* je *in vitro* testiranjem pokazao antimikrobnu aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*) i protiv gljivice *Candida albicans* (Isidorov i sar., 2015).

Etarsko ulje pupoljaka breze koje je korišćeno u ovom istraživanju nije pokazalo antimikrobnu aktivnost protiv navedenih mikroorganizama. Najverovatniji uzrok ovih razlika u antimikrobnoj aktivnosti izolovanih etarskih ulja je razlika u njihovom kvalitativnom i kvantitativnom sastavu koja potiče od različitosti biljne vrste, geografskog područja i eksperimentalnih uslova pri kojima je vršena izolacija etarskog ulja.

Rezultati antimikrobne aktivnosti etarskog ulja pokazuju da pupoljci breze mogu biti upotrebljeni kao izvor prirodnih antimikrobnih jedinjenja, kao sigurnija alternativa sintetskim antimikrobnim lekovima.

Germakren D pokazuje antibakterijsku, antioksidativnu i citotoksičnu aktivnost na ćelijama najčešćih humanih tumora. Takođe, prekursor je različitih seskviterpenskih

jedinjenja (kadineni i selineni) (Kasim i sar., 2014; Noge i Becerra, 2009; Palazzo i sar., 2009; Rather i sar., 2012). Biološka uloga germakrena D još uvek nije razjašnjena, ali se pretpostavlja da odbija herbivore, ima ulogu insekticida protiv komaraca i repelenta protiv vaši i krpelja (Eslahi i sar., 2017).

δ-Kadinen identifikovan je kao najzastupljenije jedinjenje izolovanog etarskog ulja iz *Kadsura longipedunculata* (čini 21,8% ukupnog etarskog ulja). Pokazuje antibakterijsku aktivnost protiv Gram-pozitivnih koka *Streptococcus agalactiae* i *Streptococcus pyogenes* (Mulyaninglish i sar., 2010). δ-Kadinen takođe pokazuje antiinflamatornu i antiproliferativnu aktivnost (Glisić i sar., 2007; Hui i sar., 2015). α-Kopaen ispoljava antibakterijsku aktivnost protiv nekih Gram-pozitivnih (*Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*) (Maggi i sar., 2010) i Gram-negativnih bakterija. Takođe, pokazuje dozno-zavisan citotoksičan efekat, bez genotoksičnih i mutagenih efekata (Martins i sar., 2015; Türkez i sar., 2014). (E)-Kariofilen pokazuje citotoksičan efekat protiv najčešćih humanih tumora (Palazzo i sar., 2009). Antibakterijska aktivnost etarskog ulja izolovanog iz *Teucrium divaricatum* Sieb. ssp. *villosum* (Celak.) Rech. Fil. (Lamiaceae) protiv Gram-pozitivnih bakterija *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus faecalis* pripisuje se visokom sadržaju (30,1%) (E)-kariofilena (Formisano i sar., 2010). α-Kadinol i α-murolol su seskviterpensi alkoholi koji imaju antiparazitarnu aktivnost na najčešće podvrste dermatofagoida (kućne grinje) (Chang i sar., 2001). α-Kadinol takođe pokazuje antimikrobnu i jaku antifungalnu aktivnost (Chang i sar., 2001; Ho i sar., 2012).

Antimikrobna aktivnost etarskog ulja pupoljaka breze izolovanog u ovom istraživanju je najverovatnije posledica sinergističkog dejstva seskviterpenskih jedinjenja, pre svega najprisutnijih, germakrena D i δ-kadineni.

U tabeli 17 prikazani su rezultati antimikrobne aktivnosti etarskog ulja lista breze.

Tabela 17. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja lista breze

Mikroorganizam	Prečnik zone inhibicije (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	12±0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14,33±0,58
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11,67±0,58
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19166	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16,67±0,58
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	11,0±0
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	20,67±0,58

Etarsko ulje izolovano iz lista breze je pokazalo antimikrobnu aktivnost protiv Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*), Gram-pozitivnih bakterija (*Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* i *Bacillus cereus*) i gljivice *Candida albicans*, sa zonama inhibicije prikazanim u tabeli 17. Najveću aktivnost ispoljava protiv gljivice *Candida albicans* sa prečnikom zone inhibicije 20,67 mm, dok najmanju aktivnost ispoljava protiv bakterije *Klebsiella pneumoniae* sa prečnikom zone inhibicije 11 mm (tabela 17). Antimikrobna aktivnost može biti direktna posledica prisustva najzastupljenijih jedinjenja (linalol i geranil acetone), s obzirom da se nekim etarskim uljima antibakterijska i antifungalna aktivnost pripisuje upravo zbog visokog sadržaja ovih jedinjenja (Al-Zharani i sar., 2021; Amakran i sar., 2024; Beatović i sar., 2013; Jelačić i sar., 2011; Mazzanti i sar., 1998; Muller i sar., 2024; Stobiecka, 2015).

Dobijeni rezultati pokazuju da etarsko ulje iz lista breze ima širi spektar antimikrobne aktivnosti u poređenju sa etarskim uljem iz pupoljaka, gde je dokazana antimikrobna aktivnost protiv *Bacillus luteus*, *Proteus vulgaris* i *Klebsiella pneumoniae*. Etarsko ulje iz pupoljaka breze sadrži najvećim delom seskviterpenske ugljovodonike (78,7%) i oksigenovane seskviterpene (14,8%), dok etarsko ulje iz lista breze osim ovih grupa jedinjenja, koja su ukupno prisutna sa oko 45%, u svom sastavu ima i monoterpenska jedinjenja, diterpene, masne kiseline, aldehide, fenilpropanoide, *n*-alkane. Razlika u antimikrobnoj aktivnosti između ova dva etarska ulja može biti posledica njihovog različitog kvalitativnog i kvantitativnog sastava.

Literaturni podaci o antimikrobnoj aktivnosti etarskog ulja iz lista breze su oskudni, i do sada nije ispitivana antimikrobna aktivnost protiv sojeva mikroorganizama koji su upotrebljeni u ovoj disertaciji. Utvrđeno je da postoji izvesna antifungalna aktivnost protiv biljnih patogena koji nisu obuhvaćeni ovim istraživanjem: *Cephalosporium aphidicola*, *Drechslera sorokiniana*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia cerealis*, dok je protiv *Aspergillus quadrilieneatus*, *Aspergillus flavus*, *Gibberella fujikuroi*, *Trichoderma harzianum* i *Trichothecium roseum* utvrđena slaba aktivnost ili izostanak aktivnosti (Can Başer i Demirci, 2007). Druge vrste breza imaju određenu antifungalnu aktivnost (*Betula alba*, *Betula nigra*, *Betula lenta*, *Betula papyrifera*, *Betula platyphyllia* var. *japonica*) (Can Başer i Demirci, 2007). Etarsko ulje iz lista rečne breze (*Betula nigra*) je pokazalo antimikrobnu aktivnost na iste mikroorganizme koji su upotrebljeni i u ovoj disertaciji (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*) (Woods i sar., 2013).

Rezultati antimikrobne aktivnosti etarskog ulja pokazuju da list breze u budućnosti može biti upotrebljen kao izvor prirodnih antimikrobnih jedinjenja, kao sigurnija alternativa sintetskim antimikrobnim lekovima.

4.4.1.2. Mikrobiološka ispitivanja ekstrakata

Antimikrobna aktivnost soka i ekstrakata lista i kore breze ispitana je protiv Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, Gram-negativnih bakterija: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* i *Escherichia coli*, i gljivice *Candida albicans*. Ekstrakti kore i lista breze pokazali su antimikrobnu aktivnost protiv svih testiranih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, i protiv gljivice *Candida albicans*. Sok breze nije pokazao antimikrobnu aktivnost protiv testiranih mikroorganizama. Rezultati su prikazani u tabeli 18.

Tabela 18. Antimikrobna aktivnost ekstrakata kore i lista breze i soka breze protiv odabranih mikrobnih sojeva i odgovarajućih antibiotika

Testirani uzorci		Ekstrakt kore breze	Ekstrakt lista breze	Sok breze	DMSO	Antibiotik
Sojevi mikroorganizma	Izvor	MIC/MBC (mg/cm ³)	MIC/MBC (mg/cm ³)	MIC/MBC (mg/cm ³)	MIC/MBC (%)	MIC/MBC (µg/cm ³)
Gram-pozitivne bakterije	ATCC					<i>Hloramfenikol</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	8,75/8,75	12,50/6,25	/	12,50/12,50	7,81/15,61
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	17,50/8,75	12,50/12,50	/	12,50/12,50	3,91/7,81
<i>Bacillus cereus</i>	11778	17,50/17,5	25,00/50,00	/	12,50/12,50	7,81/15,61
Gram-negativne bakterije	ATCC					<i>Streptomycin</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	0,47/0,47	1,25/1,25	/	12,50/12,50	0,60/0,60
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076	0,03/0,06	0,31/1,25	/	12,50/12,50	0,30/0,30
<i>Escherichia coli</i>	8739	0,23/0,47	0,63/1,25	/	12,50/12,50	0,16/0,16
Gljivice	ATCC	MIC/MFC (mg/ cm ³)	MIC/MFC (mg/ cm ³)	MIC/MFC (mg/ cm ³)	MIC/MFC (%)	MIC/MFC (µg/cm ³)
<i>Candida albicans</i>	24433	0,94/1,88	0,63/1,25	/	12,50/12,50	3,91/7,81

DMSO – dimetil sulfoksid; MIC- minimalna inhibitorna koncentracija; MBC – minimalna baktericidna koncentracija

Dobijeni rezultati (tabela 18) pokazuju da su Gram-negativne bakterije osetljivije na antimikrobno dejstvo ekstrakata lista i kore breze. Među testiranim bakterijskim sojevima, najveću osetljivost ima *Salmonella enteritidis*, sa MIC vrednostima 0,03 mg/cm³ i 0,31 mg/cm³ za ekstrakt kore i lista breze, redom. Antimikrobna dejstva ekstrakata kore i lista breze su slabija u odnosu na upotrebljene komercijalne antibiotike.

Emrich i saradnici (2022) su istraživali antimikrobnu aktivnost vodenog ekstrakta kore breze mikrodilucionom metodom protiv nekih sojeva bakterija značajnih u dermatologiji, i utvrdili snažnu aktivnost protiv *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* i MRSA (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*), dok je *Escherichia coli* bila rezistentna (Emrich i sar., 2022). Neki literaturni podaci ukazuju na antimikrobnu aktivnost ekstrakta kore breze protiv *Mycobacterium tuberculosis*, u *in vitro* i *in vivo* uslovima, što može biti od velikog značaja pri lečenju tuberkuloze (Demikhova i sar., 2006). Durić i saradnici (2013) su utvrdili da metanolni ekstrakt spoljašnje kore breze pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv *Pseudomonas aeruginosa*, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. Sa druge strane, za razliku od dobijenih rezultata u ovom istraživanju (tabela 18), ovi autori nisu utvrdili antimikrobnu aktivnost protiv *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Različita antimikrobna aktivnost ekstrakata breze verovatno je posledica različitosti biljnog materijala, izabranog ekstragensa i drugačijih uslova ekstrakcije (Durić i sar., 2013). Još jedno istraživanje daje podatke o antimikrobnoj aktivnosti metanolnog ekstrakta kore breze protiv *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* i *Cutibacterium acnes*. Vodeni ekstrakt kore breze pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* i *Cutibacterium acnes* (Schuster i sar., 2020). Chapurin i saradnici (2022) su utvrdili da je etanolni ekstrakt unutrašnje kore breze obećavajući antimikrobni agens protiv velikog broja klinički izolovanih uropatogenih bakterija, rezistentnih na najčešće komercijalne antibiotike. Potvrdili su antimikrobnu aktivnost protiv *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* i *Escherichia coli*, bakterija na koje je ekstrakt kore breze i u ovom istraživanju pokazao antimikrobnu aktivnost. Buduća istraživanja bi mogla biti fokusirana na unutrašnju koru breze i ekstrakciju drugim rastvaračima (Chapurin i sar., 2022).

Šarić i saradnici (2009) u svojoj studiji navode jaču antimikrobnu aktivnost etanolnog ekstrakta lista breze na *Bacillus cereus*, sa vrednošću MIC 10 mg/cm³, dok je kod sledećih bakterija: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* vrednost MIC bila 50 mg/cm³, što znači da je antimikrobna aktivnost slabija u odnosu na rezultate dobijene u ovoj disertaciji. MBC je u rasponu od 25 mg/cm³ (*Bacillus cereus*) do 50 mg/cm³ (ostale

bakterije) (Šarić i sar., 2009). Još neki literaturni podaci ukazuju na aktivnost ekstrakata lista breze protiv *Staphylococcus aureus* (Rauha i sar., 2000), što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u tabeli 18. Metanolni i vodeni ekstrakt lista breze pokazuju antimikrobnu aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (Durić i sar. 2013).

U dostupnoj literaturi nema podataka o antimikrobnom dejstvu soka breze. Istraživanje Klingera i saradnika (1989) pokazalo je da sok breze nema antimikrobnu aktivnost protiv *Staphylococcus* vrsta (Klinger i sar., 1989), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. Ljubojević i saradnici (2016) nisu utvrdili antimikrobnu aktivnost svežeg i pasterizovanog soka breze protiv testiranih mikroorganizama (Ljubojević i sar., 2016).

Antimikrobna aktivnost biljnih proizvoda je od suštinske važnosti u različitim oblastima (farmaceutska industrija, alternativna medicina, tradicionalna medicina, prehrambena industrija). Naročito je bitno prevazilaženje rezistencije sve većeg broja mikroorganizama na veliki broj komercijalnih antibiotika. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju da antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata lista i kore breze treba da bude dalje istražena zato što postoji realna osnova za njihovu upotrebu u prevenciji i lečenju infekcija izazvanih različitim mikroorganizmima.

4.4.1.3. Antimikrobna aktivnost inkluzionih kompleksa

Antimikrobna aktivnost standarda BE i BK, i njihovih inkluzionih kompleksa sa HP- β -CD testirana je na Gram-pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, Gram-negativne bakterije: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, i gljivicu *Candida albicans*. Rezultati istraživanja su prikazani u tabeli 19.

Tabela 19. Antimikrobna aktivnost BE, BK i inkluzionih kompleksa BE i BK sa HP- β -CD protiv odabranih mikrobnih sojeva i odgovarajućih antibiotika

Testirani uzorci		BE	BK	BE:HP- β -CD	BK:HP- β -CD	DMSO	Antibiotik
Sojevi mikroorganizama	Izvor	MIC/MBC (mg/cm ³)	MIC/MBC (mg/cm ³)	MIC/MBC (mg/cm ³)	MIC/MBC (mg/cm ³)	MIC/MBC (%)	MIC/MBC (μg/cm ³)
Gram-pozitivne bakterije	ATCC						<i>Hloramfenikol</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	/	/	/	/	12,50/12,50	7,81/15,61
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	/	/	/	/	12,50/12,50	3,91/7,81
<i>Bacillus cereus</i>	11778	/	/	/	/	12,50/12,50	7,81/15,61
Gram-negativne bakterije	ATCC						<i>Streptomycin</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	/	/	/	/	12,50/12,50	0,60/0,60
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076	/	/	/	/	12,50/12,50	0,30/0,30
<i>Escherichia coli</i>	8739	/	/	/	/	12,50/12,50	0,16/0,16
Gljivice	ATCC	MIC/MFC (mg/cm ³)	MIC/MFC (mg/cm ³)	MIC/MFC (mg/cm ³)	MIC/MFC (mg/cm ³)	MIC/MFC (%)	MIC/MFC (μg/mL)
<i>Candida albicans</i>	24433	/	0,44/0,88	/	0,31/0,31	12,50/12,50	3,91/7,81

DMSO – dimetil sulfoksid; MIC- minimalna inhibitorna koncentracija; MBC – minimalna baktericidna koncentracija

Analizirani uzorci nisu pokazali antimikrobnu aktivnost protiv testiranih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, dok su BK i inkluzioni kompleks BK:HP- β -CD pokazali određenu antimikrobnu aktivnost protiv gljivice *Candida albicans*, s tim što BK u kompleksu ispoljava jaču aktivnost. Naime, MIC/MFC za BK iznosi 0,44/0,88 mg/cm³, dok za kompleks BK:HP- β -CD iznosi 0,31/0,31 mg/cm³.

Literaturni podaci o antimikrobnom dejstvu BE su oprečni. Postoje podaci o umerenom antimikrobnom dejstvu na sledeće mikroorganizme: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* sa MIC vrednostima 62,5-1024 μg/cm³ (Kwaji i sar., 2018; Oloyede i sar., 2017). Takođe, još jedno istraživanje daje podatke o antimikrobnom dejstvu BE i postojanju zona inhibicije na sledeće bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* (Virginia i sar., 2024). Ove informacije nisu u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, s obzirom na to da standard BE nije pokazao antibakterijsku aktivnost na testirane sojeve mikroorganizama. Sa druge strane, grupa autora (Durić i sar., 2013) koja je izolovala triterpene iz različitih delova breze i određivala njihovu antimikrobnu aktivnost došla je do rezultata da triterpeni nisu pokazali antimikrobnu aktivnost protiv *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. Ovi podaci su u skladu sa rezultatima prikazanim u tabeli 19 za iste

bakterijske sojeve (Durić i sar., 2013). BE ima izvesno antifungalno dejstvo protiv više vrsta gljivica (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*), pri čemu je dejstvo na *Candida albicans* slabije u odnosu na standardni lek flukonazol (Virginia i sar., 2024).

Pretragom dostupne literature, dobija se potvrda antimikrobnog dejstva BK. BK ima antibakterijski efekat na Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* i Gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. Na većinu ispitivanih bakterijskih sojeva BK deluje inhibicijom DNK giraze i beta-laktamaze, enzima važnih za patogenost i održavanje funkcija bakterija. Antifungalno dejstvo BK ostvaruje protiv gljivičnih enzima CYP51 i dihidrofolat reduktaze (Rodrigues i sar., 2023). Još jedna grupa autora (Biliksu i sar., 2024) utvrdila je antibakterijsko dejstvo BK na *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (sa MIC vrednostima 0,025 i 0,056 mg/cm³, redom) koje je uporedivo sa standardnim antibiotikom neomicinom (MIC 0,072 mg/cm³) (Biliksu i sar., 2024). BK ometa funkciju ćelijske membrane gljivice *Candida albicans*, pri čemu menja njenu fluidnost i na taj način postiže antifungalni efekat. Za razliku od BK, dejstvo BE na ćelijski zid *Candida albicans* je reverzibilnog karaktera, pa je pretpostavka da je za aktivnost zaslužna karboksilna grupa, prisutna u BK ali ne i u BE (Hamion i sar., 2024). Još neka istraživanja govore o antifungalnom dejstvu BK na gljivicu *Candida albicans*, ali i druge sojeve iz roda *Candida*, što ukazuje na širi antifungalni spektar BK (Shai i sar., 2008; Rodrigues i sar., 2023).

Sa druge strane, neki literaturni podaci ne daju potvrdu o antimikrobnoj aktivnosti BK na testirane mikroorganizme (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* i *Pseudomonas aeruginosa*) (Fontanay i sar., 2008), što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u tabeli 19.

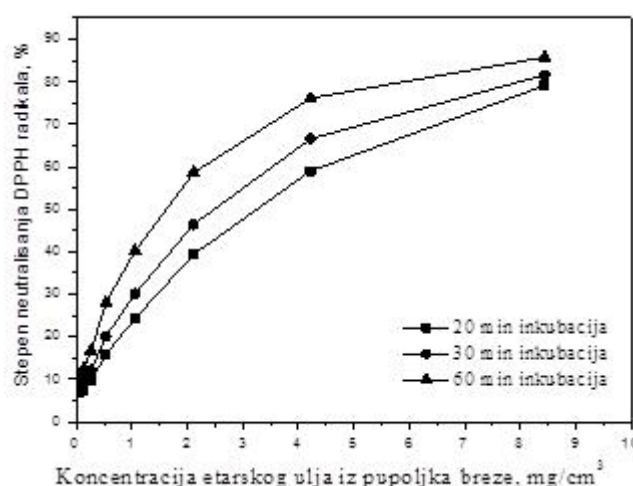
4.4.2. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost etarskih ulja pupoljaka i lista breze, ekstrakata lista i kore breze, soka breze, BE, BK i inkluzionih kompleksa BE i BK sa HP-β-CD određena je primenom DPPH metode (odeljak 3.1.7.2.).

4.4.2.1. Antioksidativna aktivnost etarskih ulja

Koncentracija etarskog ulja pupoljaka breze potrebna za neutralizaciju 50% početne koncentracije DPPH radikala (EC_{50} vrednost) je $3,31 \text{ mg/cm}^3$ nakon 20 minuta inkubacije; $2,67 \text{ mg/cm}^3$ nakon 30 minuta inkubacije i $1,70 \text{ mg/cm}^3$ nakon 60 minuta inkubacije sa radikalom (slika 34). Sintetički antioksidans butil hidroksi toluen (BHT) pokazao je EC_{50} vrednost $0,021 \text{ mg/cm}^3$ nakon 20 minuta inkubacije sa DPPH radikalom (Stanojević i sar., 2015).

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala zavisi od primenjene koncentracije etarskog ulja, kao i od vremena inkubacije, i raste sa porastom koncentracije etarskog ulja i vremenom inkubacije sa DPPH radikalom. Etarsko ulje pupoljaka breze je pokazalo najbolju antioksidativnu aktivnost (sa stepenom neutralizacije DPPH radikala 85%) nakon 60 minuta inkubacije.



Slika 34. Antioksidativna aktivnost etarskog ulja pupoljaka breze

Većina aktuelno korišćenih antioksidanasa su sintetičkog porekla i postoje dokazi o njihovim toksičnim efektima na zdravlje ljudi. Interes za prirodne antioksidanse raste poslednjih decenija, a posebno za antioksidativna jedinjenja biljnog porekla. Antioksidansi iz biljnih izvora su sigurnija alternativa sintetičkim antioksidansima (Miguel, 2010). Izolovano etarsko ulje pokazalo je značajnu antioksidativnu aktivnost u DPPH testu hvatanja slobodnih radikala, i može biti sigurnija alternativa sintetičkim antioksidativnim agensima.

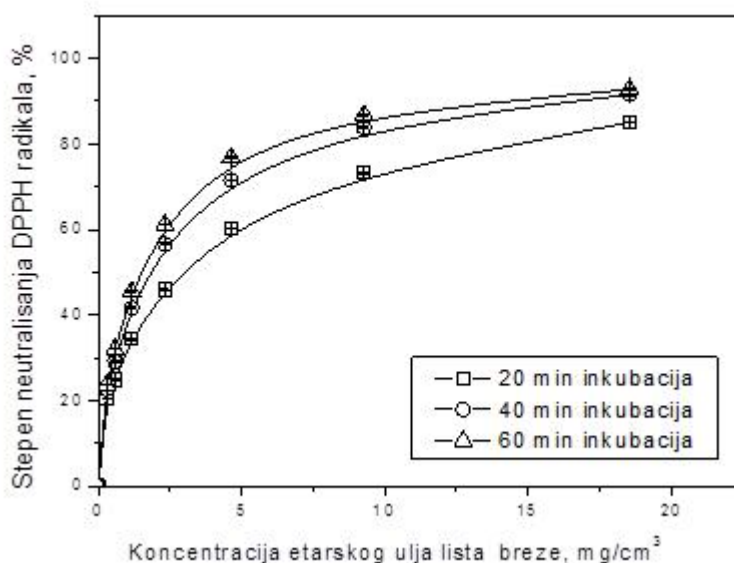
Prethodna istraživanja su utvrdila antioksidativnu aktivnost etarskog ulja iz pupoljaka dve različite vrste breze *Betula pubescens ssp. pubescens* i *Betula pubescens ssp. czerepanovii* merenjem njihove sposobnosti hvatanja DPPH radikala (Can Başer i Demirci,

2007). Test je izvršen na uzorcima u koncentracijama od $0,5 \text{ mg/cm}^3$ i $1,0 \text{ mg/cm}^3$, ali aktivnost uklanjanja slobodnih radikala nije bila utvrđena.

Mashentseva i saradnici (2011) su DPPH testom utvrdili da etanolni ekstrakt pupoljaka breze ispoljava antioksidativnu aktivnost koja se može porediti sa antioksidativnom aktivnošću standarda vitamina E. EC_{50} vrednost ($0,51 \text{ mg/cm}^3$) (Mashentseva i sar., 2011) je niža u poređenju sa vrednostima koje su dobijene u ovom istraživanju. Procesom ekstrakcije dobija se izolat različitog hemijskog sastava u odnosu na etarsko ulje, odnosno ekstrakt, pa je i njegova antioksidativna aktivnost jača.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da etarsko ulje pupoljaka breze može predstavljati pristupačan izvor prirodnih antioksidanasa za upotrebu u farmaciji, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji.

Na slici 35 prikazane su zavisnosti stepena neutralizacije DPPH radikala od koncentracije etarskog ulja lista breze nakon 20 minuta, 40 minuta i 60 minuta inkubacije.



Slika 35. Antioksidativna aktivnost etarskog ulja lista breze

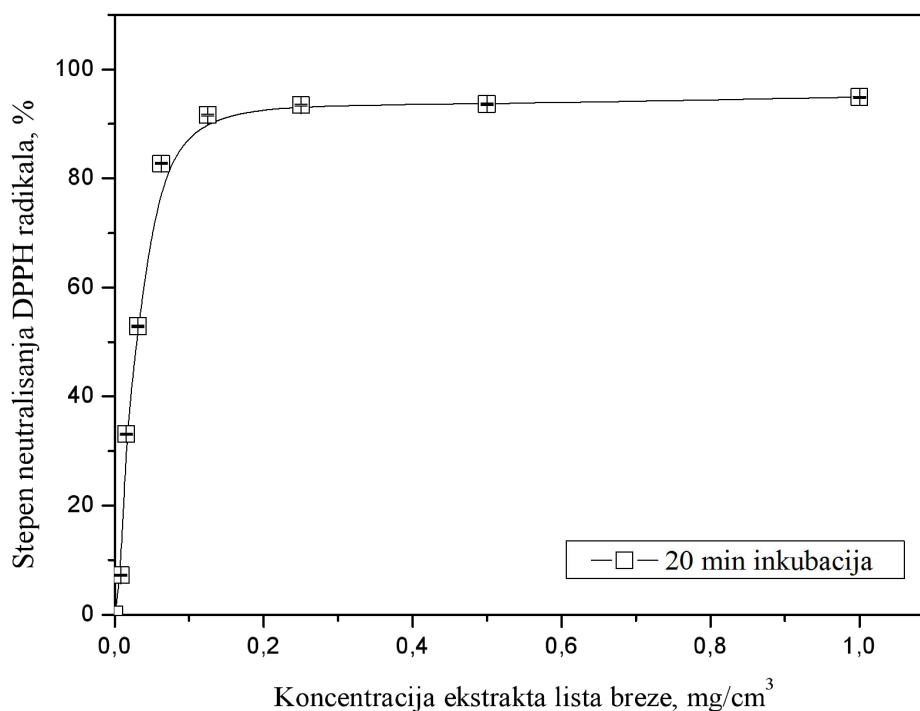
Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti etarskog ulja lista breze (slika 35) ukazali su na sposobnost neutralizacije DPPH radikala. EC_{50} vrednosti, koje predstavljaju koncentraciju etarskog ulja potrebnu za neutralizaciju 50% početne koncentracije DPPH radikala, su $3,13 \text{ mg/cm}^3$ nakon 20 minuta, $1,91 \text{ mg/cm}^3$ nakon 40 minuta, i $1,41 \text{ mg/cm}^3$ nakon 60 minuta inkubacije.

Ovi rezultati ukazuju na antioksidativnu aktivnost, koja se povećava sa vremenom inkubacije. Prema podacima prethodnog istraživanja Vladimirov i saradnika (2019b), EC_{50} vrednosti etarskog ulja pupoljaka breze su iznosile 3,31 mg/cm³ nakon 20 minuta, 2,67 mg/cm³ nakon 30 minuta i 1,70 mg/cm³ nakon 60 minuta inkubacije. Poređenjem dobijenih vrednosti sa antioksidativnom aktivnošću etarskog ulja iz pupoljaka breze, u našem prethodnom istraživanju, uočava se da su EC_{50} vrednosti etarskog ulja lista breze nešto niže, što ukazuje na jaču antioksidativnu aktivnost etarskog ulja lista breze (Vladimirov i sar., 2019b).

Ovi podaci potvrđuju da etarsko ulje lista breze poseduje značajan antioksidativni potencijal, čime se otvara mogućnost njegove primene kao prirodnog antioksidansa, sigurnije alternative sintetskim antioksidansima.

4.4.2.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata i soka breze (*Betula pendula*)

Na slici 36 prikazani su rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakta lista breze nakon 20 minuta inkubacije dobijeni DPPH testom.



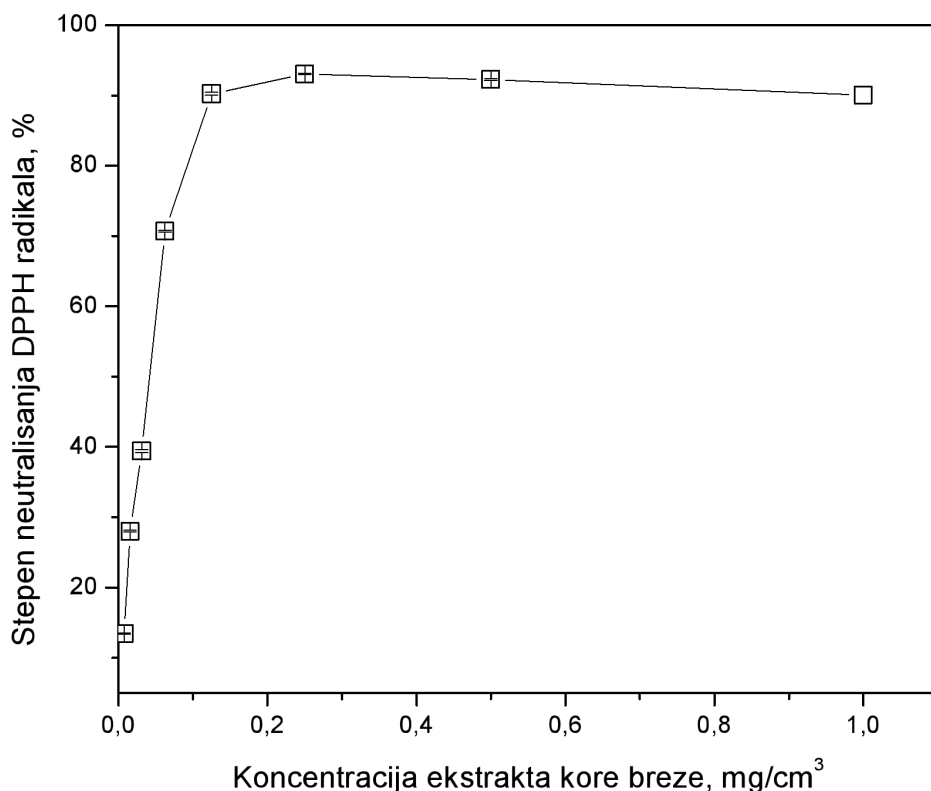
Slika 36. Antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta lista breze

Kapacitet neutralizacije DPPH radikala ekstrakta lista breze povećava se sa povećanjem primenjene koncentracije rastvora (slika 36). Primenom rastvora koncentracije 0,00781 mg/cm³ kapacitet neutralisanih DPPH radikala iznosi 7,27%, dok se sa povećanjem koncentracije rastvora na 0,01563 mg/cm³ neutrališe 33,09% DPPH radikala. Primenom rastvora koncentracije 0,03125 mg/cm³ kapacitet neutralisanja DPPH radikala iznosi 52,91%. Primenom najveće korišćene koncentracije (1 mg/cm³) kapacitet neutralisanja DPPH radikala iznosi 94,91%, što predstavlja maksimalnu ispitivanu vrednost kapaciteta neutralizacije DPPH radikala. Vrednost EC₅₀ ekstrakta lista breze iznosi 0,030 mg/cm³.

Pretpostavka je da antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta lista breze potiče od prisutnih fenolnih jedinjenja, pre svega flavonoida, i da je u korelaciji sa ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja (Azman i sar., 2017; Christova-Bagdassrian i sar., 2014; Keinänen i Julkunen-Tiito, 1997; Kucharski i sar., 2025; Raal i sar., 2015). U literaturi su dostupni različiti podaci o antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata lista breze. Kucharski i saradnici (2025) izveštavaju o značajnoj antioksidativnoj aktivnosti etanolnog ekstrakta lista breze, postignutoj primenom DPPH i FRAP (test redukcione moći antioksidanasa – eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) testa (Kucharski i sar., 2025). Dokazana je veoma jaka antioksidativna aktivnost suvog ekstrakta lista breze, gde pri koncentraciji 0,08 mg/cm³, ekstrakt lista neutrališe 98% DPPH radikala (Penkov i sar., 2018). Vrednost EC₅₀ metanolnog ekstrakta lista breze je 0,4651 mg/cm³ (Costea i sar., 2016) i veća je od vrednosti dobijene u ovom istraživanju, što pokazuje da je ekstrakt u ovoj disertaciji pokazao bolju antioksidativnu aktivnost. Germanó i saradnici (2012) proučavali su etanolni ekstrakt lista breze i DPPH testom dobili vrednost EC₅₀ od 0,137 mg/cm³ (Germanó i sar., 2012), što znači da uzorak upotrebljen u njihovom istraživanju ima slabije antioksidativno dejstvo u odnosu na uzorak korišćen u ovom istraživanju.

Pretpostavka je da na antioksidativnu aktivnost, osim biljnog materijala, načina čuvanja i skladištenja, dosta utiče vrsta izabranog ekstragensa, postupak ekstrakcije i test određivanja antioksidativne aktivnosti. Zato ne postoji uniformnost literaturnih podataka o antioksidativnoj aktivnosti (Azman i sar., 2017). Zbog relativno jakog antioksidativnog potencijala koji poseduje, list breze može biti upotrebljen kao potencijalni prirodni antioksidans. Može biti izvor za izradu preparata korisnih u prevenciji različitih stanja povezanih sa oksidativnim stresom.

Na slici 37 prikazani su rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakta kore breze nakon 20 minuta inkubacije dobijeni DPPH testom.



Slika 37. Antioksidativna aktivnost ekstrakta kore breze nakon 20 minuta inkubacije

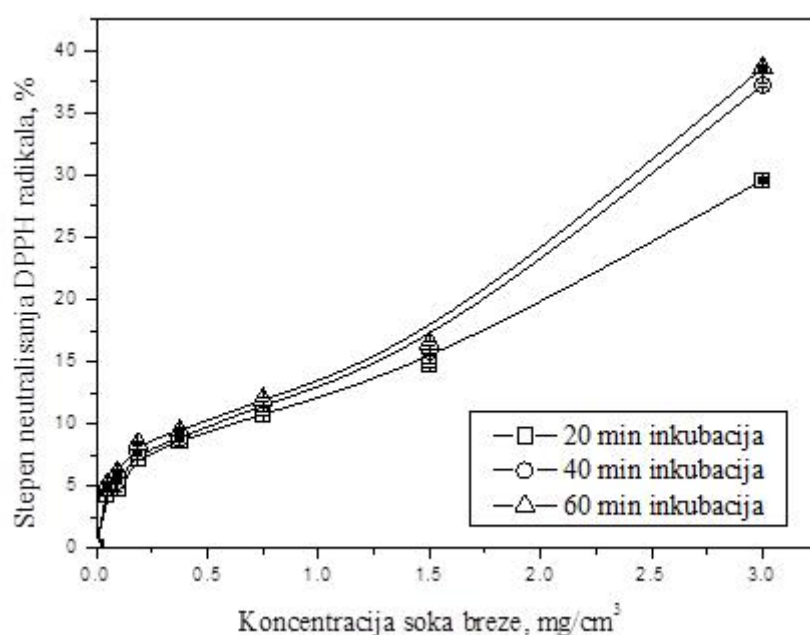
Antioksidativna aktivnost ekstrakta kore breze određena je u opsegu koncentracija od 0,007803-1 mg/cm³. Kapacitet neutralisanja DPPH radikala ekstrakta kore breze povećava se sa povećanjem primenjene koncentracije ekstrakta (slika 37). Primenom rastvora koncentracije 0,03125 mg/cm³ kapacitet neutralisanih DPPH radikala iznosi 39,38%, dok se sa povećanjem koncentracije rastvora na 0,0625 mg/cm³ neutrališe 70,67 % DPPH radikala. Primenom rastvora koncentracije 0,25 mg/cm³ kapacitet neutralisanih DPPH radikala iznosi 93,05%, što ujedno predstavlja maksimalnu postignutu vrednost kapaciteta neutralizacije DPPH radikala. Vrednost EC₅₀ ekstrakta kore breze iznosi 0,040772 mg/cm³.

Literaturni podaci potvrđuju antioksidativnu aktivnost kore breze (Co i sar., 2009; Mashentseva i sar., 2011; Nakurte i sar., 2017; Ostapiuk i sar., 2021; Tálos-Nebehaj i sar., 2019). U istraživanju Nakurte i saradnika (2017) i Mashentseve i saradnika (2011), prilikom određivanja antioksidativne aktivnosti etanolnih ekstrakata kore breze DPPH testom, dobijene EC₅₀ vrednosti su 0,03928 mg/cm³ i 0,041 mg/cm³, redom, i uporedive su sa

vrednošću dobijenom u ovom istraživanju (Mashentseva i sar., 2011; Nakurte i sar., 2017). Metanolni ekstrakt kore breze pokazao je bolju antioksidativnu aktivnost ($EC_{50} = 0,0128 \text{ mg/cm}^3$) (Tálos-Nebehaj i sar., 2019) u odnosu na uzorak korišćen u ovom istraživanju.

Antioksidativna aktivnost umnogome zavisi od izbora rastvarača za ekstrakciju. Po pravilu, polarnijim rastvačima se postiže veća antioksidativna aktivnost ekstrakta pri izboru iste metode, zbog većeg sadržaja polarnih jedinjenja (fenoli, flavonoidi) u ekstraktu. Vodeni i metanolni ekstrakt kore breze ($0,1 \text{ mg/cm}^3$) postižu skoro 100% inhibicije DPPH radikala, za razliku od heksanskog ekstrakta, gde je procenat inhibicije DPPH radikala manji od 4%. Smanjenjem polarnosti upotrebljenog rastvarača, opada i antioksidativna aktivnost ekstrakata (Calliste i sar., 2001). Generalno, etanol je prihvaćen kao odgovarajući rastvarač za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz kore breze. Ekstrakcija je brza, efikasna, ekološki prihvatljiva i dobijeni ekstrakti poseduju antioksidativnu aktivnost (Co i sar., 2009).

Na slici 38 prikazani su rezultati antioksidativne aktivnosti soka breze nakon 20 minuta, 40 minuta i 60 minuta inkubacije. Antioksidativna aktivnost soka breze određena je u opsegu koncentracija od $0,0469\text{--}3 \text{ mg/cm}^3$. Kapacitet neutralisanja DPPH radikala soka breze povećava se sa povećanjem primenjene koncentracije soka breze (slika 38). Antioksidativna aktivnost soka breze pri analiziranim koncentracijama je slaba, a EC_{50} vrednost nije postignuta ni pri koncentraciji soka od 3 mg/cm^3 nakon 60 minuta inkubacije.

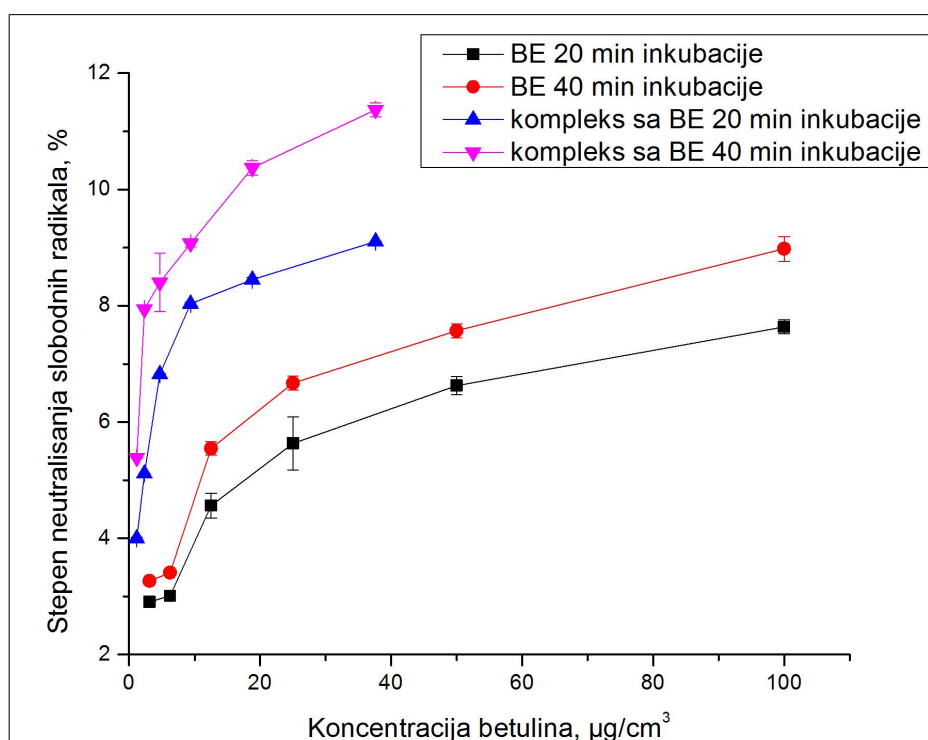


Slika 38. Antioksidativna aktivnost soka breze

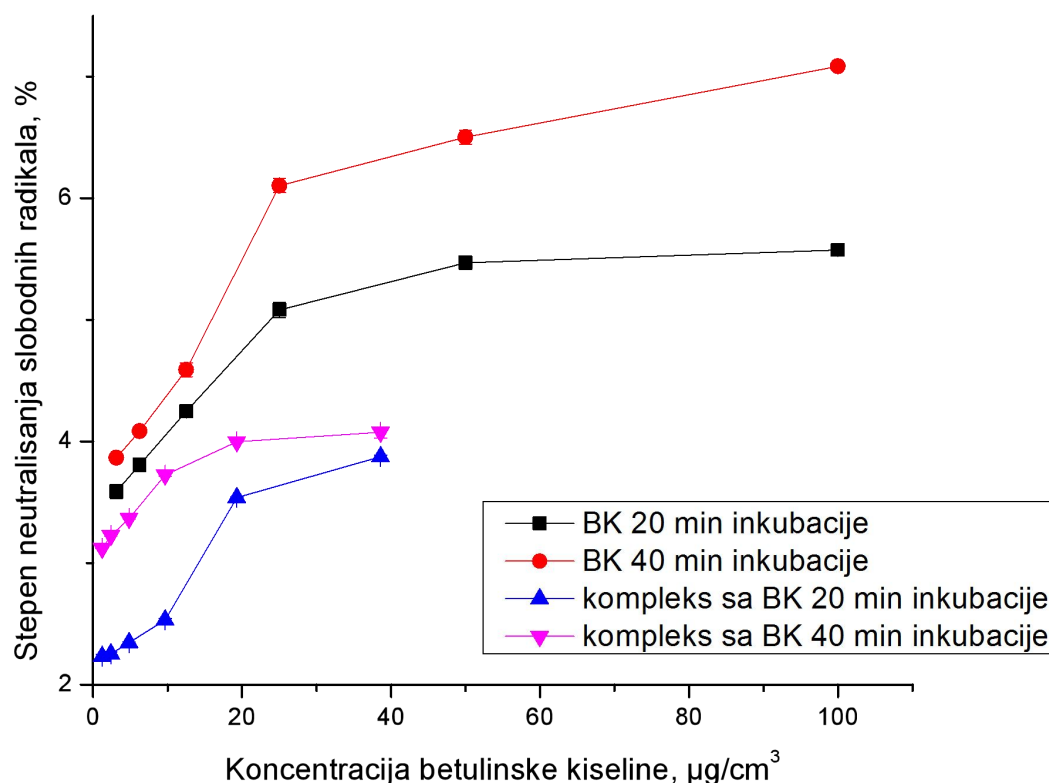
Dostupna literatura daje ograničene podatke o antioksidativnoj aktivnosti soka breze. U publikacijama koje potvrđuju antioksidativnu aktivnost soka breze je primenjena drugačija metodologija od one korišćene u ovom istraživanju (Bilek i sar., 2017; Grabek-Lejko i sar., 2017; Kûka i sar., 2013; Norocel i Paduret, 2020; Kûka i sar., 2013) su u svom istraživanju određivali antioksidativnu aktivnost DPPH testom i rezultate predstavili kao ekvivalente kvercetina (Qe). Dobijena vrednost od 0,35 mg/cm³ Qe potvrđuje antioksidativnu aktivnost i sadržaj flavonoida u soku breze (Kûka i sar., 2013).

4.4.2.3. Antioksidativna aktivnost inkluzionih kompleksa betulina i betulinske kiseline

Određivanje antioksidativne aktivnosti je izvršeno da bi se procenio uticaj kompleksacije sa HP- β -CD na aktivnost BE i BK. Antioksidativna aktivnost BE i BK je određena u opsegu koncentracija od 3,125-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Antioksidativna aktivnost izrađenih inkluzionih kompleksa, postupkom opisanim u odeljku 3.1.5., određena je u opsegu koncentracija kompleksa od 7,8125-250 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, što odgovara opsegu koncentracija BE i BK u kompleksima od 1,18-37,625 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti BE i inkluzionog kompleksa BE:HP- β -CD, odnosno BK i inkluzionog kompleksa BK:HP- β -CD primenom DPPH testa prikazani su na slikama 39 i 40, redom.



Slika 39. Antioksidativna aktivnost BE i inkluzionog kompleksa BE:HP- β -CD



Slika 40. Antioksidativna aktivnost BK i inkluzionog kompleksa BK:HP- β -CD

BE i BK su neutralisali 2,89-7,70% i 3,55-5,55% slobodnih DPPH radikala, redom, pri koncentracijama od 3,125-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ nakon 20 minuta inkubacije. Nakon 40 minuta inkubacije stepen neutralisanja slobodnih DPPH radikala pri istim koncentracijama je 3,27-8,76% za BE i 3,89-7,08% za BK.

Formiranje inkluzionog kompleksa BE:HP- β -CD povećava antioksidativnu aktivnost BE, pa tako BE u inkluzionom kompleksu pri manjim koncentracijama (1,18-37,625 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) neutrališe više slobodnih DPPH radikala 4,04-9,11% nakon 20 minuta inkubacije, odnosno 5,31-11,44% nakon 40 minuta inkubacije. Ovo je u skladu sa rezultatima Zhang i saradnika (2024), koji su pokazali da elektrospinozana nanovlakna sa inkluzionim kompleksom BE:metil- β -CD pokazuju bolji kapacitet hvatanja DPPH slobodnih radikala od samog BE, nakon jednočasovne inkubacije (Zhang i sar., 2024).

Sa druge strane, pri istim analiziranim koncentracijama, BK neutrališe 3,55-5,55% slobodnih DPPH radikala nakon 20 minuta inkubacije, odnosno 3,89-7,08% nakon 40 minuta inkubacije. BK u inkluzionom kompleksu (1,18-37,625 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) neutrališe svega 2,24-3,87% slobodnih DPPH radikala nakon 20 minuta inkubacije, odnosno 3,16-4,02% nakon 40 minuta inkubacije, što znači da se njen kapacitet neutralisanja slobodnih DPPH radikala smanjuje

nakon inkorporacije u inkluzione komplekse. Razlog ovome može biti jača interakcija funkcionalnih grupa BK koje su od značaja za ispoljavanje antioksidativne aktivnosti sa hidroksilnim grupama HP- β -CD u inkluzionom kompleksu, zbog čega se BK teže oslobađa iz kompleksa. U dostupnoj literaturi nema podataka o antioksidativnoj aktivnosti inkluzionih kompleksa BK sa ciklodekstrinima, dok su podaci o smanjenju *in vitro* antioksidativne aktivnosti aktivnih supstanci nakon inkorporacije u inkluzione komplekse oskudni (Wang i sar., 2019; Yuan i sar., 2013). Yuan i saradnici (2013) su primetili da pri većim ispitivanim koncentracijama čist astaksantin pokazuje veći kapacitet neutralisanja DPPH radikala od njegovog inkluzionog kompleksa sa HP- β -CD, verovatno zbog otežanog oslobađanja astaksantina iz kompleksa pri većim koncentracijama ciklodekstrina u rastvoru (Yuan i sar., 2013).

Kapacitet neutralizacije DPPH radikala BE, BK i njihovih inkluzionih kompleksa povećava se sa produženjem vremena inkubacije i sa povećanjem primenjene koncentracije. Pri primenjenom opsegu koncentracija nakon 20 minuta i 40 minuta inkubacije ne dostižu se vrednosti EC₅₀, što govori da BE i BK u datim koncentracijama, u čistom stanju, ali i u formiranim inkluzionim kompleksima, imaju slabu antioksidativnu aktivnost. Većina jakih biljnih antioksidanasa poseduje fenolne grupe u svojoj strukturi. Fenolna jedinjenja lako mogu donirati svoje elektrone reaktivnim slobodnim radikalima, i pritom ostati stabilni zbog mogućnosti elektronske rezonancije (Adesanwo i sar., 2013). Struktura BE i BK koji su u osnovi triterpeni sastavljeni od 5 izoprenskih jedinica se znatno razlikuje od fenolnih jedinjenja, i to je moguće objašnjenje njihove slabe antioksidativne aktivnosti.

Literaturni podaci o antioksidativnoj aktivnosti BE i BK su oprečni. Zhang i saradnici (2019) proučavali su moguću upotrebu BE kao konzervansa u prehrambenoj industriji (Zhang i sar., 2019). Antioksidativna aktivnost određena je pomoću DPPH i ABTS testa, pri čemu su korišćene značajno veće koncentracije BE (0,05-0,35 mg/cm³). Kod DPPH testa je 100% neutralizacije slobodnih radikala postignuto pri koncentraciji 0,25 mg/cm³ BE, dok je EC₅₀ vrednost BE iznosila 0,081 mg/cm³. Sa druge strane, jedno istraživanje daje podatke o neutralizaciji svega 8,5% slobodnog DPPH radikala pri koncentracijama BE od 2 mg/cm³ nakon 30 minuta inkubacije (Bai i sar., 2012). Günther i saradnici (2021) određivali su antioksidativnu aktivnost BE i njegovih sintetskih derivata DPPH i ABTS metodama. Pri korišćenim koncentracijama (0,1 mg/cm³), BE nije pokazao antioksidativnu aktivnost primenom ABTS testa, dok je stepen neutralizacije DPPH radikala nakon 10 minuta inkubacije iznosio svega 2,81% (Günther i sar., 2021).

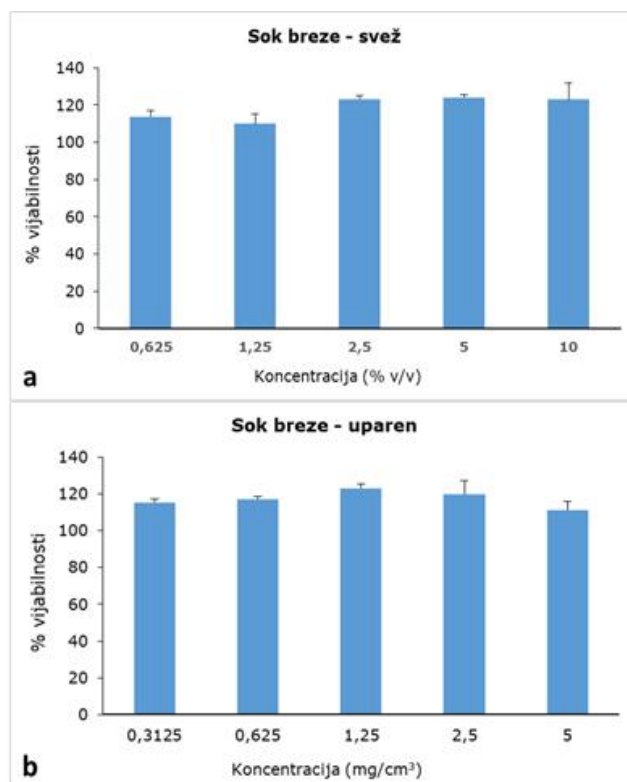
Adesanwo i saradnici (2013) navode da BK izolovana i prečišćena iz biljnih izvora neutrališe 50% slobodnog DPPH radikala pri koncentraciji 0,141 mg/cm³ nakon 30 minuta inkubacije. Takođe je primećeno da kombinacija BK i askorbinske kiseline ima niže EC₅₀ vrednosti (0,023 mg/cm³), odnosno jaču antioksidativnu moć u odnosu na samu askorbinsku kiselinu (0,037 mg/cm³), što ukazuje na sinergizam ova dva jedinjenja u hvatanju slobodnih radikala (Adesanwo i sar., 2013). BK izolovana iz vrste *Grewia optiva* daje još niže EC₅₀ vrednosti neutralizacije DPPH radikala (0,090 mg/cm³) nakon 15 minuta inkubacije (Bari i sar., 2019). Sa druge strane, u istraživanjima Sousa i saradnika (2021) i Wang i saradnika (2023) BK nije pokazala antioksidativnu aktivnost ni pri maksimalnim korišćenim koncentracijama od 0,35 mg/cm³ i 0,09 mg/cm³, redom (Sousa i sar., 2021; Wang i sar., 2023).

4.4.3. Efekat na vijabilnost i proliferaciju ćelija

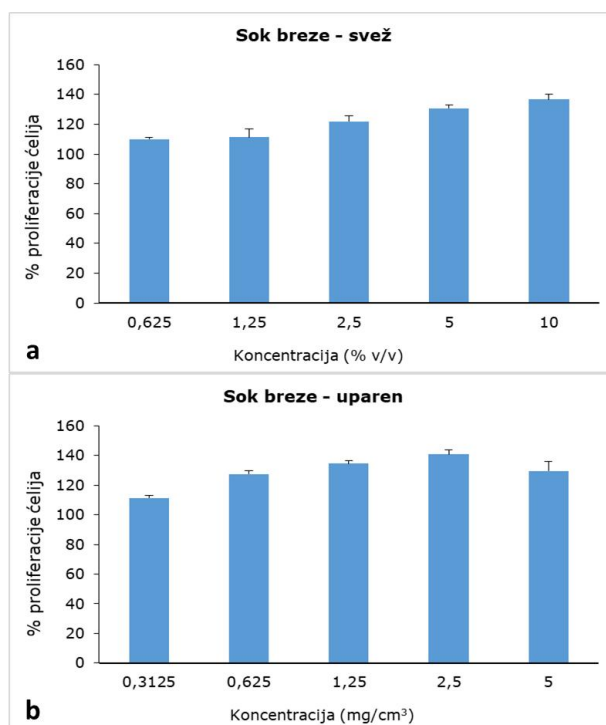
Rezultati ispitivanja efekata soka breze, svežeg i uparenog, na vijabilnost i proliferaciju MDCK ćelija u kulturi, prikazani su na slikama 41 i 42.

I svež (slika 41a) i uparen sok breze (slika 41b) su blago povećali vijabilnost ćelija u svim ispitivanim koncentracijama (uparen sok breze: od 0,3125 do 5 mg/cm³; svež sok breze: od 0,625 do 10%), pri čemu je povećanje vijabilnosti bilo statistički značajno u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$).

Stimulacija stepena proliferacije ćelija uočena je u eseju proliferacije i u slučaju svežeg soka breze (slika 42a) i u slučaju uparenog soka breze (slika 42b), u svim ispitivanim koncentracijama (uparen sok breze: od 0,3125 do 5 mg/cm³; svež sok breze: od 0,625 do 10%), pri čemu je povećanje stepena proliferacije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$).



Slika 41. Efekat svežeg (a) i uparenog (b) soka breze na vijabilnost MDCK ćelija

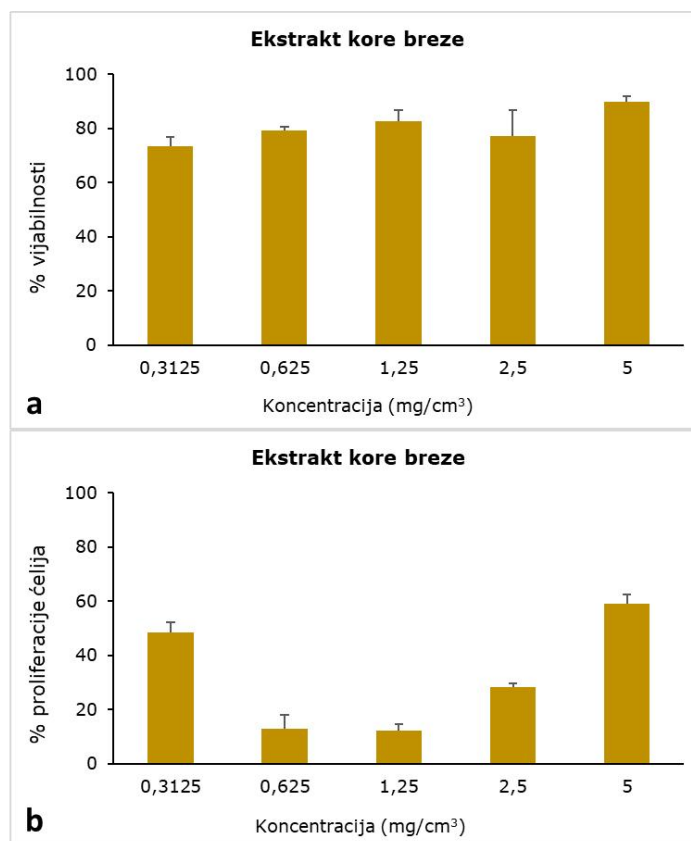


Slika 42. Efekat svežeg (a) i uparenog (b) soka breze na proliferaciju MDCK ćelija

Stimulacija vijabilnosti i proliferacije koju smo dobili, uočena je i u drugim studijama. Kada je 5% sok breze ispitivan na kulturi keratinocita, pokazano je da ne ispoljava citotoksični efekat (Softa i sar., 2019). Pokazano je i da sok breze stimuliše vijabilnost i proliferaciju dermalnih fibroblasta i keratinocita nakon 24 h i 48 h inkubacije, u koncentracijama od 6,25% do 50%, sa izraženijim stimulatornim efektom na najvišim koncentracijama (Boroduškis i sar., 2017). Pojava da sa povećanjem koncentracije raste i stimulatorni efekat soka breze, uočena je i u našoj studiji. Sok breze sadrži puno bioaktivnih i mineralnih supstanci (Grabek-Lejko i sar., 2017) koje deluju povoljno na funkcionisanje ćelija, pa se njegov stimulatorni efekat na vijabilnost i proliferaciju ćelija može pripisati upravo sastavu bogatom ovim supstancama.

Rezultati ispitivanja efekta suvog ekstrakta kore breze na vijabilnost i proliferaciju MDCK ćelija u kulturi, prikazani su na slici 43. Ekstrakt kore breze je u svim ispitivanim koncentracijama (od 0,3125 do 5 mg/cm³) delovao blago citotoksično (slika 43a). Procenat vijabilnosti ćelija ostaje relativno visok i kreće se u intervalu od približno 75% do 90%, bez jasnog trenda opadanja sa porastom koncentracije, što sugerise odsustvo toksičnosti pri ispitivanim koncentracijama. Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji (5 mg/cm³) uočava se čak i blagi porast vijabilnosti, koji može biti posledica stimulatornog efekta ekstrakta kore breze na metabolizam ćelija. Ukupno posmatrano, visoka vijabilnost ćelija u celom opsegu koncentracija sugerise da ekstrakt nema značajan citotoksični efekat na MDCK ćelije, što ukazuje na njegovu relativnu bezbednost prema nekancerskim ćelijskim linijama.

Izražen anti-proliferativni efekat ekstrakta kore breze primećen je u svim ispitivanim koncentracijama (od 0,3125 do 5 mg/cm³) (slika 43b). U poređenju sa vijabilnošću, rezultati proliferacije ćelija pokazuju varijabilniji odgovor. Pri nižim i srednjim koncentracijama (0,625 i 1,25 mg/cm³) dolazi do značajnog smanjenja proliferativne aktivnosti ćelija, dok se pri višim koncentracijama (2,5 i 5 mg/cm³) beleži oporavak, odnosno porast proliferacije. Ovakav nelinearan odgovor može ukazivati na kompleksno dejstvo komponenti ekstrakta, koje pri različitim koncentracijama mogu imati različite biološke efekte. Pretpostavka je da je to direktna je posledica prisustva velikog broja jedinjenja u ekstraktu kore breze.



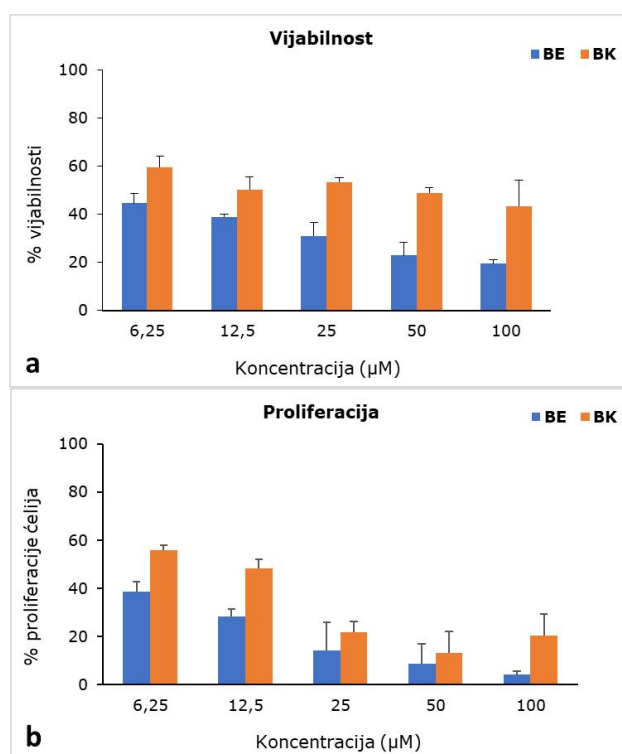
Slika 43. Efekat ekstrakta kore breze na vijabilnost (a) i proliferaciju (b) MDCK ćelija

Izražen anti-proliferativni efekat ekstrakta kore breze koji smo dobili, u skladu je sa literaturnim podacima o anti-proliferativnom efektu kore breze, iako je u našem radu korišćena nekancerska ćelijska linija. Pokazano je da ekstrakt kore breze deluje anti-proliferativno, značajno inhibirajući rast tumorskih ćelija različitih ćelijskih linija (Dragićević i sar., 2022; Dehelean i sar., 2012). Anti-proliferativni i anti-kancerski efekat kore breze uglavnom se pripisuje betulinu, kao najzastupljenijoj bioaktivnoj supstanci u kori breze (Tuli i sar., 2021), ali i betulinskoj kiselini koja je takođe prisutna u visokom procentu u ekstraktima kore breze (Drag i sar., 2009). Postoje podaci i da katran iz kore breze indukuje apoptozu ćelija i deluje genotoksično (Baumgartner i sar., 2012). Ekstrakt kore breze je u literaturi opisan kao izrazito bogat betulinom, i uglavnom se efekti kore breze pripisuju ovoj supstanci.

Rezultati ispitivanja efekta betulina (BE) i betulinske kiseline (BK) na vijabilnost i proliferaciju MDCK ćelija prikazani su na slici 44. Obe supstance su delovale citotoksično (slika 44a) i anti-proliferativno (slika 44b) u ispitivanim koncentracijama (od 6,25 do 100 μ M), pri čemu je efekat betulina bio izraženiji i u eseju vijabilnosti i u eseju proliferacije, u svim ispitivanim koncentracijama. U oba slučaja uočen je koncentracijski-zavisani efekat.

U eseju vijabilnosti ćelija (slika 44a), oba jedinjenja izazivaju progresivno smanjenje procenta vijabilnih ćelija sa porastom koncentracije. Uočava se značajna razlika u intenzitetu delovanja-betulin pokazuje izraženiji citotoksični efekat u odnosu na betulinsku kiselinu pri svim ispitivanim koncentracijama. Već pri najnižoj koncentraciji (6,25 μM), vijabilnost ćelija tretiranih betulinom iznosi oko 45%, dok je u slučaju betulinske kiseline oko 60%. Sa povećanjem koncentracije na 100 μM , vijabilnost opada na približno 20% za betulin, odnosno oko 40–45% za betulinsku kiselinu, što potvrđuje veću toksičnost betulina prema ispitivanoj ćelijskoj liniji.

Sličan trend uočen je i kod proliferacije ćelija (slika 44b). Oba jedinjenja dovode do smanjenja proliferativne aktivnosti na koncentracijski zavisani način, pri čemu je inhibicija izraženija u odnosu na efekat na vijabilnost. Betulin pokazuje snažniji antiproliferativni efekat, sa padom proliferacije na ispod 10% pri višim koncentracijama (50 i 100 μM), dok betulinska kiselina ispoljava blaži efekat, pri čemu proliferacija ostaje na nivou od približno 20% pri najvišoj koncentraciji.



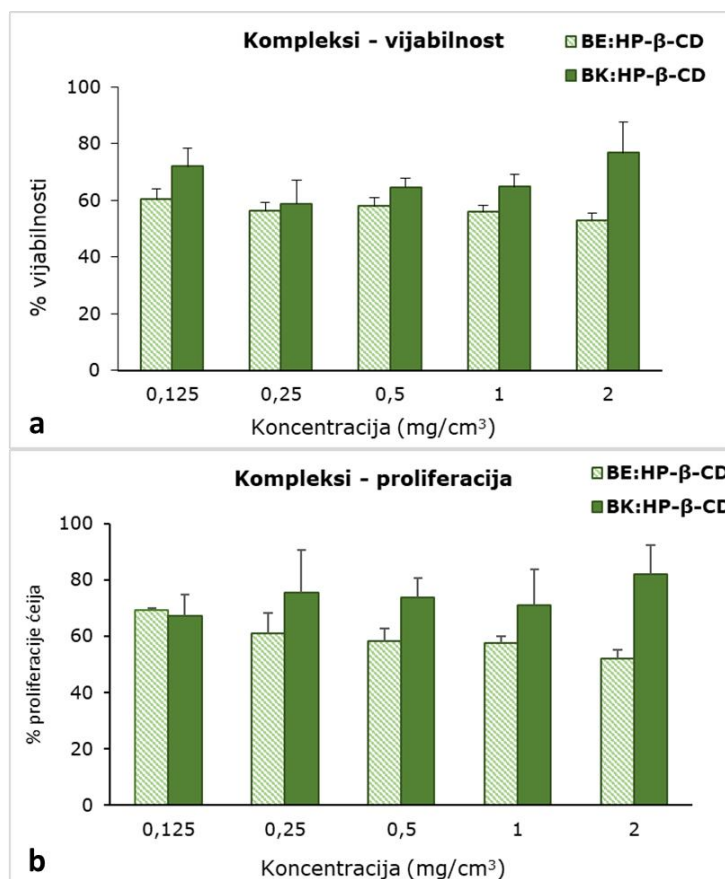
Slika 44. Efekat betulina (BE) i betulinske kiseline (BK) na vijabilnost (a) i proliferaciju (b) ćelija u kulturi

U literaturi je opisan citotoksični i anti-proliferativni efekat betulina i betulinske kiseline na različitim kancerskim ćelijama (Hordyjewska i sar., 2019; Drag i sar., 2009; Kozubek i sar., 2022), ali i anti-tumorski efekat na *in vivo* modelima (Hordyjewska i sar., 2018). Pokazano je da betulinska kiselina indukuje značajno povećanje koncentracije jona kalcijuma u MDCK ćelijama što dovodi do smrti ćelija koje su tretirane nižim koncentracijama od onih koje su korišćene u našoj studiji (Chou i sar., 2000), pa se efekat koji smo dobili može objasniti navedenim mehanizmom, budući da su MDCK ćelije nekancerske ćelije.

Prema literaturnim podacima, betulinska kiselina često pokazuje izraženiju selektivnost prema tumorskim ćelijama uz manju toksičnost prema normalnim ćelijama, dok betulin može ispoljiti varijabilan biološki efekat u zavisnosti od tipa ćelija i eksperimentalnih uslova (Drag i sar., 2009; Pisha i sar., 1995). U našem istraživanju, međutim, betulin pokazuje veći stepen citotoksičnosti, što može biti posledica specifične osetljivosti ispitivane ćelijske linije ili razlika u uslovima eksperimenta.

Direktno kvantitativno poređenje bioloških efekata ekstrakta kore breze i standarda BE i BK nije moguće zbog razlike u načinu izražavanja koncentracija. Ukoliko se pristupi kvalitativnom poređenju, mogu se primetiti značajne razlike u biološkom odgovoru. Dok čiste komponente ispoljavaju izražen citotoksični i antiproliferativni efekat na MDCK ćelijsku liniju, ekstrakt pokazuje znatno blaže delovanje, bez značajnog smanjenja vijabilnosti ćelija. Ovakva razlika može se objasniti kompleksnim sastavom ekstrakta, gde prisustvo drugih komponenti može modulirati biološku aktivnost dominantnih triterpenskih jedinjenja, bilo kroz antagonističke ili zaštitne efekte. Rezultati sugerišu značaj međusobnih interakcija komponenti u ekstraktu kore breze i potrebu za njihovim daljim ispitivanjem.

Rezultati ispitivanja efekta inkluzionih kompleksa HP- β -CD sa BE (BE:HP- β -CD) i BK (BK:HP- β -CD) na vijabilnost i proliferaciju MDCK ćelija prikazani su na slici 45.



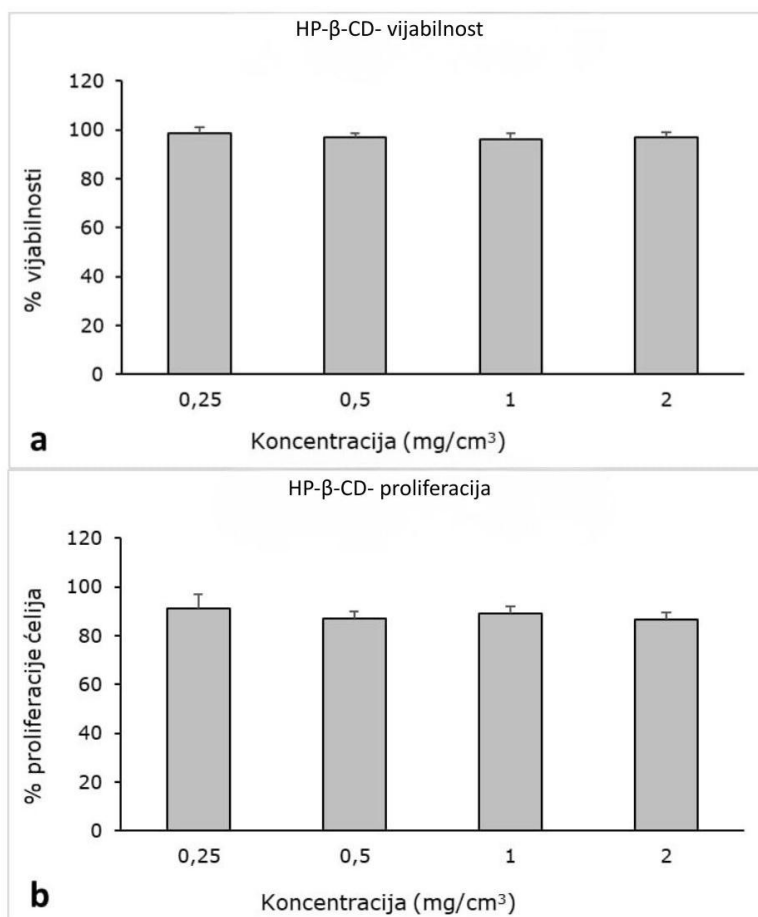
Slika 45. Efekat inkluzionih kompleksa BE:HP-β-CD i BK:HP-β-CD na vijabilnost (a) i proliferaciju (b) ćelija u kulturi

Oba inkluzionna kompleksa (i sa BE i sa BK) pokazala su blagu citotoksičnost (slika 45a) i anti-proliferativni efekat (slika 45b), sa jače izraženim efektom BE:HP-β-CD kompleksa, što je u skladu sa trendom koji je uočen pri ispitivanju čistih supstanci BE i BK i što ukazuje na to da su BE i BK zadržali svoj efekat i nakon inkorporacije u inkluzione komplekse sa HP-β-CD. Citotoksični i anti-proliferativni efekat koji je uočen u slučaju BE:HP-β-CD i BK:HP-β-CD, potiče od samih BE i BK, budući da sam HP-β-CD ne deluje citotoksično i anti-proliferativno u ispitivanim koncentracijama, što je prikazano na slici 46.

Trenutno ne postoje literaturni podaci koji navode citotoksičnost i antirpoliferativni efekat kompleksa BE i BK sa HP-β-CD, pa će rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije dati prve podatke o tome. Zbog toga direktno poređenje rezultata sa literaturnim podacima nije moguće.

U literaturi je pokazano da inkluzioni kompleksi betulina i betulinske kiseline sa derivatima γ-ciklodextrina dovode do značajnog smanjenja vijabilnosti i proliferacije tumorskih ćelija u *in vitro* i *in vivo* modelima, u poređenju sa čistim supstancama, što se

pripisuje njihovoj poboljšanoj rastvorljivosti i bioraspoloživosti (Dehelean i sar., 2011; Šoica i sar., 2012; Soica i sar., 2014). Na osnovu toga, može se pretpostaviti da i kompleksiranje sa HP- β -CD donekle modifikuje biološku aktivnost BE i BK, pri čemu očekivani efekti zavise od stabilnosti i karakteristika formiranog inkluzionog kompleksa.



Slika 46. Efekat HP- β -CD na vijabilnost (a) i proliferaciju (b) ćelija u kulturi

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije sprovedeno je sistematsko ispitivanje hemijskog sastava, bioloških aktivnosti i mogućnosti poboljšanja svojstava bioaktivnih jedinjenja izolovanih iz različitih biljnih delova breze (*Betula pendula* Roth.), uključujući list, koru, pupoljke i sok breze.

Bioaktivna jedinjenja iz lista i kore breze ekstrahovana su pomoću 96% etanola, na Soxhlet aparaturi. Ekstrakcija lista breze je izvršena pri solvomodu (odnos biljni materijal/rastvarač) 1:15, m/V, tokom 4 h. Ekstrakcija kore breze je izvršena pri solvomodu 1:10, m/V, tokom 5 h. Zatim su osušeni ekstrakti podvrgnuti procesu digestije sa etil-acetatom i dietil-etrom, nakon čega je usledila karakterizacija hemijskog sastava GC-MS metodom. Sok sakupljen iz stabla breze je takođe podvrgnut procesu ekstrakcije sa etil-acetatom i dietil-etrom i okarakterisan GC-MS metodom.

Ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja iz lista i kore breze 96% etanolom pokazala se kao efikasna metoda za dobijanje ekstrakata sa značajnim prinosom, posebno u slučaju kore breze (prinos 42,67%). GC-MS analizom ekstrakata kore breze potvrđeno je prisustvo pentacikličnih triterpena lupeola i betulina, pri čemu se etil-acetat pokazao znatno efikasnijim rastvaračem za izdvajanje betulina u poređenju sa dietil-etrom. Nasuprot tome, u ekstraktu lista breze nisu identifikovani navedeni triterpeni, već su dominantna jedinjenja bila metil-estri nezasićenih masnih kiselina. Ekstrakti soka breze nisu sadržali pentaciklične triterpene niti druga identifikovana organska jedinjenja pri primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Biološka ispitivanja pokazala su da ekstrakti lista i kore breze ispoljavaju izraženu antimikrobnu aktivnost protiv svih testiranih Gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*) i Gram-negativnih (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* i *Escherichia coli*) bakterija, kao i protiv gljivice *Candida albicans*, dok sok breze nije pokazao antimikrobno dejstvo. Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje značajnog antimikrobnog potencijala ekstrakata lista i kore breze i opravdavaju njihovo dalje istraživanje u cilju moguće primene u prevenciji i tretmanu infektivnih oboljenja.

Antioksidativna aktivnost ekstrakata lista i kore breze, procenjena DPPH metodom, pokazala je da ekstrakt lista breze poseduje nešto jači antioksidativni potencijal ($EC_{50}=0,030$

mg/cm³) u poređenju sa ekstraktom kore breze (EC₅₀=0,040 mg/cm³), dok sok breze nije ispoljio značajnu antioksidativnu aktivnost. Ovi rezultati ukazuju da list i kora breze predstavljaju vredan prirodni izvor antioksidanasa, sa potencijalnom primenom u prevenciji stanja povezanih sa oksidativnim stresom.

ICP-OES analizom mineralnog sastava soka breze utvrđeno je prisustvo značajnih količina makroelemenata, pre svega kalijuma (58,79 µg/cm³) i kalcijuma (47,21 µg/cm³), dok su mikroelementi prisutni u manjim koncentracijama, prema opadajućim vrednostima mangan, silicijum, bakar, cink, gvožđe. Ovi rezultati ukazuju da sok breze predstavlja značajan prirodni izvor mineralnih materija.

Određivanjem sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u listu, kori i soku breze Folin-Ciocalteu metodom, potvrđeno je da je list breze naročito bogat fenolnim jedinjenjima (112,01 mg GKE/g s.e.) i flavonoidima (91,02 mg RE/g s.e.), čime se dodatno ističe njegov biološki potencijal.

Izolacija etarskih ulja iz pupoljaka i lista breze je izvršena hidrodestilacijom po Clevenger-u, tokom 4h, pri hidromodulu 1:5 m/V (odnos biljni materijal/voda) za pupoljke, odnosno tokom 2h, pri hidromodulu 1:10 m/V za list breze. Karakterizacija je vršena GC-MS i GC-FID metodama. Etarska ulja izolovana iz pupoljaka i lista breze pokazala su značajne razlike u prinosu, hemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti. Najzastupljenije grupe jedinjenja etarskog ulja pupoljaka breze pripadaju seskviterpenskim ugljovodonicima (78,7%) i oksigenovanim seskviterpenima (14,8%), dok su u etarskom ulju lista breze dominantni oksigenovani seskviterpeni (30%), oksigenovani monoterpenoidi (22,6%), seskviterpenski ugljovodonici (14,6%) i *n*-alkani (11,5%). Etarsko ulje lista breze ispoljilo je širi spektar antimikrobne aktivnosti u odnosu na etarsko ulje pupoljaka, uključujući delovanje na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, kao i na gljivicu *Candida albicans*. Takođe, etarsko ulje lista breze je pokazalo nešto izraženiju antioksidativnu aktivnost, što se može dovesti u vezu sa njegovim složenijim hemijskim sastavom. Dobijeni rezultati sugerišu da etarska ulja iz pupoljaka i lista breze predstavljaju pristupačan izvor prirodnih antioksidanasa, i mogu biti sigurnija alternativa sintetičkim antioksidansima.

U cilju poboljšanja rastvorljivosti i potencijalne bioraspoloživosti betulina i betulinske kiseline, izrađeni su inkluzioni kompleksi sa hidroksipropil-β-ciklodekstrinom. Rezultati FTIR, XRD, DSC i SEM analiza potvrdili su uspešno kompleksiranje obe supstance.

Formiranje inkluzionih kompleksa dovelo je do povećanja rastvorljivosti betulina 1,35 puta, u vodenim medijumima, dok je efikasnost solubilizacije betulinske kiseline bila 1,23 puta. Iako čista jedinjenja i njihovi inkluzioni kompleksi nisu pokazali antimikrobnu aktivnost protiv testiranih bakterija, betulinska kiselina i njen inkluzioni kompleks ispoljili su određenu aktivnost protiv gljivice *Candida albicans*, a aktivnost inkluzionog kompleksa je veća u odnosu na čistu betulinsku kiselinu. Čiste supstance i njihovi inkluzioni kompleksi ne poseduju značajnu antioksidativnu aktivnost. Inkluzioni kompleks betulina pokazao je izraženiju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa čistim jedinjenjem, što se može pripisati povećanoj rastvorljivosti, dok je kod betulinske kiseline uočen suprotan efekat, verovatno usled jačih interakcija sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom i otežanog oslobađanja iz kompleksa. Na osnovu rezultata se može zaključiti da antioksidativna aktivnost ekstrakta kore breze ne potiče od prisustva pentacikličnih triterpena, već je posledica delovanja drugih bioaktivnih jedinjenja prisutnih u ekstraktu.

In vitro ispitivanje vijabilnosti i stepena proliferacije uzoraka je određeno primenom MTT testa na MDCK ćelijskoj liniji. Sok breze, i svež i uparen, delovali su blago, ali značajno stimulatorno na vijabilnost i proliferaciju MDCK ćelija, pri čemu je uočen koncentracijski-zavisani efekat. Uzrok stimulatornom efektu na ćelije je najverovatnije relativno visok sadržaj mineralnih materija u soku breze.

Ekstrakt kore breze je delovao blago citotoksično na MDCK ćelije dok je pokazao statistički značajan, umereno do izrazito anti-proliferativni efekat, u različitim ispitivanim koncentracijama.

I betulin i betulinska kiselina su delovali citotoksično i anti-proliferativno na MDCK ćelije u kulturi, sa izraženijim efektom betulina u odnosu na betulinsku kiselinu, pri čemu je uočen koncentracijski-zavisani efekat.

Inkluzioni kompleksi sa betulinom (BE:HP- β -CD) i betulinskom kiselinom (BK:HP- β -CD) su delovali blago do umereno citotoksično i anti-proliferativno, ali statistički značajno, sa izraženijim efektom kompleksa sa betulinom u odnosu na kompleks sa betulinskom kiselinom, što prati trend delovanja čistih supstanci i ukazuje na uspešnu inkorporaciju ovih supstanci u inkluzione komplekse. I u slučaju inkluzionih kompleksa uočen je koncentracijski-zavisani efekat. HP- β -CD kao kompleksirajući agens, bez betulina i betulinske kiseline, koji je uzet kao kontrola nosača, nije ispoljio značajne efekte na vijabilnost i proliferaciju MDCK ćelija.

Sveukupno, rezultati doktorske disertacije potvrđuju da breza predstavlja značajan izvor različitih bioaktivnih jedinjenja sa izraženim antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima. Dobijeni podaci pružaju naučnu osnovu za dalja istraživanja usmerena na optimizaciju ekstrakcionih postupaka, ispitivanje mehanizama delovanja i procenu bezbednosti, kao i na potencijalnu primenu ekstrakata, etarskih ulja i formulacija na bazi ciklodekstrina u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji.

6. LITERATURA

Abdallah, E.M.; Alhatlani, B.Y.; de Paula Menezes, R.; Martins, C.H.G. Back to Nature: Medicinal Plants as Promising Sources for Antibacterial Drugs in the Post-Antibiotic Era, *Plants* 2023, 12, 3077.

Adesanwo, J.K.; Makinde, O.O.; Obafemi, C.A. Phytochemical analysis and antioxidant activity of methanol extract and betulinic acid isolated from the roots of *Tetracera potatoria*. *Journal of Pharmacy Research* 2013, 6(9), 903–907.

Aelenei, P.; Rimbu, C.M.; Guguianu, E.; Dimitriu, G.; Aprotosoae, A.C.; Brebu, M.; Horhoge, C.E.; Miron, A. Coriander essential oil and linalool-interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 2019, 68(2), 156-164.

Aiken, C.; Chen, C.H. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends in Molecular Medicine* 2005, 11(1), 31-36.

Aksoy, L.; Kolay, E.; Ağlönü, Y.; Aslan, Z.; Kargioğlu, M. Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2013, 20(3), 235-239.

Alakurtti, S.; Mäkelä, T.; Koskimies, S.; Yli-Kauhaluoma, J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006, 29(1), 1-13.

Alhazmi, H.F.S. Extraction of phytochemicals betulin and betulinic acid from the chaga mushroom and their effect on MCF-7 cells. Master's Thesis, Lakehead University, Ontario, Canada, 2017.

Al-Zharani, M.; Al-Eissa, M.S.; Rudayni, H.A.; Ali, D.; Alarifi, S.; Surendrakumar, R.; Idhayadhulla, A. Larvicidal activity of geranylacetone derivatives against *Culex quinquefasciatus* larvae and investigation of environmental toxicity and non-target aquatic species. *Agronomy* 2021, 11(11), 2342.

Amakran, A.; Hamoudane, M.; Pagniez, F.; Lamarti, A.; Picot, C.; Figueredo, G.; Nhiri, M.; Le Pape, P. Chemical composition, antifungal, antioxidant, and hemolytic activities of Moroccan *Thymus capitatus* essential oil. *Chemistry & Biodiversity* 2024, 21(9), e202300563.

Atkinson, M.D. *Betula pendula* Roth. (*B. verrucosa* Ehrh.) and *B. pubescens* Ehrh. *Journal of Ecology* 1992, 80(4), 837-870.

Azman, N.A.M.; Skowrya, M.; Muhammad, K.; Gallego, M.G.; Almajano, M.P. Evaluation of the antioxidant activity of *Betula pendula* leaves extract and its effects on model foods. *Pharmaceutical Biology* 2017, 55(1), 912–919.

Bai, Y.H.; Feng, Y.Q.; Mao, D.B.; Xu, C.P. Optimization for betulin production from mycelial culture of *Inonotus obliquus* by orthogonal design and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2012, 43(5), 663–669.

Bari, W.A.; Zahoor, M.; Zeb, A.; Khan, I.; Nazir, Y.; Khan, A.; Rehman, N.U.; Ullah, R.; Shahat, A.A.; Mahmood, H.M. Anticholinesterase, antioxidant potentials, and molecular

docking studies of isolated bioactive compounds from *Grewia optiva*. International Journal of Food Properties 2019, 22(1), 1386-1396.

Baumgartner, A.; Sampol-Lopez, M.; Cemeli, E.; Schmid, T.E.; Evans, A.A.; Donahue, R.E.; Anderson, D. Genotoxicity assessment of birch-bark tar-A most versatile prehistoric adhesive. Advances in Anthropology 2012, 2(2), 49-56.

Beatović, D.V.; Jelačić, S.Ć.; Oparnica, Č.D.; Krstić-Milošević, D.B.; Glamočlija, J.M.; Ristić, M.S.; Šiljegović, J.D. Chemical composition, antioxidative and antimicrobial activity of essential oil of *Ocimum sanctum* L. Hemijska Industrija 2013, 67(3), 427-435.

Beck, P.; Caudullo, G.; Rigo, D.; Tinner, W. *Betula pendula*, *Betula pubescens* and other birches in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: European Atlas of Forest Tree Species. Publications Office of the European Union 2016, 70-73.

Belojević, G. Efekti polifenola na zdravlje ljudi. Galenika Medical Journal 2023, 2(7), 46-52.

Bilek, M.; Siembida, A.; Gostkowski, M.; Stawarczyk, K.; Cieślik, E. Antioxidative capacity of birch saps. Biotechnology and Food Science 2017, 81(1), 3–10.

Bilkisu, A.; Ariyo, A.L.; Umar, A.; Olayemi, E.E.; Isyaka, S.M.; Ajagbonna, O.P.; Ogundajo, T.L. In vitro antibacterial activity of betulinic acid from *Psidium guajava* L. Journal of Medicinal Plants Studies 2024, 12(1), 48–54.

Blainski, A.; Lopes, G.C.; De Mello, J.C.P. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. Molecules 2013, 18(6), 6852-6865.

Bonikowski, R.; Świtakowska, P.; Kula, J. Synthesis, odour evaluation and antimicrobial activity of some geranyl acetone and nerolidol analogues. Flavour and Fragrance Journal 2015, 30(3), 238-244.

Boroduškis, M.; Kaktiņa, E.; Blāķe, I.; Nakurte, I.; Dzabijeva, D.; Kusiņa, I.; Mičule, S.; Ramata-Stunda, A. Chemical characterization and in vitro evaluation of birch sap and a complex of plant extracts for potential use in cosmetic anti-ageing products. Environmental and Experimental Biology 2017, 15, 29-36.

Boryczka, S.; Michalik, E.; Jastrzębska, M.; Kusz, J.; Zubko, M.; Bębenek, E. X-ray crystal structure of betulin–DMSO solvate. Journal of Chemical Crystallography 2012, 42(4), 345-351.

Bradley, P.R. British Herbal Compendium: A Handbook of Scientific Information on Widely Used Plant Drugs, Volume 2. British Herbal Medicine Association 2006.

Brewster, M.E.; Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Advanced Drug Delivery Reviews 2007, 59(7), 645-666.

Buko, V.; Zavodnik, I.; Palecz, B.; Stepniak, A.; Kirko, S.; Shlyahtun, A.; Misiuk, W.; Belonovskaya, E.; Lukivskaya, O.; Naruta, E.; Kuzmitskaya, I.; Ilyich, T.; Erdenebayar, B.; Rakhmadieva, S. Betulin/2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex:

Physicochemical characterization and hepatoprotective activity. *Journal of Molecular Liquids* 2020, 309, 113118.

Calliste, C.A.; Trouillas, P.; Allais, D.P.; Simon, A.; Duroux, J.L. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49(7), 3321–3327.

Can Başer, K.H.; Buchbauer, G. *Handbook of science, technology, and applications*. CRC Press 2010.

Can Başer, K.H.; Demirci, B. Studies on *Betula* essential oils. *Arkivoc* 2007, 7, 335–348.

Carnat, A.; Lacouture, I.; Fraisse, D.; Lamaison, J.L. Standardisation de la feuille de bouleau [Standardization of the birch leaf]. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 1996, 5, 231–235.

Carpintero, M.; Marcet, I.; Zornoza, M.; Rendueles, M.; Díaz, M. Effect of birch sap as solvent and source of bioactive compounds in casein and gelatine films. *Membranes* 2023, 13(9), 786.

Carta, G.; Murru, E.; Banni, S.; Manca, C. Palmitic acid: physiological role, metabolism and nutritional implications. *Frontiers in Physiology* 2017, 8, 902.

Carvalho, T.C.d.; Polizeli, A.M.; Turatti, I.C.; Severiano, M.E.; de Carvalho, C.E.; Ambrósio, S.R.; Crotti, A.E.; de Figueiredo, U.S.; Vieira, P.C.; Furtado, N.A. Screening of filamentous fungi to identify biocatalysts for LU biotransformation. *Molecules* 2010, 15(9), 6140–6151.

Chamorro, E.; Zambón, S.; Morales, W.; Sequeira, A.; Velasco, G. Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography. In: *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. InTech 2012, 307–324.

Chang, S.T.; Chen, P.F.; Wang, S.Y.; Wu, H.H. Antimite activity of essential oils and their constituents from *Taiwania cryptomerioides*. *Journal of Medical Entomology* 2001, 38(3), 455–457.

Chapurin, Y.V.; Mbarga, M.D.A.; Senyagin, A.N.; Podoprighora, I.V.; Manar, R. Evaluation of the Antibacterial Activity of Extracts of *Betula pendula* (Silver Birch) Bark Against Uropathogenic Microorganisms. *Antibiotics and Chemotherapy* 2022, 67(3-4), 29–35.

Cheng, A.Y.F.; Teoh, P.L.; Jayasinghe, L.; Cheong, B.E. Volatile profiling aided in the isolation of anti-proliferative LU from the roots of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. *Processes* 2021, 9(8), 1383.

Chou, K.J.; Fang, H.C.; Chung, H.M.; Cheng, J.S.; Lee, K.C.; Tseng, L.L.; Tang, K.Y.; Jan, C.R. Effect of betulinic acid on intracellular free Ca^{2+} levels in Madin-Darby canine kidney cells. *European Journal of Pharmacology* 2000, 408(2), 99–106.

Christova-Bagdassarian, V.; Chohadjieva, D.; Atanassova, M. Total Phenolics and Total Flavonoids, Nitrate Contents and Microbiological Tests in Dry Extract of Bulgarian White

Birch Leaves (*Betula pendula*). International Journal of Advanced Research 2014, 2(6), 668-674.

Chrobak, E.; Kadela-Tomanek, M.; Bębenek, E.; Marciniec, K.; Wietrzyk, J.; Trynda, J.; Pawełczak, B.; Kusz, J.; Kasperczyk, J.; Chodurek, E.; Paduszyński, P.; Boryczka, S. New phosphate derivatives of betulin as anticancer agents: synthesis, crystal structure, and molecular docking study. Bioorganic Chemistry 2019, 87, 613-628.

Cîntă-Pînzaru, S.; Dehelean, C.A.; Soica, C.; Culea, M.; Borcan, F. Evaluation and differentiation of the Betulaceae birch bark species and their bioactive triterpene content using analytical FT-vibrational spectroscopy and GC-MS. Chemistry Central Journal 2012, 6(1), 67.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, Approved standard 9th ed, CLSI document M07-A9, Wayne, PA, CLSI, 2012.

Co, M.; Mattila, P.; Eklund-Åkergren, P.; Srinivas, K.; King, J.W.; Sjöberg, P.; Turner, C. Pressurized liquid extraction of betulin and antioxidants from birch bark. Green Chemistry 2009, 11(5), 668–674.

Collin, M.S.; Venkatraman, S.K.; Vijayakumar, N.; Kanimozhi, V.; Arbaaz, S.M.; Stacey, R.G.S.; Anusha, J.; Choudhary, R.; Lvov, V.; Tovar, G.I.; Senatov, F.; Koppala, S.; Swamiappan, S. Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects on human: A review. Journal of Hazardous Materials Advances 2022, 7, 100094.

Colombini, M.P.; Modugno, F. Organic mass spectrometry in art and archaeology. John Wiley & Sons Ltd 2009.

Costea, T.; Vlase, L.; Ancuceanu, R.; Dinu, M.; Olah, N.-K.; Popescu, M.; Gîrd, C.E. Chemical composition, antioxidant activity and phytotoxic properties of silver birch leaves. 2016, 21(3), 11527–11538.

D'Aria, F.; Pagano, B.; Giancola, C. Thermodynamic properties of hydroxypropyl- β -cyclodextrin/guest interaction: a survey of recent studies. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2022, 147, 4889-4897.

Dehelean, C.A.; Șoica, C.; Ledeți, I.; Aluaș, M.; Zupko, I.; G Lușcan, A.; Cinta-Pinzaru, S.; Munteanu, M. Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation. Chemistry Central Journal 2012, 6, 137.

Del Valle, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochemistry 2004, 39(9), 1033-1046.

Demets, O.V.; Takibayeva, A.T.; Kassenov, R.Z.; Aliyeva, M.R. Methods of betulin extraction from birch bark. Molecules 2022, 27, 3621.

Demikhova, O.V.; Balakshin, V.V.; Presnova, G.A.; Bocharova, I.V.; Lepekha, L.N.; Chernousova, L.N.; Smirnova, T.G.; Pospelov, L.E.; Chistiakov, A.N. Antimycobacterial

activity of a dry birch bark extract on a model of experimental pulmonary tuberculosis. *Problemy Tuberkuleza i Bolezni Legkikh* 2006, 1, 55–57.

Demina, L.; Parshikova, V.; Stepen, R.A. Composition, properties, and biocidal activity of a carbon dioxide extract of *Betula pendula* Roth leaves. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya* 2006, 49(1), 75-78.

Demirci, B.; Can Başer, K.H. Essential oils from the buds of *Betula* spp. growing in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 2003, 18(2), 87-90.

Demirci, B.; Paper, D.; Demirci, F.; Can Başer, K.H.; Franz, G. Essential oil of *Betula pendula* Roth buds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2004, 1(3), 301-303.

Demirci, F.; Demirci, B.; Can Başer, K. H.; Guven, K. The composition and antifungal bioassay of the essential oils of different *Betula* species growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds* 2000, 36 (2), 159-165.

Drag, M.; Surowiak, P.; Drag-Zalesińska, M.; Dietel, M.; Lage, H.; Oleksyszyn, J. Comparison of the cytotoxic effects of birch bark extract, betulin and betulinic acid towards human gastric carcinoma and pancreatic carcinoma drug-sensitive and drug-resistant cell lines. *Molecules* 2009, 14(4), 1639-1651.

Dragićević, A.; Kitić, D.; Pavlović, D. Biological activity of the birch leaf and bark. *Natural Medicinal Materials* 2022, 42, 89-95.

Du, F.; Pan, T.; Ji, X.; Hu, J.; Ren, T. Study on the preparation of geranyl acetone and β -cyclodextrin inclusion complex and its application in cigarette flavoring. *Scientific Reports* 2020, 10(1), 12375.

Duchêne, D.; Ponchel, G.; Bochot, A. New uses of cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005, 26(2), 97-104.

Durić, K.; Kovač-Bešović, E.; Nikšić, H.; Sofić, E. Antibacterial activity of methanolic extracts, decoction and isolated triterpene products from different parts of birch, *Betula pendula* Roth. *Journal of Plant Studies* 2013, 2(2), 61-70.

Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports* 2006, 23(3), 394-411.

Elbatanony, M.M.; Aly, H.F.; Deabes, D.A.E.; El-Sayed, A.F.; Younis, E.A. The anti-hypothyroidism regulating role of *Ficus carica* L. leaves extract: *In-vitro*, *In-vivo*, and *In-silico* studies. *Egyptian Journal of Chemistry* 2024, 67(10), 341-359.

Emrich, S.; Schuster, A.; Schnabel, T.; Oostingh, G.J. Antimicrobial activity and wound-healing capacity of birch, beech and larch bark extracts. *Molecules* 2022, 27(9), 2817.

Eslahi, H.; Fahimi, N.; Sardarian, A.R. Chemical composition of essential oils. In: Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications. John Wiley & Sons Ltd 2017, 119–171.

Essiedu, J.A.; Kovaleva, E.G. Physicochemical, antioxidant activity, and sensory characteristics of mead produced with *Hibiscus sabdariffa* and *Betula pendula* (birch sap). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 2024, 58, 103189.

European Medicines Agency. Assessment report on *Betula pendula* Roth and/or *Betula pubescens* Ehrh. as well as hybrids of both species, folium EMA/HMPC/573240/2014. 24 November 2014.

Ferdosi, M.F.H.; Haider Khan, I.; Javaid, A.; Sattar, T.; Munir, A. Identification of antimicrobial constituents in essential oil from *Paulownia fortunei* flowers. Mycopathologia 2021, 18(2), 53-57.

Fontanay, S.; Grare, M.; Mayer, J.; Finance, C.; Duval, R.E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. Journal of Ethnopharmacology 2008, 120(2), 272–276.

Formisano, C.; Napolitano, F.; Rigano, D.; Apostolides Arnold, N.; Piozzi, F.; Senatore, F. Essential oil composition of *Teucrium divaricatum* Sieb. ssp. *villosum* (Celak.) Rech. fil. growing wild in Lebanon. Journal of Medicinal Food 2010, 13(5), 1281–1285.

Fulda, S.; Debatin, K.M. Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. Medical and Pediatric Oncology 2000, 35(6), 616-618.

Germanò, M. P.; Cacciola, F.; Donato, P.; Dugo, P.; Certo, G.; D'Angelo, V.; Mondello, L.; Rapisarda, A. *Betula pendula* Roth leaves: gastroprotective effects of an HPLC- fingerprinted methanolic extract. Natural Product Research 2013, 27(17), 1569-1575.

Germanò, M. P.; Cacciola, F.; Donato, P.; Dugo, P.; Certo, G.; D'Angelo, V.; Mondello, L.; Rapisarda, A. *Betula pendula* leaves: polyphenolic characterization and potential innovative use in skin whitening products. Fitoterapia 2012, 83(5), 877-882.

Glišić, S.B.; Milojević, S.Ž.; Dimitrijević, S.I.; Orlović, A.M.; Skala, D.U. Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. Journal of the Serbian Chemical Society 2007, 72(4), 311-320.

Grabek-Lejko, D.; Kasprzyk, I.; Zaguła, G.; Puchalski, C. The bioactive and mineral compounds in birch sap collected in different types of habitats. Baltic Forestry 2017, 23(2), 394-401.

Gruber, L.; Seidl, L.; Zanetti, M.; Schnabel, T. Calorific value and ash content of extracted birch bark. Forests 2021, 12, 1480.

Gründemann, C.; Gruber, C.W.; Hertrampf, A.; Zehl, M.; Kopp, B.; Huber, R. An aqueous birch leaf extract of *Betula pendula* inhibits the growth and cell division of inflammatory lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 2011, 136(3), 444-451.

Günther, A.; Makuch, E.; Nowak, A.; Duchnik, W.; Kucharski, Ł.; Pelech, R.; Klimowicz, A. Enhancement of the antioxidant and skin permeation properties of betulin and its derivatives. *Molecules* 2021, 26, 3435.

Hamion, G.; Aucher, W.; Mercier, A.; Tewes, F.; Menard, M.; Bertaux, J.; Girardot, M.; Imbert, C. Insights into betulinic acid as a promising molecule to fight the interkingdom biofilm *Staphylococcus aureus-Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2024, 63(6), 107166.

Hänsel, R.; Sticher, O. *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, 8th, überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer, 2007.

Harju, L.; Huldén, S. Birch sap as a tool for biogeochemical prospecting. *Journal of Geochemical Exploration* 1990, 37(3), 351-365.

Heidary Navid, M.; Laszczyk-Lauer, M.N.; Reichling, J.; Schnitzler, P. Pentacyclic triterpenes in birch bark extract inhibit early step of herpes simplex virus type 1 replication. *Phytomedicine* 2014, 21(11), 1273-1280.

Higuchi, T.; Connors, K. Phase solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* 1965, 7, 117-212.

Ho, C.L.; Yang, S.S.; Chang, T.M.; Su, Y.C. Composition, antioxidant, antimicrobial and anti-wood-decay fungal activities of the twig essential oil of *Taiwania cryptomerioides* from Taiwan. *Natural Product Communications* 2012, 7(2), 261–264.

Holonec, L.; Ranga, F.; Crainic, D.; Truta, A.M.; Socaciu, C. Evaluation of betulin and betulinic acid content in birch bark from different forestry areas of Western Carpathians. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-napoca* 2012, 40, 99-105.

Hordyjewska, A.; Ostapiuk, A.; Horecka, A. Betulin and betulinic acid in cancer research. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 2018, 12(2), 72-75.

Hordyjewska, A.; Ostapiuk, A.; Horecka, A.; Kurzepa, J. Betulin and betulinic acid: triterpenoid derivatives with a powerful biological potential. *Phytochemistry Reviews* 2019, 18, 929-951.

Huang, L.; Yuan, X.; Aiken, C.; Chen, C.H. Bifunctional anti-human immunodeficiency virus type 1 small molecules with two novel mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004, 48(2), 663-665.

Hui, L.M.; Zhao, G.D.; Zhao, J.J. δ -Cadinene inhibits the growth of ovarian cancer cells via caspase-dependent apoptosis and cell cycle arrest. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015, 8(6), 6046-6056.

Innocente, A.; Casanova, B.B.; Klein, F.; Lana, A.D.; Pereira, D.; Muniz, M.N.; Sonnet, P.; Gosmann, G.; Fuentefria, A.M.; Gnoatto, S.C. Synthesis of isosteric triterpenoid derivatives and antifungal activity. *Chemical Biology & Drug Design* 2014, 83(3), 344-349.

Isidorov, V.; Bagan, R.; Szczepaniak, L.; Świecicka, I. Chemical profile and antimicrobial activity of extractable compounds of *Betula litwinowii* buds. *Open Chemistry* 2015, 13, 125-137.

Isidorov, V.; Krajewska, U.; Vinogorova, V.; Vetchinnikova, L.; Fuksman, I.; Bal, K. Gas chromatographic analysis of essential oil from buds of different birch species with preliminary partition of components. *Biochemical Systematics and Ecology* 2004, 32(1), 1-13.

Isidorov, V.; Szczepaniak, L.; Wróblewska, A.; Pirożnikow, E.; Vetchinnikova, L. Gas chromatographic-mass spectrometric examination of chemical composition of two Eurasian birch (*Betula* L.) bud exudates and its taxonomical implication. *Biochemical Systematics and Ecology* 2014, 52, 41-48.

Isidorov, V.; Szoka, Ł.; Nazaruk, J. Cytotoxicity of white birch bud extracts: perspectives for therapy of tumours. *PLoS ONE* 2018, 13(8), e0201949.

IUCN. *Betula pendula*. The IUCN Red List of Threatened Species. Dostępno na: <https://www.iucnredlist.org/species/62535/3115662>

Jaganath, I.B.; Crozier, A. Dietary flavonoids and phenolic compounds. In: *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology* 2009, Chapter 1, 1-22.

Jäger, S.; Laszczyk, M.N.; Scheffler, A. A preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (*Betulae alba cortex*). *Molecules* 2008, 13(12), 3224-3235.

Jelačić, S.C.; Beatović, D.V.; Prodanovic, S.; Tasić, S.R.; Moravčević, D.Z.; Vujosevic, A.; Vučković, S.M. Chemical composition of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum* L., Lamiaceae). *Hemijaska Industrija* 2011, 65(4), 465-471.

Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47(10), 3954-3962.

Kallio, H.; Rine, S.; Pangborn, R. M.; Jennings, W. Effect of heating on the headspace volatiles of Finnish birch syrup. *Food Chemistry* 1987, 24(4), 287-299.

Kanamoto, T.; Kashiwada, Y.; Kanbara, K.; Gotoh, K.; Yoshimori, M.; Goto, T.; Sano, K.; Nakashima, H. Anti-human immunodeficiency virus activity of YK-FH312 (a betulinic acid derivative), a novel compound blocking viral maturation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001, 45(4), 1225-1230.

Karonen, M.; Ossipov, V.; Sinkkonen, J.; Lopenen, J.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. Quantitative analysis of polymeric proanthocyanidins in birch leaves with normal-phase HPLC. *Phytochemical Analysis* 2006, 17(3), 149-156.

Kasim, L.S.; Olaleye, K.O.; Fagbohun, A.B.; Ibitoye, S.F.; Adejumo, O.E. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Struchium sparganophora* Linn. Ktze (Asteraceae). *Advances in Biological Chemistry* 2014, 4(4), 246–252.

Kavelenova, L.; Lishchinskaya, S.; Karandaeva, L.N. Characteristics of water-soluble phenols seasonal dynamics in *Betula pendula* Roth. leaves in forest-steppe urban environment (case study of Samara). *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya* 2001, 3, 91-96.

Kazachenko, A.S.; Akman, F.; Vasilieva, N.Y.; Issaoui, N.; Malyar, Y.N.; Kondrasenko, A.A.; Borovkova, V.S.; Miroshnikova, A.V.; Kazachenko, A.S.; Al-Dossary, O.; Wojcik, M.J.; Berezhanaya, J.D.; Elsuf'ev, E.V. Catalytic sulfation of betulin with sulfamic acid: experiment and DFT calculation. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23(3), 1602.

Keinänen, M.; Julkunen-Tiitto, R. Effect of sample preparation method on birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, 44(9), 2724-2727.

Keinänen, M.; Julkunen-Tiitto, R. High performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *Journal of Chromatography A* 1998, 793(2), 370–377.

Kim, D.S.H.L.; Chen, Z.; Van Tuyen, N.; Pezzuto, J.M.; Qiu, S.; Lu, Z. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. *Synthetic Communications* 1997, 27, 1607-1612.

Kim, K.H.; Kabir, E.; Jahan, S.A. A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. *Journal of Hazardous Materials* 2016, 306, 376-385.

Klinger, W.; Hirschelmann, R.; Süß, J. Birch sap and birch leaves extract: screening for antimicrobial, phagocytosis-influencing, antiphlogistic and antipyretic activity. *Pharmazie* 1989, 44(8), 558–560.

Kolundžić, M.; Stanojković, T.; Radović, J.; Tačić, A.; Dodevska, M.; Milenković, M.; Sisto, F.; Masia, C.; Farronato, G.; Nikolić, V.; Kundaković, T. Cytotoxic and antimicrobial activities of *Cantharellus cibarius* Fr. (Cantarellaceae). *Journal of Medicinal Food* 2017, 20(8), 790-796.

Kosyakov, D.S.; Ul'yanovskii, N.V.; Falev, D.I. Determination of triterpenoids from birch bark by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* 2014, 69(13), 1264-1269.

Kozioł, A. Analogues of betulin and betulinic acid with biological activity. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 2021, 12(2), 203-213.

Kozubek, M.; Hoenke, S.; Schmidt, T.; Deigner, H.P.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R. Synthesis and cytotoxicity of betulin and betulinic acid-derived 30-oxo-amides. *Steroids* 2022, 182, 109014.

Krasutsky, P.A. Birch bark research and development. *Natural Product Reports* 2006, 23, 919-942.

Krstić, N.; Nikolić, R.; Krstić, M. Biološki značaj mangana. *Hemijski pregled* 2014, 6, 154-157.

Kucharski, Ł.; Kucharska, E.; Muzykiewicz-Szymańska, A.; Nowak, A.; Pelech, R. Chemical composition, antioxidant potential, and antimicrobial activity of novel antiseptic lotion from the leaves of *Betula pendula* Roth. *Applied Sciences* 2025, 15(7), 3658.

Kūka, M.; Čakste, I.; Geršebeka, E. Determination of bioactive compounds and mineral substances in Latvian birch and maple saps. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B* 2013, 67(4-5), 437-441.

Kwaji, A.; Adamu, H.M.; Chindo, I.Y.; Atiko, R. Isolation, characterization and biological properties of betulin from *Entada africana* Guill. & Perr. (Mimosaceae). *Journal of Applied and Advanced Research* 2018, 3(1), 28–31.

Laszczyk, M.; Jäger, S.; Simon-Haarhaus, B.; Scheffler, A.; Schempp, C.M. Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*Betulae cortex*). *Planta Medica* 2006, 72(15), 1389-1395.

Lavrenev, G.V.; Lavrenev, V.K. *Polnaya entsiklopediya lekarstvennyh rastenii* (Complete Encyclopedia of Herbs), Vol. 1 A-L. Olma-Press 1999.

Li, S.; Zhang, J.; Fang, Y.; Yi, J.; Lu, Z.; Chen, Y.; Guo, B. Enhancing betulinic acid dissolution rate and improving antitumor activity via nanosuspension constructed by anti-solvent technique. *Drug Design, Development and Therapy* 2020, 14, 243-256.

Lin, J.Y.; Tang, C.Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry* 2007, 101(1), 140-147.

Loftsson, T.; Brewster, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011, 63(9), 1119-1135.

Loftsson, T.; Brewster, M.E.; Másson, M. Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. *American Journal of Drug Delivery* 2004, 2(4), 261-275.

Loftsson, T.; Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 2007, 329(1-2), 1-11.

Loftsson, T.; Konráðsdóttir, F.; Másson, M. Influence of aqueous diffusion layer on passive drug diffusion from aqueous cyclodextrin solutions through biological membranes. *Pharmazie* 2006, 61(2), 83-89.

Loftsson, T.; Moya-Ortega, M.D.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2016, 68(5), 544-555.

Loza-Tavera, H. Monoterpenes in essential oils: Biosynthesis and properties. In: Advances in Experimental Medicine and Biology, Volume 464. Springer 1999, 49-62.

Łuczaj, Ł.; Bilek, M.; Stawarczyk, K. Sugar content in the sap of birches, hornbeams and maples in southeastern Poland. Central European Journal of Biology 2014, 9(4), 410-416.

Ljubojević, S.; Vasilišin, L.; Vučić, G.; Savić, A.; Miodragović, D. Seasonal variability of the chemical composition of birch sap obtained through tapping (*Betulae sucus recens*). In Book of Proceedings, VII International Scientific Agriculture Symposium AGROSYM 2016, 2810-2817.

Maggi, F.; Cecchini, C.; Cresci, A.; Coman, M.M.; Tirillini, B.; Sagratini, G.; Papa, F.; Vittori, S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from several *Hypericum* taxa (Guttiferae) growing in Central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano). Chemistry & Biodiversity 2010, 7(2), 447-466.

Makuch-Pietraś, I.; Grabek-Lejko, D.; Górka, A.; Kasprzyk, I. Antioxidant activities in relation to the transport of heavy metals from the soil to different parts of *Betula pendula* (Roth.). Journal of Biological Engineering 2023, 17(1), 19.

Marrufo, T.; Nazzaro, F.; Mancini, E.; Fratianni, F.; Coppola, R.; De Martino, L.; Agostinho, A.B.; De Feo, V. Chemical composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Moringa oleifera* Lam. cultivated in Mozambique. Molecules 2013, 18(9), 10989-11000.

Martins, C.M.; Nascimento, E.A.; do Moraes, S.A.L.; Oliveira, A.; Chang, R.; Cunha, L.C.S.; Martins, M.M.; Martins, C.H.G.; Moraes, T. da S.; Rodrigues, P.V.; Silva, C.V.; Aquino, F.J.T. Chemical Constituents and Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. Essential Oils. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015, 2015, 842047.

Mashentseva, A.; Dehaen, W.; Seitembetov, T.; Seitembetova, A. Comparison of the antioxidant activity of the different *Betula pendula* Roth extracts from Northern Kazakhstan. Journal of Phytology 2011, 3(1), 18-25.

Mazzanti, G.; Battinelli, L.; Salvatore, G. Antimicrobial properties of the linalool-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* (Lamiaceae). Flavour and Fragrance Journal 1998, 13(5), 289-294.

Miguel, M. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. Flavour and Fragrance Journal 2010, 25(5), 291-312.

Milenković, A.; Stanojević, J.; Stojanović, R.Z.; Pejčić, M.; Cvetković, D.; Zvezdanović, J.; Stanojević, L. Chemical composition, antioxidative and antimicrobial activity of allspice (*Pimenta dioica* (L.) Merr.) essential oil and extract. Advanced Technologies 2020, 9(1), 27-36.

Mingaila, J.; Čiuldienė, D.; Viškelis, P.; Bartkevičius, E.; Vilimas, V.; Armolaitis, K. The quantity and biochemical composition of sap collected from silver birch (*Betula pendula* Roth.) trees growing in different soils. Forests 2020, 11(4), 365.

Modugno, F.; Ribechini, E.; Colombini, M.P. Chemical study of triterpenoid resinous materials in archaeological findings by means of direct exposure electron ionisation mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006, 20(11), 1787–1800.

Moghaddam, M.G.; Ahmad, F.B.H.; Samzadeh-Kermani, A. Biological activity of betulinic acid: a review. *Pharmacology & Pharmacy* 2012, 3, 119-123.

Muceniece, R.; Saleniece, K.; Rumaks, J.; Krigere, L.; Dzirkale, Z.; Mezhapuke, R.; Zharkova, O.; Klusa, V. Betulin binds to gamma-aminobutyric acid receptors and exerts anticonvulsant action in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2008, 90(4), 712-716.

Muller, B.T.; Kleibert, K.R.U.; Sartori, C.O.; Lautenchleger, F.; Colet, C.F. Profit and chemical analysis of *Lavandula dentata* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils and the influence of factors stressors. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 2024, 46(1), e70034.

Mulyaningsih, S.; Youns, M.; El-Readi, M.Z.; Ashour, M.L.; Nibret, E.; Sporer, F.; Herrmann, F.; Reichling, J.; Wink, M. Biological activity of the essential oil of *Kadsura longipedunculata* (Schisandraceae) and its major components. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010, 62(8), 1037–1044.

Myz, S.A.; Politov, A.A.; Kuznetsova, S.A.; Shakhtshneider, T.P. Morphological changes in betulin particles as a result of polymorphic transformations, and formation of co-crystals under heating. *Powders* 2023, 2(2), 432-444.

Nadeem, M.; Muhammad Anjum, F.; Issa Khan, M.; Tehseen, S.; El-Ghorab, A.; Iqbal Sultan, J. Nutritional and medicinal aspects of coriander (*Coriandrum sativum* L.): A review. *British Food Journal* 2013, 115(5), 743-755.

Nakurte, I.; Stankus, K.; Virsis, I.; Paze, A.; Rizhikovs, J. Characterization of antioxidant activity and total phenolic compound content of birch outer bark extracts using micro plate assay. In: *Proceedings of the International Scientific and Practical Conference, Environment Technology Resources*, 2017, 1, 197-201.

Nędzarek, A.; Tórz, A.; Karakiewicz, B.; Clark, J.S.; Laszczyńska, M.; Kaleta, A.; Adler, G. Concentrations of heavy metals (Mn, Co, Ni, Cr, Ag, Pb) in coffee. *Acta Biochimica Polonica* 2013, 60(4), 623-627.

Nikolić, L.; Urošević, M.; Nikolić, V.; Gajić, I.; Dinić, A.; Miljković, V.; Rakić, S.; Đokić, S.; Kesić, J.; Ilić-Stojanović, S.; Nikolić, G. The formulation of curcumin: 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex with smart hydrogel for prolonged release of curcumin. *Pharmaceutics* 2023, 15(2), 382.

Noge, K.; Becerra, J.X. Germacrene D, a common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Burseraceae). *Molecules* 2009, 14(12), 5289-5297.

Norocel, L.; Pădureț, S. Evaluation of birch sap (*Betula pendula*) quality during storage. *Scientific Study & Research Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry* 2020, 21(2), 217-226.

OECD. Section 2 - European white birch (*Betula pendula* Roth). In: Safety Assessment of Transgenic Organisms, Volume 2: OECD Consensus Documents. OECD Publishing 2006, 42-74.

Oloyede, H.O.B.; Ajiboye, H.O.; Salawu, M.O.; Ajiboye, T.O. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. *Microbial Pathogenesis* 2017, 111, 338-344.

Omara, T.; Kiprop, A.K.; Kosgei, V.J. Isolation and characterization of compounds in ethanolic extract of *Albizia coriaria* (Welw ex. Oliver) leaves: a further evidence of its ethnomedicinal diversity. *Bulletin of the National Research Centre* 2022, 46(1), 30.

Orav, A.; Arak, E.; Boikova, T.; Raal, A. Essential oil in *Betula* spp. leaves naturally growing in Estonia. *Biochemical Systematics and Ecology* 2011, 39, 744-748.

Orsini, S.; Ribechini, E.; Modugno, F.; Klügl, J.; Di Pietro, G.; Colombini, M. Micromorphological and chemical elucidation of the degradation mechanisms of birch bark archaeological artifacts. *Heritage Science* 2015, 3, 2.

Ostapiuk, A.; Kurach, Ł.; Strzemiński, M.; Kurzepa, J.; Hordyjewska, A. Evaluation of antioxidative mechanisms in vitro and triterpenes composition of extracts from silver birch (*Betula pendula* Roth) and black birch (*Betula obscura* Kotula) barks by FT-IR and HPLC-PDA. *Molecules* 2021, 26, 4633.

Ozolinčius, R.; Bareika, V.; Rubinskienė, M.; Viškelis, P.; Mažeika, R.; Staugaitis, G. Chemical composition of silver birch (*Betula pendula* Roth.) and downy birch (*Betula pubescens* Ehrh.) sap. *Baltic Forestry* 2016, 22(2), 222-229.

Palazzo, M.C.; Wright, H.L.; Agius, B.R.; Wright, B.S.; Moriarty, D.M.; Haber, W.A.; Setzer, W.N. Chemical compositions and biological activities of leaf essential oils of six species of Annonaceae from Monteverde, Costa Rica. *Records of Natural Products* 2009, 3(3), 153-160.

Pantović, S. Osnovi biohemije za studente visoke medicinske škole. Univerzitet Crne Gore 2020, 83-122.

Paže, A.; Zandersons, J.; Rižikovs, J.; Dobeles, G.; Jurkjāne, V.; Spince, B.; Tardenaka, A. Apparatus and selective solvents for extraction of triterpenes from silver birch (*Betula pendula* Roth.) outer bark. *Baltic Forestry* 2014, 20(1), 88-97.

Penkov, D.; Andonova, V.; Delev, D.; Kostadinov, I.; Kassarova, M. Antioxidant activity of dry birch (*Betula pendula*) leaves extract. *Folia Medica* 2018, 60(4), 571-579.

Pierson, T.C.; Doms, R.W. HIV 1 entry and its inhibition. In: Cellular Factors Involved in Early Steps of Retroviral Replication. Springer 2003, 1-27.

Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.S.; Chagwedera, T.E.; Farnsworth, N.R.; Cordell, A.C.; Beecher, C.W.W.; Fong, H.H.H.; Kinghorn, A.D.; Brown, D.M.; Wani, M.C.; Wall, M.E.; Hieken, T.J.; Das Gupta, T.K.; Pezzuto, J.M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature Medicine* 1995, 1(10), 1046-1051.

PubChem. Betulinic Acid – KEGG-ID section. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Betulinic-Acid#section=KEGG-ID>.

Pyo, J.S.; Roh, S.H.; Kim, D.K.; Lee, J.G.; Lee, Y.Y.; Hong, S.S.; Kwon, S.W.; Park, J.H. Anti-cancer effect of betulin on a human lung cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem mass spectrometry. *Planta Medica* 2009, 75(2), 127-131.

Qi-he, C.; Fu, M.; Liu, J.; Zhang, H.; He, G.; Ruan, H. Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 2009, 16, 599-604.

Quilaqueo, M.; Millao, S.; Luzardo-Ocampo, I.; Campos-Vega, R.; Acevedo, F.; Shene, C.; Rubilar, M. Inclusion of piperine in β -cyclodextrin complexes improves their bioaccessibility and in vitro antioxidant capacity. *Food Hydrocolloids* 2019, 91, 143-152.

Raal, A.; Boikova, T.; Püssa, T. Content and dynamics of polyphenols in *Betula* spp. leaves naturally growing in Estonia. *Records of Natural Products* 2015, 9(1), 41-48.

Rastogi, S.; Pandey, M.; Singh Rawat, A.K. Medicinal plants of the genus *Betula* – traditional uses and a phytochemical–pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology* 2015, 159, 62-83.

Rather, M.A.; Dar, B.A.; Dar, M.Y.; Wani, B.A.; Shah, W.A.; Bhat, B.A.; Ganai, B.A.; Bhat, K.A.; Anand, R.; Qurishi, M.A. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine* 2012, 19(13), 1185–1190.

Rauha, J.P.; Remes, S.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Kähkönen, M.; Kujala, T.; Pihlaja, K.; Vuorela, H.; Vuorela, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* 2000, 56(1), 3–12.

Rizhikovs, J.; Zandersons, J.; Dobeles, G.; Paže, A. Isolation of triterpene-rich extracts from outer birch bark by hot water and alkaline pre-treatment or the appropriate choice of solvents. *Industrial Crops and Products* 2015, 76, 209-214.

Rodrigues, G.C.S.; Maia, M. dos S.; de Souza, T.A.; de Oliveira Lima, E.; Gomes dos Santos, L.E.C.; Lima Silva, S.; da Silva, M.S.; Barbosa Filho, J.M.; Rodrigues Junior, V. da S.; Scotti, L.; Scotti, M.T. Antimicrobial potential of betulinic acid and investigation of the mechanism of action against nuclear and metabolic enzymes with molecular modeling. *Pathogens* 2023, 12(3), 449.

Ryu, S.Y.; Oak, M.H.; Yoon, S.K.; Cho, D.I.; Yoo, G.S.; Kim, T.S.; Kim, K.M. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Medica* 2000, 66(4), 358-360.

Saelens, X.; Festjens, N.; Vande Walle, L.; van Gurp, M.; van Loo, G.; Vandenabeele, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004, 23(16), 2861-2874.

Saleem, M.; Afaq, F.; Adhami, V.M.; Mukhtar, H. Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 2004, 23(30), 5203-5214.

Sancho, A.I.; Birk, T.; Gregersen, J.M.; Rønne, T.; Hornslet, S.E.; Madsen, A.M.; Bøgh, K.L. Microbial safety and protein composition of birch sap. *Journal of Food Composition and Analysis* 2022, 107, 104347.

Savić, Lj. Metode ekstrakcije biljnih materijala: uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. *Lekovite sirovine* 2014, 34(34), 93-103.

Sbârcea, L.; Ledeti, A.; Udrescu, L.; Varut, R.M.; Barvinschi, P.; Vlase, G.; Ledeti, I. Betulonic acid-cyclodextrins inclusion complexes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2019, 138(4), 2787-2797.

Schuster, A.; Ortmayr, N.; Oostingh, G.; Stelzhammer, B. Compounds extracted from larch, birch bark, Douglas fir, and alder woods with four different solvents: Effects on five skin-related microbes. *BioResources* 2020, 15(2), 3368–3381.

Shai, L.J.; McGaw, L.J.; Aderogba, M.A.; Mdee, L.K.; Eloff, J.N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 2008, 119(2), 238–244.

Shambilova, G.K.; Bukanova, A.S.; Kalauova, A.S.; Kalimanova, D.Zh.; Abilkhairov, A.I.; Makarov, I.S.; Vinogradov, M.I.; Makarov, G.I.; Yakimov, S.A.; Koksharov, A.V.; Novikov, E.M. An experimental study on the solubility of betulin in the complex solvent ethanol-DMSO. *Processes* 2024, 12(6), 1179.

Sharma, G.N.; Dubey, S.K.; Sati, N.; Sanadya, J. Anti-inflammatory activity and total flavonoid content of *Aegle marmelos* seeds. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 2011, 3(3), 214-218.

Shikov, A.N.; Pozharitskaya, O.N.; Makarov, V.G.; Wagner, H.; Verpoorte, R.; Heinrich, M. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia: their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology* 2014, 154(3), 481–536.

Shraim, A.M.; Ahmed, T.A.; Rahman, M.M.; Hijji, Y.M. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT – Food Science and Technology* 2021, 150, 111932.

Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture* 1965, 16(3), 144-158.

Siswadi, S.; Saragih, G.S. Phytochemical analysis of bioactive compounds in ethanolic extract of *Sterculia quadrifida* R.Br. *AIP Conference Proceedings* 2021, 2353(1), 030098.

Softa, M.; Percoco, G.; Lati, E.; Bony, P. Birch sap (*Betula alba*) and chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extracts show antioxidant, anti-inflammatory and DNA protection/repair activity *in vitro*. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 2019, 9(2), 188-205.

Șoica, C.; Danciu, C.; Savoiu-Balint, G.; Borcan, F.; Ambrus, R.; Zupko, I.; Bojin, F.; Coricovac, D.; Ciurlea, S.; Avram, S.; Dehelean, C.A.; Olariu, T.; Matusz, P. Betulinic acid in complex with a gamma-cyclodextrin derivative decreases proliferation and *in vivo* tumor development of non-metastatic and metastatic B16A5 cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2014, 15(5), 8235-8255.

Șoica, C.; Dehelean, C.; Danciu, C.; Wang, H.M.; Wenz, G.; Ambrus, R.; Bojin, F.; Anghel, M. Betulin complex in γ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in *in vitro* and *in vivo* tumor models. *International Journal of Molecular Sciences* 2012, 13(11), 14992-15011.

Șoica, C.; Peev, C.I.; Ciurlea, S.; Ambrus, R.; Dehelean, C. Physico-chemical and toxicological evaluations of betulin and betulinic acid interactions with hydrophilic cyclodextrins. *Farmacia* 2010, 58(5), 611-619.

Sousa, J.L.C.; Gonçalves, C.; Ferreira, R.M.; Cardoso, S.M.; Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Silva, A.M.S. Functionalization of betulinic acid with polyphenolic fragments for the development of new amphiphilic antioxidants. *Antioxidants* 2021, 10(2), 148.

Stanciauskaite, M.; Marksa, M.; Rimkiene, L.; Ramanauskiene, K. Evaluation of chemical composition, sun protection factor and antioxidant activity of Lithuanian propolis and its plant precursors. *Plants* 2022, 11(24), 3558.

Stanković, M.; Stanojević, Lj. Tehnologija lekovitog i začinskog bilja. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2014.

Stanojević, J.; Stanojević, Lj.; Cvetković, D.; Danilović, B. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the turmeric essential oil (*Curcuma longa* L.). *Advanced Technologies* 2015, 4(1), 7-15.

Stanojević, L.; Stanković, M.; Nikolić, V.; Nikolić, L.; Ristić, D.; Čanadanovic-Brunet, J.; Tumbas, V. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts. *Sensors* 2009, 9(7), 5702-5714.

Stanojević, L.J.P.; Zdravković, A.S.; Stanković, M.Z.; Cakić, M.D.; Nikolić, V.D.; Ilić, D.P. Antioksidativna aktivnost vodenno-etanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.). *Savremene tehnologije* 2013, 2(1), 51-59.

Stella, V.J.; He, Q. Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology* 2008, 36(1), 30-42.

Stobiecka, A. Comparative study on the free radical scavenging mechanism exerted by geraniol and geranylacetone using the combined experimental and theoretical approach. *Flavour and Fragrance Journal* 2015, 30(5), 399-409.

Šarić, Lj.; Čabarkapa, I.; Beljkaš, B.; Mišan, A.; Sakač, M.; Plavšić, D. Antimicrobial activity of plant extracts from Serbia. *Food Processing, Quality and Safety* 2009, 36(1-2), 1-5.

Šiman, P.; Filipová, A.; Tichá, A.; Niang, M.; Bezrouk, A.; Havelek, R. Effective method of purification of betulin from birch bark: The importance of its purity for scientific and medicinal use. *PLOS ONE* 2016, 11(5), e0154933.

Takibayeva, A.T.; Zhumabayeva, G.K.; Bakibaev, A.A.; Demets, O.V.; Lyapunova, M.V.; Mamaeva, E.A.; Yerkassov, R.S.; Kassenov, R.Z.; Ibrayev, M.K. Methods of analysis and identification of BE and its derivatives. *Molecules* 2023, 28(16), 5946.

Tálos Nebehaj, E.; Albert, L.; Visi Rajczi, E.; Hofmann, T. Combined multi assay evaluation of the antioxidant properties of tree bark. *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica* 2019, 15(2), 85–97.

Trichard, L.; Duchêne, D.; Bochot, A. Cyclodextrins in dispersed systems. In: *Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*. Wiley-VCH 2006, 423-446.

Tuli, H.S.; Sak, K.; Gupta, D.S.; Kaur, G.; Aggarwal, D.; Parashar, N.C.; Choudhary, R.; Yerer, M.B.; Kaur, J.; Kumar, M.; Garg, V.K.; Sethi, G. Anti-inflammatory and anticancer properties of birch bark-derived betulin: Recent developments. *Plants* 2021, 10(12), 2663.

Tunón, H.; Olavsdotter, C.; Bohlin, L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants: inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *Journal of Ethnopharmacology* 1995, 48, 61-76.

Türkez, H.; Çelik, K.; Toğar, B. Effects of copaene, a tricyclic sesquiterpene, on human lymphocytes cells in vitro. *Cytotechnology* 2014, 66(4), 597–603.

Turova, A.D.; Sapozhnikova, È.N.; Li, V.D. *Lekarstvennyye rastenija SSSR i Vetnama (Herbs in USSR and Vietnam)*. Meditsina 1987.

Urban, M.; Sarek, J.; Klinot, J.; Korinkova, G.; Hajduch, M. Synthesis of α -seco derivatives of betulinic acid with cytotoxic activity. *Journal of Natural Products* 2004, 67, 1100-1105.

Vadivelu, R.K.; Yeap, S.K.; Ali, A.M.; Hamid, M.; Alitheen, N.B. Betulinic acid inhibits growth of cultured vascular smooth muscle cells *in vitro* by inducing G₁ arrest and apoptosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 2012, 251362.

Vedernikov, D.N.; Roshchin, V.I. Extractive compounds of Betulaceae family birch buds (*Betula pendula* Roth.): IV. Composition of sesquiterpene diols, triols, and flavonoids. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2012a, 38(7), 753-761.

Vedernikov, D.N.; Roshchin, V.I. Extractive compounds of Betulaceae family birch buds (*Betula pendula* Roth.): V. Composition of triterpene seco-acids. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2012b, 38(7), 762-768.

Vedernikov, D.N.; Roshchin, V.I. Extractive compounds of birch buds (*Betula pendula* Roth.): I. Composition of fatty acids, hydrocarbons, and esters. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2010a, 36(7), 894-898.

Vedernikov, D.N.; Roshchin, V.I. Extractive compounds of birch buds (*Betula pendula* Roth.): II. Carbonyl compounds and oxides. Esters. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2010b, 36(7), 899-908.

Virginia, F.; Cathrine, L.; Fernandez, S. Isolation, purification, and characterization of betulin, a pentacyclic triterpenoid from the ethanolic extracts of *Coleus forskohlii* tuberous roots; its antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxicity appraisals. Moroccan Journal of Chemistry 2024, 12(4), 1531-1553.

Vladimirov, M.; Nikolić, V.; Stanojević, Lj.; Nikolić, Lj.; Tačić, A. Common birch (*Betula pendula* Roth.) – chemical composition and biological activity of isolates. Advanced Technologies 2019a, 8(1), 65-77.

Vladimirov, M.S.; Nikolic, V.D.; Stanojevic, L.P.; Stanojevic, J.S.; Nikolic, L.B.; Danilovic, B.R.; Marinkovic, V.D. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of birch (*Betula pendula* Roth.) buds essential oil. Journal of Essential Oil Bearing Plants 2019b, 22(1), 120-130.

Wacker, K.; Gründemann, C.; Kern, Y.; Bredow, L.; Huber, R.; Reinhard, T.; Schwartzkopff, J. Inhibition of corneal inflammation following keratoplasty by birch leaf extract. Experimental Eye Research 2012, 97(1), 24-30.

Wal, P.; Wal, A.; Sharma, G.; Rai, A.K. Biological activities of lupeol. Systematic Reviews in Pharmacy 2011, 2, 96-103.

Wang, D.-H.; Koh, E.-H.; Lee, K.A.; Chung, H.S. Chemical constituents from *Betula schmidtii* and their free radical scavenging, tyrosinase inhibitory, and neuroprotective activities. Bulletin of the Korean Chemical Society 2023, 44(3), 256-264.

Wang, H.; Wang, S.; Zhu, H.; Wang, S.; Xing, J. Inclusion complexes of lycopene and β cyclodextrin: Preparation, characterization, stability and antioxidant activity. Antioxidants 2019, 8(8), 314.

Wang, H.M.; Şoica, C.M.; Wenz, G. A comparison investigation on the solubilization of betulin and betulinic acid in cyclodextrin derivatives. Natural Product Communications 2012, 7(3), 289-291.

Wang, S.; Yang, Z.L.; Xiong, F.; Chen, C.; Chao, X.; Huang, J.; Huang, H. Betulinic acid ameliorates experimental diabetic-induced renal inflammation and fibrosis via inhibiting activation of NF- κ B signaling pathway. Molecular and Cellular Endocrinology 2016, 434, 135-143.

Weaver, C.M. Potassium and health. Advances in Nutrition 2013, 4(3), 368S-377S.

Welna, M.; Piekarski, M.; Paszko, K. Simplified ICP OES-based method for determination of 12 elements in commercial bottled birch saps: validation and bioaccessibility study. Molecules 2020, 25(5), 1256.

Woods, K.E.; Chhetri, B.K.; Jones, C.D.; Goel, N.; Setzer, W.N. Bioactivities and Compositions of *Betula nigra* Essential Oils. Journal of Medicinally Active Plants 2013, 2(1–2), 1-9.

World Flora Online. *Betula pendula* Roth. Dostupno na: <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000335449>

Wróblewska-Kurdyk, A.; Dancewicz, K.; Gliszczyńska, A.; Gabryś, B. Antifeedant potential of geranylacetone and nerylacetone and their epoxy-derivatives against *Myzus persicae* (Sulz.). *Molecules* 2022, 27(24), 8871.

Xu, T.; Pang, Q.; Zhou, D.; Zhang, A.; Luo, S.; Wang, Y.; Yan, X. Proteomic investigation into betulinic acid-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. *PLoS ONE* 2014, 9(8), e105768.

Yanevich, A.; Mokshin, D.; Polyakov, V. Optimization of the isolation of biologically active complexes from buds and shoots of birch and poplar for their further use in cosmeceutical compositions. *ScienceRise: Pharmaceutical Science* 2023, 1(44), 67-76.

Yang, D.; Gong, N.; Zhang, L.; Lu, Y.; Du, G. Structural and computational study of 4 new solvatomorphs of betulin: a combined X-ray, Hirshfeld surface, and thermal analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017, 106(3), 826-834.

Yuan, C.; Du, L.; Jin, Z.; Xu, X. Storage stability and antioxidant activity of complex of astaxanthin with hydroxypropyl β cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers* 2013, 91(1), 385–389.

Yuan, P.H.; Bi, Y.C.; Su, B.; Yang, D.Z.; Gong, N.B.; Zhang, L.; Lu, Y.; Du, G.H. Analysis of Four Solvatomorphs of Betulin by TG–DTA–EI/PI–MS System Equipped with the Skimmer-Type Interface. *Natural Products and Bioprospecting* 2020, 10(3), 141-152.

Zakharov, N.A.; Pridantseva, N.M.; Khokhlova, A.A.; Nikolaeva, V.G. Use of a tincture of birch buds for treating suppurative wounds. *Vestnik Khirurgii Imeni I. I. Grekova* 1980, 124(1), 82-85.

Zhang, W.; Jiang, H.; Yang, J.; Jin, M.; Du, Y.; Sun, Q.; Cao, L.; Xu, H. Safety assessment and antioxidant evaluation of betulin by LC MS combined with free radical assays. *Analytical Biochemistry* 2019, 587, 113460.

Zhang, Y.; Li, F.; Guo, G.; Xiu, Y.; Yan, H.; Zhao, L.; Gao, S.; Fu, Y. Preparation and characterization of betulin/methyl beta cyclodextrin inclusion complex electrospun nanofiber: Improving the properties of betulin. *Industrial Crops and Products* 2024, 209, 117974.

Zhang, Z.; Elsohly, H.N.; Jacob, M.R.; Pasco, D.S.; Walker, L.A.; Clark, A.M. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. *Planta Medica* 2002, 68(1), 49-54.

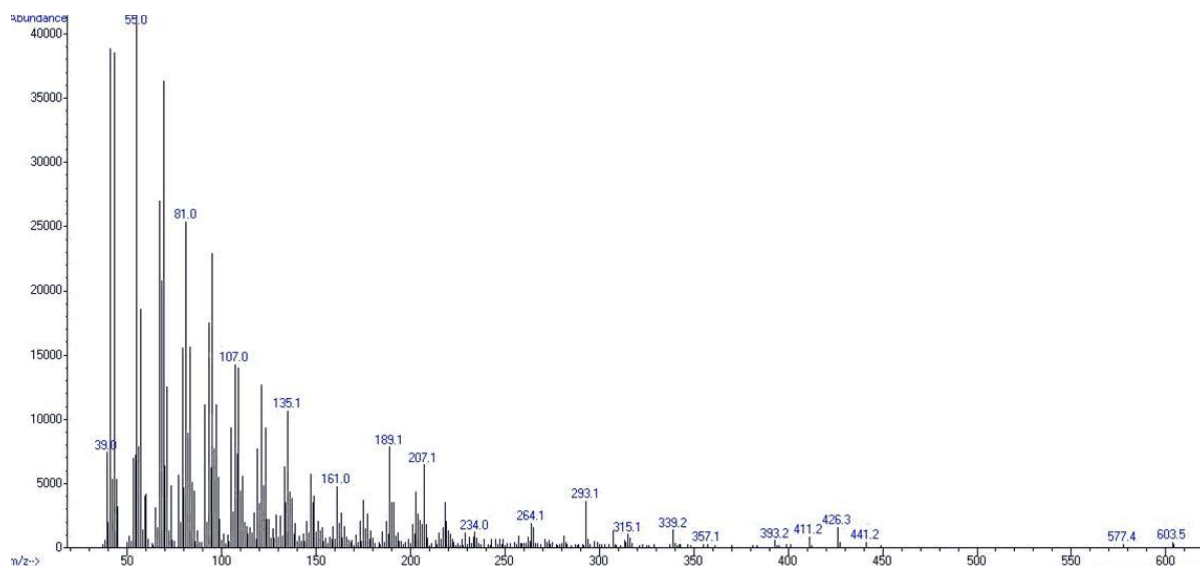
Zhao, G.J.; Tang, S.L.; Lv, Y.C.; Ouyang, X.P.; He, P.P.; Yao, F.; Chen, W.J.; Lu, Q.; Tang, Y.Y.; Zhang, M.; Fu, Y.; Zhang, D.W.; Yin, K.; Tang, C.K. Antagonism of betulinic acid on LPS-mediated inhibition of ABCA1 and cholesterol efflux through inhibiting NF- κ B signaling pathway and miR-33 expression. *PLoS ONE* 2013, 8(9), e74782.

Zhou, Z.; Zhu, C.; Cai, Z.; Zhao, F.; He, L.; Lou, X.; Qi, X. Betulin induces cytochrome c release and apoptosis in colon cancer cells via NOXA. *Oncology Letters* 2018, 15(5), 7319-7327.

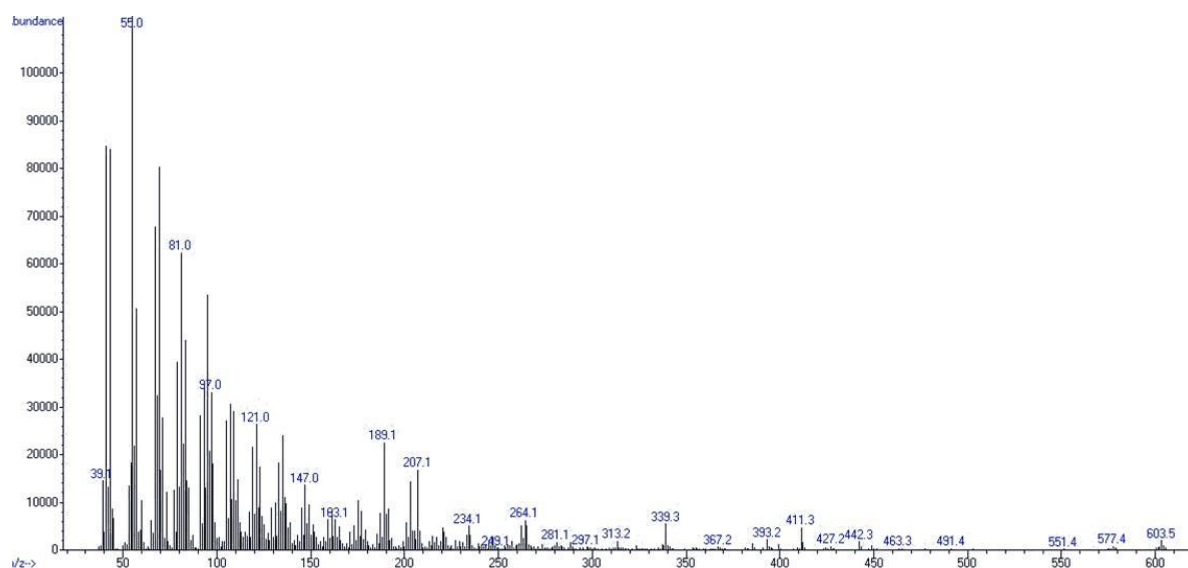
Zielińska-Błajet, M.; Feder-Kubis, J. Monoterpenes and their derivatives-Recent development in biological and medical applications. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21(19), 7078.

PRILOZI

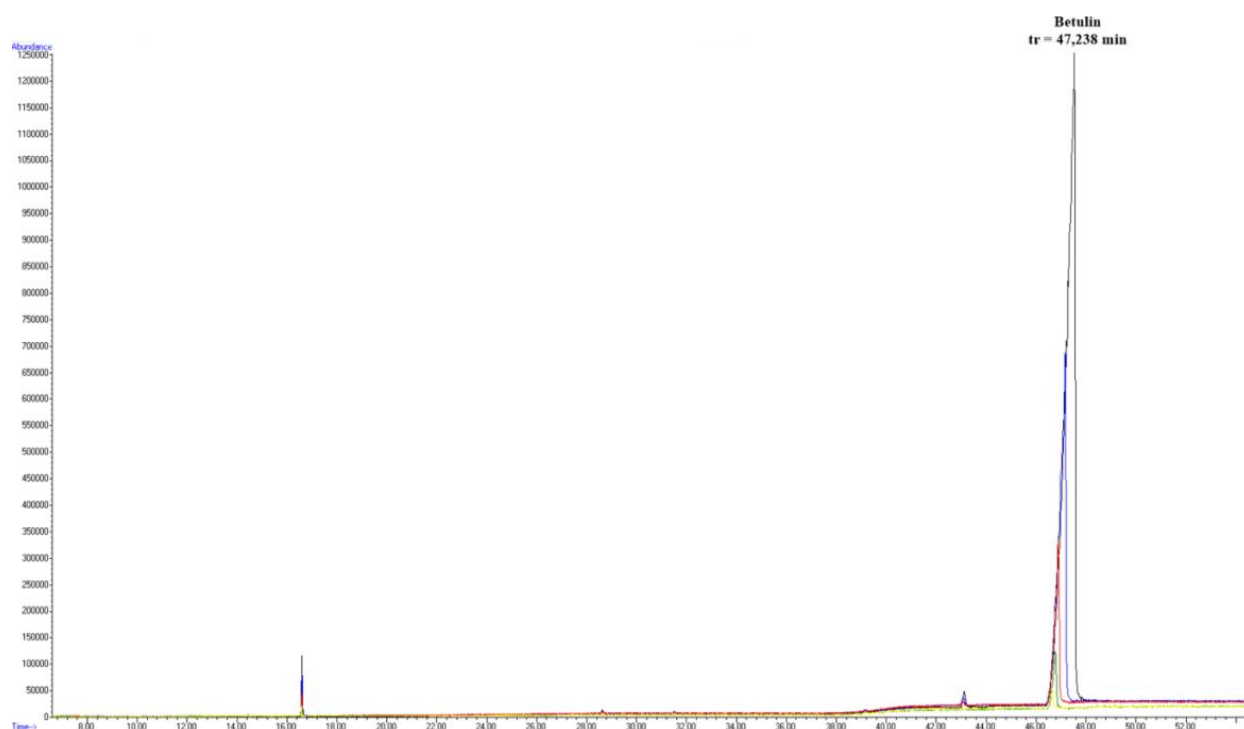
Prilog 1



Slika P1. Maseni spektar komponente koja se javlja na retencionom vremenu 38 min u GC hromatogramima ispitivanih uzoraka (dietil-etarskim i etil-acetatnim ekstraktima suvog etanolnog ekstrakta i taloga izdvojenog tokom ekstrakcije kore breze)



Slika P2. Maseni spektar komponente koja se javlja na retencionom vremenu 50 min u GC hromatogramima ispitivanih uzoraka (dietil-etarskim i etil-acetatnim ekstraktima suvog etanolnog ekstrakta i taloga izdvojenog tokom ekstrakcije kore breze)



Slika P3. Uporedni prikaz GC-MS hromatograma dietil-etarskih rastvora standarda BE različitih koncentracija (0,37-6 mg/cm³)

BIOGRAFIJA

Marijana Vladimirov je rođena 07.03.1989. god. u Nišu. Osnovnu školu završila je u Medoševcu 2004. god., sa odličnim uspehom i Vukovom diplomom, kao učenik generacije. Srednju medicinsku školu u Nišu, smer farmaceutski tehničar, završila je 2007.god., sa odličnim uspehom. Godine 2007., upisala je Integrisane akademske studije farmacije na Medicinskom fakultetu u Nišu. Fakultet je završila 2012.god. sa prosečnom ocenom 8,79. Diplomski rad pod nazivom „Primena opijatnih analgetika u terapiji kancerskog bola“ odbranila je ocenom 10, i time stekla zvanje Magistra farmacije.

Po završetku studija i pripravničkog staža u Apotekarskoj ustanovi Niš, položila je Stručni ispit za diplomirane farmaceute 2013.god., pred Ministarstvom zdravlja Republike Srbije. Profesionalnu karijeru započela je 2013. god., radom u Apotekarskoj ustanovi „Nikolić i sinovi“, a od 2015.god. radi u Apotekarskoj ustanovi „Dr.Max“. Član je raznih komisija u ustanovi i mentor magistrima farmacije i farmaceutskim tehničarima tokom obavljanja školske i studentske prakse, i stručnog osposobljavanja u okviru pripravničkog staža. Član je i nosilac licence Farmaceutske komore Srbije. Kontinuirano se stručno usavršava i pohađa edukacije iz oblasti farmacije i medicine.

Stručno usavršavanje nastavlja školske 2015/2016 god., upisom Doktorskih akademskih studija na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, smer Tehnološko inženjerstvo. Položila je sve ispite predviđene planom i programom, sa prosečnom ocenom 10. Kandidat se bavi naučno-istraživačkim radom u oblasti farmaceutsko-tehnološkog inženjerstva. Autor je i koautor naučnih radova publikovanih u časopisima međunarodnog i nacionalnog značaja.

Kandidat odlično govori engleski jezik, poseduje osnovno znanje nemačkog jezika, i aktivno se služi računarom i internetom.

BIBLIOGRAFIJA

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

1. **Marijana S. Vladimirov**, Vesna D. Nikolic, Ljiljana P. Stanojevic, Jelena S. Stanojevic, Ljubisa B. Nikolic, Bojana R. Danilovic, Valentina D. Marinkovic, Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activity of Birch (*Betula pendula* Roth.) Buds Essential Oil, Journal of Essential Oil Bearing Plants 2019, 22(1), 120-130.

Rad u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (M24)

1. **Marijana S. Vladimirov**, Vesna D. Nikolić, Ljiljana P. Stanojević, Ljubiša B. Nikolić, Ana D. Tačić, COMMON BIRCH (*Betula pendula* Roth.) – CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ISOLATES, Advanced Technologies 2019, 8(1), 65-77.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

1. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Ana Dinić, Ivana Gajić, **Marijana Vladimirov**, Natalija Tošić, Vesna Nikolić, Vojkan Miljković, The release of curcumin from thermo-sensitive copolymer, Book of Abstracts, 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, Novi Sad, 20-22.10.2022., p 174, ISBN-978-86-6253-160-5.
2. **Marijana Vladimirov**, Ana Dinić, Vesna Nikolić, Maja Urošević, Ivana Gajić, Ljubiša Nikolić, Vesna Savić, Inclusion complex of betulin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation, characterization and testing of phase solubility, Book of Abstracts, 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, Novi Sad, 20-22.10.2022., p 178, ISBN-978-86-6253-160-5.
3. **Marijana Vladimirov**, Ana Dinić, Vesna Nikolić, Maja Urošević, Ivana Gajić, Ljubiša Nikolić, Vojkan Miljković, preparation and characterization of betulinic acid inclusion complex with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Book of Abstracts, 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, Novi Sad, 20-22.10.2022., p 179, ISBN-978-86-6253-160-5.

4. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Ivana Gajić, Ana Dinić, Snežana Ilić-Stojanović, **Marijana Vladimirov**, Natalija Tošić, Vojkan Miljković, The influence of cross-linker on the swelling process of poly(N-isopropylmethacrylamide-co-N isopropylacrylamide), Book of Abstracts, XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Banja Luka, 21.-22.10.2022., p 62, ISBN-978-99938-54-96-8.
5. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Ivana Gajić, Ana Dinić, Snežana Ilić-Stojanović, **Marijana Vladimirov**, Natalija Tošić, Vojkan Miljković, Characterization of synthesized thermosensitive hydrogels, Book of Abstracts, XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Banja Luka, 21.-22.10.2022., p 63, ISBN-978-99938-54-96-8.
6. Natalija Tošić, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ivana Gajić, Maja Urošević, Ana Dinić, **Marijana Vladimirov**, Antioxidant activity of commercial and isolated essential oil of indian frankincense (*Boswellia serrata*), Book of Abstracts, XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Banja Luka, 21.-22.10.2022., p 64, ISBN-978-99938-54-96-8.
7. Ivana Gajić, Ana Dinić, Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Natalija Tošić, **Marijana Vladimirov**, Ivan Ristić, Ljiljana Stanojević, In vitro release of biochanin A from the electrospun poly(vinylpyrrolidone) nanofibers, Book of Abstracts, XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Banja Luka, 21.-22.10.2022., p 67, ISBN-978-99938-54-96-8.
8. **Marijana Vladimirov**, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ana Dinić, Maja Urošević, Ivana Gajić, Natalija Tošić, Ljubiša Nikolić, Antioxidant activity of betulin, betulinic acid and white birch bark extract (*Betula pendula*), Book of Abstracts, XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Banja Luka, 21.-22.10.2022., p 68, ISBN-978-99938-54-96-8.
9. **Marijana Vladimirov**, Vesna Nikolić, Jelena Stanojević, Ana Dinić, Maja Urošević, Ivana Gajić, Ljubiša Nikolić, GC-MS analysis of the white birch bark extract (*Betula*

pendula), Book of Abstracts, XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Banja Luka, 21.-22.10.2022., p 69, ISBN-978-99938-54-96-8.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

- 1 **Marijana Stojković**, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ljubiša Nikolić, Ana Tačić, Bojana Danilović, The chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from birch buds, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, June 16-19. Jun 2016, Kopaonik, Book of abstracts, pp. 99-100.
- 2 **Marijana Stojković**, Vesna Nikolić, Slobodan Petrović, Ljiljana Stanojević, Ana Tačić, Ljubiša Nikolić, Ljiljana Takić, Saša Savić, Analysis of macro and microelements in birch sap (*Betula pendula*), Book of abstracts, 12th Symposium „Novel technologies and economic development“, October 20-21, 2017. Leskovac, p. 66, ISBN 978-86-89429-25-1.
- 3 **Marijana Vladimirov**, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Ljubiša Nikolić, Ana Tačić, Maja Urošević, GC-MS Analysis of triterpenes from white birch bark (*Betula pendula*), Book of abstracts, 13th symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, 18.-19. 10.2019., PHCE-5, pp 69, ISBN 978-86-89429-35-0.
- 4 Ana Tačić, Ivana Nikolić, Maja Urošević, **Marijana Vladimirov**, Ljiljana Stanojević, Vesna Nikolić, Vesna Savić, Characterization and phase solubility study of benzocaine:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex, 13th symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, 18.-19.10.2019., Book of abstracts, PHCE-6, pp 70, ISBN 978-86-89429-35-0.
- 5 Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović, **Marijana Vladimirov**, Ivana Nikolić, Ana Tačić, Aleksandar Zdravković, Structural characterization of synthesized copolymer hydrogels of poly(*N*-isopropylmethacrylamide-*co*-*N*-isopropylacrylamide) and analysis of residual reactants, 13th symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, 18.-19.10.2019., Book of abstracts, PE-8, pp 114, ISBN 978-86-89429-35-0.

6. Ana Tačić, Ivana Nikolić, Maja Urošević, **Marijana Vladimirov**, Ljiljana Stanojević, Vesna Nikolić, Vesna Savić, Characterization and phase solubility study of benzocaine:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex, Book of abstracts, 13th symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, 18.-19. 10.2019., PHCE–6, p 70, ISBN-978-86-89429-35-0.

7. Ljubiša Nikolić, Maja Urošević, Vesna Nikolić, Ana Dinić, Ivana Gajić, **Marijana Vladimirov**, Ljiljana Takić, The synthesis and characterization of thermosensitive copolymer hydrogels poly(N-isopropylmethacrylamide-co-N-isopropylacrylamide), Book of Abstracts, 15th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 20-21, 2023., PE – 6, , p. 100, ISBN- 978-86-89429-56-5.

8. **Marijana Vladimirov**, Vesna Nikolić, Jelena Stanojević, Ljubiša Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ivana Gajić, Ana Dinić, Maja Urošević, Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from white birch leaves (*Betula pendula* Roth), Book of Abstracts, 16th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 17-18, 2025., OCT-2, p.56, ISBN-978-86-89429-60-2.

9. **Marijana Vladimirov**, Vesna Nikolić, Aleksandra Milenković, Ljiljana Stanojević, Ljubiša Nikolić, Ana Dinić, Tatijana Mihajlov-Krstev, Total phenol and flavonoid content and antimicrobial activity of isolates from white birch (*Betula pendula* Roth), Book of Abstracts, 16th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 17-18, 2025., OCT-3, p.57, ISBN-978-86-89429-60-2.

10. Vojkan Miljković, Ljubiša Nikolić, Maja Urošević, Snežana Ilić-Stojanović, Vesna Nikolić, Ivana Gajić, Ana Dinić, **Marijana Vladimirov**, Natalija Tošić Mirković, Testing the influence of monomer content, crosslinker concentration, and temperature on the swelling of thermos-sensitive hydrogels, Book of Abstracts, 16th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 17-18, 2025., PE - 4, p.78, ISBN-978-86-89429-60-2



ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Хемијска карактеризација и анализа биолошке активности изолата из брезе
(*Betula pendula* Roth.)

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио ауторска права, нити злоупотребио 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 Нишу,

Потпис аутора дисертације:



ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов дисертације:

Хемијска карактеризација и анализа биолошке активности изолата из брезе
(*Betula pendula* Roth.)

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

У Нишу

Потпис аутора дисертације:



ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

Хемијска карактеризација и анализа биолошке активности изолата из брезе (*Betula pendula* Roth.)

Дисертацију са свим прилозима предао 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 одлучио.

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 Нишу,

Потпис аутора дисертације:
