



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Никола З. Срећковић

**ФИТОХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА
ЕКСТРАКТА БИЉАКА *LYTHRUM SALICARIA* L. И
SALVIA PRATENSIS L., ЊИХОВА БИОЛОШКА
АКТИВНОСТ И ПОТЕНЦИЈАЛНА ПРИМЕНА У
СИНТЕЗИ НАНОЧЕСТИЦА СРЕБРА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Nikola Z. Srećković

**PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF
LYTHRUM SALICARIA L. AND *SALVIA PRATENSIS*
L. EXTRACTS, THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY AND
POTENTIAL APPLICATION IN SILVER
NANOPARTICLES SYNTHESIS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Аутор
Име и презиме: Никола З. Срећковић
Датум и место рођења: 15. 4. 1993., Крагујевац
Садашње запослење: <i>Истраживач сарадник, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
Докторска дисертација
Наслов: Фитохемијска карактеризација екстракта биљака <i>Lythrum salicaria</i> L. и <i>Salvia pratensis</i> L., њихова биолошка активност и потенцијална примена у синтези наночестица сребра
Број страница: 191
Број слика: 67
Број библиографских података: 314
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област (УДК): Хемија – Биохемија (577.1)
Ментор: др Владимир Михаиловић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 20.08.2020.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-01-832/6, 18.11.2020.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. др Владимир Михаиловић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Ужа научна област: Биохемија 2. др Владимир Бешкоски, ванредни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду, Ужа научна област: Биохемија (председник комисије) 3. др Данијела Мишић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду, Научна област: Биологија 4. др Милан Младеновић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Ужа научна област: Биохемија 5. др Јелена С. Катанић Станковић, научни сарадник, Институт за информационе технологије Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу, Научна област: Хемија
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
1. др Данијела Мишић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду, Научна област: Биологија (председник комисије) 2. др Само Крефт, редовни професор, Фармацеутски факултет, Универзитет у Љубљани, Словенија, Ужа научна област: Фармацеутска биологија 3. др Владимир Бешкоски, редовни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду, Ужа научна област: Биохемија 4. др Ненад Вуковић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Ужа научна област: Биохемија 5. др Милош Матић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија
Датум одбране дисертације: 2024. године

ЗАХВАЛНИЦА

Експериментални део докторске дисертације урађен је у лабораторији за Биохемију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Део истраживања урађен је на Факултету за физичку хемију, Универзитета у Београду, Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, и на Универзитету Федерико II у Напуљу (Депарتمان за хемијске науке), Италија.

Највећу захвалност дугујем свом ментору др Владимиру Михаиловићу, доценту Природно-математичког факултета у Крагујевцу, који је и предложио тему ове дисертације и без кога ово научно дело не би било у оваквом облику каквом је сада. Искрено му се захваљујем на саветима, пруженој помоћи и мотивацији током израде докторске дисертације и писања свих радова, као и многобројним идејама које су великим делом остварене.

Велику захвалност желим да упутим др Јелени Катанић Станковић, вишем научном сараднику Института за информационе технологије у Крагујевцу, на чији сам наговор и уписао докторске студије и која је увек била уз мене како у лепим тако и у тешким тренуцима. Велико хвала на корисним саветима, на стрпљењу и одговорима на безброј мојих питања, као и на великој помоћи и корисним саветима који су ми олакшали израду ове докторске дисертације.

Желим да се захвалим ментору и свим члановима комисије на прегледању рукописа дисертације, на свим сугестијама и корисним саветима којима су допринели квалитету дисертације. Такође, желим да се захвалим др Данијели Мишић са Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ на помоћи при фитохемијској карактеризацији биљних екстраката, проф. др Милану Станковићу са Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу на помоћи при идентификацији биљних врста, др Зорану Недићу са Факултета за физичку хемију и др Силвани Димитријевић са Института за рударство и металургију у Бору на помоћи при карактеризацији синтетисаних наночестица сребра, др Сањи Матић на испитивању антигенотоксичних активности биљних екстраката, као и истраживачкој групи проф. др Дарије Монти (Универзитет Федерико II у Напуљу) на изузетној сарадњи.

Захваљујем се свим колегама са Института за хемију, Природно-математичког факултета, а посебно колегама из Лабораторије за биохемију на колегијалности, разумевању, сарадњи и лепим тренуцима проведеним заједно.

Неизмерну захвалност дугујем својој породици, родитељима Зорану и Радмили, брату Слободану и девојци Емилији без чије безусловне подршке и помоћи израда ове докторске дисертације не би била могућа. Хвала вам на свему!

Никола З. Срећковић

Сажетак

У оквиру истраживања која су обухваћена овом докторском дисертацијом одређен је фенолни профил и неки аспекти фармаколошке примене метанолних екстраката надземних делова и корена биљака *Lythrum salicaria* L. и *Salvia pratensis* L., које имају употребу у народној медицини. Утврђено је да обе биљне врсте поседују високе концентрације фенолних једињења, нарочито *S. pratensis* која је богата рузмаринском киселином и њеним дериватима. Идентификована фенолна једињења у екстрактима показала су висок степен биодоступности током процеса *in vitro* гастроинтестиналне дигестије. У складу са високим садржајем фенолних једињења, екстракти су показали изражен антиоксидативни ефекат и могућност заштите ДНК од оксидативног оштећења у *in vitro* условима. Екстракти обе биљке испољили су слабу до умерену антимикуробну активност, као и биокомпатибилност са здравим хуманим кератиноцитима коже (HaCaT) у концентрацијама до 100 µg/mL, док су екстракти корена обе биљке показали цитотоксичан ефекат према канцерогеним ћелијама.

Узимајући у обзир да су *L. salicaria* и *S. pratensis* поседовале висок садржај фенолних једињења и изражену антиоксидативну активност, њихови водени екстракти искоришћени су у зеленој синтези наночестица сребра (AgNP). Добијене AgNP су показале висок степен антибактеријске активности, док је антиоксидативна активност синтетисаних AgNP нижа у поређењу са одговарајућим екстрактима. Наночестице нису показале хемолитичку активност у концентрацијама до 150 µg/mL, док наночестице *S. pratensis* нису испољиле ни цитотоксични ефекат (до 200 µg/mL) према ћелијама канцера и нормалним ћелијама. *L. salicaria* AgNP биле су ефикасне у смањењу раста канцерогених ћелија (IC₅₀ од 12,7 до 62 µg/mL). Обе врсте AgNP показале су се као ефикасни катализатори у реакцијама редукције полутаната.

Кључне речи: *Lythrum salicaria* L.; *Salvia pratensis* L.; Наночестице сребра; Фенолне киселине; Рузмаринска киселина; Флавоноиди; *In vitro* дигестија; Антиоксидативна активност; Антимикуробна активност; Антигенотоксичност; Цитотоксична активност; Каталитичка активност металних наночестица

Abstract

The phenolic profile and some aspects of the pharmacological application of methanolic extracts of *Lythrum salicaria* L. and *Salvia pratensis* L. aerial parts and roots, plants used in folk medicine, were determined within the scope of the research included in this PhD thesis. It was found that both plant species have high concentrations of phenolic compounds, especially *S. pratensis*, which is rich in rosmarinic acid and its derivatives. The identified phenolic compounds in the extracts showed a high degree of bioavailability during the process of *in vitro* gastrointestinal digestion. In accordance with the high content of phenolic compounds, the extracts showed a pronounced antioxidant effect and the ability to protect DNA from oxidative damage under *in vitro* conditions. Extracts of both plants showed weak to moderate antimicrobial activity, as well as biocompatibility with healthy human skin keratinocytes (HaCaT) in concentrations up to 100 µg/mL, while root extracts of both plants showed a cytotoxic effect against cancerous cells.

Considering that *L. salicaria* and *S. pratensis* possessed a high content of phenolic compounds and pronounced antioxidant activity, their aqueous extracts were used for the green synthesis of silver nanoparticles (AgNP). The obtained AgNPs showed a high antibacterial activity, while the antioxidant activity of the synthesized AgNPs was lower compared to the corresponding extracts. Nanoparticles did not show hemolytic activity in concentrations up to 150 µg/mL, and *S. pratensis* nanoparticles did not show a cytotoxic effect (up to 200 µg/mL) towards cancer cells and normal cells. *L. salicaria* AgNPs were effective in reducing the growth of cancer cells (IC₅₀ from 12.7 to 62 µg/mL). Both types of AgNPs proved to be effective catalysts in reactions of pollutants reduction.

Keywords: *Lythrum salicaria* L.; *Salvia pratensis* L.; Silver nanoparticles; Phenolic acids; Rosmarinic acid; Flavonoids; *In vitro* digestion; Antioxidant activity; Antimicrobial activity; Antigenotoxicity; Cytotoxic activity; Catalytic activity of metal nanoparticles

Садржај

1. УВОД.....	1
2. ОПШТИ ДЕО.....	6
2.1. Основне карактеристике фамилија <i>Lythraceae</i> и <i>Lamiaceae</i>	7
2.2. Карактеристике и традиционална употреба биљака рода <i>Lythrum</i> и <i>Salvia</i>	9
2.3. Основне карактеристике и традиционална употреба биљака <i>Lythrum salicaria</i> L. и <i>Salvia pratensis</i> L.	12
2.3.1. Секундарни метаболити биљака рода <i>Lythrum</i> и њихов фармаколошки потенцијал.....	15
2.3.2. Секундарни метаболити биљака рода <i>Salvia</i> и њихов фармаколошки потенцијал.....	23
2.3.2.1. Липофилна једињења биљака рода <i>Salvia</i>	24
2.3.2.2. Хидрофилна једињења биљака рода <i>Salvia</i>	28
2.4. Фармаколошки потенцијал лековитих биљака.....	38
2.4.1. Оксидативни стрес као покретач многих здравствених обољења	38
2.4.1.1. Егзогени антиоксиданти у улози регулације оксидативног стреса	42
2.4.2. Једињења биљног порекла као антимикробни агенси	44
2.4.3. Биљке као извор антиканцерогених једињења	47
2.5. Наночестице	51
2.5.1. Синтеза наночестица	52
2.5.2. Зелени приступ синтезе наночестица	55
2.5.3. Употреба биљака у зеленој синтези наночестица сребра	56
2.5.4. Основне карактеристике и потенцијална примена наночестица сребра	59
2.5.5. Антимикробна активност наночестица сребра	61
2.5.6. Цитотоксична активност наночестица сребра	62
2.5.7. Каталитичка активност наночестица сребра	65
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	68
3.1. Биљни материјал и припрема метанолских екстраката за фитохемијска испитивања и одређивање биолошке активности	69
3.2. Инструменти и хемикалије	69
3.3. Одређивање садржаја фенолних једињења у екстрактима.....	70
3.3.1. Одређивање садржаја укупних фенолних једињења.....	70
3.3.2. Одређивање укупног садржаја флавоноида	71
3.3.3. Одређивање укупног садржаја флавонола	72
3.3.4. Одређивање укупног садржаја фенолних киселина	72
3.3.5. Одређивање укупног садржаја кондензованих танина	73
3.3.6. Одређивање садржаја мономерних и укупних антоцијана.....	73
3.4. Одређивање фенолног профила метанолских екстраката	75
3.4.1. HPLC-PDA анализа екстраката надземног дела и корена биљке <i>L. salicaria</i>	75
3.4.2. UHPLC/MS-MS анализа надземног дела и корена биљке <i>S. pratensis</i>	76
3.4.3. UHPLC-DAD/(-)HESI-MS/MS квантитативна анализа надземног дела и корена биљке <i>S. pratensis</i> L.	76
3.5. Биосинтеза наночестица сребра (AgNPs) помоћу водених екстраката биљака <i>L. salicaria</i> и <i>S. pratensis</i>	77
3.5.1. Припрема водених екстраката биљака <i>L. salicaria</i> и <i>S. pratensis</i>	77
3.5.2. Фитохемијска анализа водених екстраката биљака	77
3.5.3. Оптимизација услова синтезе наночестица сребра	77

3.5.4.	Методе карактеризација синтетисаних наночестица сребра	78
3.5.4.1.	UV-Vis спектрофотометрија.....	78
3.5.4.2.	Рендгенска дифракциона (XRPD) анализа наночестица	78
3.5.4.3.	Скенирајућа електронска микроскопија са енергетски дисперзионом спектроскопијом (SEM/EDS)	78
3.5.4.4.	Одређивање расподеле величина наночестица.....	79
3.5.4.5.	Карактеризација узорака инфрацрвеном спектроскопијом Фуријеове трансформације (FT-IR)	79
3.6.	Одређивање антиоксидативне активности екстраката и синтетисаних наночестица.....	79
3.6.1.	Одређивање укупне антиоксидативне активности метанолских екстраката 79	
3.6.2.	Одређивање ефикасности неутрализације DPPH радикала.....	80
3.6.3.	Одређивање ефикасности неутрализације ABTS радикал катјона	81
3.6.4.	Одређивање ефикасности инхибиције липидне пероксидације.....	82
3.6.5.	Одређивање капацитета хелатизације екстраката	84
3.6.6.	Одређивање редуктивне активности екстраката	84
3.7.	Испитивање антигенотоксичне активности метанолских екстраката.....	85
3.7.1.	Одређивање степена инхибиције оштећења ДНК изазваног хидроксил радикалима.....	86
3.7.2.	Одређивање степена инхибиције оштећења ДНК изазваног пероксил радикалима.....	86
3.8.	Симулација <i>in vitro</i> гастроинтестиналне дигестије метанолских екстраката	87
3.9.	Испитивање антимикробне активности метанолских екстраката надземног дела и корена биљака <i>L. salicaria</i> и <i>S. pratensis</i> као и одговарајућих наночестица сребра.....	89
3.9.1.	Стерилизација лабораторијског прибора, хранљивих подлога и потребних раствора	89
3.9.2.	Припрема хранљивих подлога и култивисање микроорганизама	89
3.9.3.	Припрема суспензија микроорганизама (инокулума).....	90
3.9.4.	Одређивање минималне инхибиторне концентрације (MIC) екстраката и наночестица микродилуционом методом	90
3.10.	Процена цитотоксичне активности метанолских екстраката и синтетисаних наночестица.....	91
3.11.	DCFDA (2',7'-дихлорофлуоресцин диацетат) тест антиоксидативне активности на HaCaT ћелијској линији.....	93
3.12.	Хемолитичка активност синтетисаних наночестица сребра	93
3.13.	Каталитички потенцијал наночестица сребра	94
3.13.1.	Каталитичка деградација конго црвене боје	95
3.13.2.	Каталитичка деградација 4 – нитрофенола	95
4.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	96
4.1.	Фитохемијска анализа метанолских екстраката надземних делова и корена биљака <i>L. salicaria</i> и <i>S. pratensis</i> и њихове биолошке активности	97
4.1.1.	Садржај различитих класа фенолних једињења у испитиваним екстрактима.....	97
4.1.2.	Фенолни профил екстраката	98
4.1.3.	Антиоксидативна активност испитиваних екстраката.....	107
4.1.4.	Биодоступност полифенолних једињења током симулиране <i>in vitro</i> гастроинтестиналне дигестије.....	112
4.1.5.	Антимикробна активност испитиваних екстраката.....	117

4.1.5.1. Антибактеријски потенцијал екстракта биљака <i>L. salicaria</i> и <i>S. pratensis</i>	117
4.1.5.2. Антифунгални потенцијал екстракта биљака <i>L. salicaria</i> и <i>S. pratensis</i>	119
4.1.6. Процена заштитне улоге екстракта на ДНК оштећења изазвана хидроксил и пероксил радикалима	120
4.1.7. Цитотоксична активност екстракта биљака <i>L. salicaria</i> и <i>S. pratensis</i>	125
4.2. Наночестице сребра добијене коришћењем екстракта биљака <i>L. salicaria</i> и <i>S. pratensis</i>	128
4.2.1. Оптимални услови зелене синтезе наночестица сребра помоћу екстракта биљака <i>L. salicaria</i> и <i>S. pratensis</i>	128
4.2.2. Карактеризација добијених наночестица	133
4.2.2.1. Рендгенска структурна анализа (XRPD)	133
4.2.2.2. FT-IR (<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>) анализа	134
4.2.2.3. SEM/EDS (<i>Scanning Electron Microscope/Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>) анализа	136
4.2.2.4. Величина добијених наночестица у раствору одређена помоћу DLS (<i>Dynamic Light Scattering</i>) анализе	138
4.2.3. Фитохемијска карактеризација водених екстракта надземних делова и корена биљака <i>L. salicaria</i> и <i>S. pratensis</i>	140
4.2.4. Антиоксидативни потенцијал водених екстракта и синтетисованих наночестица сребра	141
4.2.5. Антимикробни потенцијал синтетисаних наночестица сребра.....	142
4.2.6. Цитотоксична активност синтетисаних наночестица сребра.....	145
4.2.7. Хемолитичка активност синтетисаних наночестица сребра	147
4.2.8. Каталитичка активност синтетисаних наночестица у реакцијама деградације конго црвене боје и 4-нитрофенола помоћу NaBH_4	149
5. ЗАКЉУЧАК	155
6. ЛИТЕРАТУРА	159
7. ПРИЛОГ	185
Листа скраћеница	188
Биографија	191



1. УВОД

Коришћење лековитих биљака датира још од најстаријих времена и може се сматрати претечом модерне медицине. Како се временом цивилизација развијала знање о бенефитима биљака било је све веће, па се временом дошло до закључка да се из биљака могу изоловати компоненте које су одговорне за њихову биолошку активност. Почетком 19. века долази до прекретнице у познавању и употреби лековитог биља. Откриће и изоловање алкалоида из различитих биљака означило је почетак научног апотекарства. Унапређењем хемијских метода откривене су и друге активне супстанце из лековитог биља, као што су танини, сапонозиди, етерична уља, витамини итд.

Међутим, почетком 20. века појавом синтетичких лекова долази до постепеног одбацивања лековитих биљака због њиховог споријег дејства у односу на лекове који су имали брже и ефикасније дејство [1]. Тај тренд се није дуго задржао због потенцијалних нуспојава синтетичких лекова. Данас се широм света све више узгајају стотине биљака како би се добиле корисне супстанце за медицину и фармацију [2]. Термин „етнофармација“ може бити најприкладнији да се нагласи ширина таквог приступа јер обухвата све релевантне дисциплине, фармакогнозију, фармакологију, фармацеутику, испоруку лекова, токсикологију, биодоступност и метаболомику. Такав приступ омогућава развој локалних ресурса у лекове и суплементе који ће се користити у примарној здравственој заштити. Према процени Светске здравствене организације, крајем 20. века 80% светске популације користило је биљке и биљне суплементе као примарну здравствену заштиту [3]. Постоје подаци да се у Сједињеним Америчким Државама (САД) данас више од 30% становништва ослања на биљне препарате уместо на медикаменте доказаног дејства. Овај податак поткрепљен је чињеницом да је последњих година продаја ехинацеје (*Echinacea purpurea* L.), биљке познате по многобројним лековитим особинама, порасла за 72% док је продаја кантариона (*Hypericum perforatum* L.), који је вековима познат у народу по свом антидепресивном дејству, порасла за невероватних 1900% [4]. Подаци о годишњој глобалној извозној вредности хиљада врста биљака са лековитим својствима процењена је на 2,2 милијарде америчких долара у 2012. години док је потенцијално глобално тржиште за ботаничке екстракте и лекове у 2017. години процењено на неколико стотина милијарди долара [5]. Данас се користе бројни производи добијени од лековитих биљака и, иако нуде многе могућности у контексту откривања лекова, фитохемијски аспекти таквих лекова заслужују посебну пажњу и ново су поље истраживања. Биљни екстракти остварују фармаколошку активност захваљујући присуству различитих типова биоактивних једињења у биљци. Они често садрже једињења попут алкалоида, флавоноида, фенолних киселина, терпеноида који истовремено могу да утичу на више фармаколошких циљева, за разлику од лекова заснованих на једном једињењу. На пример, могу да интерагују са ензимима и рецепторима у телу, да остваре антиоксидативну, антимикробну и антиканцерогену активност, као и да врше регулацију хормоналних нивоа [6]. Међутим, ово захтева јасну и добро дефинисану стратегију за карактеризацију таквих екстраката и биљака од којих су добијени.

Пошто је откривање лекова заснованих на природним производима повезано са неким суштинским потешкоћама, фармацеутска индустрија је свој главни фокус померила на формирању библиотичких база синтетичких једињења за откривање нових водећих лекова. Добијени резултати, међутим, нису испунили очекивања, што се види у опадању броја нових лекова који долазе на тржиште. Ова околност је обновила интересовање за откривање лекова заснованих на природним производима, упркос њиховој великој сложености, што заузврат захтева широке интердисциплинарне приступе истраживања [7]. Од 1073 нова хемијска ентитета који припадају групи малих молекула, а који су одобрена између 1981. и 2010. године, само 36% је било чисто

синтетичко, док је више од половине изведено из природних производа или инспирисано њима [7]. Значајан број ових једињења откривен је у вишим биљкама. Посебно истакнути примери природних једињења биљног порекла која су постали незамењиви за савремену фармакотерапију могу се наћи у области лекова против рака. На пример, паклитаксел и његови деривати из рода тиса (*Taxus*) и винкрестин и винбластин из биљке познате по називу винка (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Даљи значајни примери укључују инхибитор ацетилхолин-естеразе, галантамин, који је одобрен за лечење Алцхајмерове болести, а првобитно је откривен у *Galanthus nivalis* L., и важно антималяријско и потенцијално средство против рака артемисинин пореклом из традиционалне кинеске биљке *Artemisia annua* L. [7]. Поред њих значајни су и трипотолид, целастрол, капсиацин и куркумин [8]. Међутим, њихова прича истиче важност и потребу за сталним интердисциплинарним истраживањем како би се дошло до остварења фармацеутског потенцијала традиционалне терапије. Традиционални лекови нуде богат и, углавном, неистражен извор терапеутских предности за фармацеутску индустрију, док укључивањем етноботаничких и етнофармаколошких приступа истраживања ова грана индустрије може профитирати на много начина [9].

Ова прошла и садашња зависност од биљака даје подстицај етнофармаколошким студијама за проучавање њихове ефикасности, безбедности и потенцијала за откривање нових лекова. Фитоједињења су била и још увек су важан извор једињења из којих су изведени многи лекови за које и дан данас синтетичка хемија није пронашла адекватну замену. Оно што се може приметити прегледом научних радова који се налазе у *Scopus* бази јесте да се последњих година смањује број публикација које се базирају на култивацији биљних врста са доказаним фармаколошким потенцијалом, док расте тренд истраживања који је фокусиран на потрагу за новим лековима и једињењима из биљака која имају специфичну активност [2].

Етнофармакологија је мултидисциплинарна област истраживања која се бави посматрањем, описом и експерименталним истраживањем природних лекова и њихове биолошке активности. Данас је примена компјутеризованих база података учинила доступност информација свих новооткривених једињења биљног порекла широј научној заједници, што је од пресудног значаја за бржи развој и проналажење нових природних лекова. Ове базе података су сакупили широк спектар информација о карактеристикама биљака, лековитим својствима и биоактивним једињењима. Упркос широкој употреби биљака у етнофармакологији и савременој фармацеутици, традиционална знања о лековитим биљкама у многим заједницама тек треба да се истраже. Због мултидисциплинарне природе етнофармакологије, информације које прикупљају научници могу имати различите перспективе [3]. Пре петнаестак година, укупан број фитоједињења је био процењен на око 200.000 у целом биљном царству, са концентрацијама у распону од реда величине пМ за биљне хормоне до неколико стотина mM за главне растворљиве шећере. Међутим, у јануару 2017. PlantCyc база података (*Plant Metabolic Network*, енг.) (www.plantcyc.org/) је садржала само 5.128 једињења, док је YMDB база података метаболома квасца (*Yeast Metabolome Database*, енг.) садржала 16.042 једињења (www.ymdb.ca), а HMDB база људских метаболита (*Human Metabolome Database*, енг.) 42.003 једињења (<http://www.hmdb.ca/>) [10]. За многе од ових метаболита биљака, или биљне врсте које их поседују, потврђен је широк спектар фармаколошких активности као што су антиоксидативна [11], антиинфламаторна [12], антибактеријска и антифунгална [13–15], антиканцерогена [16], антидијабетична [17], неуропротективна [18] и многе друге [19]. Биљни препарати (чајеви, тинктуре, мацерати и етарска уља) су све популарнији широм света и имају обећавајући потенцијал за лечење, одржавање и побољшање здравља, као и превенцију и лечење неколико болести јер се сматрају безбеднијим и економичнијим у поређењу са савременим конвенционалним лековима

[20,21]. Биоактивни природни производи пружају флексибилнија средства и стратегије за лечење болести, као и нова решења за тренутне изазове лечења болести, као што су резистенција на лекове, токсични нежељени ефекти и рецидиви. Највећа предност лекова изведених из биљака јесте у њиховој биокомпатибилности са људским организмом, односно ниском токсичношћу. Међутим, иако се сваке године открива све више нових биоактивних природних једињења у лабораторијама, доказано је да само неколико њих има потенцијал за клиничке експерименте. Већина биолошки активних фитохемијских компоненти има разна ограничења. Наиме, њихова апсорпција и дистрибуција могу да буду ниске, а циљна специфичност је генерално ниска, што резултира ниском биодоступношћу, и смањеном биолошком активношћу. Поред тога, потребне су велике дозе да би се обезбедила лековита активност фитоједињења, а такође су нека од ових фитохемијских једињења осетљива на киселе услове и имају ниску стабилност, што за последицу има онемогућење клиничке примене [20,22,23].

Да би се превазишла ова ограничења, полифеноли се често стављају у различите носаче како би се побољшала њихова биорасположивост. Ово може повећати биокомпатибилност, спречити деградацију изазвану спољашњим окружењем и спречити интеракцију са другим компонентама у људском телу. Показало се да су материјали на бази наночестица одлични за капсулирање фенолних једињења и побољшање њихове биодоступности [24]. Штавише, недавно је развијена једна потпуно нова дисциплина која се бави синтезом наночестица различитих метала помоћу биљних екстраката, где фенолна једињења играју кључну улогу у редукцији и стабилизацији формираних наночестица. Рад са наночестицама је данас тема динамичног научног истраживања, наглашавајући примену наночестица у различитим областима, као што су електроника, катализа, биосензори, третман отпадних вода, биомедицина, фармацеутски производи и козметика. Употреба метала у медицинске сврхе повезана је и са њиховим нанодимензионираним облицима. Данас нанотехнологија поседује невероватан потенцијал и у терапијској и у дијагностичкој примени. Наноматеријали органског, неорганског и мешовитог порекла могу се користити као лекови, носачи, сонде, контрастна средства за снимање, биосензори, итд., али се такође брзо шире у здравству и козметици, чак и као производи широке потрошње. У настојању да створи светски каталог производа заснованих на нанотехнологији и помогне грађанима и привреди упозоравајући их на могуће последице нанотехнологије по здравље и животну средину, инвентар нанотехнолошких потрошачких производа (NCPI, *Nanotechnology Consumer Products Inventory*, енг.) је 2005. године покренуо Пројекат о новим нанотехнологијама. Први попис је навео око 54 производа 2005. године, док их је већ у 2013. години било 1814 од 622 компаније у 32 земље [25]. Од свих типова наночестица метала, наночестице сребра привлаче највећу пажњу због својих физичко-хемијских и биолошких особина. Области у којима се наночестице сребра најчешће примењују су медицина и фитнес (762 производа, 42%), као антимикробни, антифунгални агенси или дијететски суплементи, у козметици (пасте за зубе, дезодоранси, пудери за шминку и креме против старења) у текстилној индустрији (антибактеријски и антифунгални агенси, одећа отпорна на мрље и гужвање) и наравно у прехранбеној индустрији (најчешће као антибактеријски и антигљивични агенси у амбалажи за паковање, итд.). Сребро као најкоришћенији метални наноматеријал, присутан у 435 производа (24%), иако се често декларисани садржај у укупном сребру не поклапа са измереним вредностима. Наноматеријали су регулисани без посебних одредби у Сједињеним Америчким Државама као опасне хемијске супстанце исто као и пестициди, у складу са Законом о контроли токсичних супстанци (EPA, *Environmental Protection Agency*, енг.), док Федерални закон о храни, лековима и козметици (FDA, *Food and Drug Administration*, енг.) регулише њихову употребу као адитива за храну, лекове или козметику. Једном када је супстанца или

једињење проглашено „безбедним“ у једном облику, нема даљих контрола на истом материјалу у његовим нанодимензионалним дериватима и његова једињења су показала изванредна својства у области медицине и охрабрујуће резултате као терапеутици. Тренутно је више од 100 медицинских уређаја који садрже сребро одобрено за употребу од стране FDA [26].

Наночестице сребра (AgNPs) се припремају најчешће као метално сребро, али и као једињења AgCl и Ag₂O. Њихова својства варирају у зависности од њиховог састава, димензија, величине, облика, присуства средстава за затварање и премаза, површинског набоја, концентрације и колоидног стања, тако да је поређење њихових резултата као терапеутика прилично тешко [27]. Пре појаве првих антибиотика, за лечење разних инфекција поред различитих врста биљака као једно од најефикаснијих средстава користило се колоидно сребро које представља суспензију наночестица металног сребра у води. Међутим, појавом првих антибиотика интересовање за наночестице сребра брзо је опадало да би последње три деценије добило поново на интересовању због феномена све веће резистенције микроорганизама на стандардне антимикробне агенсе [26,28]. Сprovedен је огроман број испитивања утицаја наночестица сребра на широк спектар микроба, гљивица и паразита, заједно са новим начинима производње који би били ефикаснији, јефтинији, са већим приносима и еколошки прихватљивији [29]. До скоро, производња наночестица се заснивала само на физичким и хемијским техникама. Иако физичке методе не захтевају употребу разних токсичних хемикалија (редуктанти, растварачи и стабилизатори) који могу да се апсорбују на њихову површину и тако их учине непогодним за медицинску примену, оне су енергетски веома захтевне и због тога нису погодне за индустријску производњу. Конвенционално данас се највише користе хемијске методе иако постоје огромни недостаци. Најчешће је то редукција јона сребра како би се добиле чисте металне наночестице, затим се користе средства за стабилизацију или затварање како би се спречила њихова агрегација у кластере. Хемијска редукција се углавном заснива на редукцији сребро нитрата или сребро тетраоксида борхидридом, аскорбатом, цитратом или водоником да би се добиле стабилне колоидне дисперзије у растварачима. Као стабилизатори се користе сурфактанти и лиганди или полимери који садрже функционалне групе као што су поли(метакрилна киселина), поливинилпиролидон, поли (метил метакрилат) или поли (етилен гликол) [30,31].

Узимајући у обзир ниво загађења и генерисање отпада које различите индустријске гране, а нарочито хемијска индустрија, могу генерисати, савремена индустријска производња захтева производне процесе који су ефикаснији, са што мањом употребом токсичних хемикалија и што мањим утрошком енергије. Стога, интензивно се врше проучавања еколошки прихватљивих начина синтезе наночестица (тзв. „зелена синтеза“) коришћењем различитих микроорганизама, алги и биљака [32,33]. Употреба микроорганизама у синтези наночестица разних метала заснива се на редукцији јона метала биомолекулима њиховог нормалног метаболизма. Ови биомолекули, поред тога што учествују у синтези, делују као стабилизирајући агенси, чиме се између осталог обезбеђује већа биокомпатибилност [34]. Нађено је да неки микроорганизми својим нормалним метаболизмом могу да формирају наночестице метала. Тако на пример, *Pseudomonas strutzeri*, бактерија која је изалована из рудника сребра, у стању да редукује јоне сребра и акумулира формиране наночестице [35]. Међутим, употреба бактерија, гљива и плесни у синтези наночестица поседује низ недостатака, као што су могућност контаминације животне средине различитим микроорганизмима, одабир одговарајућег микроорганизама, обезбеђивање услова неопходних за њихов раст и развој, као и чињеница да сам поступак може бити спор [34,36].

Последњих година проучавање синтезе наночестица различитих метала, нарочито сребра, помоћу биљних екстраката је доста интензивно. До сада је публикован огроман број резултата о синтези наночестица злата, паладијума, платине, гвожђа, бакра и сребра помоћу различитих биљних екстраката [37–41]. Овакав начин синтезе је релативно брз, чист, одржив и економичан. Процес синтезе је прилично једноставан, а као растварач се најчешће користи вода тако да је метода у складу са принципима зелене хемије. Још једна предност коришћења биљака као редуктаната јесте што не захтева повишену температуру, тако да је сам процес врло економичан. Једна од бројних предности ове методе синтезе је то што су наночестице обogaћене фитоједињењима из биљака, чиме се додатно повећава биолошка активност и компатибилност наночестица [42]. Поред свих поменутих предности наночестица добијених овим поступком, добијене наночестице су врло стабилне те се поред коришћења у медицинске сврхе могу користити као сензори, али и у индустрији отпадних вода као катализатори [43]. Узимајући у обзир све већу отпорност бактерија и гљивица на стандардне антимицробне лекове па и на једињења биљног порекла, многи истраживачи су успешно синтетисали наночестице сребра користећи биљне екстракте како би добили агенсе са израженијим антимицробним својствима. Синтетисане наночестице сребра показале су импресиван потенцијал против бројних патогена, укључујући бактерије (и Грам-позитивне и Грам-негативне), гљивице, протозое, гриње и ларве [44]. Бројни радови, такође, потврђују и њихову антиканцерогену активност према неколико ћелијских линија канцера [45–48]. Сумирајући све наведено, огроман напредак који је већ постигнут у областима фитохемије, фармакогнозије али и нанотехнологије, може да послужи као мотивација за даља истраживања и усавршавања нових формулација која ће бити активнија и безбеднија од постојећих биљних и нано препарата.

Циљеви ове докторске дисертације су били да се испита фитохемијски састав и биолошке активности две биљне врсте, *Lythrum salicaria* L. и *Salvia pratensis* L., познате у народу као пурпурна врбица (поточњак) и ливадска жалфија. Обе биљне врсте имају дугу историју коришћења у традиционалној медицини народа на простору Европе. Међутим, било је недовољно научних сазнања о њиховом хемијском саставу и биолошким активностима. Након одређивања садржаја укупних фенолних једињења као и квалитативне и квантитативне анализе фенолних једињења присутних у метанолским екстрактима надземних делова и корена биљака спектрофотометријским и хроматографским методама, одређена је биодоступност идентификованих фенолних једињења у екстрактима помоћу симулиране дигестије у *in vitro* условима. Такође, испитана је антиоксидативна активност екстраката (укупна антиоксидативна активност, редуктивна активност, неутралисање ABTS радикал-катјона, неутралисање DPPH радикала, капацитет хелатизације и инхибиција липидне пероксидације), као и антибактеријска и антифунгална активност добијених екстраката. Антиоксидативна заштита на нивоу ДНК тестирана је у *in vitro* условима изазивањем оксидативног оштећења помоћу хидроксил и пероксил радикала. Тестирање цитотоксичне активности екстраката *L. salicaria* и *S. pratensis* на канцерогеним (A431 и SVT2) и здравим ћелијским линијама (HaCaT и BALB/c-3T3) спроведено је помоћу МТТ теста.

Циљ другог дела докторске дисертације фокусира се на еколошки прихватљиву синтезу наночестица сребра користећи водене екстракте надземног дела и корена истих биљних врста. Затим, оптимизацији синтезе наночестица и њиховој карактеризацији, као и одређивању антиоксидативне, антимицробне и цитотоксичне активност користећи исте методе као код испитивања метанолских екстраката. Такође испитана је хемолитичка активност наночестица, али и потенцијална каталитичка активност у деградацији конго црвене боје и 4-нитрофенола.



2. ОПШТИ ДЕО

2.1. Основне карактеристике фамилија Lythraceae и Lamiaceae

Фамилија Lythraceae припада реду Myrtales. Састоји се од једногодишњих или вишегодишњих заљастих биљака, ређе полужбунова и дрвећа. Све биљке ове фамилије су цветнице и подељене су у 32 рода, са око 620 различитих биљних врста [49]. Најкарактеристичнији родови су *Cuphea* (са око 275 врста), *Lagerstroemia* (56 врста), *Nesaea* (50 врста), *Rotala* (45 врста), и *Lythrum* (35 врста). Интересантно је да је фамилији Lythraceae недавно прикључен и нар (*Punica granatum*) који се раније налазио у фамилији Punicaceae. Биљке фамилије Lythraceae су распрострањене широм света, највише у тропима, али се могу наћи и у регионима са умереном климом, нарочито на западној хемисфери [50].

Економски значај ове фамилије обухвата разно дрвеће, биљке које могу да се користе за бојење (*Lawsonia inermis* L., кана), корове (*Trapa natans* L., водени кестен), бројне украсне сорте рода *Cuphea* spp., *Lagerstroemia indica*, (индијски јоргован), и *Lythrum* spp. (врбице). Најпознатије биљке фамилије Lythraceae приказане су на **Слици 1**. Многе биљке из рода *Lythrum* се користе у медицинске сврхе, а неке од њих налазе се и у Европској фармакопеји [51]. Такође, *Punica granatum* L. (нар) се користи у медицини и важно је воћно дрво, док су плодови воденог кестена важни за исхрану у појединим крајевима Кине [52].



Слика 1. Приказ најзначајнијих биљака породице Lythraceae (А - *Trapa natans* L., водени кестен; Б - *Punica granatum* L., нар; В - *Cuphea ignea* A.DC., цигарет биљка; Г – *Lythrum salicaria* L., пурпурна врбица; Д - *Lawsonia inermis* L., кана).¹

¹ А <https://www.invasive.org/alien/pubs/midatlantic/trna.htm>

Б https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e6/Punica_granatum_004.JPG

В https://en.wikipedia.org/wiki/Cuphea_ignea#/media/File:Cuphea_ignea-IMG_9713.JPG

Г <https://www.gardenersworld.com/plants/lythrum-salicaria-robin/>

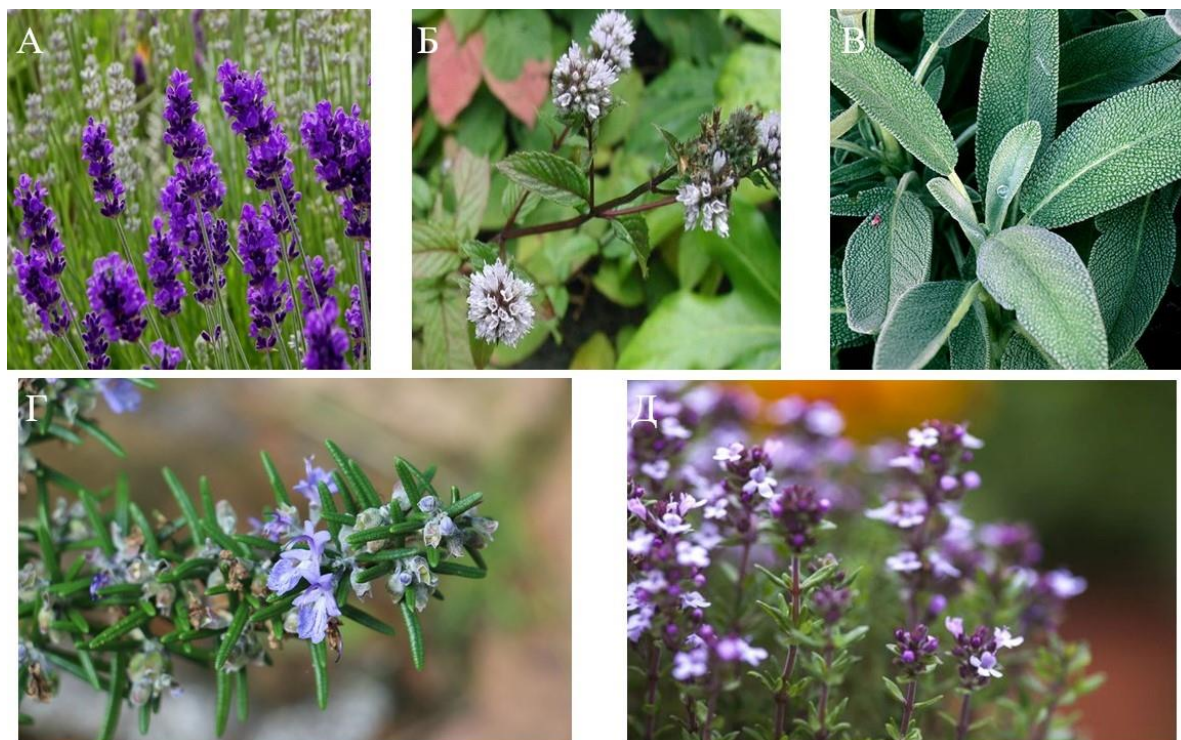
Д [https://en.wikipedia.org/wiki/Lawsonia_inermis#/media/File:Lawsonia_inermis_\(3709419835\).jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Lawsonia_inermis#/media/File:Lawsonia_inermis_(3709419835).jpg)

За разлику од фамилије *Lythraceae*, која је оскуднија у броју родова и врста, фамилија *Lamiaceae* или *Labiatae* (уснатице) је породица цветних биљака са космополитском дистрибуцијом која садржи око 236 родова и за које се претпоставља да садржи од 6900 до 7200 врста. Највећи родови су *Salvia* (са преко 900 врста), *Scutellaria* (360 врста), *Stachys* (300 врста), *Plectranthus* (300 врста), *Hyptis* (280 врста), *Teucrium* (250 врста), *Vitex* (250 врста), *Thymus* (220 врста) и *Nepeta* (200 врста). Многи од њих се користе као зачини и поврће [53,54].

Фамилију *Lamiaceae* чине једногодишње или вишегодишње зељасте биљке или жбуње, често ароматичних карактеристика [55]. Широка распрострањеност ових биљака на готово свим насељеним континентима допринела је великој интеракцији са људима. Због тога од античких времена су постепено откривани бенефити биљака породице *Lamiaceae* на здравље и укључиване су у третмане разних обољења и повреда [56].

Биљке фамилије *Lamiaceae* су значајне украсне, лековите и ароматичне биљке, од којих многе садрже етарска уља која се користе у традиционалној и савременој медицини, као и у фармацеутској и козметичкој индустрији. Традиционална примена биљака из породице *Lamiaceae* је у облику чајева, као средство за побољшање ароме или, као средства против инсеката. Од давнина се користе за олакшање болова у стомаку, код гасова и дијареје, за лечење разних инфекција, антиинфламаторних стања, као аналгетици и средства за умирење и код многих других обољења. Развојем науке, нарочито последњих деценија, терапеутска примена лековитих биљака доведена је у директну везу са присуством одговарајућих секундарних метаболита као што су алкалоиди, сапонини, флавоноиди, гликозиди, феноли, као и терпенска једињења која се могу изоловати из етарских уља, а за које је потврђено да имају различите фармаколошке активности. Између осталог, могу се користити у превентивне сврхе тј. за одржавање општег доброг здравља и то најчешће у облику зачина који поред додавања укуса храни могу побољшати варење [54,56].

Биљке ове фамилије имају изузетан економски значај, већина биљака је култивисана и користи се за добијање етарских уља и припрему чајева. Фамилија је најпознатија као извор кулинарског биља укључујући *Ocimum basilicum* L. (босиљак), *Origanum majorana* L. (мајоран), *Mentha piperita* L. (мента), *Origanum vulgare* L. (оригано), *Rosmarinus officinalis* L. (рузмарин), *Salvia officinalis* L. (жалфија), *Satureja hortensis* L. (чубар), *Thymus vulgaris* L. (тимијан) и *Lavandula angustifolia* L. (лаванда), од којих су неке приказане на **Слици 2**.



Слика 2. Приказ најзначајнијих биљака породице Lamiaceae (А - *Lavandula angustifolia* L., лаванда; Б - *Mentha piperita* L., питома нанна; В - *Salvia officinalis* L., жалфија; Г - *Rosmarinus officinalis* L., рузмарин; Д - *Thymus vulgaris* L., мајчина душица.²

2.2. Карактеристике и традиционална употреба биљака рода *Lythrum* и *Salvia*

Род *Lythrum* чини 38 врста цветних биљака које се могу наћи у појасу умерене климе. У Европи, Евро-Азији и Северној Африци су распрострањене 4 врсте (*Lythrum salicaria* L., *Lythrum virgatum* L., *Lythrum hyssopifolia* L. и *Lythrum tribracteatum* Salzm. ex Spreng.) и све се могу наћи у Србији (Слика 3) [57,58]. Генеричко име *Lythrum* потиче од грчке речи "luthron" што значи крв, што се односи на боју цветова али вероватно и на употребу као адстрингенса за заустављање крварења [59]. Амерички домороци користили су инфузију *Lythrum alatum* var. *lanceolatum* за лечење проблема са бубрезима [60]. Уобичајени назив биљака овог рода у енглеском језику је „loosestrife”, што у преводу може да значи врбица, а односи се на све биљке које носе усправне класове цветова, а расту у води и на влажном тлу [57].

² А <https://www.highcountrygardens.com/perennial-plants/lavender/lavandula-flowerkisser-after-midnight-english-lavender>

Б <https://en.wikipedia.org/wiki/Peppermint#/media/File:Mentha-piperita.JPG>

В <https://www.nccih.nih.gov/health/sage> © Steven Foster

Г <https://www.aucklandbotanicgardens.co.nz/plants-for-auckland/plants/rosmarinus-officinalis/image-group-4>

Д <https://www.gardenersworld.com/plants/thymus-vulgaris/>



Слика 3. Приказ биљних врста рода *Lythrum* које су распрострањене на територији Србије. А - *Lythrum salicaria* L.; Б - *Lythrum virgatum* L.; В - *Lythrum hyssopifolia* L. и Г - *Lythrum tribracteatum* Salzm. ex Spreng.).³

Биљке овог рода су зељасте једногодишње или вишегодишње. Обично имају четвртасте стабљике, уске листове без петeljки и класове звездастих цветова у нијансама љубичасте, ружичасте и беле. Њихово станиште је често повезано са мочварним пределима, обалама река и језера [57]. Иако биљке овог рода немају велики економски значај, *L. salicaria* се издваја због велике медоносности, али и због употребе у традиционалној медицини [51,61]. Међутим, у појединим државама се налази на црвеној листи због своје велике инвазивности, а самим тим и угрожавања других биљних врста [62]. Из тог разлога, али и због потврђеног високог садржаја полифенолних једињења [51], у свету постоји интересовање да се искористи инвазивни потенцијал ове биљне врсте у производњи различитих дијететских суплемената.

Род *Salvia*, у народу познат као жалфија, је највећи у фамилији Lamiaceae и састоји се од скоро 1000 врста жбунова, зељастих вишегодишњих и једногодишњих биљака [63]. Док је род препознат од стране Египатске и Грчке цивилизације, своје име дугује Римљанима (име *Salvia* изведено је из латинске речи „*salvage*” што значи „спасити”) [64]. Представља један је од нараспрострањенијих родова на планети, при чему се у Јужној и Централној Америци може наћи приближно 600 различитих врста, у централној Азији и Медитерану око 250 док је у источној Азији идентификовано 90 врста. У Народној Републици Кини се 40 врста рода *Salvia* користи у медицинске сврхе за третман различитих обољења, а неке од њих се користе и хиљадама година уназад [65]. У Европи постоји 36 различитих врста, док се на Иберијском, а нарочито Балканском полуострву могу наћи велики број ендемских врста. Већина врста преферира топлије и сунчане пределе, обично без обзира на квалитет земљишта и често расту на каменитим и стеновитим стаништима [66]. У Србији расте 14 врста овог рода, а неке од њих су приказане на **Слици 4** [58].

³ А <https://www.plantea.com.hr/vrbica/>

Б https://ukrbin.com/show_image.php?imageid=43459&big=1

В https://en.wikipedia.org/wiki/Lythrum_hyssopifolia#/media/File:LythrumHyssopifolia2.jpg

Г https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0809+0749



Слика 4. Приказ неких врста рода *Salvia* поред *S. officinalis* (Слика 2 В) које су распрострањене на територији Србије. А – *Salvia pratensis* L.; Б – *Salvia verticillata* L.; В – *Salvia sclarea* L.; Г – *Salvia glutinosa* L.⁴

Род *Salvia* садржи једињења са веома благотворним дејством на здравље људи, што је један од разлога за коришћење биљака из овог рода за лечење разних обољења од давнина. Најпознатија и најкоришћенија *Salvia* spp. је обична жалфија (*Salvia officinalis* L.) (Слика 2 В). Ова жалфија, али и многе друге се користе као зачини у прехранбеним производима, у традиционалној медицини за различите болести као што су крварење, менструални поремећаји попут дисменореје, против туберкулозе, као и у лечењу бројних инфламаторних болести, диспепсије, дијареје, когнитивни поремећаји изазвани старењем, прекомерно знојење и хипергликемија, поремећаји циркулације, упала слузокоже уста и грла [67–69]. Етарска уља и фенолна једињења биљака које припадају овом роду поседују висок антимикробни и антиоксидативни потенцијал и стога се екстракти жалфије користе у исхрани, не само за додавање ароме, већ и за конзервирање [67]. Монотерпени, тритерпеноиди и флавоноиди су карактеристична једињења која се налазе у надземном делу врста *Salvia*, док се дитерпеноиди и фенолне киселине налазе у корену [68]. Бројне врсте рода *Salvia* имају значајну комерцијалну вредност и пре свега су од великог интересовања за прехранбену и фармацеутску индустрију. Најпознатије, али и највише испитиване врсте из рода жалфија су, поред *S. officinalis*, *Salvia lavandulifolia* Vahl, *Salvia fruticosa* Mill., *Salvia divinorum* Epling & Játiva и *Salvia hispanica* L. познатија као чија, чије се семенке све више користе у исхрани као богат извор минерала и хранљивих материја [66,70–72]. Већина биљака овог рода има сличну традиционалну употребу, али постоје и врсте које имају потпуно другачију примену. *Salvia divinorum* L. (магична нана) је биљна врста која поседује пролазну психоактивну активност. Пореклом је из Мексика где су је древни народи користили у религиозне сврхе. Модерна медицина је потврдила ову активност и установила да је за њу одговоран дитерпеноид салвинорин А. Резултати једне студије на Универзитету у Ајови су показали да ово једињење може имати потенцијал као аналгетик, али и да се може користити као терапеутско средство за лечење зависности од дрога [73]. Такође, показује и антиспазмодичну активност на ткиво црева, штавише примећена је фармаколошка активност само на упаљеном делу чиме је смањена могућност нуспојава [74]. Међутим, постоји много врста овог рода које нису довољно испитане и чија потенцијална употреба није искоришћена. Због тога данас постоји велико интересовање за истраживањем ретких и ендемских врста у циљу проналаска нових, обећавајућих

⁴ А <https://www.infoflora.ch/en/flora/salvia-pratensis.html>

Б https://en.wikipedia.org/wiki/Salvia_verticillata#/media/File:Salvia_verticillata_240606.jpg

В https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b5/Salvia_sclarea02.jpg

Г https://species.wikimedia.org/wiki/Salvia_glutinosa#/media/File:Salvia_glutinosa_PID1167-2.jpg

биолошких супстанци и њихових деловања. *Salvia pratensis* L. јесте једна од мање испитаних биљака овог рода те представља драгоцено истраживачко подручје за њену употребу као замену за добро познате врсте или њену примену у прехранбеној и фармацеутској индустрији.

У том смислу, ово истраживање има за циљ да утврди фенолни профил метанолних екстраката надземних делова (LSA и SPA) и корена (LSR и SPR) биљака *L. salicaria* и *S. pratensis* како би се проценио њихов потенцијал за различите примене. Студија такође има за циљ да дефинише потенцијалну примену ове две недовољно истражене врсте као замене за опште познате врсте које имају дугу традицију употребе и које су описане у фармакопејама. У ту сврху, у овој студији су испитани неки аспекти њихове потенцијалне примене, као што су антимикробна активност, антиоксидативни потенцијал, ДНК заштитна активност и цитотоксичност према здравим и канцерогеним ћелијама. Један од циљева ове студије је и утврђивање могућих промена у количини фенолних једињења током процеса варења како би се боље разумела биодоступност уколико се биљке примењују орално.

2.3. Основне карактеристике и традиционална употреба биљака *Lythrum salicaria* L. и *Salvia pratensis* L.

Lythrum salicaria L. је у народу позната као пурпурна врбица због сличности листова са листовима врбе или поточњак због њеног станишта. Раније је ова биљна врста носила назив *Lysimachia purpurea spicata* Bauh. Pinax., затим је Тоурнефорт први увео у име назив *salicaria* па се у током 17. века звала *Salicaria vulgaris purpurea* Tourn. Коначно, Карл Лине даје биљци име *Lythrum salicaria* L. које се користи и данас [51]. Међу најчешћим синонимима који се користе за назив ове биљке према листи биљака из 2023. године (The WFO Plant List. <https://wfoplantlist.org/plant-list/taxon/wfo-0000366878-2023-06?page=1>) су *Lythrum anceps* (Koehne) Makino, *Lythrum argyi* H. Lév., *Lythrum tomentosum* Mill. и *Chabraea vulgaris* Bubani. Биљка расте на влажним и поплавленим местима, па се често може наћи поред река, потока и језера. Може нарасти 1–2 m у висину, формирајући колоније ширине 1,5 m или више, са бројним усправним стабљикама које расту из једне дрвенасте масе корена. Стабљике су црвенкасто-љубичасте и квадратног пресека. Листови су копљасти, дуги 3–10 cm и широки 5–15 mm, перласти и седећи, распоређени насупрот или у по три колута. Цветови су црвенкасто-љубичасти, пречника 10–20 mm (Слика 5) [58,75]. Цвета од јуна до краја септембра и у том периоду је посећују многи инсекти. Изузетно је медоносна биљка, при чему уколико су повољни услови пчела може сакупити и до 4 kg нектара дневно по кошници [61]. Поред тога, богата је и поленом те представља добар извор хране за пчелиње заједнице, а самим тим и добру припрему за наступајућу зиму.



Слика 5. Изглед надземног дела и корена⁵ биљке *L. salicaria*. (извор: Никола Срећковић, 2020)

Пурпурна врбица је пореклом из Европе, Азије и Северне Африке. Сматра се да је на тло Северне Америке доспела почетком 19. века. Некада популарно узгајана због својих украсних и фармаколошких вредности, пурпурна врбица је данас главна инвазивна биљка у мочварама Северне Америке. Међународна унија за очување природе (Специјална група за инвазивне врсте) сматра је једном од 100 најгорих инвазивних страних врста на свету. Биолошко сузбијање пурпурне врбице је један од најшире примењених програма биоконтроле корова у Северној Америци [51,76].

Европска фармакопеја преузела је монографију пурпурне врбице из Француске фармакопеје. Међутим, ова биљка још увек није на листи Европске агенције за биљне лекове, као ни у монографијама Европске научне задруге за фитотерапију. Нажалост, упркос значајном положају у народној медицини, данас је њена употреба изгубила некадашњу популарност и ретко се може наћи на тржишту [51]. Од 18. до раног 20. века многе тезе и извештаји о употреби пурпурне врбице од стране лекара праћени описима студија случаја објављени су у водећим медицинским часописима тог времена. Главне примене које се традиционално приписују пурпурној врбици су за лечење дизентерије и дијареје. Постоји много документованих извештаја о употреби биљке у епидемијама дизентерије, која се често појављивала у ратним годинама међу војницима [51]. Њена спољашња употреба због својих детерзивних, адстрингентних, хемотипичних, зарастајућих и освежавајућих својстава препоручивала се посебно у лечењу упале очију, синуситиса (испирање носа разблаженом тинктуром), проширених вена, хемороида, менорагије, хеморагије, леукојеје и код инфекције и иритације слузокоже уринарног тракта. Штавише, коришћена је у лечењу хроничног и акутног вагинитиса и пруритуса различите етиологије, као и код дерматитиса и екцема. Због општег тренда опадања употребе локалног лековитог биља, посебно у урбаним областима северне Европе, већина извештаја о тренутној традиционалној употреби потиче из етнофармаколошких студија спроведених у јужној Европи и регионима Блиског истока. Пурпурна врбица се данас користи за лечење болести са инфламаторном позадином, као што су хемороиди, дизентерија, хронични катар црева и екцеми [51,77]. Због поседовања јаких адстрингентних и хеостатских особина, често се користи код случајева дијареје и крварења [78,79].

⁵ Илустрација десно: https://www.freepik.com/premium-photo/purple-loosestrife-twigs-with-flowers-isolated-white-background-lythrum-salicaria-herbal-medicine-clipping-path_31053439.htm

***Salvia pratensis* L.**, позната као ливадска жалфија, је вишегодишња биљка карактеристичних крупних плавих цветова, која најчешће расте на ливадама које се налазе у близини жбуња или шума [80]. Латински специфичан епитет "*pratensis*" односи на њено преферирано станиште и значи ливада. Корен биљке је одрвенео, вретенаст и често шупаљ кроз средину испуњен земљом. Може да нарасте до висине од 1 до 1,5 m, са крупним зеленим набразданим листовима који су благо наборани и назубљени на ивицама. Стабљике имају четири ивице и обложене су жлездастим и меким длачицама. Листови су распоређени у супротним паровима, с тим да су они на доњем делу стабљике највећи и смањују се ка врху. Цветне стабљике су обично разгранате, са четири до шест грана цветова. У дивљини је цвет обично плавичастољубичаст (Слика 6). У узгоју, цветови имају широку палету боја, од богате љубичасте и љубичасто-плаве до плавичасто беле, и од ружичасте до чисто беле. Период цветања је од маја до августа у зависности од климатских услова. Врло је добра медоноша при чему пчеле са 1 ha засада могу да сакупе и до 350 kg меда [61,80,81].



Слика 6. Изглед надземног дела и корена биљке *S. pratensis*. (извор: Никола Срећковић, 2018)⁶

Порекло ливадске жалфије везује се за Европу, Западну Азију и Северну Африку. Употреба ливадске жалфије у кулинарству сеже још у античко доба. Њени велики листови сматрани су много ароматичнијим од обичне жалфије те се из тог разлога, обично користила за кување меса, али и за ароматизацију пива и вина [82]. У суштини, ливадска жалфија се може користити као замена за обичну жалфију или заједно са њом [80,83]. Листови и цветови ливадске жалфије традиционално се користе као чај за лечење болова у стомаку, кожних обољења и чирева. У народу постоји веровање да се семе биљке раније користило као паста за уклањање честица из очију, као и за смањење упале и црвенила. Такође се користила за испирање грла и чишћење зуба [82].

⁶ Илустрација десно:

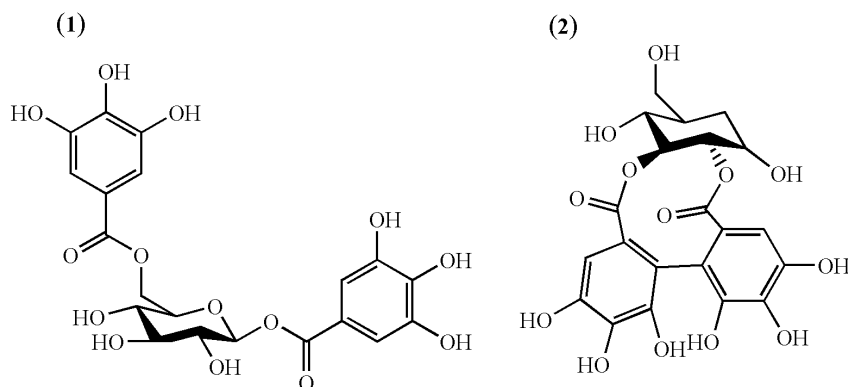
<https://www.i-flora.com/en/image-search/phylogenetic-tree/art/showgallery/salvia-pratensis.html>
<https://www.wiemann-lehrmittel.de/shop/naturwissenschaften/biologie/botanik-modelle/wiesen-salbei-schlagbaum-mechanismus-salvia-pratensis>

2.3.1. Секундарни метаболити биљака рода *Lythrum* и њихов фармаколошки потенцијал

На основу доступне литературе, највише испитивана биљна врста рода *Lythrum* јесте *L. salicaria*. За ову биљну врсту карактеристично је да садржи високе концентрације полифенола укључујући елагитанине, једињења сродна танинима, флавоноиде, флаван-3-оле, фенолне киселине и антоцијанине. Осим фенола, потврђено је присуство и неких неполарних једињења различитих хемијских група, као што су стероиди, тритерпени, фталати, кумарини и алкалоиди [51].

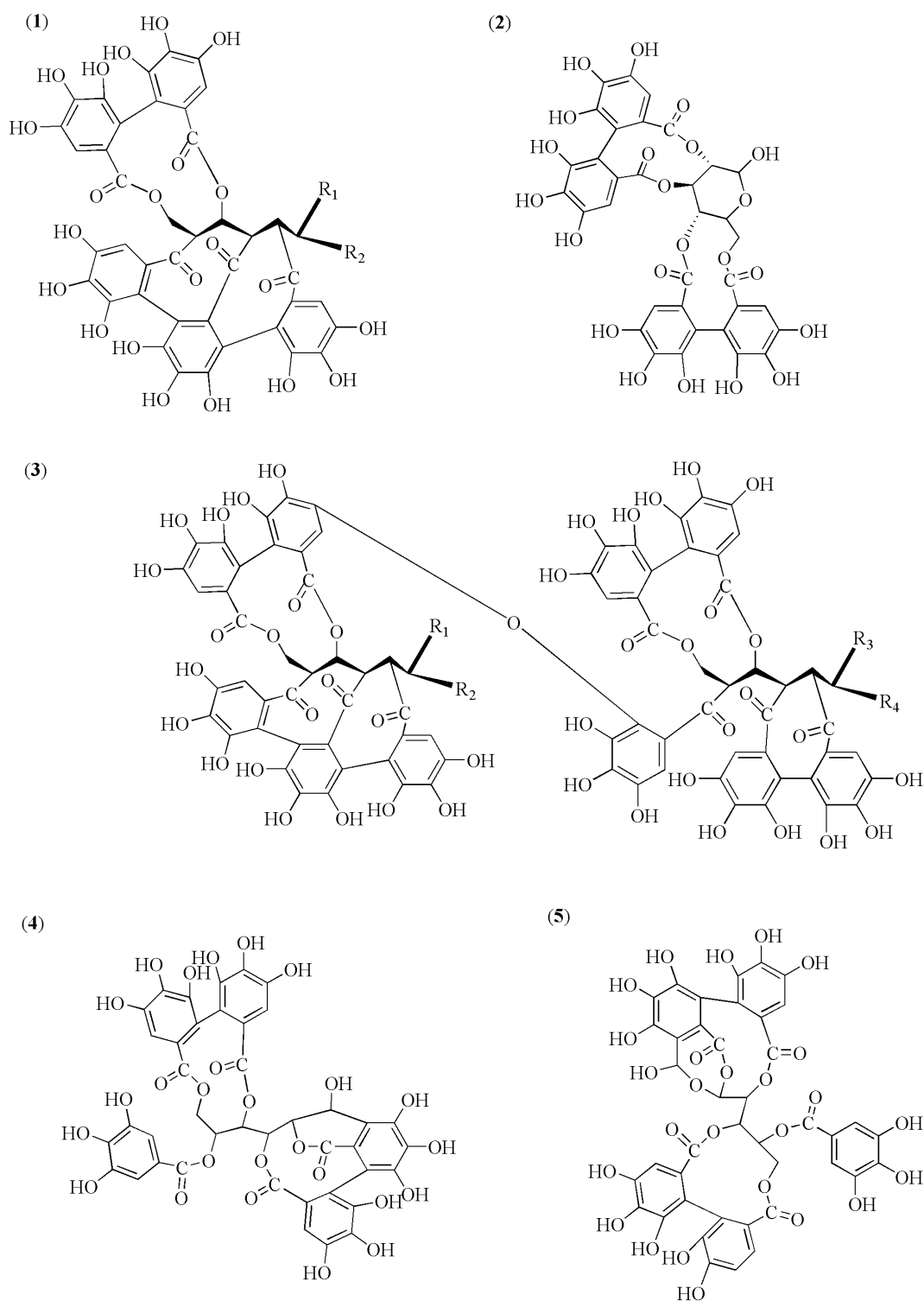
Танини су секундарни биомолекули биљака, који се убрајају у природна ароматична једињења и полифеноле, карактеристични по томе да имају способност да таложе протеине и многа друга органска једињења укључујући аминокиселине и алкалоиде. Нашли су примену у индустрији коже за штављење и тај процес је познат још из праисторијских времена. Танини се налазе у многим биљним врстама и имају улогу да заштите биљку од инфекција и од хербивора [84]. Танини се могу поделити у три групе: кондензоване, хидролизабилне и комплексне танине.

Галотанини и елагитанини припадају класи хидролизујућих танина, тип полифенола који се првенствено формира оксидативним повезивањем галоил група у 1,2,3,4,6-пентагалоил глукози. За разлику од галотанина, елагитанини садрже додатне C-C везе између суседних галоил група у молекулу пентагалоилглукозе. Ове C-C везе формирају се оксидативним купловањем између два суседна галоил остатка при чему настаје хексахидроксиdifенол (HNHP) који може бити S- или R-конфигурације. Назив елагитанин потиче од елагинске киселине која настаје спонтано од хексахидродифенилне киселине у воденом раствору преко интрамолекулске естерификације [84]. Досадашња испитивања хемијског састава биљке *L. salicaria* показала су да је биљка богата у садржају галотанина и елагитанина. Од галотанина детектованих у надземном делу ове биљке, најзначајнији су 1,6-ди-О-галоил глукоза и HNHP-глукоза (2,3-(S)-хексахидроксиdifенол-D-глукоза) (Слика 7).



Слика 7. Галотанини детектовани у биљци *L. salicaria*, (1) 1,6-ди-О-галоил глукоза и (2) HNHP-глукоза.

Најзначајнији елагитанини који су детектовани у надземном делу биљке *L. salicaria* су мономерни елагитанини (касталагин, вескалагин и педункулагин) и димерни (сликаринин А, В и С, и његови мономери касуаринин и стахиурин) (Слика 8). Касталагин је дијастереоизомер вескалагина. Касталагин и вескалагин су најзаступљенији елагитанини у белом вину које се чува у храстовим бурадима. Током старења вина, ова два једињења се екстрахују из дрвета и хемијским реакцијама могу да се трансформишу у нове деривате [85].



Слика 8. Елагитанини детектовани у надземном делу биљке *L. salicaria*. Мономерни елигитанини (1) касталагин (R₁=H, R₂=OH), (1) вескалагин (R₁=OH, R₂=H) и (2) педункулагин и димерни елагитанини (3) Саликарин А (R₁=OH, R₂=H, R₃=OH, R₄=H), Саликарин В (R₁=OH, R₂=H, R₃=H, R₄=OH), Саликарин С (R₁=H, R₂=OH, R₃=H, R₄=OH) и њихови мономери (4) касуаринин и (5) стахиурин.

Испитивањем односа између хемијских структура појединих танина предложен је биосинтетички пут синтезе касталагина и вескалагина у биљкама (**Схема 1**) [86]. Прво једињење у хидролизабилном танинском путу, 1-О-галоилглукоза, настаје од галне киселине и уридин-дифосфат глукозе (UDP-глукозе). Ова галоилација се даље наставља узастопно, специфично позиционирано до настанка коначног производа 1,2,3,4,6-пента-О-галоилглукозе. С друге стране формирање првог елагитанина, телимаграндина 2, мономерног елагитанина, директно из пентагалоилглукозе је потврђено тек недавно. Следећи биосинтетички кораци нису експериментално доказани, али се генерално претпоставља да је касуарицтин производ оксидативног спајања две просторно суседне галоил групе. Поред тога, предложено је да се С-гликозидни елагитанини вескалагин и касталагин формирају из педункулагина и да овај корак садржи два интермедијера стахурин и касуаринин [86].

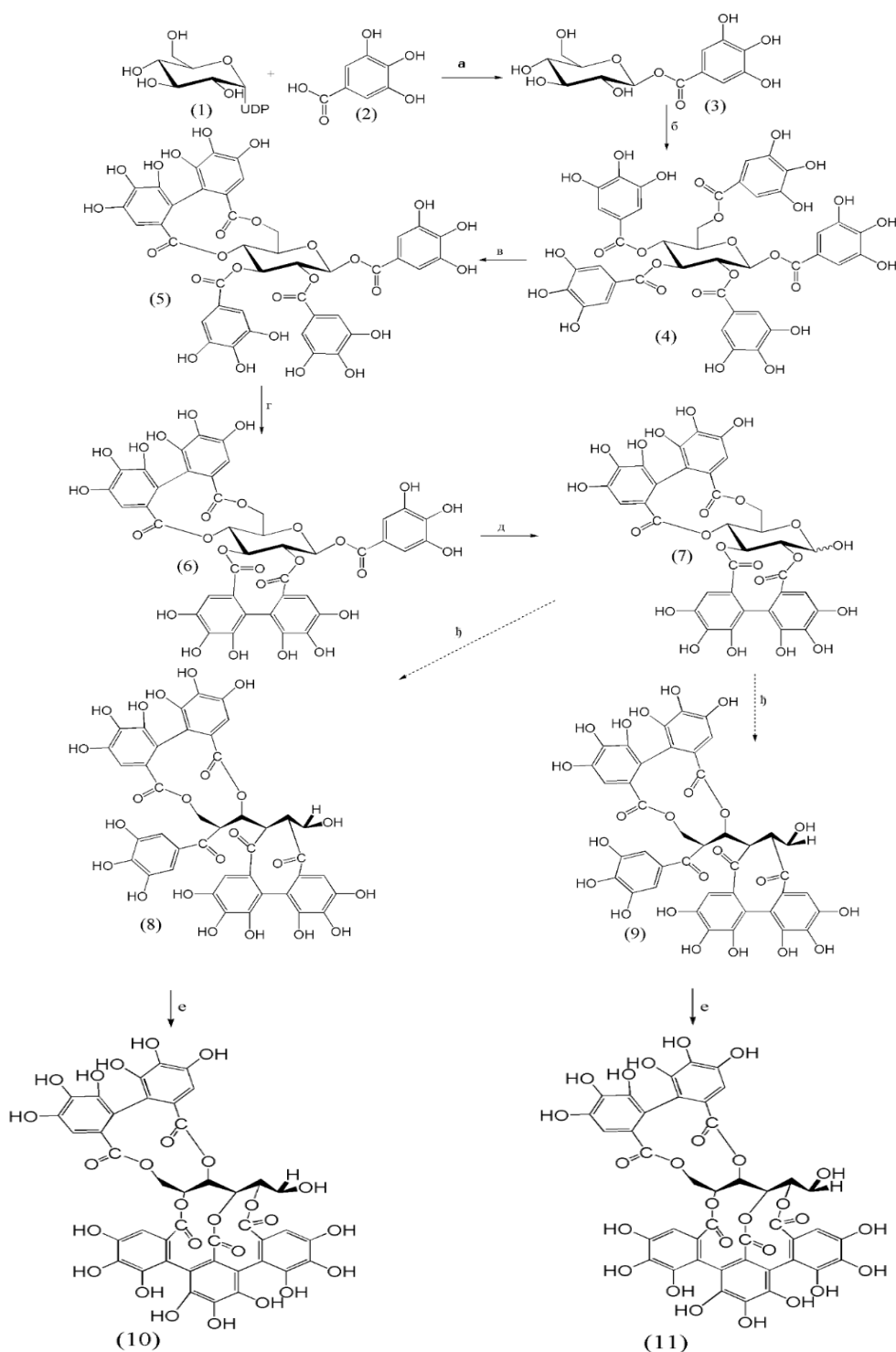
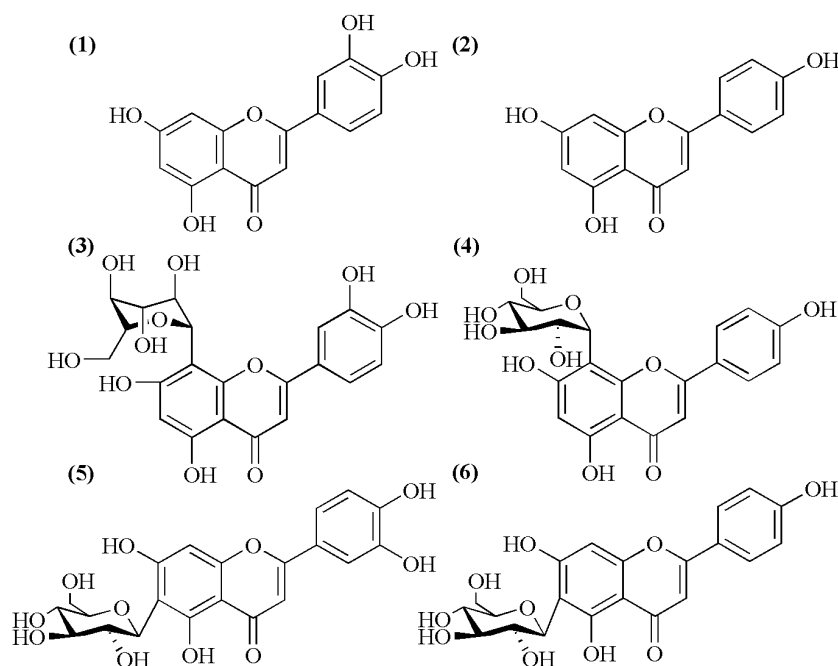


Схема 1. Предложени биосинтетички пут настанка елигитанина вескалагина (10) и касталагина (11). Биосинтетички пут укључује (а) галоилацију уридин-дифосфат глюкозе (1) на положају C-1 галном киселином (2) до настанка 1-О-галоилглукоза (3), (б) четири узастопна корака галоилације до настанка 1,2,3,4,6-пента-О-галоилглукозе (4), (в) оксидативно везивање две галоил групе са положаја C-4 и C-6 до настанка телимаграндина 2 (5), (г) оксидативно везивање две галоил групе на положају C-2 и C-3 до касуарицина (6), (д) одлазак галоил групе са положаја C-1 уз настаanak педункулагина (7), (ђ) отварање глюкопиранозног облика и везивање галне киселине на положај C-5 уз формирање вескалагин (8) и касталагин (9), (е) оксидативно везивање бензенског прстена на положајима C-4 и C-5.

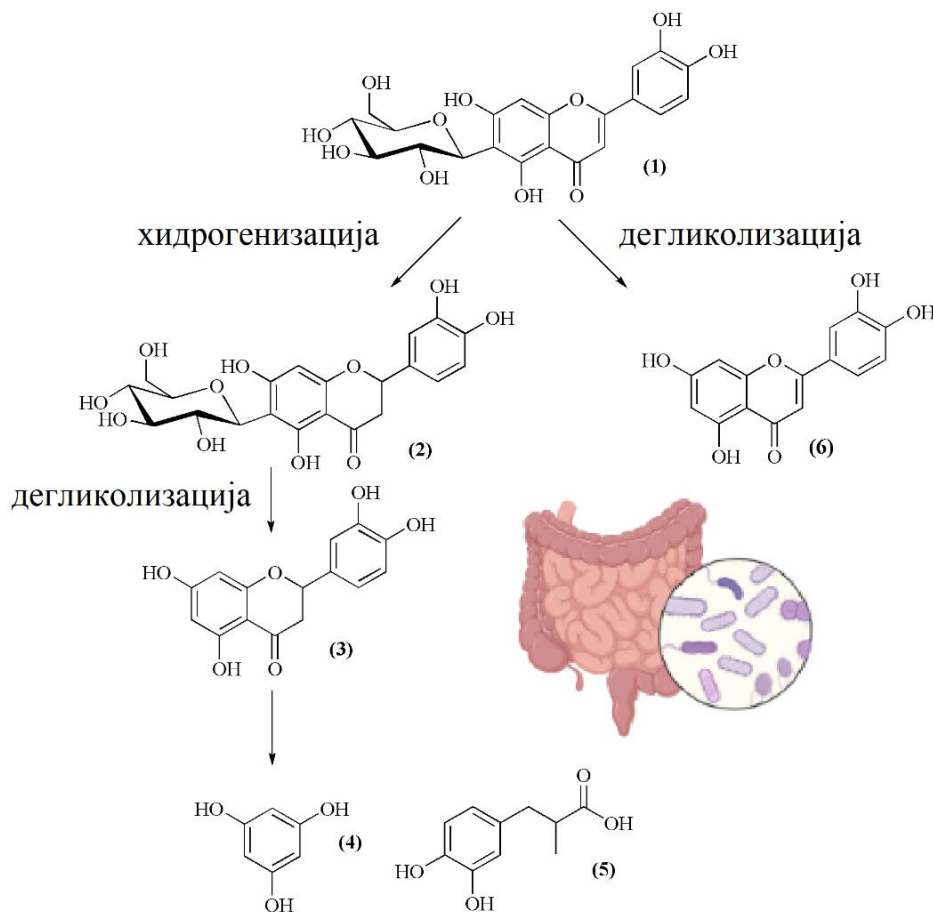
Флавоноиди су најчешћа и најбоље анализирана група полифенола која се налази у надземним деловима готово свих врста биљака. Постоји неколико студија објављених о садржају флавоноида у биљкама рода *Lythrum*. Већина студија о хемијском саставу фокусирана је на *L. salicaria*, биљку која се, колико је познато, једина из овог рода користи у традиционалној медицини. Потврђено је да *L. salicaria* садржи углавном лутеолин и апигенин, али и њихове глукозидне облике. У већини спроведених студија идентификовани су изомери лутеолина, С-глукозиди – оријентин и изооријентин, као и деривати апигенина – витексин и изовитексин (**Слика 9**) [51,76,87]. Антиинфламаторни и антихипертензивни ефекти витексина су први пут описани 1980. године док су последњих година потврђени и многи други фармаколошки ефекти. Доказано је да витексин поседује антиоксидативну, антитуморску, антивирусну, антитироидну и кардиопротективну активност [88]. Витексин и изовитексин испољавају антинеопластичне ефекте у неколико *in vitro* и *in vivo* модела, изазивајући апоптозу и аутофагију, као и инхибицију пролиферације и миграције преко неколико сигналних путева. У ранијим студијама, витексин и изовитексин показали су антитуморску активност изазивајући апоптозу ћелија канцера код човека и то на U937 леукемијске ћелије, 30 MFC-7 ћелије карцинома дојке, НерG2 ћелије јетре, HeLa цервикалне ћелије, НЕР-2 ћелије ларинкса и HCT116 колоректалне ћелије [89]. Нађено је да поседује и позитиван ефекат на неуролошку дисфункцију као што је антидепресантна активност код мишева [90]. С-гликозидним флавоноидима је посвећено врло мало пажње у литератури с обзиром на њихову присутност у људској исхрани.



Слика 9. Једињења из групе флавоноида идентификована у биљци *L. salicaria* ((1) лутеолин, (2) апигенин, (3) ориентин, (4) витексин, (5) изоориентин, (6) изовитексин).

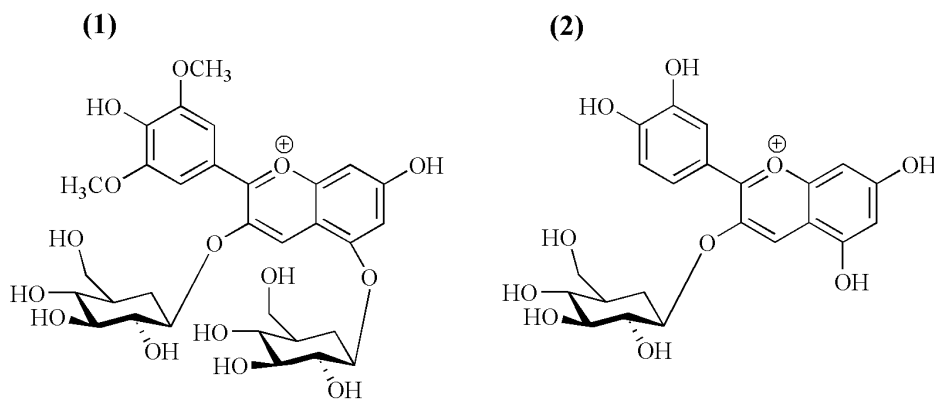
Њихов метаболизам у организму се битније разликује од метаболичких путева О-гликозидних флавоноида. Такође, С-С гликозидна веза има и утицаја на њихову биолошку активност. С-гликозидни флавоноиди су у већини случајева показали већи антиоксидативни и антидијабетски потенцијал у односу на њихове одговарајуће О-гликозидне флавоноиде и агликоне [89–91]. Међутим, велика резистентност С-гликозидних једињења према хидролизи, нам говори о другачијој биорасположивости ових једињења. Хидролитички ензими дигестивног тракта човека који се могу везати за

гликозидни део флавоноидних гликозида су активни само за флавоноидне *O*-гликозиде, али немају могућност хидролизе *C*-гликозидних флавоноида. Недавно се дошло до податка да је за њихову дегликолизу и деградацију задужена микрофлора у цревима. Цревне бактерије могу да раскину *C*-гликозидну везу код многих *C*-моногликозидних флавоноида, као што су пуеранин, изоориентин, ориентин, витексин и изовитексин. Због хидроксированог *C*-1" положаја у шећеру, *C*-гликозидна веза се не редукује већ хидролизује. Даље се флавоноидни *C*-гликозиди дегликолизују у своје агликоне и деградирају у облику мањих метаболита као што су флороглуцинол, хидрокафеинска киселина и флоретна киселина. На примеру изоориентина, његовим метаболизмом настају 6-*C*-глукозилериодиктиол, флороглуцинол, (+)-ериодиктиол, 3,4-дихидроксифенилпропионска киселина и лутеолин помоћу цревних бактерија које се налазе у дебелом цреву човека (Слика 10). Бактерија *Eubacterium cellulosolvens* у потпуности метаболише изоориентин и витексин до 3-(3,4-дихидроксифенил) пропионске киселине и 3-(4-хидроксифенил) пропионске киселине у року од 24 сата. *E. cellulosolvens* такође дегликолизује изоориентин и изовитексин у лутеолин и апигенин. Генерално, флавоноидни *C*-моногликозиди се лоше апсорбују код људи са врло мало метаболита у урину и крви те се најчешће излучују фецесом у непромењеном облику [88].



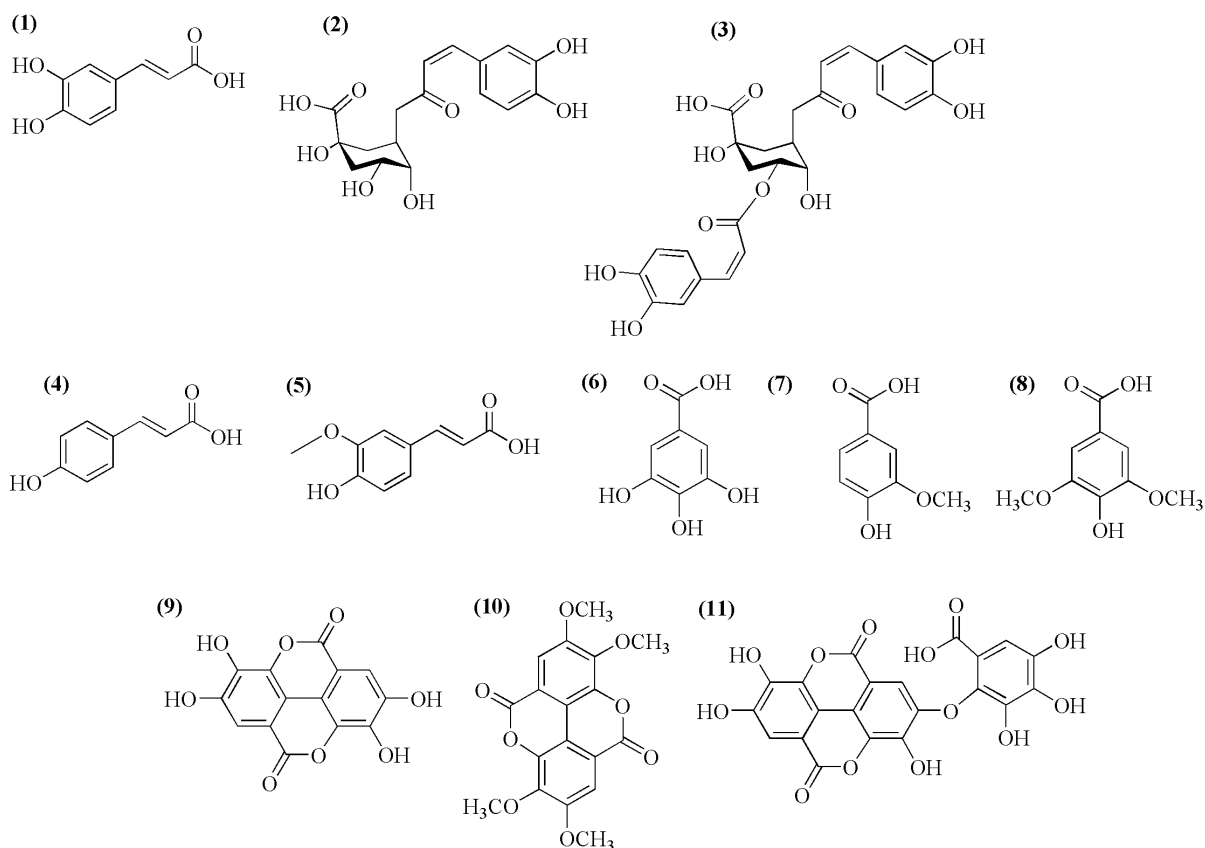
Слика 10. Биотрансформација изоориентина од стране хумане цревне микрофлоре ((1) изоориентин, (2) 6-*C*-глукозилериодиктиол, (3) (+)-ериодиктиол, (4) флороглуцинол, (5) 3,4-дихидроксифенилпропионска киселина, (6) лутеолин).

Антоцијани су група флавоноидних једињења често присутна у биљкама са функцијом заштите биљака од хербивора и УВ зрачења, али су одговорни и за обојеност цветова, што је од есенцијалног екофизиолошког значаја за привлачење полинатора. Боја коју антоцијани дају биљкама може варирати од црвене до плаве у зависности од рН вредности околине. Средином прошлог века идентификована су по први пут у биљци *L. salicaria* два доминантна облика антоцијана, малвидин 3,5-ди-*O*-глукозид и цијанид 3-*O*-глукозид који су приказани на **Слици 11**.



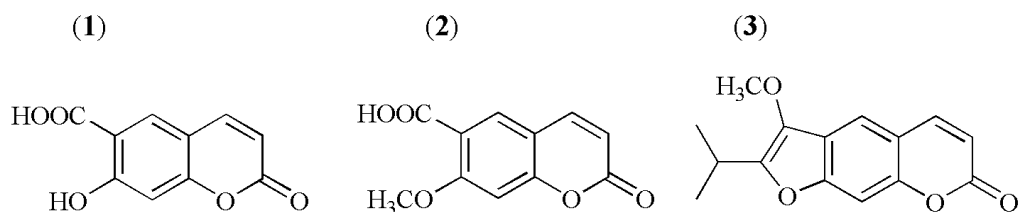
Слика 11. Антоцијани присутни у биљци *L. salicaria* (малвидин 3,5-ди-*O*-глукозид (1) и цијанид 3-*O*-глукозид (2)).

Фенолне киселине које су детектоване у екстрактима надземних делова *L. salicaria* могу се поделити на основу структуре на три групе. Прву групу чине деривати циметне киселине, као што су кафеинска киселина, хлорогенска киселина, изохлорогенска киселина, *p*-кумаринска киселина и ферулна киселина. Другу групу чине једињења класификована као једноставни деривати бензоеве киселине укључујући галну, сиригинску и ванилинску киселину. Као трећу, посебну, групу једињења чине елагинска киселина и њени деривати укључујући 3,3',4'-три-*O*-метилелагинску киселину, њене гликозидне облике и дилактон валонску киселину [51,76,87]. Структурне формуле фенолних киселина пронађених у екстрактима надземног дела биљке *L. salicaria* приказани су на **Слици 12**.



Слика 12. Приказ фенолних киселина идентификованих у *L. salicaria* ((1) кафеинска, (2) хлорогенска, (3) изохлорогенска, (4) *p* – кумаринска, (5) ферулна, (6) гална, (7) сиригинска, (8) ванична, (9) хлорогенска, (10) 3,3',4'-три-О-метилелагинска и (11) дилактон валинска киселина.

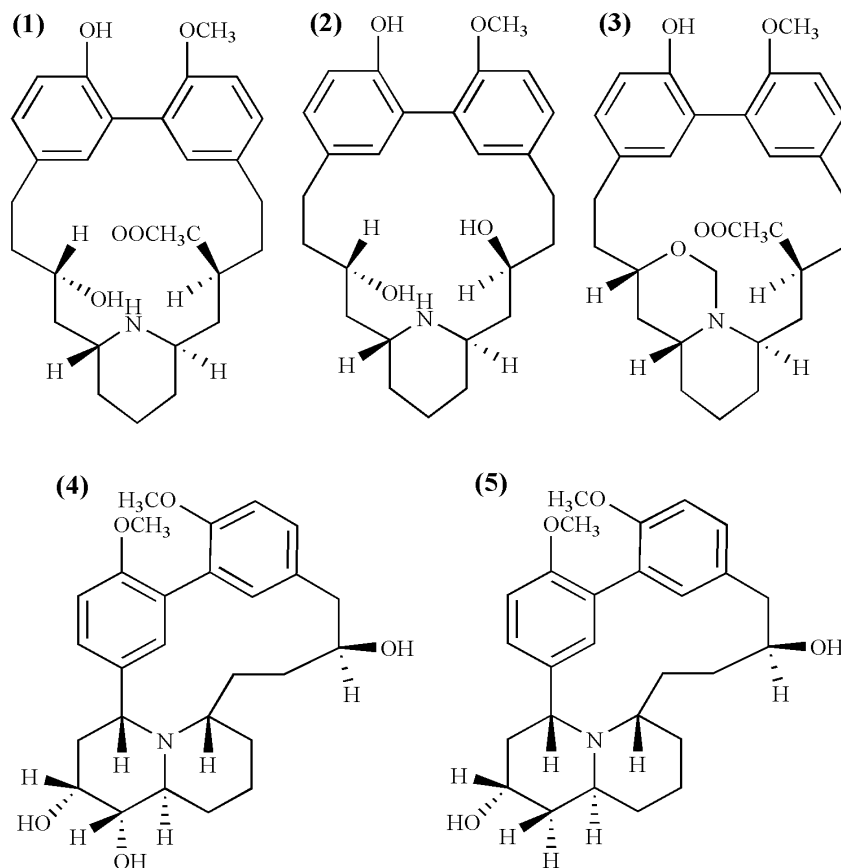
Кумарини су природна ароматична једињења присутна у многим биљкама. На основу литературних података, у пурпурној врбици идентификована су три једињења кумаринске структуре и то умбелиферон-6-карбоксилна киселина и бунтанзин који представљају једноставне кумарине и пеуцеданин који припада групи фурукумарина (Слика 13) [51].



Слика 13. Једињења из групе кумарина идентификованих у биљци *L. salicaria* ((1) умбелиферон-6-карбоксилна киселина, (2) бунтанзин и (3) пеуцеданин).

Алкалоиди представљају класу органских једињења изолованих из биљака који у својој структури поседују базни атом азота, најчешће су хетероцикличне структуре и поседују изражено физиолошко дејство [92]. Почевши од 1960. група *Fujita* и сар. успешно је изоловала 13 алкалоида из биљке *L. salicaria* (ранији назив *L. anceps*). Изоловани алкалоиди су класификовани као деривати пиперидина и хинолизидина и названи су литранин, литранидин, литрамин, литранцин и његови деривати и литранцепин и његови деривати (Слика 14) [93–95]. Међутим, мора се напоменути да

присуство идентификованих алкалоида није потврђено у каснијим студијама које су испитивале фитохемијске компоненте ове биљке [51].



Слика 14. Једињења из групе алкалоида детектованих у биљци *L. salicaria* ((1) литранин, (2) литранидин, (3) литрамин, (4) литраницин и (5) литранцепин).

2.3.2. Секундарни метаболити биљака рода *Salvia* и њихов фармаколошки потенцијал

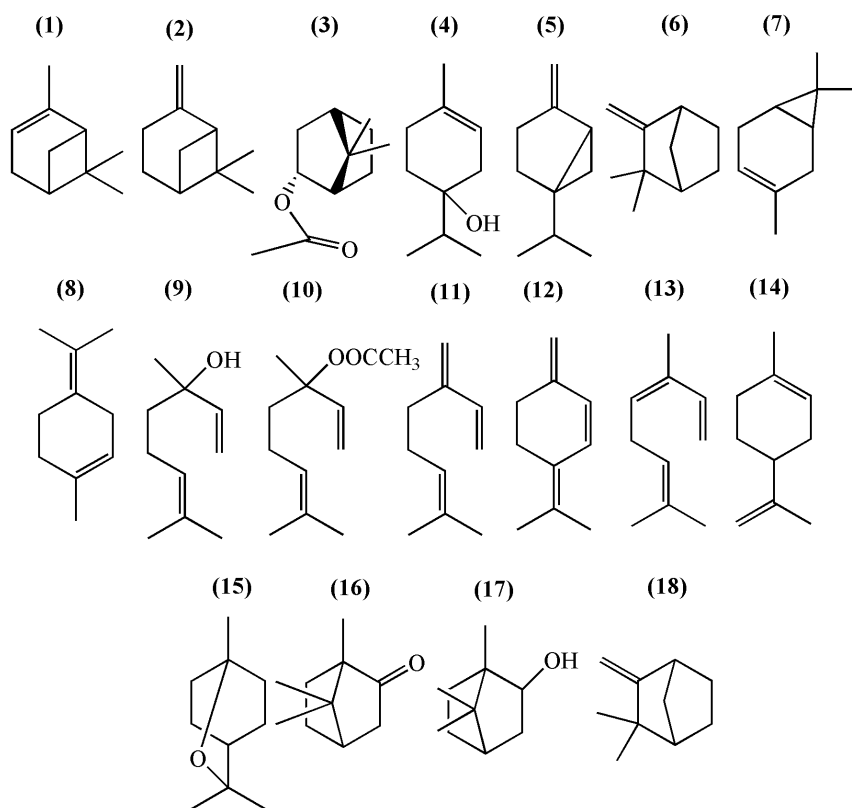
Биљке рода *Salvia* представљају богат извор биолошки активних једињења. До почетка 2011. године из 134 врсте рода *Salvia* изоловано је укупно 773 различитих једињења [96]. Основна подела ових једињења јесте на липофилна (једињења која потичу из етарских уља) и хидрофилна једињења (полифеноли). Етарска уља ових биљака изузетно су богата разноврсним једињењима која су класификована у неколико подгрупа (монотерпеноиди, сесквитерпеноиди, дитерпеноиди, тритерпеноиди и стероиди). Монотерпеноиди и тритерпеноиди су најприсутнији у надземном делу биљака док се дитерпеноиди претежно налазе у корену [96,97]. Интересантно је да је само из етарског уља надземног дела биљке *S. officinalis* окарактерисано преко 120 различитих једињења [98].

Поред претходно поменутих липофилних једињења, друга група метаболита који су растворни у води се могу, према својој структури, даље поделити у две подгрупе: фенолне киселине и флавоноиди. Већина фенолних киселина у врстама рода *Salvia* су искључиво деривати кафеинске киселине (мономери, димери, тримери и тетрамери), који су карактеристични за род *Salvia*. Кафеинска киселина има централну улогу у биохемији биљака фамилије Lamiaceae и јавља се претежно у облику димера као румаринска киселина. Флавоноиди су широко распрострањени у биљкама овог рода, и

углавном су присутни као флавоени, флавоноли и њихови гликозиди при чему су од посебног таксономског значаја за овај род 6- хидроксиловани флавоени [99].

2.3.2.1. Липофилна једињења биљака рода *Salvia*

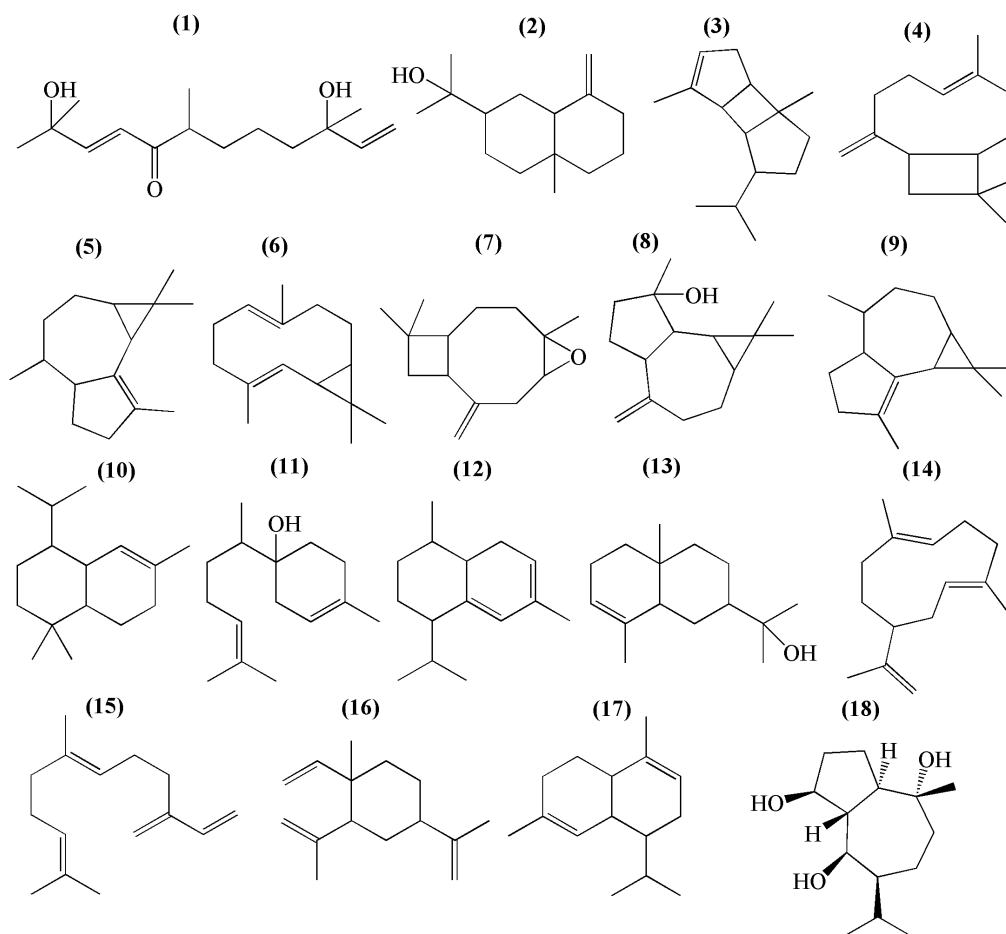
Монотерпеноиди се састоје од C_{10} угљеничног скелета који укључује две јединице изопрена и могу бити ацикличне, моноцикличне и бицикличне структуре. Монотерпеноиди настају из геранил дифосфата који настаје комбинацијом диметилалил дифосфата и изопентенил дифосфата [100]. Као најважнији монотерпеноиди који су изоловани из надземних делова биљака издвајају се α -пинен, β -пинен, борнил ацетат, терпинен-4-ол, сабинен, камфен, 3-карен, терпинолен, линалол, линалоол ацетат, мирцен, β -феландрен, β -оцимен, лимонен, 1,8-цинеол, камфор, борнеол и борнил ацетат и њихова структура је приказана на **Слици 15**.



Слика 15. Једињења из групе монотерпеноида изолованих из неких врста жалфија ((1) α -пинен, (2) β -пинен, (3) борнил ацетат, (4) терпинен-4-ол, (5) сабинен, (6) камфен, (7) 3-карен, (8) терпинолен, (9) линалол, (10) линалоол ацетат, (11) мирцен, (12) β -феландрен, (13) β -оцимен, (14) лимонен, (15) 1,8-цинеол, (16) камфор, (17) борнеол и (18) борнил ацетат) [97].

Сесквитерпеноиди се састоје од C_{15} угљеничне структуре која настаје комбинацијом три изопренске јединице. Већина сесквитерпена настаје директно из фарнезил дифосфата, кључног C_{15} дифосфорилизованог интермедијера биосинтетског пута мевалоната [100]. До 2010. године идентификовано је 46 природних сесквитерпена у 15 врсти *Salvia* који се могу поделити у шест подгрупа (алифатични сесквитерпени, гермакран сесквитерпени, каротан сесквитерпени, кариофилан сесквитерпени, гвајани сесквитерпени и други сесквитерпени) [96,97]. Најзначајнији сесквитерпеноиди као што су салвинен, β -еудесмол, α -бурбонен, β -кариофилен, α -гурјунен, бициклогермакрен,

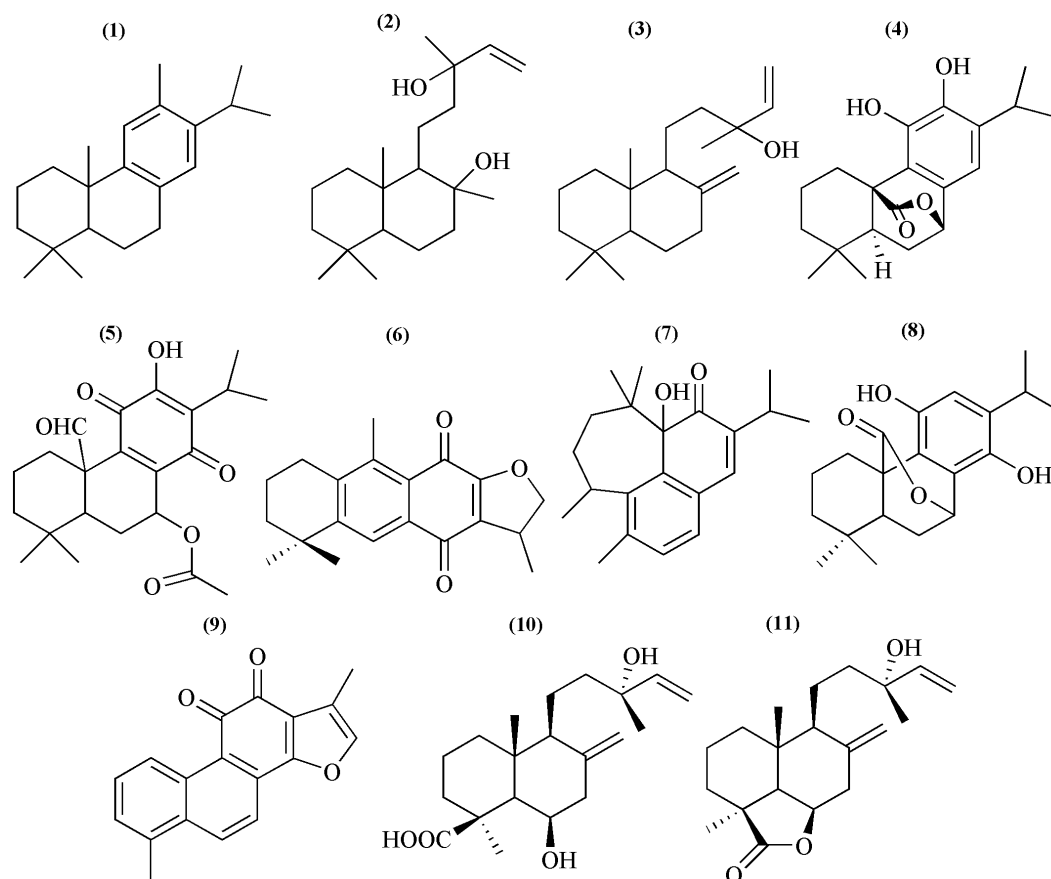
кариофилен оксид, спатуленол, α -гурјунен, α -кадиол, α -бисаболол, кадинадиен, 7-епи- α -еудесмол, гермакрен-D, β -фарнезен, β -елемен, мууролен и теуклатриол су приказани на **Слици 16**.



Слика 16. Једињења из групе сесквитерпеноида изолованих из биљака рода *Salvia* ((1) салвинен, (2) β -еудесмол, (3) α -бурбонен, (4) β кариофилен, (5) α -гурјунен, (6) бициклогермакрен, (7) кариофилен оксид, (8) спатуленол, (9) α -гурјунене, (10) α -кадиол, (11) α -бисаболол, (12) кадинадиен, (13) 7-епи- α -еудесмол, (14) гермакрен-D, (15) β -фарнезен, (16) β -елемен, (17) мууролен и (18) теуклатриол) [97].

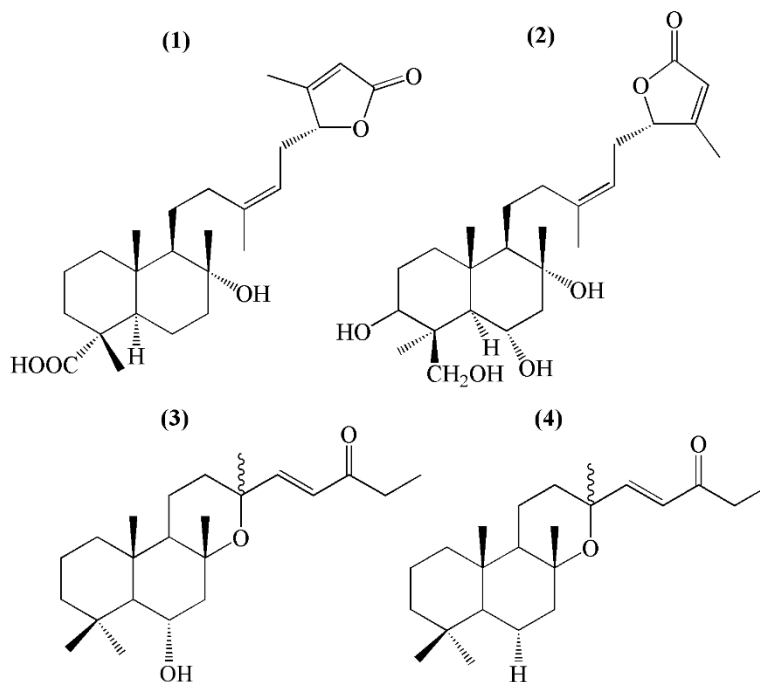
Дитерпеноиди су класа природних једињења чији је угљенични скелет сачињен од 20 угљеникових атома. Њихово формирање се заснива на различитим типовима циклизације геранилгеранил дифосфата. Они се биосинтетишу помоћу два различита пута, путем мевалонске киселине или алтернативним деоксисилулоза-фосфатним путем [100]. Процес циклизације је важан из перспективе формирања различитих скелета дитерпеноида и представља најважнији пут биосинтезе цикличних дитерпена. Концентрације дитерпеноида варирају у зависности од дела биљке и највеће су у корену [97]. Дитерпеноиди изоловани из биљака рода *Salvia* представљају највећу групу једне класе једињења у овим биљкама. Према до сада објављеним подацима, дитерпеноиди чине 545 од 791 до сада идентификованих конституената у роду *Salvia*. На основу њихове структуре дитерпеноиди се могу поделити у пет подгрупа, и то абиетани, клеродани, пимарани, лабдани и други дитерпеноиди [96].

Род *Salvia* је изузетно богат абиеталним дитерпеноидима који испољавају низ биолошких активности, што изазива значајно интересовање фармаколошке заједнице. Потврђене су њихове антибактеријске, антифунгалне, антиоксидативне и кардиопротективне особине [101]. Од 545 познатих дитерпеноида који су пронађени у роду *Salvia*, 365 припада абиеталним дитерпеноидима и сви су идентификовани до 1976. године. На **Слици 17** приказани су карактеристични дитерпеноиди који се срећу у етарским уљима многих *Salvia*. Феругиол, склареол и манол су типична једињења која су екстрахована из различитих делова биљака овог рода. Серија деривата изокарнозола, од којих су карнозол и сисокарнозол приказани на слици, је изолована и идентификована у многим врстама *Salvia* [97]. Фитохемијским испитивањем екстракта корена *S. nemorosa*, као главни дитерпеноид идентификован је неморон [102]. Тебесинон А један је од идентификованих дитерпеноида у корену биљке *S. tebesana* [103]. Као један од истакнутијих дитерпеноида идентификованих у корену биљака *S. viridis* и *S. palestina* појављује се 1-оксомикростегиол. Дитерпеноиди који се састоје од 4 прстена, при чему је прстен С орто-хинон или пара-хинон, а прстен D дихидрофуран или фуран познати су као таншинони, од којих је таншинон I приказан на **Слици 17**. Најрепрезентативнија врста која синтетише ову групу дитерпеноида јесте *S. miltiorrhiza* [104]. Из надземног дела биљке *S. leriifolia* изолована су два дитерпеноида који припадају подгрупи лабдана, и то 6 β ,13 β -дихидроксилабд-8(17),14-диен-19-оична киселина и 13-хидроксилабд-8,14-диен-6 β ,19-олид (**Слика 17**) [105].



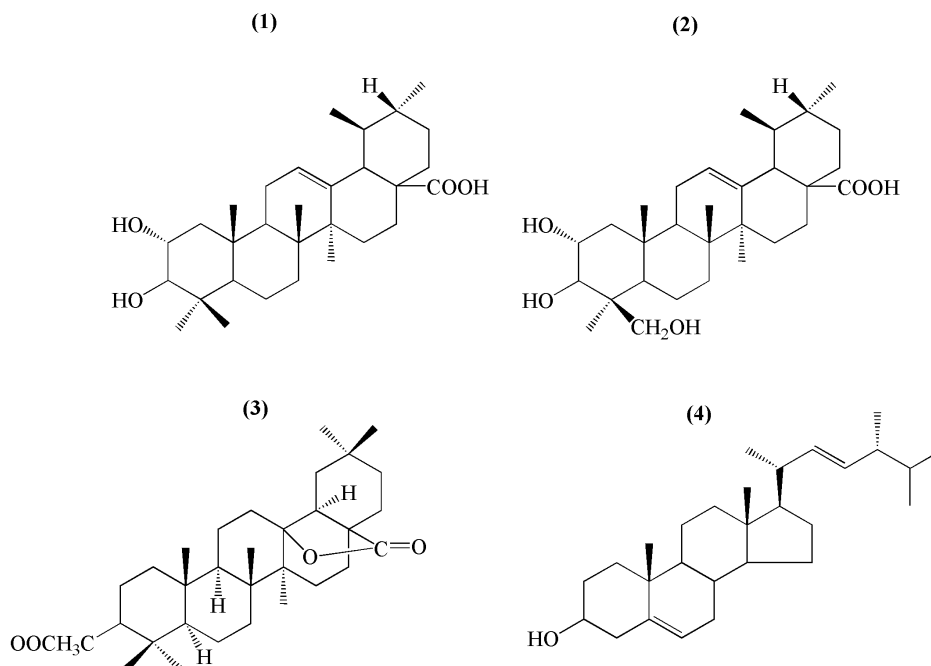
Слика 17. Једињења из групе дитерпеноида детектована у биљкама рода *Salvia* ((1) Феругиол, (2) склареол, (3) манол, (4) карнозол, (5) неморон, (6) тебесинон А, (7) 1-оксомикростегиол, (8) сисокарнозол, (9) таншинон I, (10) 6 β ,13 β -дихидроксилабд-8(17),14-диен-19-оична киселина и (11) 13-хидроксилабд-8,14-диен-6 β ,19-олид).

Сестерпеноиди су C_{25} једињења изведена из пет изопренских јединица и потичу од геранилфарнезилпирофосфата [100]. Испитивањем фитохемијског састава надземног дела *S. mirzaianii* [106] и *S. syriaca* [107] изоловани су салвимириаколид и салвисириаколид. С друге стране, испитивањем састава надземног дела *S. limbata* и *S. yosgadensi* изолована су два динорсестертерпена, јосгаденсонол и 6-дехидрокси-јосгаденсонол [96,108]. Структурне формуле ових једињења приказане су на **Слици 18**.



Слика 18. Једињења из групе сестерпеноида идентификована у биљкама рода *Salvia* ((1) салвимириаколид, (2) салвисириаколид, (3) јосгаденсонол и (4) 6-дехидрокси-јосгаденсонол).

Тритерпеноиди и стероиди су C_{30} једињења која се састоје од шест јединица изопрена. Тритерпеноиди се формирају циклизацијом сквалена, угљоводоника састављеног од два молекула фарнезилпирофосфата [100]. Према својој структури, ова група је даље класификована у шест подгрупа: тритерпеноиди урсанског типа, тритерпеноиди типа олеанана, тритерпеноиди лупане типа, дамаран тритерпеноиди, стероиди и други тритерпеноиди. Урсански и олеанански тип су главни тритерпеноиди који се налазе у многим врстама *Salvia*. $2\alpha,3\alpha$ -дихидрокси-урс-12-ен-28-енска киселина и $2\alpha,3\alpha,24$ -трихидрокси-урс-12-ен-28-енска киселина су урсански тритерпеноиди изоловани из корена *S. sclarea*, док је испитивањем *S. lanigera* изолован тритерпен типа олеанана, 3β -хидроксиолеанан-13 β →28 лактон. Испитивањем биљке *S. multicaulis* успешно је изоловано једињење стероидног типа познато као брасикастерон (**Слика 19**) [96].



Слика 19. Тритерпеноиди и стероиди изоловани из биљака рода *Salvia* ((1) 2 α ,3 α дихидрокси-урс-12-ен-28-енска киселина, (2) 2 α ,3 α ,24-трихидрокси-урс-12-ен-28-енска киселина, (3) 3 β -хидроксиолеанан-13 β →28 лактон, (4) брасикастерол).

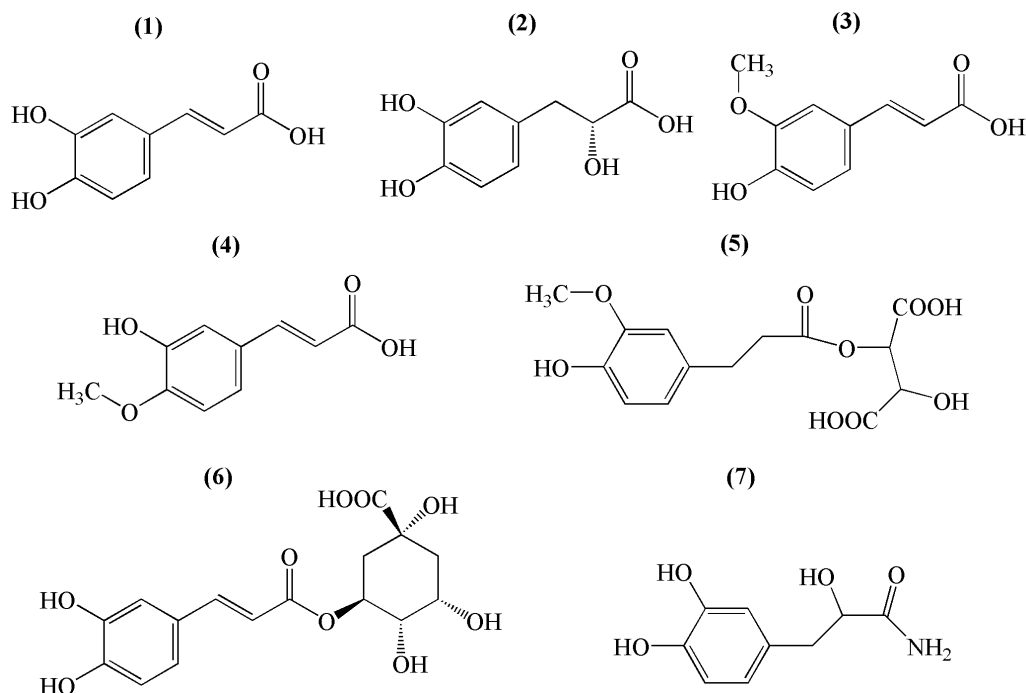
2.3.2.2. Хидрофилна једињења биљака рода *Salvia*

Поред претходно поменутих липофилних компоненти, терпеноида, друга група метаболита су полифеноли растворљиви у води. На основу досадашњих испитивања различитих врста жалфија, фенолне киселине и флавоноиди су означени као основне компоненте полифенолног састава готово свих врста жалфија.

Фенолне киселине су доминантна група једињења која су присутна у воденим, метанолним, етанолним и другим поларним екстрактима биљака рода *Salvia*. Присуство појединих фенолних киселина јединствених само за род *Salvia*, као што су салвианоличне киселине (А-К) или јунанске киселине (А-Х), може бити од таксономског значаја. Осим неколико једноставних бензоевих киселина, као што су 4-хидроксибензоева, протокатехуинска, ванилинска киселина, и друге, већина фенолних киселина у врстама рода *Salvia* су искључиво деривати кафеинске киселине који су карактеристични за род *Salvia*. Изузетак су рузмаринска киселина и литосперминске киселине које се могу срести и у биљкама других родова. Кафеинска киселина игра централну улогу у биохемијским путевима синтезе фамилије Lamiaceae и јавља се претежно у облику димера, као рузмаринска киселина. Код врста рода *Salvia*, кафеинска киселина је градивни блок разних биљних метаболита, од једноставнијих мономера до вишеструких кондензационих производа који доводе до настанка различитих олигомера. Тримери и тетрамери су занимљивији са терапеутске тачке гледишта јер се показало да поседују значајне биолошке активности [99].

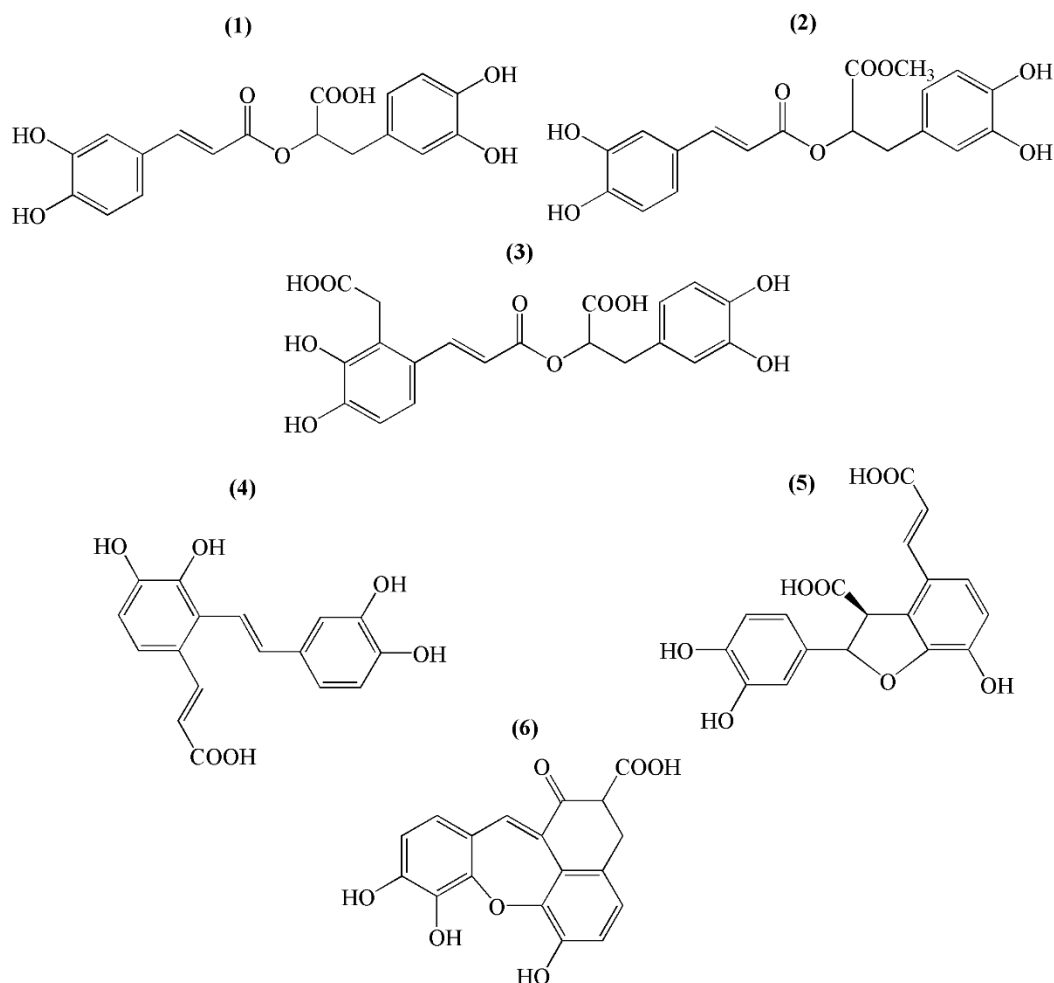
Мономерне фенолне киселине, који су присутне често у различитим врстама жалфија, представљају кафеинска киселина и 3-(3,4-дихидроксифенил)млечна киселина позната као даншенсу (Слика 20). Даншенсу је опште прихваћен назив за ово једињење које је први пут изоловано из биљке *S. miltiorrhiza* (чији је кинески назив даншен). Установљено је да је даншенсу коронарни вазодилатор и да неутралише слободне радикале кисеоника који настају током исхемијско-реперфузионе повреде миокарда,

једнако ефикасно као ензим супероксид дисмутаза [109]. Поред ова два најзначајнија мономерна деривата кафеинске киселине, ферулна киселина, изоферулна киселина и два естра кафеинске киселине моно-ферулоил-винске киселина и хлорогенска киселина (5-кафеоилкинска киселина) такође су идентификована у неким врстама. Амид, 3,3-(3,4-дихидроксифенил)лактамид је пронађен у *S. miltiorrhiza* и поседује већу способност неутрализације слободних радикала од аскорбинске киселине (Слика 20) [99,110].



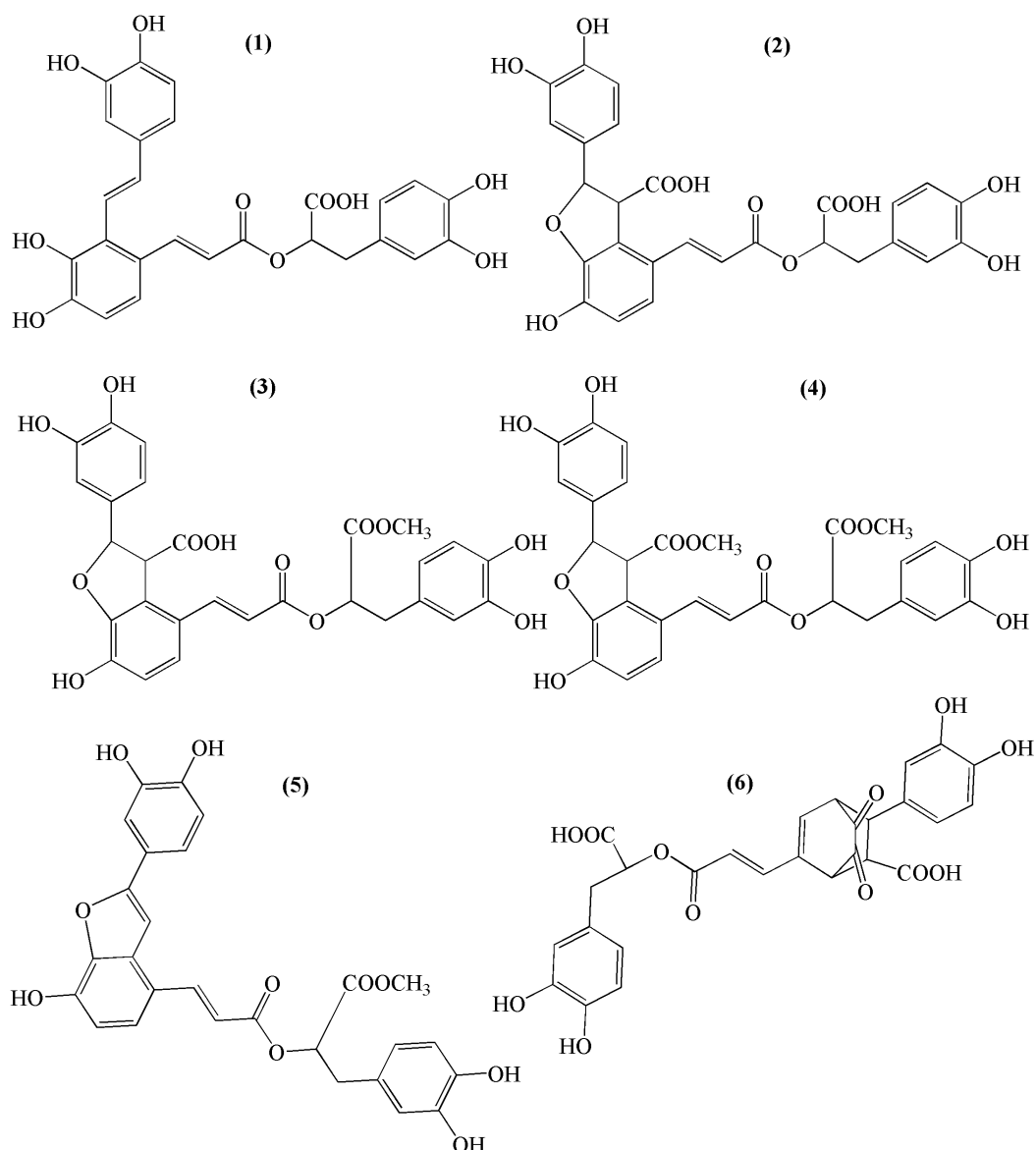
Слика 20. Мономерни деривати кафеинске киселине присутни у роду *Salvia* ((1) кафеинска киселина, (2) 3-(3,4-дихидроксифенил)млечна киселина (даншен), (3) ферулна киселина, (4) изоферулна киселина, (5) моно-ферулоил-винске киселине, (6) хлорогенска киселина (5-кафеоилкинска киселина), (7) 3,3-(3,4-дихидроксифенил)лактамид).

Димери кафеинске киселине структурно се могу поделити на две јединице кафеинске киселине. Најзаступљенија димерна фенолна киселина у врстама *Salvia* је рузмаринска киселина (Слика 21). Сматра се да је рузмаринска киселина најодговорнија за многе биолошке активности ових биљака, потврђена је њена антиинфламаторна, антибактеријска, антивирусна, антиканцерогена, антидијабетска, као и изузетна антиоксидативна активност. Са друге стране, показала је врло добре неуропротективне, кардиопротективне, хепатопротективне, нефропротективне и антиалергетске особине [111]. Остали димери кафеинске киселине идентификовани у биљкама рода *Salvia* приказани на **Слици 21** су метил рузмаринат, салвијанолична киселина Д, салвијанолична киселина Ф, пролитосперминска киселина (прзевалскинска киселина А) и салвијанолична киселина Г [99].



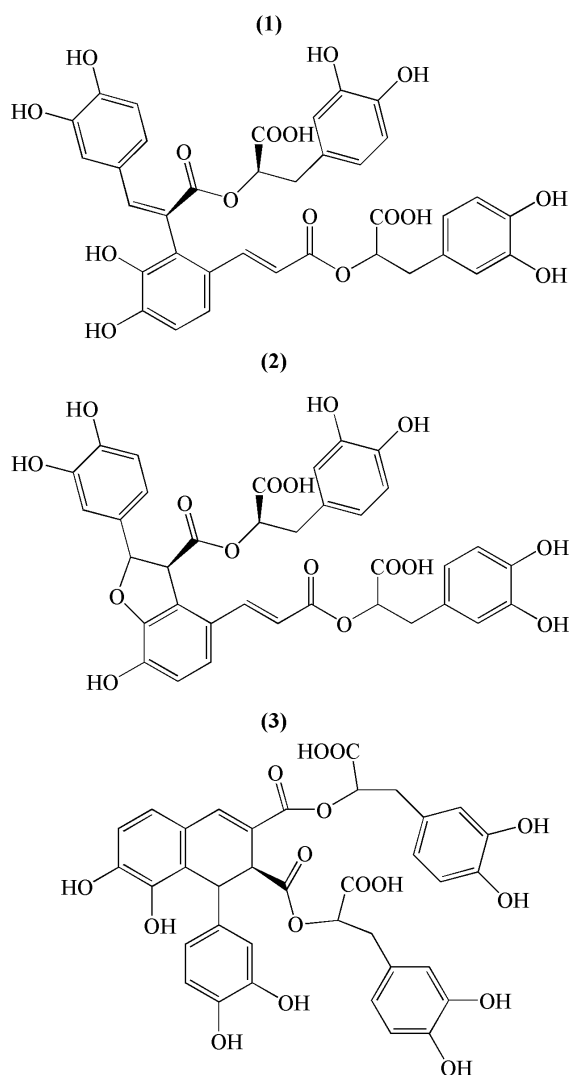
Слика 21. Димерни деривати кафеинске киселине присутни у роду *Salvia* ((1) рузмаринска киселина, (2) метил рузмаринат, (3) салвијанолична киселина Д, (4) салвијанолична киселина Ф, (5) пролитосперминска киселина, (прзевалскинска киселина А) и (6) салвијанолична киселина Г).

Тримери кафеинске киселине се структурно изграђени од три јединице кафеинске киселине. Ову групу чини највећи број метаболита присутних у роду *Salvia* од којих је шест једињења сличне структуре приказано на **Слици 22**, и то салвианолична киселина А, литоспермична киселина, метил естар литоспермичне киселине, диметил естар литоспермичне киселине, салвианолична киселина Ц и јуананска киселина Ц [99,112]. Познато је да је литоспермична киселина активна компонента изолована из *S. miltiorrhiza* која има вишеструке фармаколошке активности, као што су антиинфламаторна, антихипертензивна и антиоксидативна [113]. Салвианоличне киселине поседују различите биоактивности, као што су антиинфламаторна, антиканцерогена, антиоксидативна и кардио-заштитна. Такође, познате су вишеструке биолошке активности салвианоличних киселина, као што су антиоксидативне, антиинфламаторне, кардиопротективне и нарочито антиканцерогене. Бројне *in vitro* и *in vivo* студије потврдиле су велики потенцијал салвианоличних киселина као моћних агенса против канцера [112,114].



Слика 22. Тримерни деривати кафеинске киселине присутни у роду *Salvia* ((1) салвианолична киселина А, (2) литоспермична киселина, (3) метил естар литоспермичне киселине, (4) диметил естар литоспермичне киселине, (5) салвианолична киселина Ц и (6) јунанска киселина Ц).

Тетрамери кафеинске киселине су изграђени од четири јединице кафеинске киселине, и такође се могу сматрати као димерни деривати рузмаринске киселине са различитим начинима повезивања. Ова група обухвата три основна члана (**Слика 23**): салвианоличну киселину Е, салвианоличну киселину Б (литоспермична киселина Б), јунеаничну киселину Г и деривате литоспермичне киселине Б (етил литоспермат Б, магнезијум литоспермат Б и амонијум-калијум литоспермат Б)[99]. Поред поменута четири типа деривата кафеинске киселине, доказано је присуство и комплекснијих деривата, који се једним именом могу назвати олигомерни деривати кафеинске киселине. Јунанеичне киселине А и Б пронађене су у *S. yunnanensis* и једини су познати хексамери кафеинске киселине [115].

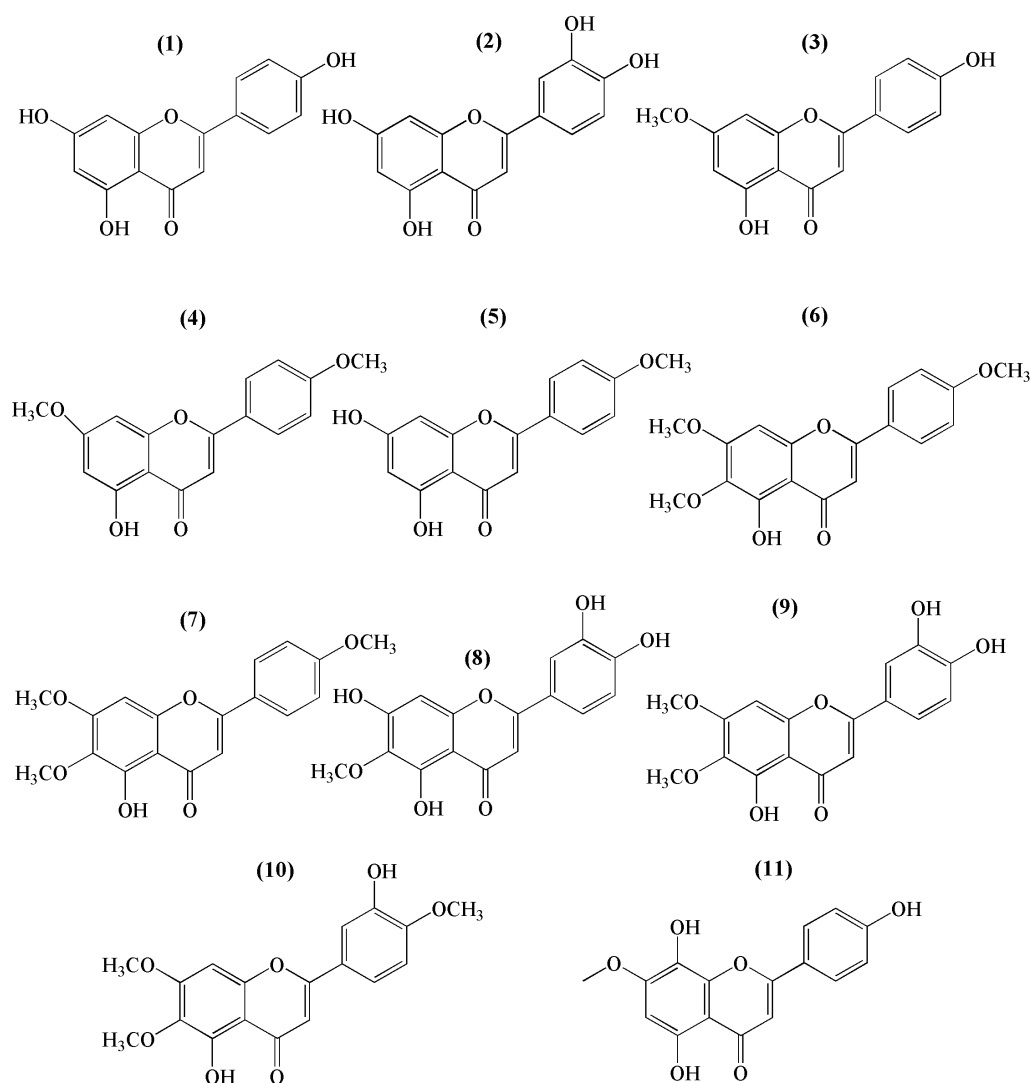


Слика 23. Тетрамерни деривати кафеинске киселине идентификовани у роду *Salvia* ((1) салвианолична киселина Е, (2) салвианолична киселина Б, (3) јунеанична киселина Г).

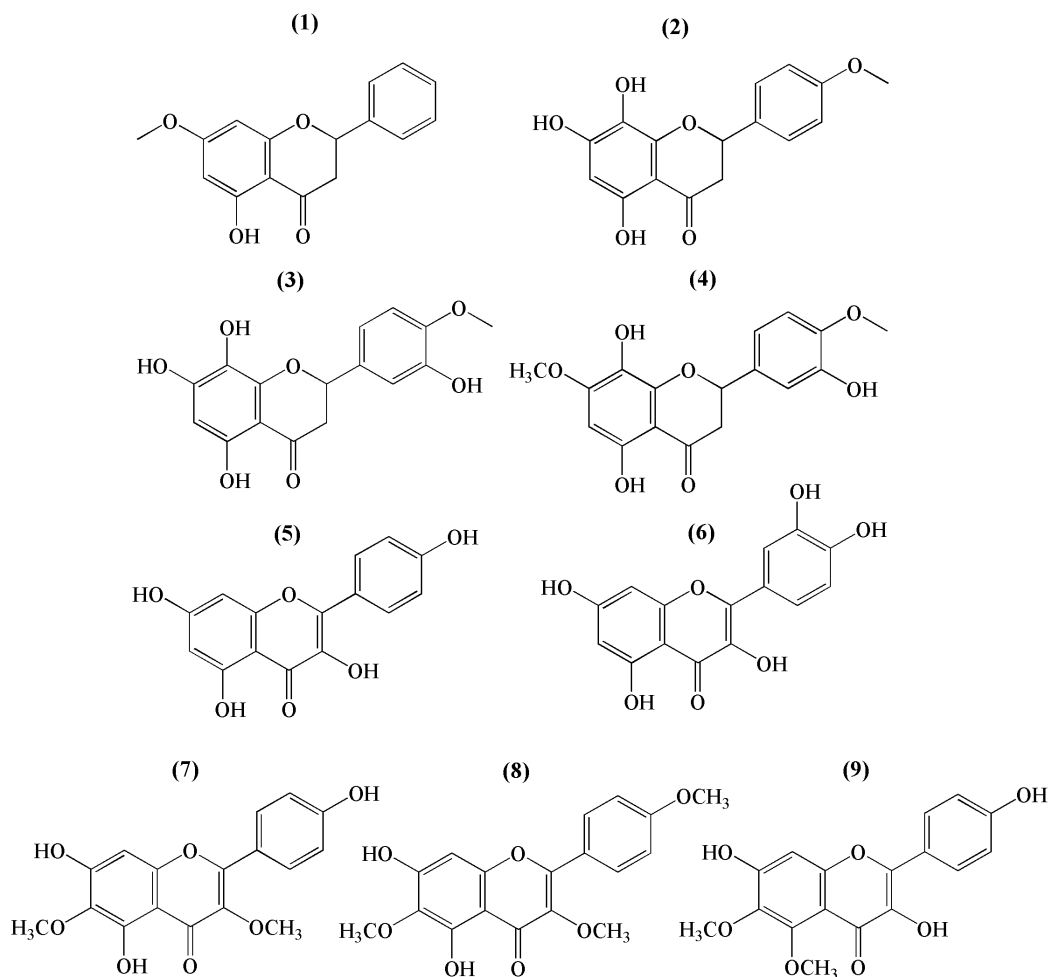
Флавоноиди су широко распрострањени у врстама *Salvia*. Углавном су присутни у облику флавона, флавонола и њихових гликозида. Ова група једињења је, за разлику од фенолних киселина, широко распрострањена у листовима, али и у целокупном надземном делу биљака [116]. На основу доступне литературе, најзаступљенији флавоноиди у биљкама рода *Salvia* су флавоноиди апигенин, лутеолин и њихови одговарајући 6-хидроксиловани деривати (**Слика 24**). Метил естри, као што су апигенин 7-метил етар (генкванин) и апигенин 7,4'-диметил етар, су чести конституенти многих жалфија, док је 4'-метил етар (акацетин) пронађен само код *S. nicolsoniana* и *S. yosgadensis*. Карактеристични флавоноиди за биљне врсте рода *Salvia* су и 6-хидроксиловани деривати апигенина и лутеолина, и то 6-хидроксиапигенин-6,7-диметил етар (цирсимаритин), 6-хидроксиапигенин-6,7,4'-триметил етар (салвигенин) и 6-хидрокси лутеолин-6-метил етар (непетин или еупафолин), 6-хидрокси лутеолин-6,7-диметил етар (цирсиол) и 6-хидрокси лутеолин-6,7,4'-триметил етар (еупаторин) [99]. Код биљне врсте *S. plebeia* идентификован је 8-хидроксиловани флавоноид, 8-хидроксиапигенин 7-метил етар (салвитин) [117].

До сада је потврђено присуство четири дихидрофлаванона код биљака из овог рода, укључујући 5-хидрокси-7-метоксифлаванон, 5,7-дихидрокси-4'-метоксифлаванон (изосакуранетин или наригенин-4'-метил етар), 5,7,3'-трихидрокси-4'-метоксифлаванон (хесперетин) и 5,3'-дихидрокси-7,4'-диметоксифлаванон (Слика 25) [99].

Присуство флавонола ограничава се углавном на оне који потичу од 5,7,4'-трихидроксифлавонола (кемпферола), 5,7,3',4'-тетрахидроксифлавонола (кверцетина) и њихових деривата, док су 6-хидроксиловани флавоноли углавном присутни у облику 6-хидроксикемпферола и укључују 6-хидроксикемпферол 3,6-диметил етар, 6-хидроксикемпферол-3,6,4'-триметил етар (сантин) и 6-хидроксикемпферол-5,6-диметил етар који је један од два позната 5-метил етра присутна у биљкама рода *Salvia* (Слика 25).



Слика 24. Једињења неких флавоонских агликаона апигенина и лутеолина присутних у биљкама рода *Salvia* ((1) апигенин, (2) лутеолин, (3) апигенин 7-метил етар (генкванин), (4) апигенин 7,4'-диметил етар, (5) апигенин 4'-метил етар (ацацетин), (6) 6-хидроксиапигенин-6,7-диметил етар (цирсимаритин), (7) 6-хидроксиапигенин-6,7,4'-триметил етар (салвигенин) и (8) 6-хидрокси-лутеолин-6-метил етар (непетин или еупафолин), (9) 6-хидрокси-лутеолин-6,7-диметил етар (цирсилиол), (10) 6-хидрокси-лутеолин-6,7,4'-триметил етар (еупаторин), (11) 8-хидроксиапигенин 7-метил етар (салвитин)).

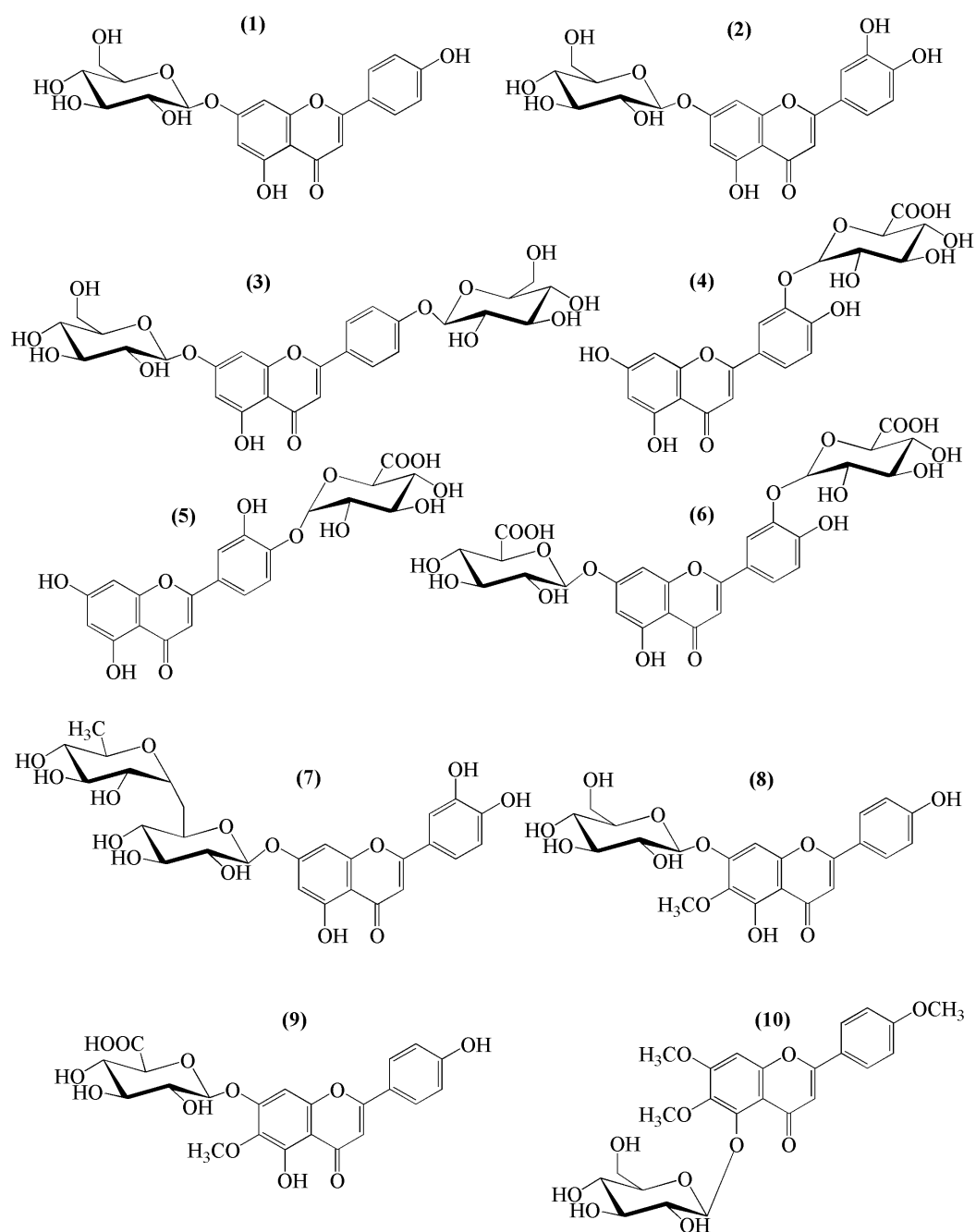


Слика 25. Једињења неких флаванонских и флавонолских агликона присутних у биљкама рода *Salvia* ((1) 5-хидрокси-7-метоксифлаванон, (2) 5,7-дихидрокси-4'-метоксифлаванон (изосакурнетин или наригенин-4'-метил етар), (3) 5,7,3'-трихидрокси-4'-метоксифлаванон (хесперетин) и (4) 5,3'-дихидрокси-7,4'-диметоксифлаванон, (5) 5,7,4'-трихидроксифлавонола (кемпферола), (6) 5,7,3',4'-тетрахидроксифлавонола (кверцетина), (7) 6-хидроксикемпферол 3,6-диметил етар, (8) 6-хидроксикемпферол-3,6,4'-триметил етар (сантин) и (9) 6-хидроксикемпферол-5,6-диметил етар).

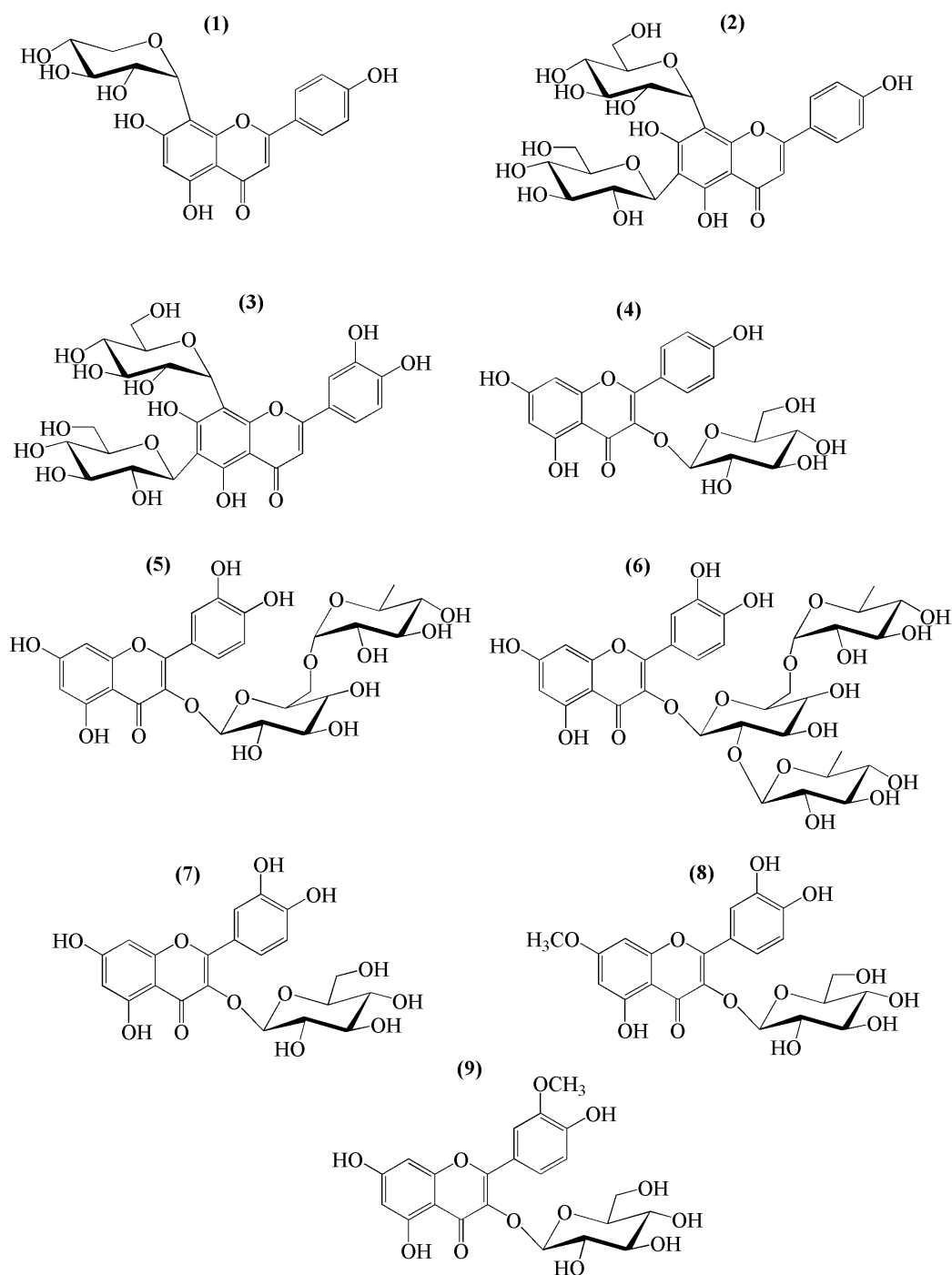
Флавоноски *O*-гликозиди (Слика 26 и Слика 27) су уобичајена класа једињења у роду *Salvia*. Већина њих су флавоно 7-гликозиди, од којих су најзаступљенији апигенин 7-глукозид (космозин), лутеолин 7-глукозид (цинарозид) и њихови одговарајући 7-глукурониди [99]. Поред флавоноида који су гликолизовани са једном јединицом неког моносахарида, могу се срести и неколико са две или више јединица. Један од њих је апигенин 7,4'-диглукозид који је детектован као ко-пигмент у плавом цвету *S. patens* [118]. У поређењу са апигенинским гликозидима, лутеолински гликозиди су распрострањенији у овом роду. Лутеолин 3'-глукуронид присутан је у *S. officinalis* [119], док је лутеолин 4'-глукуронид пронађен у *S. lavandulifolia* заједно са другим флавоноидима [120]. Неколико лутеолин дисахарида је идентификовано у роду *Salvia* од којих се као значајнији издвајају лутеолин 3'-глукозид-7-глукуронид и лутеолин 7-рутинозид [99]. Род *Salvia* је такође богат садржајем 6-хидроксифлавононим гликозидима, исто као и претходно поменути агликонским облицима. Од 6-хидроксиапигенин глукозида у роду *Salvia* искључиво су присутни 6-метилзовани деривати као што су 6-метоксиапигенин 7-глукозид (хомоплантагенин), 6-метоксиапигенин 7-глукуронид и салвигенин 5-глукозид, одговарајући 6-

хидроксилутеолин гликозиди су равномерно распоређени између оних који су метиловани и неметиловани (**Слика 26**) [99].

У поређењу са биљкама из рода *Lythrum* које су богате у садржају флавоноидних С-гликозида, за биљке рода *Salvia* није карактеристична ова група једињења. Међутим у биљци *S. blepharophylla* идентификовани су апигенин 8-С-глукозид (**Слика 9**, витексин), апигенин 8-С-арабинозид и апигенин 6,8-ди-С-глукозид (**Слика 27**). Док је од лутеолин С-глукозида, једино лутеолин 6,8-ди С-глукозид пронађен код биљке *S. aegyptiaca* (**Слика 27**). Флавонолни глукозиди који се налазе у роду *Salvia* су искључиво 3-гликозиди. Позната су три кемпферол гликозида, али они обухватају низ једињења од моно- до триглукозида за које је пример кемпферол 3-глукозид (астрагалин) пронађен у *S. cavaleriei*, кемпферол 3-робинозид и кемпферол 3-(2,6-дирамнозилглукозид) у *S. farnacea*. Глукозиди кверцетина такође укључују њихове метил етре, тако да су, поред најчешћег 3-глукозида кверцетина (изокверцитрина), присутни рамнетин (кверцетин 7-метил етар) 3-глукозид и изорамнетин (кверцетин 3'-метил етар) 3-галактозид (**Слика 27**).



Слика 26. Једињења неких флаворн 7-гликозида и 6-хидроксилованих гликозида присутних у биљкама рода *Salvia* ((1) апигенин 7-глукозид (космозин), (2) лутеолин 7-глукозид (цинарозид), (3) апигенин 7,4'-диглукозид, (4) лутеолин 3'-глукуронид, (5) лутеолин 4'-глукуронид, (6) 3'-глукозид-7-глукуронид, (7) лутеолин 7-рутинозид, (8) 6-метоксиапигенин 7-глукозид, (9) 6-метоксиапигенин 7-глукуронид, (10) салвигенин 5-глукозид).



Слика 27. Једињења неких флавоонских *C*-глюкозида и флавонолних 3-глюкозида присутних у биљкама рода *Salvia* ((1) апигенин 8-*C*-арабинозид, (2) апигенин 6,8-ди-*C*-глюкозид, (3) лутеолин 6,8-ди *C*-глюкозид, (4) кемпферол 3-глюкозид, (5) кемпферол 3-робинозид, (6) кемпферол 3-(2,6-дирамнозилглюкозид), (7) 3-глюкозид кверцетина (изокверцитрина), (8) кверцетин 7-метил етар 3-глюкозид (рамнетин), (9) кверцетин 3'-метил етар 3-галактозид (изорамнетин)).

2.4. Фармаколошки потенцијал лековитих биљака

2.4.1. Оксидативни стрес као покретач многих здравствених обољења

У контексту старења, оксидативни стрес је дефинисан као ћелијско стање у којем ћелија није способна да неутралише слободне радикале који настају уобичајеним метаболичким процесима, што резултира оштећењем макромолекула који су неопходни за њено нормално функционисање. Чак и под нормалним условима, због неравнотеже између антиоксиданата и прооксиданата, стање оксидативног стреса постоји у ћелији аеробног организма. Међутим, његови високи нивои могу довести до дисрегулације редокс сигналних путева и дисфункције различитих органа, укључујући погоршање здравља и неуролошке болести попут Алцхајмерове и Паркинсонове болести [121].

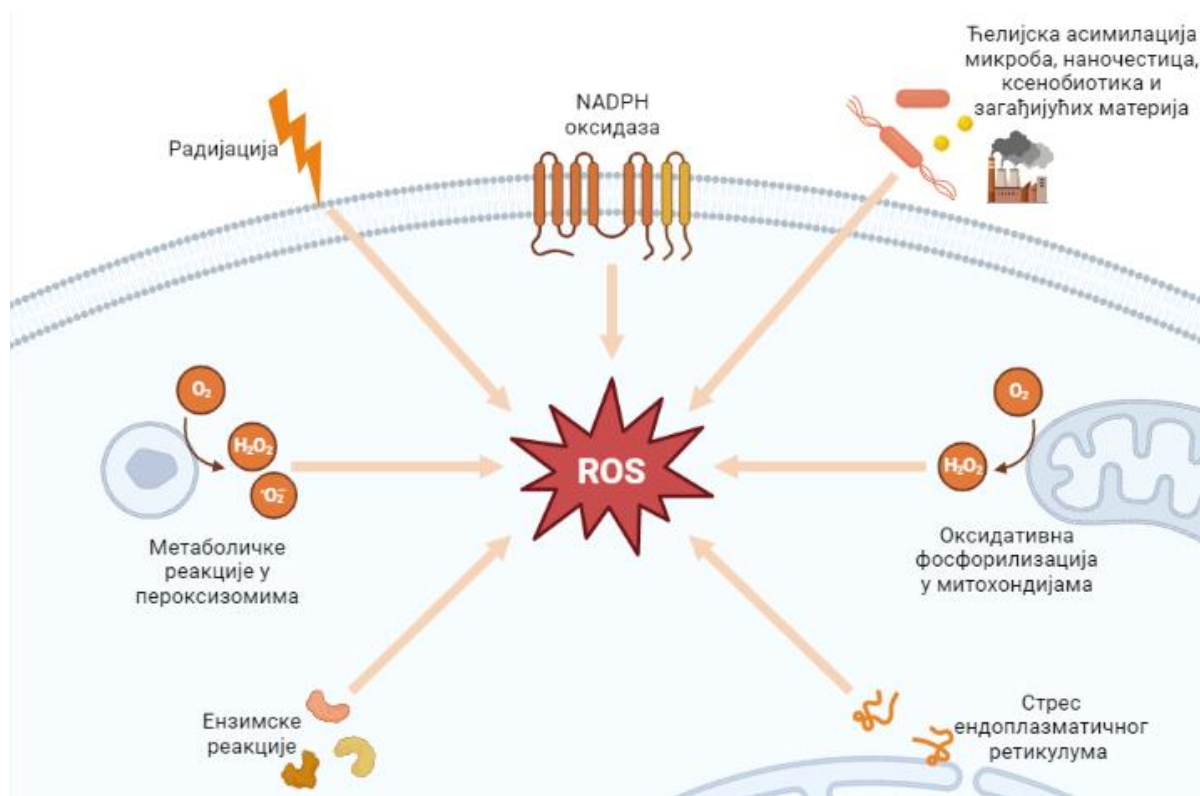
Формирање слободних радикала може се десити у ћелијама прихватањем или губљењем електрона који делују као редуктанти, односно оксиданти. Са једним или више неспарених електрона у њиховој спољашњој орбитали, ови радикали су атоми или молекули, који су високо реактивни и могу се везати за други молекул и биохемијски га променити. Слободни радикали могу оштетити различите биолошке молекуле укључујући протеине, нуклеинске киселине и липиде, мењајући нормалну редокс равнотежу и изазивајући повећано оксидативно оптерећење [122].

Реактивне врсте кисеоника и азота као и њихова комбинација, представљају реактивне радикалске и нерадикалске деривате кисеоника и азота који настају као последица оксидативног стреса. У **Табели 1** приказани су неке најзначајније реактивне кисеоникове и азотове врсте које се формирају континуирано у ниским концентрацијама током нормалних физиолошких процеса. Они играју кључну улогу у трансдукцији ћелијског сигнала, инфламаторним одговорима, експресији гена, регулацији рада глатких мишића, уништавању патогена у инфицираним ћелијама помоћу никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) оксидазе, нарушавајући мембрану патогена и оштећујући њихову ДНК и друге биомолекуле. Врсте као што су супероксидни анјонски радикал ($O_2^{\cdot -}$), водоник-пероксид (H_2O_2) и азот-моноксидни радикал ($NO^{\cdot}$) створене у високим концентрацијама могу бити токсичне за ћелије, производећи још неколико реактивних врста, тј. хидроксил радикал ($HO^{\cdot}$), синглетни кисеоник (1O_2) и пероксинитрит ($ONOO^{\cdot}$) [123]. Касних осамдесетих година прошлог века, показано је да ћелије производе азот моноксид који је поред своје токсичности укључен у регулацију кардиоваскуларног, имунолошког и нервног система. У централном нервном систему, азот моноксид има низ функција, као што су регулација синаптичке пластичности, циклус спавања и буђења и лучење хормона. Физиолошке количине овог молекула су неуропротективне, док су веће концентрације изразито неуротоксичне [121,124]. У последњој деценији велико интересовање у научној заједници изазивају и реактивне врсте угљеника и сумпора које имају улоге у различитим биолошким процесима и системима. Међутим, и оне могу бити штетне у неким ситуацијама. На пример, њихово присуство у загађеном ваздуху, које је врло често може довести до оштећења биолошких молекула [125]. Појавом таквог стања доводи до разарања неколико ћелијских структура, као што су мембране, липиди, протеини, липопротеини и ДНК. Као радикална ланчана реакција, липидна пероксидација се врло брзо шири и утиче на велику количину липидних молекула. Протеини такође могу бити оштећени оксидативним стресом, подвргнути конформационим модификацијама које би могле да доведу до губитка или оштећења њихове ензимске активности [126].

Табела 1. Реактивне кисеоничне и азотне врсте које настају током нормалног метаболизма и њихове карактеристике [127].

Назив	Структура	Карактеристике
Реактивне кисеоничне врсте		
Супероксид анјон	$O_2^{\cdot -}$	Веома нестабилни, сигнална функција, синаптичка пластичност
Водоник пероксид	H_2O_2	Токсичност ћелија, сигнална функција, стварање других реактивних кисеоничних врста
Хидроксил радикал	$OH^{\cdot}$	Слободни радикали, веома нестабилни, веома реактивни агенси
Алкокси радикал	$RO^{\cdot}$	Слободни радикали, производ реакције липида
Пероксил радикал	$ROO^{\cdot}$	Слободни радикали, производ реакције липида
Хипохлоритни анјон	OCl^-	Реактивне врсте кисеоника и хлора, генерисане мијелопероксидазом
Синглетни кисеоник	1O_2	Индуковани/побуђени молекул кисеоника, радикалски и нерадикалски облик
Озон	O_3	Еколошки токсин
Реактивне азотне врсте		
Азот-моноксид радикал	$^{\cdot}NO$	Токсин из животне средине, ендогени сигнални молекул
Пероксинитрит	$ONOO^-$	Високо реакциони интермедијер $^{\cdot}O_2$ и $^{\cdot}NO$
Азот-диоксид радикал	$^{\cdot}NO_2$	Високо реактивни радикал, еколошки токсин
Остали азотови оксиди	NO_x	Слободни радикали, производ реакције липида

Реактивне кисеоничне врсте се могу произвести из ендогених или егзогених извора. Реактивне врсте настале из ендогених извора се производе у деловима ћелије помоћу разних ензима, који су укључени у оксидацију липида унутар пероксизома, оксидативну фосфорилацију у митохондријама, цитоплазматске оксидазе, циклооксигеназе и NADPH оксидазе (**Слика 28**) [121,124,128]. Такође, у ендогене изворе се убрајају и процеси оксидоредукције у којима учествују метали са променљивом валенцом, аутооксидација неких мањих молекула, процес фагоцитозе у ћелији (инфламација), различите болести (аутоимуне, малигне, кардиоваскуларне, неуродегенеративне), као и стања као што су хипоксија и исхемија. Интеракција између реактивних кисеоничних врста и цитокина може бити комплексна. Реактивне кисеоничне врсте могу регулисати сигналне путеве цитокина, а истовремено, активација цитокина може индуцирати производњу радикала. Дисбаланс између реактивних кисеоничних врста и цитокина може допринети различитим патолошким процесима у организму. У егзогене изворе који доприносе настанку оксидативног стреса спадају трансформација ксенобиотика (током метаболизма једињења унетих у организам као што су адитиви у храни, лекови, хемикалије из животне средине), дејство спољашњих фактора средине (УВ и јонизујуће зрачење), при појачаној физичкој активности и при тровању различитим токсичним супстанцама [124].



Слика 28. Места настанка реактивних кисеоничних врста под утицајем ендогених и егзогених фактора. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Окисидативна фосфорилација производи највише ових реактивних врста које доприносе укупном оксидативном оптерећењу. Аеробни организми користе митохондрије као главни генератор енергије за реализацију својих виталних функција [121]. Међутим, ове реакције увек доводе до стварања реактивних кисеоничних једињења која, покушавајући да се стабилизују, привлаче електроне од других биомолекула, чинећи их такође дестабилизованим. Стога, они нису више у стању да правилно обављају своје функције, мењајући тако хомеостазу и на крају, изазивајући смрт ћелије [121]. Такође, због оксидативних карактеристика атмосфере на нашој планети, на продукцију реактивних врста утичу неравнотеже у оксидационо-редукционим реакцијама и загађење ваздуха различитим честицама и гасовима (чађ, озон, азотни оксиди и сулфурни оксиди). Све ово заједно може допринети настанку или погоршању многих болести, као што су рак, дијабетес, Паркинсонова болест, итд. Поједини аутори наводе да је ова неравнотежа у редокс реакцијама деловала као иницијатор развоја ефикасних механизма за елиминисање токсичности кисеоника. Ово је омогућило еволуцију виших облика живих организама, који су много специјализованији и заштићенији од негативног деловања реактивних кисеоничних врста [121,129]. Велики број доказа показује да оксидативни стрес може бити одговоран, са различитим степеном важности, за настанак или прогресију неколико болести (нпр. рак, неуролошке болести, дијабетес, метаболички поремећаји, атеросклероза и кардиоваскуларне болести).

- *Канцер и оксидативни стрес*

Настанак рака код људи је сложен процес, који зависи од ћелијских и молекуларних промена посредованих ендогеним и егзогеним оксидацијским факторима. Већ је добро познато да је оксидативно оштећење ДНК један од стимуланса одговорних за развој рака

[130]. Рак може бити подстакнут или промовисан хромозомским абнормалностима и активацијом онкогена која је подстакнута оксидативним стресом. Хидролизоване базе ДНК су уобичајени нуспроизводи оксидације ДНК и сматрају се једним од најважнијих процеса у хемијској канцерогенези. Формирање такве врсте адуката омета нормалан раст ћелија мењајући физиолошки транскриптомски профил и изазивајући мутације гена. Оксидативни стрес такође може да изазове много различитих модификација структуре ДНК (лезије базе и шећера, унакрсне везе ДНК-протеина, прекиде ланца и места без база). Пушење дувана, разни загађивачи животне средине и хронична запаљења су извори оксидативног оштећења ДНК који могу допринети настанку тумора [130,131]. Оксидативни стрес који проистиче од животног стила такође може играти важну улогу у развоју рака, као што сугерише снажна корелација између конзумирања масти у исхрани (фактор који излаже организам већем ризику од пероксидације липида) и стопе смртности од различитих врста рака [126,132].

- *Кардиоваскуларне болести и оксидативни стрес*

Кардиоваскуларне болести су клиничка стања са вишефакторском етиологијом, генерално повезани са веома великом количином фактора ризика, од којих су најшире препознати хиперхолестеролемија, хипертензија, навика пушења, дијабетес, неуравнотежена исхрана, стрес и неактиван начин живота. Оксидативни стрес делује углавном као окидач атеросклерозе. Добро је познато да је формирање атероматозног плака резултат ране упале ендотела, што заузврат доводи до стварања реактивних кисеоничних врста од стране макрофага. Циркулишући липопротеини ниске густине (LDL, *low-density lipoprotein*, *енг.*) се затим оксидују реактивним врстама кисеоника, изазивајући настанак пенастих ћелија и акумуляцију липида, што за последицу има формирања атеросклеротског плака. И *in vivo* и *ex vivo* студије пружиле су доказе који подржавају улогу оксидативног стреса у атеросклерози, исхемији, хипертензији, кардиомиопатији, хипертрофији срца и конгестивној срчаној инсуфицијенцији [126,132,133].

- *Неуролошке болести и оксидативни стрес*

Оксидативни стрес је повезан са неколико неуролошких болести (нпр. Паркинсонова болест, Алцхајмерова болест, амиотрофична латерална склероза (АЛС), мултипла склероза, депресија и губитак памћења). Неколико експерименталних и клиничких студија потврдило је везу оксидативног стреса са Алцхајмеровом болешћу и то првенствено губитком неурона и прогресијом болести. Код свих пацијената код којих је установљено да болују од Алцхајмера примећено је таложење β -амилоида, пептида који настаје деловањем слободних радикала и који је делимично одговоран за неуродегенерацију уочену током почетка и прогресије болести [134].

- *Респираторне болести и оксидативни стрес*

Неколико истраживања је показало да су плућне болести, попут астме и хроничне опструктивне болести плућа, одређене системском и локалном хроничном инфламацијом која је повезана са оксидативним стресом. Познато је да оксиданти појачавају упалу активацијом различитих киназа које укључују путеве и факторе транскрипције као што су NF- κ B и AP-1[135,136].

- *Реуматодни артритис и оксидативни стрес*

Реуматоидни артритис је хронични инфламаторни поремећај који погађа зглобове и околна ткива, а карактеришу га макрофаги и активирана инфилтрација Т ћелија. Слободни радикали на месту упале играју значајну улогу како у започињању тако и у прогресији овог синдрома, као што је показано повећањем нивоа изопростана и простагландина у синовијалној течности оболелих пацијената [126,137].

- *Болести јетре и оксидативни стрес*

Јетра је орган који је посебно изложен реактивним врстама кисеоника, које не настају само током метаболичких функција већ и током биотрансформације ксенобиотика. Појава оксидативног стреса утиче на функције јетре, модулира упалне путеве и доприноси болести. Доводи се у директну везу са акутним оштећењем јетре и у патогенези преовлађујућих инфективних или метаболичких хроничних болести јетре, као што су вирусни хепатитис Б или Ц, алкохолна масна болест јетре, неалкохолна масна болест јетре и неалкохолни стеатохепатитис. Штавише, оксидативни стрес игра кључну улогу у прогресији болести јетре до фиброзе јетре, цирозе и хепатоцелуларног карцинома [138].

- *Болести бубрега и оксидативни стрес*

За мноштво болести које утичу на бубрежни апарат, као што су гломеруло- и тубулски интерстицијски нефритис, бубрежна инсуфицијенција, протеинурија и уремија одговоран је оксидативни стрес [132]. Бубрези су погођени оксидативним стресом углавном због чињенице да производња реактивних кисеоничних врста индукује груписање инфламаторних ћелија и производњу проинфламаторних цитокина, што доводи до почетне инфламаторне фазе. У овој раној фази, доминантну улогу имају TNF- α и IL-1 β , као проинфламаторни медијатори, као и NF- κ B као транскрипциони фактор потребан за одржавање инфламаторног процеса. Последњу фазу карактерише повећање синтезе TGF- β цитокина који је важан за регулисање кључних ћелијских активности. Дакле, када стимуланти оксидативног стреса делују хронично на бубрежно ткиво, резултат ће бити почетна фаза упале и касније формирање обилног фиброзног ткива које нарушава функцију органа, што потенцијално доводи до инсуфицијенције бубрега. Познато је да су одређени лекови, као што су циклоспорин, такролимус, гентамицин и блеомицин, нефротоксични углавном због чињенице да повећавају ниво слободних радикала и оксидативни стрес путем пероксидације липида [126]. Тешки (Cd, Pb, Hg и As) и прелазни (Cu, Co, Fe и Cr) метали који делују као моћни индуктори оксидативног стреса, одговорни су за различите облике нефропатије [131].

2.4.1.1. *Егзогени антиоксиданти у улози регулације оксидативног стреса*

Људско тело поседује неколико стратегија у борби са негативним ефектима слободних радикала и оксидативног стреса. Ендогени антиоксиданти се могу поделити у две основне групе, и то ензимски (нпр., супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза (GPx)) и неензимски (нпр., липоична киселина, глутатион, L-аргинин и коензим Q10). Поред ових, постоји неколико егзогених антиоксидативних молекула животињског или биљног порекла, које се уносе исхраном или суплементацијом. Постоје различите дефиниције антиоксиданата. Најсвеобухватнија дефиниција описује антиоксиданте као супстанце које директно уклањају слободне

радикале, инхибирају њихову производњу или индиректно делују на регулацију антиоксидативне одбране. Штавише, антиоксидативна једињења треба да имају способност да формирају нови стабилни радикал који је неактиван за даљу оксидацију, након уклањања слободних радикала. Механизми заштите антиоксиданата код људи укључују три линије одбране: превентивне антиоксиданте, антиоксиданте који уклањају радикале и антиоксиданте за обнављање стања редокс равнотеже.

Најпознатије једињење природног порекла које поседује изузетне антиоксидативне особине јесте аскорбинска киселина или витамин Ц. Аскорбинска киселина је једињење добро растворно у води које је класификовано у групу природних антиоксиданата. Аскорбат реагује са реактивним кисеоничним врстама, неутралише их при чему настаје полухидроаскорбат радикал, који је слабо реактивна хемијска врста, чиме ефикасно смањује ризик од оксидативног стреса неутралисањем слободних радикала [126]. Витамин Е, такође, је познат као један од најснажнијих природних антиоксиданата. Токоферол (витамин Е) има улогу у регулацији оксидативног стреса огледа се у регулацији NF- κ B пута и стварања пенастих ћелија услед оксидације нискомолекуларних липопротеина, смањујући c-Jun фосфорилацију (инхибирајући упалу и инвазију миоцита) и експресију матрикса металопроотеаза [126].

Многобројне студије су показале да су полифенолна једињења биљака препозната као активни антиоксиданси, чак и при ниским концентрацијама, иако већина доказа о антиоксидативном капацитету потиче углавном из *in vitro* студија. Међутим, на основу резултата многих студија, постоји јасан концензус да егзогени антиоксиданти, а међу њима и полифенолна једињења, неутралишу слободне радикале и уклањају или поправљају оштећене биомолекуле. Њихова антиоксидативна активност произилази из њиховог капацитета за неутрализацију слободних радикала, али и потенцијалне хелирајуће активности према прелазним металима. Ова једињења могу донирати водоников атом слободном радикалу преко механизма преноса водониковог атома, формирајући феноксил радикал који може да прекине ланац оксидације или пероксидације липида. Експерименталне студије су показале да феноксидни радикали могу бити подвргнути рекомбинацији, формирајући нереактивне димере (**Схема 2(1)**), могу бити стабилизирани резонантним ефектом (**Схема 2(2)**) и могу формирати интермолекуларну водоничну везу (**Схема 2(3)**) и стабилизирати се на тај начин [123].

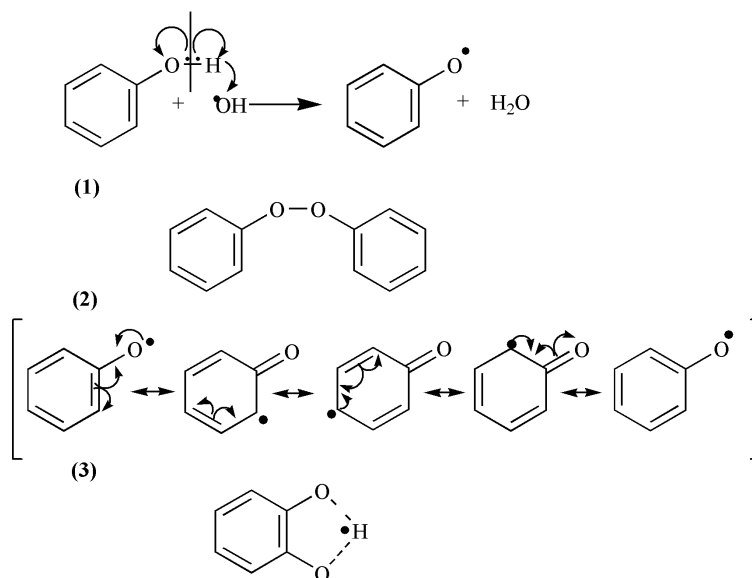
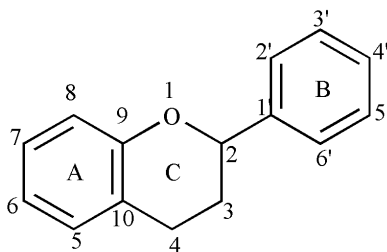


Схема 2. Настанак феноксидног радикала и начини његове стабилизације, (1) димеризација, (2) резонанциони ефекат, (3) формирање интрамолекуларске водоничне везе.

Стабилност феноксног радикала одређује ниво антиоксидативне ефикасности фенолног једињења. Овај процес у великој мери зависи од хемијске структуре фенолног једињења, посебно од присуства додатних -ОН група, њиховог броја и реактивног положаја, као и већег степена делокализације електрона преко бензоеног прстена. Флавоноиди су најраспрострањенија класа фенолних једињења (око 80% свих фенолних једињења). Ова класа једињења има скелет хроманског типа са два ароматична прстена (А- и В-прстенови) повезана преко три атома угљеника, формирајући хетероциклични прстен С који садржи атом кисеоника (**Слика 29**). *In vitro* студије су показале да фенолна једињења који имају катехолни део у В прстену, двоструку везу између С2 и С3 у С прстену и, поред тога, имају ОН групе повезане са А прстеном на С3 и С5 позицијама показују високу антиоксидативну ефикасност. Присуство катехолне структуре В прстена је кључно у овом погледу и ефикасност преноса атома водоника негативно корелира са јачином фенолне О–Н везе. Са слабијом везом, антиоксидативна моћ је већа. Супституенти који донирају електроне на орто и/или пара позицијама смањују енергију дисоцијације фенолне О–Н везе. Студије о повезаности хемијске структуре фенолног једињења и њихове антиоксидативне моћи показале су да флавоноли показују већу антиоксидативну моћ од флавона [123].

Друга структурна карактеристика фенолних једињења важна за њихов антиоксидативни потенцијал укључује способност хелатизације јона прелазних метала одговорних за производњу слободних радикала (нпр. Fe (III), Cu (II)). Присуство хидроксилне групе на положају 3- или 5-, незасићења у С прстену и карбонилне групе на положају 4 овог прстена представља најповољније околности за комплексирање металних јона. Поред тога, дихидроксиловани В прстен у одређеним типовима фенолних једињења је друго место за везивање јона метала. Међутим, због ниске концентрације фенолних једињења у људским ткивима, њихова способност инхибирања слободних радикала, као и ефикасност хелатизације метала је ограничена [123].



Слика 29. Основни скелет свих типова флавоноида.

2.4.2. Једињења биљног порекла као антимикуробни агенси

Последњих година су предложене различите стратегије за превазилажење резистенције антибиотика. Једна од препоручених стратегија за постизање овог циља укључивала је комбинацију других молекула са неуспешним антибиотикима, што се одражава на пораст антибактеријске активности. Немогућност синтетичке хемије да адекватно одговори на проблем све веће резистентности микроорганизама поново је бацио фокус на истраживање антимикуробног потенцијала биљака и других природних производа. Очекује се да ће светска улагања у проналажење нових антиинфективних лекова порасти за 60% наредних година. Употреба биљних екстраката, као и других алтернативних облика антимикуробних третмана, ужива велику популарност последњих година. Отприлике трећина људи који су испитани у Сједињеним Државама користила је најмање једну „неконвенционалну“ терапију током претходних година [139,140].

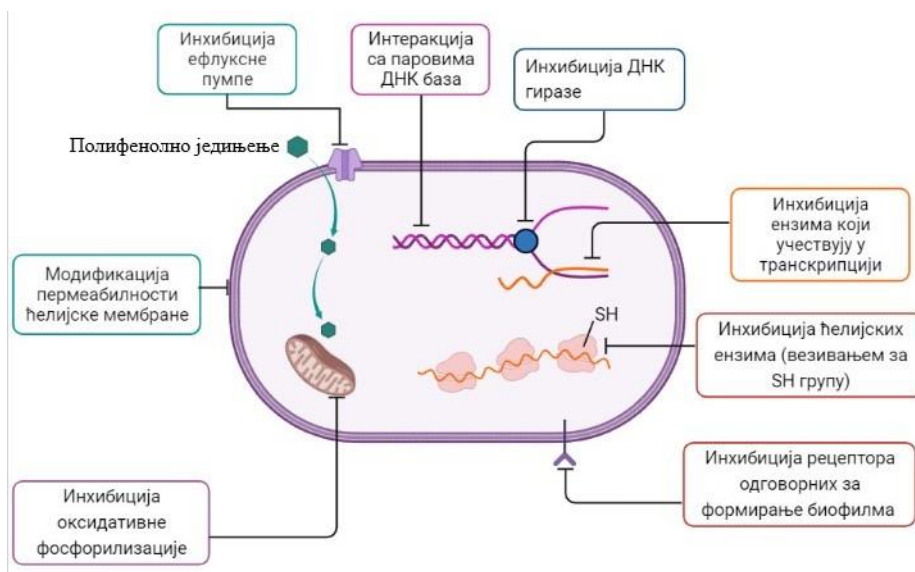
Антимикробна једињења из лековитих биљака могу инхибирати раст бактерија, гљивица, вируса и протозоа механизмима који су различити од механизма антимикробних лекова и могу имати значајну клиничку вредност у лечењу резистентних сојева микроба. Бактерије могу развити отпорност и на третман препаратом који садржи само један активни састојак биљног порекла са специфичним циљем, слично као и антибиотици [141]. Међутим, ефикасност екстракта лековитих биљака да инхибирају раст бактерија је повезана и са синергистичким ефектом присутних активних једињења у екстракту. Појам синергизма у овом случају описује стање у којем екстракт који представља скуп различитих једињења поседује знатно већу антимикробну активност од збира активности сваког једињења засебно. Овакво деловање произилази из постојања вишециљних механизма, односно могућности појединачних хемијских једињења у екстракту способних да потисну механизме отпорности бактерија фармакокинетичким или физичко-хемијским ефектима, што може резултирати повећањем биорасположивости, растворљивости и брзине ресорпције, али и неутрализације штетних ефеката и смањење токсичности појединачних компоненти у самом екстракту [142,143]. Синергистички ефекат не постоји само између једињења биљног порекла. Много је научних радова који су потврдили повећање ефикасности различитих антимикробних лекова када се примењују у комбинацији са екстрактима биљака [142].

Биоактивна једињења биљног порекла која имају терапеутску вредност су углавном секундарни метаболити који настају као резултат секундарног биљног метаболизма и могу бити међупродукти или крајњи производи. Имају широк спектар антимикробне активности у зависности од структуре, броја и положаја супституентских група, присуства гликозидних веза, алкилације ОН група, као и топографије и климе станишта биљке. У већини случајева, биљни екстракти садрже сложене мешавине фитоједињења, а њихово синергистичко деловање може дати појачан ефекат антимикробне активности. Ова једињења могу утицати на микробну ћелију на неколико начина.

Примарно циљно место биоактивних једињења је ћелијска мембрана микроорганизма, утичући на њену структуру и интегритет, пермеабилност и функционалност на различите начине [141,144]. Претпоставља се да биљни екстракти у свом саставу могу да садрже инхибиторе ефлуксне пумпе. Поред тога, инхибиција нормалне ћелијске комуникације је такође описана као један од најперспективнијих механизма деловања биоактивних једињења биљака код резистентних патогена [143]. Инхибитори ћелијске комуникације имају способност да смање експресију гена одговорних за контролу густине ћелијске популације, при томе треба да буду и хемијски стабилни како би се одупрли метаболичким процесима и процесима одстрањивања из организма домаћина [141,145]. Одређена фитоједињења могу да модификују или инхибирају протеин-протеин интеракције, чиме се представљају као ефикасни модулатори имуног одговора, митозе и апоптозе. Они такође имају способност да ометају интермедијарни метаболизам, да индукују коагулацију садржаја цитоплазме и ометају или инхибирају формирање биофилма, који даје заштитну предност патогенима током инфекције [143]. Присуство антивирусних компоненти у екстрактима лековитих биљака повезује се са њиховом интеракцијом са различитим вирусним протеинима у различитим фазама вирусне репликације [146].

На основу њихове хемијске структуре, пута биосинтезе или њихове растворљивости, сва антимикробна једињења пореклом из биљака се могу класификовати у неколико главних група које укључују алкалоиде, фенолна једињења, једињења која садрже сумпор, кумарине, терпене, танине, лектине и полипептиде [140]. С обзиром да су фенолна једињења једна од најприсутнијих група секундарних метаболита у биљкама, њихова антимикробна активност се интензивно испитује. Иако

је њихова активност генерално слаба и неспецифична, ова једињења поседују различите механизме деловања према различитим микробним сојевима. Ови механизми укључују инхибиторну активност ефлуксне пумпе, способност модификације пермеабилности ћелијских мембрана, померање неколико интрацелуларних функција узроковано везивањем фенолних једињења за ензиме или губитком интегритета ћелијског зида услед различитих интеракција са ћелијском мембраном [143,147,148]. Механизми за које се сматра да су одговорни за антимикуробну активност фенолних једињења укључују инхибицију ензима од стране оксидованих једињења, вероватно кроз реакцију са сулфхидрил групама или кроз више неспецифичних интеракција са протеинима [140,143]. Антимикуробна својства флавоноида потичу од могућности да формирају комплексе, како са екстрацелуларним протеинима, тако и са бактеријском мембраном. Стога се њихова антимикуробна активност испољава преко инхибиције фактора бактеријске вируленције, као што су сигнални рецептори за комуникацију између бактерија и ензима, дестабилизацију и пермеабилizацију цитоплазматске мембране, инхибицију екстрацелуларних микробних ензима и хелатизацијом супстрата потребних за раст микроба као што су гвожђе и цинк [143,149]. Такође је познато је да хинони стварају комплексе са нуклеофилним аминокиселинама у микробним протеинима, што често доводи до губитка њихове активности [143]. Антибактеријска активност танина потврђена је према Грам-негативним и Грам-позитивним бактеријама. Доказано је да танини утичу на функционисање ћелијске мембране, инхибирају оксидативну фосфорилацију која је од круцијалне важности за метаболизам микроба. Поред тога танини могу да интерагују са паровима ДНК база и инхибирају микробне ензиме који генерално утичу на транскрипцију, потискују експресију и изазивају смрт ћелије [143,150]. Доказано је да се дигална киселина, која је дериват танинске киселине, и други галати понашају као потенцијални инхибитори бактеријске ДНК гиразе [151]. На **Слици 30** приказана су потенцијална места деловања полифенолних једињења на бактеријску ћелију. Иако је антибактеријска активност терпена и даље изазовна због њихове слабе растворљивости, терпени показују снажну активност посебно према Грам-позитивним бактеријама. Антимикуробни механизми терпена су уско повезани са њиховим липофилним особинама које олакшавају њихов продор кроз ћелијски зид микроба. Монотерпени првенствено утичу на структуру мембране повећавајући њену флуидност и пермеабилност, мењајући топологију њених протеина и доводећи до поремећаја у респираторном низу. Механизам деловања терпеноида није у потпуности јасан, али се спекулише да утиче на ћелијску мембрану која је претежно изграђена од липофилних једињења, као и поремећајем покретачке силе протеина доводећи до коагулације ћелијског садржаја [143,152].



Слика 30. Потенцијалне мете полифенолних једињења у бактеријској ћелији. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

2.4.3. Биљке као извор антиканцерогених једињења

Канцер је велики јавно здравствени проблем и очекује се да ће бити највећа препрека за повећање очекиваног животног века широм света у овом веку. У 2018. години било је процењених 18,1 милиона нових случајева рака и 9,6 милиона смртних случајева широм света, а процењује се да ће се ова инциденција удвостручити до 2035. Брз развој медицинских техника снимања омогућио је и ранију дијагнозу тумора који се раније нису могли детектовати. Штавише, неколико нових третмана је већ доступно, али већина њих је прилично скупа и на крају пацијенти развијају отпорност на њих [45].

Стога, на том пољу у које су укључене многе научне области присутна је стална битка на глобалном нивоу са многим развојним техникама у лечењу, фармаколошким и превентивним терапијама. Хируршке методе, хемиотерапија, радиотерапија и хемијски генерисани лекови су тренутно међу најактуелнијим третманима. Третмани као што је хемиотерапија и радиотерапија могу довести до великог оптерећења пацијената и додатно оштетити њихово здравље. Стога је све већи фокус усмерен на коришћењу алтернативних третмана и терапија против рака. Више истраживачких група је идентификовало различите врсте биљака које су показале антиканцерогена својства са посебном пажњом усмереном на оне које се користе у биљној медицини у земљама у развоју [153,154].

Један од корака који воде ка развоју канцера подразумева измене епигенетских процеса и њихову дерегулацију. Лекови који могу инхибирати или поништити епигенетске промене су у развоју последњих година. Код развоја нових хемиотерапеутика највећи изазов је синтетисати хемијско једињење тако да није токсично за нормалне ћелије, односно да поседује специфичну цитотоксичну активност према канцерогеним ћелијама. Стога, развој и истраживање једињења пореклом из природе која се користе у лечењу и превенцију канцера постају све актуелнији у научној заједници, а нарочито једињења која потичу из биљака [153]. Постоје разноврсни облици канцера међу људском популацијом, али они деле сличне карактеристике или генотипове, као што је неосетљивост на сигнале који инхибирају раст ћелија чинећи њихову репликацију неограниченом. Код ћелија канцера не долази до процеса апоптозе,

а ангиогенеза (раст нових крвних судова) се одржава унутар туморског ткива омогућавајући његово преживљавање. Једињења биљног порекла су показала својства да инхибирају активност ћелија рака, као што је инхибирање пролиферације ћелија рака, изазивање апоптотске ћелијске смрти, регулације ангиогенезе, заустављања ћелијског циклуса и епигенетску контролу експресије гена [154]. Једињења која су идентификована и екстрахована из биљака због својих антиканцерогених својстава укључују полифеноле, брасиностероиде и таксоле. Сматра се да полифеноли имају својства која индукују апоптозу механизмима који се могу применити у антиканцерогеној терапији. Механизам иницијације ћелијске апоптозе од стране полифенола је највероватније кроз регулисање мобилизације јона бакра који су везани за хроматин изазивајући фрагментацију ДНК. У присуству Cu^{2+} , показало се да је ресвератрол способан за деградацију ДНК. Друга особина коју показују биљни полифеноли је њихова способност да ометају функцију протеина који су присутни у ћелијама канцера и подстичу њихов раст. Такође, узрочници рака могу бити измењени помоћу полифенола који регулише ацетилацију, метилацију или фосфорилацију директним везивањем. На пример, третирањем ћелијских линија канцера куркумином у примећено је спречавање експресије фактора туморске некрозе (TNF, *Tumour Necrosis Factor*, енг.). TNF је мултифункционални цитокин који има важну улогу у различитим ћелијским догађајима као што су преживљавање ћелија, пролиферација, диференцијација и ћелијска смрт) [153].

Данас се интензивно трага за лековима биљног порекла који би се могли увести у терапију различитих типова канцера. Лекови биљног порекла су пожељни за лечење канцера јер су природни и лако доступни. Могу се лако примењивати орално као део редовне исхране код пацијента. Такође, пошто су једињења биљака већ део нашег природног окружења и веома често део наше исхране, сматрају се генерално више компатибилним и нетоксичним за здраве људске ћелије. Међутим, постоје изузеци, као што су цијаногени гликозиди, лектини, сапонини, лигнани, и неки таксани. Ако лекови биљног порекла могу да покажу селективност у истраживању, нису токсични за нормалне ћелијске линије и покажу цитотоксичност према ћелијским линијама канцера, ови лекови се могу довести у клиничка испитивања ради даљег терапијског развоја. Лекови биљног порекла могу да се сврстају у четири класе лекова са следећим активностима, инхибитори метилтрансферазе, лекови за превенцију оштећења ДНК или антиоксиданси, инхибитори хистон деацетилазе и митотички дисруптори [153]. Нека од једињења биљног порекла која су већ ушла у клиничка испитивања налазе се у **Табели 2** где је описан њихов начин деловања и биљна врста из које су изолована.

Табела 2. Лекови биљног порекла у истраживању и клиничким испитивањима.

Антиканцерогени агенти	Порекло	Активност једињења	Клинички развој
Сулфорафан	Изотиоцијанат из поврћа рода <i>Brassica</i>	Индукује ензиме детоксикације фазе 2; инхибира раст тумора код карцинома дојке; антипролиферативни ефекти.	Клиничка испитивања са оралном применом препарата од поврћа са сулфорафаном.
Паклитаксел (Таксол)	Пацифичка тиса; <i>Taxus brevifolia</i> L.	Дисруптор микротубула; блок митоза; индукују апоптозу; микротубуле су полимеризоване и стабилизоване; поремећај формирања вретена; инхибиција транслационих машина.	У клиничкој употреби; Клиничка испитивања фазе I-III; поставке раног лечења; не-мали рак плућа, рак дојке, рак јајника, Капоси сарком. Истраживање и развој у алтернативној примени лекова коришћењем наночестица, наокохеалта и нанолипосома.
Епиподофилотоксин	<i>Podophyllum peltatum</i> L.; Подофилотоксин изомер	Про-апоптотички ефекти; интерференција ћелијског циклуса	Испитивања лимфома и рака тестиса.
Винкрестин	<i>Catharanthus roseus</i> G. Don; Алкалоиди изоловани из винке	Анти-митотик; инхибитор микротубула; везује се за β -тубулин; стабилизатори или дестабилизатори микротубула; про-апоптотичка својства и индукују заустављање ћелијског циклуса; антитуморска активност.	Лимфоми, саркоми и леукемије; у клиничкој употреби; комбинована испитивања.
Винбластин			Рак тестиса, Ходжкинска болест и лимфом; у клиничкој употреби; комбинована испитивања.
Винорелбин			Рак великих ћелија плућа; појединачна и комбинована испитивања; Фаза I-III
Виндесин			Клиничка испитивања за акутну лимфоцитну леукемију.
Винфлунин			Клиничка (Фаза III) испитивања за активност против леукемија.

Табела 2. Наставак

Епигалакотехин-3-галат	Катехин; Зелени чај	Антиоксидант; смањити оштећење ДНК од оксидативног стреса; анти-пролиферативни ефекти; инхибиција специфичних киназа; инхибира канцерогенезу изазвану хемијским путем или УВ зрачењем.	Клиничка испитивања у лечењу рака простате; Клиничка студија фазе I за оралну примену.
Росковитине	Изведен из оломуцина који се налази у ротквици; <i>Raphanus sativus</i> L.	Инхибиција циклин зависних киназа; смањење прогресије ћелијског циклуса	Фаза II клиничких испитивања у Европи.

Екстракти неких врста жалфија, као и њихова једињења (рузмаринска киселина, манол, хризин и таншинони) су показала потенцијал да инхибирају канцерогенезу, пролиферацију и метастазе ћелија рака, док узрокују минимална оштећења нормалних ћелија. Истраживање које су спровели *Furtado* и сар. показало је да је код пацова третираних рузмарином киселином пре третмана канцерогеном (1,2-диметилхидразин) дошло до смањеног степена оштећења ДНК и смањења формирања акомулација абнормалних жлезда налик цевима у слузници дебелог црева и ректума. Смањење овог индикатора раног стадијума канцера дебелог црева, указује на то да рузмаринову киселину треба даље истраживати као једног од кандидата за превенцију и лечење канцера дебелог црева [155]. У другој студији која је укључивала мужјаке албино пацова којима је убризган 1,2-диметилхидразин са 250 mg/mL хризина током 8 недеља значајно је смањио експресију CYP2E1 (гена за синтезу ензима из цитохром P450 фамилије) и спречио развој хистопатолошких поремећаја који указују на туморогенезу [156]. Поред тога, употребом сирове питоме жалфије је такође показан њен ДНК-заштитни потенцијал. У *in vivo* студији, профилактичка примена воденог екстракта (биљног чаја) *S. officinalis* (13,3 g/L, током 2 недеље) спречила је оштећење ДНК изазвано азоксиметаном на колоноцитима и лимфоцитима за 20 и 65%, редом; смањила оштећења ДНК изазвана помоћу H₂O₂ на епителним ћелијама дебелог црева за 28%, и инхибирала за 30,5% пролиферацију ћелија слузокоже изазвану азоксиметаном [157].

Потенцијал биљака у лечењу канцера је предмет интензивних истраживања, али важно је разумети да ово поље још увек захтева многа истраживања и клиничка испитивања како би се потврдила ефикасност и сигурност биљних терапија за различите типове канцера. Као најзначајнији аспекти потенцијала биљака у лечењу канцера сматрају се:

- Антиоксидативна својства: Готово све биљне врсте садрже антиоксиданте који могу помоћи у неутрализацији слободних радикала, што за последицу може утицати на смањење ризика од оштећења ћелија и потенцијално смањити ризик од настанка канцера.
- Антиинфламаторна својства: Многа једињења присутна у биљкама показују противупална својства која могу помоћи у смањењу упале, која је један од најзначајнијих фактора ризика развоја канцера.
- Антипролиферативна својства: Биљке садрже различита једињења као што су флавоноиди, алкалоиди и терпеноиди, који су показали потенцијал у сузбијању раста ћелија канцера или индуковању апоптозе у лабораторијским условима.

- Имуномодулација: Неке биљке могу подржати имунолошки систем организма, што је важно за борбу против канцера.

Међутим, важно је нагласити да се ове биолошке активности још увек проучавају и да се неке биљне супстанце могу користити само као додатак конвенционалној терапији рака, а не као замена за њих. С обзиром да биљке представљају неограничен извор структурно различитих једињења и да се константно откривају нова једињења које су биљке способне да синтетишу, постоји велика могућност да се у једном тренутку пронађе једињење које би ушло у конвенционалну употребу, самостално или у синергизму са другим једињењима.

2.5. Наночестице

Нанотехнологија представља област истраживања која је у константном развоју од 1959. године. Због нанометарских величина, различите геометрије и веће површине, наночестице имају другачија својства од честица микрометарских величина које, генерално, не поседују неку специфичну биолошку активност. Ова својства су довела наночестице у центар интересовања за потенцијану примену у многим областима, посебно у биомедицини, биотехнологији и електроници. Последњих година привреда бележи напредак у погледу потребе за мањим и бољим материјалима у свим доменима. Наночестице се могу користити као носачи многих лекова, хемијски и биолошки сензори, гасни сензори, апсорбери угљен-диоксида и у друге сврхе [158]. То су широка класа материјала која укључује честице које имају величину до 100 nm. Оне могу бити подељене у различите категорије у зависности од њихове морфологије, величине и хемијских својстава. На основу материјала од којег су изграђене, основна подела наночестица је на металне и метало-оксидне наночестице, затим наночестице на бази угљеника, у које се убрајају фулерени, угљеничне наноцеви и графен и органске, у које се сврставају разне мицеларне и полимерне наночестице (**Слика 31**).

Металне наночестице су искључиво направљене од металних прекурсора. Наночестице племенитих метала показују нова физичко-хемијска својства која се не примећују ни у појединачним молекулима ни у металној форми. Због добро познатих карактеристика локализоване површинске плазмонске резонанце, овај тип наночестица поседује јединствена оптичка и електрична својства. Све наночестице алкалних и племенитих метала имају апсорпциону траку у видљивом делу спектра елекромагнетног зрачења. Због својих напредних оптичких својстава, металне наночестице налазе примену у многим истраживачким областима. На пример, премаз наночестицама злата се широко користи код SEM (*scanning electron microscopes*, енг.) испитивања, како би се побољшао електронски ток, који помаже у добијању високо квалитетних SEM слика. Поред малих димензија, металне наночестице су привукле пажњу због својих физичко-хемијских својстава, као што је проводљивост, али и биолошка, каталитичка и оптичка активност [47,159,160]. Наночестице злата имају винско црвену, платине жуто-сиву, сребра браон-црну, док наночестице паладијума имају тамно црну боју. Штавише, боја наночестица једног метала може такође да зависи од њихове величине и облика. Наночестице саме по себи нису једноставни молекули и најчешће се састоје од површинског слоја, који може бити функционализован низом малих молекула, металних јона, сурфактаната или полимера, затим слоја љуске, који је хемијски различит од језгра у свим аспектима, и језгра, које је централни део наночестица [158].

Наночестице на бази угљеника, због својих физичко хемијских карактеристика, данас привлаче све већу пажњу. Фулерени су заправо наноматеријали који су направљени од глобуларног шупљег кавеза, као што су алотропни облици угљеника. Овакав тип наночестица има велику комерцијалну вредност због своје електропроводљивости, високе чврстоће, афинитета према електрону и разноврсности. Угљеничне наноцеви су издужене, цевасте структуре, пречника 1-2 nm. Структурно подсећају на роловане графитне плоче, које могу бити двоструко па чак и троструко роловане [161]. Органске наноформулације обично садрже липидне делове и ефикасно се користе у многим биомедицинским применама. Генерално, за њих је карактеристичан сферичан облик са пречником у распону од 10 до 1000 nm. Као и полимерне наночестице, липидне имају чврсто језгро направљено од липида и матрикс садржи растворљиве липофилне молекуле. Липидна нанотехнологија је посебна област која се фокусира на дизајнирање и синтезу липидних наночестица за различите примене, као што су испорука лекова и њихово ослобађање у терапији рака [158].



Слика 31. Шематски приказ главних типова наночестица класификованих у органске, неорганске и наночестице на бази угљеника. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Данас се највећи проценат синтетисаних металних наночестица добија физичким и хемијским методама које захтевају употребу високих притисака, температура и хемикалија које имају девастирајући утицај на животну средину. Поред тога, употреба хемикалија ограничава примену таквих наночестица у биомедицинске сврхе [162].

2.5.1. Синтеза наночестица

Два основна приступа која се користе у синтези наночестица метала су такозвани одоздо према горе или „*Bottom up*” приступ и одозго надоле или „*Top-down*” приступ као што је приказано на Слици 32. Ови приступи се даље деле на различите поткласе на основу операције, стања реакције и усвојених протокола.



Слика 32. Типични примери различитих приступа добијања наночестица метала.

„Bottom up” приступ се заснива на формирању наночестица од релативно једноставније супстанце као што су атоми, молекули и јони, па је овај приступ назван и приступом изградње. Примери овог начина синтезе су технике редукције и седиментације, које укључују биолошку синтезу, предење и хемијску синтезу [163]. За покретање хемијске реакције међу укљученим атомима, јонима или молекулама, одређене соли се узимају као полазне супстанце. Ове соли се мешају једна са другом да би се формирао хомогени раствор заједно са одговарајућим хелатним агенсом. Контрола природе раствора такође игра важну улогу у процесу синтезе. Стога, данас се развијају различите методе променом природе хелатног агенса и рН раствора како би се минимизирао третман прекаљивања који је често неопходан у зависности од типа наночестица [164]. Синтеза сагоревањем је добро позната метода за синтезу наноматеријала различитих врста у различитим варијансама. Већина поступка заснива се на процесу сагоревања раствора. Најчешће, ова метода укључује оксидант и супстрат за покретање реакције. Најчешћи оксиданти су метални нитрати, амонијум нитрат и азотна киселина док се као гориво често користе уреа, глицин, сахароза, глукоза, лимунска киселина, органски материјали на бази хидразина и ацетилацетона. Вода, угљоводоници и алкохоли делују као растварачи за реакције укључене у овај начин синтезе. Дакле, синтеза сагоревањем може да произведе наночестице различитих материјала како у истраживачке сврхе, тако и у индустријском обиму [165]. Различите врсте наночестица попут титаната, ферита, карбоната, хидроксида и оксида синтетишу се овим приступом. Такође синтеза сагоревањем се користи за формирање различитих врста наноструктура MgO и његових деривата [164].

У „Top-down” приступу користе се деструктивне методе. Почевши од већег молекула, који се разлаже на мање јединице и затим се те јединице претварају у одговарајуће наночестице. Пример ове методе су механичко млевење, таложeње

хемијских испарења (CVD, *chemical vapor deposition*, енг.), хемијска кондензација пара (CVC, *chemical vapor condensation*, енг.) и друге технике разлагања [163]. Пример једног од „*Top-down*” начина синтезе који се данас користи јесте производња наночестица кокосове љуске. У ту сврху је примењена метода млевења, код које се сирови прах љуске фино меље у различитим временским интервалима, уз помоћ керамичких куглица и планетарног млина. Овај тип наночестица има велику примену као природна нанопунила за ојачање полимера и метала за зелену производњу нанокомпозита ојачаних природним честицама и повећању отпорности материјала на хабање [166]. Такође, наночестице сферног магнетита из руде природног оксида гвожђа (Fe_2O_3) могу се синтетисати деструктивним приступом одозго надоле са величином честица која варира од 20 до 50 nm у присуству олеинске киселине [167]. У последње време, високо фотоактивне Co_3O_4 наночестице синтетишу се ласерском фрагментацијом одозго надоле. Снажно ласерско зрачење генерише добро униформне наночестице просечне величине око 5,8 nm са добрим слободним местима за кисеоник [168]. Највећи проблем са приступом одозго према доле је несавршеност површинске структуре. На пример, наночестице направљене литографијом нису глатке и могу садржати много нечистоћа и структурних дефеката на својој површини.

Физичке, хемијске, биолошке, а у неким случајевима и хибридне технике су главни начини производње наночестица у оквиру „*bottom up*” и „*top down*” приступа. Физичке методе производње наночестица укључују методе као што су ласерска аблација, високоенергетско зрачење, пиролиза спрејом и јонска имплантација, а хемијске укључују технике хемијске редукције, сонохемијску методу, солгел процес, микроемулзиону и електрохемијску методу. Биолошка метода која се назива и зелена биосинтеза наночестица укључује примену биљних екстраката, микроорганизама, ензима, па чак и неких пољопривредних отпада за производњу наночестица. Иако су физичко-хемијским методама добијају велике количине наночестица, примена хемијских агенаса током производње наночестица је у посредној вези са производњом еколошки опасних једињења која ограничавају овај начин синтезе [30]. На пример, термолиза која је хемијска метода за дисоцијацију органометалних прекурсора се изводи на високим температурама коришћењем органских растварања. Такође, у неким случајевима, додаје се сурфактант у реакциони медијум за смањење коалесценције честица. Техника хемијске редукције је усвојена хемијска метода која користи широк спектар редукционих агенаса као што су натријум борохидрид, хидроксиламин и N,N-диметилформамид за производњу зервалентних јона. Хемијска метода уз помоћ таласа користи ултразвучне таласе у координацији са сурфактантом или редукционим агенсом за производњу наночестица. Формирање микрошупљина са високим температурама ултразвучном индукцијом може започети хемијску редукцију супстрата [30].

Методе физичке производње наночестица су углавном енергетски интензивне и захтевају посебне уређаје. На пример, процес млевења је начин на који се металне микрочестице дробе коришћењем високоенергетских лоптастих млинова. Процес у гасној фази или аеросолни процес је подељен у четири главна типа (укључујући пламени реактор, плазма реактор, ласерски реактор и реактор са врућим зидом који се користи код хемијског таложења у гасној фази) која се користе за производњу наночестица као што су фулерени и угљеничне нанопеве. Све врсте ових метода захтевају посебне уређаје и углавном троше велику количину енергије. Производња наночестица влажном хемијском синтезом одвија се на ниским температурама и једна је од најчешће коришћених метода за производњу наночестица. Међутим, као главни недостатак методе влажне хемијске синтезе помињу се ограничења у повећању шаржног реактора због ограниченог мешања и ниског преноса топлоте [30].

Неки од главних предности и недостатака производње наночестица физичко-хемијским методама сумирани су у **Табели 3**.

Табела 3. Главне физичко-хемијске методе производње наночестица и њихове одговарајуће предности и мане [30].

Метода	Предности	Недостаци
Хемијско таложење пара (CVD, <i>chemical vapor deposition</i>) и хемијска кондензација пара (CVC, <i>chemical vapor condensation</i>)	Висока производња наночестица	Висока температура поступка (изнад 300°C) Употреба хемијских средстава
Кондензација гаса	Производња ултрафиних нанокристаличних метала и легура	Потреба за посебним уређајима Изузетно спор процес
Ласерска аблација	Производња наночестица високе чистоће	Потребни су посебни уређаји Тешко је контролисати величину, агрегацију и кристалне структуре
Сол-гел поступак	Једноставна метода Производња великог асортимана материјала Ниска температура	Коришћење хемијских средстава Производња непожељних агенаса Цена материјала може бити висока
Хемијска редукција	Исплативо Добра стопа производње	Примена токсичних средстава

2.5.2. Зелени приступ синтезе наночестица

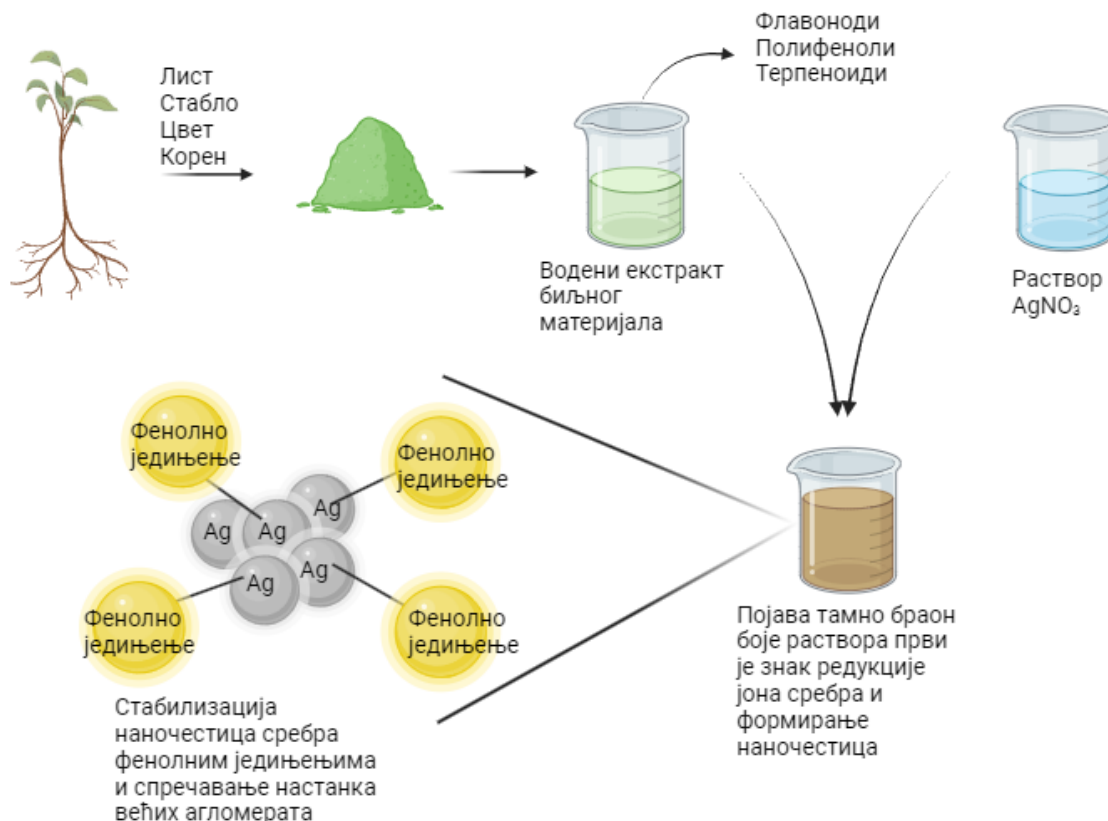
Узимајући у обзир огромно постојање разноврсних природних производа, као одрживих и еколошки прихватљивих материјала који се могу користити за синтезу наночестица, научна литература обухвата бројне радове који укључују зелену синтезу наночестица. Зелена технологија која користи биолошке системе попут биљака, микроорганизама и ензима за производњу наночестица брзо расте као алтернативна конвенционалним физичко-хемијским методама [169]. За разлику од физичко-хемијских метода, које углавном имају негативан утицај на животну средину, биолошке методе производње наночестица су познате као еколошки прихватљивије и нетоксичне. Посебне карактеристике овако произведених наночестица које их чине различитим од наночестица произведених другим методама укључују високу каталитичку активност, нечистоће ниске токсичности, високу стабилност, биокompatibilност и биоразградивост [30]. Производња наночестица микроорганизмима може се класификовати у методе интрацелуларне и екстрацелуларне синтезе. На интрацелуларни начин, јони од интереса се транспортују у микробну ћелију и затим редукују у присуству ензимских процеса, док се екстрацелуларни начин синтезе заснива на везивању металних јона и њиховој редукцији на површини микроорганизма. Производња наночестица помоћу микроорганизама у погледу способности већине бактерија и гљивица да толеришу амбијенталне услове различитих температура, рН вредности, концентрација соли и притисака чини овај приступ безбедним, исплативим и еколошки прихватљивим. Неколико микробних врста које су изоловане из различитих средина

коришћене су за производњу различитих типова металних наночестица [30,170]. Ипак, методе синтезе засноване на употреби микроорганизама карактеришу ниски приноси у зависности од типа организма, раста ћелије, активности ензима и различитих биокатализатора. Поред тога, комплетан механизам микробне синтезе још увек није у потпуности разјашњен, иако је направљен одређени напредак коришћењем специфичних микробних протеина или пептида у синтези [45]. Штавише, коришћење микроорганизама захтева опрез у раду, могућност контаминације околине и нешто сложенију опрему за рад. Из тог разлога, тренутно најпопуларнија од свих зелених синтеза је синтеза металних наночестица која користи биљак са познатом традиционалном употребом.

2.5.3. Употреба биљака у зеленој синтези наночестица сребра

У поређењу са методама производње помоћу микроорганизама, производња наночестица у биљци је пожељнија јер не захтева никакве посебне и вишестепене процесе, знатно је бржа, али и исплативија [163]. Истраживања су показала да се метали биоакумулирани у биљкама углавном налазе у облику наночестица. На пример, детектован је висок ниво акумулације наночестица сребра у *Brassica juncea* и *Medicago sativa*, али и акумулација наночестица бакра у *Iris pseudacorus* [30]. Овај тип производње наночестица међутим има неколико недостатака, укључујући хетерогену величину и морфологију наночестица, тешку процедуру екстракције и изолације и низак принос [171].

Алтернативнији приступ је *in vitro* метода производње која се заснива на редукцији јона коришћењем биљних екстракта (Слика 33). Ова метода се више може контролисати кроз промену биљног екстракта и концентрације јона, времена реакције, температуре и рН реакционог медијума. Производње применом ове методе је много бржа и лакша од *in vivo* методе [30]. До данас синтетисан је огроман број различитих типова наночестица од различитих јона метала користећи екстракте многих биљних врста, као што су надземни делови различитих биљака *Moringa oleifera* [172], *Eucalyptus camaldulensis*, *Terminalia arjuna* [173], *Aloe vera*, *Artemisia vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha aquatica* [174]. Окарактерисано је и неколико типова наночестица сребра синтетисаних помоћу различитих врста биљака из рода *Salvia* и то *S. officinalis* [175], *S. spinosa* [176], *S. nubicola* [177] и *S. leriifolia* [178]. Водени екстракти листова *Filipendula ulmaria* и *Salvia verticillata* коришћени су за редукцију AgNO_3 до наночестица чија се величина у највећем проценту кретала између 40 и 70 nm. Овако добијене наночестице показале су високу антимикуробну и цитотоксичну активност према ћелијама канцера дебелог црева (HCT-116) [179].



Слика 33. Илустративни приказ синтезе наночестице сребра помоћу екстракта биљака. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Употреба биљака у производњи наночестица сребра привукла је пажњу због свог брзог, еколошки прихватљивог, непатогеног, економичног и једноставног поступка синтезе али и стабилизације формираних наночестица. Редукција и стабилизација јона сребра врши се комбинацијом биомолекула, као што су протеини, аминокиселине, ензими, полисахариди, алкалоиди, танини, феноли, сапонини, терпеноиди и витамини, који су већ идентификовани у екстрактима биљака које се користе у лековите сврхе. Такође, ови биомолекули су бенигни по животну средину, а ипак хемијски сложене структуре. Још једна предност овог начина синтезе је обновљив и неограничен извор фитохемикалија за њихову синтезу. До данас је потврђена потенцијална употреба различитих биљних врста, њихових надземних делова и корена, коре дрвећа, лишћа, и другог биолошког отпада у производњи различитих типова наночестица сребра [27,29,169]. Штавише, због двоструког ефекта фитомолекула, овај начин зелене синтезе испуњава критеријуме најбољег приступа синтезе наночестица намењених за биолошку примену јер се добијене наночестице могу одмах применити без икаквих модификација након синтезе [180]. Поступак синтезе наночестица најчешће подразумева сакупљање дела биљке од интереса, затим темељно испирање водом да би се уклониле нечистоће. Чисти и свежи делови биљке се суше у хладу 10-15 дана, а затим самелу у прах. Екстракт се добија преливањем биљног материјала дестилованом водом, најчешће у односу 1:10. Добијена инфузија се затим темељно филтрира како би се уклонио биљни материјал. На крају, раствору AgNO_3 одређене концентрације додаје се неколико милилитра биљног екстракта након чега следи редукција Ag (I) јона у Ag (0) што се може пратити мерењем UV-Vis спектра раствора у правилним интервалима. Као индикатор настанка наночестица сребра, поред апсорпционог пика који се појављује као последица феномена резонанције површинских плазмона на око 380 – 450 nm, примећује се и

визуелна промена боје од безбојне ка тамно браон боји. Утицај рН вредности, концентрације екстракта и металних јона, као и промена температуре такође се могу пратити спектрофотометријски на основу интензитета и ширине површинског плазмонског резонанционог појаса који највише зависи од величине и облика формираних наночестица [29].

Са механизичке тачке гледишта, електрони који су неопходни за редукцију јона сребра настају дехидратацијом фенолних киселина, односно фенолних једињења, или кетоенолном таутомеријом. Након редукције до атома сребра следи њихова агрегација и коначно формирање и стабилизација наночестица [27,29,31]. Потенцијални позитивни ефекат базне средине на синтезу и у стабилизацију насталих наночестица на примеру рузмаринске киселине приказан је на **Схеми 3**. У првом кораку хидроксилне групе активирају реактивне центре фенолних једињења, као што су фенолне (-OH) и карбоксилне групе (-COOH), што омогућава лакшу интеракцију са јонима сребра и предају електрона [181]. Након редукције, атоми сребра се међусобно слепљују при чему у самој структури и на површини наночестица остају заробљена и нека фенолна једињења што се може потврдити FT-IR техником. Ова једињења утичу на стабилизацију наночестица сребра односно спречавају формирање већих агрегата. Ово је само један од многих аспеката зелене хемије која има за циљ смањење еколошког и токсичног утицаја хемијских процеса на околину, пружајући истовремено ефикасне и одрживе алтернативе.

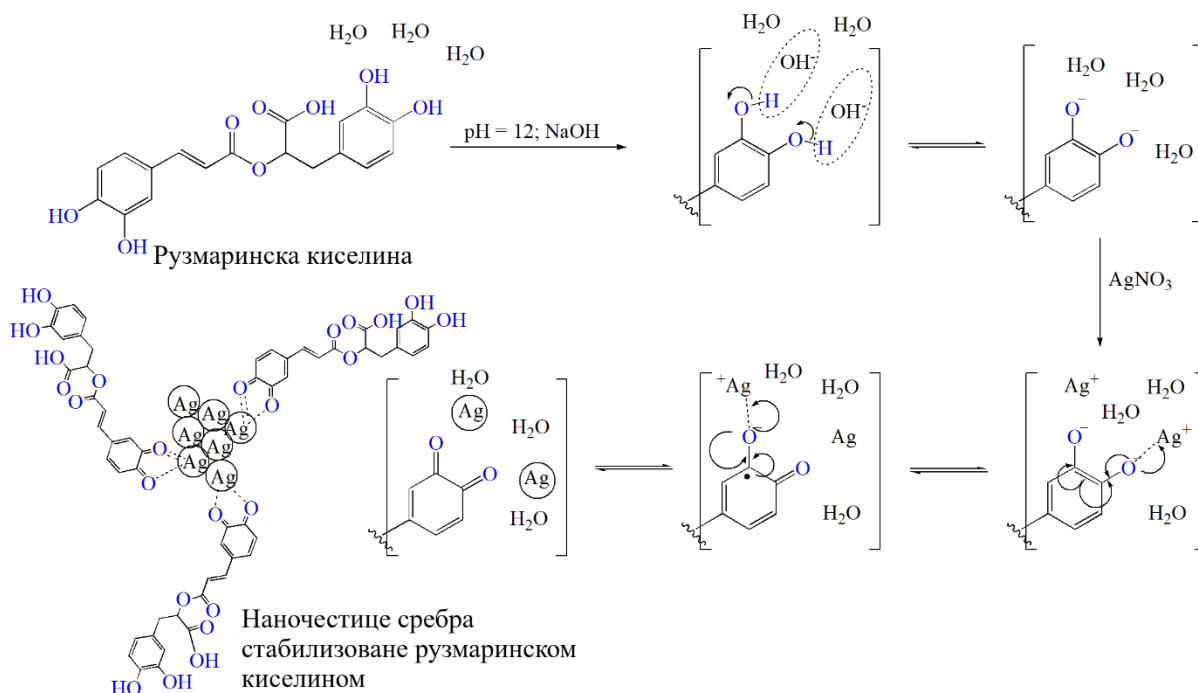


Схема 3. Потенцијални механизам редукције јона сребра и стабилизације формираних наночестица на примеру рузмаринске киселине.

Приказани поступак синтезе наночестица је у складу са принципима зелене хемије и придржава се следећим корацима који су основа зелене хемије:

- Коришћење сировина које су еколошки прихватљиве (биоразградиве, обновљиве, нискотоксичне);
- Процеси морају бити енергетски ефикасни (мали утрошак енергије уз што мању продукцију отпада);
- Коришћење зелених растварача (вода као најбезбеднији растварач);
- Смањење отпада (једини отпад након завршене синтезе јесте биљна биомаса која се може користити у продукцији компоста);
- Потенцијални ризици по здравље људи и животну средину су смањени на минимум.

Синтеза наночестица у складу са зеленом хемијом може бити изазовна, али доприноси смањењу негативног утицаја хемијских процеса на околину и промовише одрживе алтернативе у развоју материјала [182].

2.5.4. Основне карактеристике и потенцијална примена наночестица сребра

Карактеристике наночестица сребра највише зависе од 3 кључна фактора, а то су њихова величина, површина и облик. Величина наночестица сребра посредује у ћелијским одговорима, укључујући унос, цитотоксичност, способност продирања кроз биолошке баријере и имунолошке одговоре [159]. Познато је да и стварање реактивних кисеоничних врста и деградација наночестица у јоне зависе од величине. Мање наночестице имају јачу активност због велике специфичне површине која регулише оксидативни стрес и брзину растварања наночестица у јоне у зависности од међуфазне интеракције. Површина наночестица може бити конјугована одређеним молекулима да би се оствариле нове функције и побољшала колоидна стабилност. Поред тога, површински премаз наночестица може утицати на облик, агрегацију и растварање. Примећено је да се уградњом појединих молекула, као што су колаген, глутатион, полиетилен гликол и липоинска киселина, на површину наночестица може повећати њихова биолошка активност и биокомпатибилност [159]. Облик наночестица сребра такође игра важну улогу у токсичним и имунолошким ефектима. У неким претходним истраживањима примећено је да наночестице сребра у облику наножица имају јачу цитотоксичну активност према ћелијама A549 у поређењу са сферичним нано и микрочестицама [183]. Због својих антибактеријских својстава, наночестице сребра су најшире коришћене у здравственој и козметичкој индустрији, за паковање хране, у текстилним премазима и бројним применама у области заштите животне средине [184] (**Слика 34**). Иако није потпуно разјашњена токсичност сребра, производи са наночестицама сребра одобрени су од стране низа акредитованих тела укључујући Управу за храну и лекове САД (FDA), Агенцију за заштиту животне средине САД (EPA), Јапанско друштво индустријске технологије антимикуробних агенаса (SIAA of Japan) и Корејски институт за тестирање и истраживање (FITI Testing and Research Institute). Наночестице сребра и производи који садрже сребро се данас користе у растућој области нанотехнологије и појављују се у различитим индустријским гранама. Добро је позната чињеница да наночестице сребра и њихови композити показују каталитичке активности у области редукције синтетичких боја и њиховог уклањања. Оне показују неколико атрактивних својстава, укључујући одличну електричну проводљивост, хемијску стабилност, антифунгална и бактерицидна својства. На пример, одећа која је у блиском контакту са људском кожом ствара топло и влажно окружење погодно за развој

микроорганизама. Према томе, због изузетно добрих антимикуробних особина наночестице сребра се често могу наћи у професионалној одећи намењеној спортистима. Биомедицински производи са наночестицама сребра се обично користе за спречавање бактеријских инфекција убрзавањем зарастања рана, али и лечење тумора брзим разбијањем канцерогених ћелија [24,25]. Наночестице сребра са доксорубицином и алендронатом служе као ефикасни носачи антитуморских лекова за Hela ћелијску линију [46,184].



Слика 34. Примена наночестица сребра у различитим индустријама.

Међутим, наночестице сребра могу деловати као мач са две оштрице са корисним и штетним ефектима, тј. могу да елиминишу бактерије, али и индукују цитотоксичност. Због пораста присутности у многим потрошачким и здравственим производима, постоји све већа забринутост јавности у вези са ризиком употребе производа на бази сребра, јер оно може представљати потенцијалну опасност по здравље. Штавише, обимна примена и производња наночестица сребра би повећала њихово ослобађање у воденој средини, као што су реке и језера. На пример, наночестице сребра се могу ослободити из антимикуробних тканина у воду током прања, загађујући на тај начин животну средину подземних вода [184]. Једном када наночестице уђу у слатководно окружење, обично се оксидују у јоне који су токсични за водене организме. Јонско сребро је имобилизовано у великој мери као слабо растворљива со попут AgCl или Ag_2S [184]. Акумулацијом у воденим организмима, наночестице сребра могу ући у људско тело кроз ланац исхране. Међутим, мало се зна о дугорочној безбедности и токсичним ефектима наночестица сребра у воденој средини. Америчка конференција владиних индустријских хигијеничара утврдила је дозвољене граничне вредности за метално сребро ($0,1 \text{ mg/m}^3$) и растворљива једињења сребра ($0,01 \text{ mg/m}^3$). Као што је познато, продужено излагање организма сребром оралним путем и удисањем може довести до аргирије или аргирозе, односно хроничних поремећаја микросудова коже и очију код људи. Последњих година све је више истраживања које се баве испитивањем токсичности наночестица сребра на здравим људским ћелијама и животињама. Установљена је цитотоксичност, али и акумулација наночестица сребра у јетри, слезини и плућима глодара [184]. Познавањем

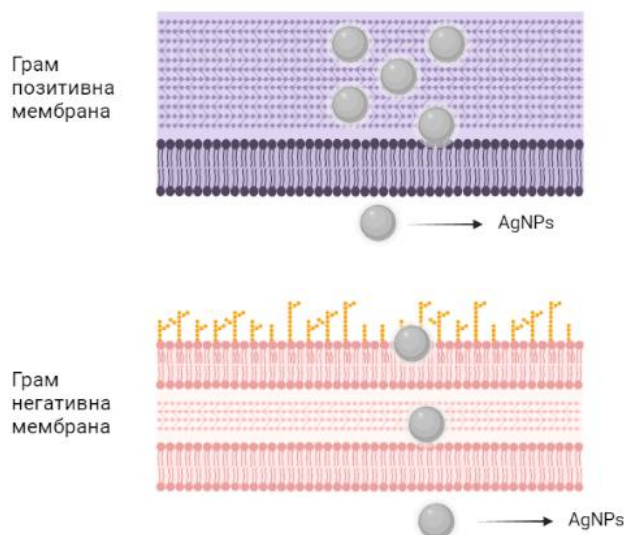
токсичности различитих типова наночестица сребра омогућава научницима да развију функционалнје наночестице са побољшаном биокомпатибилношћу са ћелијама сисара за борбу против резистентних бактерија.

2.5.5. Антимикробна активност наночестица сребра

Сребро се широко користило у многим древним цивилизацијама у различите сврхе. Многа друштва користила су сребро као накит, украсе и прибор за јело. Некада се сматрало да сребрни накит, посуђе и прибор за јело доноси многе здравствене користи. Сребро има дугу историју употребе као антимикробно средство како би се спречила контаминација микробима, још од Феничана који су користили сребро као природни биоцид за облагање боца са млеком [29]. Од друге половине 19. века током порођаја постала је уобичајена пракса да се капи воденог раствора сребро нитрата сипају у очи новорођенчета како би се спречило преношење *Neisseria gonorrhoea* од заражених мајки. Данас се поуздано зна антимикробно дејство сребра против преко 650 микроорганизама из различитих класа као што су Грам-негативне и Грам-позитивне бактерије, гљивице или вируси. У скорије време овај метал проналази примену у облику наночестица сребра. Од свих метала са антимикробним својствима, утврђено је да сребро има најефикасније антибактеријско дејство и да је најмање токсично за животињске ћелије. Сребро је постало уобичајено коришћено у медицинским третманима рањених војника у Првом светском рату како би се спречила инфекција рана [26,29].

Конвенционални антибиотици као што су тетрациклин и стрептомицин се данас широко користе за инхибицију бактеријских инфекција. Међутим, ови антибактеријски агенси постају неефикаснији због стварања све веће резистенције бактеријских сојева на ове молекуле. Стога се сматра неопходним развити биоматеријале који ће остварити интеракцију са бактеријом на различитим начинима и тако инхибирати њен раст. У том погледу, наночестице сребра са великим површинама могу да обезбеде бољи контакт са бактеријама, у поређењу са конвенционалним микрочестицама сребра. Сребро се генерално користи у облику сребро нитрата, али и колоидног сребра као биоцидни агенс у Сједињеним Државама дуже од 100 година [28]. Међутим, у последње време било много покушаја да се произведу нови материјали на бази сребра како би се побољшала његова антимикробна активност и евентуално проширила примена на различите области. Наночестице сребра имају изузетну антибактеријску активност, чак и при ниским концентрацијама, због високог односа површине и запремине [185]. Механизам антимикробног дејства наночестица сребра није у потпуности схваћен. Међутим, потврђена је већа ефикасност наночестица сребра у инхибицији Грам-негативних бактеријских сојева. Грам-позитивне бактерије имају једну цитоплазматску мембрану и релативно дебео ћелијски зид који се састоји од неколико слојева пептидогликана (20-80 nm). За разлику од њих, Грам-негативне бактерије имају спољашњи слој липополисахарида праћен танким слојем пептидогликана и унутрашњом плазма мембраном што омогућава лакши пролазак наночестица (Слика 35)[186]. Најприхваћенија теорија заснива се на постепеном ослобађању јона сребра који се, захваљујући својој електростатичкој привлачности и афинитету за сумпор, везују за протеине који садрже аминокиселине цистеин и метионин. На тај начин се везују и за цитоплазматску мембрану, изазивајући нарушавање пермеабилности мембране и нарушавање бактеријског омотача [187]. Поред тога, ако наночестице прођу ту баријеру и стигну до ћелије, слободни јони сребра могу деактивирати ензиме и модификовати молекулу ДНК, стварајући реактивне врсте кисеоника. Штавише, јони сребра могу да

интерагују са рибозомима у цитоплазми и тако инхибирају синтезу протеина [185]. Наночестице сребра такође могу елиминисати бактерије отпорне на више лекова (MDR, *multi drug resistance*, енг.) ометајући њихове одбрамбене механизме. Могу се користити самостално или у комбинацији са антибиотицима [184]. *Gurunathan* и сар. су показали да су биосинтетисане наночестице сребра веома ефикасне у инхибицији MDR бактерија *Prevotella melaninogenica* и *Arcanobacterium pyogenes* [188]. Док су *Katva* и сар. известили да наночестице сребра у комбинацији са гентамицином и хлорамфениколом показују бољи антибактеријски ефекат код *Enterococcus faecalis* него оба антибиотика самостално [189].



Слика 35. Пропустљивост ћелијске мембране бактерија за наночестице сребра у зависности од њене структуре. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

2.5.6. Цитотоксична активност наночестица сребра

Током протекле две деценије, услед све већих истраживања у области нанотехнологије, расте број научних радова у области нанотерапије, односно о наночестицама. Као што је већ поменуто, наночестице сребра имају специфична хемијска и физичка својства, због своје величине и високог односа површине према запремини, што омогућава њихову примену у неколико биомедицинских поља. [45,184]. Поред антимикуробних активности, наночестице сребра поседују јединствене цитотоксичне карактеристике према ћелијама сисара. Ова особина чини наночестице сребра потенцијално применљивим у терапији тумора. Док убрзано растући број научних података подржава њихову могућу примену као агенса против канцера, за развој терапеутских модалитета заснованих на наночестицама сребра са високом ефикасношћу и поузданом безбедношћу, бројна питања треба унапред разјаснити [190].

Већина наночестица сребра улази у ћелије ендоцитозом, иако неке могу ући путем дифузије. Међутим, тачан механизам уласка у ћелију још није довољно разјашњен. Ендоцитозом, наночестице преузимају ендозоми који потом формирају лизозоме за које се зна да имају нижу рН вредност која фаворизује ослобађање Ag^+ у цитоплазми. Настали јони потом дебалансирају ћелијску хомеостазу и интерагују са другим молекулима цитосола, што доводи до апоптопске смрти ћелије [191]. Упркос свим повољним карактеристикама, чини се да су наночестице сребра донекле токсичне и за здрава ткива, стога је неопходно осигурати да се примењене наночестице

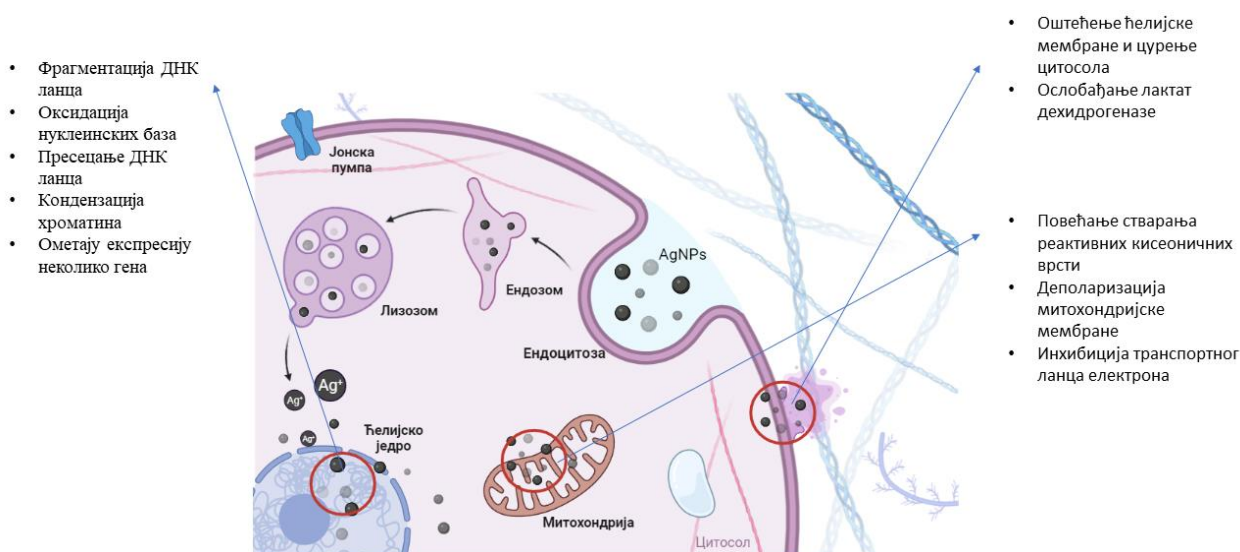
акумулирају првенствено у канцерогеном ткиву, остављајући здрава ткива нетакнутим. Туморска ткива садрже хетерогене популације ћелија и интеракције између неканцерогених и ћелија рака имају пресудан утицај на еволуцију болести као и на исход терапија. Стога, да би се развили нови режими лечења који користе наночестице, неопходно је разумети како наночестице сребра утичу на интеракцију између ћелија рака и ткива тумора када стигну у микроокружење тумора. Такође, биолошка природа туморске ћелије свакако диктира ефикасност наночестица сребра [190]. Неколико истраживачких група показало је изузетан потенцијал наночестица као антиканцерогених агенаса. Међутим, токсично понашање ових наноматеријала чини их донекле сличним конвенционалним лековима за хемиотерапију. Ипак, главна разлика између наночестица сребра и конвенционалних малих молекуларних лекова лежи у њиховој нанометарској природи, што утиче на смањење интензитета нежељених нуспојава. Као резултат ове нано-карактеристике, наночестице сребра могу циљати или пасивно или активно туморска ткива, где се могу акумулирати у високим концентрацијама. Пасивна акумулација је заснована на јединственој структури туморског ткива, код које нео-ангиогенеза доводи до атипичног ендотелног слоја и фенестриране васкулатуре, која заједно са поремећеном лимфном дренажом усмерава продирање и акумулацију материјала нано величине унутар канцерогених ткива. Овај феномен се назива ефекат побољшане пермеабилности и ретенције, који се користи за дизајн лекова у области наномедицине [190].

Као алтернатива пасивном циљању, предложене су активне стратегије циљања као одрживи приступи за повећање специфичности деловања наночестица сребра према канцеру. Након активног циљања, наночестица сребра се везује за део мембране специфичане за ћелије канцера како би се олакшало узимање наноматеријала од стране жељене популације ћелија. Типично се могу користити лиганди рецептора специфичних за канцер, као и нека антитела. Међутим, везивањем пептида који лако продиру у ћелије на површинама наночестица сребра, побољшава терапеутску ефикасност таквих наноматеријала. Такође, измењени образац површинске гликозилације је обележје ћелија канцера, посебно канцера дојке, где се често користи као прогностички маркер. Аглутинин соје има специфично везивање за такве површинске обрасце ћелија канцера, чиме се обезбеђује стратегија циљања која се може искористити за ову групу малигних ћелија. У складу са овим, потврђено је да су наночестице сребра коњуговане аглутинином соје биле специфично цитотоксичне за ћелијске линије канцера дојке (MDA-MB-231 и MCF-7), али не и за здраве епителне ћелије дојке (MCF-10A). Друга студија је показала да наночестице сребра коњуговане са фолном киселином, такође селективно делују на ћелије канцера које прекомерно експримирају фолне рецепторе. Пријављено је да токсичност наночестица сребра на различитим ћелијским линијама зависи више од ефикасности упијања наночестица него од индивидуалне осетљивости дате ћелије рака на јоне сребра. Хемијске карактеристике материјала за стабилизацију на спољашњем слоју наночестице обликују биомолекуларни склоп честице и, самим тим, препознавање наночестица сребра од стране ћелија рака. На пример, показано је да су A549 ћелије преузеле веће количине наночестица сребра обложених танинском киселином него наночестице које су биле обложене цитратом или поливинилпирролидином. Величина наночестица је такође препозната као важан фактор који одређује ћелијски унос. Међутим, једна студија је показала да наночестице сребра од 5 и 35 nm покрећу идентичне апоптотичке путеве у ћелијама остеосаркома, показујући да њихова величина не утиче на начин деловања [190]. С обзиром да већина ћелија канцера има киселину средину од здравих ћелија, ослобађање Ag^+ је интензивније, а самим тим је и селективност већа [192]. Ова врста деловања се традиционално назива

механизмом типа „тројански коњ“ и подразумева да се цитотоксична активност наночестица појављује тек након њиховог преузимања од стране ћелија [190].

Због свог огромног односа величине површине, слично другим наноматеријалима, наночестице сребра су обећавајући алати за циљану испоруку. Оне поседују капацитет да вежу широк спектар органских једињења и биомолекула углавном путем хемисорпције и физиосорпције. Последњих година, ове карактеристике су успешно искоришћене за формулисање и активних и пасивних система за испоруку лекова против тумора коришћењем биокомпатибилних метода синтезе, као што су двофазна синтеза, микроемулзија, радиолиза и редукција у воденом раствору. Недавно су зелено синтетисане наночестице сребра постигле велико интересовање за клиничку примену. Посебно су наночестице сребра синтетизоване коришћењем биљних екстраката као редукционих агенаса задобиле истакнуто интересовање у наномедицини, због високог садржаја једињења, која могу послужити као средства за облагање током синтезе наночестица. Такође, потенцијална предност наночестица сребра које су формиране редукцијом помоћу биљних екстраката јесте у томе што се поред ослобађања јона сребра, ослобађају и фитоједињења која могу додатно допринети антиканцерогеном ефекту. Поређењем тумор-селективне цитотоксичности, антиоксидативних и антимикробних својства комерцијално доступних наночестица сребра и наночестица добијених коришћењем воденог екстракта ораха, зелено синтетизоване наночестице показале су виши степен цитотоксичности и антиоксидативна својства од комерцијалних [187]. Иако су *in vivo* студије о биокоњугованим и зелено синтетизованим наночестицама сребра веома ограничене, ове наночестице су потенцијални кандидати у будућој наномедицини, посебно у терапији рака. Главни изазови у напредовању њиховог коришћења су селективност према туморским ћелијама, разматрање хетерогености тумора и туморске строме, као и критичних параметара као што су физиолошке баријере. Прилагођавањем површине наночестица, тачније, модификовањем њихове површине различитим биолошки активним једињењима у циљу бољег таргетирања ћелија канцера или испоруке лекова, захтева напредније студије како би се добиле терапеутски ефикасне формулације.

Према већини студија, наночестице сребра испољавају своју токсичност унутар ћелије на три главне локације које су приказане на **Слици 36**, а то су цитоплазматична мембрана, митохондрије и једро [45].



Слика 36. Потенцијална места у ћелији на којима наночестице сребра испољавају своју токсичност. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Штета настала на овим локацијама на крају доводи до апоптозе (иако се понекад јавља и некроза). Као последица оштећења у цитоплазматичној мембрани примећено је присуство мембранских мехурића [45]. Ова оштећења такође поткрепљују студије које показују повећање цурења цитосолног ензима лактат дехидрогеназе из ћелија третираних наночестицама сребра, што је уобичајен показатељ поремећаја цитоплазматске мембране [193]. Токсичност наночестица сребра унутар митохондрија настаје углавном због повећане производње реактивних кисеоничних врста. Ове врсте се углавном производе у овој органели, током оксидативне фосфорилације када неки електрони на крају побегну и вежу се за O_2 формирајући радикал $O_2^{\cdot -}$ који се може претворити у друге радикале. Повећање производње реактивних кисеоничних врста може настати и као последица површинске хемије наночестица, трошењем молекула антиоксиданата (као што је на пример глутатион) везивањем Ag^+ за тиолне групе, изменом ензимске производње реактивних врсти, инхибицијом ланца транспорта електрона и смањењем експресије ензима SOD и CAT [193]. Унутар ћелијског једра, наночестице сребра могу изазвати много оштећења у ДНК ланцу, и у зависности од хемијских и физичких карактеристика наночестица, као и од ћелијске линије, ова оштећења у великој мери могу утицати на виталност ћелије. Наночестице сребра могу индуковати мутације, фрагментацију ДНК, формирање ДНК лестнице са малом молекулском тежином, оксидацију база ДНК, прекиде једноструких или двоструких ланаца, формирање унакрсних веза и кондензацију хроматина. Ова оштећења могу бити узрокована директним везивањем наночестица за ДНК или везивањем за протеине који остварују интеракцију са ДНК ланцем. Потврђено је такође да мењају регулацију неколико гена који су укључени у поправку ДНК и заустављању раста [45,191,193]. Поред тога, наночестице сребра успешно инхибирају миграцију и инвазију ћелија, што показује њихов потенцијални антиметастатски карактер [45]. Апоптоза се генерално индукује на две главна пута сигнализације: унутрашњи пут (који је регулисан каспазом 9) и спољашњи пут (регулисан каспазом 8) [194].

2.5.7. Каталитичка активност наночестица сребра

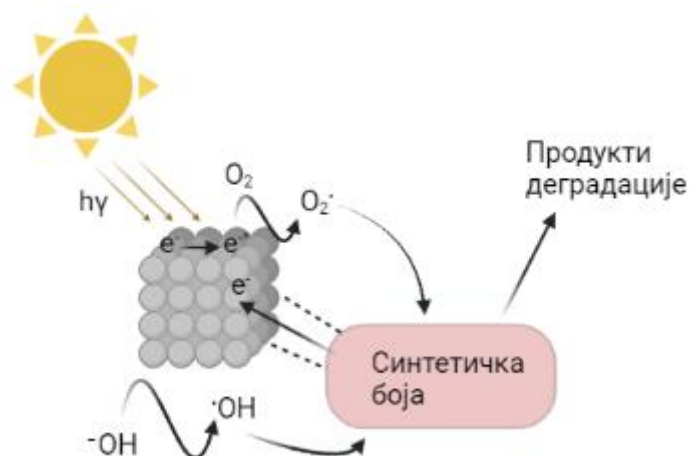
Пораст бројних индустрија, попут прехранбене, козметичке, текстилне и многих других у циљу повећања производње у складу са потребама све већег броја становништва, довео је до повећања производње отпада и неправилног одлагања отпада. Ове индустрије, заједно са повећањем производње, такође су повећале употребу боја како би задовољиле своје купце и повећале продају [195]. Различите структурне варијанте боја укључујући дисперзне, азо, реактивне, базичне, диазо, антрахинонске боје као и скоро осам хиљада хемијских производа намењени за индустрију боја су доступни на тржишту. Након употребе у индустрији, ове боје морају бити уклоњене из отпадних вода јер су неке боје канцерогене и представљају потенцијални ризик за људе, али и друга жива бића [196].

Основни поступци који се користе у третману отпадних вода су физички, хемијски и биолошки. Физички третман укључује употребу принципа као што су адсорпција и зрачење. Адсорбенти који се најчешће користе у постројењима за пречишћавање воде укључују активни угаљ, зеолит и хитозан. Зрачење комуналних отпадних вода врши се УВ, гама и рендгенским зрацима [196]. Уклањање боја из индустријског отпада захтева огромну количину хемикалија за мокру прераду и стога се често индустријска отпадна вода која садржи ефлуент боја испушта без накнадне обраде. Хемијска индустрија која користи боје производи приближно 9 милијарди тона отпада годишње [197]. Најкоришћеније методе уклањања загађивача укључују хемијску

оксидацију, адсорпцију на биомасу и мицеларну солубилизацију. Хемијска оксидација подразумева употребу оксидационог средства за претварање загађивача у мање опасне супстанце. Адсорпција на биомасу користи биолошке материјале, као што су алге и бактерије, да заробе и сталожу загађиваче и тако спрече испуштање у водотокове. Мицеларна солубилизација користи сурфактанте за разлагање загађивача на мање честице које се лако могу уклонити из околине. Међутим, ове методе нису економичне и практичне, захтевају велике количине оксидационог средства и сурфактанта, а рад са микроорганизма није брз и захтева дугачку припрему и контролисане услове [195,197,198]. Штавише, употреба оваквих процеса ствара велике количине муља који садржи ароматичне аminer који постају токсични за живе организме укључујући људе [195,198].

Каталитичка редукција загађивача је важан део контроле загађења и представља процес који користи катализатор за смањење количине загађивача испуштених у животну средину. Овај процес се широко користи за смањење емисије гасова, боја и других загађивача из различитих извора. Показало се да металне наночестице такође поседују каталитичка својства и да је њихова употреба у контроли загађења данас прилично популарна с обзиром на исплативост и безбедност процеса [195]. Као што је већ претходно поменуто значај наночестица у било којој области приписује се великој површини доступној за хемијску реактивност. Постоје четири класе функционалних наночестица које се користе у пречишћавању воде, а то су дендримери, наночестице које садрже метал, зеолити и угљенични наноматеријали. Микро и нанопунила захтевају примену значајнијих радних притисака за задржавање растворених материја молекулске масе између 1000 и 3000 Da, што је превазиђено ултрафилтерима дендримера. Предност наночестица које садрже метал је и њихова потенцијална биоцидна активност према неколико Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија. Такође, оне помажу у уклањању тешких метала, као што је арсен и халогени [196]. Примена наночестица сребра у деградацији индустријских боја има још једну предност а то је да се оне лако могу рециклирати и поново користити у каталитичкој реакцији. Данас се на тржишту могу наћи мембрански производи оплемењени различитим типовима наночестица које се користе у третманима отпадних вода [196].

На основу прегледане литературе, наночестице сребра синтетисане помоћу биљних екстраката могу испољити и каталитичку и фотокаталитичку активност. Оба поступка се заснивају на претходној апсорпцији загађивача односно синтетичке боје на површини наночестица које заправо омогућавају пренос електрона са редукујућег средства (најчешће NaBH_4 , натријум борхидрид) на синтетичку боју. С тим што се у случају фотокатализе валентни електрони побуђују са површине наночестице помоћу светлости који затим учествују у редукцији боје (**Слика 37**). Када наночестице сребра апсорбују видљиву светлост, површински електрони из најудаљенијег sp појаса се побуђују у више енергетско стање због ефекта површинске плазмонске резонанције. Ови побуђени електрони ступају у интеракцију са молекулима кисеоника да би формирали радикале кисеоника ($\text{O}_2^{\bullet}$) и хидроксил јон да би формирали хидроксилни радикал ($\text{OH}^{\bullet}$). Тако формиран радикали нападају молекул боје адсорбоване на површини наночестица и доводе до његове деградације. Поред деградације боје од стране радикала, рупе настале у d орбитали наночестица попуњавају се електронима из адсорбованог молекула боје што доводи до деградације боје. Дакле, наночестице сребра су познате по апсорпцији целог светлосног спектра због ефекта плазмонске резонанције и међупојасних прелаза $4d$ електрона у $5sp$ орбиталу [199]. Апсорпција УВ зрачења из сунчевог спектра од стране наночестица сребра изазива побуђивање електрона са $4d$ орбитале на $5sp$ орбиталу [199].



Слика 37. Предложени механизам фотокаталитичке редукције синтетичких боја помоћу наночестица сребра. Слика је креирана помоћу Biorender.com [199].

У механизму каталитичке редукције органских боја уз помоћ NaBH_4 , улога NaBH_4 је да својом дисоцијацијом производи BH_4^- и делује као довор електрона, а молекули боја делују као акцептори електрона, док наночестице сребра делују као транспортни центар за пренос електрона са BH_4^- на молекуле боја. У воденом раствору BH_4^- јони и молекули боја се налазе причвршћени за површину наночестица сребра. Водоник ослобођен из BH_4^- , адсорбује се на површини наночестица (сребро хидрид) и напада молекуле боја. Наночестице који носе електроне активирају каталитичку површину и активирају азо везу боја, што резултира кидањем азо веза услед преузимања електрона преко катализатора и водоника из BH_4^- јона, услед чега се боје редукују на површини наночестица [200]. У случају да молекул боје садржи нитро групу у својој структури, на сличан начин долази до њене редукције у амино групу (**Схема 4**). До данас синтетизоване су наночестице помоћу разних биљних врста које су показале каталитичку активност у деградацији конго црвене боје, метиленско плаве, метил оранж, 4 – нитрофенол, родамина Б и метил црвене [195].

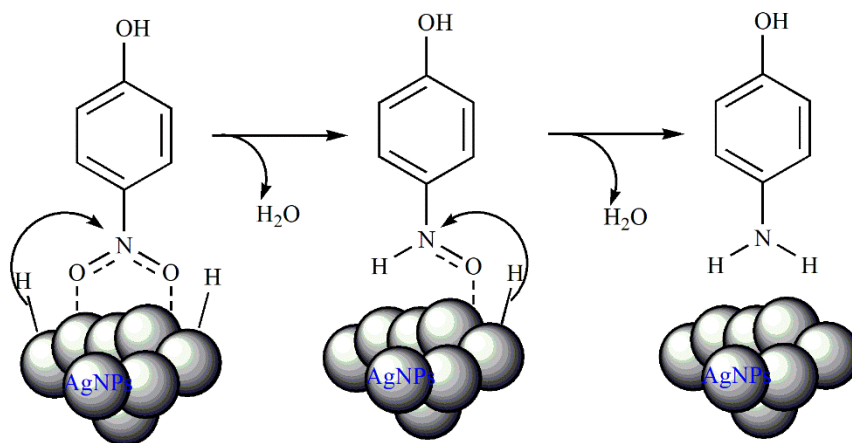


Схема 4. Потенцијални механизам редукције 4-нитрофенола до 4-аминофенола у присуству наночестица сребра као катализатора и натријум борхидрида као редукујућег агенса [201].



3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Биљни материјал и припрема метанолских екстраката за фитохемијска испитивања и одређивање биолошке активности

Надземни део и корен биљке *L. salicaria* сакупљен је у августу 2017. године у централној Србији на локацији са следећим географским координатама: 44°10'30.7"N 20°55'40.6"E, (село Сипић, општина Рача). Биљка *S. pratensis* је сакупљена у мају 2018. године на локалитету са географским координатама 44°08'42" N, 20°54'23" E (село Велико Крчмаре, општина Рача). Обе биљне врсте су сакупљене у фази пуног цветања након чега су идентификоване и депоноване у хербаријуму Института за Биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Добијени број ваучера за биљку *L. salicaria* је 130/018, док је за *S. pratensis* 129/018.

Пристап обради биљака, односно њихова припрема за екстракцију, је био идентичан. Након сакупљања биљног материјала, надземни делови су одвојени од корена. Корен биљака је третиран јаким млазом воде како би се очистио од заостале земље. Сушење биљака је изведено на тамном и проветреном месту на собној температури. Биљни материјал је после сушења уситњен коришћењем кухињског блендера како би екстракција била што ефикаснија.

За добијање метанолских екстраката коришћен је поступак мацерације. Осушени и уситњени надземни део (90,8 g) и корен (103,7 g) биљке *L. salicaria*, као и надземни део (80,3 g) и корен (90,2 g) биљке *S. pratensis* су преливени са три пута већом запремином метанола и остављени да одстоје 24 h на собној температури, заштићени од светлости, уз повремено мешање. Након тога, узорци су профильтрирани кроз филтер папир (*Whatman*, No. 1), процес мацерације истог биљног материјала је поновљен још два пута коришћењем исте запремине растварача. Добијени филтрати су спојени и упарени помоћу ротационог вакуум упаривача (RV 10 basic, IKA, Штауфен, Немачка) до сува, водећи рачуна да температура не пређе 40 °C. Након потпуног уклањања растварача добијено је 9,75 g (10,74 %, w/w) и 13,01 g (12,79 %, w/w) екстракта надземног дела (*LSA*) односно корена биљке *L. salicaria* (*LSR*), док је маса екстракта надземног дела биљке *S. pratensis* (*SPA*) била 8,67 g (10,79 %, w/w), а екстракта корена (*SPR*) 6,81 g (7,55 %, w/w). Добијени екстракти су чувани у фрижидеру на 4°C до даљих испитивања. У свим даљим експериментима коришћени су суви екстракти добијени на овај начин и растворени у одговарајућим растварачима погодним за ту врсту испитивања.

3.2. Инструменти и хемикалије

Спектрофотометријска мерења за одређивање фенолних једињења, антиоксидативне активности, праћење синтезе наночестица и одређивање њихове хемолитичке и каталитичке активности вршена су на *Uv-Vis* спектрофотометру двоструког снопа *Halo DB-20S* (*Dynamica GmbH*, Дитикон, Швајцарска). ДНК траке у одређивању антигенотоксичне активности екстраката су визуализоване под УВ светлом (*UV transilluminator*, *Vilber Lourmat*, Колежјен, Француска). Помоћу течне хроматографије високих перформанси одређен је хемијски профил екстраката биљке *L. salicaria* користећи *Shimadzu prominence instrument* (Кјото, Јапан), док је течна хроматографија ултра високих перформанси (*UHPLC*) са линеарним анализаторима масе за хватање јона – орбитрап (*LTQ OrbiTrap XL*; *Thermo Fisher Scientific*, Бремен, Немачка) коришћен за идентификацију фенолних једињења биљке *S. pratensis*. Идентификована фенолна једињења су квантификована коришћењем *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* система који је био опремљен троструким квадруполним масеним спектрометром (*TSQ Quantum Access Max*, *Thermo Fisher Scientific*, Базел, Швајцарска).

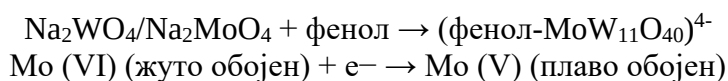
МТТ тест спроведен је користећи аутоматски читач микроплоча (*Microbeta Wallac 1420*, *PerkinElmer*, Базел, Швајцарска). Интензитет флуоресценције приликом одређивања *in vivo* антиоксидативне активности мерен је *Perkin-Elmer LS50* (Валтхам, Масачусетс, Сједињене Америчке Државе) спектрофлуориметром. Кристална структура наночестица испитана је користећи дифрактометар за прах (*PHILIPS PW 1710*, Амстердам, Холандија). Снимање површине и елементалног састава наночестица вршена је помоћу скенирајућег електронског микроскопа (SEM) *JOEL JSM IT 300LV* (Пибоди, Масачусетс, Сједињене Америчке Државе) са EDS детектором (*Energy dispersive spectroscopy*, енг.) (*OXFORD Instruments, X-max*, Абингдон, Оксфордшир, Уједињено краљевство). За одређивање величине наночестица мерењем динамичког расејавања светлости коришћен је *Mastersizer 2000* од компаније *Malvern Panalytical* (Малверн, Воркестершире, Уједињено краљевство). FT-IR спектри узорака екстракта и наночестица снимљени су на *Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR* (Валтхам, Масачусетс, Сједињене Америчке Државе).

Хемикалије коришћене у изради ове докторске дисертације (2,20-азино-бис(3-етилбензтиазолин-6 сулфонска киселина) (ABTS), 2,2- дифенил-1-пикрилхидразил радикал (DPPH), натријум борохидрид (NaBH_4), сребро нитрат (AgNO_3), натријум додецил сулфат (SDS), као и све хемикалије које се користе за анализу укупних фенолних једињења, антимикуробне активности, тестове заштите ДНК од радикалског оштећења и цитотоксичности добијене су од компанија *Sigma-Aldrich* (Деизенхофен, Немачка) и *Acros Organics* (Њу Џерзи, Сједињене Америчке Државе). Деоксирибонуклеинска киселина из сперме харинге, као и сви растварачи за течну хроматографију високих перформанси (HPLC), набављени су од компаније *Karl Roth* (Карлсруе, Немачка). Готове дехидратисне смеше за припрему течних и чврстих подлога за култивисање микроорганизама и експерименте који су са њима извођени набављене су од Института за вирусологију, вакцине и серуме Торлак (Београд, Србија). Од компаније *Sigma Aldrich* (Сент Луис, Мисури, Сједињене Америчке Државе) су обезбеђени ензими који се користе у *in vitro* гастроинтестиналном симулационом тесту (алфа-амилаза, пепсин, панкреатин и екстракт жучи).

3.3. Одређивање садржаја фенолних једињења у екстрактима

3.3.1. Одређивање садржаја укупних фенолних једињења

Садржај укупних фенолних једињења у екстрактима одређен је спектрофотометријском методом применом Фолин-Чикалте (*Folin-Ciocalteu*) реагенса [202]. Метода се заснива на реакцији фенолних једињења са Фолин-Чикалте реагенсом (смеша натријум-фосфолибдата, $\text{Na}_3\text{Mo}_{12}\text{PO}_{40}$ и натријум-фосфоволфрамата, $\text{Na}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) у присуству NaHCO_3 при чему долази до промене боје реагенса из жуте у плаву. С обзиром да се реакција фенокснидног анјона и реагенса одиграва у базној средини, неопходно је додати NaHCO_3 , при чему бикарбонатни анјон базно хидролизује у повећава рН вредност. Интензитет промене боје представља капацитет фенолних једињења да редукују Фолин-Чикалте реагенс односно Мо (VI) у Мо (V), на основу чега се одређује садржај фенолних једињења у датом екстракту.



Реагенси:

1. Раствор NaHCO_3 у води концентрације 7,5%;
2. Фолин-Чикалте реагенс разблажен 10 пута у дестилованој води;
3. Раствор галне киселине концентрације 0,1 mg/mL у метанолу за припрему стандардне праве;
4. Раствори екстракта у метанолу концентрације 0,4 mg/mL.

Поступак:

У 0,25 mL метанолског раствора екстракта концентрације 0,4 mg/mL додато је 1,25 mL Фолин-Чикалте реагенса и 1 mL 7,5% воденог раствора NaHCO_3 . Узорци су затим инкубирани на 45 °C у трајању од 15 минута. Након тога измерена је апсорбанца на 765 nm. Исти поступак је примењен за све узорке екстракта и за растворе различитих концентрација галне киселине коришћених за конструисање стандардне праве. Три понављања су одрађена за све узорке и стандард галне киселине. На основу добијене калибрационе праве галне киселине, израчунат је садржај укупних фенолних једињења у екстрактима, који је изражен у еквивалентима галне киселине по граму сувог екстракта (mg GKE/g екстракта). Резултати представљају средњу вредност три понављања и њихову стандардну девијацију.

3.3.2. Одређивање укупног садржаја флавоноида

Због присуства окси и хидрокси група, многи флавоноиди могу координовати и хелирати различите металне јоне. Међутим, због добрих редукујућих особина флавоноида, нису све реакције са металним јонима координационог типа. Ово се посебно односи на металне јоне са оксидационим својствима, нпр. Fe(III) , Ru(IV) , Ru(III) или Au(III) , које флавоноиди могу редуковати до нижих оксидационих стања [203]. Укупни садржај фенолних једињења у екстрактима испитиваних биљних врста одређен је спектрофотометријском методом коју су описали *Brighente* и сар., а која се заснива на реакцији Al(III) јона са флавоноидима и њиховим гликозидима при чему настаје комплекс жуте боје [204]. На **Схеми 5** је приказано комплексирање изоориентина флавоноида присутног у биљци *L. salicaria* са Al^{3+} јоном.

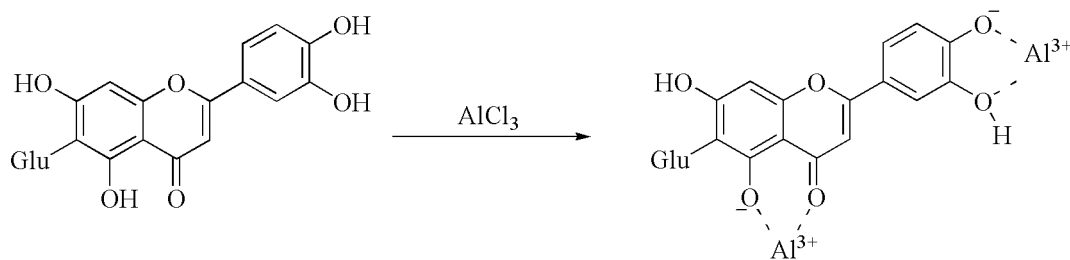


Схема 5. Потенцијална места комплексирања изоориентина јоном алуминијума.

Реагенси:

1. Раствор AlCl_3 у метанолу (2%);
2. Стандардни раствор кверцетина у метанолу;
3. Метанолски раствори екстракта концентрације 0,5 mg/mL.

Поступак:

У 1 mL метанолских раствора екстраката концентрације 0,5 mg/mL додато је 1 mL 2% раствора AlCl_3 и затим инкубирано сат времена на собној температури и тамном месту. Након сат времена измерена је апсорбанца свих узорака и контроле (уместо 1 mL екстраката коришћен је 1 mL метанола) на 415 nm. Како би се одрадила корекција боје која потиче од екстраката, уместо реагенса запремини од 1 mL додато је 1 mL метанола и апсорбанце су такође мерене на 415 nm. Стандардни раствор кверцетина у опсегу концентрација од 0,02 до 0,1 mg/mL коришћен је за конструисање калибрационе праве, при чему је на основу добијене једначине праве израчуната укупна количина флавоноида у узорку. Резултати су изражени у еквивалентима кверцетина по граму екстракта (mg KVE/g сувог екстракта) и представљају средњу вредност три независна мерења и њихову стандардну девијацију.

3.3.3. Одређивање укупног садржаја флавонола

Флавоноли су класа флавоноида чија се структура разликује од флавоноида по томе што имају 3-хидроксифлавоноску основу. Њихово одређивање се такође заснива на реакцији комплексирања са AlCl_3 по методи коју су описали *Yermakov* и сар. [205].

Реагенси:

1. Раствор AlCl_3 у метанолу (2%);
2. Раствор CH_3COONa концентрације 50 mg/mL;
3. Стандардни раствор рутина у метанолу;
4. Метанолски раствори екстраката концентрације 1 mg/mL.

Поступак:

Помешане су идентичне запремине раствора екстраката и реагенса AlCl_3 (1 mL), након чега је додато 3 mL раствора CH_3COONa . После 2,5 h инкубације реакционе смеше на собној температури мерена је апсорбанца узорка на 440 nm. Калибрациона права је конструисана коришћењем стандардног раствора рутина у опсегу концентрација од 0,02 до 0,1 mg/mL. Из једначине праве израчунат је укупни садржај флавонола у узорцима, при чему је добијени резултат изражен у еквивалентима рутина (mg RUE/g сувог екстракта) и представља средњу вредност три независна мерења и њихову стандардну девијацију.

3.3.4. Одређивање укупног садржаја фенолних киселина

Садржај укупних фенолних киселина у екстрактима одређен је помоћу Arnow-ог реагенса по методи која је описана у Пољској фармакопеји [206].

Реагенси:

1. Arnow реагенс (5% Na-молибдат и 5% NaNO_2);
2. Раствор HCl (0,1 M);
3. Раствор NaOH (0,1 M);
4. Стандардни раствор кафеинске киселине концентрације 0,1 mg/mL;
5. Метанолски раствори екстраката концентрације 1 mg/mL.

Поступак:

У 1 mL претходно одмерене запремине екстракта концентрације 1 mg/mL додато је 6 mL дестиловане воде. Након разблажења, додато је 1 mL HCl (0,1 M), 1 mL Arnow-ог реагенса и 1 mL NaOH (0,1 M) уз повремено мешање. Одмах по додатку свих реагенаса измерена је апсорбанца на 490 nm. Стандардна права је конструисана помоћу раствора кафеинске киселине чији је основни раствор био концентрације од 0,1 mg/mL. На основу добијене једначине праве израчуната је концентрација фенолних киселина присутних у биљним екстрактима, при чему је резултат изражен у еквивалентима кафеинске киселине (mg KKE/g сувог екстракта) и представља средњу вредност три независна мерења и њихове стандардне девијације.

3.3.5. Одређивање укупног садржаја кондензованих танина

Укупни садржај кондензованих танина одређен је применом методе коју су описали *Scalbert* и сар. [207]. Ова метода се заснива на таложењу кондензованих танина помоћу флороглуцинола.

Реагенси:

1. Флороглуцинол, $C_6H_6O_3$;
2. Раствор HCl (разблажена са дестилованом водом у односу 2:5);
3. Водени раствор формалдехида (13 mL 37% HCHO разблажен до 100 mL дестилованом водом);
4. Метанолски раствори екстракта концентрације 2 mg/mL.

Поступак:

Након одређивања укупне количине фенолних једињења по већ описаној методи приступа се одређивању укупног садржаја кондензованих танина у екстрактима. На сваки мол галне киселине који је добијен израчунавањем садржаја укупних фенолних једињења у екстракту, у раствор за одређивање танина додаје се онолико грама флороглуцинола која одговара маси 0,5 mol еквивалената флороглуцинола. Затим се у 2 mL екстракта (2 mg/mL) у којем је додат флороглуцинол додаје 1 mL раствора HCl (2:5) и 1 mL раствора HCHO. Смеша је затим инкубирана 24 h на собној температури при чему је дошло до таложења кондензованих танина, који се филтрирањем одбаце, а у супернатанту се поново одреди укупна количина несталожених фенолних једињења методом по Фолину. Разлика укупних фенола и неисталожених фенола одговара садржају кондензованих танина у узорцима, при чему је резултат приказан у еквивалентима галне киселине по граму сувог екстракта (mg GKE/g сувог екстракта) и представља средњу вредност три независна мерења и њихову стандардну девијацију.

3.3.6. Одређивање садржаја мономерних и укупних антоцијана

За одређивање садржаја мономерних антоцијана у екстрактима коришћена је рН диференцијална метода. То је спектрофотометријска метода која се заснива на структурним трансформацијама мономерних антоцијана која се јавља са променом рН вредности, при чему је на рН 1 њихова боја црвена (оксонијум облик), док је на рН 4-5

безбојна (хемикетални облик). Промена структуре у зависности од рН вредности приказана је на примеру цијанидин-3-О-гликозида (Схема 6).

За одређивање укупних антоцијана, који обухватају и мономерне и полимеризоване антоцијане у метанолским екстрактима коришћена је рН „сингл” метода. Метода се заснива на чињеници да апсорбанца измерена на рН 1 одговара садржају укупних антоцијана. Ово је могуће јер антоцијанини имају типичан апсорпциони пик у области од 490 до 550 nm видљивог спектра док се апсорпционе траке других фенола налазе у УВ области. Коришћене методе детаљно су описали *Giusti & Wrolstad* [208].

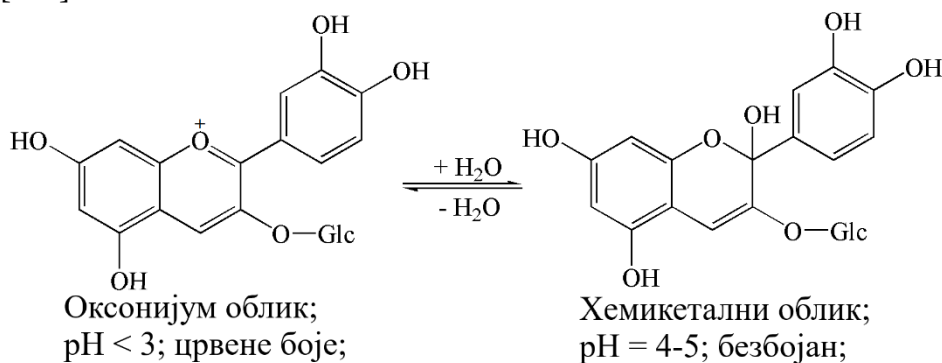


Схема 6. Структурне промене цијанидин-3-О-гликозида са променом рН вредности на којима се заснива рН диференцијална метода.

Реагенси:

1. Калијум хлоридни пуфер (KCl/HCl; 0,025 M; рН 1);
2. Натријум ацетатни пуфер (CH₃COONa/CH₃COOH; 0,4 M; рН 4,5);
3. Метанолски раствори екстракта (2 mg/mL).

Поступак:

За почетак неопходно је да се одреди фактор разблажења (F) тако што се одређена запремина узорка разблажује KCl пуфером (рН 1.0) тако да се на 520 nm максимум апсорпције налази између 0,4 – 0,7. Затим се по 2,5 mL истог екстракта претходно утврђене концентрације разблаже до 10 mL, један са KCl-пуфером рН 1.0 а други са CH₃COONa-пуфером рН 4.5. Након инкубације на собној температури у временском интервалу од 15 минута мерена је апсорбанца на 520 nm и 700 nm. Добијене апсорбанце се разликују због евентуалног присуства мономерних антоцијана. Садржај мономерних и укупних антоцијана је изражен у еквивалентима цијанидин-3-О-гликозида по граму сувог екстракта (mg Cy-3-glc/g екстракта). Резултати су израчунати преко следеће једначине:

$$c = \frac{(A \times M \times F \times 1000)}{(\epsilon \times l)}$$

при чему је: c - концентрација мономерних или укупних антоцијана; A представља апсорбанцу израчунату као (A₅₂₀ – A₇₀₀)_{рН 1.0} за укупне антоцијане и (A₅₂₀ – A₇₀₀)_{рН 1.0} – (A₅₂₀ – A₇₀₀)_{рН 4.5} за мономерне антоцијане; M – моларна маса цијанидин-3-О-гликозида (449.2 g/mol); F – дилуциони фактор; ε – моларна апсорптивност (26,900 L/mol × cm); l – дужина кивете (1 cm).

3.4. Одређивање фенолног профила метанолских екстраката

3.4.1. HPLC-PDA анализа екстраката надземног дела и корена биљке *L. salicaria*

Фенолна једињења у метанолским екстрактима надземног дела и корена биљке *L. salicaria* пре и након хидролизе екстраката идентификована су и квантификована помоћу HPLC уређаја *Shimadzu prominence instrument* (Кјото, Јапан). Уређај се састојао од контролера система модел CBM-20A, грејача колоне (CPO-20AC), пумпе са дегасером модел DGU-20A5 и фотодиодног детектора SPD-M20A (*PDA detector – Photo Diode Array detector*, енг.). За раздвајање компонената коришћена је C18 колона *Luna* (*Phenomenex, Torrance, CA, US*) (димензија 250 × 4.6 mm, величином честица од 5 µm). Количина ињектованог узорка за анализу била је 20 µL. За HPLC анализу коришћени су екстракти растворени у метанолу, концентрације 2 mg/mL који су профилирани кроз филтер величине отвора пора од 0,2 µm. Брзина протока мобилне фазе током хроматографске анализе узорака била је 1 mL/min. Систем растварача се састојао од мобилне фазе А (вода) и мобилне фазе Б (ацетонитрил) са додатком 0,1% трифлуоросирћетне киселине у обе фазе. Састав мобилне фазе током елуирања био је: 0 – 1 min 5% B, 1 – 5 min 5 – 10% B, 5 – 25 min 10 – 80% B, 25 – 27 min 100% B и 27 – 30 min 5% B. Селектоване таласне дужине за праћење и анализу хроматограма су 280, 325, and 360 nm. Добијени хроматографски подаци су обрађени помоћу *LC solution software (version 1.24 SP1)*. Фенолна једињења су идентификована поређењем ретенционих времена и апсорпционих спектра непознатих пикова са референтним стандардима. За квантификацију фенолних једињења присутних у екстрактима, урађене су калибрационе праве следећих референтних стандарда: витексин, оријентин, изооријентин, елагинска киселина, кафеинска киселина, хлорогенска киселина и гална киселина. Граница детекције и граница квантификације за примењену HPLC анализу одређена је у складу са *International Conference on Harmonization* [209].

Како би се идентификовали агликони појединих фенолних и флавоноидних гликозида присутних у екстракту извршена је и хроматографска анализа хидролизованог екстраката при истим условима. Поступак киселе хидролизе метанолских екстраката заснива се на методи коју су објавили *Engida* и сар. уз одређене модификације [210].

Реагенси:

1. Метанол (65%);
2. Хлороводонична киселина (6 N HCl);
3. LSA и LSR суви метанолски екстракти.

Поступак:

Најпре су екстракти растворени у 40 mL 65% водено-метанолског раствора у који је потом додато 10 mL хлороводоничне киселине (6 N) и загревано на 80°C током 1 h. Након хлађења до собне температуре узорци су били изложени ултразвучном купатилу 5 минута, запремина узорка је допуњена метанолом до 100 mL и филтрирани су кроз филтер за шприц са величином поре од 0,2 µm. Узорци обрађени на овај начин су били спремни за даљу HPLC анализу.

3.4.2. UHPLC/MS-MS анализа надземног дела и корена биљке *S. pratensis*

Раздвајање једињења од интереса је извршено коришћењем система течне хроматографије ултрависоких перформанси (UHPLC, *ultrahigh-performance liquid chromatography*, енг.) који се састоји од кватернарне пумпе (Accela 600) и Accela аутосемплера (ThermoFisher Scientific, Бремен, Немачка) [211]. Коришћена колона за раздвајање једињења (Syncronis C18 100×2,1 mm, величина честица 1,7 μm) од произвођача ThermoFisher Scientific, термостатирана је на 30°C. Брзина протока је подешена на 300 μL/минути, а мобилна фаза се састојала од 0,1% сирћетне киселине у дејонизованој води (А) и ацетонитрила (MS чистоће) (Б). Запремине убризгавања биле су 25 μL, а програм линеарног градијента је био следећим редоследом: 0,0–1,0 мин, 5% Б; 1,0–12,0 мин, 5–95% Б; 12,0–12,2 мин, 95–5% Б; 12,2–15,0 мин, 5% Б.

UHPLC систем је повезан са масеним спектрометром са линеарном јонском замком - орбитрап (LTQ OrbiTrap MS) опремљеним јонским извором у облику електроспреј јонизације (HESI-II, ThermoFisher Scientific, Бремен, Немачка) у режиму негативне јонизације. Параметри јонског извора били су: напон извора 4000 V, капиларни напон 40 V, напон цеви сочива 80 V, температура капиларе 300 °C, проток носећег и ауксиларног гаса (N₂) 35 и 7 AU (*arbitrary units*). Снимање масених спектра је изведено у спектралном опсегу масених јединица 100-1500 *m/z*. За испитивање фрагментације праћена је дисоцијација молекула индукована колизијом, (*CID*, *Collision-induced dissociation*, енг.) и енергија *CID* ћелије је подешена на 35 *eV*. Идентификација фенолних једињења извршена је на основу добијених спектралних података из масеног спектра, прецизне молекулске масе једињења, карактеристичне фрагментације и карактеристичног ретенционог времена. Подаци су прикупљени и обрађени помоћу софтвера ThermoFisher Scientific *Xcalibur software (Version 2.1)* који је служио и за контролу и управљање инструментом. Механизам фрагментације и карактеристични фрагменти су потврђени коришћењем софтвера ThermoFisher Scientific *Mass Frontier (Version 6.0)*. Интернет база података тачних MS података, *ChemSpider (www.chemspider.com)*, коришћена је као референтна база за идентификацију једињења од интереса [211].

3.4.3. UHPLC-DAD/(-)HESI-MS/MS квантитативна анализа надземног дела и корена биљке *S. pratensis* L.

Циљана фенолна једињења су квантификована коришћењем *Dionex Ultimate 3000* UHPLC система (Thermo Fisher Scientific, Бремен, Немачка) конфигурисаног са троструким квадруполним масеним спектрометром (*TSQ Quantum Access Max*, Thermo Fisher Scientific, Базел, Швајцарска) са електроспреј јонизациом (HESI) [211]. Фенолна једињења присутна у екстрактима надземног дела и корена биљке *S. pratensis* су хроматографски раздвојена помоћу *Hypersil gold C18* колоне (50 × 2.1 mm) са величином честица од 1,9 μm (Thermo Fisher Scientific, Сједињене Америчке Државе), термостатираној на 30°C. Примењена мобилна фаза са брзином протока од 0,4 mL/минути, састојала се од 0,1% сирћетне киселине у води (А) и ацетонитрила LC-MS квалитета (Б). Параметри хроматографског елуирања једињења подешени су као што су описали Мишић и сар., док су подешавања масеног спектрометра била следећа: температура испаривача 450°C, волтажа 4000 V, притисак носећег гаса (N₂) 50 AU, притисак гаса у јонском извору 0 AU, притисак ауксиларног гаса 20 AU, температура капилара 320 °C. Циљана једињења су квантификована у SRM (енг. *selected reaction monitoring*) модалитету масеног спектрометра који је радио у режиму негативне

јонизације. Фрагментација индукована колизијом је остварена коришћењем колизионог гаса аргона, при чему је енергија судара подешена на 30 eV [211].

Једињења су квантификована коришћењем екстерних стандарда. Основни стандардни раствори су припремљени растварањем 1 mg чистог једињења у 1 mL метанола, а радни стандардни раствор је даље припремљен мешањем основних раствора чистих једињења у метанолу да би се добила концентрација од 100 $\mu\text{g/mL}$. Нивои калибрације у опсегу концентрација од 20 до 0,002 $\mu\text{g/mL}$ добијени су разблаживањем радног раствора метанолом.

3.5. Биосинтеза наночестица сребра (AgNPs) помоћу водених екстраката биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*

3.5.1. Припрема водених екстраката биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*

Суви делови биљака, одвојено надземни део и корен, су уситњени до праха користећи лабораторијски млин. Затим је засебно одмерено по 10 g надземног дела (LSA и SPA) и корена биљака (LSR и SPR) који су преливени са 100 mL кључале дејонизоване воде и остављени поклопљени 1 h. Тако добијени екстркати су профилирани кроз филтер папир (*Macherey-Nagel* 85/70 mm) како би се уклонио биљни материјал. Добијени екстракти су чувани у фрижидеру на 4°C и искоришћени за синтезу у року од недељу дана.

3.5.2. Фитохемијска анализа водених екстраката биљака

Претходно описаним спектрофотометријским методама у одељку 3.2.1. и 3.2.2. одређен је укупни садржај фенолних и флавоноидних једињења у воденим екстрактима при чему су резултати изражени у mg GKE/g сувог биљног материјала односно mg KVE/g сувог биљног материјала.

3.5.3. Оптимизација услова синтезе наночестица сребра

Како би се одредили најповољнији реакциони услови за синтезу веће количине наночестица сребра помоћу водених екстраката испитиваних биљака, испитани су утицаји различите концентрације AgNO_3 , различите концентрације екстраката, као и промена рН вредности и температуре на реакцију синтезе наночестица сребра. Процес формирања наночестица праћен је спектрофотометријски, снимањем апсорпционог спектра на таласним дужнама од 300 до 800 nm са резолуцијом од 0,5 nm. Као полазни услови синтезе узети су 10 mM раствор AgNO_3 , 10% (v/v) раствор екстраката, приближно собна температура (25°C) и рН 6. Затим је испитан утицај промене једног по једног параметра на синтезу наночестица. Најпре је мењана концентрација сребро нитрата (5 и 10 mM) и концентрација водених екстраката (5 и 10% (v/v)). Реакционе смеше су мешане на магнетној мешалици и загревање на различитим температурама (25, 50 и 80°C) све док се не формирају наночестице. За модификовање рН реакционе смеше (рН 2, 6 и 12) коришћена је 1 M HNO_3 или 1 M NaOH . Визуелна промена боје (од светло жуте до тамно браон) и UV-Vis спектрофотометрија су коришћени да би се посматрао настанак AgNPs током реакције синтезе. Интензитет карактеристичног пика на приближно 420 nm указивао је на количину формираних наночестица у раствору. Поређењем спектрофотометријских података при различитим условима синтезе, дошло

се до података при којим условима се добија највећи принос наночестица у овом процесу синтезе. Када је установљено који су најповољнији услови синтезе наночестица сребра, синтетисана је њихова већа количина. Добијене наночестице су затим центрифугиране на 12 000 rpm у трајању од 10 минута. Супернатант је декантован, а добијени талог након центрифугирања је испран дејонизованом водом и поново центрифугиран. Исталожене наночестице су сушене на 40°C у сушници након чега су чуване у фрижидеру на 4°C.

3.5.4. Методе карактеризација синтетисаних наночестица сребра

3.5.4.1. UV-Vis спектрофотометрија

Спектрофотометар са двоструким снопом Halo DB-20C (Dynamica GmbH, Швајцарска) је коришћен за снимање настанка AgNPs у опсег таласних дужина 300-800 nm са резолуцијом од 0,5 nm. Сва снимања су вршена у кварцним киветама дебљине 1 cm. Пре додатка AgNO₃, снимљени су спектри свих водених екстраката одговарајућег разблажења. Додатком AgNO₃ започиње формирање наночестица које се прати симањем спектра сваких 10 минута у временском интервалу од 30 минута.

3.5.4.2. Рендгенска дифракциона (XRPD) анализа наночестица

Узорци наночестица су испитани на дифрактометру за прах (PHILIPS PW 1710) под следећим условима: употребљено је зрачење са антикатоде бакра таласне дужине $\text{CuK}\alpha = 1,54178 \text{ \AA}$ и графитни монохроматор. Радни напон на цеви је био $U = 40 \text{ kV}$ а јачина струје $I = 30 \text{ mA}$. Узорци су испитани у опсегу $10 - 90^\circ 2\theta$ са кораком $0,02^\circ$ и временским задржавањем $0,25 \text{ s}$ на сваком кораку. Добијени подаци положаја дифракционих максимума $2\theta(^\circ)$, вредности међуплосних растојања $d \text{ (\AA)}$, као и одговарајући интензитети I дати су одељку Резултати и дискусија.

На основу добијених вредности интензитета I/I_{max} и међуплосних растојања d као и упоређивањем са литературним подацима и ICDD PDF-2 стандардима идентификоване су присутне кристалне фазе.

3.5.4.3. Скенирајућа електронска микроскопија са енергетски дисперзионом спектроскопијом (SEM/EDS)

У циљу испитивања површине и елементалног састава наночестица коришћен је скенирајући електронски микроскоп (SEM) JOEL JSM IT 300LV са EDS детектором (Energy dispersive spectroscopy, енг.) (OXFORD Instruments, X-max). Ова техника се заснива на добијању увећане слике површине неког узорка која се добија помоћу снопа електрона високе енергије. Током снимања узорци се налазе у вакуму како би сноп електрона био фокусиран на узорак односно како не би дошао у интеракцију са молекулима из ваздуха. Такође сви узорци наночестица су пре анализе премазани танким слојем злата помоћу аутоматског регулатора дебљине премаза JOEL FC-TM20. Када дође до интеракције електрона са површином узорка долази до ослобађања секундарних електрона са узорка дајући слику површине на основу топографије. Помоћу EDS анализе могуће је идентификовати елементе који чине узорак. Интеракцијом X – зрака са узорком доводи до настанка емисионог спектра који је јединствен за сваки елемент присутан у узорку, док су позиције пикова у спектру предвиђени Мозлијевим законом.

3.5.4.4. Одређивање расподеле величина наночестица

Расподела величина наночестица у раствору одређена је помоћу DLS технике (*Dynamic light scattering*, енг.) која се заснива на расејавању светлости у свим правцима када се она судари са суспендованим честицама које су мање у поређењу са таласном дужином светлости (мање од 250 nm). Mastersizer 2000 од компаније *Malvern Panalytical* је коришћен за одређивање величине наночестица мерењем динамичког расејавања светлости.

3.5.4.5. Карактеризација узорака инфрацрвеном спектроскопијом Фуријеове трансформације (FT-IR)

Добијени узорци наночестица, као и суви (упарени) водени екстракти коришћени у њиховој синтези, подвргнути су инфрацрвеној спектроскопији Фуријеове трансформације (FT-IR, *Fourier-transform infrared spectroscopy*, енг.) за детекцију функционалних група молекула присутних у узорцима која су одговорна за редукцију јона сребра и стабилизацију насталих наночестица. Техника се заснива на пропуштању полихроматског зрачења кроз узорак при чему узорак апсорбује део тог упадног зрачења а рефлектује се зрачење мањег интензитета на оним таласним дужинама које је узорак апсорбовао. Узорци су припремљени претходним ситњењем и мешањем мале количине са калијум бромидом (KBr) од којег се потом прави KBr пилула помоћу пресе високог притиска. Одузимањем спектра улазног зрачења од рефлектованог добија се апсорпциони спектар. Узорци су снимљени на *Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR* спектрометру у средњем инфрацрвеном региону од 4000 до 400 cm^{-1} .

3.6. Одређивање антиоксидативне активности екстраката и синтетисаних наночестица

3.6.1. Одређивање укупне антиоксидативне активности метанолских екстраката

Укупна антиоксидативна активност узорака екстраката и наночестица сребра одређена је методом која се заснива на чињеници да антиоксидативна једињења присутна у екстрактима у киселој средини и повишеној температури (95°C) могу да редукују редукују Мо (VI) до Мо (V). Настали комплекс фосфат - Мо (V) је зелене боје.

Реагенси:

1. Реагенс се припрема растварањем натријум фосфата (Na_3PO_4 ; 28 mM) и амонијум молибдата ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$; 4 mM) у сумпорној киселини (H_2SO_4 ; 0,6 M);
2. Стандардни раствор тролокса (0,1 mg/mL);
3. Раствори узорка (0,2 mg/mL).

Поступак:

У три серије од по 0,3 mL узорка додато је 3 mL реагенса. Узорци су затим инкубирани 90 минута на 95°C, након чега је мерена апсорбанца на 695 nm. Стандардна права конструисана је помоћу стандардног раствора тролокса у различитим концентрацијама почевши од 0 до 0,1 mg/mL. Као слепа проба уместо екстраката и

стандарда коришћен је метанол. Резултати представљају средњу вредност три независна мерења и њихову стандардну девијацију и изражени су у еквивалентима тролокса по граму сувог екстракта (mg тролокса/g екстракта).

3.6.2. Одређивање ефикасности неутрализације DPPH радикала

DPPH радикал (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал) један је од најстабилнијих слободних радикала који се користи као стандард приликом испитивања нивоа антиоксидативног потенцијала биљног или синтетичког материјала. Љубичасте је боје и реакцијом са антиоксидантима прелази у стабилнији облик 1,1-дифенил-2-(2,4,6-тринитрофенил)-хидразин жуте боје (**Схема 7**). Антиоксидативна једињења се најчешће понашају као донори водоника у реакцији са DPPH радикалима при чему врше њихову редукцију, што за последицу има смањење апсорбанце на 517 nm. Примењена метода заснива се на деколоризацији раствора DPPH радикала што указује на способност неутрализације радикала [212].

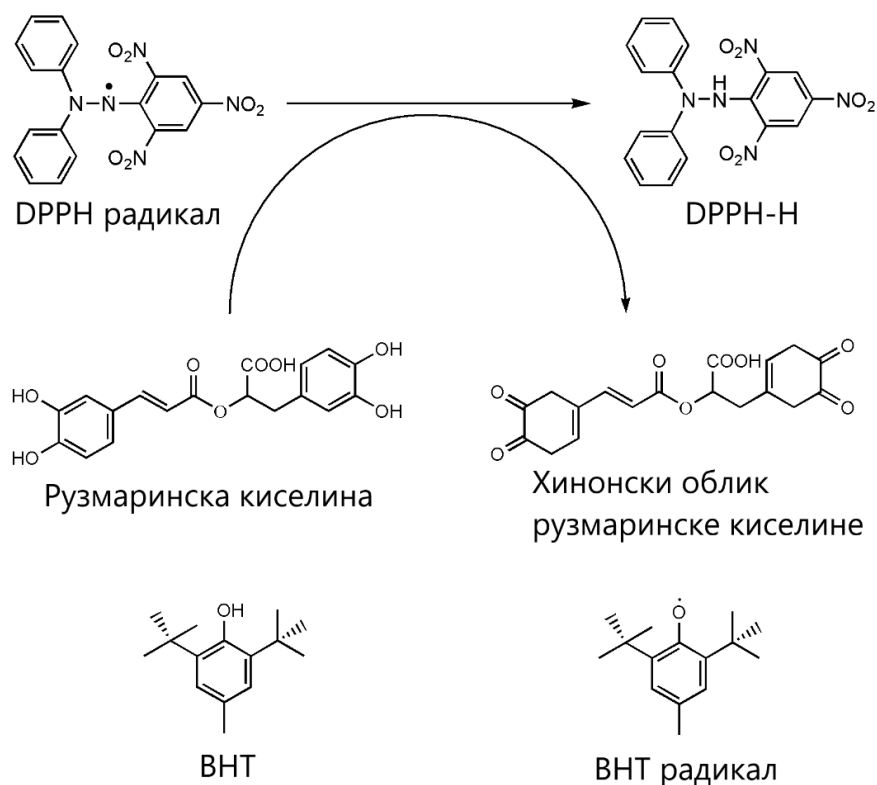


Схема 7. Механизам неутралисања DPPH радикала руžмаринском киселином и синтетичким антиоксидантом ВНТ (бутилисани хидрокситолуен).

Реагенси:

1. Метанолски раствор 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал (DPPH, 80 $\mu\text{g/mL}$);
2. Стандардни раствори антиоксиданата у метанолу (гална киселина, аскорбинска киселина, тролокс и бутилхидрокситолуен (БНТ; 0,1 mg/mL);
3. Раствори водених (2 mg суве биљке/mL) и метанолских (1 mg сувог екстракта/mL) екстракта
4. Раствори синтетисаних наночестица (0.1 mg/mL).

Поступак:

Прво се направи серија од 10 дуплих разблажења узорка у метанолу, коначне запремине 1 mL. Сви узорци, стандарди, као и контроле испитани су у три понављања. Као контрола коришћен је метанол. Потом се додаје 1 mL раствора DPPH радикала и смеша остави да стоји 30 минута у мраку на собној температури, након чега се мери апсорбанца на 517 nm. Проценат инхибиције DPPH радикала израчунат је према следећој једначини:

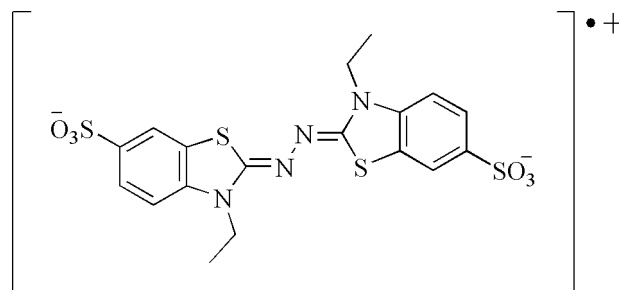
$$\% \text{ инхибиције} = \frac{A_k - A_u}{A_k} \times 100$$

Где је: A_k - апсорбанца контроле; A_u – апсорбанца узорка.

Помоћу криве зависности процента инхибиције од концентрације узорка израчуната је IC_{50} вредност која представља концентрацију испитиваног узорка који је потребан да неутрализује слободне радикале за 50% и изражен у $\mu\text{g/mL}$ екстракта. За израчунавање IC_{50} вредности на основу сигмоидне „dose-response” криве (поступком нелинеарне регресије) коришћен је софтвер Origin Pro 9.

3.6.3. Одређивање ефикасности неутрализације ABTS радикал катјона

ABTS^{•+}, односно 2,2'-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат) радикал катјон, је стабилно хемијско једињење које је нашло широку примену у одређивању антиоксидативног потенцијала прехранбених производа (Слика 38). Метода базирана на примени овог радикала у одређивању антиоксидативног потенцијала неког природног производа или синтетисаног антиоксиданта заснива се на степену деколоризације раствора ABTS^{•+} тамно зелене боје [213].



Слика 38. Структурна формула ABTS радикал катјона.

Метода је врло погодна за одређивање липофилних и хидрофилних антиоксиданата због добре расатворљивости ABTS^{•+} како у води тако и у неполарним органским растварачима. ABTS радикал-катјон се припрема реакцијом 7 mM раствора

ABTS са 2,45 mM калијум-персулфатом. Реакциона смеша се остави да стоји у мраку на собној температури 12 h пре употребе.

Реагенси:

1. Реагенс раствор ABTS^{•+};
2. Стандардни раствори антиоксиданата у метанолу (гална киселина, аскорбинска киселина, тролокс и ВНТ, (0,1 mg/mL));
3. Раствори водених (2 mg суве биљке/mL) и метанолских екстраката (1 mg сувог екстракта/mL)
4. Раствори синтетисаних наночестица (0.2 mg/mL).

Поступак:

Раствор ABTS^{•+} је припремљен 12 h пре тестирања антиоксидативне активности. Након припреме серије дуплих разблажења у метанолу испитиваних екстраката, наночестица и стандардних раствора у три понављања укупне запремине 0,2 mL дода се по 1,8 mL раствора ABTS^{•+}. Реакциона смеша је, затим, остављена на собној температури 30 минута, заштићена од светла, након чега су измерене апсорбанце раствора на 734 nm у односу на контролу код које је уместо узорка коришћен метанол. Проценат инхибиције је израчунат на основу приказане једначине:

$$\% \text{ инхибиције} = \frac{A_k - A_u}{A_k} \times 100$$

Где је: A_k - апсорбанца контроле; A_u – апсорбанца узорка

IC₅₀ вредност израчуната је на основу криве зависности процента инхибиције од концентрације узорка, односно стандарда, на начин описан код методе неутрализације DPPH радикала.

3.6.4. Одређивање ефикасности инхибиције липидне пероксидације

Липидна пероксидација представља тип оксидативне деградације биомолекула, при чему долази до ланчане реакције уз формирање пероксидних једињења. Формирање липидних пероксида приказано је на **Схеми 8**. Пероксиди су једињења чија је општа формула R-O-O-R', код којих је атом кисеоника у нестабилном оксидационом стању – 1. Липиди су посебно склони пероксидацији, нарочито полинезасићене масне киселине у свом слободном облику или у облику триацилглицерида. Такође, овим реакцијама подлежу и поларни липиди који садрже полинезасићене масне киселине (гликолипиди, фосфолипиди и сфинголипиди).

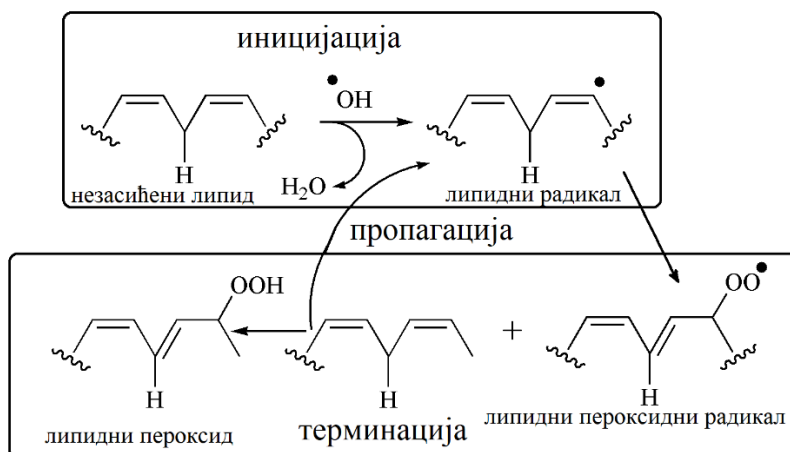


Схема 8. Спонтано формирање липидних пероксида процесом пероксидације липида.

Способност испитиваних биљних екстраката да инхибирају липидну пероксидацију је одређена помоћу гвожђе-тиоцијанатне методе [214]. Метода се заснива на аутооксидацији линолне киселине на повишеној температури, при чему настају хидропероксиди који оксидују Fe^{2+} до Fe^{3+} . Потом, реакцијом Fe^{3+} са тиоцијанатом настаје комплекс црвене боје. Интензитет боје формираног комплекса сразмеран је концентрацији на основу чијег интензитета се Fe^{3+} јона насталих оксидацијом помоћу формираних липидних пероксида.

Реагенси:

1. 30% раствор NH_4SCN у води;
2. Гвожђе (II) сулфат (20 mM FeSO_4 растворен у 3,5% воденом раствору HCl);
3. Фосфатни пуфер (0,2 M, pH = 7);
4. Емулзиони раствор линолне киселине (једнаке масе (0,5608 g) линолне киселине и Tween 40 растворене у 1 L 0,2 M фосфатног пуфера pH 7);
5. 75% етанол;
6. Раствор ВНТ-а, 0,1 mg/mL;
7. Метанолски раствори екстраката (1 mg/mL).

Поступак:

Направи се серија дуплих разблажења екстраката и стандардног једињења (ВНТ) запремине 0,5 mL, при чему је почетна концентрација екстраката 1 mg/mL, а стандардног једињења 0,1 mg/mL. Након тога, у све узорке и контролне растворе (етанол) дода се 2,5 mL емулзије линолне киселине, промеша се и инкубира у мраку на 37 °C у току 72 h. Потом се у 0,1 mL инкубираних смеша дода 4,7 mL 75% етанола, 0,1 mL NH_4SCN и 0,1 mL FeSO_4 и након 3 минута мери апсорбанца насталог комплекса црвене боје на 500 nm. Проценат инхибиције липидне пероксидације екстраката у поређењу са познатим стандардним антиоксидантом (ВНТ) и контролом (етанол) израчуната је преко једначине:

$$\% \text{ инхибиције} = \frac{A_k - A_u}{A_k} \times 100$$

Где је: A_k - апсорбанца контроле; A_u – апсорбанца узорка

Као и у претходним методама резултати су изражени преко IC50 вредности, на начин описан код методе неутрализације DPPH радикала.

3.6.5. Одређивање капацитета хелатизације екстраката

Уколико дође до повећања концентрације слободних Fe^{2+} јона (феро облик) у организму долази до реакција фентоновог типа у којима настаје хидроксил радикал ($\text{OH}^\cdot$) који потом доводи до повећаног оксидативног стреса. У циљу спречавања настанка $\text{OH}^\cdot$, односно повећања концентрације слободних Fe^{2+} јона, све је више истраживања која се баве проналаском што безбеднијег лиганда који ће хелирати и на тај начин неутралисати слободне Fe^{2+} јоне. Познато је да нека полифенолна једињења поседују изузетно велики потенцијал у хелирању металних јона. Испитивање капацитета екстраката да хелирају Fe^{2+} јон рађено је по методи која се заснива на способности неких хелатационих агенаса да онемогуће везивање Fe^{2+} за ферозин и стварање обојеног Fe -ферозин комплекса [215].

Реагенси:

1. 0,3125 mM водени раствор ферозина ((натријум 4-[3-пиридин-2-ил-5-(4-сулфофенил)-1,2,4-триазин-6-ил]бензенсулфонат);
2. 0,125 mM водени раствор гвожђе (II) сулфат (FeSO_4);
3. Метанолски раствори екстраката (2 mg/mL);
4. Стандардни раствор рутина у метанолу (1 mg/mL);
5. Стандардни раствор етилендиаминететрасирћетне киселине (EDTA, 0,1 mg/mL).

Поступак:

Након припреме серије од 10 дуплих разблажења екстраката и стандарда у три понављања укупне запремине од 1 mL, додато је по 1 mL раствора FeSO_4 и 1 mL раствора ферозина након чега је реакциона смеша остављена 10 минута на собној температури. Интензитет настанка црвене боје награђеног комплекса Fe^{2+} са ферозином одређен је спектрофетометријски мерењем апсорпције на 562 nm. Проценат инхибиције настанка Fe -ферозин комплекса израчунат је према једначини:

$$\% \text{ инхибиције} = \frac{A_k - A_y}{A_k} \times 100$$

Где је: A_k - апсорбанца контроле; A_y – апсорбанца узорка

Добијене IC_{50} вредности изражене су у $\mu\text{g/mL}$ на начин описан код методе неутрализације DPPH радикала.

3.6.6. Одређивање редуктивне активности екстраката

Редуктивни потенцијал биљних екстраката представља способност антиоксиданата присутних у екстрактима да редукују супстрат са којим ступају у реакцију предајући му један електрон. Метода се заснива на процени редуктивног капацитета испитиваних екстраката у редукцији Fe^{3+} у Fe^{2+} које потом у киселој средини формира комплекс $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ познат као Берлинско плаво (Схема 9) [216]. Концентрација насталог комплексног једињења се потом одређује спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 700 nm.

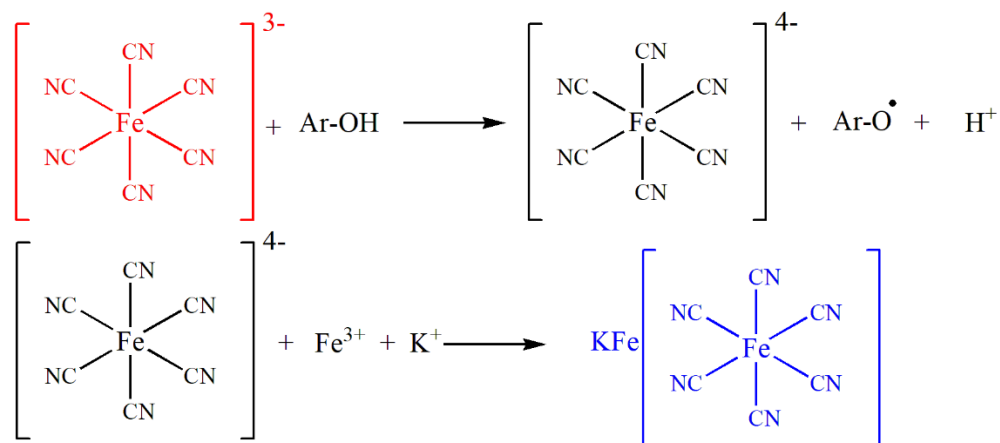


Схема 9. Редуктивна способност фенолних једињења присутних у биљним екстрактима у редукцији Fe^{3+} у Fe^{2+} , при чему настаје комплекс Берлинско плаво.

Реагенси:

1. Водени раствор калијум ферицијанида ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1%);
2. Натријум фосфатни пуфер (0,2 М, $\text{pH} = 6,6$);
3. Раствор трихлорсирћетне киселине (CCl_3COOH , 10%);
4. Водени раствор гвожђе (III) хлорид (FeCl_3 , 0,1%);
5. Стандардни раствор тролокса (0,1 mg/mL);
6. Метанолски раствори екстракта (0,1 mg/mL).

Поступак:

У 1 mL раствора екстракта у метанолу (0,1 mg/mL) додато је по 1 mL натријум фосфатног пуфера и 1% воденог раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ након чега су узорци инкубирани 20 минута на 50°C . Потом додати по 1 mL раствора трихлорсирћетне киселине и 0,8 mL раствора FeCl_3 . У случају формирања талога, узорци се центрифугирају 8 минута на брзини од 1000 обртаја/min након чега се мери апсорбанца на 700 nm. За конструисање стандардне праве припреме се три серије раствора тролокса тачно познатих концентрација који се третирају на исти начин као и узорци. На основу добијених вредности конструира се стандардна права зависности апсорбанце од концентрације тролокса, помоћу које се израчунава редуктивна активност екстракта. Резултати су приказани као средња вредност три независна мерења $\pm \text{SD}$ и изражени су у mg тролокса/g екстракта.

3.7. Испитивање антигенотоксичне активности метанолских екстракта

Различите концентрације метанолских екстракта (25, 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$) и стандардних фенолних једињења (100 $\mu\text{g/mL}$) идентификованих у екстрактима коришћени су како би се испитао њихов потенцијално заштитни ефекат од оштећења ДНК изазваног хидроксилним и пероксидним радикалима. Поред фенолних једињења идентификованих у екстрактима, као референтни стандард коришћен је кверцетин (100 $\mu\text{g/mL}$), једињење са много пута потврђеним антигенотоксичним ефектом.

3.7.1. Одређивање степена инхибиције оштећења ДНК изазваног хидроксил радикалима

Процена заштитног ефекта екстраката и стандардних фенолних једињења идентификованих у екстрактима од оштећења ДНК изазваног хидроксидним радикалима испитана је методом коју су описали *Lin* и сар. [217].

Реагенси:

1. Фосфатни пуфер (0,2 М, рН = 7.4);
2. ДНК изолован из спеме харинге (*Carl Roth GmbH*, Карлсруе, Немачка);
3. Натријум-хлорид (NaCl, 0,9%);
4. Гвожђе(II) сулфат (FeSO₄, 180 mM);
5. Водоник-пероксид (H₂O₂, 600 mM);
6. Агарозни гел (1 g агарозе у 100 mL 1xTAE (Tris-ацетат-EDTA) пуферу);
7. Етидијум бромид (10 mg/mL);
8. Различите концентрације екстраката и фенолних једињења.

Поступак:

Најпре се припреме различите концентрације екстраката и фенолних једињења у метанолу након чега се остави да метанол потпуно испари. Затим се у суве екстракте додаје 45 µL фосфатног пуфера (0,2 М, рН = 7.4) и 10 µL ДНК изоловане из сперме харинге (*Carl Roth GmbH*, Карлсруе, Немачка), концентрације 5 mg/mL, суспендоване у 0,9% NaCl. Хидроксил радикал генерисан је додатком 0.9 µL FeSO₄ (180 mM) и 3.6 µL H₂O₂ (600 mM). Након инкубације смеше 15 минута на собној температури, третирани узорци екстраката и фенолних једињења су подвргнути електрофорези са напоном од 100 V на 1% агарозном гелу, претходно припремљеном растварањем 1 g агарозе у 100 mL 1xTAE (Tris-ацетат-EDTA) пуферу, у којем је додато 3 µL етидијум бромида (10 mg/mL). Интензитет развијених ДНК трака се визуелно читава под УВ светлошћу на таласној дужини од 365 nm користећи UV транслуминатор (*Vilber Lourmat*). Развијене ДНК траке се затим фотографишу и обрађују помоћу *ImageJ* програма.

3.7.2. Одређивање степена инхибиције оштећења ДНК изазваног пероксил радикалима

Заштитини потенцијал испитиваних екстраката као и фенолних једињења идентификованих у екстрактима од ДНК оштећења изазваног пероксидним радикалима процењена је користећи методу коју су описали *Zhang* и сар. [218].

Реагенси:

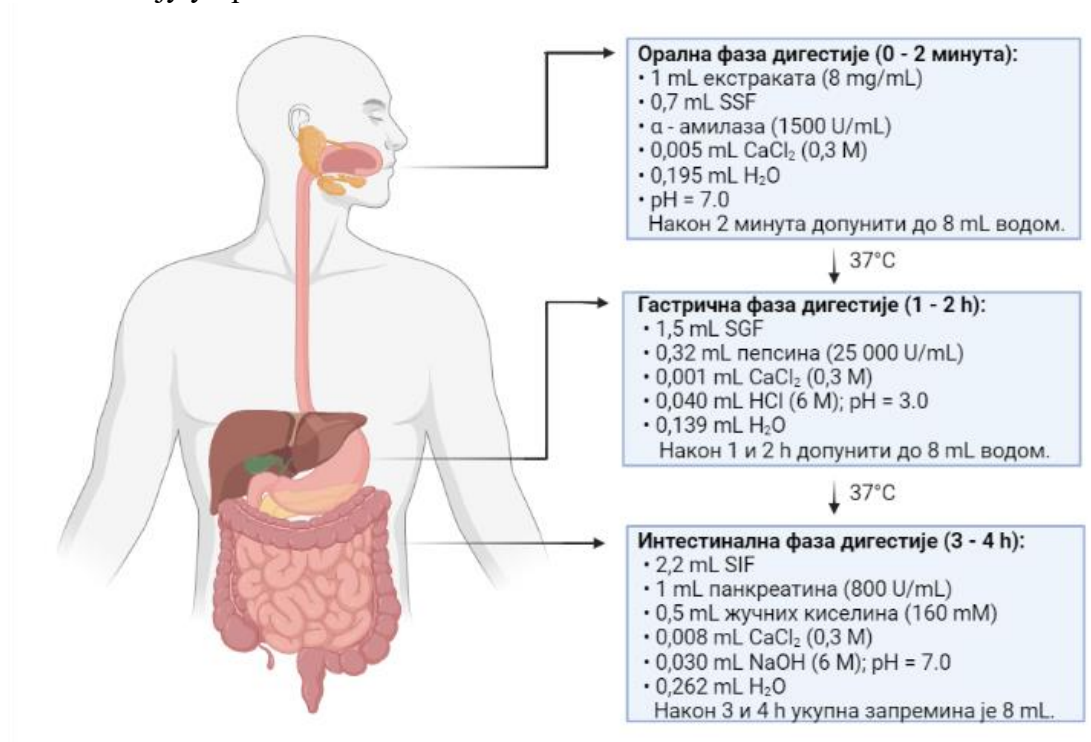
1. Фосфатни пуфер (0,2 М, рН = 7.4);
2. ДНК изолован из спеме харинге (*Carl Roth GmbH*, Карлсруе, Немачка);
3. Натријум-хлорид (NaCl, 0,9%);
4. 2,2' -азобис (2-метилпропионамидин) дихидрохлорида (AAPH, 200 mM);
5. Агарозни гел (1 g агарозе у 100 mL 1xTAE (Tris-ацетат-EDTA) пуферу);
6. Етидијум бромид (10 mg/mL);
7. Различите концентрације екстраката и фенолних једињења.

Поступак:

Као и код претходно описане методе изазивања оштећења ДНК хидроксил радикалима, најпре се припреми серија раствора различитих концентрација екстраката и фенолних једињења концентрације 100 $\mu\text{g/mL}$, који се потом оставе да метанол потпуно испари. Затим се у упарене узорке додају исте запремине фосфатног пуфера и ДНК из сперме харинге идентичних концентрација као у претходно описаној методи. Пероксил радикали су формирани додатком 10 μL 2,2'-азобис (2-метилпропионамидин) дихидрохлорида (AAPH, 200 mM) узорцима са ДНК и њиховом инкубацијом 4 h на 37°C. Након инкубације, електрофорезом на 1% агарозном гелу (припремљеном идентично као у претходној методи) развијене су ДНК траке. Такође, након електрофорезе агарозни гел са узорцима је пренет на транслуминатор где је под УВ светлошћу таласне дужине 365 nm фотографисан. Резултати су на крају обрађени користећи *ImageJ* програм.

3.8. Симулација *in vitro* гастроинтестиналне дигестије метанолских екстраката

In vitro методе које симулирају процесе варења широко се користе за проучавање понашања хране, тачније биомолекула у условима гастроинтестиналне дигестије. Биодоступност активних полифенолних једињења присутних у испитиваним метанолским екстрактима испитана је методом коју су описали *Minekus* и сар. [219]. Цео процес симулације дигестије изведен је у три фазе (Слика 39). У оралној фази симулирани су процеси који се дешавају у усној дупљи, у гастричној фази су симулирани процеси који се одвијају у желуцу, док су у интестиналној фази симулирани процеси који се дешавају у цревима.



Слика 39. Преглед *in vitro* гастроинтестиналне дигестије са свим коришћеним ензимима и реагенсима. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Најпре су направљени одговарајући основни раствори електролита за сваку фазу. У **Табели 4** су приказане тачне запремине одговарајућих раствора соли познате концентрације које треба помешати у нормалном суду од 250 mL и допунити суд дестилованом водом до врха како би се добили флуиди који симулирају услове у различитим деловима дигестивног тракта (усна дупља, желудац и интестинални тракт).

Табела 4. Припрема раствора електролита који симулирају пљувачни (SSF), желудачни (SGF) и интестинални (SIF) флуид. Запремине су прерачунате за укупну запремину од 250 mL раствора.

Стандардни раствори	SSF* (pH = 7)	SGF* (pH = 3)	SIF* (pH = 7)
KCl (0,5 mol/L)	9,44 mL	4,31 mL	4,25 mL
KH ₂ PO ₄ (0,5 mol/L)	2,31 mL	0,56 mL	0,5 mL
NaHCO ₃ (1 mol/L)	4,25 mL	7,81 mL	26,56 mL
NaCl (2 mol/L)	-	7,37 mL	6 mL
MgCl ₂ ·6H ₂ O (0,15 mol/L)	0,312 mL	0,250 mL	0,69 mL
(NH ₄) ₂ CO ₃ (0,5 mol/L)	0,037 mL	0,3125 mL	-

*SSF (*Simulated Salivary Fluid*, енг.) симулирани пљувачни флуид, SGF (*Simulated Gastric Fluid*, енг.) симулирани желудачни флуид, SIF (*Simulated Intestinal Fluid*, енг.) симулирани цревни флуид.

Реагенси:

1. Раствори екстраката (8 mg/mL) у води;
2. SSF, SGF, SIF раствори припремљени према упутству у Табели 4;
3. Калцијум хлорид (CaCl₂, 0,3 M);
4. Хлороводонична киселина (6 M);
5. Натријум хидроксид (NaOH, 6 M);
6. Раствор α – амилазе (1500 U/mL) у SSF-у;
7. Раствор пепсина (25 000 U/mL) у SGF-у;
8. Жучне киселине (160 mM) растворене у SIF-у;
9. Панкреатин (800 U/mL) растворен у SIF-у;

Поступак:

Како би се симулирали орални услови, у 1 mL раствора екстраката додато је 0,7 mL SSF, 0,1 mL раствора α -амилазе (1500 U/mL), 5 μ L CaCl₂ (0,3 M) и 0,195 mL дестиловане воде. Након 2 минута инкубације на 37°C, у 2 mL раствора додато је 1,5 mL SGF, 0,32 mL раствора пепсина (25 000 U/mL), 1 μ L CaCl₂ (0,3 M), 0,139 mL воде и 40 μ L HCl (6 M) како би подесели pH на 3.0. Добијена смеша је инкубирана 2 h на 37°C. На тај начин симулирани су услови дигестије у желуцу. После инкубације, узорцима који су прошли желудачну фазу дигестије, додати су 2,2 mL SIF, 1 mL раствора панкреатина (800 U/mL), 0,5 mL жучних киселина (160 mM), 8 μ L CaCl₂ (0,3 M), 30 μ L NaOH (6 M) и 0.262 mL воде како би се постигла pH вредност 7.0 и опет инкубирани 2 h на 37°C. На тај начин симулирани су интестинални услови дигестије. Контролни узорак је припремљен на идентичан начин, с тим што је уместо узорка додата иста запремина дестиловане воде. Узорци дигестираних екстраката за HPLC анализу, праћење садржаја фенолних и флавоноидних једињења као и праћење антиоксидативне активности екстраката током *in vitro* дигестије, узимани су након 0, 2, 60, 120, 180 и 240 минута, након чега су замрзнути до даљих анализа. Садржај фенолних и флавоноидних једињења као и антиоксидативна активност (DPPH) екстраката праћена је претходно описаним спектрофотометријским методама. Хидрофобни филтери за шприцеве (PTFE 0,45 μ m) коришћени су за филтрацију узорка пре убризгавања у HPLC уређај.

3.9. Испитивање антимикробне активности метанолских екстраката надземног дела и корена биљака *L. salicaria* и *S. pratensis* као и одговарајућих наночестица сребра

3.9.1. Стерилизација лабораторијског прибора, хранљивих подлога и потребних раствора

Пре почетка експеримента неопходно је стерилисати сво лабораторијско посуђе, микробиолошке подлоге као и растворе који се користе. Поступком стерилизације уништавају се сви евентуално присутни микроорганизми и њихове споре које могу касније утицати на валидност добијених резултата. За уништавање свих микроорганизама (бактерија, гљива, плесни) довољно је постићи температуру од 100°C у трајању од 1 – 2 h, међутим њихови спорогени облици су знатно отпорнији на топлоту те је за њихово уништавање потребна температура од 125°C. Стерилизација је одрађена у Пастеровој пећи на температури од 125°C у трајању од 2 h непосредно пре почетка рада.

3.9.2. Припрема хранљивих подлога и култивисање микроорганизма

Пре почетка испитивања антимикробне активности неопходно је припремити свеже културе микроорганизма. Бактеријске врсте се засејавају у епруветама на косом Хранљивом агару (Торлак, Београд, Србија), фунгалне врсте се пресејавају на коси кромпир-глюкозни агар, док је *Candida albicans* пресејена на коси *Sabouraud* декстрозни агар (Торлак, Београд, Србија). Засејавање хранљивих подлога, односно њихова инокуација се врши у стерилним условима помоћу микробиолошке езе. Након засејавања хранљивих подлога бактеријске врсте су инкубиране 24 h на 37°C, док су фунгалне културе инкубиране 48 – 72 h на 28°C, како би се поспешило њихов раст.

Антимикробна активност екстраката надземног дела и корена биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*, као и синтетисаних наночестица сребра тестирана је на 11 стандардних бактеријских АТСС култура (*American Type Culture Collection*) од којих 6 Грам-позитивних (G +) и 5 Грам-негативних (G -), 8 плесни и квасцу *C. albicans*. Листа коришћених микроорганизма дата је у **Табели 5**.

Табела 5. Бактеријске и фунгалне врсте коришћене у испитивању антимикробне активности.

Бактеријске (АТТС) културе			Фунгалне културе	
<i>Enterococcus faecalis</i>	G +	ATCC 29212	Плесни	
<i>Bacillus cereus</i>	G +	ATCC 10876	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
<i>Bacillus subtilis</i>	G +	ATCC 6633	<i>Alternaria alternata</i>	FSB 51
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G +	ATCC 12228	<i>Doratomyces stemonitis</i>	FSB 41
<i>Staphylococcus aureus</i>	G +	ATCC 25923	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	FSB 13
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	G +	ATCC 4698	<i>Trichoderma harzianum</i>	FSB 12
<i>Salmonella typhimurium</i>	G -	ATCC 14028	<i>Penicillium canescens</i>	FSB 24
<i>Salmonella enteritidis</i>	G -	ATCC 13076	<i>Penicillium cyclopium</i>	FSB 23
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G -	ATCC 70063	<i>Fusarium oxysporum</i>	FSB 91
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G -	ATCC 10145	Квасац	
<i>Escherichia coli</i>	G -	ATCC 25922	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10259

Стандардне бактеријске врсте (АТТС) коришћене у овом испитивању добијене су од Института за јавно здравље у Крагујевца, док је Лабораторија за микробиологију, Департмана за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу обезбедила све фунгалне културе.

3.9.3. Припрема суспензија микроорганизама (инокулума)

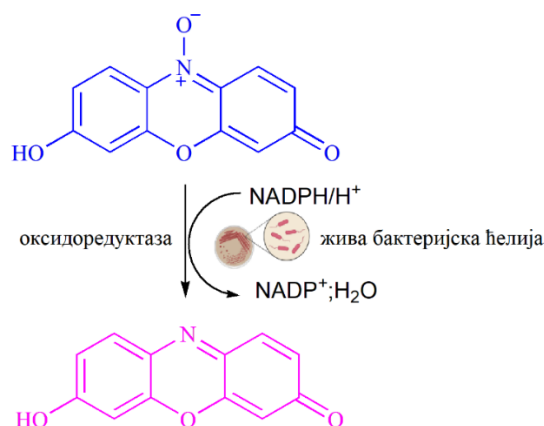
Суспензије тестираних микроорганизама су припремљене према упутству датом од стране Института за клиничке и лабораторијске стандарде, САД [220–222]. Микродулициона метода захтева претходну припрему суспензија микроорганизама тачно познате концентрације, која је изражена преко њихове оптичке густине, а која се одређује фотоколориметријски на 550 nm. Стандардизација суспензија спора извршена је помоћу 0,5 Mc Farland стандарда који се добија мешањем 1% сумпорне киселине (99,5 mL) и 1,175% раствора BaCl_2 (0,5 mL) чијом реакцијом настаје талог BaSO_4 који има специфичну оптичку густину која одговара густини суспензије микроорганизама од 1.5×10^8 CFU/mL (*Colony Forming Unit*, енг.). При одређивању антибактеријске активности екстракта препоручено је да густина суспендованих бактерија износи 1.0×10^6 CFU/mL (исто важи и за *C. albicans*), док густина суспензије мицелија гљива код одређивања антифунгалне активности треба да буде око 1.0×10^4 CFU/mL. Поступак припреме суспензија ћелија микроорганизама заснива се на додатку стерилног физиолошког раствора (0,9% NaCl) у епрувете у којима се налазе културе старости 24 h за бактерије и 48 h за гљиве. Због бољег суспендовања бактеријске или гљивичне врсте користи се 5% раствор диметил-сулфоксида (DMSO). Тако добијена концентрована суспензије се пренесе у другу епрувету и разблажи стерилним физиолошким раствором. Додавањем физиолошког раствора или концентроване суспензије подешава се оптичка густина (O.D., *optical density*, енг.) фотоколориметријски на 550 nm (зелени филтер) тако да за бактеријске културе буде $\text{O.D.}_{550 \text{ nm}} = 0.045$, а за гљиве $\text{O.D.}_{550 \text{ nm}} = 0.030$ што одговара потребној концентрацији микроорганизама у суспензији за даље тестирање.

3.9.4. Одређивање минималне инхибиторне концентрације (MIC) екстракта и наночестица микродулиционом методом

Екстракти и синтетисане наночестице испитани су микродулиционом методом коју су описали Sarker и сар. како би се одредила њихова минимална инхибиторна концентрација (MIC, *Minimal Inhibitory Concentration*, енг.) [223]. То је минимална концентрација екстракта која ће инхибирати видљиви раст микроорганизама. Тест је извођен у стерилним микротитарским плочама са 96 конусних удубљења укупне запремине од 200 μL .

За испитивање антибактеријске активности екстракта коришћена је *Mueller-Hinton*-ова течна подлога. Најпре се направи серија дуплих разблажења екстракта и стандардних антибиотика (хлорамфеникол и еритромицин) у *Mueller-Hinton*-овој течној подлози укупне запремине 80 μL , почетне концентрације екстракта од 20 mg/mL, односно стандарда 40 $\mu\text{g/mL}$. Затим се у сваки отвор додаје 10 μL ресазурина (раствора индикатора бактеријског раста) и 10 μL претходно припремљених суспензија бактеријских врста (1.0×10^6 CFU/mL). Овако припремљене културе бактерија се инкубирају на 37°C у трајању од 24 h, након чега се визуелно одређује промена боје, при чему розе боја индикатора указује на раст, а плава боја на инхибицију раста бактерија. Механизам дејства индикатора заснива се на чињеници да нормалним метаболизмом бактерија долази до стварања ензима оксидоредуктаза (NADH и NADPH дехидрогеназа)

који потом редукују ресазурин до резорурфина (Слика 40). Концентрација екстраката и стандарда која је у последњој јамици у низу разблажења задржала првобитну боју индикатора узима се као минимална инхибиторна концентрација.

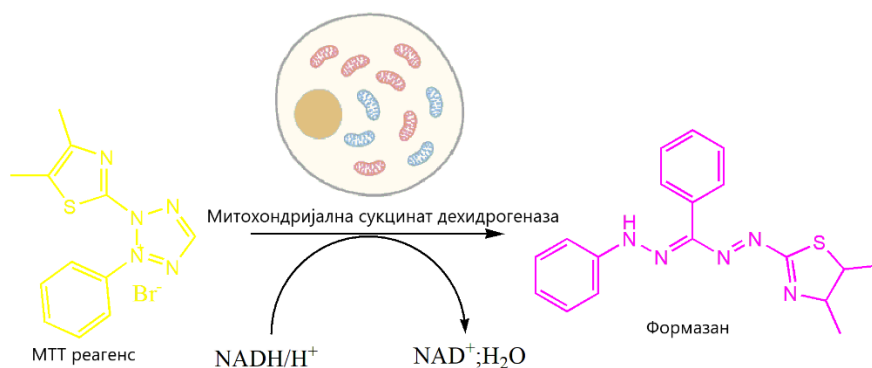


Слика 40. Редуција ресазурина до резорурфина од стране ензима бактеријске ћелије.

За испитивање антифунгалне активности екстраката коришћена је *Sabouraud* декстрозна течна подлога. Као и код одређивања антибактеријске активности, најпре се припреми серија дуплих разблажења раствора екстраката (20 mg/mL) и стандардног антимикотика нистатина (40 μ L) у *Sabouraud* декстрозној течној подлози укупне запремине 90 μ L. Након чега се у сваком отвору додаје 10 μ L претходно припремљене суспензије фунгалних ћелија (1.0×10^4 CFU/mL). Овако припремљене микротитарске плоче се инкубирају 48 – 72 h на 28°C након чега се читава минимална инхибиторна концентрација испитиваних узорака и стандардних антимикотика. Раст гљива читава се визуално на основу замућења подлоге и видљивог раста на површини хранљиве подлоге. Као минимална инхибиторна концентрација узима се она концентрација екстракта односно стандарда у првој јамици у серији дуплих разблажења у којој није дошло до видљивог раста гљива. Испитивања су рађена у три понављања за сваки узорак.

3.10. Процена цитотоксичне активности метанолских екстраката и синтетисаних наночестица

Цитотоксична активност испитиваних екстраката процењена је МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид] методом [224]. Метода се заснива на мерењу метаболичке активности третираних ћелија на основу редукције МТТ реагенса у формазан (плаво-љубичасте боје) која се дешава у присуству митохондријалне сукцинат дехидрогеназе (EC 1.3.99.1), ензима присутног само у живим ћелијама (Слика 41). Тестирање екстраката и синтетисаних наночестица укључило је експерименте на здравим (не измењеним) ћелијама и ћелијама канцера како би се пратила селективна активност тестираних узорака. На тај начин добија се и податак о биокомпатибилности испитиваних екстраката, тачније потврђује се безбедност њихове употребе.



Слика 41. Редукција МТТ реагенса од стране сукцинат дехидрогеназе до розе обојеног формаза.

Реагенси:

1. Ћелијске линије здравих и канцерогених ћелија;
2. Различите концентрације екстракта ($10 - 200 \mu\text{g}/\text{mL}$);
3. Различите концентрације наночестица ($1 - 200 \mu\text{g}/\text{mL}$);
3. МТТ реагенс ([3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид]) ($0,5 \text{ mg}/\text{mL}$ крајња концентрација у јамици);
4. DMEM медиум (Dulbecco's Modified Eagle Medium);

Припрема ћелијских линија и поступак МТТ методе:

За испитивање цитотоксичности екстракта и наночестица коришћене су две еукариотске ћелијске линије и то имортализоване ћелијске линије хуманих кератиноцита (HaCaT) и ћелијске линије фибробласта миша 3T3 соја (BALB/c), као и две канцерогене ћелијске линије и то ћелије хуманог епидермоидног карцинома A431 и ћелијске линије трансформисаних фибробласта миша вирусом SvT2. Дулбеков медијум са високим садржајем глукозе, који садржи 10% феталног говеђег серума, 2 mM L-глутамин, $100 \text{ U}/\text{mL}$ антибиотика стрептомицина и пеницилина, коришћен је за засејавање и чување ћелијских линија. Ћелијске линије су након засејавања чуване у атмосфери са 5% CO_2 на 37°C . Коришћене културе A431, BALB/c-3T3 и SVT2 су биле стандардизоване ATCC културе док су HaCaT обезбеђене од Innoprot (Берио, Шпанија).

Прво се ћелијске линије засеју у свих 96 јамица микротитарских плоча тако да густина ћелија износи $2,5 \times 10^3$ ћелија по јамици. Тако припремљене микротитарске плоче се инкубирају 24 h како би се ћелије причврстиле за подлогу, након чега се додају узорци растворени у стерилисаној деминерализованој води тако да њихова концентрација расте у низу од 10 до $200 \mu\text{g}/\text{mL}$. Вијабилност ћелија се читава 48 h након додатка екстракта помоћу МТТ теста. Претходно припремљени МТТ реагенс (растварањем основног раствора [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид] у DMEM медијуму) додат је у сваку јамицу, тако да је његова крајња концентрација била $0,5 \text{ mg}/\text{mL}$. Након поновне инкубације на 37°C у временском интервалу од 4 h, медијум се уклања, док се заостале ћелије заједно са искристалисаним МТТ реагенсом растварају додатком по $100 \mu\text{L}$ закишељеног изопропанола (50 mL $0,1 \text{ M}$ HCl у $2,5 \text{ mL}$ изопропанола) у сваку јамицу. Интензитет настале љубичасте боје, која потиче од формаза мери се на 570 nm користећи аутоматски читач микроплоча (Microbeta Wallac 1420, PerkinElmer, Базел, Швајцарска). Вијабилност ћелија израчуната је помоћу доле приказане једначине и изражена је као проценат вијабилних ћелија у зависности од концентрације екстракта узимајући у обзир контроле. Две групе ћелија су коришћене као контроле: не третиране ћелије и ћелије у којима је додата једнака

запремина пуфера. Сви екстракти су тестирани у три независне анализе од којих је свака изведена у три понављања.

$$\% \text{ Вијабилних ћелија} = \frac{A_t}{A_k} \times 100$$

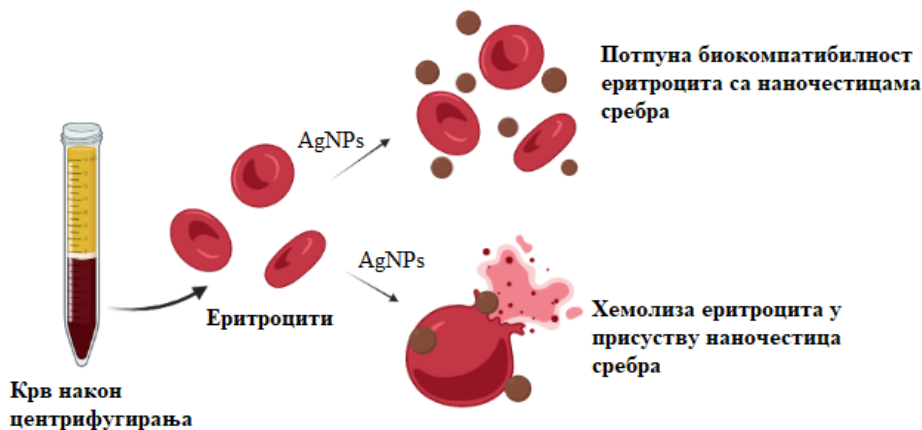
Где је: A_t – апсорбанца третираних ћелија, A_k – апсорбанца контролних ћелија

3.11. DCFDA (2',7'-дихлорофлуоресцин диацетат) тест антиоксидативне активности на HaCaT ћелијској линији

Због своје изражене антиоксидативне активности и селективне цитотоксичности екстракти биљке *L. salicaria* одабрани су за тестирање њихове антиоксидативне активности коришћењем HaCaT ћелијске линије помоћу 2',7'-дихлорофлуоресцин диацетат (DCFDA). Метода се заснива на дифузији DCFDA / H₂DCFDA / DCFH-DA / DCFH унутар ћелије, при чему долази до деацетилизације ћелијским естеразама у нефлуоресцентно једињење, које се касније оксидује помоћу реактивних кисеоничних врста у 2',7'-дихлорофлуоресцеин (DCF). Антиоксидативна активност метанолских екстраката биљке *L. salicaria* испитана је методом која се заснива на мерењу интрацелуларних нивоа реактивних кисеоничних врста [225]. У поступку тестирања, најпре је подешена концентрација HaCaT ћелија на густину од 5×10^4 ћелија/cm². Након 24 h, ћелије су инкубиране 30, 60 и 120 минута у присуству или одсуству LSA (25 µg/mL) или LSR (10 µg/mL), а затим изложене натријум арсениту (NaAsO₂) у концентрацији 300 µM током 1 h. На крају инкубације, ћелије су инкубиране са DCFDA (20 µM). Интензитет флуоресценције је мерен *Perkin-Elmer LS50* спектрофлуориметром (525 nm таласна дужина емисије, 488 nm таласна дужина екситације, брзина скенирања 300 nm/мин, ширина 5 прореза за екситацију и емисију). Производња реактивних врста кисеоника изражена је као проценат интензитета DCF флуоресценције узорка који се тестира, у односу на нетретиран узорак. Свака вредност је процењена помоћу три независна експеримента, сваки са три одређивања.

3.12. Хемолитичка активност синтетисаних наночестица сребра

Хемолиза представља разградњу ћелијске мембране еритроцита под утицајем неких агенаса и изливање њиховог садржаја ван (Слика 42).



Слика 42. Потенцијални ефекти наночестица на еритроците. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Испитивање хемолитичке активности може пружити информације о токсичности неког агенса, као и њихов утицај на интегритет црвених крвних зрнаца. Такође, може бити корисно у фармацеутском истраживању или у процени безбедности одређених хемијских једињења. Могућа хемолитичка активност синтетисаних наночестица (LSA-AgNps, LSR-AgNps, SPA-AgNps и SPR-AgNps) одређена је по методи која се заснива на праћењу нивоа ослобођеног хемоглобина из ћелија еритроцита након њихове инкубације са испитиваним узорцима под симулираним физиолошким условима [226].

Реагенси:

1. Узорак људске крви од здравих донора (узет у епрувету са антикоагулансом EDTA);
2. Физиолошки раствор фосфатног пуфера (PBS, pH 7,4);
3. Различите концентрације наночестица растворених у PBS-у;
4. 1% раствора натријум додецил сулфата (SDS).

Поступак:

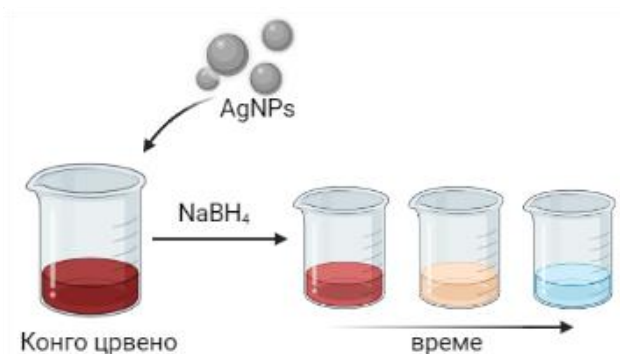
Узорак људске крви је сакупљен од здравих донора у стерилној епрувети са антикоагулансом (EDTA, етилендиаминтетрасирћетном киселином) поступцима усклађеним са смерницама Декларације Светског медицинског удружења из Хелсинкија. Након тога, узорак крви је центрифугиран на 2500 грм током 10 минута ради изолације еритроцита. Добијени талог је затим три пута испран фосфатним пуфером (PBS, pH 7,4) и поново центрифугиран. За одређивање хемолитичких својстава, 1 mL раствора испитиваних наночестица (растворених у PBS-у) додат је у 1 mL 5% еритроцита растворених у PBS-у, како би се добила коначна концентрација наночестица од 150, 120, 90, 60, 30 и 10 $\mu\text{g/mL}$. Негативна контрола је припремљена коришћењем раствора PBS-а уместо раствора наночестица, док је позитивна контрола припремљена додатком 1 mL 1% раствора натријум додецил сулфата (SDS) у 1 mL раствора еритроцита. Узорци су инкубирани на 37°C током 1 h, а затим центрифугирани на 1200 грм током 15 минута. После центрифугирања измерена је апсорбанца супернатанта спектрофотометријски на 540 nm. Проценат хемолизисаних еритроцита је израчунат помоћу следеће једначине:

$$\% \text{ Хемолизе} = \frac{(A_{\text{AgNPs}} - A_{g_0}) - A_k}{A_{\text{SDS}} - A_k} \times 100$$

Где је: A_{AgNPs} апсорбанца узорка са наночестицама, A_0 је апсорбанца одговарајуће концентрације наночестица у PBS-у, A_{SDS} је позитивна контрола са раствором SDS-а, и A_k је негативна контрола (еритроцити у PBS-у).

3.13. Каталитички потенцијал наночестица сребра

Методе које су коришћене за испитивање каталитичке активности синтетисаних наночестица сребра, заснивају се на деградацији конго црвене боје и 4-нитрофенола помоћу натријум-борхидрида (NaBH_4) који има улогу редукујућег средства (Слика 43). У одсуству наночестица, брзина ових реакција је врло мала, готово да до редукације и не долази.



Слика 43. Редукција конго црвене боје помоћу наночестица сребра.

3.13.1. Каталитичка деградација конго црвене боје

Реагенси:

1. Конго црвено (10 μM);
2. Натријум борхидрид (1 mM);
3. Водени раствор наночестица сребра (0,1 mg/mL).

Поступак:

Испитивање каталитичког потенцијала синтетисаних наночестица одређен је по методи која се базира на редукцији конго црвене боје помоћу натријум борхидрида (NaBH_4) у присуству наночестица сребра које имају улогу катализатора [227]. У 1 mL воденог раствора наночестица сребра (0,1 mg/mL) додато је 5 mL раствора конго црвеног (10 μM) и 1,5 mL NaBH_4 (1 mM). Брзина процеса каталитичке деградације конго реда у различитим временским интервалима праћена је спектрофотометријски на $\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$, снимањем спектра од 300 до 700 nm.

3.13.2. Каталитичка деградација 4 – нитрофенола

Реагенси:

1. 4-Нитрофенол (10 $\mu\text{g/mL}$);
2. Натријум борхидрид (0,05 mg/mL);
3. Водени раствор наночестица сребра (0,3 mg/mL).

Поступак:

Каталитичка редукција 4 - нитрофенола помоћу NaBH_4 у присуству наночестица одређена је према методи коју су описали *Desai* и сар. [228]. Реакциони раствор је припремљен додавањем 0,5 mL воденог раствора наночестица (0,3 mg/mL) у смешу која се састоји од 0,5 mL NaBH_4 (0,05 mg/mL) и 5 mL раствора 4 - нитрофенола (10 $\mu\text{g/mL}$). Реакција је праћена спектрофотометријски на 25°C у опсегу таласне дужине од 250 до 550 nm.



4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Фитохемијска анализа метанолских екстраката надземних делова и корена биљака *L. salicaria* и *S. pratensis* и њихове биолошке активности

4.1.1. Садржај различитих класа фенолних једињења у испитиваним екстрактима

У циљу добијања основних информација о присуству различитих класа полифенолних једињења (фенола, флавоноида, флавонола, фенолних киселина, кондензованих танина, као и укупних и мономерних антоцијана) у метанолским екстрактима надземних делова и корена биљака *L. salicaria* (LSA и LSR) и *S. pratensis* (SPA и SPR), као и њиховог међусобног поређења примењене су проверене и стандардизоване спектрофотометријске методе. Добијени подаци о садржају ових класа једињења приказани су у **Табели 6**.

Табела 6. Садржај различитих класа фенолних једињења у метанолским екстрактима биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*.

Екстракти	LSA	LSR	SPA	SPR
Укупни феноли (mg GKE/g екстракта)	201,50 ± 11,49	326,36 ± 10,25	128,94 ± 2,65	177,85 ± 0,35
Укупни флавоноиди (mg KVE/g екстракта)	43,36 ± 2,16	18,08 ± 2,93	68,46 ± 6,73	33,27 ± 1,66
Укупни флавоноли (mg RUE/g екстракта)	89,36 ± 13,08	255,94 ± 6,95	69,68 ± 4,83	96,36 ± 3,29
Укупни кондензовани танини (mg GKE/g екстракта)	89,36 ± 13,08	255,94 ± 6,95	69,68 ± 4,83	96,36 ± 3,29
Укупне фенолне киселине (mg KKE/g екстракта)	77,00 ± 1,87	87,71 ± 0,63	3,91 ± 0,61	37,95 ± 2,99
Укупни антоцијани (mg Су-3-glc/g екстракта)	17,84 ± 0,28	14,16 ± 2,07	29,92 ± 2,75	15,40 ± 0,76
Укупни мономерни антоцијани (mg Су-3-glc/g екстракта)	2,26 ± 0,37	н.д.	17,83 ± 2,27	10,20 ± 0,71

Резултати представљају средњу вредност три независна мерења ± стандардна девијација; н.д., није детектован

Приказани резултати сугеришу да су екстракти биљке *L. salicaria* богатији у садржају укупних фенолних једињења у поређењу са екстрактима биљке *S. pratensis*. Поређењем укупног садржаја фенолних једињења надземног дела и корена *L. salicaria* уочава се да LSR екстракт поседује знатно већи садржај фенолних једињења (326,36 mg GKE/g) у односу на LSA екстракт (201,50 mg GKE/g). Такође, LSR екстракт је био богатији у садржају кондензованих танина (255,94 mg GKE/g) и фенолних киселина (87,71 mg KKE/g), док су у LSA екстракту заступљенији флавоноиди (43,36 mg KVE/g), флавоноли (9,14 mg RUE/g), као и укупни (17,84 mg Су-3-glc/g) и мономерни антоцијани (2,26 mg Су-3-glc/g). Према добијеним резултатима, кондензовани танини и флавоноли представљају главну класу фенолних једињења у LSA и LSR екстрактима са највишим концентрацијама у поређењу са осталим класама фенолних једињења. [76].

Анализирани екстракти биљке *S. pratensis*, као и код екстраката *L. salicaria*, имали су висок садржај фенолних једињења (**Табела 6**) са знатно већом количином укупних фенолних једињења у екстракту корена него у надземном делу. Екстракт корена је као и

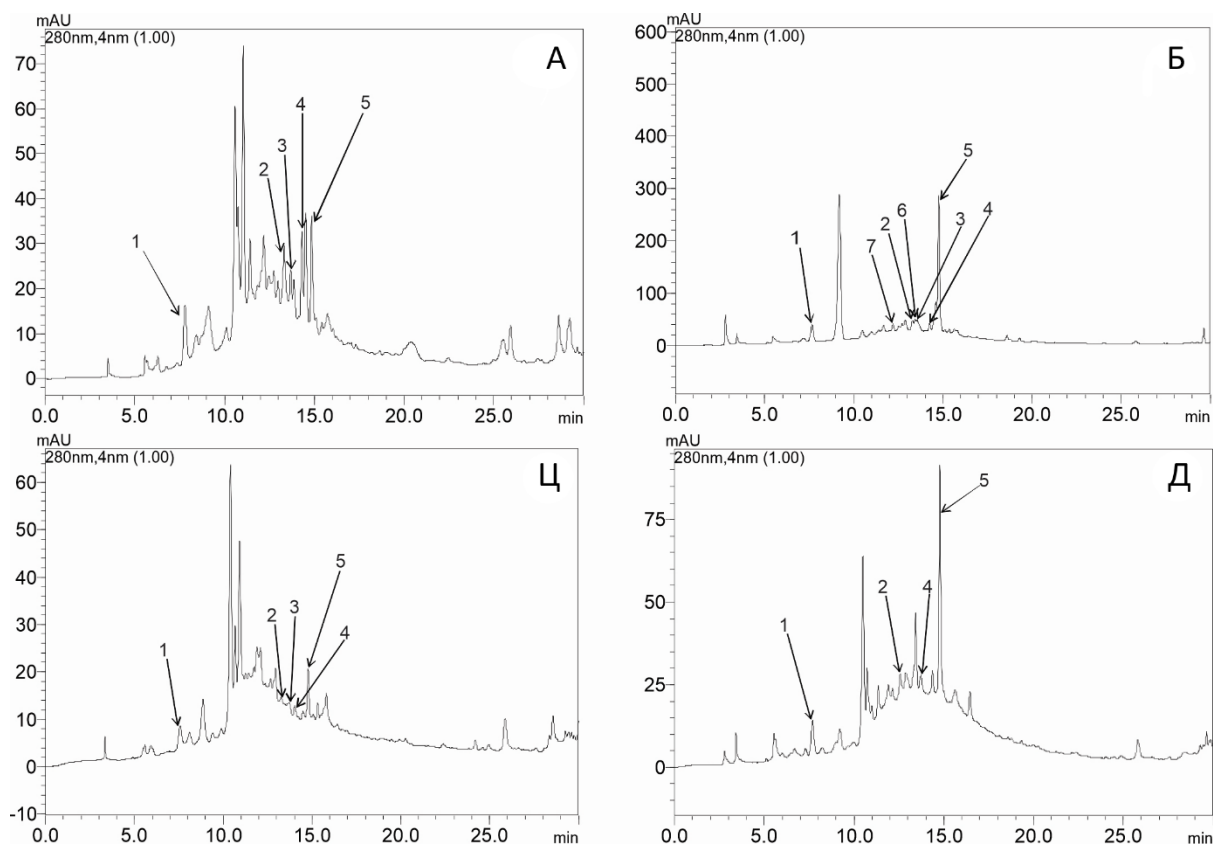
код биљке *L. salicaria* био посебно богат кондензованим танинима (96,36 mg GKE/g) и фенолним киселинама (37,95 mg KKE/g) у поређењу са екстрактом надземног дела у ком су преовладавали флавоноиди (68,46 mg KVE/g), флавоноли (1,59 mg RUE/g), укупни (29,92 mg Су-3-glc/g) и мономерни антоцијани (17,83 mg Су-3-glc/g). Генерално, у екстрактима надземних делова обе биљне врсте заступљенији су флавоноиди, флавоноли и антоцијани, док су у екстрактима корена присутнији кондензовани танини и фенолне киселине [80].

Добијени резултати подржавају претходно објављене резултате истраживања, који идентификују *L. salicaria* као биљку богату танинима и то око 5% изражео у еквивалентима пирогалола [229]. Према истраживању које су спровели Tunalier и сар., садржај укупних фенолних једињења (191,35 mg GKE/g) у метанолском екстракту надземног дела *L. salicaria* из западног дела Турске био је нешто нижи у поређењу са резултатима добијеним у овом истраживању, док је садржај флавонола био знатно виши (18,56 mg RUE/g екстракта) [230]. Према нашим сазнањима, не постоје доступни литературни подаци о фенолном садржају корена *L. salicaria*. Иако се надземни део ове биљке најчешће користи у народној медицини [231,232], ови резултати су показали да је екстракт корена знатно богатији садржајем укупних фенолних једињења, посебно танина.

Досадашња испитивања биљке *S. pratensis* потврдила су висок садржај фенолних једињења, што представља једну од карактеристика биљака рода *Salvia*. Метанолски екстракти листова и цветова *S. pratensis* са подручја Бугарске били су нешто богатији укупним фенолима [233] у поређењу са SPA екстрактом у овој студији. Како наводе Katanić Stanković и сар., надземни део врсте *Salvia verticillata* L., поседовао је већу количину укупних фенолних једињења у поређењу са резултатима добијеним за SPA, док је њихов садржај био упоредив са садржајем у SPR [67]. Међутим, примећено је да SPR поседује већи укупни садржај фенола (177,85 mg GKE/g) него екстракти корена неких других испитиваних врста жалфија као што је *Salvia fruticosa* Mill. са укупним садржајем фенола од 80 mg GKE/g екстракта [234] и *Salvia viridis* L. са 102,03 mg GKE/g екстракта [235].

4.1.2. Фенолни профил екстракта

Квалитативне и квантитативне анализе фенолних једињења у метанолским екстрактима надземног дела и корена биљке *L. salicaria* изведене су коришћењем HPLC-PDA система. Линеарни опсег, LOD и LOQ коришћене HPLC методе су приказани у **Табели 1П** (прилог). HPLC анализи су такође подвргнути и хидролизован метанолски екстракти како би се идентификовали и агликони флавоноидних гликозида и друге групе фенолних једињења у гликозидној форми. Хидролизом екстракта долази до ослобађања потенцијално везаних фенолних киселина и флавоноида са угљеним хидратима и другим фенолним једињењима. Одабрани HPLC-PDA хроматограми на 280 nm LSA и LSR екстракта пре и после хидролизе приказани су на **Слици 44**. HPLC анализе су показале присуство две фенолне киселине (гална и елагинска киселина) и три С-глукофлавона (изоориентин, ориентин и витексин) у оба екстракта (**Слика 44 А и Ц**). Међутим, концентрације идентификованих једињења у LSR екстракту биле су много ниже него у LSA екстракту.



Слика 44. HPLC-PDA хроматограми метанолских екстраката LSA (А, Б) и LSR (Ц, Д) пре и после хидролизе снимљени на 280 nm. Идентификовани пикови: 1 - гална киселина; 2 - изоориентин; 3 – ориентин; 4 – витексин; 5 – елагинска киселина, 6 – кафеинска киселина; 7 – хлорогенска киселина [76].

Квантитативне анализе екстраката (**Табела 7**) су показале да је витексин присутан у LSA у највишој концентрацији (3,93 mg/g сувог екстракта) у односу на остала идентификована фенолна једињења. Следеће једињење по заступљености била је елагинска киселина (2,63 mg/g сувог екстракта). Гална и елагинска киселина су такође пронађене у LSR екстракту, али у мањој количини (1,27 и 1,15 mg/g сувог екстракта, респективно) у поређењу са LSA екстрактом. Након хидролизе LSA екстраката идентификоване су кафеинска и хлорогенска киселина које су се највероватније налазиле у облику својих деривата, гликозида или су биле везане за нека друга једињења. Идентична фенолна једињења идентификована су у LSR екстракту пре и после хидролизе, осим ориентина. Садржај елагинске киселине у екстрактима значајно се повећао након киселе хидролизе, што указује на високо присуство њених деривата у оба екстракта. Такође се може уочити и да је концентрација галне киселине повећана у оба екстракта након хидролизе. За разлику од елагинске и галне киселине чије су се концентрације повећавале, хидролизом се смањио садржај витексина у LSA екстракту (**Табела 7**) [76].

Табела 7. Резултати квантитативне анализе фенолних једињења у метанолским екстрактима *L. salicaria* надземног дела (LSA) и корена (LSR) пре и после хидролизе [76].

Назив једињења ^а	Метанолски екстракти (mg/g сувог екстракта)		Хидролизоване екстракти (mg/g сувог екстракта)	
	LSA	LSR	LSA	LSR
Гална киселина	2,10 ± 0,06	0,95 ± 0,02	4,36 ± 0,96	1,44 ± 0,02
Елагинска киселина	2,63 ± 0,11	1,15 ± 0,04	31,12 ± 0,10	9,00 ± 0,13
Кафеинска киселина	н.д.	н.д.	1,89 ± 0,03	н.д.
Хлорогенска киселина	н.д.	н.д.	3,84 ± 0,08	н.д.
Ориентин	1,68 ± 0,06	< LOQ	2,39 ± 0,04	н.д.
Изоориентин	1,84 ± 0,02	< LOQ	2,97 ± 0,04	< LOQ
Витексин	3,93 ± 0,06	< LOQ	2,88 ± 0,03	< LOQ

(а) Једињења су идентификована поређењем ретенционих времена пикова из екстраката са пиковима стандардних једињења; н.д., није детектовано; LOQ, лимит квантификације (*limits of quantification*, енг.)

Добијени резултати су у сагласности са раније објављеним истраживањима, која су показала да су елагинска киселина и флавоноид С-гликозиди (витексин, ориентин и изоориентин) главна фенолна једињења у надземним деловима биљке *L. salicaria* [87,230,232]. Ориентин, изоориентин и витексин, као карактеристични флавоноиди за ову биљну врсту, идентификовани су у високим концентрацијама у екстракту надземног дела, што се поклапа са резултатима које су објавили *Rauha* и сар. [87]. *Piwowarski* и *Kiss* су успешно идентификовали елагитанине вескалагин и педункулагин у надземном делу *L. salicaria* [236]. С обзиром да ова једињења имају елагинску киселину у својој структури, повећање њене концентрације након хидролизе заправо може да буде резултат хидролизе ових танина.

UHPLC-MS⁴ орбитрап анализа коришћена је за идентификацију фенолних једињења у SPA и SPR екстрактима. На основу MS², MS³ и MS⁴ фрагментације молекула и маса депротонисаних молекула [М-Н]⁺, детектовано је укупно 67 фенолних једињења која су приказана у **Табели 8**. У екстракту SPR детектовано је 40 фенолних киселина и њихових деривата, док је у SPA екстракту идентификовано њих 36. Поред тога у SPA је пронађено 21 флавоноида и њихових деривата, док присуство флавоноида у SPR није потврђено овом методом. Одговарајући хроматограми екстракта SPA и SPR представљени су на **Слици 1П** (прилог) [80].

Табела 8. Резултати квалитативне анализе присутних фенолних једињења у екстрактима SPA и SPR помоћу UHPLC–MS⁴ орбитрап метаболички отисак прста (режим негативне јонизације), коришћењем четири дијагностичка MS⁴ фрагмента [80].

Број	Назив једињења	Ретенционо време, мин	Молекулска формула, [M–H] [–]	Израчуната маса, [M–H] [–]	Тачна маса, [M–H] [–]	Δ mDa	MS ² фрагменти, (% базног пика)	MS ³ фрагменти, (% Base Peak)	MS ⁴ фрагменти, (% базног пика)	Присуство	
										SPA	SPR
Фенолне киселине											
1	Дихидроксibenзоил хексозид 1	2.25	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ [–]	315.07216	315.06927	2.88	108(7), 109(12), 151(7), 152(43), 153(100), 163(7), 165(11)	109(100)	81(100)	-	+
2	Гална киселина	3.86	C ₇ H ₅ O ₅ [–]	169.01425	169.01237	1.88	69(10), 84(4), 123(17), 124(11), 125(100), 126(12), 150(4)	71(14), 79(30), 81(100), 83(51), 97(78), 98(16), 107(15)	ND	+	-
3	Галоил хексозид	4.90	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀ [–]	331.06707	331.06390	3.17	125(30), 150(10), 167(18), 168(98), 169(37), 313(100), 314(17)	125(76), 137(22), 150(54), 151(100), 165(22), 193(58)	95(35), 107(47), 123(100), 141(3)	-	+
4	Даншенсу хексозид	5.57	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀ [–]	359.09837	359.09482	3.55	135(3), 179(14), 197(100), 198(6)	73(17), 153(3), 179(100)	107(3), 135(100)	+	+
5	Ванилинска киселина	5.72	C ₈ H ₇ O ₄ [–]	167.03498	167.03321	1.77	69(14), 121(3), 123(100), 124(6), 137(3), 139(7), 149(6)	77(34), 79(42), 81(18), 93(8), 95(100), 105(23), 108(9)	ND	+	+
6	Дихидроксibenзоил хексозид 2	5.77	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ [–]	315.07216	315.06960	2.56	109(11), 152(11), 153(100), 154(6), 285(20), 287(5), 298(4)	109(100)	65(46), 81(100)	+	+
7	3,4-дихидроксифенетил алкохол 4-О-хексозид	5.88	C ₁₄ H ₁₉ O ₈ [–]	315.10854	315.10434	4.20	123(5), 153(100)	123(100)	77(22), 79(5), 81(14), 93(13), 95(100), 105(37), 108(13)	+	+
8	Декафеоилвербаскозид	6.13	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂ [–]	461.16645	461.16094	5.51	135(67), 153(96), 161(20), 167(30), 297(19), 315(100), 413(25)	101(5), 113(4), 119(4), 131(4), 135(100), 153(11)	ND	+	+
9	Протокатехинска киселина	6.16	C ₇ H ₅ O ₄ [–]	153.01933	153.01826	1.07	108(3), 109(100), 123(27), 154(16)	80(13), 81(100), 82(12)	ND	+	+
10	Кафеоил дихексозид 1	6.17	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₄ [–]	503.14063	503.13667	3.96	161(100), 179(50), 221(12), 251(21), 281(32), 323(12), 341(13)	133(100)	ND	+	+
11	Хидроксibenзоил хексозид	6.18	C ₁₃ H ₁₅ O ₈ [–]	299.07724	299.07450	2.74	137(100), 138(7)	65(6), 70(18), 81(11), 92(14), 93(100), 108(18), 109(80)	ND	+	+
12	Кафеоил дихексозид 2	6.51	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₄ [–]	503.14063	503.13805	2.58	161(29), 179(57), 221(32), 251(59), 281(100), 323(54), 341(56)	135(7), 179(100), 221(31)	135(100)	+	+
13	Кафеоил хексозид 1	6.63	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ [–]	341.08781	341.08478	3.02	135(7), 179(100), 180(8), 181(21), 221(3), 251(9), 281(13)	135(100)	ND	+	+
14	Синапил алдехид	6.94	C ₁₁ H ₁₁ O ₄ [–]	207.06628	207.06434	1.94	115(9), 143(5), 159(6), 161(21), 163(5), 192(100), 193(12)	177(100)	77(11), 105(4), 121(20), 149(100)	+	+
15	Кафеоил треонична киселина 1	7.05	C ₁₃ H ₁₃ O ₈ [–]	297.06159	297.05923	2.36	135(100), 179(23)	59(4), 71(5), 75(100), 89(77), 117(95)	ND	+	+
16	p-Хидроксibenзоева киселина	7.13	C ₇ H ₅ O ₃ [–]	137.02442	137.02354	0.88	92(30), 93(100), 108(27), 109(94), 137(42)	66(100), 182(78)	ND	+	+
17	Гентизинска киселина	7.27	C ₇ H ₅ O ₄ [–]	153.01933	153.01821	1.12	107(8), 108(8), 109(100), 110(4), 123(5), 125(5)	65(68), 66(6), 67(14), 81(100), 83(35), 91(8), 123(10)	ND	+	+
18	Кафеоил глицерол	7.35	C ₁₂ H ₁₃ O ₆ [–]	253.07176	253.07058	1.18	135(100), 136(7), 161(55), 162(4), 179(38), 180(3)	79(7), 107(100), 117(19), 135(56)	ND	+	+
19	Кафеинска киселина	7.53	C ₉ H ₇ O ₄ [–]	179.03498	179.03360	1.38	135(100)	75(8), 79(18), 91(21), 93(11), 107(100), 117(15), 135(30)	ND	+	+
20	Кафеоил треонична киселина 2	7.60	C ₁₃ H ₁₃ O ₈ [–]	297.06159	297.05982	1.77	135(100), 163(3), 179(21)	59(5), 73(3), 75(98), 89(100), 117(88)	59(100)	+	-
21	Салвианична киселина Ц	7.60	C ₁₈ H ₁₇ O ₉ [–]	377.08781	377.08439	3.41	197(3), 273(22), 289(5), 317(7), 359(100), 360(7)	133(5), 161(100), 179(21), 197(22), 223(8)	133(100)	+	-
22	Ферулна киселина	7.61	C ₁₀ H ₉ O ₄ [–]	193.05063	193.04922	1.41	111(37), 134(100), 135(9), 147(15), 149(34), 173(5), 178(4)	106(100), 107(11), 134(14)	ND	+	+

Табела 8. Наставак

23	Кафеоил хексозид 2	7.76	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341.08781	341.08509	2.71	179(100), 180(9), 193(5), 195(6), 223(7), 295(7), 323(3)	75(17), 81(9), 87(5), 99(31), 135(16), 143 (100), 161(45)	71(14), 81 (100), 99(29), 125(22)	+	-
24	Вербаскозид	8.04	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅ ⁻	623.19814	623.19496	3.18	461 (100), 462(15)	134(3), 135(57), 143(7), 161(13), 297(14), 315 (100)	113(4), 119(13), 125(5), 131(3), 135 (100), 143(5)	-	+
25	Јунанеична киселина Ф	8.09	C ₂₉ H ₂₅ O ₁₄ ⁻	597.12498	597.12358	1.40	197(18), 267(21), 311 (100), 312(15), 329(39), 355(10), 491(20)	249(4), 251(19), 252(3), 265(7), 267 (100), 268(7), 269(3)	223(38), 224(21), 239(52), 246(22), 249(78), 250(62), 252 (100)	+	+
26	Салвиафласид	8.17	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₃ ⁻	521.13007	521.12553	4.54	161(3), 323(3) 359 (100), 360(8)	133(5), 135(3), 161 (100), 179(21), 197(31), 223(7)	133 (100)	+	+
27	Кафеоил хексозид 3	8.25	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341.08781	341.08382	3.98	135(9), 145(4), 179 (100), 180(8), 295(9), 296(3), 297(5)	135 (100)	107 (100)	-	+
28	Вербаскозид изомер	8.32	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅ ⁻	623.19814	623.19588	2.26	461 (100), 462(20)	135(58), 136(3), 143(5), 161(10), 297(19), 315 (100), 316(3)	101(3), 119(3), 135 (100), 136(5)	-	+
29	Ферулоил треонична киселина	8.37	C ₁₄ H ₁₅ O ₈ ⁻	311.07724	311.07473	2.51	135(3), 193 (100)	134 (100), 149(18)	106 (100), 134(7)	+	-
30	Кафеоил-дихидроксibenзоил хексозид	8.49	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂ ⁻	477.10385	477.10018	3.67	153(4), 161(4), 315 (100), 316(11), 323(8), 433(21), 434(4)	108(10), 109(12), 152(44), 153 (100), 163(10), 165(13), 225(8)	109 (100)	+	+
31	Литоспермична киселина	8.67	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₂ ⁻	537.10385	537.10003	3.82	355(15), 359 (100), 360(15), 373(30), 491(14), 519(14), 519(29)	161(12), 179(17), 197 (100)	73(19), 153(4), 179 (100)	-	+
32	Рузмаринска киселина	9.02	C ₁₈ H ₁₅ O ₈ ⁻	359.07724	359.07323	4.01	133(3), 161 (100), 162(5), 179(13), 197(12), 223(5)	133 (100)	77(100), 105(46)	+	+
33	Даншенсу	9.04	C ₉ H ₉ O ₅ ⁻	197.04555	197.04394	1.61	73(19), 123(9), 151(48), 153(11), 167(7), 179 (100), 180(19)	91(3), 107(3), 135 (100)	107 (100)	+	+
34	Салвианолична киселина Ц 1	9.65	C ₂₆ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	491.09837	491.09361	4.76	295(3), 311 (100), 312(11)	267 (100), 268(7)	197(21), 211(23), 221(17), 239 (100), 249(46), 267(35)	-	+
35	Сејкумарин	9.70	C ₂₇ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	535.08820	535.08391	4.29	161(15), 177(13), 179(14), 311(16), 329 (100), 330(13), 491(48)	283(4), 311 (100), 312(6)	133(17), 147(16), 221(7), 239(43), 249(36), 267(27), 283 (100)	+	-
36	Салвианолична киселина Ц 2	9.79	C ₂₆ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	491.09837	491.09468	3.70	161(5), 179(3), 311(8), 313(3), 357(5), 359 (100)	133(5), 161 (100), 179(20), 197(23), 223(7)	133 (100)	-	+
37	Клиндополинска киселина А	9.82	C ₁₈ H ₁₅ O ₇ ⁻	343.08233	343.07916	3.17	135(15), 145(14), 161 (100), 162(10), 179(26), 197(14), 325(11)	133 (100)	77(100), 105(98)	+	+
38	Салвианолична киселина А	9.96	C ₂₆ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	493.11402	493.10963	4.39	359 (100), 360(4)	133(3), 161 (100), 179(12), 197(13), 223(5)	133 (100)	+	-
39	Јунанеична киселина Е	10.18	C ₂₆ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	509.10894	509.10602	2.91	179(11), 311(31), 313(13), 329(34), 359 (100), 447(53), 491(9)	133(5), 161 (100), 179(19), 197(22), 223(7)	133 (100)	+	+
40	Салвианолична киселина Ф 1	10.24	C ₁₇ H ₁₃ O ₆ ⁻	313.07176	313.06905	2.71	161 (100), 178(21), 267(74), 268(17), 283(26), 297(20), 300(23)	133 (100)	79(100)	-	+
41	Метил литоспермат 1	10.39	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	551.11950	551.11596	3.54	161(11), 357(32), 358(11), 359(70), 360(13), 519 (100), 520(30)	161(3), 339 (100)	133(8), 161 (100), 177(15), 179(7), 295(3), 311(3)	+	+
42	Метил рузмаринат	10.61	C ₁₉ H ₁₇ O ₈ ⁻	373.09289	373.08972	3.17	135(40), 179 (100), 180(3), 287(3), 313(30), 331(6), 331(28)	135 (100)	106(57), 107 (100), 135(17)	+	+
43	Салвианолична киселина Ф 2	11.09	C ₁₇ H ₁₃ O ₆ ⁻	313.07176	313.06870	3.06	161 (100), 162(4)	133 (100)	89(7), 105 (100), 107(20), 133(5), 140(8)	+	+
44	Метил литоспермат 2	11.16	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	551.11950	551.11763	1.87	359(33), 389 (100), 390(13), 461(6), 505(11), 519(29), 520(6)	123(15), 151 (100), 179(10), 109(3), 195(4), 197(62), 357(32)	79(3), 81(4), 107(9), 108(3), 109(3), 123 (100), 133(4)	+	+
45	Салвианолична киселина Ц 3	11.23	C ₂₆ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	491.09837	491.09555	2.82	179(14), 267(21), 293(11), 311 (100), 312(10), 329(19), 447(11)	174(4), 202(4), 223(4), 249(3), 267(42), 283 (100), 293(20)	173(40), 174 (100), 239(30), 255(14), 255(79), 265(13), 268(20)	-	+
46	Салпалестенин	11.47	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	553.13515	553.13407	1.08	177(43), 341(29), 343(53), 373(87), 477 (100), 489(31), 521(56)	267(25), 311(41), 312(16), 313(54), 343 (100), 433(16), 459(35)	133(12), 135(23), 177(24), 178(9), 179 (100), 267(22), 311(10)	+	+

Табела 8. Наставак

Flavonoids											
47	Лутеолин 7-О-глюкозид	7.85	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447.09329	447.09024	3.04	285(100), 286(8)	151(27), 175(73), 199(69), 213(24), 217(62), 241(100), 243(49)	185(16), 197(99), 198(87), 199(100), 213(25), 213(47), 226(25)	+	-
48	Кверцетин 3-О-(6"-рамнозил) глюкозид (Рутин)	7.95	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609.14611	609.14498	1.13	255(4), 271(8), 299(3), 300(42), 301(100), 302(12), 343(6)	151(82), 179(100), 255(8), 257(13), 271(9), 272(14), 273(17)	151(100)	+	-
49	Лутеолин 7-О-(6"-пентосил) хексозид	8.05	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅ ⁻	579.13554	579.13412	1.42	285(100), 286(8)	151(41), 175(93), 199(88), 213(26), 217(74), 241(100), 243(68)	185(16), 196(15), 197(63), 198(100), 199(60), 213(56), 226(15)	+	-
50	Кверцетин 3-О-глюкозид	8.21	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463.08820	463.08444	3.76	299(3), 300(18), 301(100), 302(5)	107(5), 151(79), 179(100), 229(5), 257(11), 273(15), 283(5)	151(100)	+	-
51	Лутеолин 7-О-ацетил хексозид 1	8.28	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂ ⁻	489.10385	489.09944	4.41	285(100), 286(11), 323(10), 327(4)	149(25), 175(60), 197(24), 199(49), 217(41), 241(100), 243(61)	173(21), 185(80), 197(77), 198(100), 199(47), 213(75), 214(31)	+	-
52	Лутеолин 7-О-хексуронид	8.37	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂ ⁻	461.07255	461.06739	5.16	285(100), 286(8), 299(4), 301(11), 323(7), 341(3), 357(5)	151(36), 175(82), 199(88), 201(26), 217(62), 241(100), 243(66)	179(9), 197(87), 198(79), 199(32), 213(100), 223(22), 241(10)	+	-
53	Лутеолин 7-О-хексозид изомер	8.39	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447.09329	447.08982	3.47	281(20), 285(100), 286(11)	151(49), 175(96), 199(100), 201(31), 217(73), 241(91), 243(61)	143(18), 153(5), 155(19), 157(5), 171(100), 181(5), 182(10)	+	-
54	Кверцетин 3-О-ацетил хексозид	8.42	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃ ⁻	505.09876	505.09465	4.11	179(3), 300(57), 301(100), 302(8), 343(3), 445(3), 463(20)	151(86), 179(100), 255(22), 271(34), 272(12), 273(17), 283(14)	151(100)	+	-
55	Лутеолин 7-О-[6"-(3-хидрокси-3-метилглутарил) хексозид	8.79	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₅ ⁻	591.13554	591.13064	4.90	447(100), 448(18), 489(76), 490(14), 529(40), 530(10)	285(100), 286(4)	151(43), 175(100), 199(92), 201(30), 217(82), 241(95), 243(65)	+	-
56	Лутеолин 7-О-ацетил хексозид 2	8.81	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂ ⁻	489.10385	489.10048	3.37	285(100), 286(7)	151(42), 175(98), 199(92), 217(74), 241(100), 243(64), 257(27)	185(14), 197(100), 198(80), 199(82), 212(8), 213(53), 226(14)	+	-
57	Апигенин 7-О-хексуронид	8.96	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁ ⁻	445.07763	445.07313	4.50	175(11), 269(100), 270(15), 285(24)	149(44), 151(28), 183(20), 201(39), 225(100), 227(26), 269(25)	168(15), 169(19), 181(100), 183(11), 196(18), 197(29), 210(35)	+	-
58	Генкванин	9.85	C ₁₆ H ₁₁ O ₅ ⁻	283.06120	283.05956	1.64	197(5), 211(5), 237(4), 239(32), 241(100), 242(7), 255(12)	197(100), 198(8)	141(100), 151(48), 153(24), 169(20), 179(33), 180(30), 197(13)	+	-
59	Лутеолин	10.40	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	285.04046	285.03843	2.03	151(39), 175(91), 199(79), 217(65), 241(100), 243(62), 285(56)	185(12), 197(100), 198(82), 199(70), 213(44), 214(8), 226(14)	151(5), 165(10), 169(100), 179(7), 182(7), 197(14), 329(3)	+	-
60	Апигенин	11.30	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269.04555	269.04395	1.60	149(48), 151(25), 201(27), 225(100), 227(18), 269(35), 270(30)	157(9), 169(23), 180(27), 181(100), 183(51), 196(24), 197(48)	122(18), 141(100), 152(5), 153(20), 166(7), 180(8), 181(12)	+	-
61	Лутеолин 7-О-(6"-р-кумароил) ацетилхексозид	11.40	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₄ ⁻	635.14063	635.13686	3.77	285(100), 286(19), 489(19), 490(6), 575(20), 576(8), 577(3)	151(45), 175(74), 199(100), 213(39), 217(80), 241(99), 243(62)	143(33), 171(100), 181(12)	+	-
62	Хризоеориол	11.55	C ₁₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	299.05611	299.05356	2.55	284(100), 285(4)	256(100), 284(7)	188(29), 200(18), 211(26), 212(19), 214(13), 227(100), 228(35)	+	-
63	Хризин	12.31	C ₁₅ H ₉ O ₄ ⁻	253.05063	253.04870	1.93	157(9), 181(100), 182(16), 209(22), 225(9), 253(27)	153(100), 155(11)	122(36), 127(100), 134(37), 171(46), 238(14)	+	-
64	Хиспидулин	12.50	C ₁₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	299.05611	299.05332	2.79	284(100), 285(9)	211(6), 227(7), 255(7), 256(75), 257(8), 284(100), 285(23)	183(25), 188(27), 200(37), 212(49), 227(100), 228(49), 239(31)	+	-

Табела 8. Наставак											
65	Циризмаритин	12.73	C ₁₇ H ₁₃ O ₆ ⁻	313.07176	313.06819	3.57	283(5), 298 (100), 299(10)	225(3), 269(30), 270(5), 283 (100)	163(8), 211(5), 227(12), 239(6), 255 (100)	+	-
66	Еупаторин	13.11	C ₁₈ H ₁₅ O ₇ ⁻	343.08233	343.07865	3.68	313(6), 328 (100), 329(13)	282(15), 299(7), 309(15), 310(4), 312(3), 313 (100)	285 (100)	+	-
67	Апацетин	13.66	C ₁₆ H ₁₁ O ₅ ⁻	283.06120	283.05923	1.96	268 (100), 269(11)	172(5), 200(5), 212(5), 239(19), 240(45), 268 (100), 269(24)	172(46), 196(93), 210(21), 211 (100), 212(45), 240(26)	+	-

Рузмаринска и кафеинска киселина су идентификоване као главна полифенолна једињења у SPA и SPR екстрактима. Такође, у екстрактима су идентификовани деривати кафеинске киселине и то њени мономери (кафеоил и даншенсу изомери, и ферулна киселина), димер (метил розмаринат), тримери (литоспермична киселина, сејцкумарин, салвианоличне киселине А и Ц, и јунанеичне киселине Е и Ф), и тетрамер (салвианолична киселина Б). Поред бројних фенолних киселина и њихових деривата, многи флавоноиди, флаваноли и њихови гликозиди су успешно идентификовани само у SPA екстракту UHPLC-MS⁴ орбитрап методом. У екстракту корена ова једињења нису идентификована [80].

У екстракту надземног дела *S. pratensis* одређен је садржај 20 фенолних једињења док је у екстракту корена квантификовано њих 18 помоћу UHPLC-DAD/(-)HESI-MS/MS анализе. Добијени резултати представљају прву квантификацију полифенолних једињења у екстрактима корена *S. pratensis*. Резултати квантификације фенолних једињења у екстрактима *S. pratensis* приказани су у **Табели 9**. У SPA екстракту, доминантна једињења су била рузмаринска (8,42 mg/g), кафеинска (0,368 mg/g) и *p*-хидроксибензоева киселина (0,175 mg/g), док се од квантификованих флавоноида лутеолин (0,150 mg/g) налази у највишој концентрацији. Насупрот томе, нивои рузмаринске и кафеинске киселине у SPR екстракту (11,06 и 0,509 mg/g, респективно) били су виши него у SPA екстракту. Такође, SPR екстракт је био богатији у садржају салвианоличне киселине А (0,519 mg/g) и салвианоличне киселине В (0,292 mg/g) у односу на SPA екстракт [80].

Табела 9. Резултати квантитативне анализе фенолних једињења присутним у метанолним екстрактима надземног дела (SPA) и корена (SPR) биљке *S. pratensis* применом троструког квадруполног масеног анализатора [80].

Број	Назив једињења	SPA (mg/g)	SPR (mg/g)
1	Хининска киселина	0,039	0,036
2	Протокатехинска киселина	0,046	0,037
3	<i>p</i> -Хидроксибензоева киселина	0,175	0,150
4	5-О-Кафеоилхининска киселина	0,028	0,010
5	Гентизинска киселина	0,037	0,021
6	Кафеинска киселина	0,368	0,509
7	Рутин	0,027	0,003
8	Кверцетин 3-О-глукозид	0,067	0,002
9	Ферулна киселина	н.д.	0,036
10	Нарингин	0,028	н.д.
11	Кампферол 3-О-глукозид	0,028	0,007
12	Рузмаринска киселина	8,42	11,06
13	Салвианолична киселина Б	0,014	0,292
14	Салвианолична киселина А	0,057	0,519
15	Ериодиктол	0,007	н.д.
16	Лутеолин	0,150	0,009
17	Апигенин	0,069	0,007
18	Нарингенин	0,005	н.д.
19	Хиспидулин	0,007	0,004
20	Циризмаритин	0,043	0,005
21	Кампферид	0,005	0,005

н.д., није детектовано

Од свих квантификованих флавоноида у SPA екстракту као најзаступљенија се издвајају лутеолин, апигенин, кверцетин-3-О-глукозид и цирсимаритин, док су у SPR екстракту поменути флавоноиди детектовани у веома ниским концентрацијама. Међу квантификованим флавоноидима, лутеолин и апигенин су пронађени у највишим концентрацијама у оба екстракта. У екстракту корена није потврђено присуство нарингенина и нарингина, док је њихово присуство у надземном делу забележено само у траговима.

Присуство кафеинске и рузмаринске киселине претходно су потврдили Šulniūtė и сар. у етанолском екстракту надземног дела *S. pratensis* [237]. Недавно спроведено истраживање 27 врсти иранских дивљих жалфија које су објавили Fotovvat и сар., показало је да надземни делови већине врста жалфија садрже више концентрације фенолних киселина (рузмаринска, салвианоличне киселине А и Б, карнозинска и кафеинска киселина) у поређењу са одговарајућим екстрактима корена, док су резултати добијени за SPA и SPR екстракте показали супротан тренд. Салвианоличне киселине, посебно салвианолична киселина А и Б које су присутне у SPA и SPR екстрактима, поседују снажан антиоксидативни потенцијал и одличне кардиопротективне активности [238]. Екстракт надземног дела *S. pratensis* садржао је мање кафеинске и рузмаринске киселине у поређењу са етанолским екстрактом надземног дела *S. pratensis* и екстрактима других врста жалфија из Литваније [237]. Такође, SPA екстракт је био сиромашнији у садржају ових киселина и од хидрометанолског екстракта *Salvia cadmica* Bioss. култивисане у Пољској [116].

Многе раније објављене студије о фитохемијском саставу различитих врста *Salvia* потврдиле су присуство литоспермичне киселине у неким од њих. [68] Њено присуство успешно је потврђено и у екстракту корена *S. pratensis*. Клиндополична киселина А идентификована је у оба испитивана екстракта *S. pratensis* (SPA и SPR) и њено присуство такође је потврђено и код *Slavia palestina* Benth. од стране Al-Qudah и сар. [239]. На основу прегледане литературе, сејцкумарин (тример кафеинске киселине) је поред *S. officinalis* у којој је раније идентификован, [99] први пут у овом истраживању пронађен у некој другој врсти жалфије и то у оба SPA и SPR екстракта. Такође, детекција вербаскозида и његових деривата (де-кафеоил вербаскозид и вербаскозид изомер), једињења карактеристична за врсте рода *Verbascum* L.[240], први пут су откривена код *S. pratensis*. Од свих до сада испитиваних врста рода *Salvia*, вербаскозид је једино идентификован у биљци *S. veridis* [70].

Опште је познато да је садржај флавоноида доминантан у листовима биљака рода *Salvia*, док је њихов садржај у корену минималан и често ван границе детекције. Флавоноиди, флаваноли и њихови гликозиди су идентификовани и квантификовани претежно у SPA екстракту, што је у складу са раније објављеним истраживањима о хемијском саставу екстракта *S. cadmica* [116]. Од свих идентификованих флавоноида, лутеолин и његови деривати квантификовани су у SPA екстракту у највишој концентрацији. Лутеолин и апигенин су добро позната флавоноидна једињења која се налазе у надземним деловима различитих врста жалфија [99]. Šulniūtė и сар. детектовали су високу концентрацију лутеолин-7-О-β-D-глукуронида (2838 μg/g) у етанолском екстракту надземног дела *S. pratensis*. Квантификовани циримаритин био је предмет изучавања више различитих студија. Једно од њих спровели су Miski и сар. који су потврдили јаку антимикуробну активност циримаритина претходно изолованог из листа биљке *S. palaestine* [241].

4.1.3. Антиоксидативна активност испитиваних екстраката

С обзиром на потенцијал фитоједињења у превенцији оштећења узрокованих оксидативним стресом, коришћено је шест различитих *in vitro* антиоксидативних тестова за процену антиоксидативне активности екстраката надземних делова и корена биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*. Коришћени тестови су укључили методе за одређивање укупног антиоксидативног потенцијала, редуктивног капацитета, способности хелатизације јона метала, и три теста за одређивање способности неутрализације слободних радикала. Сва четири испитивана екстраката су показала значајан укупни антиоксидативни и редуктивни капацитет, као и активност неутрализације радикала у поређењу са стандардним (референтним) антиоксидантима у *in vitro* условима (**Табела 10**). Ефикасност екстраката или стандардних једињења у инхибицији слободних радикала ($\text{DPPH}^{\cdot}$ и $\text{ABTS}^{\cdot+}$), липидне пероксидације и способности хелатирања метала изражена је преко IC_{50} вредности, што указује на количину екстраката или стандардних једињења која је неопходна да би се ови процеси инхибирали за 50 %. Добијене IC_{50} вредности се често користе за поређење резултата у оквиру истог теста, између тестираних узорака и референтних једињења, као и између различитих тестова [242].

Прегледом добијених резултата, екстракт корена биљке *L. salicaria* испољио је најјачи антиоксидативни ефекат са најнижим IC_{50} вредностима код $\text{DPPH}^{\cdot}$ и $\text{ABTS}^{\cdot+}$ тестова (12,33 и 11,52 $\mu\text{g/mL}$, редом), док се IC_{50} вредност референтних антиоксиданта, галне киселине, аскорбинске киселине, ВНТ-а и тролокса, кретала између 1,33 и 18,79 $\mu\text{g/mL}$. Екстракт корена је показао нижу антиоксидативну активност од надземног дела једино у инхибицији липидне пероксидације. У живим организмима производи липидне пероксидације могу да изазову мутагенезу или оксидацију протеина нарушавајући тако ћелијску хомеостазу. Реакције липидне пероксидације сматрају се главним узрочником кварења хране у чији састав улазе масти, нарушавајући њена органолептичка својства, смањење њен нутритивне вредности и настанак нуспроизвода токсичних за потрошаче. Због тога инхибиција липидне пероксидације је од велике важности нарочито за прехранбену индустрију. Међутим, употреба синтетичких конзерванаса у ту сврху све више губи на популарности због све више доказа о њиховим негативним утицајима на људско здравље и животну средину. Данас је све више произвођача из различитих области који за потребе својих производних процеса трагају за природним суплементима који могу заменити дуго коришћене синтетичке конзервансе [243]. У суштини, испитивани екстракти обе биљне врсте су испољили нижи антиоксидативни потенцијал према инхибицији липидне пероксидације у поређењу са њиховим способностима уклањања слободних радикала. Референтни стандард ВНТ је показао многоструко пута већи степен инхибиције пероксидације липида (IC_{50} 15,02 $\mu\text{g/mL}$) у поређењу са свим испитиваним екстрактима. Сличан тренд у антиоксидативној активности примећен је и код екстраката биљке *S. pratensis*. Екстракт корена испољио је готово дупло већу активност у неутрализацији $\text{DPPH}^{\cdot}$ и $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (24,31 и 56,55 $\mu\text{g/mL}$, редом) у поређењу са екстрактом надземног дела, док је као и код екстраката биљке *L. salicaria*, екстракт надземног дела *S. pratensis* (395,73 $\mu\text{g/mL}$) показао за нијансу бољу инхибицију липидне пероксидације од екстракта корена. Ови резултати сугеришу да испитани екстракти, а нарочито екстракти корена, садрже већу количину поларних антиоксидативних једињења која нису у стању да се растворе у липидној фази, што доводи до ниске ефикасности у липидним системима. Као што се може видети у **Табели 10** екстракти биљке *L. salicaria* поседују значајно већи антиоксидативни потенцијал у поређењу са екстрактима *S. pratensis*, што се може довести у директну везу са садржајем фенолних једињења који је знатно већи у екстрактима *L. salicaria* [76,80].

С обзиром да полифенолна антиоксидативна једињења у биљним екстрактима поседују способност и да хелирају јоне прелазних метала, стабилизују их и инхибирају њихову прооксидативну активност, резултати процене способности екстракта да хелирају јоне прелазних метала могу бити од великог значаја. Међутим, тестирани екстракти нису успели да хелирају 50% слободних Fe^{2+} јоне у раствору ни при највећој примењеној концентрацији, за разлику од EDTA (IC_{50} 36,12 $\mu\text{g/mL}$), једињења познатог по добрим хелатизационим особинама. Екстракти су показали висок антиоксидативни потенцијал у редукцији Мо (VI) до (V) у фосфомолибденском тесту. Такође, екстракти су имали умерен потенцијал редукције оксиданаса, редукцијом Fe^{3+} у Fe^{2+} у комплексу ферицијанида. Фосфомолибденским тестом показано је да је LSR екстракт ефикаснији антиоксидант од тролокс-а (1255,29 mg тролокса/g екстракта), док је редуктивна активности LSA и LSR екстракта била 438,37 и 540,83 mg тролокса/g, редом. Екстракти биљке *S. pratensis* поседују скоро дупло мању способност редукције Мо (VI) до Мо (V) у односу на екстракте биљке *L. salicaria*. Ова метода је показала да 1 g SPR екстракта има исти укупни антиоксидативни капацитет као 614,80 mg тролокс-а, док је SPA екстракт показао нешто мањи укупни антиоксидативни потенцијал (447,70 mg тролокса/g екстракта). Интересантно је да су вредности добијене за редуктивни капацитет *S. pratensis* нису битније разликовале у односу на резултате добијене за екстракте биљке *L. salicaria* [76,80].

Претходна истраживања антиоксидативне активности биљке *L. salicaria* су такође показала сличан потенцијал екстракта надземног дела у инхибицији DPPH радикала [244]. У студији коју су спровели Tunalier и сар. показано је да водено-метанолски и водени екстракти *L. salicaria* поседују високу инхибиторну активност према DPPH радикалу (IC_{50} 0,1 mg/mL за оба типа екстракта), док су неполарнији екстракти, етил ацетатни и петрол етарски, имали много слабију активност према DPPH радикалу [230]. Неутрализација DPPH радикала од стране LSA и LSR екстракта у овом истраживању била је израженија у поређењу са резултатима ранијих студија [230,244]. Оба екстракта биљке *S. pratensis* показала су висок антиоксидативни потенцијал у поређењу са коришћеним референтним антиоксидантима. Њихов највећи антиоксидативни потенцијал се манифестовао у неутрализацији слободних радикала (DPPH $^{\cdot}$ и ABTS $^{\cdot+}$). Miliauskas и сар. су испитивањем антиоксидативне активности метанолског екстракта надземног дела *S. pratensis* дошли до резултата да екстракт у концентрацији од 2,5 mg/mL инхибира 93 % DPPH радикала [245]. Према Tzanovi и сар., екстракт цветова *S. pratensis* поседовао је већу активност неутрализације DPPH радикала (79,1 mmol Тролокс/kg суве масе) у поређењу са екстрактом листова (40,8 mmol Тролокса/kg суве масе). Међутим за разлику од претходна два истраживања, Lopez и сар. нису успели да детектују антиоксидативну активност метанолног екстракта листова *S. pratensis* применом DPPH методе [246].

Табела 10. Антиоксидативна активност испитиваних метанолских екстраката и стандардних једињења.

Екстракти и стандарди	IC ₅₀ вредности (µg/mL)				Укупна антиоксидативна активност (mg тролокса/g екстракта)	Редуктивни капацитет (mg тролокса/g екстракта)
	Инхибиција DPPH радикала	Инхибиција ABTS радикал катјона	Инхибиција липидне пероксидације	Капацитет хелатизације		
LSA	15,78 ± 1,00	23,49 ± 4,11	130,36 ± 10,59	>2000	1098,58 ± 42,71	438,37 ± 18,53
LSR	12,33 ± 1,33	11,52 ± 3,75	248,61 ± 18,67	>2000	1255,29 ± 30,49	540,83 ± 11,72
SPA	50,17 ± 2,98	90,65 ± 11,87	395,73 ± 2,66	>4000	447,70 ± 25,86	466,70 ± 10,80
SPR	24,31 ± 2,13	56,55 ± 4,91	435,27 ± 29,59	>4000	614,80 ± 42,43	529,83 ± 2,70
Гална киселина	1,33 ± 0,04	2,30 ± 1,03	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.
Рутин	н.т.	н.т.	н.т.	>1000	н.т.	н.т.
Аскорбинска киселина	8,17 ± 0,37	18,79 ± 0,29	> 100	н.т.	н.т.	н.т.
ВНТ	7,73 ± 0,04	6,14 ± 0,48	15,02 ± 0,83	н.т.	н.т.	н.т.
Тролокс	10,10 ± 0,49	1,45 ± 0,01	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.
EDTA	н.т.	н.т.	н.т.	36,12 ± 1,26	н.т.	н.т.

н.т., није тестирано; ВНТ, бутиловани хидрокситолуен; EDTA, етилендиаминтетрасирћетна киселина.

Тиоцијанатни тест је коришћен за процену антиоксидативног потенцијала испитиваних биљних екстраката и превенцију пероксидације линолне киселине. Ова метода може пружити корисне информације о способности биљних екстраката за конзервирање хране, као инхибитора процеса оксидације липида у храни. Међутим резултати добијени овом методом нису били обећавајући за њихову потенцијалну примену у прехранбеној индустрију. Антиоксидативни потенцијал свих екстраката добијен у систему емулзија типа уље у води није у коералацији са њиховим укупним фенолним садржајем (Табела 6), што сугерише да сва квантификована фенолна једињења немају могућност да делују као инхибитори пероксидације липида у емулзијама. Већи антиоксидативни потенцијал екстраката надземних делова биљка у овој методи може бити последица већег садржаја флавоноидних агликаона који су неполарног карактера и имају већу растворљивост у неполарном липидном слоју. Такође, екстракти нису показали могућност хелирања Fe^{2+} , који има важну улогу у стварању оксидативног стреса код аеробних организама. Према томе, Zhao и сар., етанолски екстракт *S. miltiorrhiza* Bunge такође није показао хелирајућа својства при највишој примењеној концентрацији (3,5 mg/mL), исто као и екстракт надземног дела *S. verticillata* [67,247]. Међутим, у другој студији, етил-ацетатни екстракти неколико врста *Salvia* показали су бољи капацитет хелације у односу на етанолне екстракте [248]. Ова сазнања указују на то да се екстракцијом неполарним растварачима могу добити екстракти са већом концентрацијом једињења која захваљујући својој структури могу ефикасније да хелирају јоне метала и неполарног су карактера, а такве карактеристике поседују флавоноиди.

Многе студије су потврдиле антиоксидативни потенцијал једињења идентификованих у екстрактима *L. salicaria* и *S. pratensis* [88,249,250]. Такође у оквиру ове докторске дисертације одеђена је антиоксидативна активност комерцијално доступних једињења која су идентификована и квантификована у екстрактима испитиваних биљака, и резултати су приказани у Табели 11.

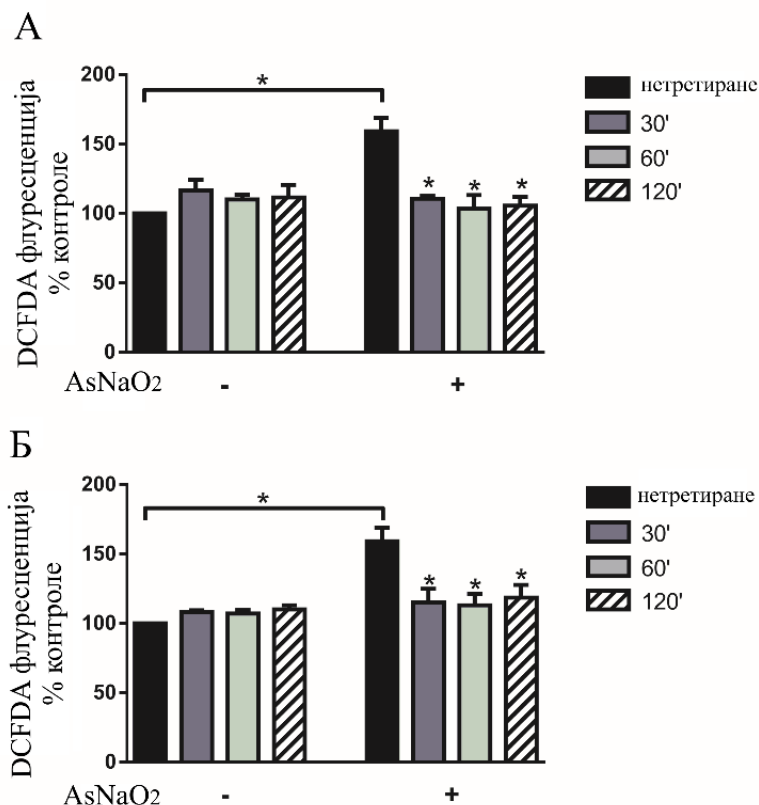
Табела 11. Антиоксидативна активност фенолних једињења идентификованих у екстрактима биљака *L. salicaria* и *S. pratensis* на нивоу DPPH радикала [76,80].

Назив једињења	IC ₅₀ (μg/mL)
Гална киселина	3,58 ± 0,28
Елагинска киселина	4,55 ± 0,25
Кафеинска киселина	7,85 ± 0,10
Рузмаринска киселина	2,60 ± 0,37
Хлорогенска киселина	19,53 ± 0,28
Ориентин	30,70 ± 0,04
Изоориентин	23,82 ± 0,04
Витексин	>100
Лутеолин	2,89 ± 0,01
Рутин	16,22 ± 2,73
Апигенин	>100
Нарингенин	>100

Рузмаринска киселина је показала највећу активност у неутрализацији DPPH радикала (IC₅₀ 3,58 μg/mL), затим лутеолин (IC₅₀ 2,89 μg/mL), гална (IC₅₀ 3,58 μg/mL) елагинска (IC₅₀ 4,55 μg/mL) и кафеинска киселина (IC₅₀ 7,85 μg/mL). Ориентин и изоориентин су поседовали ниже активности уклањања DPPH радикала од тестираних фенолних киселина, док је IC₅₀ вредност витексина била већа од 100 μg/mL, што је у

складу са раније објављеним резултатима од стране Zhu и сар. [251]. Постоји и неколико студија које су потврдиле добру антиоксидативну активност изоориентина и ориентина [252,253]. Поред различитих антиоксидативних механизма ових једињења, ориентин и изоориентин показују знатно већу антиоксидативну активност од витексина, што се може објаснити чињеницом да ориентин и изоориентин поседују једну хидроксилну групу више на Б-прстену [254]. Пошто је елагинска киселина идентификована у високој концентрацији у екстрактима *L. salicaria*, може се претпоставити да је елагинска киселина заједно са С-глукофлавонима, изоориентином и ориентином, имала значајан утицај на укупани антиоксидативни потенцијал LSA и LSR екстракта. На основу добијених вредности DPPH инхибиторне активности за једињења идентификована у екстрактима биљке *S. pratensis*, рузмаринска киселина, кафеинска киселина и лутеолин су једињења која су испољила највећу активност. С тога, ова једињења су вероватно и најодговорнија за добру антиоксидативну активност SPA и SPR екстракта. Међутим, апигенин и нарингенин су инхибирали мање од 50% DPPH радикала при максималној примењеној концентрацији ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$).

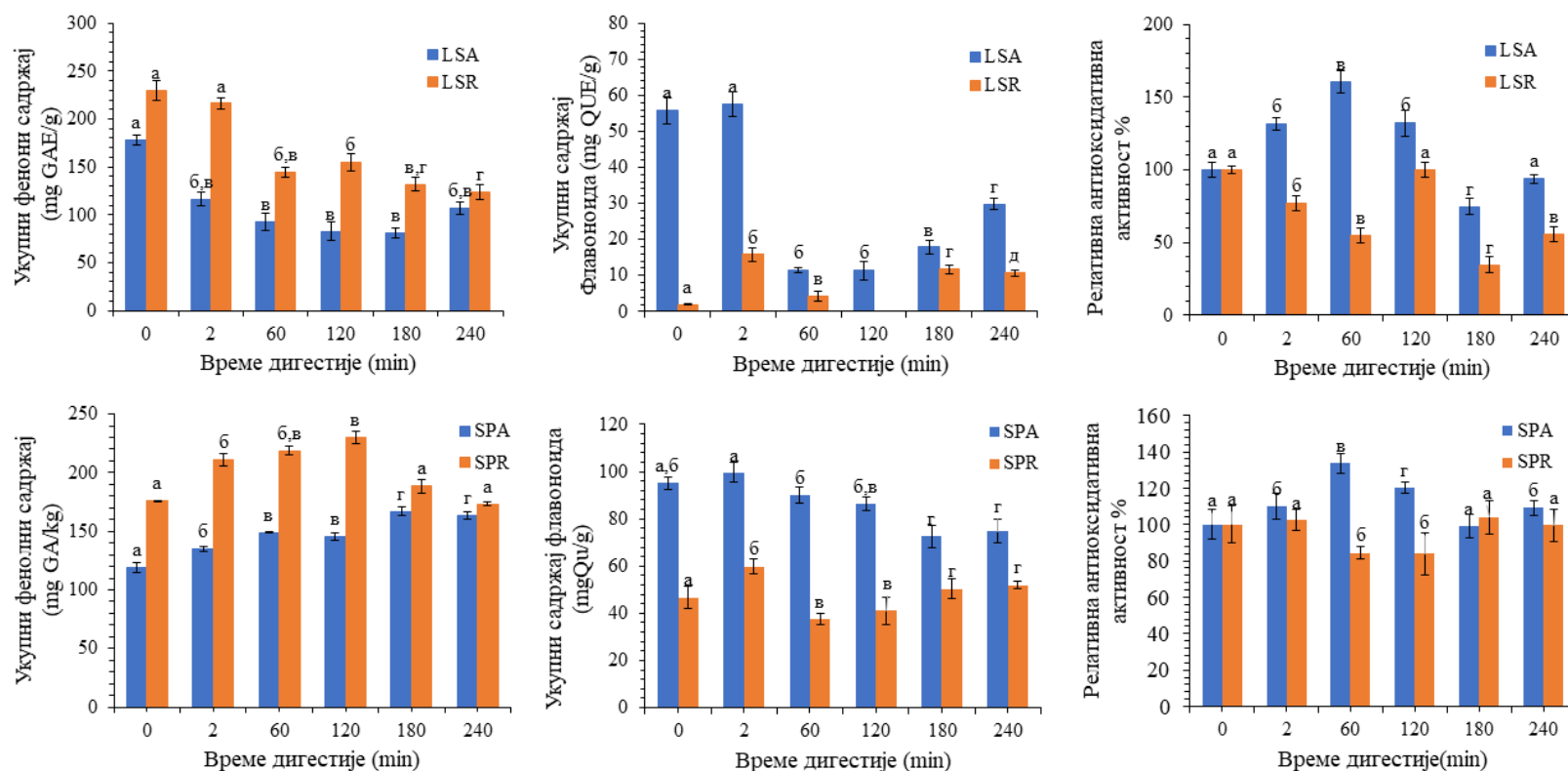
Због изразито високе антиоксидативне активности екстракта биљке *L. salicaria* код готово свих коришћених *in vitro* метода, ова два екстракта (LSA и LSR) подвргнута су испитивању антиоксидативне активности DCFDA методом. Наиме, за тестирање ефеката LSA и LSR екстракта на моделу ћелиске линије подвргнуте оксидативном стресу, изабране су ћелије људских кератиноцита, (HaCaT) и натријум арсенит (NaAsO_2) као генератор оксидативног стреса. Натријум-арсенит је канцерогени загађивач који се може срести у животној средини и може бити присутан у води, храни и ваздуху. Свој токсични ефекат испољава кроз генерисање реактивних кисеоничних врста, што заузврат изазива губитак хомеостазе GSH и оксидацију различитих биолошких молекула [255,256]. У овом експерименту ћелије су претходно третиране са појединачним екстрактима и то у интервалима од 30-60-120 min, а затим је изазван стрес коришћењем $300 \mu\text{M NaAsO}_2$. Непосредно након индукције оксидативног стреса, производња реактивних кисеоничних врста је одређена коришћењем 2,7-дихлорофлуоресцин диацетата (H_2DCFDA) (Слика 45). Као што се могло очекивати, 60-минутни третман са NaAsO_2 индуковао је 50% повећање интрацелуларних нивоа реактивних кисеоничних врста у поређењу са контролним нетретираним ћелијама ($p < 0,05$). Занимљиво је да када су ћелије инкубирани са LSA (Слика 45 А) или LSR (Слика 45 Б) екстрактима пре третмана са NaAsO_2 , није примећено повећање нивоа реактивних кисеоничних врста ($p < 0,05$) већ након 30 минута инкубације [76]. DCFDA тест је потврдио да екстракти биљке *L. salicaria* осим антиоксидативне активности приказане у *in vitro* методама могу постићи антиоксидативне ефекте на ћелијском нивоу.



Слика 45. Антиоксидативни ефекат LSA и LSR екстраката на HaCaT ћелијској линији. Оксидативни стрес индукован је додатком AsNaO₂. Ћелије су третиране LSA (А, 25 µg/mL) или LSR (Б, 10 µg/mL) екстрактима. Приказани подаци су средња вредност ± СД три независна експеримента. **p* < 0,05 у односу на нетретиране ћелије [76]

4.1.4. Биодоступност полифенолних једињења током симулиране *in vitro* гастроинтестиналне дигестије

Систем за варење, као сложен биохемијски механизам, има улогу да обезбеди организам водом, електролитима и хранљивим материјама у биодоступним облицима. Процеси унутар дигестивног система често могу истовремено да промене структуру активних једињења и њихове биолошке активности. Дакле, телесна температура, рН вредност и дигестивни ензими итекако могу довести до промена у хемијском саставу и антиоксидативној активности екстраката [257]. Биорасположивост неког фитоједињења односи се на меру у којој се хранљиве материје из хране апсорбују, транспортују и користе у организму. Док се појам биодоступности фокусира на мерење и процену колико од унете дозе неког једињења оно стварно доспева у системску циркулацију у односу на то колика се доза унела. Сходно томе, позитиван утицај биоактивних једињења биљака на здравље зависе од њихове молекуларне масе, хемијске структуре, концентрације у храни, као и матрикса хране и процеса варења. Стога је одређивање *in vitro* утицаја дигестије на фенолни састав и антиоксидативну активност екстраката биљака *L. salicaria* и *S. pratensis* важно за процену биодоступности, а затим и за биорасположивост присутних биоактивних једињења. **Слика 46 А и Б** показују промене у концентрацијама укупних фенола и флавоноида као и релативну антиоксидативну активност испитиваних екстраката током времена варења.



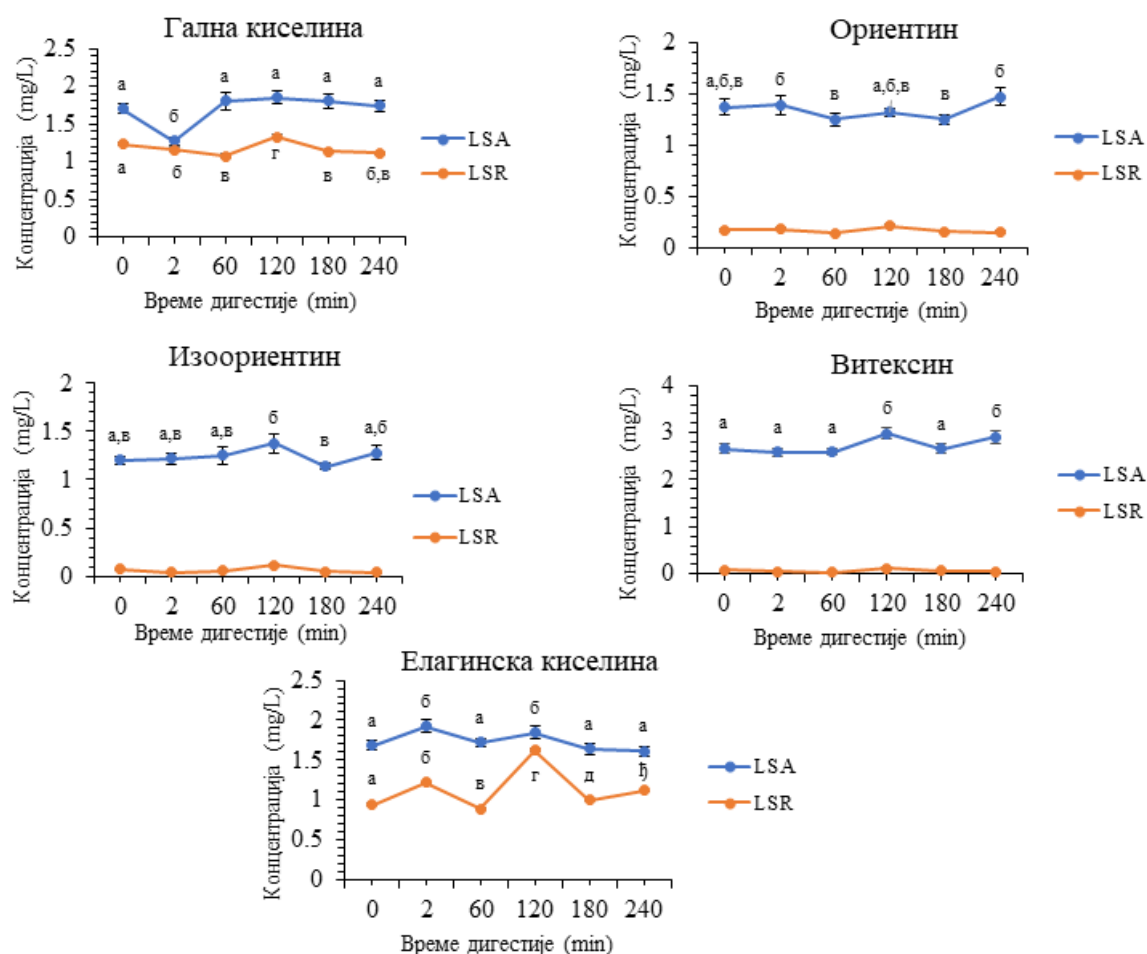
Слика 46. Промене укупног садржаја фенола (1) и флавоноида (2) као и промена релативне антиоксидативне активности на нивоу DPPH радикала (3) екстракта *L. salicaria* (А) и *S. pratensis* (Б) током симулиране *in vitro* дигестије [76,80]. Вредности за исти тип екстракта обележене различитим словима на графицима статистички се значајно разликују ($p < 0,05$).

Укупни фенолни садржај LSA и LSR екстракта (**Слика 46 А (1)**) значајно се смањило ($p < 0,05$) током оралне и желудачне дигестије (до 60 мин). Што се одразило и на смањење DPPH активности LSR екстракта (**Слика 46 А (3)**), док се изненађујуће повећала антиоксидативна активност LSA екстракта. У наредних сат времена, DPPH инхибиторна активност LSA и LSR екстракта је повећана у складу са повећањем садржаја фенола. Сличан тренд је такође примећен за вредности укупног садржаја фенола и DPPH активности екстракта током следећих сат времена варења (до 180 мин, цревна дигестија). Вредности укупног садржаја фенола за LSR су се смањиле до краја дигестије (240 мин), док су за LSA екстракт вредности укупног фенолног садржаја порасле. Током последњег сата *in vitro* симулиране цревне дигестије, активност уклањања DPPH радикала повећана је за оба екстракта. Што се тиче укупног садржаја флавоноида током *in vitro* дигестије екстракта, у оралној фази је садржај флавоноида благо повећан у односу на њихов почетни садржај. Међутим, у следећем сату (желудачна фаза) садржај флавоноида је брзо опао, а затим је поново почео да расте током интестиналне фазе (**Слика 46 А (2)**). Ови резултати показују да је антиоксидативна активност екстракта током *in vitro* дигестије више повезана са садржајем укупних фенолних једињења него са садржајем флавоноида [76].

Као што је приказано на **Слици 46 Б (1)**, укупни фенолни садржај SPA и SPR екстракта је благо повећан током прве две фазе варења (до 60 мин). У наредних сат времена фенолни садржај SPR екстракта је наставио да расте ($p < 0,05$), док је њихов садржај у SPA екстракту стагнирао. У складу са повећањем фенолног садржаја, DPPH инхибиторна активност SPA екстракта је порасла у првом сату варења. Изненађујуће, антиоксидативна активност SPR екстракта је опала (**Слика 46 Б (3)**) у истом периоду варења. Током цревне фазе варења, фенолни садржај у SPA се постепено смањивао до краја варења (240 мин), док се у SPR екстракту повећавао између 120 и 180 минута варења и потом остао непромењен до краја. У међувремену, антиоксидативна активност SPR екстракта је наставила да се понаша пратећи промену фенолног садржаја до краја варења, док исти тренд није примећен за SPA екстракт. Укупан садржај флавоноида је био у умереном порасту након завршетка оралне фазе у поређењу са почетним нивоом флавоноида (**Слика 46 Б (2)**). Затим се брзо смањило током желудачне фазе. Занимљиво је да је флавоноидни садржај наставио да опада до краја дигестије у SPA, док је уочено повећање флавоноида у SPR екстракту [80].

Промене у концентрацијама идентификованих једињења у екстрактима *L. salicaria* током симулиране *in vitro* дигестије одређене су HPLC-PDA хроматографском методом и графички приказане на **Слици 47**. Сва једињења откривена у метанолским екстрактима *L. salicaria* била су прилично стабилна током *in vitro* гастроинтестиналне дигестије. Иако је степен промена у концентрацијама фенолних једињења био незнатно различит код LSA и LSR током варења, промене у количинама идентификованих флавоноидних C-глукозида и елагинске киселине биле су мање изражене у LSA у поређењу са LSR током процеса дигестије. Варијације у концентрацији елагинске киселине у LSR екстракту су биле најизраженије. Благо повећање концентрације елагинске киселине у LSR екстракту током оралне, желудачне и цревне фазе варења може се објаснити хидролизом неких деривата елагинске киселине. Међутим, у поређењу са високом концентрацијом елагинске киселине у екстрактима након хидролизе киселином (**Табела 7**), ово повећање током симулираног варења било је занемарљиво. Што заправо може да значи да су за хидролизу деривата елагинске киселине у LSA и LSR екстрактима очигледно потребни екстремнији услови. Иако екстракти садрже неке деривате елагинске киселине, не може се са сигурношћу рећи да ли се ови деривати елагинске киселине могу апсорбовати након гастроинтестиналног варења. Ово је у складу са другим студијама биорасположивости које су потврдиле

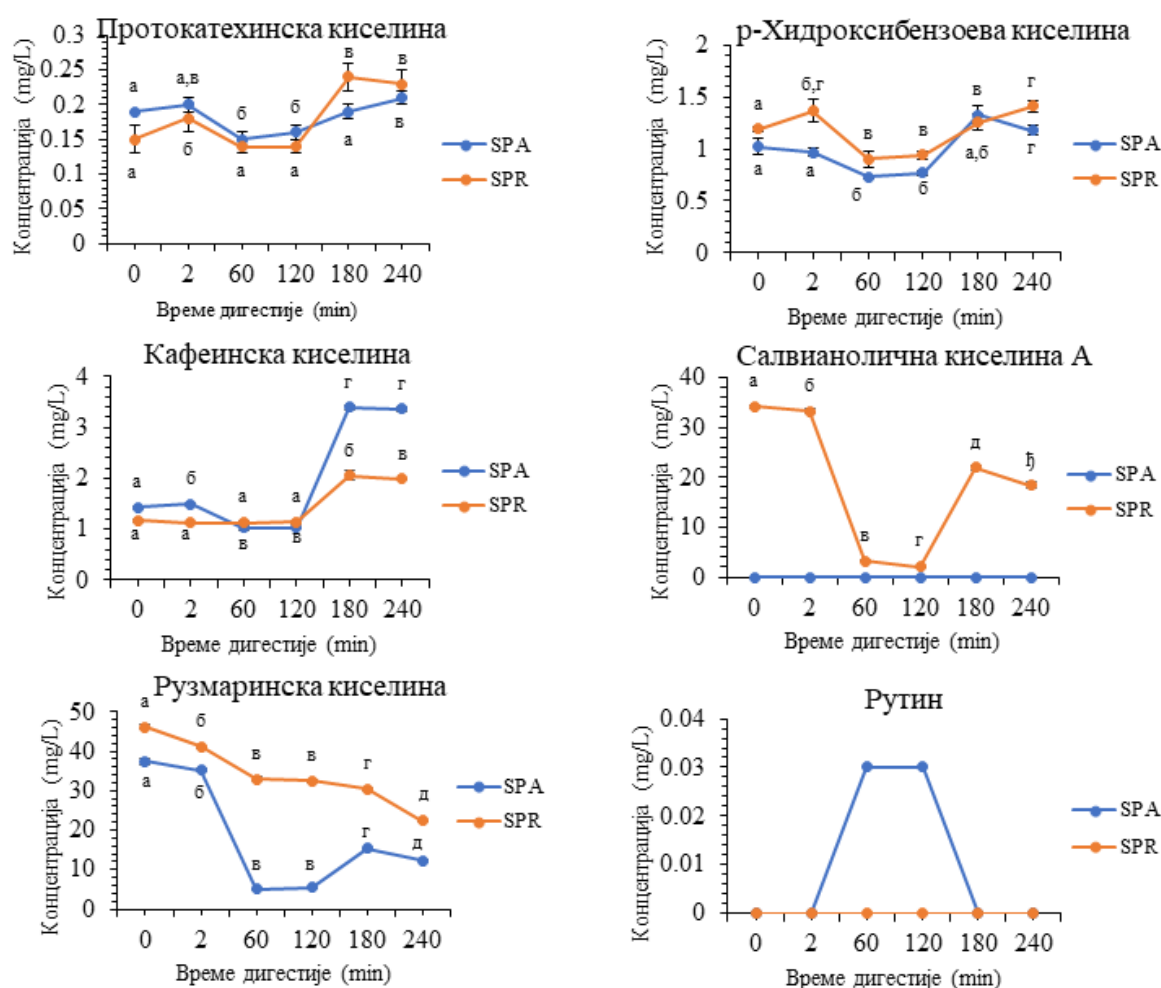
нису апсорпцију елагитанина и показале да су метаболити добијени елагинском киселином откривени само у плазми [258]. *González-Barrio* и сар. су показали да знатне количине неких елагитанина могу проћи из танког у дебело црево где се уз помоћ микрофлоре дебелог црева могу метаболити у деривате уролитина [259]. Добијени резултати су потврдили да количине галне киселине, елагинске киселине, ориентина, изоориентина и витексина откривене у екстрактима *L. salicaria* могу бити у потпуности доступне за асимилацију, цревни метаболизам, апсорпцију и даље за дистрибуцију у ткивима и испољавање својих биоактивности. За праћење промене концентрација током *in vitro* симулиране дигестије појединих једињења идентификованих у екстрактима *S. pratensis* коришћена је софистициранија UHPLC/(-)HESI- MS² метода у односу на HPLC-PDA методу коришћену код праћења једињења присутних у LSA и LSR екстрактима [76].



Слика 47. Промене у концентрацији идентификованих фенолних једињења у екстрактима *L. salicaria* током *in vitro* симулиране дигестије [76]. Вредности за исти тип екстракта обележене различитим словима на графицима статистички се значајно разликују ($p < 0,05$).

На **Слици 48** приказане су варијације у концентрацијама а једињења идентификованих у SPA и SPR екстрактима током симулиране *in vitro* дигестије. Резултати су показали да се концентрација фенолних једињења у екстрактима *S. pratensis* доступних за апсорпцију у дигестивном тракту, као и њихов антиоксидативни потенцијал, мења током процеса *in vitro* дигестије. Промене у садржају фенола, флавоноида и антиоксидативне активности SPA и SPR екстракта током симулиране дигестије нису биле толико изражене у поређењу са променама концентрације

појединих фенолних једињења у екстрактима које су биле значајно приметне. Протокатехинска и *p*-хидроксибензоева киселина су показале значајну стабилност током протокола варења што сугерише да поседују високу биодоступност за даљу апсорпцију. Такође, постоји могућност да је повећан садржај ове две фенолне киселине у екстрактима током процеса варења последица њиховог ослобађања из комплексних фенолних једињења као што су њихови глукозиди. Рузмаринска киселина и салвианолична киселина А нису показале високу стабилност у симулираним гастроинтестиналним условима у оба SPA и SPR екстракта. Значајно нижа концентрација ($p < 0,05$) рузмаринске киселине у екстракту после 60 минута варења, посебно током гастричне фазе, може бити узроковано њеном хидролизом у киселој средини или структурним променама које се могу довести у везу са присуством различитих ензима, променом рН вредности или додавањем различитих једињења за симулацију гастроинтестиналних услова. Промене у концентрацијама рузмаринске и кафеинске киселине могу се повезати с обзиром да је рузмаринска киселина естар кафеинске киселине и 3,4-дихидроксифенил млечне киселине. Повећање концентрације кафеинске киселине и смањење концентрације рузмаринске киселине може указивати на то да се одређена количина рузмаринске киселине у екстрактима разлаже при чему се добија кафеинска киселина као производ. Такође, уочено је статистички значајно веће смањење концентрације рузмаринске киселине ($p < 0,05$) и повећање концентрације кафеинске киселине ($p < 0,05$) у цревној фази варења SPA екстракта него код SPR екстракта, што указује на корелацију између ових промена у концентрацијама [80]. Овај резултат подржава хипотезу да рузмаринска киселина може бити хидролизована током варења до кафеинске киселине као једном од производа. Такође, уочен је значајан пораст концентрације кафеинске киселине у оба екстракта током цревне фазе варења, што би могло да указује на њено ослобађање из њених многобројних деривата чије је присуство доказано помоћу UHPLC–MS4 орбитрапом коришћењем четири дијагностичка MS⁴ фрагмента. Ранија истраживања су показала да је стабилност рузмаринске киселине, када се испита сама у раствору, значајно већа од њене стабилности у биљним екстрактима породице Lamiaceae након гастроинтестиналног варења. Такође, потврђено је да кисела средина (рН = 2,5) значајно смањује концентрацију рузмаринске киселине ($\geq 50\%$) [260]. Током процеса варења рутин је квантификован у дигестивном раствору SPA екстракта само током гастричне фазе. Овакво понашање рутина током варења може се објаснити бољом стабилношћу флавоноида у киселој средини него у алкалној као што је то у интестиналној фази варења [261]. Добијени резултати су показали ниску стабилност главних фенолних једињења, рузмаринске и салвианоличне киселине А као деривата хидроксициметне киселине у испитиваним екстрактима током *in vitro* гастроинтестиналне дигестије, док су *p*-хидроксибензоева и протокатехинска киселина прилично стабилне у условима варења. Дакле, таква биодоступност ових једињења идентификованих у екстрактима сугерише да се биоактивност екстракта одређена *in vitro* може променити у људском телу након њихове оралне примене.



Слика 48. Промене у концентрацији идентификованих фенолних једињења у екстрактима *S. pratensis* током *in vitro* симулиране дигестије [80]. Вредности за исти тип екстракта обележене различитим словима на графицима статистички се значајно разликују ($p < 0,05$).

4.1.5. Антимикробна активност испитиваних екстраката

4.1.5.1. Антибактеријски потенцијал екстраката биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*

Резултати антибактеријске активности екстраката *L. salicaria* и *S. pratensis* приказани су у **Табели 12**. Оба екстракта биљке *L. salicaria* показала су умерену антибактеријску активност. Најниже MIC вредности (0,625 mg/mL) за LSA и LSR забележене код бактеријских врста *B. subtilis* и *S. aureus*, док је *P. aeruginosa* била најотпорнија бактеријска врста на дејство *L. salicaria* екстраката са MIC вредностима 5 mg/mL за LSA и 20 mg/mL за LSR екстракт. Нешто виши антибактеријски потенцијал LSA и LSR екстракта примећен је и код *M. lysodeikticus* и *S. enteritidis* (MIC 1,25 mg/mL). Други бактеријски сојеви су показали нижу осетљивост на бактериостатско дејство *L. salicaria* екстраката где су забележене MIC вредности од 2,5 до 10 mg/mL. На основу добијених резултата може се приметити да су Грам-позитивне бактерије биле осетљивије на екстракте биљке *L. salicaria* у односу на Грам-негативне, нарочито када је у питању екстракт корена. Вредности MIC за LSA и LSR су биле много веће у

поређењу са хлорамфениколом (MIC; 1,25–40 µg/mL) и еритромицином (MIC; < 0,3125–40 µg/mL), као референтним антибиотицима [76].

Табела 12. Антибактеријски потенцијал екстракта биљака *L. salicaria* (LSA и LSR) и *S. pratensis* (SPA и SPR), као и референтних антибиотика (хлорамфеникол и еритромицин).

Назив бактеријских култура			MIC*					
			LSA	LSR	SPA	SPR	X	E
<i>B. cereus</i>	ATCC 10876	G+	2,5	5	1,25	< 0,156	5	0,625
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	G+	0,625	0,625	5	< 0,156	20	0,625
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	G+	5	5	20	< 0,156	2,5	0,625
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	G+	0,625	0,625	5	< 0,156	10	< 0,3125
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	G+	5	10	10	< 0,156	5	20
<i>M. lysodeikticus</i>	ATCC 4698	G+	1,25	1,25	10	20	1,25	10
<i>S. typhimurium</i>	ATCC 14028	G-	2,5	10	5	< 0,156	10	1,25
<i>S. enteritidis</i>	ATCC 13076	G-	1,25	1,25	20	> 20	2,5	20
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	G-	2,5	10	10	> 20	5	2,5
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	G-	2,5	5	20	> 20	40	< 0,3125
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 10145	G-	5	20	20	20	> 40	> 40

X – Хлорамфеникол; E – Еритромицин; *Вредности MIC за екстракте су изражене у mg/mL, док су за хлорамфеникол и еритромицин у µg/mL.

Поређивањем антибактеријске активности екстракта биљке *S. pratensis*, SPR екстракт је показао изузетан антибактеријски потенцијал према већини Грам-позитивних бактерија. Екстракт корена је био ефикасан у инхибицији раста већине Грам-позитивних бактерија (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, и *E. faecalis*) и *S. typhimurium* као Грам-негативне бактерије са MIC вредностима испод најниже тестиране концентрације (MIC; < 0,156 mg/mL). Међутим, примећено је да SPR екстракт није имао значајну активност према осталим коришћеним бактеријама. С друге стране, SPA је показао знатно слабија антибактеријска својства, у поређењу са SPR, а најизреженији ефекат је показао за беактеријску врсту *B. cereus* са вредношћу MIC од 1,25 mg/mL за [80].

Иако су екстракти LSA и LSR генерално показали слабу антимикробну активност, LSR екстракт се може сматрати потенцијално ефикаснијом антимикробном супстанцом у смислу даље примене. Borchardt и сар. су показали да етанолски екстракт надземног дела *L. salicaria* поседује антимикробно дејство на *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и једну плесан *C. albicans* [262]. Затим, резултати које су добили Becker и сар. показали су сличну активност метанолских екстракта надземног дела *L. salicaria* против *S. aureus*, са MIC вредношћу од 0,5 mg/mL [231]. Такође, добијени резултати су подржани претходним студијама које су спровели Rauha и сар. и Çitoğlu & Altanlar [78,263]. Колико је познато, ово је прва студија која је испитивала антимикробно деловање екстракта корена *L. salicaria*. Поред тога, не постоје литературни подаци о антифунгалној активности оба испитивана екстракта. Manayi и сар. су показали да метанолски екстракт надземног дела *L. salicaria* поседује умерену активност према *Helicobacter pylori* са зоном хибиције од 17 mm при примењеној концентрацији од 500 mg/mL [244]. Постоје такође истраживања која су била фокусирана на антимикробни потенцијал чистих активних једињења која су откривена у екстрактима *L. salicaria*. Boroja и сар. су потврдили антимикробну активност елагинске киселине, која је доминантно једињење у *L. salicaria*, на једанаест бактеријских и десет гљивичних врста са MIC вредностима од 0,016 до преко 1 mg/mL [264]. Такође, потврђена је антибактеријска активност ориентина у комбинацији са виценином на *S. aureus*, *E. coli*

и *K. pneumoniae* [249], док су *Li* и сар. показали антибактеријску активност витексина изолованог из *Alsophila spinulosa* према истим бактеријама при чему се МИС вредност кретала у распону од 25 до 100 µg/mL [265].

За разлику од биљака рода *Lythrum*, антимикробни потенцијал екстраката али и етарских уља рода *Salvia* је много чешће испитиван. *Kamatou* и сар. су успешно изоловали и идентификовали олеанолну киселину и њен изомер урсолну киселину, карносол и 7-*O*-метилепиросманол из *Salvia chamelaeagnea* K. Bergius као једињења са значајним антимикробним својствима против *S. aureus* [266]. Према добијеним резултатима, SPR екстракт је показао бољу антибактеријску активност против *E. faecalis* и *S. epidermidis*, са МИС вредностима < 0,156 mg/mL од екстракта корена *S. cadmica* (MIC; 1,25 mg/mL за *E. faecalis*; 0,625 mg/mL за *S. epidermidis*) у студији коју су објавили *Piątaczak* и сар. (2021) [116]. Антимикробни потенцијал надземног дела *S. pratensis* у до сада објављеним студијама, такође је показао ниску антимикробну активност [267]. У овом истраживању по први пут је приказана антимикробна активност екстракта корена *S. pratensis*. Једна од главних група једињења из биљака одговорних за њихово антимикробно дејство су фенолна једињења. Рузмаринска киселина, као доминантно једињење у оба екстракта, добро је позната по својим различитим биолошким активностима укључујући и добру антимикробну активност. Међутим, *Piątaczak* и сар. су показали да рузмаринска киселина поседује оскудну антимикробну активност у поређењу са екстрактима надземног дела и корена *S. cadmica* [116]. Дакле, могуће је да антибактеријска својства SPR екстракта могу бити последица синергизма неколико једињења.

4.1.5.2. Антифунгални потенцијал екстраката биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*

Антифунгална активност испитиваних екстраката и референтних антимикотика приказана је у **Табели 13**. Екстракти су показали знатно слабију антифунгалну активност у поређењу са њиховом антибактеријском активношћу са МИС вредностима које су се кретале од 5 до преко 20 mg/mL. Најосетљивији сојеви гљива на LSA и LSR су били *C. albicans* и *F. oxysporum*, са МИС вредностима од 5 и 10 mg/mL, редом. Екстракти нису показали никакав антифунгални ефекат при концентрацији од 20 mg/mL према *A. alternata* и *D. stemonitis*. Раст других сојева гљива је инхибиран концентрацијама екстраката од 10 или 20 mg/mL [76].

Ово истраживање је такође укључило, по први пут, антифунгалну активност метанолских екстраката надземног дела и корена биљке *S. pratensis*. Екстракти су показали ниже антифунгалне активности у поређењу са њиховим антибактеријским потенцијалом. Слична антифунгална ефикасност SPA и SPR уочена је према већини испитиваних сојева гљива са нешто већим антифунгалним потенцијалом SPA екстракта према *F. oxysporum* (MIC 0,3125 mg/mL), *A. alternata* (MIC 10 mg/mL), *D. stemonitis* (MIC 10 mg/mL), и *P. cyclopium* (MIC 1,25 mg/mL) у поређењу са SPR екстрактом. Екстракт корена је имао умерену антифунгалну активност са МИС вредностима између 2,5 и 20 mg/mL. Поређењем антифунгалне активности екстраката биљке *S. pratensis* са екстрактима биљке *L. salicaria* може се уочити нешто боља активност SPA и SPR екстракта, нарочито према *P. canescens*, *P. cyclopium* и *T. harzianum*. Нистатин и клотримазол су коришћени као референтни антимикотици, при чему је нистатин инхибирао раст гљивица са МИС вредностима од 1,25 до 20 µg/mL, док су се МИС вредности за клотримазол кретале од 10 до 40 µg/mL [80]. Према доступним литературним подацима ово су први резултати антифунгалне активности екстраката испитиваних биљних врста. Иако су испитивани екстракти генерално показали умерену

до слабу антибактеријску активност, са изузетком екстракта корена биљке *S. pratensis* који је поседовао нешто израженије антибактеријске особине, њихов антибактеријски потенцијал је значајнији у односу на антифунгалну активност. Свакако могућност примене испитиваних екстракта као антимикуробних агенаса, а нарочито корена биљке *S. pratensis*, би могла бити даље усмерена ка њиховој употреби као антибактериских препарата, док се не би могли употребити, бар у погледу неког значајног ефекта, као препарати који би зауставили раст фунгалних врста (плесни или квасаца).

Табела 13. Антифунгални потенцијал екстракта биљака *L. salicaria* (LSA и LSR) и *S. pratensis* (SPA и SPR), као и референтних антимикутика (нистатина и клотримазола).

Назив гљивичних култура		MIC*					
		LSA	LSR	SPA	SPR	Нистатин	Клотримазол
<i>P. cyclopium</i>	FSB 23	20	20	1,25	5	1,25	40
<i>P. canescens</i>	FSB 24	20	20	2,5	2,5	5	40
<i>T. harzianum</i>	FSB 12	20	10	5	2,5	2,5	> 40
<i>T. longibrachiatum</i>	FSB 13	20	10	10	10	20	>40
<i>D. stemonitis</i>	FSB 41	> 20	> 20	10	20	1,25	20
<i>A. alternata</i>	FSB 51	> 20	> 20	10	20	1,25	10
<i>A. brasiliensis</i>	ATCC 16404	> 20	20	10	10	2,5	40
<i>F. oxysporum</i>	FSB 91	10	5	0,3125	5	5	40
<i>C. albicans</i>	ATCC 10259	5	10	20	20	1,25	1,25

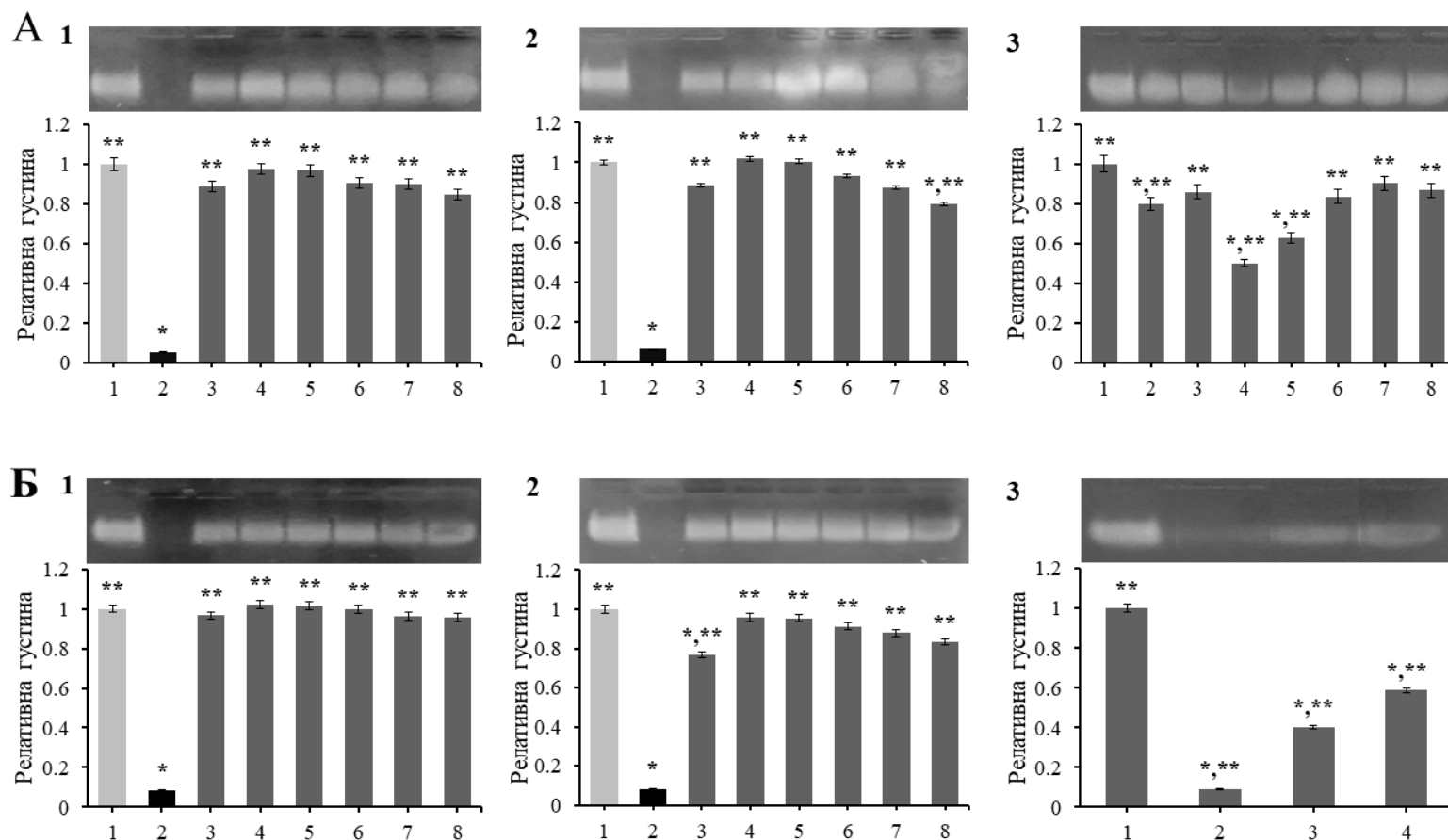
*Вредности MIC за екстракте су изражене у mg/mL, док су за нистатин и клотримазол у µg/mL.

4.1.6. Процена заштитне улоге екстракта на ДНК оштећења изазвана хидроксил и пероксил радикалима

Оксидативни стрес је један од главних узрока оштећења ДНК који доводи до разних модификација у ДНК ланцу. Потенцијална заштитна улога екстракта биљака *L. salicaria* (LSA и LSR) и *S. pratensis* (SPA и SPR) на ДНК оштећења изазвана слободним радикалима утврђена је коришћењем две различите *in vitro* антиоксидативне методе. Хидроксил и пероксил радикали су главни биолошки релевантни слободни радикали одговорни за оксидативно оштећење ДНК [268]. **Слика 49** приказује електрофорезу на агарозном гелу добијену након оштећења ДНК из сперме харинге изазваног хидроксил радикалима и у присуству различитих концентрација LSA, LSR, SPA и SPR екстракта. На **Слици 49 А (3)** и **Б (3)** представљени су заштитни ефекти главних фенолних једињења идентификованих у екстрактима *L. salicaria* и *S. pratensis*, редом. **Слике 49 А (1)** и **(2)** показују заштитне ефекте LSA и LSR екстракта од оштећења ДНК изазваног применом Fe^{2+} и H_2O_2 . Оба екстракта су показала највеће ДНК-заштитне ефекте при концентрацијама од 25 и 50 µg/mL (траке 4 и 5), чак и боље од кверцетина (трака 3, 100 µg/mL). Ови налази указују да LSA и LSR екстракти садрже високу концентрацију моћних антиоксидативних једињења, која у ниским концентрацијама ефикасно неутралишу високо реактивне хидроксилне радикале. Још један од циљева у одређивању ДНК заштите од оксидативног оштећења коришћењем екстракта био је да се утврди која једињења идентификована у екстрактима у највећој мери доприносе антиоксидативном дејству екстракта. Фенолна једињења (100 µg/mL) идентификована у оба екстракта биљке *L. salicaria* показала су статистички значајно смањење ($p < 0,05$) оштећења ДНК изазвано хидроксил радикалима у следећем опадајуће редоследу заштитног ефекта (**Слика 49 А (3)**): витексин (трака 7) > ориентин (трака 8) > гална

киселина (трака 3) > изооријентин (трака 6) > елагинска киселина (трака 2) > хлорогенска киселина (трака 5) > кофеинска киселина (трака 4) [76]. Резултати протективног ефекта ових фенолних једињења показују да сва идентификована једињења у *L. salicaria* екстрактима имају снажан антиоксидативни потенцијал заштите ДНК и да у великој мери доприносе испољеном ефекту екстракта.

Резултати добијени за SPA (Слика 49 Б (1)) и SPR (Слика 49 Б (2)) су показали да екстракти примењени у концентрацијама до 400 µg/mL (траке 4, 5, 6, 7, 8) ефикасно инхибирају ($p < 0,05$) оштећења ДНК изазвана хидроксил радикалима, при чему су добијени резултати упоредиви са заштитом од оштећења ДНК коју обезбеђује кверцетин као стандард (трака 3, 100 µg/mL). Такође, повећање концентрације SPR екстракта (Слика 49 Б, траке 4, 5, 6, 7, 8) изазвало је смањење његове способности да заштити ДНК од оштећења изазвана хидроксилним радикалима. Међутим, примећена је значајно већа заштита ДНК при свим примењеним концентрацијама SPR екстракта у поређењу са кверцетином (трака 3) који је коришћен као стандард. Такође фенолна једињења идентификована у екстрактима биљке *S. pratensis* показала су заштитини ефекат према ДНК оштећењу изазваног хидроксилним радикалима у односу на позитивну контролу, при чему је кафеинска киселина имала већи потенцијал заштите од рузмаринске киселине (Слика 49 Б (3)) [80].

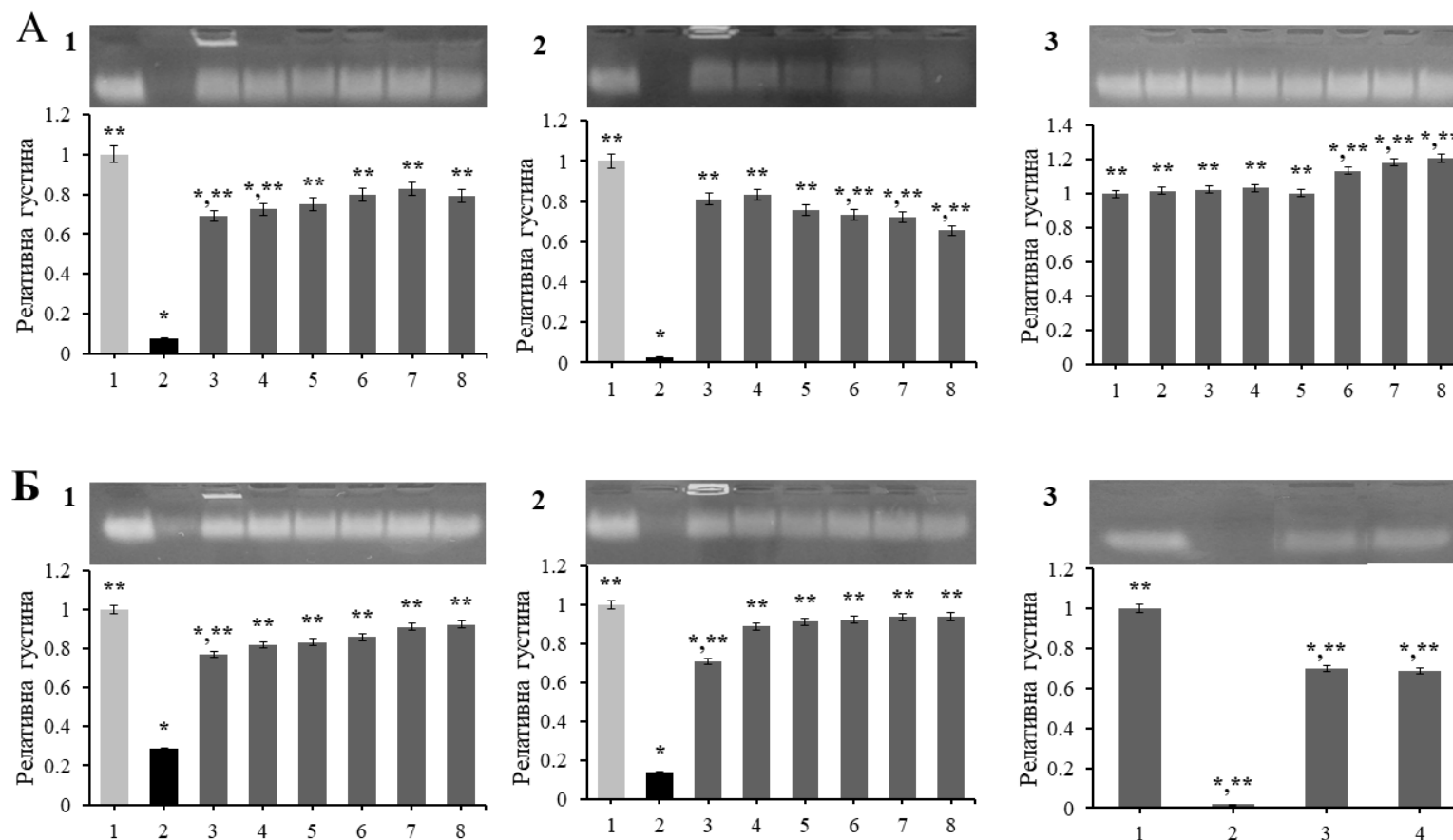


Слика 49. Агарозни гел након електрофорезе оштећења ДНК хидроксил радикалима и третманом различитим концентрацијама екстраката надземног дела (**А (1)**) и корена (**А (2)**) *L. salicaria* и надземног дела (**Б (1)**) и корена (**Б (2)**) *S. pratensis*. **Слике А (1 и 2) и Б (1 и 2):** трака 1 – негативна контрола (нетретирана ДНК); трака 2 – позитивна контрола (оштећење ДНК изазвано Fe^{2+} и H_2O_2); трака 3 – предтретман кверцетином (100 $\mu\text{g/mL}$) уз оштећење ДНК; траке 4–8 предтретман LSA **А (1)**, LSR **А (2)**, SPA **Б (1)** и SPR **Б (2)** у концентрацијама од 25, 50, 100, 200 и 400 $\mu\text{g/mL}$ (редом) уз оштећење ДНК. **Слика А (3):** трака 1 – негативна контрола; траке 2–8 предтретман (50 $\mu\text{g/mL}$) елагинска киселина, гална киселина, кафеинска киселина, хлорогенска киселина, изооријентин, витексин, оријентин уз оштећење ДНК. **Слика Б (3):** трака 1 – негативна контрола; трака 2 – позитивна контрола; траке 3 и 4 – предтретман (50 $\mu\text{g/mL}$) рузмаринска киселина и кафеинска киселина (редом) уз оштећење ДНК. * $p < 0,05$ у поређењу са негативном контролном групом; ** $p < 0,05$ у поређењу са позитивном контролном групом [76,80].

Када је ДНК из сперме харинге инкубирана са LSA и ААРН, такође је примећена заштита ДНК која зависи од концентрације LSA екстракта (**Слика 50 А (1)**). Међутим може се уочити да је LSA екстракт имао мању способност да инхибира пероксилне радикале у поређењу са инхибицијом хидроксилних радикала. LSR екстракт је у концентрацији од 25 µg/mL био најефикаснији у заштити ДНК од пероксил радикала (**Слика 50 А, (2)**; трака 4), док су више концентрације LSR екстракта биле мање ефикасне. Ови подаци указују на то да антиоксиданти који имају висок капацитет неутрализације слободних радикала могу бити мање ефикасни када се примењују у високој концентрацији или могу показати прооксидантне ефекте. У зависности од интензитета трака (**Слика 50 А (3)**) заштитна активност оштећења ДНК изазваног пероксил радикалом била је следећа: ориентин (трака 8) > витексин (трака 7) > изоориентин (трака 6) > гална киселина (трака 3) = кофеинска киселина (трака 4) > елагинска киселина (трака 2) > хлорогенска киселина (трака 5). Ови резултати су показали да ориентин и витексин (**Слике 49 А и 50 А (3)**) поседују већи ДНК заштитни ефекат од оштећења изазваног хидроксилним и пероксилним радикалом него друга фенолна једињења откривена у оба LSA и LSR екстракта. Такође, хлорогенска киселина (**Слике 49 А и 50 А (3)**, траке 5) показује низак ДНК заштитни потенцијал у оба *in vitro* теста. Ове фенолне киселине и С-глукофлавоноиди у екстрактима *L. salicaria* могу бити одговорни за њихов ДНК заштитни ефекат. Ови резултати су такође подржани активностима ових једињења према DPPH радикалу, осим код витексина, који је имао ниску активност неутрализације DPPH радикала али висок заштитни ефекат према ДНК оштећењу (**Табела 10**) [76].

Екстракти биљке *S. pratensis* и главна фенолна једињења идентификована у екстрактима показали су висок степен заштите од оштећења ДНК изазваних слободним радикалима. Добијени резултати за SPA и SPR су упоредиви са ДНК заштитним својствима молекула кверцетина који се користи као стандардно једињење. Очигледно је са **Слике 50 Б (1 и 2)**(траке 4, 5, 6, 7, 8) да су SPA и SPR екстракти инхибирали пероксилне радикале дозно-зависно, а резултати су били упоредиви са кверцетином. За разлику од заштите ДНК оштећења изазваног хидроксилним радикалом код којег је кофеинска киселина испољила знатно бољу активност од рузмаринске, у овом случају обе фенолне киселине су имале подједнак ефекат заштите ДНК од пероксидних радикала (**Слика 50 Б (3)**) [80].

Ово је прво истраживање које је пратило ДНК заштитни ефекат екстракта надземног дела и корена биљке *L. salicaria*. Такође, први пут су испитани заштитни ефекти елагинске, кофеинске, и хлорогенске киселине, као и заштитне ефекте ориентина, изоориентина и витексина од оштећења изазваног пероксилним радикалом генерисаним ААРН-ом. Ранија студија генотоксичног потенцијала воденог екстракта *L. salicaria*, користећи шкољку *Unio pictorum* као модел организма и микронуклеус тест дагње, показала је мутагено дејство екстракта примењеног у концентрацији од 1 g/L [269]. Zhu и сар. су известили о заштитном ефекту витексина и изовитексина код цепања ДНК ланца изазваног хидроксилним радикалима насталим коришћењем UV зрачења на водоник пероксид. Студија је такође показала да витексин и изовитексин имају већи заштитни ефекат на оксидативно оштећење ДНК од њиховог флавоноидног агликона апигенина [251].

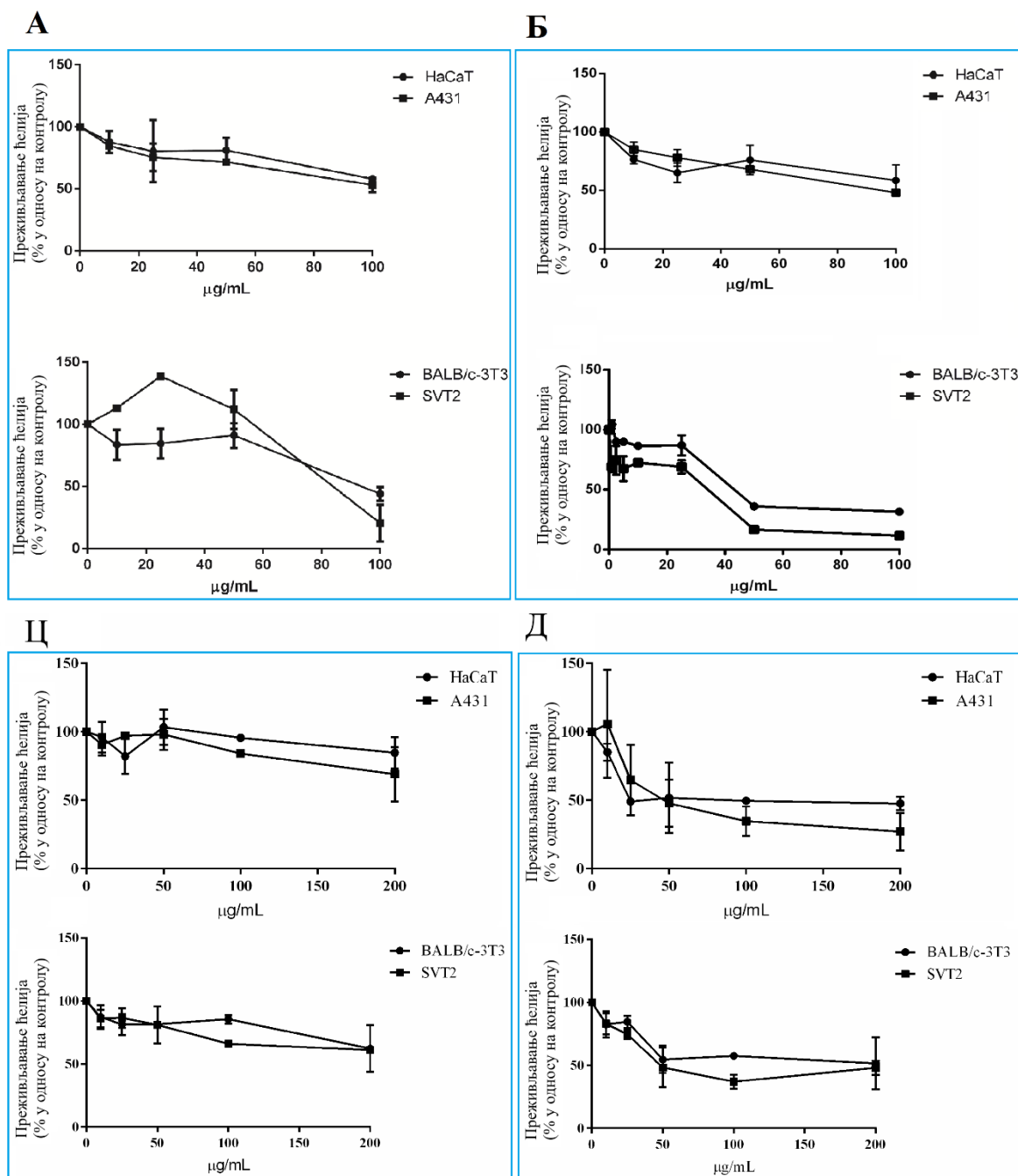


Слика 50. Агарозни гел након електрофорезе оштећења ДНК пероксил радикалима и третманом различитим концентрацијама екстракта надземног дела (А (1)) и корена (А (2)) *L. salicaria* и надземног дела (Б (1)) и корена (Б (2)) *S. pratensis*. **Слике А (1 и 2) и Б (1 и 2):** трака 1 – негативна контрола (нетретирана ДНК); трака 2 – позитивна контрола (оштећење ДНК изазвано ААРН); трака 3 – предтретман кверцетином (100 µg/mL) уз оштећење ДНК; траке 4–8 предтретман LSA А (1), LSR А (2), SPA Б (1) и SPR Б (2) у концентрацијама од 25, 50, 100, 200 и 400 µg/mL (редом) уз оштећење ДНК. **Слика А (3):** трака 1 – негативна контрола; траке 2–8 предтретман (50 µg/mL) елагинска киселина, гална киселина, кафеинска киселина, хлорогенска киселина, изооријентин, витексин, оријентин уз оштећење ДНК. **Слика Б (3):** трака 1 – негативна контрола; трака 2 – позитивна контрола; траке 3 и 4 – предтретман (50 µg/mL) рузмаринска киселина и кафеинска киселина (редом) уз оштећење ДНК. * $p < 0,05$ у поређењу са негативном контролном групом; ** $p < 0,05$ у поређењу са позитивном контролном групом [76,80].

Генотоксичност и/или антигенотоксичност су до сада испитивани за екстракте различитих врста биљака рода *Salvia*. Метанолски екстракт *S. officinalis* показао је заштитни ефекат против оштећења ДНК изазваног водоник пероксидом у људским лимфоцитима [270]. Yurtseven и сар. су указали да екстракт *S. officinalis* може значајно да смањи оштећење ДНК изазвано антибиотиком флавомицином код јаребица (*Alectoris chukar*) [271]. На основу истраживања које су спровели Mathew и Thoppil, екстракт *S. officinalis* не производи генотоксични ефекат код албино мишева коришћењем методе микронуклеуса и комете. На основу добијених резултата, фенолна једињења детектована у екстрактима могла би бити укључена у превенцију оштећења ДНК. На пример за рузмаринску киселину се зна да смањује учесталост настанка микронуклеуса и штити ДНК од оштећења изазваних доксорубицином. Такође, потврђено је да кафеинска киселина поседује способност инхибиције оштећења ДНК изазваног хидроксилним радикалима [272].

4.1.7. Цитотоксична активност екстракта биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*

Потенцијална цитотоксична активност сва четири екстракта је процењена испитивањем њиховог утицаја на четири ћелијске линије, и то две еукариотске ћелије (имортализовани хумани нормални НаСаТ кератиноцити и мишији BALB/с-3Т3 фибробласти) и две ћелије рака (хумани епидермоидни карцином А431 и мишији трансформисани SvT2 фибробласти) МТТ методом. Ћелије су инкубиране 48 h у присуству растуће концентрације сваког екстракта и резултати су приказани на **Слици 51**. Утврђено је да је екстракт LSA (**Слика 51 А**) потпуно биокомпатибилан са свим тестираним ћелијским линијама у концентрацијама до 50 µg/mL. Када се концентрација повећа (на 100 µg/mL), LSA екстракт је постао неселективно токсичан, јер је исти тренд токсичности потврђен код здравих и канцерогених ћелија. С друге стране, LSR екстракт је имао исту токсичност на свим анализираним ћелијским линијама, али са много већом токсичношћу на BALB/с-3Т3 и SvT2 (**Слика 51 Б**). Међутим, на основу добијених IC₅₀ вредности, односно концентрација екстракта које могу да инхибирају раст 50% ћелија, није пронађена селективност ни за LSA ни за LSR екстракт (**Табела 14**) [76].



Слика 51. Утицај LSA (А), LSR (Б), SPA (Ц) и SPR (Д) екстраката на здраве еукариотске имортализоване ћелије (HaCaT и BALB/c-3T3) и ћелије канцера (A431 и SVT2) [76,80].

На основу виталности ћелија, SPR је показао цитотоксичне ефекте на све испитиване ћелијске линије у зависности од дозе (Слика 51 Д), за разлику од SPA екстракта који је испољио слабију цитотоксичност (Слика 51 Ц). IC₅₀ вредности показују да је SPR екстракт био токсичнији посебно према ћелијама канцера, док за SPA екстракт није било могуће израчунати IC₅₀ вредност ни при највишој примењеној концентрацији од 200 µg/mL. IC₅₀ вредности SPR екстракта за две канцерогене ћелијске линије A431 и SvT2 биле су 24,3 и 49,6 µg/mL, редом. Интересантно је да је SPR екстракт био у потпуности биокompatibilan са BALB/c-3T3 ћелијским линијама при највишој примењеној концентрацији [80].

Табела 14. IC₅₀ вредности испитиваних екстраката након 48 h третмана ћелија.

Ћелијске линије ^a	IC ₅₀ (µg/mL)			
	LSA	LSR	SPA	SPR
HaCaT	> 100	> 100	> 200	47,9 ± 11,7
A431	> 100	98 ± 1,4	> 200	24,3 ± 1,1
BALB/c-3T3	94 ± 6	41 ± 1,4	> 200	> 200
SVT2	86 ± 2	34 ± 3	> 200	49,6 ± 12,3

Резултати представљају средњу вредност ± SD три независна мерења; ^a HaCaT - имортализовани хумани нормални кератиноцити, A431 - хумани епидермоидни карцином, BALB/c-3T3 – ћелије мишијих фибробласта, SVT2 - мишији трансформисани фибробласти.

Показана цитотоксичност је у складу са другим студијама, у којима је показано да високи нивои антиоксиданата могу имати негативан ефекат по виталност и здравих и канцерогених ћелије. Претходна студија о цитотоксичности хидрометанолског екстракта *L. salicaria* и његове фракције показала је слаб ефекат на карцином дебелог црева (HT-29), леукемију (K562), дуктални карцином дојке (T47D) и ћелије фибробласта швајцарског ембриона миша (NIH 3T3) [273], што је у складу са резултатима добијеним у овој дисертацији. Manayi и сар. су доказали да деривати тритерпена, стероли изоловани из неполарне фракције метанолног екстракта надземног дела *L. salicaria* имају највеће цитотоксичне ефекте на HT-29 ћелијске линије од свих четрнаест изолованих једињења (фенолних једињења и тритерпеноида) ове биљке [274]. Према овим резултатима, једињења са јаком цитотоксичном активношћу присутна су у високој концентрацији у неполарним екстрактима биљке *L. salicaria*, што сугерише да поларни екстракти и деривати елагинске киселине присутни у биљци нису активни против ћелија канцера. Друга студија је потврдила слабу цитотоксичну активност витексина у концентрацији од 100 µg/mL на ћелијским линијама HepG2 (јетра), MCF7 (дојка) и HCT116 (дебелог црева). Иста студија је показала да ориентин има нижу цитотоксичну активност од витексина примењеног у истој концентрацији, изазивајући цитотоксични ефекат само на MCF7 ћелијску линију [275].

Испитивање цитотоксичности SPA и SPR екстраката према имортализованим еукариотским и канцерогеним ћелијским линијама је показало да је биокомпатибилност SPA екстракта са свим испитиваним ћелијама у концентрацијама до 200 µg/mL, док је SPR екстракт показао већи цитотоксични потенцијал са нижим IC₅₀ вредностима за канцерогене ћелије (A431 и SvT2). Ови резултати сугеришу да надземни део *S. pratensis* има виши ниво биокомпатибилности од корена, што би требало узети у обзир и са више опреза када се корен *S. pratensis* користи за различите примене [80]. Претходне студије су показале да је метанолни екстракт друге врсте жалфије, *S. verticillata*, у потпуности биокомпатибилан на нормалним ћелијама [67], док су хидрометанолски екстракти надземног дела и корена биљке *S. cadmica* показали слабу цитотоксичну активност према мишијим L929 фибробластима [116]. Ранији резултати истраживања неких врста *Salvia* потврдила су да су оне богат извор многих потенцијалних антиканцорегених једињења [99]. Високе концентрације рузмаринске и салвианоличне киселине у екстрактима, посебно у корену, могу бити одговорне за цитотоксичну активност према ћелијама канцера [116]. Даље, HeLa и ME-180 ћелије канцера које су третиране кафеинском киселином показале су побољшане апоптотичке и морфолошке промене [276]. Такође, различите студије су потврдиле високу цитотоксичну активност салвианоличних киселина А и Б против карцинома дојке, плућа, јетре и сквамозних ћелија [277]. Сви ови молекули који су идентификовани у *S. pratensis* могу бити одговорни за њен забележени цитотоксични потенцијал.

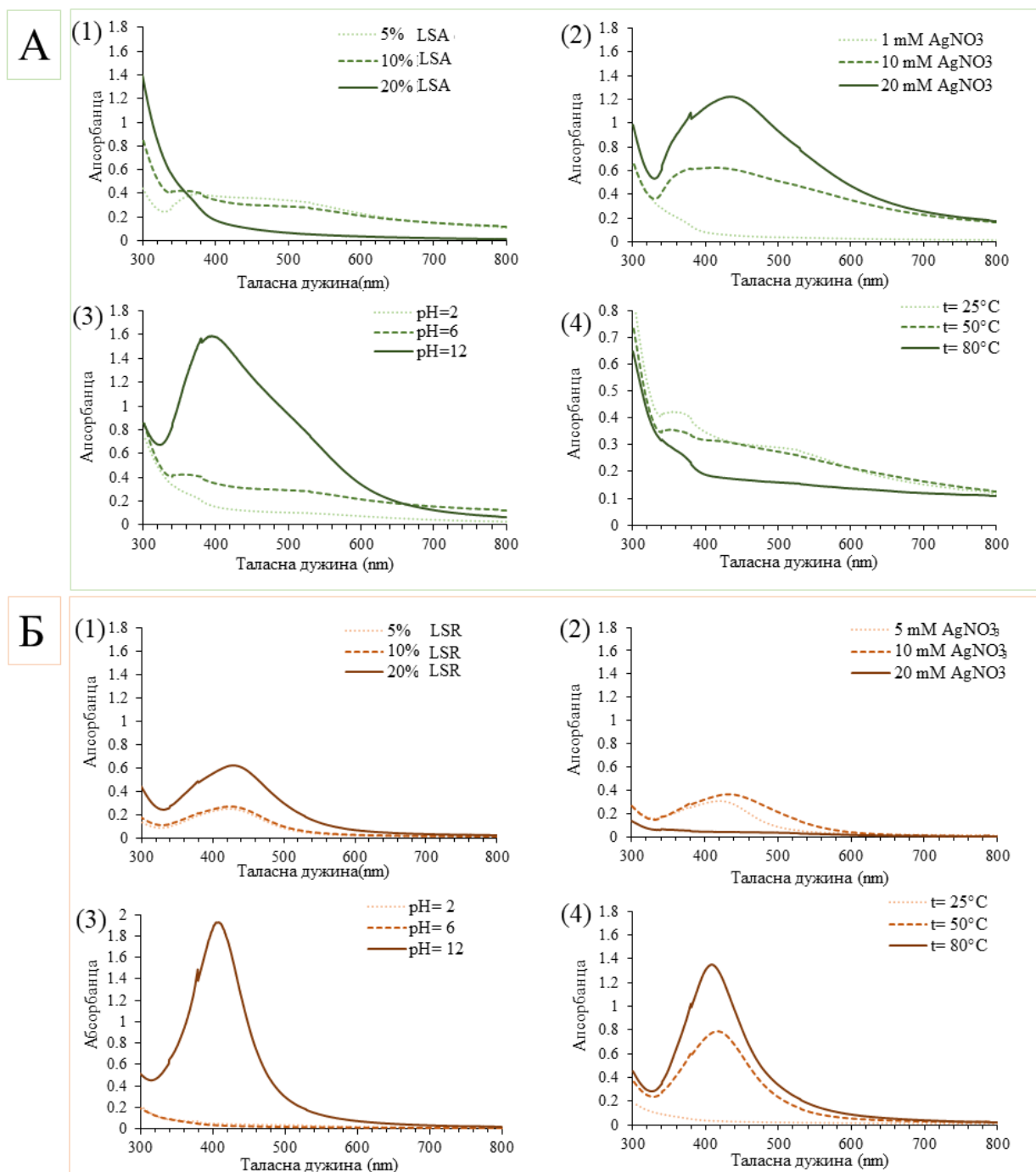
4.2. Наночестице сребра добијене коришћењем екстракта биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*

4.2.1. Оптимални услови зелене синтезе наночестица сребра помоћу екстракта биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*

Избор биљака за биосинтезу наночестица је веома важан параметар. Иако већина различитих биљних врста садржи биомолекуле који могу да делују као редукциони и стабилизујући агенси током синтезе, постоје биљке које су богате у садржају неких једињења као што су танини, који могу довести до слепљивања честица и стварања агрегата. Ови фитомолекули такође могу утицати и на површинске карактеристике AgNPs [278]. На принос, квалитет и карактеристике форматираних AgNPs може значајно утицати однос биљног екстракта и јона метала, дужина процеса синтезе, температура и рН реакције [279]. Наночестице сребра (LSA-AgNPs, LSR-AgNPs, SPA-AgNPs и SPR-AgNPs) које су касније окарактерисане и испитане су им биолошке и каталитичке особине, синтетизоване су комбиновањем најповољнијих услова добијених претходном оптимизацијом. За еколошки прихватљиву синтезу, као растварач за екстракција биљног материјала и синтезу наночестица коришћена је вода. Формирање наночестица сребра је праћено снимањем спектра од 800 до 300 nm помоћу UV-Vis спектрофотометра, при чему су се највиши апсорпциони врхови налазили у распону од 400 до 440 nm. У овом опсегу таласних дужина, постоји осцилација електрона на површини наночестица, која се рефлектује апсорбацијом, а ова појава се назива површинска плазмонска резонанција [280]. Поред тога формирање наночестица могло се уочити и визуелно променом боје раствора од светло жуте до тамно браон што потврђује редукцију јона сребра до његовог елементарног облика. Максималне вредности апсорпције током биосинтезе су добијене за 30 минута, а након тога се апсорпциони врхови нису повећавали, што указује на крај процеса синтезе.

Најпре су као фиксни услови узети 10%-тни раствори екстракта, добијени разблажењем воденог екстракта, 10 mM раствор AgNO₃, собна температура и рН вредност 6. Променом једног по једног параметра и праћењем је промена апсорпционог спектра испитани су различити услови, и тако за сваки испитивани екстракт посебно. На **Слици 52** приказана је синтеза наночестица сребра помоћу екстракта надземног дела (**А**) и корена (**Б**) биљке *L. salicaria* (LSA и LSR) у зависности од промене параметара као што су концентрација екстракта (1), концентрација AgNO₃ (2), рН вредности (3) и температуре (4). Концентрација од 5% (v/v) LSA екстракта била је најефикаснија за синтезу LSA-AgNPs (**Слика 52 А** (1)), док су веће концентрације екстракта изазвале агрегацију наночестица и њихово таложење што се примећује на основу интензитета апсорпционог пика у UV-Vis спектру. Што се тиче утицаја концентрације AgNO₃, најоштрији максимум у UV-Vis спектру за LSA-AgNPs је добијен коришћењем веће концентрације соли (20 mM AgNO₃) (**Слика 52 А** (2)), док употреба 1 mM AgNO₃ није довела до формирања наночестица. Међутим, повећање рН вредности раствора LSA екстракта довело је до повећања интензитета апсорпције за LSA-AgNPs (**Слика 52 А** (3)). Брзо формирање наночестица, са високим интензитетом пика на 394 nm, примећено је на рН 12, што указује да би алкални услови могли бити одговорни за активацију једињења из екстракта. Ово се може објаснити претпоставком да додатком базе хидроксилне групе привлаче атоме водоника фенолне и карбоксилне групе (из флавоноида и фенолних киселина) и на тај начин повећавају парцијално негативно наелектрисање кисеоника који затим лакше редукује јоне сребра и стабилизују формиране наночестице. Такође је познато да концентрација NaOH у раствору током

биоредукције Ag^+ утиче на величину, облик, монодисперзност и принос формираних наночестица [281]. Није примећено стварање наночестица при рН 2 [42].



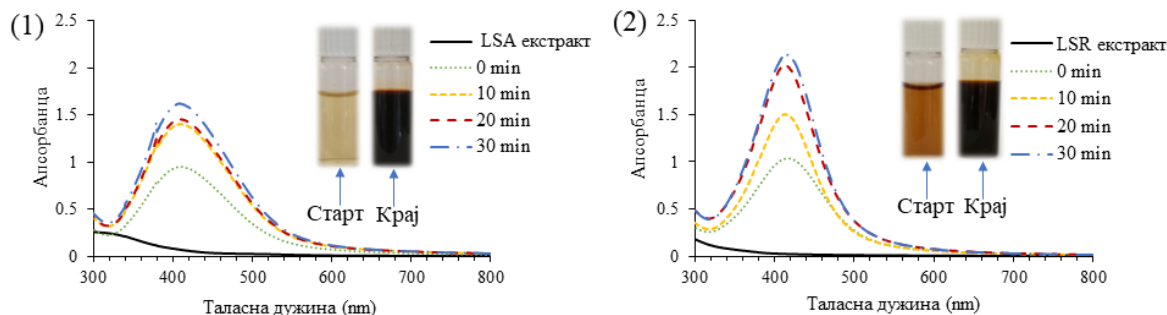
Слика 52. UV-Vis апсорпциони спектри LSA-AgNPs (А) и LSR-AgNPs (Б) у зависности од концентрације екстракта (1), концентрације соли (2), рН вредности раствора екстракта (3) и различитих температура (4)[42].

Такође, *Anigol* и сар. су показали да синтеза наночестица у киселој средини доводи до настанка широког пика апсорпције што указује на широк распон величина наночестица. Они су такође показали да повећањем рН вредности током синтезе, пик је био ужи и виши, док је при рН 9 израженија униформност величина наночестица [282]. Друга студија је потврдила да промена рН вредности не утиче на облик наночестица,

док се са повећањем рН вредности њихова величина смањује. Тако на пример, при рН вредностима од 5 до 9, величина AgNPs се кретала од 45 nm до 20 nm [283]. Биосинтеза LSA-AgNPs је такође праћена на различитим температурама и на основу добијених максимума апсорпције може се закључити да температура нема значајнији утицај на формирање наночестица коришћењем LSA екстракта (**Слика 52 А** (4)). Ово може бити предност коришћења LSA екстракта у синтези наночестица у поређењу са LSR, због мање потрошње енергије током процеса синтезе.

Спектрофотометријски подаци за синтезу LSR-AgNPs под различитим условима приказани су на **Слици 52 Б**. Примећено је да се са повећањем концентрације LSR екстракта повећава апсорпциони пик за LSR-AgNPs (**Слика 52 Б** (1)). Што се тиче утицаја концентрације AgNO₃, најоштрији пикови су добијени коришћењем 10 mM AgNO₃. Међутим, применом веће концентрације AgNO₃ (20 mM) појавиле су се велике, дисперговане честице, узрокујући нижи максимум апсорпције у UV-Vis спектру (**Слика 52 Б** (2)). Као и код синтезе наночестица коришћењем екстракта надземног дела, утицај повећања рН вредности имао је позитиван ефекат на синтезу LSR-AgNPs што се јасно види на **Слици 52 Б** (3). Промена температуре значајано је утицала на синтезу LSR-AgNPs, за разлику од синтезе LSA-AgNPs. Апсорпциони пик раствора током синтезе LSR-AgNPs био је много већи на 80°C него на 50 и 25°C, с обзиром на исте реакционе услове (**Слика 52 Б** (4)) [42].

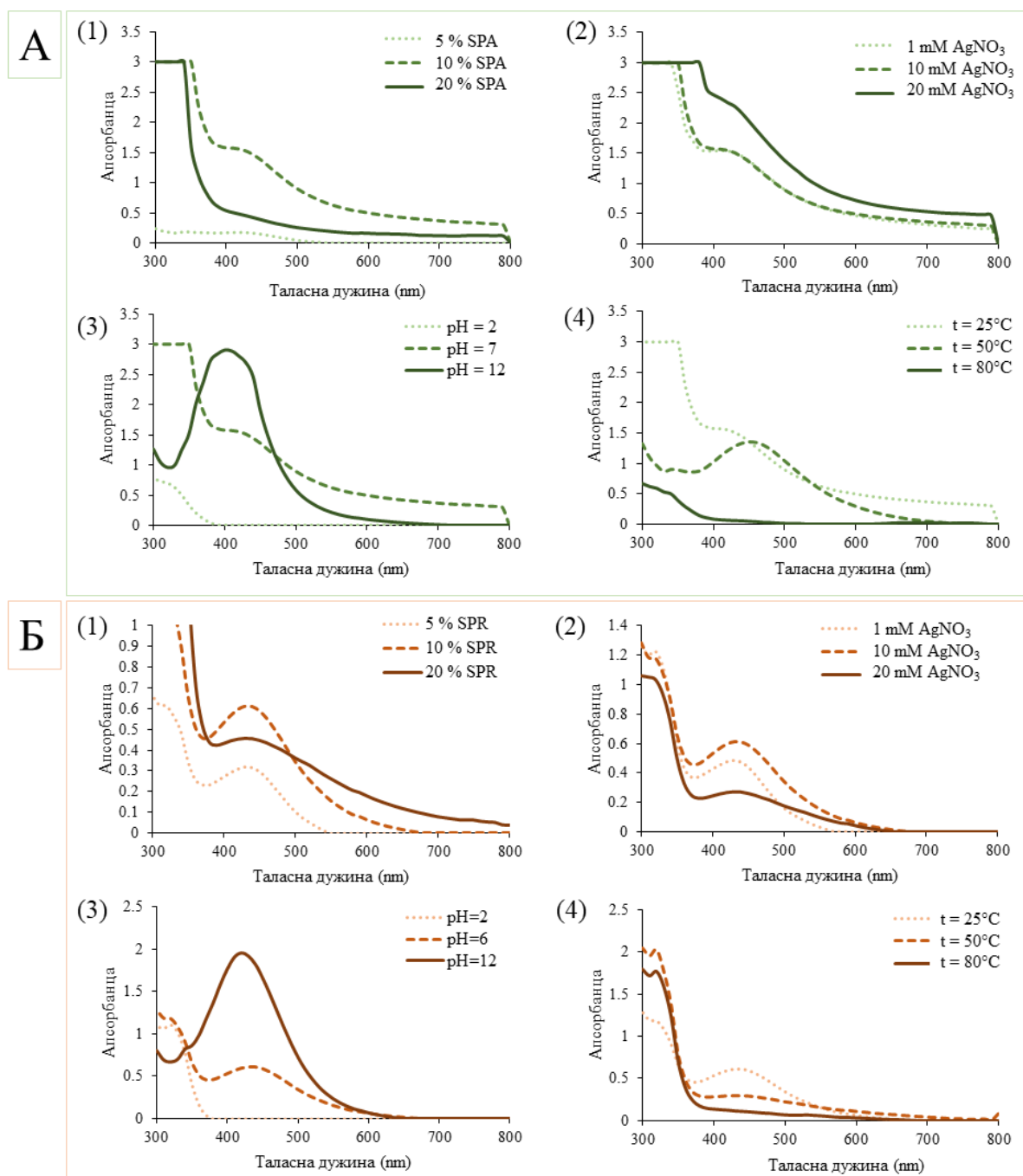
За методе карактеризације и одређивање биолошке активности, наночестице су синтетисане применом комбинације најповољнијих услова који су добијени у експериментима (**Слика 53**). Синтеза LSA-AgNPs (1) је била најуспешнија коришћењем 5% воденог екстракта, концентрације AgNO₃ 20 mM, без додатног загревања (на собној температури) и при рН 12, док су најповољнији услови за синтезу LSR-AgNPs били 20% водени екстракт, 10 mM AgNO₃, уз загревање на 80°C током 30 минута, и при рН 12 [42].



Слика 53. UV-Vis апсорпциони спектри AgNPs током синтезе помоћу екстракта надземног дела (1) и корена (2) биљке *L. salicaria* под оптималним условима[42].

У ранијим научним радовима екстракт надземног дела *L. salicaria*, такође, је успешно примењен у синтези AgNPs и AgNPs-органских нанохибрида [284]. Са друге стране, синтеза наночестица коришћењем екстракта корена *L. salicaria*, као и испитивање оптималних услова за примену ове биљке у синтези наночестица, њихове цитотоксичне и фотокаталитичке активности до сада нису испитиване.

На **Слици 54** приказана је синтеза наночестица сребра помоћу екстракта надземног дела (**А**) и корена (**Б**) биљке *S. pratensis* у зависности од промене параметара као што су концентрација екстракта (1), концентрације AgNO₃ (2), рН вредности (3) и температуре (4). Као фиксни услови су као и код претходне биљке коришћени 10% раствори екстракта, 10 mM AgNO₃, рН вредност 6 и собна температура. Променом једног по једног параметра праћена је промена у UV-Vis спектру [285].



Слика 54. UV-Vis апсорпциони спектри SPA-AgNPs (**А**) и SPR-AgNPs (**Б**) у зависности од концентрације екстракта (1), концентрације соли (2), рН вредности раствора екстракта (3) и различитих температура (4) [285].

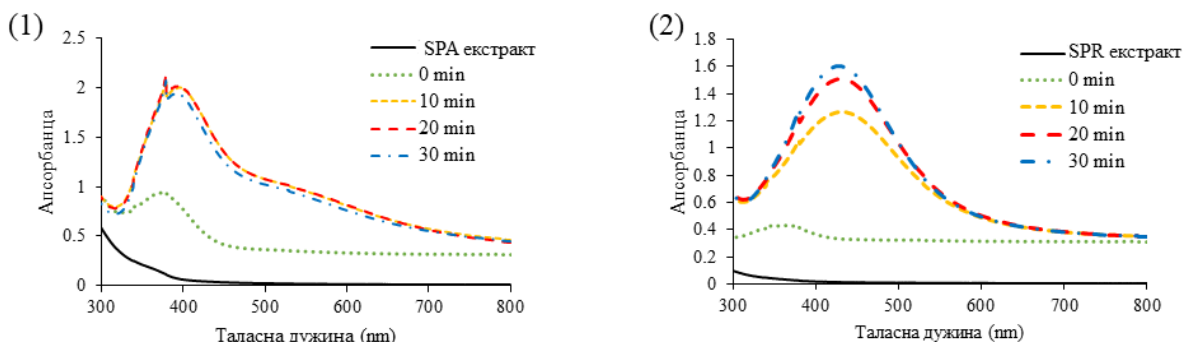
Утицај промене концентрације SPA екстракта на формирање наночестица сребра приказана је на **Слици 54 А** (1). Може се приметити да је 10% раствор екстракта показао највећи апсорпциони максимум који указује на највећи принос наночестица, док је формирање наночестица било значајно отежано при концентрацијама од 20% и 5%. Повећање концентрације AgNO_3 (**Слика 54 А** (2)) повољно је утицало на формирање наночестица. Такође, повећање рН вредности (**Слика 54 А** (3)) повећало је принос AgNPs. Интересантно је да се повећањем рН вредности максимум апсорпције помера на ниже таласне дужине. Овај феномен се може објаснити чињеницом да оптичка својства сферних наночестица сребра зависе од њиховог пречника. Веће наночестице показују

веће расејање и имају проширене и померене апсорпционе максимуме ка вишим таласним дужинама UV-Vis спектра, док наночестице мањег пречника претежно апсорбују светлост и имају оштре апсорпционе пикове око 400 nm [286]. Занимљиво је да је повећање температуре са 25 на 50°C (Слика 54 А (4)) позитивно утицало на синтезу, док је даље повећање имало негативан ефекат, што се могло визуелно уочити настанком крупнијих честица које су се таложиле на дну реакционе посуде.

Као и приликом синтезе SPA-AgNPs, 10% раствор екстракта корена најповољније је утицао на формирање SPR-AgNPs (Слика 54 Б (1)). У овом случају, примена AgNO₃ у концентрацији од 10 mM била је најефикаснија у формирању наночестица (Слика 54 Б (2)), док је у примена концентрације од 20 mM изазвала видљиво формирање агрегата и најмањи принос SPR-AgNPs. Као код синтезе наночестица сребра помоћу LSA, LSR и SPA екстракта, повећање pH вредности имало је позитиван ефекат на синтезу (Слика 54 Б (3)). Повећање температуре (Слика 54 Б (4)) у синтези наночестица са SPR екстрактом негативно је утицало на формирање наночестица што је значајно у погледу утрешка енергије у неком процесу који се може окарактерисати као зелени поступак (тј. енергетске ефикасности). Главни циљ оптимизације зелених синтеза AgNPs заправо и јесте био повећање сигурности и поузданости али и минимизирање еколошких и финансијских нежељених ефеката употребом енергетски захтевних процеса, токсичних хемикалија или генерисањем отпада.

Након завршене оптимизације услова синтезе, оба типа наночестица сребра (SPA-AgNPs и SPR-AgNPs) припремљени су комбиновањем најоптималнијих услова и тако синтетизоване коришћене су за даља испитивања (Слика 55 (1) и (2), редом). Као најоптималнији услови синтезе SPA-AgNPs коришћен је 10% раствор SPA екстракта, AgNO₃ концентрације 20 mM, при pH 12 и температури од 50°C, док се синтеза SPR-AgNPs одвијала користећи такође 10% раствор SPR екстракта, AgNO₃ концентрације 10 mM, при pH 12 и при собној температури (25°C) [285].

Процеси синтезе свих типова наночестица (LSA-AgNPs, LSR-AgNPs, SPA-AgNPs и SPR-AgNPs) одвијали су се док није постигнут највиши максимум апсорпције (30 минута) и праћени су снимањем UV-Vis спектра реакционе смеше у интервалима од 10 минута. Након тога раствори наночестица центрифугирани су на 12 000 обртаја по минути у трајању од 20 минута. Након таложења, наночестице су испране дејонизованом водом и поново центрифугиране. На крају наночестице су осушене на собној температури и чуване на хладном и тамном месту.

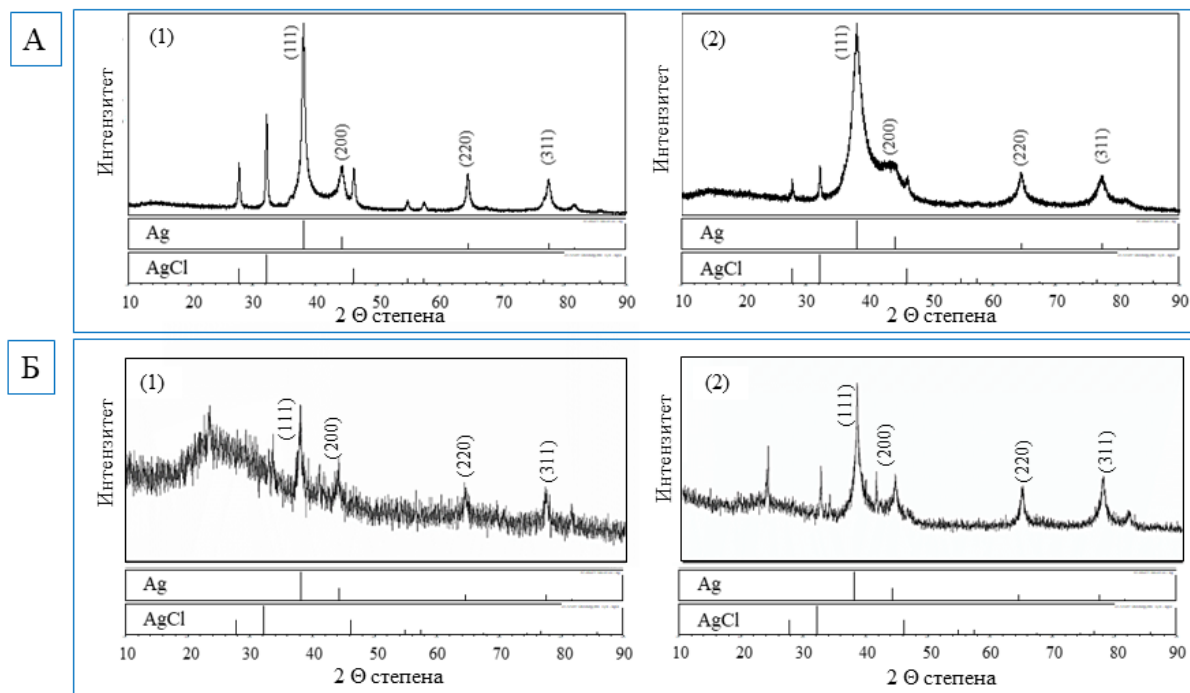


Слика 55. UV-Vis апсорпциони спектри AgNPs током синтезе помоћу екстракта надземног дела (1) и корена (2) биљке *S. pratensis* под оптималним условима [285].

4.2.2. Карактеризација добијених наночестица

4.2.2.1. Рендгенска структурна анализа (XRPD)

Кристална структура биосинтетизованих AgNPs испитана је рендгенском структурном анализом (XRPD, *X-ray powder diffraction*, енг.). На **Слици 56 А** приказани су спектри LSA-AgNPs (1) и LSR-AgNPs (2) док су на **Слици 56 Б** представљени спектри SPA-AgNPs (1) и SPR-AgNPs (2) [42,285]. На основу добијених вредности интензитета $I/Imax$, међусобних растојања d , поређења са литературним подацима и стандарда ICDD PDF-2, потврђено је присуство кристалних фаза у сва четири испитивана узорка [287].



Слика 56. (А) XRPD спектри LSA-AgNPs (1) и LSR-AgNPs (2), **(Б)** XRPD спектри SPA-AgNPs (1) и SPR-AgNPs (2) [42,285].

Најзаступљенија кристална фаза у свим узорцима била је Ag-фаза (PDF 87-0597), док је следећа по заступљености је била AgCl-фаза (PDF 31-1238). У случају LSA-AgNPs (**Слика 56 А** (1)), карактеристични пикови Брагове рефлексије појавили су се на позицијама $38,19^\circ$, $44,42^\circ$, $64,53^\circ$ и $77,46^\circ$ у 2Θ опсегу између 10 и 80, што би могло бити аналогно површински центрираним кубичним равнинама кристала AgNPs (111), (200), (220) и (311) (fcc, *face-centered cubic*, енг). Пикови који се појављују на $27,80^\circ$, $32,24^\circ$, $46,24^\circ$ одговарају формирању AgCl фаза. Сребро у узорку LSR-AgNPs има нижи кристалинитет од сребро хлорида и нижи кристалинитет од сребра у LSA-AgNPs узорку. Међутим, садржај сребро-хлорида у LSR-AgNPs био је мањи него у узорку LSA-AgNPs. Формирање кристалне фазе сребро хлорида може бити последица присуства хлоридних јона у биљним екстрактима [42].

Спектри наночестица синтетисаних помоћу водених екстраката надземног дела и корена биљке *S. pratensis* приказани су на **Слици 56 Б** ((1) и (2), редом) [285]. Поређењем са стандардом, добијени XRPD спектри су такође потврдили кристалну природу SPA-AgNPs и SPR-AgNPs, што указује на њихов нанокристални облик. Наночестице сребра синтетизоване помоћу воденог екстракта надземног дела биљке *S. pratensis* су показале Брагове дифракционе пикове на $38,14^\circ$, $44,22^\circ$, $64,4^\circ$ и $77,34^\circ$, док

су добијени врхови одговарали кубичним (fcc) кристалним равнима сребра (111), (200), (220) и (311). Нешто бољи спектар, са много мање шума, добијен је снимањем наночестица синтетизованих коришћењем екстракта корена (Слика 56 Б (2)) са пиковима на $38,04^\circ$, $44,16^\circ$, $64,54^\circ$ и $77,5^\circ$. Присуство неких биоорганичких једињења у екстрактима које се могу везати за површину наночестица сребра, као што су протеини, угљени хидрати и фенолна једињења, може одговарати неколицини неидентификованих пикова [288]. Добијени резултати су упоредиви са претходним истраживањима која су се односила на AgNPs добијене помоћу екстракта биљака [289,290].

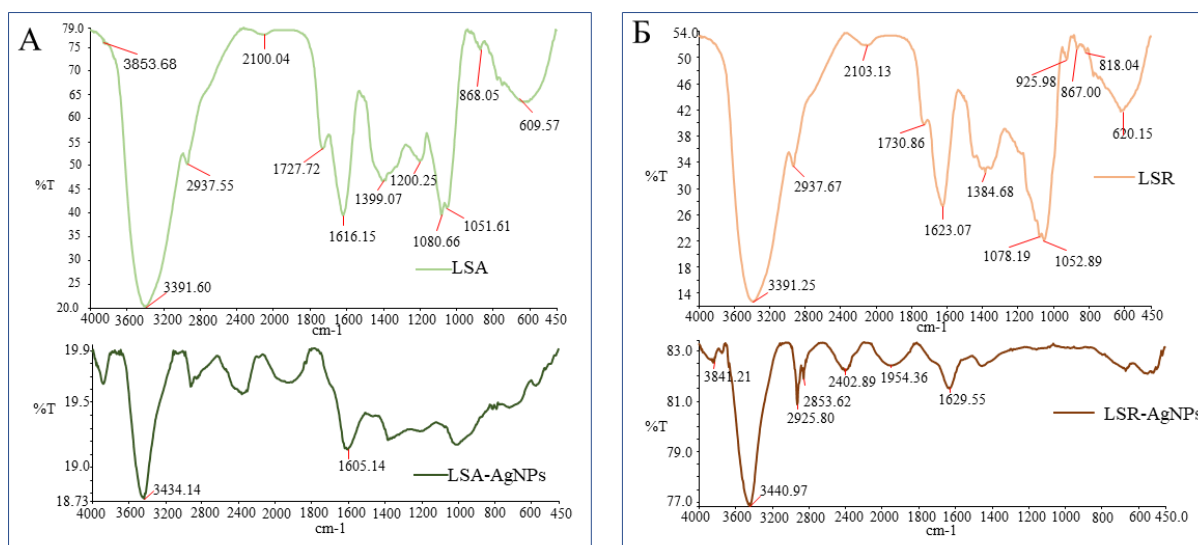
4.2.2.2. FT-IR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) анализа

Способност биомолекула присутних у екстрактима за редукцију јона сребра и стабилизацију синтетизованих наночестица потврђена је FT-IR анализом (Слика 57 и 58). У спектрима наночестица уочено је преклапање најдоминантнијих вибрационих трака које потичу од фитоједињења одговарајућег екстракта помоћу којег су синтетисане. Најизразитије функционалне групе пронађене су поређењем добијених вредности апсорпционих трака са стандардним вредностима и подацима из литературе. Због различитог степена апсорпције LSA и LSR екстракта у односу на LSA-AgNPs и LSR-AgNPs, ови спектри су приказани раздвојено како би се јасније уочило преклапање трака (Слика 57).

На Слици 57 А, приказан је FT-IR спектар осушеног воденог екстракта надземног дела биљке *L. salicaria* и спектар синтетизованих LSA-AgNPs [42]. Апсорпциона трака на $3391,60\text{ cm}^{-1}$ за LSA и $3391,25\text{ cm}^{-1}$ за LSR екстракт потиче од вибрационих истезања -OH група из фенолних једињења (флавоноида, фенолних киселина и другугих деривата фенола). Затим, апсорпциона трака ниског интензитета на $2937,55\text{ cm}^{-1}$ и $2937,67\text{ cm}^{-1}$ за LSA и LSR (Слика 57 Б), респективно, може бити последица алифатског C-H истезања. Такође, у FT-IR спектру LSA и LSR екстракта (Слика 57 (А и Б)), траке на $1727,72\text{ cm}^{-1}$ и $1730,86\text{ cm}^{-1}$ указују на присуство C=O група. Појава изражених трака на $1616,15\text{ cm}^{-1}$ и $1623,07\text{ cm}^{-1}$ одговара истезању C=C- вези у ароматичном прстену. Након поређења спектра синтетисаних наночестица LSA-AgNPs и LSR-AgNPs са спектрима одговарајућих екстракта, у њима се јасно уочавају траке које потичу из биљног екстракта. LSA-AgNPs и LSR-AgNPs поседују траке на $3434,14\text{ cm}^{-1}$ и $3440,97\text{ cm}^{-1}$, респективно, које одговарају групама алкохола, док LSR-AgNPs поседују и траку на $2925,80\text{ cm}^{-1}$ за коју је одређено да потиче од истезања C-H везе из алкана. Појава ових трака у LSA-AgNPs и LSR-AgNPs у FT-IR спектрима имплицира да су једињења из екстракта *L. salicaria* укључена у формирању површинског слоја који је задужен за стабилизацију и растворљивост наночестица. Међутим, пикови који потичу C=O групе у спектрима наночестица су смањени и скоро потпуно спојени са интензивном траком која одговара ароматичним C=C- вибрацијама.

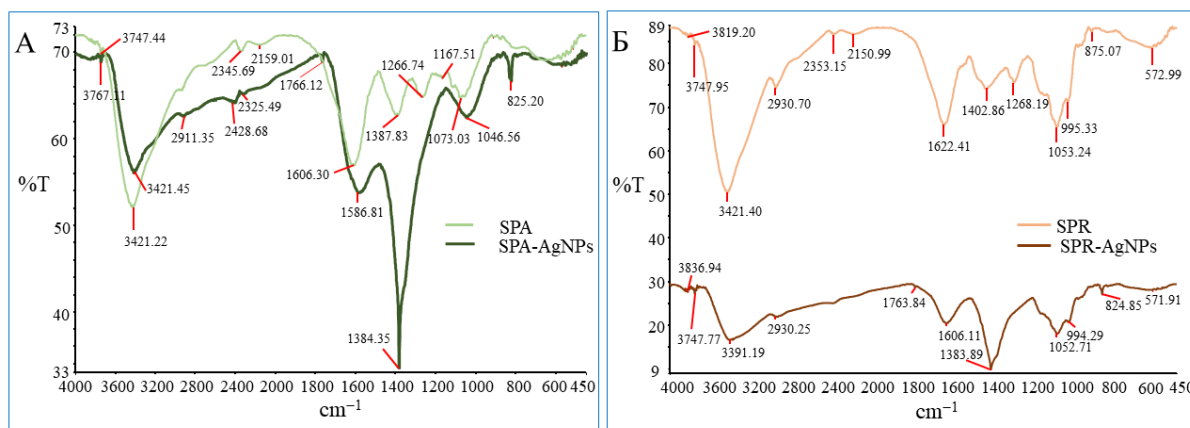
Смањење интензитета пика карактеристичног за карбонилну групу (C=O) у спектру наночестица (LSA-AgNPs и LSR-AgNPs) може се приписати ниској концентрацији једињења која поседују ову групу и која су учествовала у формирању и стабилизацији наночестица. Поред тога, интеракција наночестица сребра са карбонилном групом (интеракције сребро-карбоксилат) може смањити интензитет и позицију траке која припада C=O групи у FT-IR спектру [291]. Затим, карактеристични пикови на $1605,14\text{ cm}^{-1}$ и $1623,55\text{ cm}^{-1}$ у добијеним наночестицама могу одговарати C=C- вези алкена, α,β - незасићених кетона или ароматичног прстена (трака за C=C-C из аромата се појављује у области $1615\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$) [292] који су потврђени и у екстрактима. Интензивне траке лоциране на $1051,61\text{ cm}^{-1}$ и $1052,89\text{ cm}^{-1}$ (Слика 57 А и Б) које одговарају

C–O вези из алкохола, фенола или естара биле су присутне у LSA и LSR екстрактима, али не у LSR-AgNPs, па се може претпоставити да једињења са овом групом нису одговорна за стабилизацију наночестица корена или су присутна у ниској концентрацији. Наведене траке у FT-IR спектрима LSA-AgNPs и LSR-AgNPs карактеристичне за полифенолна једињења указују на то да флавоноиди или друга фенолна једињења формирају заштитне слојеве на површини добијених наночестица. Нестанак трака на 1052,89, 1078,19 и 1384,68 cm^{-1} у LSR-AgNPs у поређењу са LSR екстрактом, указује на то да не учествују сва присутна једињења из екстраката у стабилизацији наночестица. Такође постоји могућност да се она могу хемијски променити током биоредукције металних јона. На **Слици 57** приказани су раздвојени спектри екстраката биљке *L. salicaria* и њихових одговарајућих наночестица због различитог интензитета трансмисије и немогућности правилног преклапања [42].



Слика 57. FT-IR спектар водених екстраката надземног дела (**А**, LSA) и корена (**Б**, LSR) биљке *L. salicaria* и одговарајућих синтетисаних наночестица LSA-AgNPs (**А**) и LSR-AgNPs (**Б**) [42].

На **Слици 58 А** приказани су спојени спектри SPA екстракта и SPA-AgNPs док су на **Слици 58 Б** приказани FT-IR спектри SPR екстракта и одговарајућих SPR-AgNPs наночестица. Као и код спектра екстраката и наночестица синтетисаних помоћу биљке *L. salicaria*, као најдоминантнија трака и у овом случају појављује се трака која потиче од -ОН групе. Дакле, упоређивањем спектра SPA и SPA-AgNPs такође је постојала коинциденција апсорпционих трака на 3391,19 cm^{-1} за SPA-AgNPs и 3421,45 cm^{-1} за SPA. Алифатско -C-H истежање је представљено траком на 2930,70 cm^{-1} у SPR спектру, која се такође појављује и у SPR-AgNPs спектру на 2930,25 cm^{-1} [285].



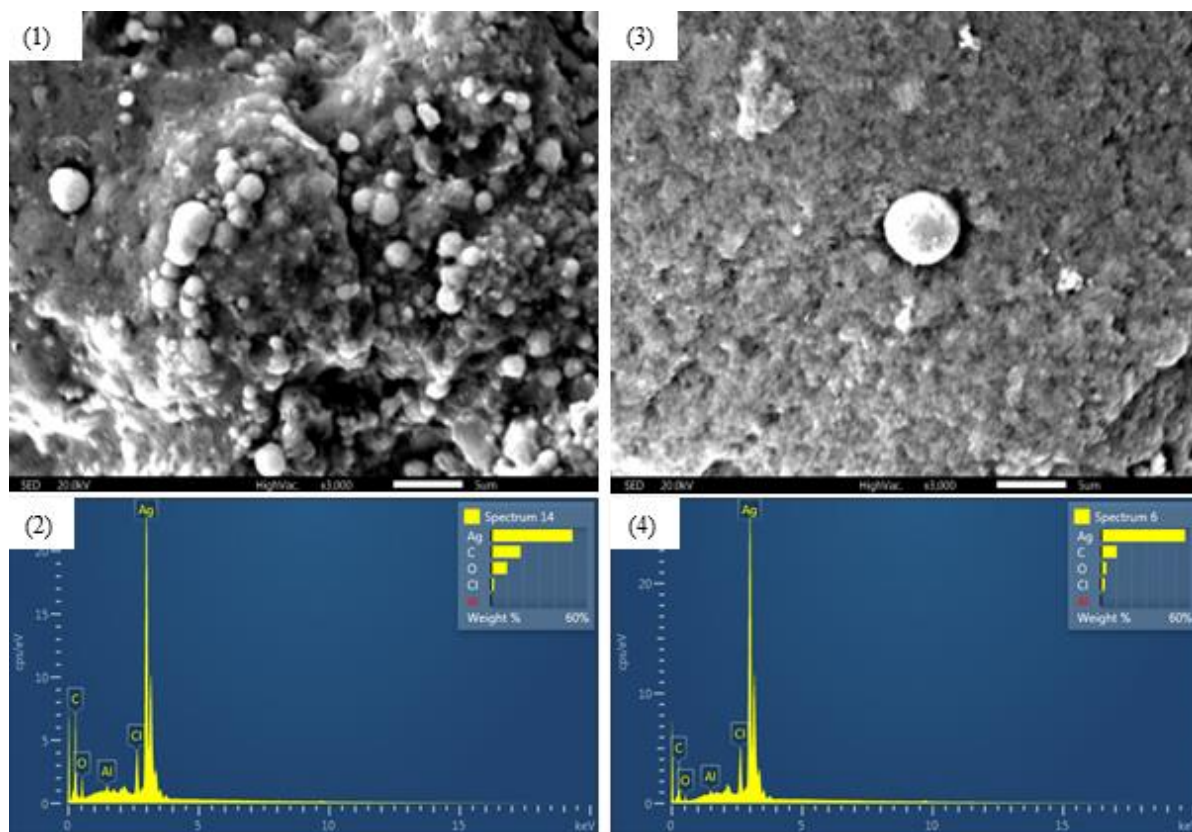
Слика 58. FT-IR спектар водених екстраката надземног дела (А, SPA) и корена (Б, SPR) биљке *S. pratensis* и одговарајућих наночестица сребра синтетисаних помоћу њих (SPA-AgNPs и SPR-AgNPs) [285].

Изражене траке на $1622,41\text{ cm}^{-1}$ за SPR и $1606,30\text{ cm}^{-1}$ за SPA такође су биле присутне у спектрима одговарајућих наночестица SPA-AgNPs и SPR-AgNPs. Ове широке траке могу одговарати -C=C-C у ароматичним прстеновима, али изгледа да су интегрисане са тракама које потичу од траке истезања на око 1730 cm^{-1} , карактеристичне за -C=O групу деривата карбоксилних киселина као и за C=O групу C прстена флавона. Затим, траке на $1387,83$ и $1402,86\text{ cm}^{-1}$ у SPA и SPR спектру, респективно, могу потицати од C-O везе карбоксилних киселина или естара, и O-H алкохола и фенола [290,293]. Присуство истих трака у SPA-AgNPs ($1384,35\text{ cm}^{-1}$) и SPR-AgNPs ($1383,89\text{ cm}^{-1}$) сугерише да једињења са овим функционалним групама имају висок афинитет везивања за синтетизоване наночестице сребра и њихову стабилизацију.

4.2.2.3. SEM/EDS (Scanning Electron Microscope/Energy-dispersive X-ray spectroscopy) анализа

Додатне информације о структурној морфологији синтетизованих наночестица добијене су SEM анализом, док је EDS анализа коришћена за идентификацију елемената присутних у структури синтетисаних AgNPs [42,285]. SEM анализом (Слике 59 и 60) је потврђено да су наночестице синтетисане помоћу екстраката обе биљке углавном сферног облика, док су већи агломерати имали благо хексагоналну структуру нарочито када су у питању SPA-AgNPs и SPR-AgNPs. Уочене веће агломерисане наночестице су вероватно настале као резултат испаравања растварача током припреме узорка пре анализе. Међутим, био је видљив и велики број малих честица нано димензија. Њихова нано димензија је потврђена DLS анализом, која је снимљена коришћењем раствора наночестица. О резултатима DLS анализе биће више речи у следећем одељку.

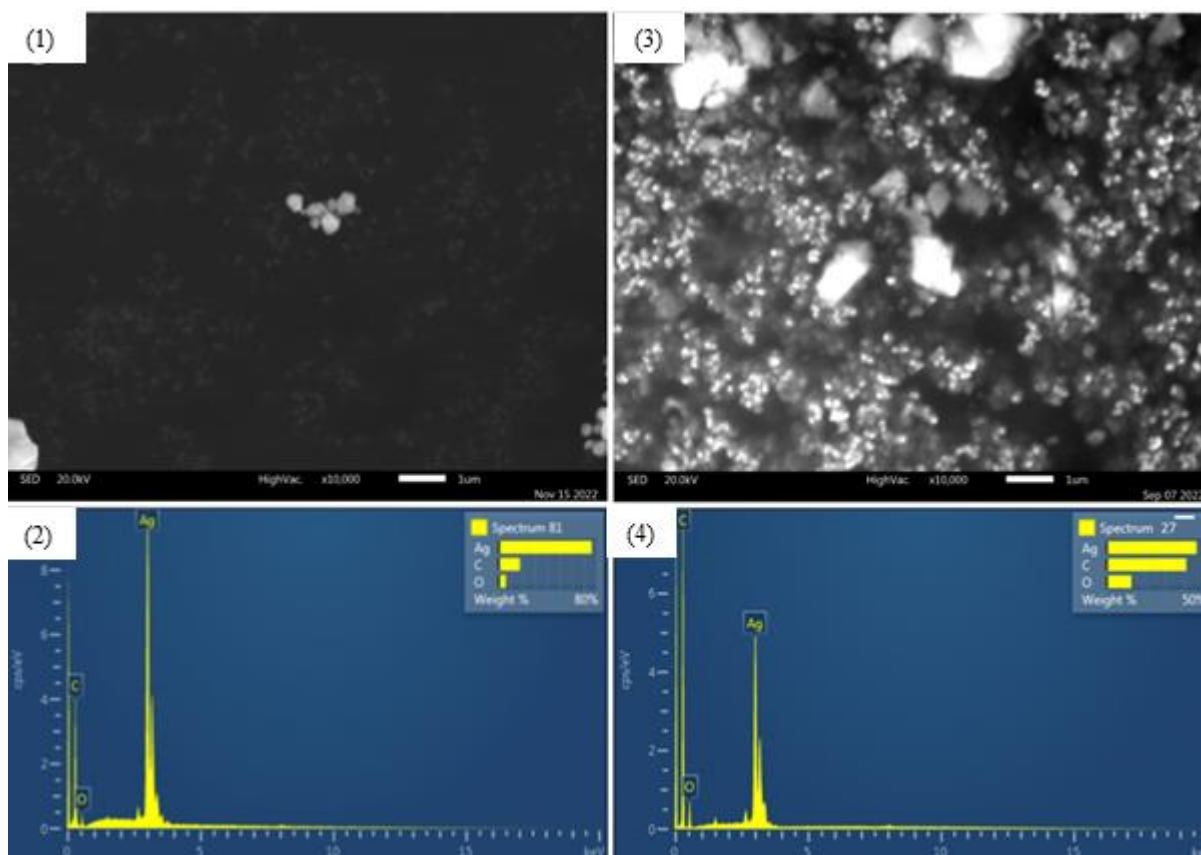
Резултати SEM и EDS анализа за LSA-AgNPs и LSR-AgNPs су представљени на Слици 59. На основу резултата SEM анализе уочено је да су узорци приликом сушења формирали агломерате који су микродимензија, веће групе спојених наночестица које су највероватније сферног облика. Сlike SEM и EDS анализе SPA-AgNPs и SPR-AgNPs приказане су на Слици 60.



Слика 59. Површина LSA-AgNPs (1) и LSR-AgNPs (3) сликана скенирајућим електронским микроскопом (SEM) у комбинацији са елементалном анализом (EDS) (2 и 4, редом) [42].

EDS анализа је показала интензивне сигнале атома сребра у оба типа наночестица на око 3 KeV, што одговара претходно објављеним вредностима [294]. Поред атома Ag као главне компоненте наночестица, такође је потврђено присуство атома C и O и у LSA-AgNPs и у LSR-AgNPs (Слика 59 (2 и 4)). Појава C и O у наночестицама може бити последица присуства једињења из екстракта *L. salicaria* уграђених у структуру наночестица. Елементална анализа LSA-AgNPs и LSR-AgNPs показала је да највећи удео у масе наночестица чини Ag и то 50,92% и 45,66%, редом. Присуство атома Al у оба узорка наночестица може се објаснити минералним садржајем биљног материјала који највише зависи од земљишта биљног станишта. Vardanyan & Ingole су потврдили присуство Al у биљци *L. salicaria*, те се његово присуство у структури добијених наночестица може довести у везу са минералним садржајем биљке [295]. Такође, садржај Cl може да потиче од биљних екстракта, док повећан садржај C и O у наночестицама синтетисаним помоћу надземног дела биљке (LSA-AgNPs) одговара већем садржају фенола у надземном делу.

На основу добијених EDS спектра за SPA-AgNPs и SPR-AgNPs (Слика 60 (2 и 4)), оба типа наночестица су се састојала у највећем проценту од атома сребра, затим угљеника и кисеоника. Идентификовани кисеоник у EDS спектрима синтетизованих наночестица највероватније потиче од полифенолних једињења. Наночестице сребра синтетизоване коришћењем SPR екстракта садрже већи проценат угљеника и кисеоника од SPA-AgNPs, што сугерише да SPR-AgNPs могу садржати већу количину фитоједињења, првенствено фенолних једињења, везаних за њихову површину.



Слика 60. Површина SPA-AgNPs (1) и SPR-AgNPs (3) сликана скенирајућим електронским микроскопом (SEM) у комбинацији са елементалном анализом (EDS) (2 и 4, редом) [285].

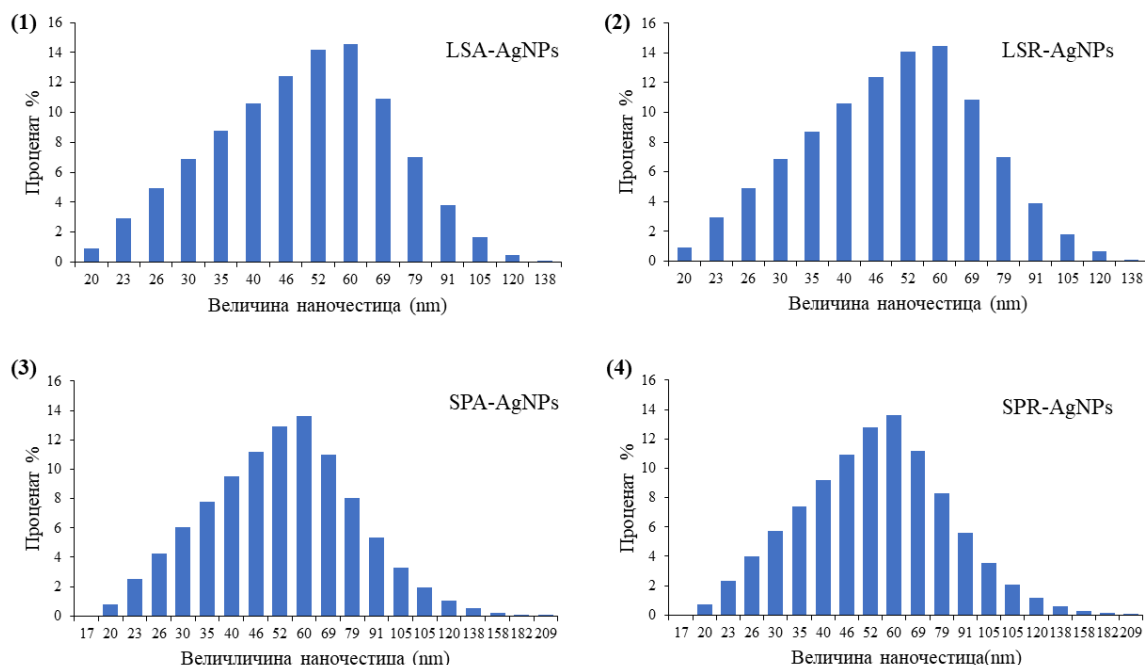
4.2.2.4. Величина добијених наночестица у раствору одређена помоћу DLS (Dynamic Light Scattering) анализе

Због склоности наночестица сребра синтетисаних поступком зелене синтезе помоћу биљних екстраката да агрегирају током сушења, њихова величина је одређена анализом динамичког расејања светлости (DLS, *Dynamic Light Scattering*, енгл) у раствору наночестица [42,285]. Ова техника се заснива на праћењу Брауновског кретања наночестица у раствору, које се дешава насумично у свим правцима, при чему се мање честице крећу брже од већих. Опсег мерења динамичког расејања светлости је стога ограничен на честице величине до 10 μm јер су веће честице претешке да би показале Брауново кретање [296]. Поред утицаја pH и температуре током реакције синтезе, многи биомолекули из биљних екстраката (протеини, флавоноиди, терпеноиди и други полифеноли) могу имати значајне ефекте на величину, структуру наночестица и њихову морфологију. Такође, многе студије су показале да је величина наночестица сребра важна за њихову стабилност, биокompatibilност и антибактеријску активност [297].

На основу резултата DLS анализе који су графички приказани на **Слици 61**, јасно се уочава да су димензије свих типова наночестица биле сличне. Величина LSA-AgNPs и LSR-AgNPs кретала се у распону од 20 до 138 nm (**Слика 61** ((1) и (2), редом) док се величина SPA-AgNPs и SPR-AgNPs кретала од 17 до 209 nm (**Слика 61** ((3) и (4), редом). Највећи проценат LSA-AgNPs и LSR-AgNPs имао је пречник између 35 и 60 nm (60,52 и 60,25%, респективно), при чему је око 75% од честица имало испод 60 nm за оба типа

синтетизованих наночестица. Сложеност хемијског састава екстракта биљке *L. salicaria* може имати значајне ефекте на величину односно на агрегацију и таложење AgNPs.

Највећи проценат SPA-AgNPs и SPR-AgNPs имале су пречник од 35 до 79 nm. Примећено је да је 98% SPA-AgNPs имало пречник мањи од 79 nm, док је код SPR-AgNPs то био нешто мањи проценат (86,22%). Код сва четири типа добијених наночестица примећено је да наведени процент, око 14%, наночестица има пречник 60 nm.



Слика 61. Дистрибуција величина синтетисаних наночестица помоћу DLS анализе [42,285].

Добијени резултати су у складу са резултатима многих других истраживача који су успешно синтетисали наночестице сребра сличних димензија користећи различите биљке [34]. Према подацима из литературе, неке од AgNPs најмањих димензија синтетисаних помоћу екстракта биљака добијене су коришћењем екстракта питеме желфије (*Salvia officinalis* L.), док се коришћењем екстракта невена (*Calendula officinalis* L.) добијају наночестице знатно већих димензија [285]. Сматра се да алкална средина доводи до повећања негативног наелектрисања кисеоника на фенолним хидроксилним групама, што доприноси бољој интеракцији између фитохемикалија и јона сребра, а самим тим и бржој редукцији и стабилизацији. *Bhutto* и сар. је предложио механизам синтезе AgNPs користећи галну киселину као пример фенолног једињења, објашњавајући да се фенолне групе оксидују у хиноне [298]. Друга студија је потврдила да флавоноиди који поседују једну до три ОН група реагују само при рН вредностима 9 и/или 10, док флавоноиди са четири и више хидроксилних група, као што је лутеолин (агликон ориентина), могу релативно брзо да редуктују Ag^+ у раствору са рН око 7. Висока реактивност флавоноида у овом процесу условљена је присуством хидроксилних група на Б прстену које се лако могу оксидовати. Даље, додатне хидроксилне групе флавоноида и њихови добијени оксидациони облици након реакције редукције су важни за везивање молекула флавоноида за добијене наночестице и за њихову стабилизацију [299]. Ориентин поседује ова својства и може бити један од молекула у екстрактима *L. salicaria* који доприносе формирању и стабилизацији наночестица добијених коришћењем екстракта ове биљке.

4.2.3. Фитохемијска карактеризација водених екстраката надземних делова и корена биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*

Биљке са високим антиоксидативним потенцијалом су ефикасније у редукцији металних јона и формирању наночестица метала, а с обзиром да су фенолна једињења једни од метаболита најодговорнијих за антиоксидативну активност биљака, сматрају се главним фактором који доприноси редукцији јони метала и синтези наночестица коришћењем биљних екстраката. Из тог разлога одређен је садржај ових једињења у испитиваним воденим екстрактима надземних делова и корена биљака *L. salicaria* (LSA и LSR) и *S. pratensis* (SPA и SPR) (Табела 15) [42,285]. Садржај укупних фенолних једињења у испитиваним екстрактима се није битније разликовао, међутим, водени екстракт надземног дела биљке *L. salicaria* (LSA) био је знатно богатији у садржају флавоноида (18,29 mg QUE/g суве биљке) од екстракта надземног дела биљке *S. pratensis* (SPA) (8,65 mg QUE/g суве биљке). Водени екстракт надземног дела и корена *L. salicaria*, коришћен за синтезу наночестица сребра, садржао је укупна фенолна једињења у концентрацијама од 99,56 и 26,44 mg GAE/g суве масе биљке. Екстракти SPA и SPR су садржали нешто нижу концентрацију укупних фенолних једињења у односу на LSA и LSR, при чему се у SPA екстракту налазило 79,39 mg GAE/g суве биљке док је SPR екстракт садржао 21,61 mg GAE/g суве масе биљке. За разлику од укупног фенолног садржаја, флавоноиди нису детектовани у SPR екстракту док су се у LSR екстракту налазили у траговима (0,19 mg QUE/g суве биљке). Већи садржај укупних фенола и флавоноида у екстракту надземног дела *L. salicaria* може објаснити употребу ниже концентрације овог екстракта за синтезу LSA-AgNPs у поређењу са коришћеном концентрацијом LSR екстракта.

Табела 15. Спектрофотометријско одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја водених екстраката надземних делова и корена биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*.

Водени екстракти	Укупни фенолни садржај (mg GAE/g суве биљне масе)	Укупни флавоноидни садржај (mg KVE/g суве биљне масе)
LSA	99,56 ± 2,14	18,29 ± 0,95
LSR	26,44 ± 0,81	0,19 ± 0,02
SPA	79,39 ± 3,30	8,65 ± 0,94
SPR	21,61 ± 0,51	н.д.

н.д.- није детектовано; GAE – (gallic acid equivalents, енг.); QUE – (quercetin equivalents, енг.)

У поређењу са претходно приказаним резултатима садржаја фенолних једињења у метанолским екстрактима ових биљака водени екстракти корена обе биљке су поседовали знатно нижи садржај фенолних једињења у односу на екстракте надземних делова што код метанолских екстраката није био случај. Сама претпоставка да су фенолна једињења која су присутна у биљкама одговорна за синтезу и стабилизацију наночестица метала, потврђена је у многим студијама где је показана синтеза наночестица сребра и злата помоћу рузмариноке и кафеинске киселине, кверцетина и рутина. При чему су добијене наночестице показале добру антиоксидативну, антиинфламаторну, антимикуробну и антиканцерогену активност [48,300–302].

Поређењем резултата садржаја фенолних једињења у екстрактима и добијених оптималних услова за синтезу AgNPs, не може се извести јасна корелација утицаја садржаја укупних фенолних једињења са условима синтезе. Једино се може приметити да је за синтезу LSA-AgNPs било нијоптималније коришћење концентрације LSA од 5%, што је најнижа примењена концентрација од испитиваних екстраката, у овом раду, за синтезу AgNPs и да је LSA садржао највећу количину укупних фенолних једињења и

флавоноида од свих примењених екстраката. Са друге стране LSR и SPR су садржали врло сличне концентрације укупних фенолних једињења и флавоноида али су оптималне концентрације за синтезу AgNPs помоћу ових екстраката биле 20% и 10%, редом. Највероватније, услови за синтезу AgNPs применом биљних екстраката не зависе само од укупног садржаја фенолних једињења, већ и од врсте и особина самих фитоједињења присутних у екстракту али и да се екстракти са високим садржајем фенолних једињења могу примењивати у нижим концентрацијама приликом синтезе AgNPs.

4.2.4. Антиоксидативни потенцијал водених екстраката и синтетисованих наночестица сребра

Антиоксидативна активност водених екстраката и синтетисаних наночестица сребра је процењена применом DPPH и ABTS методе [42,285]. Као референтни стандард коришћен је бутиловани хидрокситолуен (BHT) и добијени резултати су приказани у **Табели 16**. Сва четири типа наночестица су показала значајно већу антиоксидативну активност у неутрализацији ABTS радикал катјона него DPPH радикала. Разлике у добијеним резултатима за антиоксидативну активност наночестица између ове две коришћене методе за одређивање антиоксидативне активности највероватније се огледају у различитим реакционим механизмима. Наночестице сребра синтетисане помоћу биљке *L. salicaria* (LSA-AgNPs и LSR-AgNPs) су показали нижу антиоксидативну активност у DPPH методи у поређењу са одговарајућим воденим екстрактима LSA и LSR. Примећено је да је IC₅₀ вредност LSR-AgNPs у ABTS тесту била нижа (127,78 µg/mL) у поређењу са IC₅₀ вредношћу LSA-AgNPs (141,66 µg/mL). Штавише, LSR-AgNPs су показале већу антиоксидативну активност приликом инхибиције ABTS радикал катјона у поређењу са воденим екстрактом корена (LSR). Супротно томе, LSA имао је нешто већи потенцијал уклањања ABTS^{•+} у поређењу са LSA-AgNPs.

Табела 16. *In vitro* антиоксидативна активност синтетисаних наночестица и одговарајућих водених екстраката.

Узорци и стандард	IC ₅₀ вредност (µg/mL)	
	DPPH [•] радикал	ABTS ^{•+} радикал катјон
LSA	86,38 ± 0,13	65,33 ± 2,08
LSA-AgNPs	> 100	141,66 ± 17,05
LSR	175,26 ± 6,31	198,36 ± 11,75
LSR-AgNPs	> 100	127,78 ± 13,52
SPA	101,18 ± 7,00	42,62 ± 7,89
SPA-AgNPs	83,54 ± 4,23	21,88 ± 3,33
SPR	130,19 ± 14,84	192,44 ± 12,55
SPR-AgNPs	93,11 ± 11,23	74,55 ± 9,25
BHT	13,08 ± 0,97	21,29 ± 1,98

^aLSA – водени екстракт надземног дела *L. salicaria*, LSR – водени екстракт корена *L. salicaria*, LSA-AgNPs – наночестице сребра синтетисане помоћу надземног дела биљке *L. salicaria*, LSR-AgNPs – наночестице сребра синтетисане помоћу корена биљке *L. salicaria*, SPA – водени екстракт надземног дела *S. pratensis*, SPR – водени екстракт корена *S. pratensis*, SPA-AgNPs – наночестице сребра синтетисане помоћу надземног дела биљке *S. pratensis*, SPR-AgNPs – наночестице сребра синтетисане помоћу корена биљке *S. pratensis*.

Анализирањем резултата добијених за наночестице синтетисане помоћу биљке *S. pratensis* примећено је да SPA-AgNPs имају већи антиоксидативни потенцијал (IC₅₀ за DPPH методу 83,54 µg/mL; IC₅₀ за ABTS методу 21,88 µg/mL) у поређењу са SPR-AgNPs.

Ово се може објаснити већим садржајем полифенола у SPA екстракту и последично већим садржајем полифенола на површини формираних SPA-AgNPs (Табеле 15 и 16). Поред тога, пошто се биолошки и физички квалитети наночестица побољшавају смањењем њихове величине услед повећања контактне површине, просечно мањи пречник SPA-AgNPs је такође допринео њиховим већим антиоксидативним својствима. SPR водени екстракт је показао слабија антиоксидативна својства, па су стога наночестице синтетизоване коришћењем овог екстракта (SPR-AgNPs) имале слабији антиоксидативни капацитет у поређењу са SPA-AgNPs. SPR-AgNPs неутралисале су DPPH радикал за 50% при концентрацији од 93,11 $\mu\text{g/mL}$, док је IC_{50} вредност према ABTS радикал катјону била 74,55 $\mu\text{g/mL}$. У другим истраживањима показани су слични резултати, Gecer и сар. су испитивали антиоксидативни потенцијал наночестица сребра синтетизованих помоћу биљке *Salvia aethiopis* при чему су потврдили да синтетизоване наночестице имају већи потенцијал да неутралишу DPPH радикале у поређењу са одговарајућим екстрактом [290]. У овом истраживању, наночестице су показале већу активност, у ABTS методи, у поређењу са ВНТ и тролоксом, који су коришћени као стандардна једињења. Већина истраживања су показала да синтетизоване наночестице имају већи антиоксидативни потенцијал од екстракта који се користи за њихову синтезу, али постоје и нека са супротним резултатима. Синтезом наночестица сребра помоћу *Juglans regia* екстракт, Khorrami и сар. су закључили да антиоксидативни потенцијал наночестица може бити одраз истовремено њиховог каталитичког дејства и активности полифенола, који су одговорни за њихову антиоксидативну активност [187]. Међутим пресудну улогу на антиоксидативну активност овако синтетисаних наночестица имају првенствено фитоједињења које су везана на њиховој површини.

4.2.5. Антимикробни потенцијал синтетисаних наночестица сребра

Бројне студије су потврдиле антимикробна својства наночестица сребра синтетисаних помоћу биљака на различитим врстама бактерија, гљива и паразита [169,194,200,303]. Већина истраживања која су се бавила испитивањем антимикробне активности наночестица сребра користила су диск дифузиони тест за одређивање степена активности. Међутим, диск дифузиони тест се користи за одређивање антимикробне осетљивости микроорганизама на антимикробне лекове, док се коришћењем дилуционе методе и одређивањем MIC вредности може доћи и до прецизније дозе за примену испитиване супстанце у лечењу инфекција. У овој студији, метода микродилуције је коришћена за одређивање антибактеријске (Табела 17) и антифунгалне (Табела 18) активности наночестица синтетизованих помоћу екстраката биљака *L. salicaria* (LSA-AgNPs и LSR-AgNPs) и *S. pratensis* (SPA-AgNPs и SPR-AgNPs) [42,285]. Синтетисане наночестице су показале изржену антибактеријску активност са MIC вредностима, претежно, 0,3125, 0,625 mg/mL или нижим према већини коришћених бактеријских врста. Антибактеријска активност за LSA-AgNPs и LSR-AgNPs није се битније разликовала према већини бактерија, при чему су се MIC вредности кретале у опсегу од 0,156 до 0,625 mg/mL . Добијене MIC вредности за антибактеријску активност наночестица синтетисаних помоћу воденог екстракта надземног дела (SPA-AgNPs) и корена (SPR-AgNPs) биљке *S. pratensis* биле су у нежем опсегу (Табела 17) [42,285].

Табела 17. Антибактеријска активност синтетисаних наночестица [42,285].

Бактеријске врсте	MIC*				
	LSA-AgNPs	LSR-AgNPs	SPA-AgNPs	SPR-AgNPs	Цип.
<i>B. cereus</i>	0,3125	0,3125	1,25	< 0,0391	20
<i>B. subtilis</i>	0,156	0,625	2,5	< 0,0391	10
<i>S. epidermidis</i>	< 0,156	0,3125	0,625	0,156	2,5
<i>S. aureus</i>	0,3125	0,625	0,625	< 0,0391	2,5
<i>S. typhimurium</i>	1,25	0,625	2,5	0,156	5
<i>S. enteritidis</i>	1,25	0,625	< 0,0391	< 0,0391	< 0,3125
<i>E. faecalis</i>	0,3125	0,625	< 0,0391	< 0,0391	< 0,3125
<i>E. coli</i>	0,625	2,5	0,625	2,5	0,625
<i>K. pneumoniae</i>	0,3125	0,625	0,3125	< 0,0391	< 0,3125
<i>M. lysodeikticus</i>	0,625	0,156	0,625	0,156	< 0,3125
<i>P. aeruginosa</i>	< 0,156	0,3125	< 0,0391	< 0,0391	< 0,3125

Цип. – ципрофлоксацин; *Вредности MIC за наночестице су изражене у mg/mL, док су за ципрофлоксацин у µg/mL.

Поређењем добијених MIC вредности, SPA-AgNPs су показале слабију инхибиторну активност према већини тестираних бактерија у поређењу са SPR-AgNPs. Највећа минимална инхибиторна концентрација SPA-AgNPs уочена је код *B. subtilis* и *S. typhimurium* (2,5 mg/mL), док су најосетљивије бактерије биле *E. faecalis*, *S. enteritidis* и *P. aeruginosa*, код којих су и најниже тестиране концентрације зауставиле њихов раст (MIC < 0,0391 mg/mL). С друге стране, SPR-AgNPs су показале MIC ниже од најниже примењене концентрације (< 0,0391 mg/mL) према скоро свим бактеријама. Најотпорнији бактеријски сојеви према дејству SPR-AgNPs били су *E. coli* (MIC 2,5 mg/mL), *S. epidermidis* (MIC 0,156 mg/mL), *S. typhimurium* (MIC 0,156 mg/mL) и *M. lysodeikticus* (MIC 0,156 mg/mL). Интересантно је да је и метанолски екстракт корена *S. pratensis* показао изузетну антибактеријску активност (Табела 12), што сугерише да су управо једињења из екстракта корена која поседују антибактериску активност инкорпорирана на површину наночестица и на тај начин утичу на повећање антибактеријског ефекта SPR-AgNPs. Оба типа наночестица (SPA-AgNPs и SPR-AgNPs) показале су висок степен антибактеријске активности према *P. aeruginosa*, *E. faecalis* и *S. enteritidis* (MIC < 0,0391 mg/mL) [285].

Такође, не може се занемарити ни активност LSA-AgNPs према *P. aeruginosa* (MIC < 0,156 mg/mL) што је знатно бољи резултат у поређењу са наночестицама сребра синтетизованим помоћу бактерије *Pseudomonas hibiscicola* у истраживању које су спровели Punjabi и сар. [41]. Поред тога, употребом још једне биљке из породице Lythraceae и то *Lagerstroemia speciosa*, добијене су наночестице које су такође показале добру инхибицију формирања биофилма бактерије *P. aeruginosa* [304]. Студија коју су спровели Shu и сар. потврдила је да ампицилин у комбинацији са наночестицама сребра има значајно већу антибактеријску активност према високо резистентној *E. coli*-Amp⁺ у поређењу са резултатима где је коришћен само ампицилин [305]. Коришћењем електронске микроскопије, Xia и сар. су показали да наночестице сребра разарају ћелијски зид, инфилтрирају се у ћелије, оштећују органеле, индукују кондензацију и маргинализацију хроматина, што је знак апоптотичке смрти ћелије [306]. Такође, потврђено је да величина наночестица има утицај на њихову антимикуробну активност, наночестице мањих димензија несметано пролазе кроз ћелијску мембрану, изражавајући своју активност унутар ћелије. Према објављеним студијама, антимикуробна активност наночестица сребра се приписује и електростатичкој интеракцији између позитивно наелектрисаних јона сребра и негативно наелектрисаног ћелијског зида. Због мало

другачије ћелијске мембране гљива, састављене углавном од фиброзног β -1,3 глукана, хитина и манопротеина, њихова интеракција са наночестицама сребра је прилично другачија [307]. Ова чињеница може бити један од узрока нешто ниже антифунгалне активности добијених наночестица у поређењу са антибактеријском активношћу, нарочито за наночестице које су синтетисане помоћу екстракта надземних делова обе биљне врсте (LSA-AgNPs и SPA-AgNPs).

Раст гљива инхибиран је применом знатно ниже концентрације LSR-AgNPs у поређењу са LSA-AgNPs (Табела 18). LSA-AgNPs су показале MIC вредности за шест врста гљивица изнад 1 mg/mL. Најосетљивије гљивичне врсте према LSA-AgNPs биле су *P. cyclopium* (MIC < 0,156 mg/mL) и *P. canescens* (MIC 0,3125 mg/mL), док су најрезистентније биле *A. brasiliensis* и *F. oxysporum* чије су MIC вредности биле 10 mg/mL. MIC вредности добијене за LSR-AgNPs су се најчешће кретале између 0,3125 и 0,625 mg/mL код већине коришћених гљива, изузетак чине *T. longibrachiatum* и *C. albicans* чија је MIC вредност била 1,25 mg/mL [42].

Табела 18. Антифунгални потенцијал синтетисаних наночестица [42,285].

Културе гљива	MIC*				
	LSA-AgNPs	LSR-AgNPs	SPA-AgNPs	SPR-AgNPs	Нистатин
<i>P. cyclopium</i>	< 0,156	0,625	> 10	< 0,0391	2,5
<i>P. canescens</i>	0,3125	0,625	> 10	< 0,0391	2,5
<i>T. harzianum</i>	1,25	0,625	0,3125	0,156	5
<i>T. longibrachiatum</i>	1,25	1,25	1,25	0,156	5
<i>D. stemonitis</i>	2,5	0,625	> 10	0,625	2,5
<i>A. alternata</i>	1,25	0,3125	> 10	0,3125	1,25
<i>A. brasiliensis</i>	10	0,3125	> 10	1,25	1,25
<i>F. oxysporum</i>	10	0,625	> 10	5	2,5
<i>C. albicans</i>	0,625	1,25	20	20	1,25

*Вредности MIC за наночестице су изражене у mg/mL, док су за нистатин у μ g/mL.

Поређењем MIC вредности које су добијене за SPA-AgNPs и SPR-AgNPs (Табела 18) уочава се знатно већа активност SPR-AgNPs. Шта више, ове наночестице су показале и најбољу антифунгалну активност од сва четири тестирана типа. Најосетљивије гљиве према овом типу наночестица биле су *P. canescens* и *P. cyclopium* код којих је добијена MIC вредност била испод најниже примењене концентрације (< 0,0391 mg/mL). Даље, SPR-AgNPs су показале доста добру активност према *T. longibrachiatum* и *T. harzianum* (MIC 0,156 mg/mL). Најотпорнија врста према SPA-AgNPs и SPR-AgNPs била је *C. albicans* (MIC 20 mg/mL), а поред ње и *F. oxysporum* са MIC вредношћу већом од 10 mg/mL за SPA-AgNPs и нешто нижом за SPR-AgNPs (MIC 5 mg/mL) [285].

Свеобухватни резултати утицаја добијених AgNPs на раст микроорганизама сугеришу да AgNPs ефикасније заустављају раст бактеријских врста, а да су плесни и квасци попут *C. albicans* отпорнији на њихово деловање. Иако је њихова антифунгална активност била нешто слабија, може се рећи да су синтетисане AgNPs ипак у ниским концентрацијама успеле да зауставе раст појединих плесни попут *Penicillium* врста. Показано је да иако су сва четири типа добијених наночестица у основи сачињена од елементарног сребра и да су димензије формираних наночестица у истом опсегу, са не тако значајним разликама, њихова антимикуробна активност се разликује. Ови резултати указују на то да поред елементарног сребра које је основ антибактеријског деловања, LSA-AgNPs, LSR-AgNPs, SPA-AgNPs и SPR-AgNPs вероватно поседују још нека

хемијска једињења или специфичне карактеристике које имају утицај на антимикробне особине. Примећено је да су SPR-AgNPs најефикасније у заустављању раста испитиваних бактеријских врста али и да метанолски екстракт SPR, такође, има најизраженију антибактеријску активност од свих тестираних екстракта. На основу овог поређења може се закључити да једињења из екстракта коришћеног при синтези AgNPs могу имати значајан утицај на биолошке активности синтетисаних AgNPs.

4.2.6. Цитотоксична активност синтетисаних наночестица сребра

За биомедицинску употребу, тестови биокомпатибилности укључујући и цитотоксични ефекат су кључни фактори који одређује могућност безбедне примене, као и могућност примене као антиканцерогених сипстанци. Цитотоксична активност биосинтетисаних AgNPs је испитана на две имортализоване ћелијске линије (ћелије фибробласта миша (Balb/c-3T3) и ћелије хуманих кератиноцита (HaCaT)) и две ћелијске линије рака (трансформисани фибробласт миша (SVT2) и епидермалног карцинома (A431)), као и у случају метанолских екстраката биљака *L. salicaria* и *S. pratensis* [42,285]. За одређивање вијабилности ћелија након третмана различитим концентрацијама наночестица (од 1 до 100 µg/mL за LSA-AgNPs и LSR-AgNPs и од 1 до 200 µg/mL за SPA-AgNPs и SPR-AgNPs) коришћен је МТТ тест. Вијабилност ћелија које су биле изложене различитим концентрацијама LSA-AgNPs и LSR-AgNPs праћена је током 48 h, док је третирање ћелија са SPA-AgNPs и SPR-AgNPs праћено 72 h због нижег степена испољене цитотоксичности.

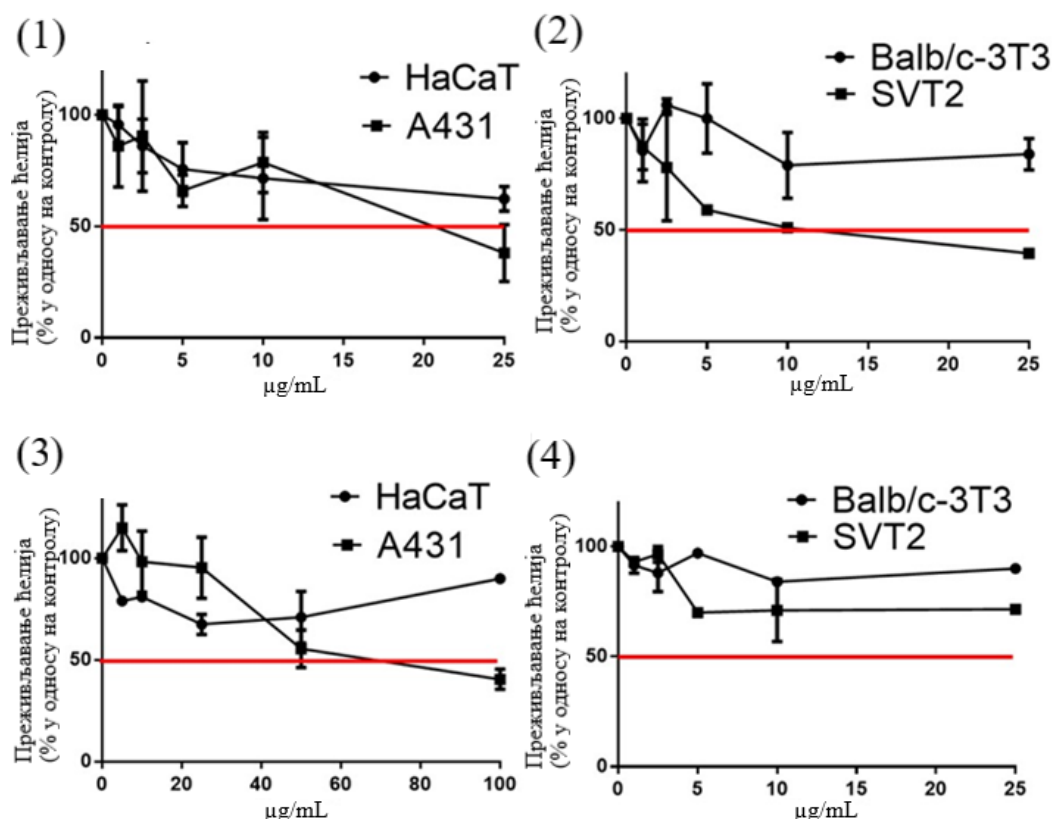
На **Слици 62** (1 и 2) може се приметити блага селективност LSA-AgNPs према канцерогеним ћелијама A431 и SVT2, при чему су израчунате IC₅₀ вредности биле 20,55 µg/mL за A431 и 12,76 µg/mL за SVT2 ћелијске линије (**Табела 19**). Занимљиво је да према здравим ћелијским линијама нису добијене IC₅₀ вредности, односно наночестице синтетисане помоћу биљке *L. salicaria* нису испољиле значајнију токсичност у концентрацијама до 25 µg/mL.

Табела 19. Цитотоксична активност синтетисаних наночестица сребра изражена преко IC₅₀ вредности.

Ћелијске линије	LSA-AgNPs (µg/mL)	LSR-AgNPs (µg/mL)	SPA-AgNPs (µg/mL)	SPR-AgNPs (µg/mL)
HaCaT	> 25	> 100	> 200	> 200
A431	20,55 ± 5	62 ± 17	> 200	> 200
BALB/c-3T3	> 25	> 100	> 200	> 200
SVT2	12,7 ± 6	> 100	> 200	> 200

Резултати представљају средњу вредност ± SD три независна мерења.

У поређењу са резултатима добијеним код испитивања цитотоксичне активности метанолских екстраката биљке *L. salicaria* где су екстракти имали сличан тренд цитотоксичности и према здравим и према канцерогеним ћелијским линијама, *L. salicaria* AgNPs су показале нешто већу селективност, показујући цитотоксични ефекат према испитиваним ћелијама канцера и биокомпатибилност са здравим ћелијама. Занимљиво је да су LSR-AgNPs добијене коришћеном екстракта корена *L. salicaria* испољиле цитотоксичност само према ћелијској линији епидермалног карцинома A431 (IC₅₀ 62,17 µg/mL) (**Слика 62** (3) и (4)). На основу приказаних резултата, оба типа наночестица LSA-AgNPs и LSR-AgNPs показују селективно понашање према канцерогеним ћелијским линијама [42].

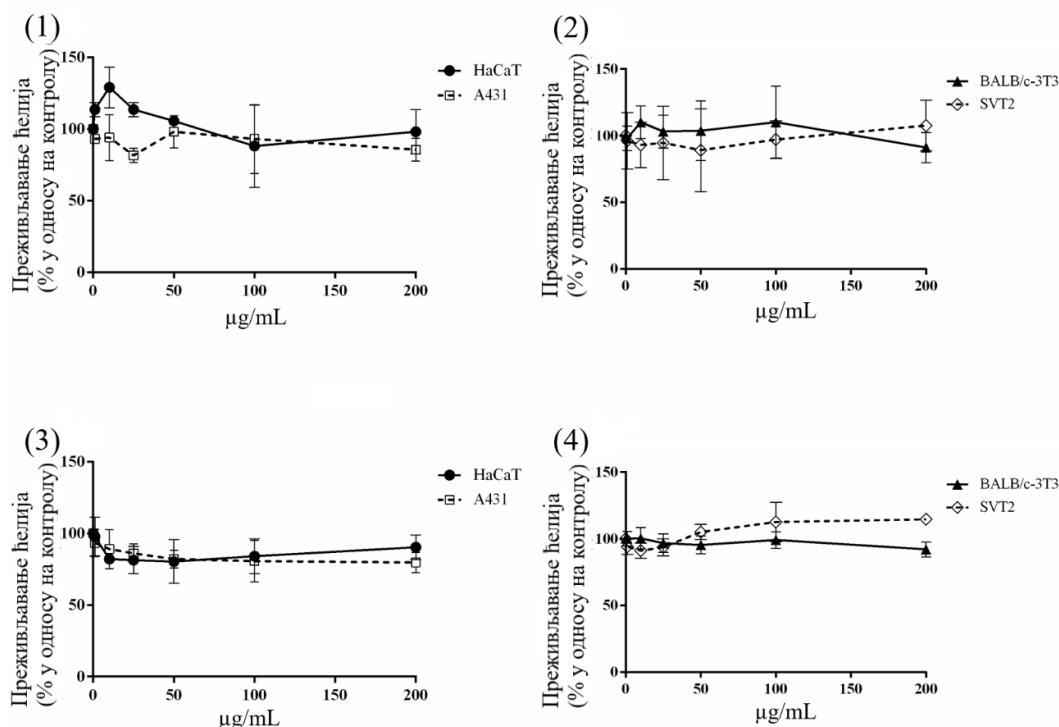


Слика 62. Ефекат LSA-AgNPs (1 и 2) у концентрацијама од 1–25 µg/mL и LSR-AgNPs (3 и 4) у концентрацијама од 1–100 µg/mL на вијабилност имортализованих здравих ћелија (HaCaT и BALB/c-3T3) и ћелија канцера (A431 и SVT2) након третмана од 48 h. [42].

Селективна активност може јавити због различитих матаболичких услова, интензивнијег енергетског метаболизма, чак и до варирања рН вредности унутар ћелија канцера у односу на здраве ћелије, што може довести до већег ослобађања јона сребра и фитоједињења из структуре AgNPs у поређењу са имортализованим ћелијама [192]. Цитотоксичност AgNPs заснива се на њиховој способности да продиру у ћелије и ослобађају јоне сребра који промовишу генерисање реактивних кисеоничних врсти, узрокујући оштећење митохондрија и ДНК, као и ћелијску апоптозу [308]. Поред тога, предност наночестица синтетизованих биљним екстрактима заснива се на фитоједињењима уграђеним у структуру или на површину наночестица, које имају добро познату биолошку активност. У различитим студијама изнети су закључци да наночестице синтетисане помоћу биљних екстраката у комбинацији са лековима против рака могу повећати њихову активност, у односу на лекове везане за хемијски синтетизоване наночестице [47].

На основу резултата приказаних на **Слици 63**, SPA-AgNPs (1 и 2) и SPR-AgNPs (3 и 4) су биле потпуно биокompatibilне са имортализованим ћелијама, с обзиром да није примећена токсичност третирањем ћелија концентрацијама од 200 µg/mL након 72 h инкубације. Такође, SPA-AgNPs и SPR-AgNPs нису биле токсичне према ћелијама канцера A431 и SVT2 након 72 h третмана ћелија у истом опсегу концентрација (**Слика 63**). У ранијим студијама показано је да полифенолна једињења биљака рода *Salvia* имају ниску токсичност према низу ћелијских линија [67,116] што је вероватно један од разлога биокompatibilности SPA-AgNPs и SPR-AgNPs са тестираним ћелијским линијама. Метанолски екстракт надземног дела *S. pratensis* у испитивању цитотоксичног ефекта према истим ћелијским линијама показао је исте резултате као и SPA-AgNPs,

одсуство цитотоксичног ефекта у концентрацијама до 200 $\mu\text{g/mL}$. Међутим, SPR је показао неселективну токсичност према оба типа ћелијских линија у концентрацијама испод 50 $\mu\text{g/mL}$ изузев за BALB/c-3T3 линију (Табела 14), док су SPR-AgNPs, неочекивано, показале одсуство цитотоксичног ефекта према истим типовима ћелија. На основу оваквих резултата можемо да предпоставимо да је другачији тип екстракције утицао на количину једињења која поседују цитотоксичност у екстракту корена *S. pratensis* коришћеном за синтезу SPR-AgNPs у односу на SPR или су та једињења ипак била присутна али је дошло до промене у њиховој структури у процесу синтезе наночестица или су се у слабијем проценту везала за површину SPR-AgNPs. Оно што је највероватније у погледу биокомпатибилности SPA-AgNPs и SPR-AgNPs је да биомолекули присутни у воденом екстракту биљке *S. pratensis* доприносе биокомпатибилности AgNPs. Као и у случају резултата антимикробне активности синтетисаних AgNPs, евидентно је да биолошку активност AgNPs синтетисаних помоћу екстракта биљака у великој мери одређују фитоједињења биљне врсте коришћене у синтези.



Слика 63. Ефекат SPA-AgNPs (1 и 2) и SPR-AgNPs (3 и 4) у концентрацијама од 1–200 $\mu\text{g/mL}$ на вијабилност имортализованих здравих ћелија (HaCaT и BALB/c-3T3) и ћелија канцера (A431 и SVT2) након третмана од 72 h [285].

4.2.7. Хемолитичка активност синтетисаних наночестица сребра

Способност наночестица или неких других молекула да разграђују мембрану црвених крвних зрнаца, сачињену од протеина, липида и гликопротеина, и након тога ослобађају хемоглобин, назива се хемолиза. Поред чињенице да се наночестице већ користе у медицини, оне се могу користити и као транспортни системи за испоруку лекова. Крв је један од првих контаката са којом наночестице остварају интеракцију приликом *in vivo* тестирања, тако да је ефекат наночестица на крвне ћелије од кључног значаја за даља истраживања и потенцијалну терапеутску примену [309]. Поред тога,

прописани основни стандарди за тестирање биокомпатибилности медицинских средстава, између осталих тестова, укључују и тестове хемокомпатибилности, тј. хемолитички есеј. Потенцијална хемолитичка активност наночестица у великој мери ограничава њихову медицинску употребу. Да би се побољшала хемокомпатибилност наночестица, модификација површине је једна од најчешће коришћених стратегија. Један од начина промене површине наночестица је везивање полифенолних једињења биљака за њихову површину, која су знатно компатибилнија у поређењу са чистом наночестицом метала или метал-оксида. Поред тога, ова једињења могу имати низ других предности за кардиоваскуларни систем захваљујући својим антиоксидативним својствима [310].

Табела 20. Проценат хемолитичке еритроцита изазване синтетисаним наночестицама сребра [42,285].

Концентрација ($\mu\text{g/mL}$)	% Хемолитичке			
	LSA-AgNPs	LSR-AgNPs	SPA-AgNPs	SPR-AgNPs
150	< Негативна контрола	2.77 ± 0.25	< Негативна контрола	< Негативна контрола
120	< Негативна контрола	0.50 ± 0.11	< Негативна контрола	< Негативна контрола
90	< Негативна контрола	0.28 ± 0.06	< Негативна контрола	< Негативна контрола
60	< Негативна контрола	< Негативна контрола	< Негативна контрола	< Негативна контрола
30	< Негативна контрола	< Негативна контрола	< Негативна контрола	< Негативна контрола
10	< Негативна контрола	< Негативна контрола	< Негативна контрола	< Негативна контрола

Процес хемолитичке еритроцита током интеракције са синтетисаним наночестицама сребра праћен је спектрофотометријски на 540 nm након претходне инкубације од 1 h на 37 °C. Хемолитичка активност узорка је израчуната на основу хемолитичке активности SDS (*sodium dodecyl sulfate*, енг.) који је коришћен као позитивна контрола при чему се сматра да 1% раствор SDS изазива потпуну (100%) хемолитичку еритроцита. Испитани узорци наночестица су показали занемарљив степен хемолитичке еритроцита (Табела 20). Штавише, LSA-AgNPs, као и оба типа наночестица синтетисаних помоћу екстракта биљке *S. pratensis* у свим примењеним концентрацијама показали су нижу хемолитичку активност у поређењу са негативном контролом (еритроцити у раствору фосфатног пуфера, PBS). Међутим, приликом испитивања хемолитичке еритроцита до које доводе наночестицама методом помоћу којих се мери ослобођени хемоглобин, треба узети у обзир могућност да се хемоглобин као сваки други протеин може адсорбовати на површину наночестице. Из тог разлога постоји могућност да је хемолитичка активност испитиваних наночестица у неком проценту виша од измерене због везивања евентуално ослобођеног хемоглобина за површину наночестица, што узрокује читавање ниже концентрације приликом мерења. Поред тога, евентуалне корекције концентрације ослобођеног хемоглобина за део који се евентуално везао за наночестице је тешко прецизно одредити. Није могуће одредити тачну концентрацију хемоглобина који се ослобађа из хемолитизованих еритроцита под дејством наночестица и истовремено количину ослобођеног хемоглобина која се веже за те исте наночестице. Оно што је познато, за сада, да се хемоглобин везује за наночестице сребра и да проценат везивања зависи од концентрације и врсте наночестица [311].

LSR-AgNPs су показале слабу хемолизу која је зависила од концентрације наночестица, када се примењују у концентрацијама од 150 до 90 $\mu\text{g/mL}$. Највећа примењена концентрација LSR-AgNPs показала је 2,8% хемолизе еритроцита, док концентрације ниже од 90 $\mu\text{g/mL}$ нису имале утицаја на деградацију мембране еритроцита. Одсуство хемолитичке активности синтетисаних AgNPs и веома ниска хемолитичка активност LSR-AgNPs у концентрацијама до 150 $\mu\text{g/mL}$ даје увид да се у овим концентрацијама могу безбедно примењивати, у смислу хеомокомпатибилности, као антиоксидативни, антимикробни и антиканцерогени агенси [42,285].

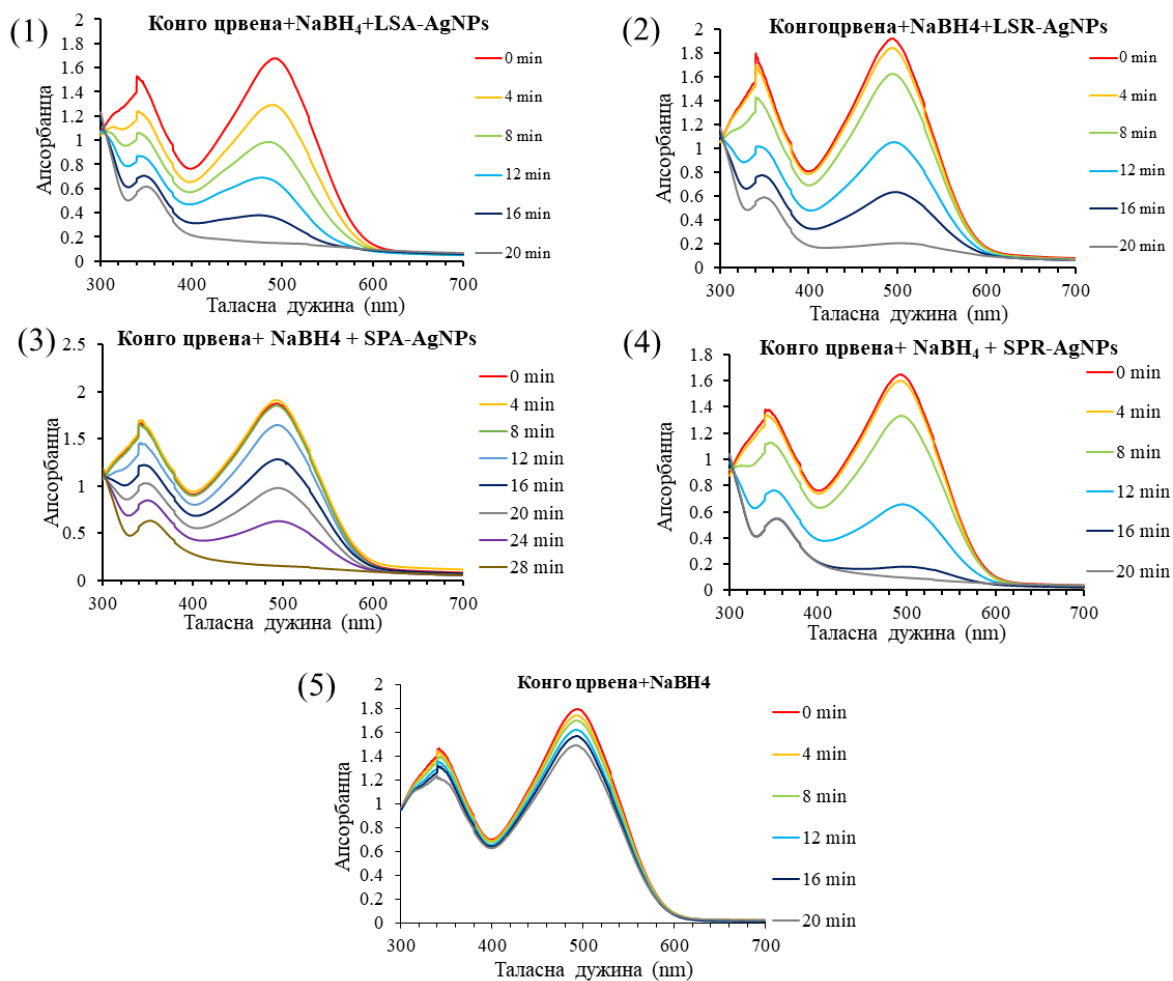
4.2.8. Каталитичка активност синтетисаних наночестица у реакцијама деградације конго црвене боје и 4-нитрофенола помоћу NaBH_4

Употреба наночестица као катализатора је у порасту последњих година, а нанокатализатори су нашли примену у пречишћавању вода, производњи биодизела, у горивим ћелијама као катализатори, органским синтезама и катализаторима за разградњу опасног отпада. Једна од антропогених делатности која највише загађује и троши воду је текстилна индустрија. Биохемијска и хемијска потрошња кисеоника, отежавање процеса фотосинтезе, инхибиција раста биљака, улазак у ланац исхране, биоаккумуляција и потенцијална токсичност и карциногеност су знатно подстакнути текстилним бојама. Многе синтетичке боје су високо канцерогене и дуго остају у животној средини. Синтетичке боје, посебно оне класификоване као реактивне, показују високу растворљивост у води, што отежава њихово уклањање обичним методама. Како су за разградњу ових једињења потребни катализатори који би повећали брзину реакције, данас постоји велико интересовање за једноставнијом производњом еколошки прихватљивих катализатора. Значајне фракције површинских атома и слободна енергија на међуфазној површини могу утицати на термостабилност и каталитичке способности наночестица [45]. Од великог значаја је употреба катализатора који имају могућност да иницирају разградњу синтетичких боја и помогну у њиховој биоразградњи микроорганизмима [46]. Успех примене наночестица сребра које су синтетисане помоћу биљног материјала у деградацији конго црвене боје и 4-нитрофенола вишеструко је потврђен [2,47,48]. Из тог разлога испитан је каталитички потенцијал сва четири типа синтетизованих наночестица у деградацији конго црвене (Слика 64) и 4-нитрофенола (Слика 65) у присуству и одсуству NaBH_4 [42,285].

Способност наночестица сребра да се понашају као катализатори у деградацији боје огледа се у њиховој особини да преносе електрон са донора (NaBH_4) на молекуле акцепторе. Реакције каталитичке деградације конго црвене боје праћене су спектрофотометријски у опсегу таласних дужина између 700 и 300 nm, при чему су се апсорпциони максимуми који потичу од конго црвене налазили на 338 и 497 nm. Каталитичка активност LSA-AgNPs (1), LSR-AgNPs (2), SPA-AgNPs (3) и SPR-AgNPs (4) у деградацији конго црвене боје приказана је на Слици 64. Као што се може приметити апсорбанца која потиче од конго црвене је константно опадала током времена, и коначно, раствор је постао безбојан након 20 min, док су максимуми апсорпције у UV-Vis спектру нестали. Примена NaBH_4 у одсуству наночестица није имала значајног утицаја на деградацију раствора конго црвене боје Слика 64 (5).

Резултати привидне константе брзине (k) и коефицијента корелације (R^2) за каталитичку редукацију конго црвене боје и 4-нитрофенола уз помоћ синтетисаних наночестица приказани су у Табели 21. Константа брзине (k) каталитичке деградације конго црвене у присуству LSR-AgNPs (Слика 66 (1)) била је нешто већа ($k = 0,0963$) у односу на константу израчунату за LSA-AgNPs ($k = 0,0766$) када је примењен модел

реакције нултог реда који је у највећем степену одговарао овом каталитичком процесу. Такође, каталитичка константа израчуната за реакцију деградације конго црвене боје са SPR-AgNPs ($k = 0,0904$) била је већа у односу на ону која је добијена за реакцију са SPA-AgNPs ($k = 0,0636$) (Слика 66 (2)). Што сугерише да су се у овом случају наночестице синтетисоване помоћу корена биљака показале као знатно бољи катализатори у поређењу са наночестицама синтетизованим помоћу надземних делова биљака и да AgNPs добијене коришћењем екстракта биљке *L. salicaria* поседују нешто боље каталитичке особине у деградацији конго црвене боје у односу на одговарајуће наночестице добијене помоћу биљке *S. pratensis*.

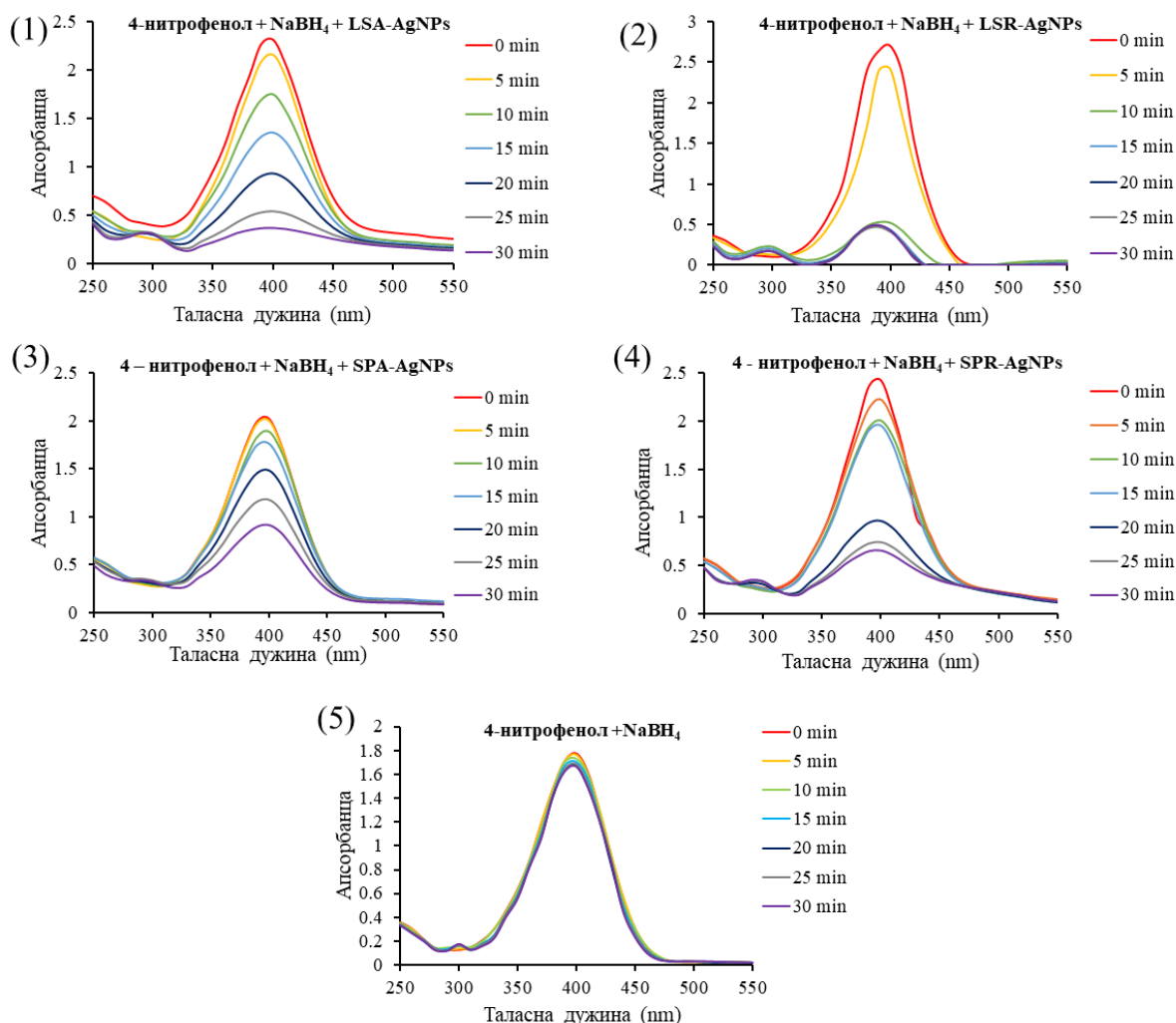


Слика 64. Каталитичка активност синтетисаних LSA-AgNPs (1), LSR-AgNPs (2), SPA-AgNPs (3) и SPR-AgNPs (4) код деградације конго црвене боје у присуству NaBH_4 и деградације конго црвене боје у одсуству наночестица (5) [42,285].

На Слици 65 приказана је каталитичка активност свих испитиваних наночестица (LSA-AgNPs (1), LSR-AgNPs (2), SPA-AgNPs (3) и SPR-AgNPs (4)) у редукцији 4-нитрофенола до 4-аминофенола. Апсорпциони максимум који потиче од 4-нитрофенола налази се на 400 nm у UV-Vis спектру. Редукција 4-нитрофенола у одсуству наночестица приказана је на Слици 65 (5), где није уочена никаква промена у апсорбanci током 30 минута. Међутим, у присуству наночестица, дошло је до брзе редукције 4-нитрофенола. Наночестице синтетисане помоћу корена обе биљке су биле ефикасније у редукцији 4-нитрофенола што се уочава и на графицима али и на основу израчунатих константи брзина реакција ($k = 0,0659$ за LSR-AgNPs (Слика 67 (3)) и $k = 0,0665$ за SPR-AgNPs (Слика 67 (2))). За све испитиване наночестице снимани су спектри у интервалу од 5

минута, међутим ни после 30 минута реакције ни једне наночестице нису довеле до потпуне редукције 4-нитрофенола [42,285].

Током процеса редукције конго црвене боје и 4-нитрофенола, NaBH_4 има улогу извора електрона, међутим, пренос електрона није могућ без присуства катализатора. Наночестице служе као транспортери електрона, апсорбујући BH_4^- и синтетичку боју на својој површини, омогућавајући размену електрона са BH_4^- на азо везу конго црвене боје односно азот нитро групе у молекулу 4-нитрофенола [166].



Слика 65. Каталитичка активност синтетисаних LSA-AgNPs (1), LSR-AgNPs (2), SPA-AgNPs и SPR-AgNPs код редукције 4-нитрофенола до 4-аминофенола у присуству NaBH_4 и редукције 4-нитрофенола у одсуству наночестица (5) [42,285].

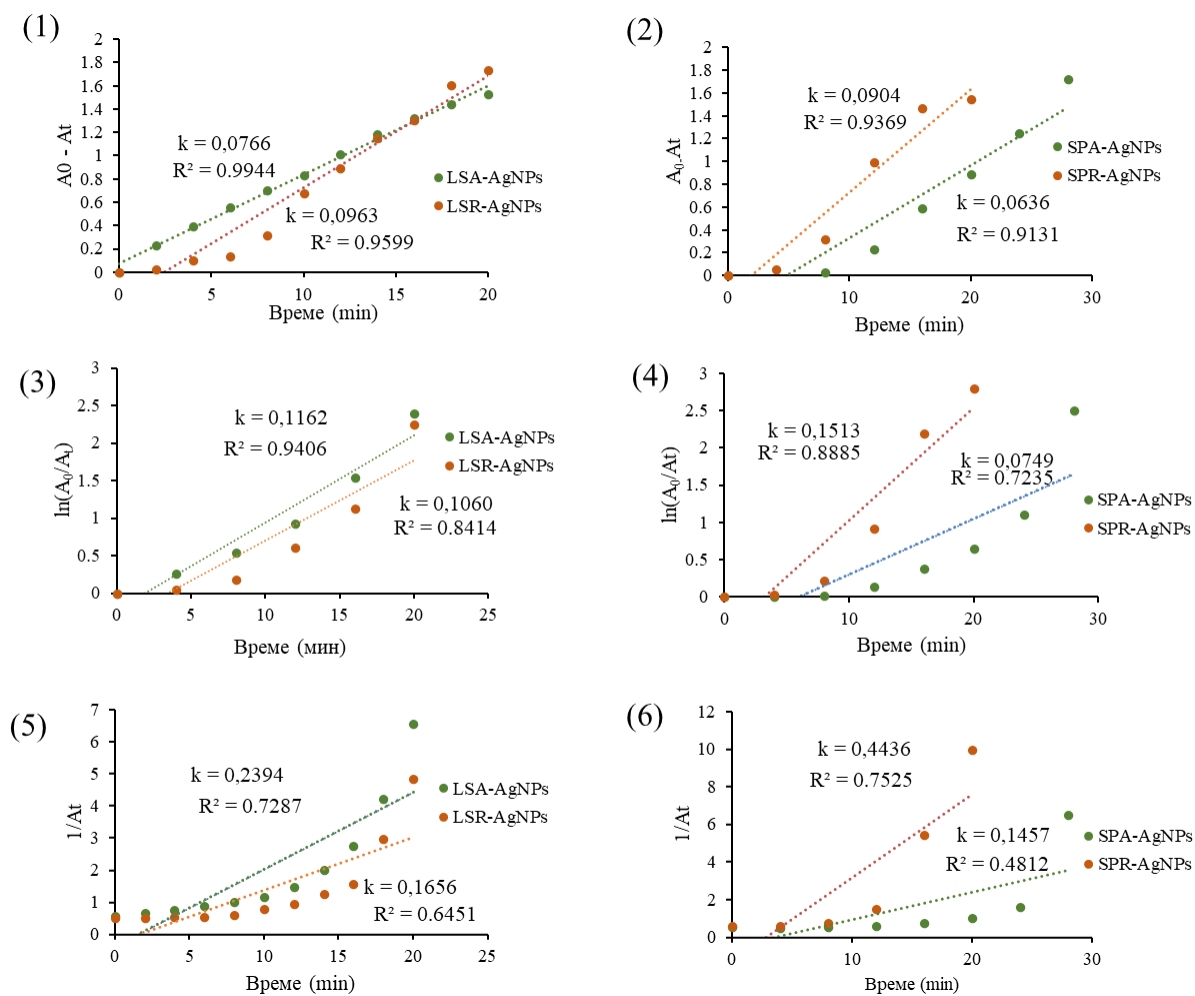
Према константама брзине реакције, у овом случају SPR-AgNPs имале нешто већу ефикасност у редукцији 4-нитрофенола у поређењу са SPA-AgNPs. За разлику од реакције коју катализује SPA-AgNPs у којој се апсорбанција 4-нитрофенола пропорционално смањује током времена, у реакцији коју катализују SPR-AgNPs, апсорбанца се благо смањила до 15 минута након чега је нагло опала до 20 минута, а затим наставила да опада споријим темпом [285].

Табела 21. Вредности константе брзине (k) и коефицијента регресије (R^2) деградације конго црвене боје и 4-нитрофенола коришћењем различитих кинетичких модела [285].

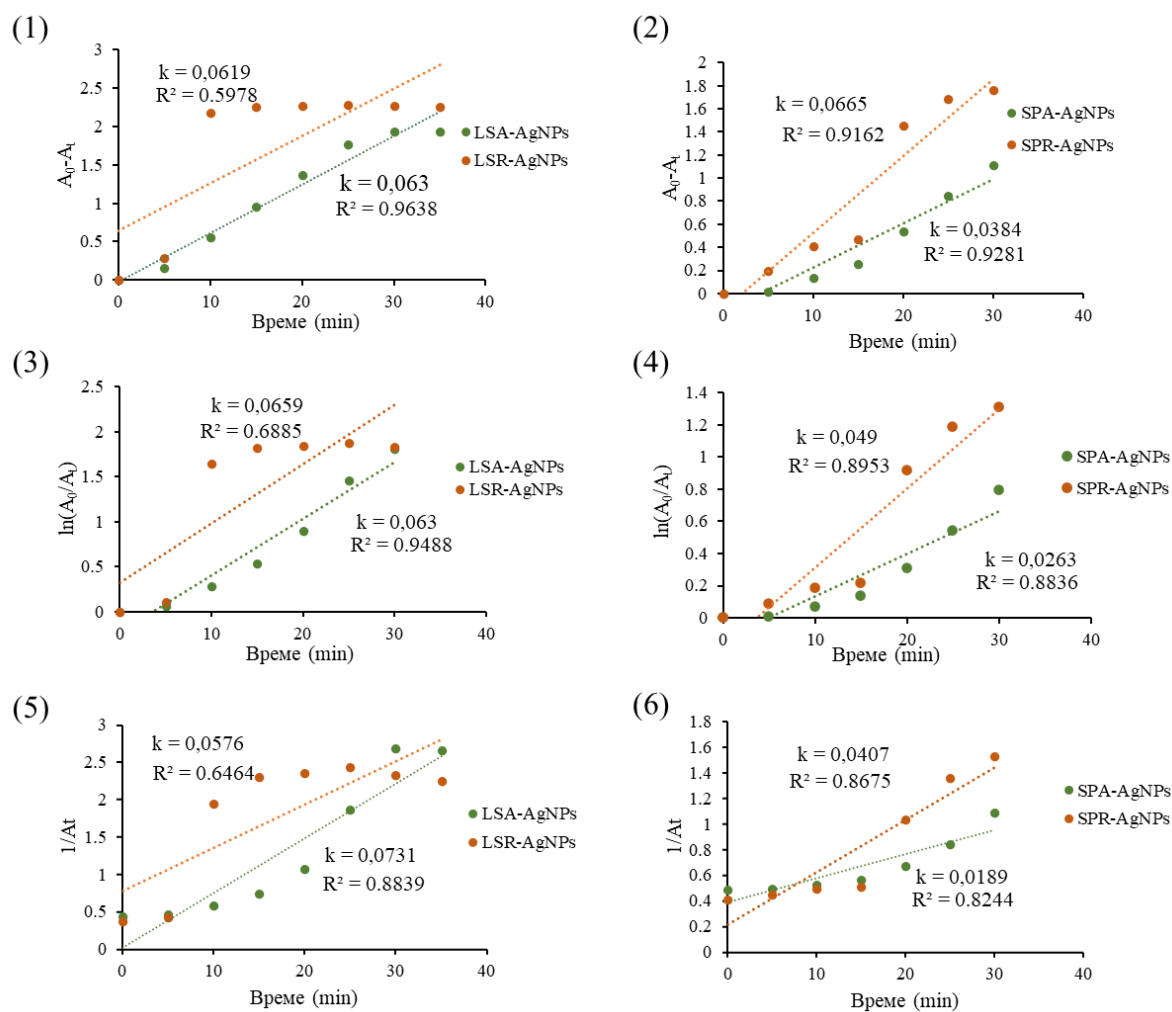
Хемијско-кинетички модел	Линеарна једначина	Наночестице	Конго црвена		4-Нитрофенол	
			Регресиони коефицијент (R^2)	Константа брзине (k) ^a	Регресиони коефицијент (R^2)	Константа брзине (k) ^a
Нулти ред	$A_0 - A_t = kt$	LSA-AgNPs	0,9944	0,0766	0,9638	0,063
		LSR-AgNPs	0,9599	0,0963	0,5978	0,0619
		SPA-AgNPs	0,9131	0,0636	0,9281	0,0384
		SPR-AgNPs	0,9369	0,0904	0,9162	0,0665
Први ред	$\ln \left(\frac{A_0}{A_t} \right) = kt$	LSA-AgNPs	0,9406	0,1162	0,9488	0,063
		LSR-AgNPs	0,8414	0,1060	0,6885	0,0659
		SPA-AgNPs	0,7235	0,0749	0,8836	0,0263
		SPR-AgNPs	0,8885	0,1513	0,8953	0,0490
Други ред	$\frac{1}{A_t} - \frac{1}{A_0} = kt$	LSA-AgNPs	0,7287	0,2394	0,8839	0,0731
		LSR-AgNPs	0,6451	0,1656	0,6464	0,0576
		SPA-AgNPs	0,4812	0,1457	0,8244	0,0189
		SPR-AgNPs	0,7525	0,4436	0,8675	0,0407

^a k је изражена у $\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ за кинетику нултог реда, min^{-1} за кинетику првог реда, и $\text{L mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ за кинетику другог реда.

У свим испитиваним каталитичким реакцијама, може се сматрати да је брзина реакције независна од концентрације NaBH_4 јер је концентрација NaBH_4 била значајно виша од конго црвене боје и 4-нитрофенола, па се пут деградације може се описати као реакције псеудо-реда. Поређењем израчунатих вредности R^2 (Табела 21) за сваки модел показано је да нулти ред најбоље описује механизам и брзину каталитичке деградације конго црвене боје и 4-нитрофенола коришћењем синтетисаних наночестица, изузев у случају LSR-AgNPs у редукцији 4-нитрофенола. Процес каталитичке деградације се обично може описати кинетичким моделом псеудо првог реда. Међутим, постоје и студије које описују каталитичке процесе коришћењем наночестица који се такође могу описати моделом псеудо нултог реда [312–314]. Као што је приказано у Табели 21 и Сликама 66 и 67, коефицијенти регресије (R^2) кинетике првог и другог реда били су нижи у поређењу са добијеним регресионим коефицијентима добијеним за модел кинетике псеудо нултог реда, што је у складу са неким раније објављеним резултатима о употреби различитих металних наночестица у каталитичкој деградацији органских боја [312,314]. Међутим, нешто виши регресиони коефицијент када се примени модел псеудо првог реда је примећен у случају деградације 4-нитрофенола под дејством LSR-AgNPs те се ова реакција може сврстати у реакције псеудо-првог реда.



Слика 66. Линеарни модели кинетике реакције псеудо-нултог (1 и 2), псеудо-првог (3 и 4) и псеудо-другог реда (5-6) за кинетику деградације конго црвене боје коришћењем синтетизованих наночестица сребра и NaBH_4 [42,285].



Слика 67. Линеарни модели кинетике реакције псеудо-нултог (1 и 2), псеудо-првог (3 и 4) и псеудо-другог реда (5-6) за кинетику деградације 4-нитрофенола коришћењем синтетизованих наночестица сребра и NaBH_4 [42,285].



5. ЗАКЉУЧАК

Резултати ове докторске дисертације пружају потпуно нови увид у фитохемијски профил и фармаколошки потенцијал метанолских екстраката надземних делова и корена биљака *L. salicaria* и *S. pratensis*. Такође, успешно су синтетисане наночестице сребра употребом водених екстраката ових биљака које су потом окарактерисане различитим методама и чија је фармаколошка и каталитичка активност затим испитана. Сва спроведена истраживања имала су за циљ трасирање пута за евентуалну примену ових биљних врста и формулисање потенцијалних суплемената који би служили као подршка лечењу многих болести, пре свега болести повезаних са оксидативним стресом и различитих инфекција. Међутим, због показане добре каталитичке активности синтетизованих AgNPs отвара се нов правац даљих истраживања у смислу потенцијалне употребе ових наночестица у третману отпадних вода или у индустријским процесима који захтевају коришћење катализатора. На основу свих спроведених тестирања, добијени резултати могу се сумирати у следећим закључцима:

- Поређењем фенолних садржаја између биљних врста уочено је да су екстракти *L. salicaria* били знатно богатији у садржају ових једињења од *S. pratensis*. Оно што је заједничко за екстракте ове две различите биљне врсте јесте да су екстракти надземних делова били богатији у садржају флавоноида, док су екстракти корена били богатији у садржају фенолних киселина и кондензованих танина. Интересантно је да је највећи део фенолних једињења екстракта корена *L. salicaria* припадао класи кондензованих танина. У нешто већој концентрацији у надземном делу биљке *L. salicaria*, као доминантни флавоноиди квантификовани су специфични С-глукозидни флавоноиди, ориентин, изоориентин и витексин, док је елагинска киселина, најдоминантнија фенолна киселина биљке *L. salicaria*. Најзаступљенија једињења квантификована у биљци *S. pratensis* су кафеинска киселина и њени деривати пре свега рузмаринска киселина и салвианоличне киселине А и Б које су забележене у већој концентрацији у екстракту корена. *In vitro* гастроинтестинална дигестија показала је да не долази до значајне промене у концентрацији већине биолошки активних фенолних једињења који су највише заступљени у екстрактима. Међутим, примећен је значајан пад биодоступности рузмаринске и салвианоличне киселине А током дигестије екстраката *S. pratensis*. Резултати фитохемијског испитивања екстраката ове две биљне врсте дали су потпунију слику о садржају биоктивних једињења из групе полифенола, нарочито када су у питању екстракти корена обе биљке који су по први пут испитани у оквиру ове дисертације. Значајни су и добијени резултати биодоступности полифенолних једињења ових биљака који нам потврђују да већина идентификованих једињења може бити доступна за апсорпцију у дигестивном тракту и да може даље испољити своје потенцијалне биолошке ефекте, док је биодоступност деривата кафеинске киселине присутних у биљци *S. pratensis* нешто нижа и да стога биолошка активност екстраката ове биљке може бити измењена у *in vivo* условима у односу на показане ефекте у *in vitro* условима.
- Очекивано, висок садржај фенолних једињења у испитиваним екстрактима одразио се и на њихову *in vitro* антиоксидативну активност. Сви екстракти су показали изванредну активност у методама неутралисања слободних радикала, при чему су екстракти корена обе биљне врсте били ефикаснији антиоксиданти што је у складу са њиховим високим фенолним садржајем. Нижа активност је примећена код методе инхибиције липидне пероксидације и хелатизације јона Fe^{2+} . Генерално, у свим методама одређивања антиоксидативне активности екстракти биљке *L. salicaria* испољили су већу активност. Добијени резултати

били су упоредиви са природним (глана, кафеинска, рузмаринска и аскорбинска киселина, рутин и лутеолин) и синтетичким (ВНТ и тролокс) стандардним једињењима. Прилог снажном антиоксидативном деловању екстраката су и резултати високог степена заштите ДНК од оксидативног оштећења изазваног хидроксилним и пероксилним радикалима. Добијени резултати сугеришу да се ове биљке могу искористити у различитим областима као добри извори антиоксиданата, у формулацијама суплемента за превенцију оксидативног стреса, третману обољења повезаних са оксидативним стресом или као додаци прехранбеним производима.

- У погледу антимикуробног деловања испитиваних биљних врста издваја се екстракт корена *S. pratensis* који је показао активност према готово свим Грампозитивним врстама бактерија са МИС вредностима нижим од најниже испитиване ($< 0,156 \text{ mg/mL}$). Екстракти обе биљне врсте испољили су слабу антифунгалну активност са МИС вредностима које су се кретале углавном од 5 до $> 20 \text{ mg/mL}$. Добијени резултати отварају могућност за даља истраживања примене корена *S. pratensis* као алтернативе некој антибактеријској терапији, с обзиром на висок антибактеријски ефекат и разноврстан фитохемијски састав екстракта корена. Међутим, с обзиром на његово цитотоксично дејство морају се дефинисати безбедне дозе екстракта за примену.
- Током *in vitro* испитивања цитотоксичне активности екстраката установљено је да екстракт надземног дела *L. salicaria* био у потпуности биокомпатибилан при концентрацији од $50 \mu\text{g/mL}$ према испитиваним здравим (HaCaT и Balbс-3Т3) и канцерогеним (A431 и SVТ2) ћелијама, даљим повећањем концентрације овај екстракт је испољио неселективну цитотоксичност. Екстракт корена *L. salicaria* имао је исти тренд цитотоксичности према свим коришћеним ћелијама са нешто већом активношћу према канцерогеним ћелијама. Са друге стране екстракт надземног дела *S. pratensis* био у потпуности биокомпатибилан према свим, и здравим и канцерогеним ћелијским линијама, при свим коришћеним концентрацијама, док је екстракт корена показао већу цитотоксичност нарочито према канцерогеним ћелијама. Резултати су показали да екстракти корена испитиваних биљака нису у потпуности биокомпатибилни са здравим ћелијама, али да истовремено неселективно заустављају раст и неких типова канцерогених ћелија. Цитотоксични ефекат ових екстракта даље отвара могућност за испитивања екстраката корена биљака *L. salicaria* и *S. pratensis* и њиховог антиканцерогеног ефекта, али истовремено сугерише да се корен ових биљака мора користити са додатном пажњом у смислу одабира дозе за примену.
- Водени екстракти надземних делова и корена биљака *L. salicaria* и *S. pratensis* успешно су искоришћени за синтезу наночестица сребра водећи се принципима зелене хемије. Величина највећег дела добијених AgNPs се кретала у распону од 35 до 79 nm, при чему је највећи проценат наночестица имао пречник око 60 nm. Резултати инхибиције DPPH радикала указују да се антиоксидативна активност синтетисаних наночестица није битније разликовала од активности самих екстраката, док су у случају инхибиције ABTS радикал катјона наночестице показале доста већи потенцијал неутрализације у поређењу са одговарајућим екстрактима. Наночестице су показале обећавајући антимикуробни потенцијал према већини коришћених бактерија. На основу добијених МИС вредности, SPR-AgNPs су се издвојиле као најјачи бактериостатици. Активност

оба типа наночестица је била знатно већа према бактеријама у односу на гљиве. Ови резултати су се подударили са резултатима добијеним за антибактеријску активност метанолских екстраката биљке *S. pratensis* где је SPR екстракт био знатно активнији. LSA-AgNPs су се издвојиле као потенцијални антиканцерогени агенси, при чему су показале селективну цитотоксичност према ћелијским линијама канцера A431 и SVT2. За разлику од наночестица синтетисаних помоћу екстраката биљке *L. salicaria*, наночестице синтетисане помоћу *S. pratensis* су биле у потпуности биокомпатибилне према свим коришћеним ћелијским линијама и при највишим коришћеним концентрацијама. Такође, синтетизоване наночестице, показале су и висок степен хемотоксичности. Њихова добра биокомпатибилност отвара могућност да се SPA-AgNPs и SPR-AgNPs могу користити безбедно као антимикуробни агенси у тртману антибактеријских инфекција. Поред тога, резултати цитотоксичности такође потврђују да биљни екстракти коришћени у синтези имају велики утицај на биоактивност AgNPs.

- Могућност примене синтетизованих наночестица сребра показана је и кроз њихов потенцијал да катализују реакције редуктивне деградације конго црвене боје и 4-нитрофенола, који имају добро познате штетне ефекте на животну средину. Висок каталитички потенцијал синтетисаних наночестица отвара могућност њихове употребе у многим гранама индустрије и пречишћавању отпадних вода.

Резултати добијени у овој докторској дисертацији пружају потврду оправданости традиционалне употребе ових биљних врста која је временом заборављена. Показано је да биљна врста *L. salicaria* поседује значајне колоидне фенолне једињења и у надземном делу и у корену и да може бити извор ових биоактивних једињења. Такође, веома изражене антиоксидативне особине ове биљке отварају могућност њене примене, пре свега као извора антиоксиданата. Добијеним резултатима може се додатно подстаћи употреба и примена ове биљне врсте, нарочито ако се узме у обзир да је у неким деловима света инвазивна врста и да се лако размножава. Такође, закључено је да се биљка *S. pratensis* може користити као замена у коришћењу добро познатих врста жалфија (*S. officinalis* и *S. verticillata*), с обзиром на њен разноврсан фитохемијски састав и показане биолошке активности. По први пут испитивани су екстракти корена обе биљне врсте који су, изненађујуће, показали већи фенолни садржај и биолошки потенцијал у већини метода у поређењу са надземним делом. Поред поменуте карактеризације ових биљних врста, у овој дисертацији испитан је и еколошки аспект примене ових биљних врста које су богат извор полифенола и антиоксиданата. У том смислу, у овом истраживању отишло се корак даље са испитивањем ових биљака, те су уз помоћ њих синтетисане наночестице сребра на еколошки прихватљив начин без употребе хемикалија које утичу на животну средину. Добијене наночестице сребра су карактеристичне по томе што поред самог сребра у елементарном стању садрже и фитожедињења, која судећи по добијеним резултатима имају значајан утицај на биолошку активност. Са друге стране изразита антимикуробна активност наночестица пружа могућност њихове употребе код разних бактеријских инфекција. Оно што је неопходно како би се ови екстракти и наночестице увеле у медицинску примену јесте да се настави са истраживањима њихове даље могуће примене у различитим областима медицине и биоматеријала, као и процене безбедности и ефикасности њихове примене, нарочито у *in vivo* условима.

6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] Bauer Petrovska, B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev.* **6**(11), 1-5, 2012. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>.
- [2] Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J.A., Manzano-Agugliaro, F. Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**(10), 3376, 2020. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17103376>.
- [3] Singh Ningthoujam, S., Das Talukdar, A., Singh Potsangbam, K., Dutta Choudhury, M., Review Challenges in developing medicinal plant databases for sharing ethnopharmacological knowledge. *J. Ethnopharmacol.* **141**(1), 9–32, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.02.042>.
- [4] Schafner Willi, E.B., Häfolfinger, B., Ernst, B. Ljekovito bilje. Leo Commerce, 1999. ISBN: 9536232758
- [5] Ahn K., The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. *BMB Rep.* **50**(3), 111–116, 2017. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2017.50.3.221>.
- [6] Schmidt, B.M., Ribnicky, D.M., Lipsky, P.E., Raskin, I. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics, *Nat. Chem. Biol.* **3**(7), 360–366, 2007. <https://doi.org/10.1038/nchembio0707-360>.
- [7] Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* **33**(8), 1582–1614, 2015. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.08.001>.
- [8] Heinrich, M. Ethnopharmacy and natural product research—Multidisciplinary opportunities for research in the metabolomic age. *Phytochem. Lett.* **1**(1) 1–5, 2008. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2007.11.003>.
- [9] Corson, T.W., Crews, C.M. Molecular Understanding and Modern Application of Traditional Medicines: Triumphs and Trials. *Cell* **130**(5), 769–774, 2007. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.08.021>.
- [10] Deborde, C., Moing, A., Roch, L., Jacob, D., Rolin D., Giraudeau, P. Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **102-103**, 61-97, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.05.001>.
- [11] Stagos, D. Antioxidant Activity of Polyphenolic Plant Extracts. *Antioxidants* **9**(1), 19, 2020. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9010019>.
- [12] Nunes, C. dos R., Arantes, M.B., Pereira, S.M. de F., Cruz, L.L., Passos, M. S., Moraes, L.P., Vieira, I.J.C., Oliveira, D.B. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules* **25**(16), 3726, 2020. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25163726>.
- [13] Gonelimali, F.D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., Hatab, S.R. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. *Front. Microbiol.* **9**, 1639, 2018. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01639/BIBTEX>.

- [14] Mostafa, A.A., Al-Askar, A.A., Almaary, K.S., Dawoud, T.M., Sholkamy, E.N., Bakri, M.M. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi J. Biol. Sci.* **25**(2), 361–366, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2017.02.004>.
- [15] Okla, M.K., Alatar, A.A., Al-amri, S.S., Soufan, W.H., Ahmad, A., Abdel-Maksoud, M.A., M. Antibacterial and Antifungal Activity of the Extracts of Different Parts of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. *Plants* **10**(2), 252, 2021. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10020252>.
- [16] Rahaman, M.M., Islam, M.T. Anticancer Activity of Plant Derived Compounds: A Literature Based Review. *Clin. Oncol.* **7**, 1917, 2022. <https://doi.org/10.25107/2474-1663.1917>. ISSN: 2474-1663
- [17] Kifle, Z.D., Abdelwuhab, M., Melak, A.D., Genet, G., Meseret, T., Adugna, M. Pharmacological evaluation of medicinal plants with antidiabetic activities in Ethiopia: A review. *Metabol Open* **13**, 100174, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.METOP.2022.100174>.
- [18] Iriti, M., Vitalini, S., Fico, G., Faoro, F. Neuroprotective Herbs and Foods from Different Traditional Medicines and Diets. *Molecules* **15**(5), 3517-3555, 2010. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES15053517>.
- [19] Les, F., Cásedas, G., López, V. Bioactivity of Medicinal Plants and Extracts. *Biol.* **10**(7), 634, 2021. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10070634>.
- [20] Ahmed, H.M., Nabavi, S., Behzad, S. Herbal Drugs and Natural Products in the light of Nanotechnology and Nanomedicine for Developing Drug Formulations. *Mini Rev. Med. Chem.* **21**, 302–313, 2021. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200916143240>.
- [21] Ahmed, H.M. Ethnopharmacobotanical study on the medicinal plants used by herbalists in Sulaymaniyah Province, Kurdistan, Iraq. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **12**, 8, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0081-3>.
- [22] Wang, S., Su, R., Nie, S., Sun, M., Zhang, J., Wu, D., Moustaid-Moussa, N. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *J. Nutr. Biochem.* **25**(4), 363–376, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.002>.
- [23] Dewi, M.K., Chaerunisaa, A.Y., Muhaimin, M., Joni, I.M. Improved Activity of Herbal Medicines through Nanotechnology. *Nanomater.* **12**(22), 1–19, 2022. <https://doi.org/10.3390/nano12224073>.
- [24] Yang, B., Dong, Y., Wang, F., Zhang, Y. Nanoformulations to enhance the bioavailability and physiological functions of polyphenols. *Molecules* **25**(20), 4613, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25204613>.
- [25] Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Hull, D.R. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6**, 1769–1780, 2015. <https://doi.org/10.3762/BJNANO.6.181>.
- [26] Medici, S., Peana, M., Nurchi, V.M., Zoroddu, M.A. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *J. Med. Chem.* **62**(13), 5923–5943, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01439>.

- [27] Srikar, S.K., Giri, D.D., Pal, D.B., Mishra, P.K., Upadhyay, S.N., Srikar, S.K., Giri, D.D., Pal, D.B., Mishra, P.K., Upadhyay, S.N. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. *Green sustain. chem.* **6**(1), 34–56, 2016. <https://doi.org/10.4236/GSC.2016.61004>.
- [28] Nowack, B., Krug, H.F., Height, M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environ. Sci. Technol.* **45**(4), 1177–1183, 2011. <https://doi.org/10.1021/ES103316Q>.
- [29] Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *J. Adv. Res.* **7**(1) 17–28, 2016. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2015.02.007>.
- [30] Rahimi, H.-R., Doostmohammadi, M. Nanoparticle Synthesis, Applications, and Toxicity. Applications of Nanobiotechnology, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87973>. ISBN 978-1-78985-978-2
- [31] Firdhouse, M.J., Lalitha, P. Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications. *J. Nanotechnol.*, Article ID 829526, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/829526>.
- [32] Rajeshkumar, S., Bharath, L.V. Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles – A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chem. Biol. Interact.* **273**, 219–227, 2017. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2017.06.019>.
- [33] Velusamy, P., Kumar, G.V., Jeyanthi, V., Das, J., Pachaiappan, R. Bio-Inspired Green Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Antibacterial Application. *Toxicol. Res.* **32**, 95–102, 2016. <https://doi.org/10.5487/TR.2016.32.2.095>.
- [34] Guilger-Casagrande, M., Lima R. Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 287, 2019. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00287>.
- [35] Klaus-Joerger, T., Joerger, R., Olsson, E., Granqvist, C.G. Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *Trends Biotechnol.* **19**(1), 15–20, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01514-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01514-6).
- [36] Sadowski, Z., Maliszewska, I., Polowczyk, I., Sadowski, Z., Maliszewska, I.H., Grochowalska, B., Polowczyk I., Koźlecki T. Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. *Mater. Sci. -Pol.* **26**(2), 419-424, 2008. ISSN: 0137-1339
- [37] Godipurge, S.S., Yallappa, S., Biradar, N.J., Biradar, J.S., Dhananjaya, B.L., Hegde, G., Jagadish, K., Hegde, G. A facile and green strategy for the synthesis of Au, Ag and Au–Ag alloy nanoparticles using aerial parts of *R. hypocrateriformis* extract and their biological evaluation, *Enzyme Microb. Technol.* **95**, 174–184, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.08.006>.
- [38] Siddiqi, K.S., Husen, A. Green Synthesis, Characterization and Uses of Palladium/Platinum Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **11**, 482, 2016. <https://doi.org/10.1186/S11671-016-1695-Z>.
- [39] Velsankar, K., Aswin Kumara, R.M., Preethi, R., Muthulakshmi V., Sudhahar S. Green synthesis of CuO nanoparticles via *Allium sativum* extract and its characterizations on

- antimicrobial, antioxidant, antilarvicidal activities, *J. Environ. Chem. Eng.* **8**(5), 104123. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104123>.
- [40] Zangeneh, M.M., Zangeneh, A. Biosynthesis of iron nanoparticles using *Allium eriophyllum* Boiss extract: Chemical characterization, antioxidant, cytotoxicity, antibacterial, antifungal, and cutaneous wound healing effects. *Appl Organomet Chem* **34**(1), 2019. e5304. <https://doi.org/10.1002/AOC.5304>.
- [41] Punjabi, K., Mehta, S., Chavan, R., Chitalia, V., Deogharkar, D., Deshpande, S. Efficiency of Biosynthesized Silver and Zinc Nanoparticles Against Multi-Drug Resistant Pathogens. *Front Microbiol* **9**, 2207, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02207>.
- [42] Srećković, N.Z., Nedić, Z.P., Liberti, D., Monti, D.M., Mihailović, N.R., Katanić Stanković, J.S., Dimitrijević, S., Mihailović, V.B. Application potential of biogenically synthesized silver nanoparticles using: *Lythrum salicaria* L. extracts as pharmaceuticals and catalysts for organic pollutant degradation. *RSC Adv* **11**, 35585–35599, 2021. <https://doi.org/10.1039/d1ra05570d>.
- [43] Akhtar, M.S., Panwar, J., Yun, Y.S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **1**(6), 591–602, 2013. <https://doi.org/10.1021/sc300118u>.
- [44] Chung, I.-M., Park, I., Seung-Hyun, K., Thiruvengadam, M., Rajakumar, G. Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Their Characteristic Properties and Therapeutic Applications. *Nanoscale Res. Lett.* **11**, 40, 2011. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1257-4>.
- [45] Morais, M., Teixeira, A.L., Dias, F., Machado, V., Medeiros, R., Prior, J.A.V. Cytotoxic Effect of Silver Nanoparticles Synthesized by Green Methods in Cancer. *J. Med. Chem.* **63**(23), 14308–14335, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01055>.
- [46] Benyettou, F., Rezgui, R., Ravaux, F., Jaber, T., Blumer, K., Jouiad, M., Motte, L., Olsen, J.C., Platas-Iglesias, C., Magzoub, M., Trabolsi, A. Synthesis of silver nanoparticles for the dual delivery of doxorubicin and alendronate to cancer cells. *J. Mater. Chem. B* **3**, 7237–7245, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5TB00994D>.
- [47] Patra, S., Mukherjee, S., Barui, A.K., Ganguly, A., Sreedhar, B., Patra, C.R. Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Mater. Sci. Eng. C* **53**, 298–309, 2015. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.04.048>.
- [48] Guo, D., Dou, D., Ge, L., Huang, Z., Wang, L., Gu, N. A caffeic acid mediated facile synthesis of silver nanoparticles with powerful anti-cancer activity. *Colloids Surf B* **134**, 229–234, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.06.070>.
- [49] Singh, G. Plant Systematics - An integral approach 3th edition, 2010. ISBN 9781578086689
- [50] Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach, Third edition., Sunderland, MA : Sinauer Associates (2008)
- [51] Piwowarski, J.P., Granica, S., Kiss, A.K. *Lythrum salicaria* L. - Underestimated medicinal plant from European traditional medicine. A review. *J. Ethnopharmacol.* **170**, 226–250, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.017>.

- [52] Simpson, M.G. Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots. *Plant Systematics* (2010) 275–448. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374380-0.50008-7>.
- [53] Tamokou, J. de D., Mbaveng, A.T., Kuete, V. Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* (2017) 207–237. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00008-X>.
- [54] Mamadalieva N.Z., Akramov, D.K., Böhmendorfer, S., Azimova, S.S., Rosenau, T. Extractives and biological activities of Lamiaceae species growing in Uzbekistan. *Holzforschung* **74**(2), 96–115, 2019. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0296>.
- [55] Kokkini, S., Karousou, R., Hanlidou, E., HERBS | Herbs of the Labiatae. Editor(s): Benjamin Caballer. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). Academic Press, 3082-3090, 2003. ISBN 9780122270550
- [56] Carović-Stanko, K., Petek, M., Grdiša, M., Pintar, J., Bedeković, D., Ćustić, M.H., Satovic, Z. Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods-A review. *Czech J. Food Sci.* **34**(5), 377–390, 2016. <https://doi.org/10.17221/504/2015-CJFS>.
- [57] Brickell, C. *RHS A-Z encyclopedia of garden plants*, Penguin Books Ltd; 3Rev Ed edition (January 1, 2008). ISBN-10:1405332964
- [58] Јосифовић М. Флора СР Србије. Српска академија наука и уметности, Београд , 1973. ISBN 9788670255746.
- [59] Pawlaczyk, I., Czerchawski, L., Kańska, J., Bijak, J., Capek, P., Pliszczak-Król, A., Gancarz, R. An acidic glycoconjugate from *Lythrum salicaria* L. with controversial effects on haemostasis. *J. Ethnopharmacol.* **131**(1), 63–69, 2010. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.06.001>.
- [60] Hamel, P.B., Chiltoskey, M.U. *Cherokee Plants and Their Uses - A 400 Year History*. page 43, Cherokee Publications 1975. ISBN-10:0935741259
- [61] Умељић, В. У свету цвећа и пчела - Атлас медоносног биља 1. Четврто издање, 2015. ISBN-86901835-2-3
- [62] Lavoie, C., Should we care about purple loosestrife? The history of an invasive plant in North America. *Biol. Invasions* **12**, 1967–1999, 2010. <https://doi.org/10.1007/S10530-009-9600-7>.
- [63] Dinić, J., Novaković, M., Pešić, M. Potential for cancer treatment: natural products from the Balkans. *Biodiversity and Biomedicine* 137–159, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819541-3.00009-8>. ISBN 9780128195413
- [64] Scholey, A., Stough, C., Neurocognitive effects of herbal extracts, *Lifetime Nutritional Influences on Cognition. Behaviour and Psychiatric Illness* 272–297, Butterworth-Heinemann publisher, 2011. <https://doi.org/10.1533/9780857092922.2.272>. ISBN:9781845697525
- [65] Hao, D.C., Gu, X.-J., Xiao, P.G. Phytochemical and biological research of *Salvia* medicinal resources. *Medicinal Plants* 587–639. Woodhead Publishing, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100085-4.00014-1>. ISBN 9780081000854

- [66] Georgiev, V., Pavlov, A. *Salvia* biotechnology. p. 427, Springer International Publishing, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-73900-7>. ISBN 978-3-319-73899-4
- [67] Katanić Stanković, J.S., Srećković, N., Mišić, D., Gašić, U., Imbimbo, P., Monti, D.M., Mihailović, V. Bioactivity, biocompatibility and phytochemical assessment of lilac sage, *Salvia verticillata* L. (Lamiaceae) - A plant rich in rosmarinic acid. *Ind. Crops Prod.* **143**, 111932, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111932>.
- [68] Xu, J., Wei, K., Zhang, G., Lei, L., Yang, D., Wang, W., Han, Q., Xia, Y., Bi, Y., Yang, M., Li, M. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese *Salvia* species: A review. *J. Ethnopharmacol.* **225**(28) 18–30, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2018.06.029>.
- [69] Wu, Y.B., Ni, Z.Y., Shi, Q.W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.C., Cong, B. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chem. Rev.* **112**(11), 5967–6026, 2012. <https://doi.org/10.1021/cr200058f>.
- [70] Grzegorzczak-Karolak, I., Kiss, A.K. Determination of the Phenolic Profile and Antioxidant Properties of *Salvia viridis* L. Shoots: A Comparison of Aqueous and Hydroethanolic Extracts. *Molecules* **23**(6), 1468, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23061468>.
- [71] Casselman, I., Nock, C.J., Wohlmuth, H., Weatherby, R.P., Heinrich, M. From local to global—Fifty years of research on *Salvia divinorum*. *J. Ethnopharmacol.* **151**(2) 768–783, 2014. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2013.11.032>.
- [72] Kintzios, S.E., Sage: The genus *Salvia*, London, CRC Press, 2000. eBook ISBN: 9780429219832
- [73] Prisinzano, T.E., Tidgewell, K., Harding, W.W. k Opioids as Potential Treatments for Stimulant Dependence. *AAPS J* **7**(3), 592-599, 2005. <https://doi.org/10.1208/aapsj070361>
- [74] Capasso, R., Borrelli, F., Zjawiony, J., Kutrzeba, L., Aviello, G., Sarnelli, G., Capasso, F., Izzo, A.A. The hallucinogenic herb *Salvia divinorum* and its active ingredient salvinatorin A reduce inflammation-induced hypermotility in mice. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **20**(2), 142-148, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2007.00994.x>.
- [75] Blamey, M., Grey-Wilson C. The illustrated flora of Britain and northern Europe, 544. Publisher: Hodder and Stoughton, 1989. ISBN 10:0340401702
- [76] Srećković, N., Katanić Stanković, J.S., Matic, S., Mihailović, N.R., Imbimbo, P., Monti, D.M., Mihailović, V. *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae) as a promising source of phenolic compounds in the modulation of oxidative stress: Comparison between aerial parts and root extracts. *Ind. Crops Prod.* **155**, 112781, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2020.112781>.
- [77] Miraldi, E., Ferri, S., Mostaghimi, V. Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *J. Ethnopharmacol.* **75**(2-3), 77–87, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00381-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00381-0).
- [78] 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. *Int. J. Food Microbiol.* **56**(1) 3–12, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00218-X).
- [79] Al-Qura'n S. Ethnobotany of Folk Medicinal Potentiality of Aquatic Plants in Jordan. *J. Bot.* **1**(2), 75–84, 2006. <https://scialert.net/abstract/?doi=rjb.2006.75.84>
- [80] Srećković, N., Mišić, D., Gašić, U., Matić, S.L., Katanić Stanković, J.S., Mihailović, N.R., Monti, D.M., D'Elia, L., Mihailović, V. Meadow sage (*Salvia pratensis* L.): A neglected sage species with valuable phenolic compounds and biological potential, *Ind. Crops Prod.* **189**, 115841, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115841>.
- [81] Clebsch, B. The new book of salvias: sages for every garden, 344. Publisher: Timber Press; Subsequent edition (April 5, 2003) ISBN-10:0881925608
- [82] Facciola, S. Cornucopia: a source book of edible plants, p. 677. Publisher: Kampong Pubns; 1st Ed. edition (January 1, 1990) ISBN-10: 0962808709
- [83] Vitalini, S., Tomè, F., Fico, G. Traditional uses of medicinal plants in Valvestino (Italy). *J. Ethnopharmacol.* **121**(1), 106–116, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.10.005>.
- [84] Vermerris, W., Nicholson, R. Phenolic compound biochemistry, p. 276. Springer, Dordrecht, Netherlands, 2006. ISBN: 978-1-4020-5163-0
- [85] Puech, J.L., Mertz, C., Michon, V., Guernevé C., Doco, T., Hervé Du Penhoat, C. Evolution of castalagin and vescalagin in ethanol solutions. Identification of new derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **47**(5), 2060–2066, 1999. <https://doi.org/10.1021/jf9813586>.
- [86] Salminen, J.P., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pihlaja, K., Pulkkinen, P. Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *J. Chem. Ecol.* **30**(9) 1693–1711, 2004. <https://doi.org/10.1023/b:joc.0000042396.40756.b7>.
- [87] Rauha, J.P., Wolfender, J.L., Salminen, J.P., Pihlaja, K., Hostettmann, K., Vuorela, H. Characterization of the polyphenolic composition of purple loosestrife (*Lythrum salicaria*). *Z. Naturforsch. C* **56**(1-2), 13–20, 2001. <https://doi.org/10.1515/ZNC-2001-1-203/HTML>.
- [88] Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A.R., Miron, A. Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health Benefits. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**(1), 29–45, 2016. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067595>.
- [89] Ganesan, K., Xu, B. Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: a critical review. *Ann. N Y Acad. Sci.* **1401**(1), 102–113, 2017. <https://doi.org/10.1111/nyas.13446>.
- [90] Courts, F.L., Williamson, G. The occurrence, fate and biological activities of c-glycosyl flavonoids in the human diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55**(10), 1352–1367, 2015. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.694497>.
- [91] Iwashina, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.* **113**, 287–299, 2000. <https://doi.org/10.1007/PL00013940>
- [92] Hussein, R.A., El-Anssary, A.A. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. IntechOpen. 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76139>

- [93] Fujita, E., Fuji, K., Bessho, K., Sumi, A., Nakamura, S. The structures of lythranine, lythranidine, and lythramine, novel alkaloids from *Lythrum anceps* makino. *Tetrahedron Lett.* **8**(46), 4595–4600, 1967. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)89563-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)89563-0).
- [94] Fujita, E., Bessho, K., Saeki, Y., Ochiai, M., Fuji, K. Lythraceous alkaloids. V. Isolation of ten alkaloids from *Lythrum anceps*. *J. Nat. Prod.* **34**(3), 306–309, 1971. PMID: 5124064.
- [95] Fujita, E., Bessho, K., Fuji, K., Sumi, A. Lythraceous Alkaloids. I. Characterization of the novel alkaloids, lythranine, lythranidine, and lythramine isolated from *Lythrum anceps* MAKINO. *Chem. Pharm. Bull.* **18**(11), 2216–2223, 1970. <https://doi.org/10.1248/cpb.18.2216>
- [96] Wu, Y.B., Ni, Z.Y., Shi, Q.W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.C., Cong, B. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chem. Rev.* **112**(11), 5967–6026, 2012. <https://doi.org/10.1021/CR200058F>.
- [97] Askari, S.F., Avan, R., Tayarani-Najaran, Z., Sahebkar, A., Eghbali, S. Iranian *Salvia* species: A phytochemical and pharmacological update. *Phytochem* **183**, 112619, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112619>.
- [98] Ghorbani, A., Esmailizadeh, M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its 283 components. *J. Tradit. Complement. Med.* **7**(4), 433–440, 2017. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jtcme.2016.12.014>.
- [99] Lu, Y., Yeap Foo, L. Polyphenolics of *Salvia* - A review. *Phytochem.* **59**(2), 117–140, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00415-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00415-0).
- [100] Dewick, P.M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 181–222, 2002. <https://doi.org/10.1039/b002685i>.
- [101] Rustaiyan, A., Masoudi, S., Tabatabaei-Anaraki, M. Terpenoids from Iranian *Salvia* Species. *Nat. Prod. Commun.* **2**(10), 1031–1042, 2007. <https://doi.org/10.1177/1934578X0700201012>.
- [102] Romanova, A.S., Pribylova, G.F., Zakharov, P.I., Sheichenko, V.I., Ban'kovskii, A.I. A new quinone from *Salvia nemorosa*. *Chem. Nat. Compd.* **7**, 190–191, 1971. <https://doi.org/10.1007/BF00568696>.
- [103] Eghbaliferiz, S., Emami, S.A., Tayarani-Najaran, Z., Iranshahi, M., Shakeri, A., Hohmann, J., Asili, J. Cytotoxic diterpene quinones from *Salvia tebesana* Bunge. *Fitoterapia* **128**, 97–101, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.05.005>.
- [104] Jiang, Z., Gao, W., Huang, L. Tanshinones, Critical Pharmacological Components in *Salvia miltiorrhiza*, *Front. Pharmacol.* **10**, 202, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00202>.
- [105] Farimani, M.M., Taleghani, A., Aliabadi, A., Aliahmadi, A., Esmaeili, M.A., Sarvestani, N.N., Khavasi, H.R., Smiesko, M., Hamburger, M., Ebrahimi, S.N. Labdane diterpenoids from *Salvia leriifolia*: Absolute configuration, antimicrobial and cytotoxic activities. *Planta Med.* **82**(14), 1279–1285, 2016. <https://doi.org/10.1055/S-0042-107798>.

- [106] Ebrahimi, S.N., Farimani, M.M., Mirzania, F., Soltanipoor, M.A., Mieri, M., Hamburger, M. Manoyloxide sesterterpenoids from *Salvia mirzayanii*. *J. Nat. Prod.* **77**(14), 848–854, 2014. <https://doi.org/10.1021/np400948n>.
- [107] Rustaiyan, A., Sadjadi, A. Salvisyriacolide, a sesterterpene from *Salvia syriaca*. *Phytochem.* **26**(11), 3078–3079, 1987. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84601-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84601-4).
- [108] Ghoran, S.H., Taktaz, F., Mozafari, A.A., Tunçtürk, M., Sekeroglu, N., Kijjoa, A. Uncommon Terpenoids from *Salvia* Species: Chemistry, Biosynthesis and Biological Activities. *Molecules* **27**, 1128, 2022. <https://doi.org/doi: 10.3390/molecules27031128>.
- [109] Zhao, B.-L., Jiang, W., Zhao, Y., Wu, J.-H., Xin, W.-J. Scavenging effects of *Salvia miltiorrhiza* on free radicals and its protection for myocardial mitochondrial membranes from ischemia-reperfusion injury. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38**(6), 1171–1182, 1996. PMID: 8739039
- [110] Kang, H.S., Chung, H.Y., Jung, J.H., Kang, S.S., Choi, J.S. Antioxidant effect of *Salvia miltiorrhiza*. *Arch. Pharm. Res.* **20**, 496–500, 1997. <https://doi.org/10.1007/BF02973947>
- [111] Nadeem, M., Imran, M., Gondal, T.A., Imran, A., Shahbaz, M., Amir, R.M., Sajid, M.W., Qaisrani, T.B., Atif, M., Hussain, G., Salehi, B., Ostrander, E.A., Martorell, M., Sharifi-Rad, J., Cho, W.C., Martins, N. Therapeutic Potential of Rosmarinic Acid: A Comprehensive Review. *Appl. Sci.* **9**(15), 3139, 2019. <https://doi.org/10.3390/app9153139>.
- [112] Jiang, R.-W., Lau, K.-M., Hon, P.-M., Mak, T., Woo, K.-S., Fung, K.-P. Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Curr. Med. Chem.* **12**(2), 237–246, 2012. <https://doi.org/10.2174/0929867053363397>.
- [113] Zhang, M., Wei, L., Xie, S., Xing, Y., Shi, W., Zeng, X., Chen, S., Wang, S., Deng, W., Tang, Q. Activation of Nrf2 by Lithospermic Acid Ameliorates Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury by Promoting Phosphorylation of AMP-Activated Protein Kinase α (AMPK α). *Front. Pharmacol.* **12**, 794982, 2021. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.794982>.
- [114] Qin, T., Rasul, A., Sarfraz, A., Sarfraz, I., Hussain, G., Anwar, H., Riaz, A., Liu, S., Wei, W., Li, J., Li, X. Salvianolic acid A & B: potential cytotoxic polyphenols in battle against cancer via targeting multiple signaling pathways. *Int. J. Biol. Sci.* **15**(10), 2256–2264, 2019. <https://doi.org/10.7150/ijbs.37467>.
- [115] Tanaka, T., Nishimura, A., Kouno, I., Nonaka, G.I., Young, T.J. Isolation and characterization of yunnaneic acids A-D, four novel caffeic acid metabolites from *Salvia yunnanensis*. *J. Nat. Prod.* **59**(9), 843–849, 1996. <https://doi.org/10.1021/NP960425S>.
- [116] Piątczak, E., Owczarek, A., Lisiecki, P., Gonciarz, W., Kozłowska, W., Szemraj, M., Chmiela, M., Kiss, A.K., Olszewska, M.A., Grzegorzczak-Karolak, I. Identification and quantification of phenolic compounds in *Salvia cadmica* Boiss. and their biological potential. *Ind. Crops Prod.* **160**, 113113, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113113>.
- [117] Gupta, H.C., Ayengar, K.N.N., Rangaswami, S. Structure & synthesis of salvitin, a new flavone isolated from *Salvia plebeian*. *Indian J. Chem.* **13**, 215–217, 1975. ISSN: 0019-5103

- [118] Takeda, K., Yanagisawa, M., Kifune, T., Kinoshita, T., Timberlake, C.F. A blue pigment complex in flowers of *Salvia patens*. *Phytochem.* **35**(5), 1167–1169, 1994. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94815-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94815-5).
- [119] Lu, Y., Foo, L.Y. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochem.* **55**(3), 263–267, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00309-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00309-5).
- [120] Cañigueral, S., Iglesias, J., Hamburger, M., Hostettmann, K. Phenolic Constituents of *Salvia lavandulifolia* ssp. *Lavandulifolia*. *Planta Med.* **55**(1), 92, 1989. <https://doi.org/10.1055/S-2006-961840>.
- [121] Sharma, V., Mehdi, M.M. Oxidative stress, inflammation and hormesis: The role of dietary and lifestyle modifications on aging. *Neurochem. Int.* **164**, 105490, 2023. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2023.105490>.
- [122] Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4**(8), 118–126, 2010. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.
- [123] Kruk, J., Aboul-Enein, B.H., Duchnik, E., Marchlewicz, M. Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. *J. Physiol. Sci.* **72**(1), 1–24, 2022. <https://doi.org/10.1186/S12576-022-00845-1>.
- [124] Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. Oxidative stress, aging, and diseases, *Clin. Interv. Aging* **2018**(13), 757–772, 2018. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>.
- [125] Pluth, M.D., Zhao, Y., Cerda, M.M. H₂S donors with optical responses, *Methods Enzymol.* **641**, 149–164, 2020. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.04.039>.
- [126] Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 8416763, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- [127] Domej, W., Oetl, K., Renner, W. Oxidative stress and free radicals in COPD-implications and relevance for treatment. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **9**(1), 1207–1224, 2014. <https://doi.org/10.2147/COPD.S51226>.
- [128] Calabrese, V., Guagliano, E., Sapienza, M., Panebianco, M., Calafato, S., Puleo, E., Pennisi, G., Mancuso, C., Allan Butterfield, D., Stella, A.G. Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: Role of vitagenes. *Neurochem. Res.* **32**, 757–773, 2007. <https://doi.org/10.1007/S11064-006-9203-Y>.
- [129] Abdollahi, M., Moridani, M.Y., Aruoma, O.I., Mostafalou, S. Oxidative stress in aging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 876834, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/876834>.
- [130] Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* **266**, 37–56, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89>.
- [131] Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**(1), 1–40, 2006. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2005.12.009>.

- [132] Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**(1), 47–95, 2002. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00018.2001>.
- [133] Baboran, T., Soobrattee, M.A., Luximon-Ramma, V., Aruoma, O.I. Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet J. Medical Update* **1**(2), 24–40, 2007. <https://doi.org/10.4314/ijmu.v1i2.39839>.
- [134] Butterfield, D.A. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic. Res.* **36**(12), 1307–1313, 2002. <https://doi.org/10.1080/1071576021000049890>.
- [135] Hoshino, Y., Mishima, M. Redox-based therapeutics for lung diseases. *Antioxid. Redox. Signal.* **10**(4), 701–704, 2008. <https://doi.org/10.1089/ARS.2007.1961>.
- [136] MacNee, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.* **429**(1-3), 195–207, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01320-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01320-6).
- [137] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **39**(1), 44–84, 2007. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2006.07.001>.
- [138] Allameh, A., Niayesh-Mehr, R., Aliarab, A., Sebastiani, G., Pantopoulos, K. Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. *Antioxidants* **12**(9), 1653, 2023. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12091653>.
- [139] Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., Sedigheh, B., Bazzaz, F. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **8**, 118, 2019.
- [140] Orth, D.S., Kabara, J.J., Denyer, S.P., Tan, S.K. (Eds.). *Cosmetic and Drug Microbiology* (1st ed.). CRC Press. (2006). <https://doi.org/10.3109/9781420019919>.
- [141] Savoia, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol.* **7**(8), 979–990, 2012. <https://doi.org/10.2217/FMB.12.68>.
- [142] Stefanović, O., Čomić, L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2**(1), 1-5, 2012. ISSN: 2231-3354
- [143] Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., Bezirtzoglou, E. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms* **9**(10), 2041, 2021. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9102041>.
- [144] Saleem, M., Nazir, M., Ali, M.S., Hussain, H., Lee, Y.S., Riaz, N., Jabbar, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 238–254, 2010. <https://doi.org/10.1039/B916096E>.
- [145] Radulović, N.S., Blagojević, P.D., Stojanović-Radić, Z.Z., Stojanović, N.M. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Curr. Med. Chem.* **20**(7), 932–952, 2013. <https://doi.org/10.2174/0929867311320070008>.
- [146] Rajasekaran, D., Palombo, E.A., Yeo, T.C., Ley, D.L.S., Tu, C.L., Malherbe, F., Grollo, L., Rajasekaran, D., Palombo, E.A., Yeo, T.C., Ley, D.L.S., Tu, C.L., Malherbe, F.,

- Grollo, L. Evidence of Synergistic Activity of Medicinal Plant Extracts against Neuraminidase Inhibitor Resistant Strains of Influenza Viruses. *Adv. Microbiol.* **4**(16), 1260–1277, 2014. <https://doi.org/10.4236/AIM.2014.416136>.
- [147] Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., Iranshahy M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytother. Res.* **33**(1), 13–40, 2018. <https://doi.org/10.1002/ptr.6208>.
- [148] Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem. Rev.* **18**, 241–272, 2019. <https://doi.org/10.1007/S11101-018-9591-Z>.
- [149] Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**(5), 343–356, 2005. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2005.09.002>.
- [150] Engels, C., Schieber, A., Gänzle, M.G. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(7), 2215–2223, 2011. <https://doi.org/10.1128/AEM.02521-10>.
- [151] Alfonso, E.E., Troche, R., Deng, Z., Annamalai, T., Chapagain, P., Tse-Dinh, Y.C., Leng, F. Potent Inhibition of Bacterial DNA Gyrase by Digallic Acid and Other Gallate Derivatives. *Chem. Med. Chem.* **17**(23), e202200301, 2022. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200301>.
- [152] Paduch, R., Kandefer – Szerszeń, M., Trytek, M., Fiedurek, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* **55**, 315–327, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>.
- [153] Greenwell, M., Rahman, P.K.S.M. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **6**, 4103–4112, 2015. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(10\).4103-12](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12).
- [154] Akhtar, M.F., Saleem, A., Rasul, A., Faran Ashraf Baig, M.M., Bin-Jumah, M., Abdel Daim, M.M. Anticancer natural medicines: An overview of cell signaling and other targets of anticancer phytochemicals. *Eur. J. Pharmacol.* **888**, 173488, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.173488>.
- [155] Furtado, R.A., Oliveira, B.R., Silva, L.R., Cleto, S.S., Munari, C.C., Cunha, W.R., Tavares, D.C. Chemopreventive effects of rosmarinic acid on rat colon carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.* **24**(2), 106–112, 2015. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000055>.
- [156] Salama, A.A.A., Allam, R.M. Promising targets of chrysin and daidzein in colorectal cancer: Amphiregulin, CXCL1, and MMP-9. *Eur. J. Pharmacol.* **892**, 173763, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173763>.
- [157] Pedro, D.F.N., Ramos, A.A., Lima, C.F., Baltazar, F., Pereira-Wilson, C. Colon Cancer Chemoprevention by Sage Tea Drinking: Decreased DNA Damage and Cell Proliferation. (2015). *Phytother. res.* **30**(2), 298–305, 2016. <https://doi.org/10.1002/ptr.5531>.
- [158] Khan, I., Saeed, K., Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* **12**(7), 908–931, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2017.05.011>.

- [159] Nicolae-Maranciuc, A., Chicea, D., Chicea, L.M. Ag Nanoparticles for Biomedical Applications—Synthesis and Characterization—A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(10), 5778, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23105778>.
- [160] Zhang, K., Suh, J.M., Choi, J.-W., Jang, H.W., Shokouhimehr, M., Varma, R.S. Recent Advances in the Nanocatalyst-Assisted NaBH₄ Reduction of Nitroaromatics in Water. *ACS Omega* **4**(1), 483–495, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03051>.
- [161] Astefanei, A., Núñez, O., Galceran, M.T. Characterisation and determination of fullerenes: A critical review. *Anal. Chim. Acta* **882**(1), 1–21, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.025>.
- [162] Alharbi, N.S., Alsubhi, N.S., Felimban, A.I. Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **15**(3), 1687–8507, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2022.06.012>.
- [163] Iravani, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.* **13**(10), 2638–2650, 2011. <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>.
- [164] Singh, J.P., Kumar, M., Sharma, A., Pandey, G., Chae, K.H., Lee, S. Bottom-Up and Top-Down Approaches for MgO. Sonochemical Reactions. IntechOpen. (2020) <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.91182>.
- [165] Varma, A., Mukasyan, A.S., Rogachev, A.S., Manukyan, K. V. Solution Combustion Synthesis of Nanoscale Materials. *Chem. Rev.* **116**(23), 14493–14586, 2016. <http://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00279>
- [166] Bello, S.A., Agunsoye, J.O., Hassan, S.B. Synthesis of coconut shell nanoparticles via a top down approach: Assessment of milling duration on the particle sizes and morphologies of coconut shell nanoparticles. *Mater. Lett.* **159**(15), 514–519, 2015. <https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2015.07.063>.
- [167] Priyadarshana, G., Kottegoda, N., Senaratne, A., De Alwis, A., Karunaratne, V. Synthesis of magnetite nanoparticles by top-down approach from a high purity ore. *J. Nanomater.* **2015**, 317312, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/317312>.
- [168] Zhou, Y., Dong, C.K., Han, L.L., Yang, J., Du, X.W. Top-Down Preparation of Active Cobalt Oxide Catalyst. *ACS Catal.* **6**(10), 6699–6703, 2016. <https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.6B02416>
- [169] Ssekatawa, K., Byarugaba, D.K., Kato, C.D., Wampande, E.M., Ejobi, F., Nakavuma, J.L., Maaza, M., Sackey, J., Nxumalo, E., Kirabira, J.B. Green Strategy–Based Synthesis of Silver Nanoparticles for Antibacterial Applications. *Front. nanotechnol.* **3**, 697303, 2021. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.697303>
- [170] Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere* **82**(4), 489–494, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.023>.
- [171] Gardea-Torresdey, J.L., Parsons, J.G., Gomez, E., Peralta-Videa, J., Troiani, H.E., Santiago, P., Yacaman, M.J. Formation and Growth of Au Nanoparticles inside Live Alfalfa Plants. *Nano Lett.* **2**(4), 397–401, 2002. <https://doi.org/10.1021/nl015673+>.
- [172] Asif, M., Yasmin, R., Asif, R., Ambreen, A., Mustafa, M., Umbreen, S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs), Structural Characterization, and their Antibacterial

- Potential. *Dose-Response* **20**(2), 1–11, 2022. <https://doi.org/10.1177/15593258221088709>.
- [173] Liaqat, N., Jahan, N., Khalil-ur-Rahman, T., Anwar, H. Qureshi, Green synthesized silver nanoparticles: Optimization, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity study by hemolysis assay. *Front. Chem.* **10**, 952006, 2022. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.952006>.
- [174] Vanlalveni, C., Lallianrawna, S., Biswas, A., Selvaraj, M., Changmai, B., Rokhum, S.L. Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature. (2021). *RSC Advance* **11**, 2804, 2021. <https://doi.org/10.1039/d0ra09941d>.
- [175] Takcı, D.K., Ozdenefe, M.S., Genc, S. Green synthesis of silver nanoparticles with an antibacterial activity using *Salvia officinalis* aqueous extract. *J. Cryst. Growth* **614**, 127239, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2023.127239>.
- [176] Pirtarighat, S., Ghannadnia, M., Baghshahi, S. Green synthesis of silver nanoparticles using the plant extract of *Salvia spinosa* grown in vitro and their antibacterial activity assessment. *J. Nanostructure Chem.* **9**, 1–9, 2019. <https://doi.org/10.1007/s40097-018-0291-4>.
- [177] Dilbar, S., Sher, H., Ali, H., Ullah, R., Ali, A., Ullah, Z. Antibacterial Efficacy of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using *Salvia nubicola* Extract against *Ralstonia solanacearum*, the Causal Agent of Vascular Wilt of Tomato. *ASC Omega* **8**(34), 31155–31167, 2023. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03164>.
- [178] Baghayeri, M., Mahdavi, B., Hosseinpour-Mohsen Abadi, Z., Farhadi, S. Green synthesis of silver nanoparticles using water extract of *Salvia leriifolia*: Antibacterial studies and applications as catalysts in the electrochemical detection of nitrite. *Appl. Organomet. Chem.* **32**(2), e4057, 2018. <https://doi.org/10.1002/AOC.4057>.
- [179] Mihailović, V., Srećković, N., Nedić, Z.P., Dimitrijević, S., Matić, M., Obradović, A., Selaković, D., Rosić, G., Katanić Stanković, J.S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Salvia verticillata* and *Filipendula ulmaria* Extracts: Optimization of Synthesis, Biological Activities, and Catalytic Properties. *Molecules* **28**(2), 808, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28020808>.
- [180] Mie, R., Samsudin, M.W., Din, L.B., Ahmad, A., Ibrahim, N., Adnan, S.N.A. Synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using the lichen *Parmotrema praesorediosum*. *Int. J. Nanomedicine* **9**(1), 121–127, 2014. <https://doi.org/10.2147/IJN.S52306>.
- [181] Liu, Y.S., Chang, Y.C., Chen, H.H. Silver nanoparticle biosynthesis by using phenolic acids in rice husk extract as reducing agents and dispersants. *J. Food Drug Anal.* **26**(2), 649–656, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2017.07.005>.
- [182] Anastas P.T., Warner J.C. Green chemistry: theory and practice. Oxford University Press. (1998). ISBN 9780198502340
- [183] Zhang, T., Wang, L., Chen, Q., Chen, C. Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles, *Yonsei Med J.* **55**(2), 283–291, 2014. <https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.2.283>.
- [184] Liao, C., Li, Y., Tjong, S.C. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(2), 449, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>.

- [185] Yin, I.X., Zhang, J., Zhao, I.S., Mei, M.L., Li, Q., Chu, C.H. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int. J. Nanomedicine* **15**, 2555–2562, 2020. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>.
- [186] Slavin, Y.N., Asnis, J., Häfeli, U.O., Bach, H. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J. Nanobiotechnology* **15**, 65, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>
- [187] Khorrami, S., Zarrabi, A., Khaleghi, M., Danaei, M., Mozafari, M.R. Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 8013–8024, 2018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S189295>.
- [188] Gurunathan, S., Choi, Y.J., Kim, J.H. Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles on Endometritis Caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in Dairy Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(4), 1210, 2018. <https://doi.org/10.3390/IJMS19041210>.
- [189] Katva, S., Das S., Moti, H.S., Jyoti ,A., Kaushik, S. Antibacterial Synergy of Silver Nanoparticles with Gentamicin and Chloramphenicol against *Enterococcus faecalis*. *Pharmacogn. Mag.* **13**(4), S828–S833, 2018. https://doi.org/10.4103/PM.PM_120_17.
- [190] Kovács, D., Igaz, N., Gopisetty, M.K., Kiricsi, M. Cancer Therapy by Silver Nanoparticles: Fiction or Reality? *Int. J. Mol. Sci.* **23**(2), 839, 2022. <https://doi.org/10.3390/IJMS23020839>.
- [191] Mao, B.H., Tsai, J.C., Chen, C.W., Yan, S.J., Wang, Y.J. Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology* **10**(8), 1021–1040, 2016. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1189614>.
- [192] Tannock2, I.F., Hot, D. Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation1. *Cancer Res.* **49**(16), 4373–4384, 1989. PMID: 2545340
- [193] Cameron, S.J., Hosseinian, F., Willmore, W.G. A Current Overview of the Biological and Cellular Effects of Nanosilver. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(7), 2030, 2018. <https://doi.org/10.3390/IJMS19072030>.
- [194] Nakkala, J.R., Mata, R., Sadras, S.R. Green synthesized nano silver: Synthesis, physicochemical profiling, antibacterial, anticancer activities and biological *in vivo* toxicity. *J. Colloid Interface Sci.* **499**, 33–45, 2017. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.03.090>.
- [195] Gupta, S., Tejavath, K.K. Phytosynthesized nanoparticle-directed catalytic reduction of synthetic dyes: beast to beauty. *Nanotechnol. Environ. Eng.* **6**, 6, 2021. <https://doi.org/10.1007/S41204-021-00101-8>.
- [196] Marimuthu, S., Antonisamy, A.J., Malayandi, S., Rajendran, K., Tsai, P.C., Pugazhendhi, A., Ponnusamy, V.K. Silver nanoparticles in dye effluent treatment: A review on synthesis, treatment methods, mechanisms, photocatalytic degradation, toxic effects and mitigation of toxicity. *J. Photochem. Photobiol. B* **205**, 111823, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2020.111823>.
- [197] Amjad, S., Shaukat, S., Rahman, H.M.A.U., Usman, M., Farooqi, Z.H., Nazar, M.F. Application of anionic-nonionic mixed micellar system for solubilization of methylene blue dye. *J. Mol. Liq.* **369**, 120958, 2023. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2022.120958>.

- [198] Zafar, S., Bukhari, D.A., Rehman, A. Azo dyes degradation by microorganisms – An efficient and sustainable approach. *Saudi J. Biol. Sci.* **29**(12), 103437, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103437>.
- [199] Sumi, M.B., Devadiga, A., Shetty, K.V., Saidutta, M.B. Solar photocatalytically active, engineered silver nanoparticle synthesis using aqueous extract of mesocarp of *Cocos nucifera* (Red Spicata Dwarf). *J. Exp. Nanosci.* **12**(1), 14–32, 2017. <https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1251622>.
- [200] Raj, S., Singh, H., Trivedi, R., Soni, V. Biogenic synthesis of AgNPs employing *Terminalia arjuna* leaf extract and its efficacy towards catalytic degradation of organic dyes. *Sci. rep.* **10**, 9616, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66851-8>.
- [201] Shimoga, G., Reddy Palem, R., Lee, S.-H., Kim, S.-Y. Catalytic Degradability of *p*-Nitrophenol Using Ecofriendly Silver Nanoparticles. *Metals* **10**(12), 1661, 2020. <https://doi.org/10.3390/met10121661>.
- [202] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152–178, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- [203] Kasprzak, M.M., Erxleben, A., Ochocki, J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Adv.* **5**, 45853–45877, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5RA05069C>.
- [204] Brighente, I.M.C., Dias, M., Verdi, L.G., Pizzolatti, M.G. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharm. Biol.* **45**, 156–161, 2007. <https://doi.org/10.1080/13880200601113131>.
- [205] Yermakov, A.I., Arasimov, V.V., Yarosh, N.P. “Methods of Biochemical Analysis of Plants,” *Agropromizdat*, Leningrad, 1987.
- [206] Polish Pharmacopoeia IX. PTFarm. Polish Pharmaceutical Society, Warsaw, Poland, 2011.
- [207] Scalbert, A., Monties, B., Janin, G. Tannins in Wood: Comparison of Different Estimation Methods. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1324–1329, 1989. <https://doi.org/10.1021/jf00089a026>.
- [208] Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Curr. protoc. food anal. chem.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2001. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>.
- [209] ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2014.
- [210] Engida, A.M., Kasim, N.S., Tsigie, Y.A., Ismadji, S., Huynh, L.H., Ju, Y.H. Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). *Ind. Crops Prod.* **41**, 392–396, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.043>.
- [211] Mišić, D., Šiler, B., Gašić, U., Avramov, S., Živković, S., Živković, J.N., Milutinović, M., Tešić, Ž. Simultaneous UHPLC/DAD/(+/-)HESI–MS/MS Analysis of Phenolic Acids and Nepetalactones in Methanol Extracts of *Nepeta* Species: A Possible

- Application in Chemotaxonomic Studies. *Phytochem. Anal.* **26**(1), 72–85, 2015 .
<https://doi.org/10.1002/PCA.2538>.
- [212] Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytother. Res.* **21**(7), 615–621, 2007. <https://doi.org/10.1002/ptr.2129>.
- [213] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**(9-10), 1231–1237, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [214] Hsu, C.K., Chiang, B.H., Chen, Y.S., Yang, J.H., Liu, C.L. Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chem.* **108**(2), 633–641, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.028>.
- [215] Yau Yan, L., Theng Teng, L., Jing Jhi, T. Antioxidant properties of guava fruit: comparison with some local fruits. *Sunway academic J.* **3**, 9–20, 2006. ISSN:1823-500X
- [216] Oyaizu, M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr. Diet.* **44**, 307–315, 1986. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>.
- [217] Lin, Y.W., Wang, Y.T., Chang, H.M., Wu, J.S.B. DNA protection and antitumor effect of water extract from residue of jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) achenes. *J. Food Drug Anal.* **16**(5), 63–69, 2008. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2335>
- [218] Zhang, L.L., Zhang, L.F., Xu, J.G., Hu, Q.P. Comparison study on antioxidant, DNA damage protective and antibacterial activities of eugenol and isoeugenol against several foodborne pathogens. *Food Nutr. Res.* **61**, 1353356, 2017. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1353356>.
- [219] Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carri, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, L.S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodkorb, A., Dotor, R., Jorge, I.P. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Funct.* **5**, 1113–1124, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.
- [220] CLSI, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard — Second Edition Serving the World ' s Medical Science Community Through Voluntary Consensus, 2008.
- [221] Cockerill, B.L.Z. F. R., Wiker, M. A., Alder, J., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Ferraro, M. J., Hardy, D. J., Hecht, D. W., Hindler, J. A., Patel, J. B., Powell, M., Swenson, J. M., Thomson, R. B., Traczewski, M. M., Turnidge, J. D., Weinstein, M. P. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard — Ninth Edition, 2012.
- [222] Liu, H., Taylor, T.H., Pettus, K., Johnson, S., Papp, J.R., Trees, D. Comparing the disk-diffusion and agar dilution tests for *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **5**, 46, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0148-x>.

- [223] Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* **42**(4), 321–324, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>.
- [224] Petruk, G., Monti, D.M., Ferraro, G., Pica, A., D'Elia, L., Pane, F., Amoresano, A., Furrer, J., Kowalski, K., Merlino, A. Encapsulation of the Dinuclear Trithiolato-Bridged Arene Ruthenium Complex Diruthenium-1 in an Apoferritin Nanocage: Structure and Cytotoxicity. *Chem. Med. Chem.* **14**(5), 594–602, 2019. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800805>.
- [225] Del Giudice, R., Petruk, G., Raiola, A., Barone, A., Monti, D.M., Rigano, M.M. Carotenoids in fresh and processed tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits protect cells from oxidative stress injury. *J. Sci. Food Agric.* **97**(5), 1616–1623, 2017. <https://doi.org/10.1002/JSFA.7910>.
- [226] Ullah Khan, A., Ullah Khan, Q., Tahir, K., Ullah, S., Arooj, A., Li, B., Ur Rehman, K., Nazir, S., Ullah Khan, M., Ullah, I. A Tagetes minuta based eco-benign synthesis of multifunctional Au/MgO nanocomposite with enhanced photocatalytic, antibacterial and DPPH scavenging activities. *Mater. Sci. Eng. C.* **126**, 112146, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112146>.
- [227] Umamaheswari, C., Lakshmanan, A., Nagarajan, N.S. Green synthesis, characterization and catalytic degradation studies of gold nanoparticles against Congo red and methyl orange. *J. Photochem. Photobiol. B* **178**, 33–39, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.017>.
- [228] Desai, M.P., Patil, R.V., Pawar, K.D. Green biogenic approach to optimized biosynthesis of noble metal nanoparticles with potential catalytic, antioxidant and antihaemolytic activities. *Process Biochem.* **98**, 172–182, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.005>.
- [229] Møller, C., Hansen, S.H., Cornett, C. Characterisation of tannin-containing herbal drugs by HPLC. *Phytochem. Anal.* **20**, 231–239, 2009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pca.1119>.
- [230] Tunalier, Z., Koşar, M., Küpeli, E., Çaliş, I., Başer, K.H.C. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-nociceptive activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts. *J. Ethnopharmacol.* **110**(3), 539–547, 2007. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2006.10.024>.
- [231] Becker, H., Scher, J.M., Speakman, J.B., Zapp, J. Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria*. *Fitoterapia* **76**(6), 580–584, 2005. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2005.04.011>.
- [232] Granica, S., Piwowarski, J.P., Kiss, A.K. Determination of C-glucosidic ellagitannins in Lythri herba by ultra-high performance liquid chromatography coupled with charged aerosol detector: Method development and validation. *Phytochem. Anal.* **25**(3), 201–206, 2014. <https://doi.org/10.1002/PCA.2492>.
- [233] Tzanova, M.T., Gerdzhikova, M.A., Grozeva, N.H., Terzieva, S.R. Antioxidant activity and total phenolic content of five *Salvia* species from Bulgaria. *Bulg. Chem. Commun.* **51**, 90–94, 2019. ISSN: 0861-9808

- [234] Boukhary, R., Raafat, K., Ghoneim, A.I., Aboul-Ela, M., El-Lakany, A. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of *Salvia fruticosa*: An HPLC Determination of Phenolic Contents. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2016**, 7178105, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7178105>.
- [235] Zengin, G., Mahomoodally, F., Picot-Allain, C., Diuzheva, A., Jekő, J., Cziáky, Z., Cvetanović, A., Aktumsek, A., Zeković, Z., Rengasamy, K.R.R. Metabolomic profile of *Salvia viridis* L. root extracts using HPLC–MS/MS technique and their pharmacological properties: A comparative study. *Ind. Crops Prod.* **131**, 266–280, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.060>.
- [236] Piwowarski, J.P., Kiss, A.K. C-glucosidic ellagitannins from *Lythri herba* (European Pharmacopoeia): Chromatographic profile and structure determination. *Phytochem. Anal.* **24**(4) 336–348, 2012. <https://doi.org/10.1002/PCA.2415>.
- [237] Šulniūtė, V., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. Phytochemical composition of fractions isolated from ten *Salvia* species by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction methods. *Food Chem.* **224**, 37–47, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.047>.
- [238] Ho, J.H.C., Hong, C.Y. Salvianolic acids: Small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *J. Biomed Sci.* **18**, 30, 2011. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-30>.
- [239] Al-Qudah, M.A., Al-Jaber, H.I., Abu Zarga, M.H., Abu Orabi, S.T., Flavonoid and phenolic compounds from *Salvia palaestina* L. growing wild in Jordan and their antioxidant activities. *Phytochem.* **99**, 115–120, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.01.001>.
- [240] Mihailović, V., Kreft, S., Tavčar Benković E., Ivanović, N., Stanković, M.S. Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. *Ind. Crops Prod.* **89**, 141–151, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.075>.
- [241] Miski, M., Ulubelen, A., Johansson, C., Mabry, T.J. Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. *J. Nat. Prod.* **46**(6), 874–875, 1983. <https://doi.org/10.1021/np50030a007>.
- [242] Neubig, R.R., Spedding, M., Kenakin, T., Christopoulos, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **55**(4), 2003. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.4>.
- [243] Noon, J., Mills, T.B., Norton, I.T. The use of natural antioxidants to combat lipid oxidation in O/W emulsions. *J. Food Eng.* **281**, 110006, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110006>.
- [244] Manayi, A., Khanavi, M., Saiednia, S., Azizi, E., Mahmoodpour, M.R., Vafi, F., Malmir, M., Siavashi, F., Hadjiakhoondi, A. Biological activity and microscopic characterization of *Lythrum salicaria* L. *DARU J. Pharm. Sci.* **21**, 1, 2013. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-21-61>.
- [245] Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* **85**(2), 231–237, 2004. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2003.05.007>.

- [246] López, V., Akerreta S., Casanova, E., María García-Mina, J., Yolanda Cavero, R., Isabel Calvo, M. *In Vitro* Antioxidant and Anti-rhizopus Activities of Lamiaceae Herbal Extracts. *Plant Foods Hum. Nutr.* **62**, 151–155, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11130-007-0056-6>.
- [247] Zhao, G.R., Xiang, Z.J., Ye, T.X., Yuan, Y.J., Guo, Z.X. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chem* **99**, 767–774, 2006. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.09.002>.
- [248] Orhan, I.E., Senol, F.S., Ercetin, T., Kahraman, A., Celep, F., Akaydin, G., Sener, B., Dogan, M. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Ind. Crops Prod.* **41**, 21–30, 2013. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.04.002>.
- [249] Lam, K.Y., Ling, A.P.K., Koh, R.Y., Wong, Y.P., Say, Y.H. A review on medicinal properties of orientin. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2016**, 4104595, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4104595>.
- [250] Miura, K., Kikuzaki, H., Nakatani, N. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *J. Agric. Food Chem.* **50**(7), 1845–1851, 2002. <https://doi.org/10.1021/JF011314O>.
- [251] Zhu, L., Chen, J., Tan, J., Liu, X., Wang, B. Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free Radical Scavenging and DNA Oxidative Damage Protection Activities and Analysis of Bioactivity-Structure Relationship Based on Molecular and Electronic Structures. *Molecules* **22**(3), 195, 2017. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22030195>.
- [252] Praveena, R., Sadasivam, K., Deepha, V., Sivakumar, R. Antioxidant potential of orientin: A combined experimental and DFT approach. *J. Mol. Struct.* **1061**, 114–123, 2014. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2014.01.002>.
- [253] An, F., Yang, G.D., Tian, J.M., Wang, S.H. Antioxidant effects of the orientin and vitexin in trollius chinensis bunge in d-galactose-aged mice. *Neural Regen. Res.* **7**, 2565–2575, 2012. <https://doi.org/10.3969/J.ISSN.1673-5374.2012.33.001>.
- [254] Zeng, P., Zhang, Y., Pan, C., Jia, Q., Guo, F., Li, Y., Zhu, W., Chen, K. Advances in studying of the pharmacological activities and structure–activity relationships of natural C-glycosylflavonoids. *Acta Pharm. Sin. B* **3**(3), 154–162, 2013. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2013.04.004>.
- [255] Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Bates, M.N., Goeden, H.M., Hertz-Picciotto, I., Duggan, H.M., Wood, R., Kosnett, M.J., Smith, M.T. Cancer Risks from Arsenic in Drinking Water. *Environ. Health Perspect.* **97**, 259–267, 1992. <https://doi.org/10.1289/ehp.9297259>.
- [256] Petruk, G., Donadio, G., Lanzilli, M., Istatico, R., Monti, D.M. Alternative use of *Bacillus subtilis* spores: protection against environmental oxidative stress in human normal keratinocytes. *Sci. Rep.* **8**, 1745, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20153-2>.
- [257] Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., Matwijczuk, A. Influence of *in vitro* digestion on composition, bioaccessibility and

- antioxidant activity of food polyphenols - a non-systematic review. *Nutrients* **12**(5), 1401, 2020. <https://doi.org/10.3390/NU12051401>.
- [258] Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., Heber, D. Pomegranate Juice Ellagitannin Metabolites Are Present in Human Plasma and Some Persist in Urine for Up to 48 Hours. *J. Nutr.* **136**(10), 2481–2485, 2006. <https://doi.org/10.1093/jn/136.10.2481>
- [259] González-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., Crozier, A. Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *J. Agric. Food Chem.* **58**(7), 3933–3939, 2010. <https://doi.org/10.1021/JF100315D>.
- [260] Zorić, Z., Markić, J., Pedisić, S., Bučević-Popović, V., Generalic-Mekinić, I., Grebenar, K., Kulišić-Bilušić, T. Stability of Rosmarinic Acid in Aqueous Extracts from Different Lamiaceae Species after *in vitro* Digestion with Human Gastrointestinal Enzymes. *Food Technol. Biotechnol.* **54**(1), 97–102, 2016. <https://doi.org/10.17113/FTB.54.01.16.4033>.
- [261] Chen, J., Kou, T., Fan, Y., Niu, Y. Antioxidant activity and stability of the flavonoids from *Lycium barbarum* leaves during gastrointestinal digestion *in vitro*. *Int. J. Food Eng.* **16**(7), 20190315, 2020. <https://doi.org/10.1515/IJFE-2019-0315>.
- [262] Borchardt, J.R., Wyse, D.L., Sheaffer, C.C., Kauppi, K.L., Fulcher, R.G., Ehlke, N.J., Biesboer, D.D., Bey, R.F. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *J. Med. Plant Res.* **2**(5), 98–110, 2008. ISSN 1996-0875
- [263] Çitoğlu, G.S., Altanlar N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. *J. Fac. Pharm. Ankara* **32**(3), 159–163, 2003. https://doi.org/10.1501/ECZFAK_00000000409.
- [264] Boroja, T., Mihailović, V., Katanić, J., Pan, S.P., Nikles, S., Imbimbo, P., Monti, D.M., Stanković, N., Stanković, M.S., Bauer, R. The biological activities of roots and aerial parts of *Alchemilla vulgaris* L. *S. AFR. J. BOT.* **116**, 175–184, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.03.007>.
- [265] Shu-hua, L., Qi, Z., Ying, C., Fang, L. Antimicrobial Activities of Vitexin from *Alsophila spinulosa*, *Food Res. Develop.* **2013**(14), 4-5,6, 2013. ISSN:1005-6521
- [266] Kamatou, G.P.P., Van Vuuren, S.F., Van Heerden, F.R., Seaman, T., Viljoen, A.M. Antibacterial and antimycobacterial activities of South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. chamelaeagnea*. *S. AFR. J. BOT.* **73**, 552–557, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.05.001>.
- [267] Veličković, D.T., Randjelović, N.V., Ristić, M.S., Melcerović, A.A., Veličković, A.S. Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *Salvia pratensis* L., *Salvia glutinosa* L. and *Salvia aethiopis* L. *J. Serb. Chem. Soc.* **67**(10), 639–646, 2002. <https://doi.org/10.2298/JSC0210639V>
- [268] Perron, N.R., Hodges, J.N., Jenkins, M., Brumaghim, J.L. Predicting how polyphenol antioxidants prevent DNA damage by binding to iron. *Inorg. Chem.* **47**(14), 6153–6161, 2008. <https://doi.org/10.1021/IC7022727>.
- [269] Eck-Varanka, B., Kováts, N., Hubai, K., Paulovits, G., Ferincz, Á., Horváth, E. Genotoxic effect of *Lythrum salicaria* extract determined by the mussel micronucleus

- test short communication. *Biol. Futur.* **66**, 460–463, 2015.
<https://doi.org/10.1556/018.66.2015.4.10>.
- [270] Ewadh, M., Zaidan, H., Haleem, Z., Al-Terehi, M., Saadi, A. Protective activity of some antioxidant plant against hydrogen peroxidase genotoxic effects on human lymphocyte. *Adv. Life Sci. Technol.* **13**, 34–44, 2013.
- [271] Yurtseven, S., Cetin, M., Şengul, T., Sogut, B. Effect of sage extract (*Salvia officinalis*) on growth performance, blood parameters, oxidative stress and DNA damage in partridges. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **38**(2), 145–152, 2008. ISSN 0375-1589
- [272] Furtado, R.A., De Araújo, F.R.R., Resende, F.A., Cunha, W.R., Tavares, D.C. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *J. Appl. Toxicol.* **30**(3), 254–259, 2010. <https://doi.org/10.1002/JAT.1491>.
- [273] Khanavi, M., Moshteh, M., Manayi, A., Reza Shams, M., Vazirian, M., Ajani, Y., Nasser Ost, S. Cytotoxic Activity of *Lythrum salicaria* L., *Res. J. Biol. Sci.* **6**, 55–57, 2011. <https://doi.org/10.3923/rjbsci.2011.55.57>
- [274] Manayi, A., Saeidnia, S., Ostad, S.N., Hadjiakhoondi, A., Ardekani, M.R.S., Vazirian, M., Akhtar, Y., Khanavi, M. Chemical Constituents and Cytotoxic Effect of the Main Compounds of *Lythrum salicaria* L. *Z Naturforsch C J Biosci.* **68**(9-10), 367-375, 2013. <https://doi.org/10.5560/ZNC.2013.68C0367>.
- [275] Mohammed, R.S., Abou Zeid, A.H., El Hawary, S.S., Sleem, A.A., Ashour, W.E. Flavonoid constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos* L. leaves. *Saudi J. Biol. Sci.* **21**(6), 547–553, 2014. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2014.02.002>.
- [276] Kanimozhi, G., Prasad, N.R. Chapter 73 -Anticancer Effect of Caffeic Acid on Human Cervical Cancer Cells. *Coffee in Health and Disease Prevention* 655–661, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00073-5>. ISBN 9780124095175
- [277] Ma, L., Tang, L., Yi, Q. Salvianolic acids: Potential source of natural drugs for the treatment of fibrosis disease and cancer. *Front. Pharmacol.* **10**, 97, 2019. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00097/FULL>.
- [278] Habeeb Rahuman, H.B., Dhandapani, R., Narayanan, S., Palanivel, V., Paramasivam, R., Subbarayalu, R., Thangavelu, S., Muthupandian, S. Medicinal plants mediated the green synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications, *IET Nanobiotechnol.* **16**(4), 115–144, 2022. <https://doi.org/10.1049/NBT2.12078>.
- [279] Dwivedi, A.D., Gopal, K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **369**, 27–33, 2010. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2010.07.020>.
- [280] Nur Aishah Mat Yusuf, S., Nurul Azieyan Che Mood, C., Hazwani Ahmad. N., Sandai, D., Keong Lee, C., Lim, V. Optimization of biogenic synthesis of silver nanoparticles from flavonoid-rich *Clinacanthus nutans* leaf and stem aqueous extracts. *R. Soc. Open Sci.* **7**, 200065, 2020. <https://doi.org/10.1098/rsos.200065>.
- [281] El Badawy, A.M., Luxton, T.P., Silva, R.G., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., Tolaymat, T.M. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 1260–1266, 2010. <https://doi.org/10.1021/es902240k>.

- [282] Anigol, L.B., Charantimath, J.S., Gurubasavaraj, P.M. Effect of Concentration and pH on the Size of Silver Nanoparticles Synthesized by Green Chemistry. *OMCIJ* **3**(5), 124–128, 2017. <https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2017.03.555622>.
- [283] Edison, T. N. J. I., Sethuraman, M. G. Electrocatalytic Reduction of Benzyl Chloride by Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Pod Extract of *Acacia nilotica*. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **1**(10), 1326–1332, 2023. <https://doi.org/10.1021/sc4001725>.
- [284] Mohammadalinejad, S., Almasi, H., Esmaili, M. Simultaneous green synthesis and *in-situ* impregnation of silver nanoparticles into organic nanofibers by *Lythrum salicaria* extract: Morphological, thermal, antimicrobial and release properties. *Mater. Sci. Eng. C.* **105**, 110115, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.110115>.
- [285] Srećković, N.Z., Nedić, Z.P., Monti, D.M., D’Elia, L., Dimitrijević, S.B., Mihailović, N.R., Katanić Stanković, J.S., Mihailović, V.B. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Salvia pratensis* L. Aerial Part and Root Extracts: Bioactivity, Biocompatibility, and Catalytic Potential. *Molecules* **28**(3), 1387, 2023. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28031387a>.
- [286] Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., Fernig, D.G. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst*, **139**, 4855–4861, 2014. <https://doi.org/10.1039/c4an00978a>.
- [287] Pirtarighat, S., Ghannadnia, M., Baghshahi, S. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum basilicum* cultured under controlled conditions for bactericidal application. *Mater. Sci. Eng. C.* **98**, 250–255, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.12.090>.
- [288] Küp, F.Ö., Çoşkunçay, S., Duman, F. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut): Evaluation of their antibacterial, antioxidant and drug release system activities. *Mater. Sci. Eng. C.* **107**, 110207, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.110207>.
- [289] Li, Y., Wu, Y., Ong, B.S. Facile synthesis of silver nanoparticles useful for fabrication of high-conductivity elements for printed electronics. *J. Am. Chem. Soc.* **127**(10), 3266–3267, 2005. <https://doi.org/10.1021/JA043425K>.
- [290] Gecer, E.N. Green Synthesis of Silver Nanoparticles from *Salvia aethiopis* L. and their Antioxidant Activity. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **31**, 4402–4409, 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-456844/v1>.
- [291] Huong, V.T.L., Nguyen, N.T. Green synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Sapindus mukorossi* fruit pericarp extract. *Mater. Today. Proc.* **42**, 88–93, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.10.015>.
- [292] Wongsu, P., Phatikulrungsun, P., Prathumthong, S. FT-IR characteristics, phenolic profiles and inhibitory potential against digestive enzymes of 25 herbal infusions. *Sci. Rep.* **12**, 6631, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10669-z>.
- [293] Rajendran, R., Pullani, S., Thavamurugan, S., Radhika, R., Prabha A.L. Green fabrication of silver nanoparticles from *Salvia* species extracts: characterization and anticancer activities against A549 human lung cancer cell line. *Appl. Nanosci.* **13**(3), 2571–2584, 2023. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-02130-w>.

- [294] Abdelhamid, A.A., Al-Ghobashy, M.A., Fawzy, M., Mohamed, M.B., Abdel-Mottaleb, M.M.S.A. Phytosynthesis of Au, Ag, and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract of sago pondweed (*Potamogeton pectinatus* L.). *ACS Sustain. Chem. Eng.* **1**(12), 1520–1529, 2013. <https://doi.org/10.1021/SC4000972>.
- [295] Vardanyan, L.G., Ingole, B.S. Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. *Environ. Int.* **32**(2), 208–218, 2006. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2005.08.013>.
- [296] Farkas, N., Kramar, J.A., Dynamic light scattering distributions by any means. *J. Nanopart. Res.* **23**, 120, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11051-021-05220-6>.
- [297] Dakal, T.C., Kumar, A., Majumdar, R.S., Yadav, V. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front. Microbiol.* **7**, 1831, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>.
- [298] Bhutto, A.A., Kalay, Ş., Sherazi, S.T.H., Culha, M. Quantitative structure–activity relationship between antioxidant capacity of phenolic compounds and the plasmonic properties of silver nanoparticles. *Talanta* **189**, 174–181, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.080>.
- [299] Švecová, M., Ulbrich, P., Dendisová, M., Matějka, P. SERS study of riboflavin on green-synthesized silver nanoparticles prepared by reduction using different flavonoids: What is the role of flavonoid used?, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **195**, 236–245, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.01.083>.
- [300] Ferreira-Gonçalves, T., Gaspar, M.M., Coelho, J.M.P., Marques, V., Viana, A.S., Ascensão, L., Carvalho, L., Rodrigues, C.M.P., Ferreira, H.A., Ferreira, D., Reis, C.P. The Role of Rosmarinic Acid on the Bioproduction of Gold Nanoparticles as Part of a Photothermal Approach for Breast Cancer Treatment. *Biomol.* **12**(1), 71, 2022. <https://doi.org/10.3390/BIOM12010071>.
- [301] Chahardoli, A., Hajmomeni, P., Ghowsi, M., Qalekhani, F., Shokoohinia, Y., Fattahi, A. Optimization of Quercetin-Assisted Silver Nanoparticles Synthesis and Evaluation of Their Hemocompatibility, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial effects. *Global chall.* **5**(12), 2100075, 2021. <https://doi.org/10.1002/GCH2.202100075>.
- [302] Tao, W., Amini, A., Wang, J., Chen, J., Chen, J., Wu, H., Su, M., Jin, H., Li, X., Wang, P. Rutin-Loaded Silver Nanoparticles With Antithrombotic Function. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 598977, 2020. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.598977>.
- [303] Zahoor, M., Nazir, N., Iftikhar, M., Naz, S., Zekker, I., Burlakovs, J., Uddin, F., Kamran, A.W., Kallistova, A., Pimenov, N., Khan, F.A. A Review on Silver Nanoparticles: Classification, Various Methods of Synthesis, and Their Potential Roles in Biomedical Applications and Water Treatment. *Water* **13**(16), 2216, 2021. <https://doi.org/10.3390/W13162216>.
- [304] Sai Saraswathi, V., Kamarudheen, N., BhaskaraRao, K.V., Santhakumar, K. Phytoremediation of dyes using *Lagerstroemia speciosa* mediated silver nanoparticles and its biofilm activity against clinical strains *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Photochem. Photobiol. B* **168**, 107–116, 2017. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2017.02.004>.
- [305] Shu, M., He, F., Li, Z., Zhu, X., Ma, Y., Zhou, Z., Yang, Z., Gao, F., Zeng, M. Biosynthesis and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Using Yeast Extract as

- Reducing and Capping Agents. *Nanoscale Res. Lett.* **15**, 14, 2020. <https://doi.org/10.1186/S11671-019-3244-Z>.
- [306] Xia, Z.K., Ma, Q.H., Li, S.Y., Zhang, D.Q., Cong, L., Tian, Y.L., Yang, R.Y. The antifungal effect of silver nanoparticles on *Trichosporon asahii*. *J Microbiol Immunol Infect J MICROBIOL IMMUNOL*. **49**, 182–188, 2016. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2014.04.013>.
- [307] Garcia-Rubio, R., Oliveira, H.C., Rivera, J., Trevijano-Contador, N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front Microbiol.* **10**, 2993, 2020. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02993/BIBTEX>.
- [308] Shi, T., Sun, X., He, Q.-Y. Cytotoxicity of Silver Nanoparticles Against Bacteria and Tumor Cells. *Curr. Protein Pept. Sci.* **19**, 525–536, 2018. <https://doi.org/10.2174/1389203718666161108092149>.
- [309] Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B.D., Watts, J.L., Håkansson, J., Hansen, P.R., Svenson, J. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic *in vivo* toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Sci. Rep.* **10**, 13206, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>.
- [310] Alotaibi, B.S., Ijaz, M., Buabeid, M., Kharaba, Z.J., Yaseen, H.S., Murtaza, G. Therapeutic Effects and Safe Uses of Plant-Derived Polyphenolic Compounds in Cardiovascular Diseases: A Review. *Drug Des. Devel. Ther.* **15**, 4713–4732, 2021. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S327238>.
- [311] Milić, M. Učinak različitih nanočestica srebra na hemostazu. Doktorska disertacija 2021. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:290366>
- [312] Alamier, W.M., Hasan, N., Ali, S.K., Oteef, M.D.Y. Biosynthesis of Ag Nanoparticles Using *Caralluma acutangula* Extract and Its Catalytic Functionality towards Degradation of Hazardous Dye Pollutants. *Crystals* **12**(8), 1069, 2022. <https://doi.org/10.3390/cryst12081069>.
- [313] Musabeygi, T., Goudarzi, N., Arab-Chamjangali, M., Mirzaee, M. Fabrication of a magnetic composite by CoFe₂O₄ and an inorganic polymer for simultaneous photo-degradation of organic pollutants under visible LED light: Bandgap engineering, CCD-RSM modeling, and resolving spectral overlap of analytes. *J. Mol. Liq.* **362**, 119692, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119692>.
- [314] Sonkusare, V.N., Chaudhary, R.G., Bhusari, G.S., Mondal, A., Potbhare, A.K., Mishra, R.K., Juneja, H.D., Abdala, A.A. Mesoporous Octahedron-Shaped Tricobalt Tetroxide Nanoparticles for Photocatalytic Degradation of Toxic Dyes. *ACS Omega* **5**, 7823–7835, 2020. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.9B03998>

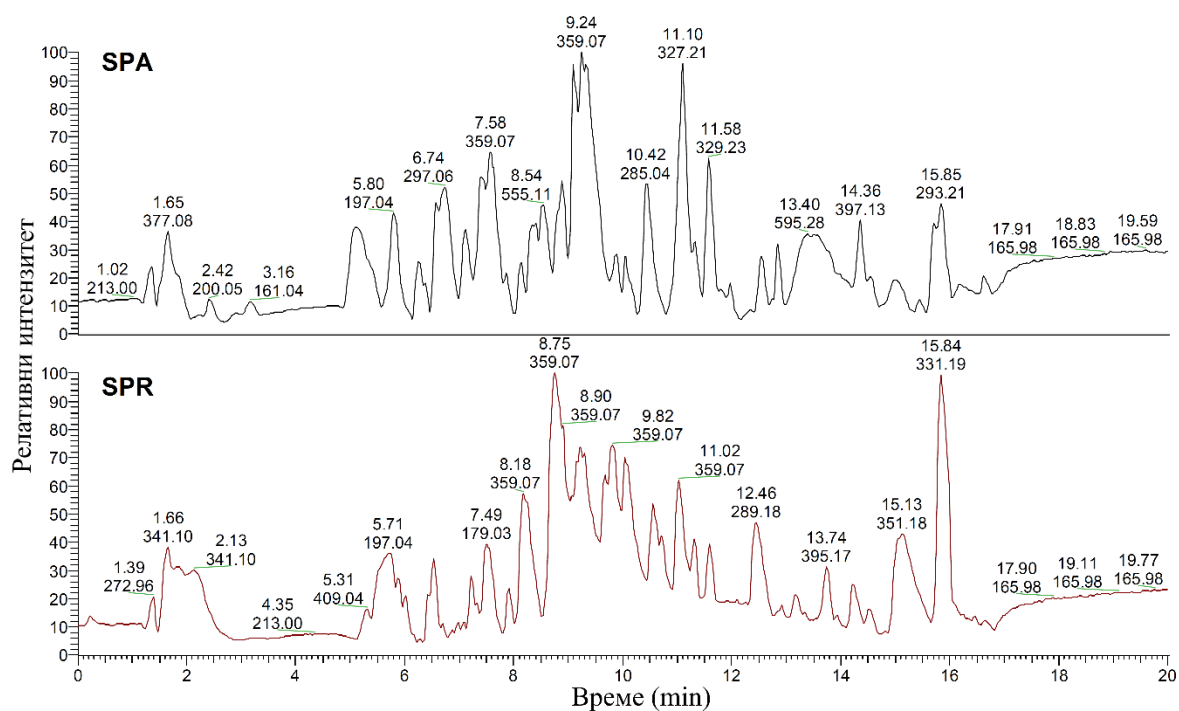
7. ПРИЛОГ

Табела 1П. Карактеризација HPLC методе коришћене за квантитативну евалуацију фенолних једињења детектованих у LSA и LSR екстрактима

Једињења	Линеарни опсег (µg/mL)	Калибрациона једначина ^а	LOD ^а (µg/mL)	LOQ ^б (µg/mL)
Изоориентин	0.9375 - 7.5	$y = 56602x + 27215$	0.169 ± 0.027	0.512 ± 0.07
Ориентин	0.9375 - 7.5	$y = 50285x + 18789$	0.165 ± 0.034	0.500 ± 0.07
Витексин	0.9375 - 7.5	$y = 52260x + 22811$	0.188 ± 0.020	0.570 ± 0.04
Гална киселина	0.3125 - 40	$y = 110970x - 52223$	0.171 ± 0.006	0.518 ± 0.015
Хлорогенска киселоина	0.3125 - 40	$y = 62117x - 40712$	0.141 ± 0.004	0.428 ± 0.011
Елагинска киселина	0.3125 - 40	$y = 69046x - 1120.7$	0.255 ± 0.010	0.773 ± 0.020
Кафеинска киселина	0.3125 - 40	$y = 174531x - 121107$	0.095 ± 0.002	0.287 ± 0.009

Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења

^аLOD - лимит детекције (*Limit of Detection*, енг.); ^бLOQ – лимит квантификације (*Limit of Quantitation*, енг.)



Слика 1П. HPLC хроматограми метанолских екстраката надземног дела (SPA) и корена (SPR) биљке *S. pratensis*

Листа скраћеница

A549	аденокарциномске хумане алвеоларне базалне епителне ћелије,
AAPH	2,2' -азобис (2-метилпропионамидин) дихидрохлорид
ABTS	диамонијумова со 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-сулфонске
AgNPs	наночестице сребра (<i>silver nanoparticles</i> , енг.)
AP-1	активатор протеин 1 (фактор транскрипције који регулише експресију гена као одговор на различите стимулусе)
ATCC	Америчка непрофитна организација за сакупљање и складиштење референтних микроорганизама и ћелијских линија (<i>American Type Culture Collection</i> , енг.)
BALB/c-3T3	ћелијске линије фибробласта миша 3T3 соја
BHT	бутилирани хидрокситолуен (<i>butylated hydroxytoluene</i> , енг.)
CAT	каталаза
CID	дисоцијација изазвана сударом (<i>collision-induced dissociation</i> , енг.)
CFU	Јединица за формирање колонија (<i>colony forming unit</i> , енг.)
c-Jun	транскрипцијски фактор Јун
CVC	хемијска кондензација пара (<i>chemical vapor condensation</i> , енг.)
CVD	хемијско таложење паре (<i>chemical vapor deposition</i> , енг.)
Cy-3-glc	еквивалент цијанидин-3-О-гликозида
CYP2E1	Цитохром P450 2E1 ген за кодирање протеина (Cytochrome P450 Family 2 Subfamily E Member 1)
DCFDA	2',7'-дихлорофлуоресцин диацетат
DLS	динамичко расејавање светлости (<i>dynamic light scattering</i> , енг.)
DMEM	медијум у коме се гаје ћелије (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , енг.)
DMSO	диметил сулфоксид (<i>dimethyl sulfoxide</i> , енг.)
DPPH	2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (<i>2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> , енг.)
EDS	енергетска дисперзивна спектроскопија (<i>energy dispersive spectroscopy</i> , енг.)
EDTA	етилендиаминететрасирћетна киселина (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , енг.)
EPA	Агенција за заштиту животне средине (<i>Environmental protection agency</i> , енг.)
fcc	површински центрирана решетка (<i>face centred cubic</i> , енг.)
FDA	Агенција за храну и лекове (<i>Food and Drug administration</i> , енг.)
FITI	Корејски институт за тестирање и истраживање (<i>Future Innovation Together Integrity (FITI) Testing & Research Institute</i> , енг.)
FT-IR	Инфрацрвена спектроскопија Фуријеове трансформације (<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> , енг.)
GKE	еквивалент галне киселине
GPx	глутатион пероксидаза
HaCaT	имортализоване ћелијске линије хуманих кератиноцита
HCT 116	ћелијска линија хуманог карцинома дебелог црева
HeLa	ћелијска линија канцера грлића материце
Hep-2	ћелијска линија епителиома ларинкса
HepG2	ћелијске линије хуманог карцинома јетре

HHDP	хексахидроксидифенилна киселина (<i>hexahydroxydiphenic acid</i> , енг.)
HMDB	база података о људском метаболу (<i>Human Metabolome Database</i> , енг.)
HPLC	течна хроматографија високих перформанси (<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , енг.)
IC ₅₀	она концентрација једињења неопходна за 50 % инхибиције неког биолошког процеса
IL-1b	интерлеукин-1 бета
KVE	еквивалент кверцетина
LDL	липопротеин ниске густине (<i>low-density lipoprotein</i> , енг.)
LOD	лимит детекције (<i>Limit of Detection</i> , енг.)
LOQ	лимит квантификације (<i>Limit of Quantitation</i> , енг.)
LSA	екстракт надземног дела биљке <i>L. salicaria</i> (<i>L. salicaria aerial part extract</i> , енг.)
LSA-AgNPs	наночестице сребра синтетисане помоћу екстракта надземног дела биљке <i>L. salicaria</i>
LSR	екстракт корена биљке <i>L. salicaria</i> (<i>L. salicaria root extract</i> , енг.)
LSR-AgNPs	наночестице сребра синтетисане помоћу екстракта корена биљке <i>L. salicaria</i>
MCF-10A	здраве епителне ћелије дојке
MCF-7	ћелијска линија канцера дојке
MDA-MB-231	ћелијска линија канцера дојке
MDR	вишеструка резистенција на лекове (<i>multiple drug resistance</i> , енг.)
MFC-7	ћелије хуманог карцинома дојке
MIC	минимална инхибиторна концентрација (<i>minimal inhibitory concentration</i> , енг.)
MTT	тетразолијум тест у микрокултури (3-(4,5-Dimethylthiazol-2 yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, енг.)
NADH	никотинамид аденин динуклеотид
NADPH	никотинамид аденин динуклеотид фосфат
NCPI	Инвентар нанотехнолошких потрошачких производа (<i>Nanotechnology Consumer Products Inventory</i> , енг.)
NF-κB	нуклеарни фактор капа-појачивач лаког ланца активираних Б ћелија
PBS	физиолошки раствор са фосфатним пуфером (<i>Phosphate-Buffered Saline</i> , енг.)
PDA	детектор низа фотодиода (<i>photo diode array detector</i> , енг.)
PlantCyc	база података биљака (приступ ручно курираним или прегледаним информацијама о заједничким и јединственим метаболичким путевима присутним у преко 500 биљних врста)
PTFE	Хидрофобни филтери за шприцеве (<i>Hydrophobic PTFE Membrane Filters for Lab Filtration</i> , енг.)
RUE	еквивалент рутина
SD	стандардна девијација
SDS	натријум додецил сулфат (<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , енг.)
SEM	скенирајући електронски микроскоп (<i>Scanning electron microscope</i> , енг.)
SGF	симулирани флуид желуца (<i>Simulated Gastric Fluid</i> , енг.)

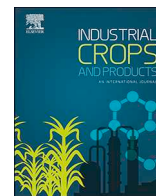
SIAA	друштво за индустријску технологију за антимикробне артикле (<i>Society of Industrial Technology for Antimicrobial Articles</i> , енг.)
SIF	симулирани флуид цревни флуид (<i>Simulated Intestinal Fluid</i> , енг.)
SOD	супероксид дисмутаза
SPA	екстракт надземног дела биљке <i>S. pratensis</i> (<i>S. pratensis aerial part extract</i> , енг.)
SPA-AgNPs	наночестице сребра синтетисане помоћу екстракта надземног дела биљке <i>S. pratensis</i>
SPR	екстракт корена биљке <i>S. pratensis</i> (<i>S. pratensis root extract</i> , енг.)
SPR-AgNPs	наночестице сребра синтетисане помоћу екстракта корена биљке <i>S. pratensis</i>
SSF	симулирани флуид пљувачке (<i>Simulated Salivary Fluid</i> , енг.)
SV-T2	ћелијске линије трансформисаних фибробласта миша
TAE	пуферски раствор који садржи смешу Трис базе, сирћетне киселине и EDTA
TGF- β	трансформирајући фактор раста бета
TNF- α	фактор некрозе тумора-алфа (<i>tumor necrosis factor-α</i> , енг.)
U 937	про-моноцитна, леукемијска ћелијска линија
UDP	уридин дифосфат (<i>uridine diphosphate</i> , енг.)
UHPLC	течна хроматографија ултра високих перформанси (<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> , енг.)
UHPLC-(QqQ)-MS/MS	течна хроматографија ултра високих перформанси куплована са трипл квадриполним масеним спектрометром (<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to triple-quadrupole Mass Spectrometry</i> , енг.)
UHPLC-HESI-MS/MS	течна хроматографија ултра високих перформанси у комбинацији са (+/-) загрејаном електроспреј јонизацијом и масеним спектрометром
WFO	интернет база светске флоре (<i>World Flora Online</i> , енг.)
XRPD	дифракција X зрака на праху (<i>X-Ray Powder Diffraction</i> , енг.)
YMDB	база података о метаболу квасца (<i>Yeast Metabolome Database</i> , енг.)
A431	модел људске ћелијске линије епидермоидног карцинома
АЛС	амиотрофична латерална склероза
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина киселине) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-sulfonic acid, енг.)
ККЕ	еквивалент кафеинске киселине
O.D.	оптичка густина (<i>optical density</i> , енг.)
УВ	ултраљубичасто зрачење (<i>ultraviolet radiation</i> , енг.)

Биографија



Никола Срећковић је рођен 1993. године у Крагујевцу (Србија). Основну школу „Карађорђе” завршио је 2008. године у Малим Крчмарима, а исте године уписао и средњу „Прву техничку школу” у Крагујевцу коју је завршио 2012. године са одличним успехом. Дипломирао је хемију (смер за истраживање и развој) са просечном оценом 9,21 на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу 2016. године, док је мастер рад одбранио 2017. године са оценом 10. Докторске академске студије, модул Биохемија, уписао је на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу под менторством др. Владимира Михаиловића школске 2017/18 и до сада завршио све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 10. Од 2018. године запослен је на Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу као истраживач приправник, а 2021. године изабран је за истраживача сарадника на истом факултету. Као истраживач био је ангажован на извођењу вежби на предметима Основних академских студија хемије, при чему је за школску 2022/23 годину био најбоље оцењен на студентској анкети. Бави се научним истраживањима лековитих биљака, као и истраживањима из области зелене хемије. Његов научни рад је фокусиран на фитохемијску карактеризацију лековитих биљака и њиховом потенцијалном применом као антиоксидативних и антимикробних агенаса. Такође, бави се зеленом синтезом наночестица сребра помоћу екстраката биљака, њиховом карактеризацијом и испитивањем њихове биолошке и каталитичке активности. Резултати његовог истраживачког рада објављени су у оквиру 13 научних радова у реномираним међународним научним часописима, 3 научна рада у часописима националног значаја и 41 саопштењу на међународним и националним конференцијама. Поред тога, аутор је и 2 поглавља у књизи међународног значаја. Његове научне публикације су цитиране 127 пута, искључујући самоцитате свих аутора (h -индекс 6, извор: *Scopus*). Укључен је у 2 билатерална пројекта научне и технолошке сарадње између Републике Србије и Републике Аустрије за период 2022-2024. године (337-00-577/2021-09/9) и између Републике Србије и Републике Словеније за период 2023-2025. године (337-00-110/2023-05/18). Боравио је на неколико европских универзитета у оквиру програма Ерасмус+ за размену истраживача. Члан је Биохемијског друштва Србије. Редовно је учествовао је у промоцији факултета кроз организацију сајмова науке и манифестације „Ноћ истраживача“.

Публиковани резултати докторске дисертације



Lythrum salicaria L. (Lythraceae) as a promising source of phenolic compounds in the modulation of oxidative stress: Comparison between aerial parts and root extracts

Nikola Srećković^a, Jelena S. Katanić Stanković^b, Sanja Matić^b, Nevena R. Mihailović^a, Paola Imbimbo^c, Daria Maria Monti^c, Vladimir Mihailović^{a,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II, Complesso Universitario Monte Sant'Angelo, via Cinthia 4, 80126, Naples, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Lythrum salicaria L.
Phenolic compounds
C-glycosylflavones
Antimicrobial activity
Antioxidant activity
Cytotoxicity

ABSTRACT

Lythrum salicaria is a flowering plant traditionally used for inflammatory diseases, gastrointestinal ailments, dysentery, and as astringent for external use. The aim of this study was to determine the phenolic content, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of *L. salicaria* aerial part and root methanol extracts, as well as the protective effects against oxidative damage on DNA and on a cell-based model. Moreover, simulated *in vitro* digestion studies were performed to estimate the stability of individual compounds present in the extracts. *L. salicaria* extracts contained a significant amount of total phenolic compounds and several phenolic compounds including C-glycoside flavones, orientin, isoorientin, and vitexin, were identified in extracts. The extracts demonstrated high antioxidant potential in different *in vitro* methods, moderate antimicrobial properties, and low cytotoxicity on studied normal and cancer cell lines. Also, the extracts showed significant DNA protection and protection of cells against arsenite-induced oxidative stress. These results suggest that, although the aerial part of *L. salicaria* is in extensive use since ancient times as a medicinal plant, its root may also possess the valuable biological properties and both could be used as functional food ingredients, considering their good antioxidant and antigenotoxic activities, and stability during *in vitro* digestion.

1. Introduction

Oxidative stress is a complex physiological process that is behind many diseases. Alzheimer's disease, Parkinsonism, cancer, hypertension, atherosclerosis, ischemic diseases, and inflammatory conditions, as well as some age-related disorders, are related to oxidative stress imbalance. Among diverse factors that have an influence on that process, external factors such as environmental exposure to toxicants, including natural toxins, air pollutants, metals, cigarette smoke, automobile exhaust fumes, radiation, pesticides, etc., have been proven to induce oxidative stress (Hodjat et al., 2015). Therefore, significant attention is being directed to the suppression of imbalance between pro-oxidant and antioxidant homeostasis as a primary cause of these diseases in the body and enrichment organism with antioxidants (Tiwari, 2001). Developing new food supplements with antioxidant properties is important for the prevention of oxidative DNA and cellular damage, as well as the aging of cells. Nowadays, synthetic pharmaceuticals have

suppressed the use of medicinal herbs, which have been popular for centuries. Indeed, many medicinal plants successfully used to treat a variety of diseases, are now forgotten. However, the numerous studies about biological activities of medicinal plants confirmed their efficacy in the treatment of different diseases, thus allowing the development of more economic, safer and greener innovative drugs based on natural compounds (Yakoub et al., 2018; Rached et al., 2018; Saravanakumar et al., 2019).

Lythrum salicaria L., known as purple loosestrife, is a perennial herbaceous plant of the genus *Lythrum* (Lythraceae), which grows in wet and flooded places, so it can often be found along the rivers, streams, and lakes. *L. salicaria* is of Eurasian origin, but in the 19th century, it was transferred to the soil of North America where it spread rapidly. Due to the high invasive ability and its ornamental and pharmacological values, biological control of purple loosestrife is one of the most widely implemented programs of weeds biocontrol in North America (Tunali et al., 2007; Piwowarski et al., 2015). Purple

* Corresponding author.

E-mail address: vladimir.mihailovic@pmf.kg.ac.rs (V. Mihailović).

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2021, 11, 35585

Application potential of biogenically synthesized silver nanoparticles using *Lythrum salicaria* L. extracts as pharmaceuticals and catalysts for organic pollutant degradation†

Nikola Z. Srećković,^a Zoran P. Nedić,^b Davide Liberti,^c Daria Maria Monti,^c Nevena R. Mihailović,^a Jelena S. Katanić Stanković,^d Silvana Dimitrijević^e and Vladimir B. Mihailović^{*,a}

This study was designed to evaluate the optimal conditions for the eco-friendly synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae) aqueous extracts and their potential application and safe use. AgNPs synthesized using *L. salicaria* aerial parts (LSA-AgNPs) and root extract (LSR-AgNPs) were characterized by UV-Vis spectrophotometry, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM/EDS), and X-ray powder diffraction (XRPD). Dynamic light scattering (DLS) was used for the determination of the size distribution profiles of the obtained nanoparticles. Both *L. salicaria* extracts showed high phenolic content, while the flavone C-glucosides orientin, vitexin, and isovitexin were detected in extracts using HPLC. The synthesized AgNPs displayed growth inhibition of the tested bacteria and fungi in concentrations between 0.156 and 1.25 mg mL⁻¹. The studied nanoparticles also showed antioxidant potential and gained selectivity at different concentrations on different cancer cell lines. Concentrations of LSA-AgNPs were found to be 20.5 and 12 µg mL⁻¹ towards A431 and SVT2, respectively, while LSR-AgNPs were effective only against A431 cancer cells (62 µg mL⁻¹). The hemolytic activity of LSA-AgNPs in concentrations up to 150 µg mL⁻¹ was not observed, while LSR-AgNPs in the highest applied concentration hemolyzed 2.8% of erythrocytes. The degradation possibility of Congo red and 4-nitrophenol using LSA-AgNPs and LSR-AgNPs as catalysts was also proven. The results indicate that *L. salicaria* may be used for the eco-friendly synthesis of AgNPs with possible applications as antimicrobial and selective cytotoxic agents towards cancer cell lines, as well as in catalytic degradation of pollutants.

Received 20th July 2021
Accepted 22nd October 2021

DOI: 10.1039/d1ra05570d

rsc.li/rsc-advances

1. Introduction

Nanoparticle's research is a topic of dynamic scientific exploration nowadays, emphasizing nanoparticle application in various fields such as electronics, catalysis, biosensors, wastewater treatment, biomedicine, pharmaceuticals, and cosmetics.¹ Due to the rising industrial uses of nanoparticles, their production volume is constantly increasing, and their

synthesis is mainly based on physical and chemical methods that consume a lot of energy or need the use of potentially environmentally harmful chemical compounds.² Nanobiotechnology aims to establish low-cost and environmentally suitable methods for use of some biological components or live organisms and their products for the fabrication of different nanoparticles. It has been reported that bacteria, fungi, molds, and plants may be used for the successful synthesis of nanoparticles in an environmentally acceptable manner.^{3,4} However, the use of some natural resources such as microorganisms in nanoparticle synthesis risks possible negative effects on health and environmental contamination. Some plant extracts or phytochemicals, particularly obtained from medicinal herbs and spices, have greater potential in nanoparticle synthesis compared with microorganisms. In addition to provide environmentally friendly reducing and stabilizing agents for the formation of the nanoparticles, these plant-originated products may possess beneficial biological characteristics and transfer their properties to nanoparticles during synthesis.⁵ Plant

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: vladimir.mihailovic@pmf.kg.ac.rs

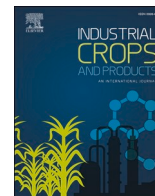
^bUniversity of Belgrade, Faculty of Physical Chemistry, Studentski trg 12-16, P.O. Box 47, 11159 Belgrade, Serbia

^cUniversity of Naples Federico II, Complesso Universitario Monte Sant'Angelo, Department of Chemical Sciences, via Cinthia 4, 80126, Naples, Italy

^dUniversity of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

^eMining and Metallurgy Institute Bor, Zeleni bulevar 35, 19210 Bor, Serbia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1ra05570d



Meadow sage (*Salvia pratensis* L.): A neglected sage species with valuable phenolic compounds and biological potential

Nikola Srećković^a, Danijela Mišić^b, Uroš Gašić^b, Sanja Lj. Matić^c, Jelena S. Katanić Stanković^c,
Nevena R. Mihailović^a, Daria Maria Monti^d, Luigi D'Elia^d, Vladimir Mihailović^{a,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković" - National Institute of Republic of Serbia, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia

^c University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

^d University of Naples Federico II, Complesso Universitario Monte Sant'Angelo, Department of Chemical Sciences, via Cinthia 4, 80126 Naples, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Meadow sage
Rosmarinic acid
Antioxidant activity
Antimicrobial activity
Antigenotoxicity
Cytotoxic activity

ABSTRACT

The genus *Salvia* is well-known for its use in food as aromatic and spicy herbs, as well as in the pharmaceutical and fragrance industries. Regardless of their importance, some *Salvia* species have not been thoroughly examined and chemically characterized, including *Salvia pratensis* L. In the present study, the detailed phenolic composition using LC/MS analysis, some bioactivities, and *in vitro* digestion stability of *S. pratensis* aerial part (SPA) and root (SPR) methanol extracts were determined. The results showed that both extracts possess high phenolic content, while SPR was richer in rosmarinic (11065.56 µg/g) and caffeic (509.00 µg/g) acids, as well as salvianolic acid A (519.22 µg/g) and B (291.60 µg/g) amounts quantified by UHPLC-DAD/(-)HESI-MS/MS analysis than SPA. The extracts demonstrated considerable antioxidant activity, particularly radical scavenger activity with IC₅₀ values ranging between 24 and 90 µg/mL. The high inhibitory effect of extracts against DNA oxidative damage induced by peroxyl and hydroxyl radicals was noticed. The root extract was the most effective in inhibiting bacterial growth with MIC < 0.156 mg/mL for some G⁺ bacterial species. SPR extract was substantially more cytotoxic than SPA against all examined cell lines, particularly on cancer cells. The IC₅₀ values of SPR for two cancerogenic cell lines A431 and SVT2 were 24.3 and 49.6 µg/mL, respectively. *S. pratensis*, especially its root, possess valuable phenolic compounds and biological properties for potential application as a substitute for some commonly used *Salvia* species.

1. Introduction

By using herbs in a daily diet, mankind was gradually acquainting their medicinal properties. Interest in herbal remedies in the prevention of disease and curative and rehabilitative properties is increasing. Today, modern medicine uses many compounds isolated from plants as the basis for health care formulations, pharmaceutical drugs, and herbal nutritional supplements (Dzoyem et al., 2013). *Salvia* L., usually known as sage, is the largest genus in the Lamiaceae family, containing over 900 species widespread throughout the world (Lopresti, 2017). The *Salvia* genus contains compounds with highly beneficial effects for human health, which is one of the reasons for use of plants from this genus to treat a variety of ailments since ancient times, excessive sweating, including bronchitis, asthma, digestive, memory problems, angina,

circulatory disturbances, mouth, and throat inflammation (Katanić Stanković et al., 2020; Xu et al., 2018; Wu et al., 2012). Essential oils and phenolic compounds of plants belonging to this genus possess a high antimicrobial and antioxidant potential and, therefore, sage extracts are used in food, not only for flavoring but also for preservation purposes (Katanić Stanković et al., 2020). Monoterpenes, triterpenoids, and flavonoids are characteristic compounds found in the aerial part of the *Salvia* species, while diterpenoids and phenolic acids are found in roots (Xu et al., 2018). Numerous *Salvia* species have significant commercial value on the herbal market and, above all, they are of great interest to the food and pharmaceutical industry. However, there are many species of this genus that have not been sufficiently tested and whose potential use has not been exploited. *Salvia pratensis* L. represents a valuable research area for its use as a substitute and/or application in the food

* Corresponding author.

E-mail address: vladimir.mihailovic@pmf.kg.ac.rs (V. Mihailović).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115841>

Received 23 May 2022; Received in revised form 12 October 2022; Accepted 16 October 2022

0926-6690/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

Article

Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Salvia pratensis* L. Aerial Part and Root Extracts: Bioactivity, Biocompatibility, and Catalytic Potential

Nikola Z. Srećković ^{1,*}, Zoran P. Nedić ², Daria Maria Monti ³ , Luigi D'Elia ^{3,4}, Silvana B. Dimitrijević ⁵ ,
Nevena R. Mihailović ¹, Jelena S. Katanić Stanković ⁶  and Vladimir B. Mihailović ^{1,*} 

¹ University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

² University of Belgrade, Faculty of Physical Chemistry, Studentski Trg 12-16, 11159 Belgrade, Serbia

³ University of Naples Federico II, Department of Chemical Sciences, Complesso Universitario Monte Sant'Angelo, via Cinthia 4, 80126 Naples, Italy

⁴ eLoop S.r.l., V.le A. Gramsci 17/B, 80122 Napoli, Italy

⁵ Mining and Metallurgy Institute Bor, Zeleni Bulevar 35, 19210 Bor, Serbia

⁶ University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

* Correspondence: nikola.sreckovic@pmf.kg.ac.rs (N.Z.S.); vladimir.mihailovic@pmf.kg.ac.rs (V.B.M.)

Abstract: The aim of this research was the synthesis of silver nanoparticles (SPA- and SPR-AgNPs) using the aqueous extracts of the aerial (SPA) and the root (SPR) parts of the plant *Salvia pratensis* L., their characterization, reaction condition optimization, and evaluation of their biological and catalytic activity. UV–Vis spectroscopy, X-ray powder diffraction (XRPD), scanning electron microscopy with EDS analysis (SEM/EDS), and dynamic light scattering (DLS) analysis were utilized to characterize the nanoparticles, while Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to detect some functional groups of compounds present in the plant extracts and nanoparticles. The phenolic and flavonoid contents, as well as the antioxidant activity of the extracts, were determined spectrophotometrically. The synthesized nanoparticles showed twice-higher activity in neutralizing 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) compared with the respective extracts. SPR-AgNPs exhibited strong antimicrobial activity against almost all of the tested bacteria (<0.0039 mg/mL) and fungal strains, especially against the genus *Penicillium* (<0.0391 mg/mL). Moreover, they were fully biocompatible on all the tested eukaryotic cells, while the hemolysis of erythrocytes was not observed at the highest tested concentration of 150 µg/mL. The catalytic activity of nanoparticles toward Congo Red and 4-nitrophenol was also demonstrated. The obtained results confirm the possibility of the safe application of the synthesized nanoparticles in medicine and as a catalyst in various processes.

Keywords: *Salvia pratensis* L.; silver nanoparticles; catalysts; hemolytic activity; antimicrobial activity; antioxidant activity



Citation: Srećković, N.Z.; Nedić, Z.P.; Monti, D.M.; D'Elia, L.; Dimitrijević, S.B.; Mihailović, N.R.; Katanić Stanković, J.S.; Mihailović, V.B. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Salvia pratensis* L. Aerial Part and Root Extracts: Bioactivity, Biocompatibility, and Catalytic Potential. *Molecules* **2023**, *28*, 1387. <https://doi.org/10.3390/molecules28031387>

Academic Editor: Josef Jampilek

Received: 30 December 2022

Revised: 25 January 2023

Accepted: 30 January 2023

Published: 1 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Due to nanoscale size, distinct geometries and higher surface area, nanoparticles have different properties than micrometer-sized particles that have essentially no activity. These properties have brought nanoparticles to the center of interest for a variety of applications, particularly in biomedicine, biotechnology, and electronics [1]. Today, the highest percentage of synthesized nanoparticles is obtained by physical and chemical methods that require the use of high pressures, temperatures, and chemicals that have a devastating impact on the environment. In addition, the use of chemicals limits the application of such nanoparticles for biomedical purposes [2]. For this reason, researchers have been working to develop new methods of synthesis that do not require the use of

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Фитохемијска карактеризација екстраката биљака *Lythrum salicaria* L. и *Salvia pratensis* L., њихова биолошка активност и потенцијална примена у синтези наночестица сребра”

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 30.1.2024. године,

Петковић Никола
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„Фитохемијска карактеризација екстракта биљака *Lythrum salicaria* L. и *Salvia pratensis* L., њихова биолошка активност и потенцијална примена у синтези наночестица сребра”

истоветне.

У Крагујевцу, 30.1.2024 године,

Сретен Анђелић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Никола Срећковић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Фитохемијска карактеризација екстраката биљака *Lythrum salicaria* L. и *Salvia pratensis* L., њихова биолошка активност и потенцијална примена у синтези наночестица сребра”

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒

дозвољавам

☐

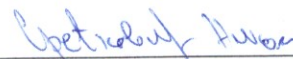
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 30. 1. 2024 године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>