УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Александра А. Јовановић

ОПТИМИЗАЦИЈА ПРОЦЕСА ЕКСТРАКЦИЈЕ ХЕРБЕ *THYMUS SERPYLLUM* L., БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ И ИНКАПСУЛАЦИЈА ЕКСТРАКАТА

Докторска дисертација

Београд, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Aleksandra A. Jovanović

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION PROCESS FROM *THYMUS SERPYLLUM* L. HERB, BIOLOGICAL ACTIVITIES AND ENCAPSULATION OF EXTRACTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Ментор

____
др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

Чланови комисије

____
др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни
професор Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

____
др Катарина Шавикин, научни саветник
Института за проучавање лековитог
биља „Др Јосиф Панчић“, Београд

____
др Гордана Здунић, виши научни сарадник
Института за проучавање лековитог
биља „Др Јосиф Панчић“, Београд

____
др Верица Ђорђевић, виши научни сарадник
Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

Кандидат

____
Александра Јовановић, магистар фармације

Датум одбране __________________________

Ова докторска дисертација урађена је у оквиру пројеката интегралних и интердисциплинарних истраживања: ИИИ 46010, „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компоненaта хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, и ИИИ 46013, „Традиционални и нови производи од плодова гајених и самониклих врста воћака и винове лозе и нус-продуката у преради, са посебним освртом на аутохтоне сорте: хемијска карактеризација и биолошки профил“, финансираних од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у периоду од 2013. до 2017.

Експериментални део рада ове докторске дисертације изведен је у лабораторијама Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, као и на Институту за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду (израда екстраката и HPLC/DAD анализа), на Хемијском факултету Универзитета у Београду (LC/DAD/MS анализа), Пољопривредном факултету Универзитета у Београду (спреј сушење екстраката, FTIR и SEM анализе, антимикробни тестови), Медицинском факултету Универзитета у Нишу (анализа спазмолитичне активности) и Институту техничких наука Српске академије наука и уметности (анализа ласерском дифракцијом и диференцијална скенирајућа калориметрија).

Захвалница

Велику захвалност дугујем свом ментору, др Бранку Бугарском, редовном професору Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, који ми је пружио прилику да будем део његовог истраживачког тима и омогућио да кроз рад на пројекту настане ова докторска дисертација.

Желим посебно да се захвалим драгим људима на Институту за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду: др Катарини Шавикин, научном саветнику, чији су ми савети, стручност, подршка и лепа реч неизмерно помогли при мојим првим корацима у свету науке и учинили да не одустанем од овог пута; др Гордани Здунић, вишем научном сараднику, велико хвала за сугестије, знање, стрпљење, време и охрабрујуће разговоре; и др Дејану Пљевљакушићу, вишем научном сараднику, који је несебично делио своја знања са мном, увек био спреман да помогне и да пружи искрену подршку.

Искрену захвалност дугујем др Верици Ђорђевић, вишем научном сараднику Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, чији су ме корисни савети, стручност, подршка, охрабрења и смиреност усмеравали ка циљу и омогућили да ова докторска дисертација буде заокружена целина.

Хвала др Зорици Кнежевић-Југовић, редовном професору Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, на корисним саветима приликом израде ове докторске дисертације.

Из свег срца желим да се захвалим др Стеви Левићу, доценту Универзитета у Београду, Пољопривредни факултет, на изузетном труду, ангажовању, подршци и стрпљењу које је пружао у току израде дела докторске дисертације који се тиче инкапсулације.

Велико хвала др Душану Мијину, редовном професору Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, на могућности да радим микроталасну екстракцију на катедри за Органску хемију. Посебно се захваљујем др Ради Пјановић што ми је омогућила рад на Францовој ћелији. Желим да се захвалим др Дејану Гођевцу, вишем научном сараднику Института за хемију, технологију и металургију у Београду, за анализе течном хроматографијом. Најлепше хвала др Смиљи Марковић, вишем научном саветнику Института *техничких наука Српске академије наука и уметности, за темељне анализе ласерском дифракцијом и диференцијалном скенирајућом калориметријом. Желим да изразим захвалност др Сузани Бранковић и др Душанки Китић, професорима Универзитета у Нишу, Медицински факултет, на детаљним испитивањима спазмолитичне активности.*

Искрено се захваљујем магистру фармације Предрагу Петровићу, истраживачу сараднику Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, на несебичној помоћи у анализи антиоксидативне и антимикробне активности, на подршци и охрабрујућим разговорима.

Желим најлепше да се захвалим дипломираном технологу, Уни-Јовани Вајић, истраживачу сараднику Института за медицинска истраживања у Београду, на великој помоћи у статистичкој анализи података, као и у току целокупних докторских студија, а изнад свега хвала на искреном пријатељству.

Од срца се захваљујем др Бојани Баланч, научном сараднику Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, на прилици да се опробам и у другим научним областима, стекнем нова знања у Словенији радом на пројекту којим руководи – „Липозоми обложени биополимерима као нови системи за доставу природних фенолних компонената“, на речима охрабрења, на брижности и на свему лепом што је проистекло из ове сарадње.

Свим мојим колегама и сарадницима велико хвала зато што сте били ту да се заједно радујемо, што сте имали одговоре на сва моја питања, што сте увек били спремни да ми помогнете и да ме посаветујете и највише зато што сте обогатили овај период мог живота.

Најтоплије се захваљујем свом супругу, Предрагу Јовановићу, професору српског језика и књижевности, што је са посебном пажњом и љубављу лектурисао ову докторску дисертацију. Веома сам му захвална што је стрпљиво слушао све моје научне монологе, што је веровао у мој успех и бодрио ме.

Мојој породици желим да се захвалим за безрезервну подршку, љубав, брижност и охрабрења. Најискренију захвалност желим да искажем својој мајци, због свих борби које је водила да бих остварила своје циљеве. Успеле смо! Посебно хвала мојој Ањи и Соњи за љубав, за снагу коју ми дајете својим осмесима, загрљајима и речима, и што сте оплемениле и употпуниле мој живот.

Докторат посвећујем својим родитељима, Арси и Анки Чанчаревић. Бескрајно хвала за све што сте учинили за мене!

„Благо човеку који нађе мудрост, и човеку који добије разум.

Јер је боље њом трговати него трговати сребром, и добитак на њој бољи је од злата.

Скупља је од драгога камења, и што је год најмилијих ствари твојих не могу се изједначити с њом.

Дуг живот у десници јој је, а у левици богатство и слава.

Путеви су њени мили путеви и све стазе њене мирне.

Дрво је животно онима који се хватају за њу, и који је год држи срећан је.

Господ је мудрошћу основао земљу, утврдио небеса разумом.

Његовом мудрошћу развалише се бездане и облаци капљу росом.“

Приче Соломунове, 3, 13-20

ОПТИМИЗАЦИЈА ПРОЦЕСА ЕКСТРАКЦИЈЕ ХЕРБЕ *THYMUS SERPYLLUM* L., БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ И ИНКАПСУЛАЦИЈА ЕКСТРАКАТА

Резиме

Врста *Thymus serpyllum* L. (Lamiaceae) или мајчина душица представља вишегодишњу зељасту биљку богату полифенолима који показују антиоксидативни, антимикробни, антихипертензивни, спазмолитични, антиинфламаторни, антиканцерогени, антиалергијски и анксиолитични ефекат. Оптимизација процеса екстракције представља први корак у добијању максималног приноса активних принципа из биљних извора као безбедне и природне алтернативе синтетским компонентама. Нестабилност полифенола у току процеса производње, дистрибуције и чувања намирница, као и у условима гастроинтестиналног тракта, ограничава њихову активност и потенцијалне корисне ефекте на здравље људи. Инкапсулација полифенола доводи до превазилажења поменутих недостатака, ублажавања горког укуса полифенола и побољшања њихове биорасположивости и полувремена елиминације.

Циљеви ове докторске дисертације били су (1) оптимизација процеса екстракције полифенола хербе мајчине душице, (2) хемијска и биолошка карактеризација екстраката и (3) инкапсулација екстраката у желатин.

Оптимизација процеса екстракције је изведена варирањем фактора од интереса: степен уситњености биљног материјала, однос дрога:растварач, врста растварача, време екстракције и метода екстракције (мацерација, екстракција на повишеној температури, у ултразвучном купатилу, ултразвучном сондом и микроталасима). Оптимални услови за добијање екстраката са највећим садржајем полифенола разликовали су се у зависности од примењене методе екстракције. Највећи садржај полифенола је забележен у екстрактима добијеним микроталасном екстракцијом.

Применом *LC/DAD/MS* методе идентификовано је 9 полифенолних компонената у одабраном екстракту врсте *T. serpyllum*: 6,8-ди-*C*-глукозилапигенин, хлорогенска киселина, 6-хидроксилутеолин 7-*O*-глукозид,

кафена киселина, лутеолин 7-*О*-глукуронид, апигенин-глукуронид, салвианолна киселина K, розмаринска киселина и салвианолна киселина I, чије су се концентрације, према *HPLC/DAD* анализи, разликовале у зависности од примењене методе екстракције.

Антиоксидативна активност екстраката је потврђена у три теста (*ABTS*, *DPPH* и тест инхибиције оксидативне деградације β-каротена), док је антимикробни потенцијал остварен против свих испитаних сојева (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica* и *Candida albicans*). У експерименту на изолованом илеуму пацова екстракти су показали спазмолитични ефекат на нивоу спонтаних контракција, контракција индукованих ацетилхолином, калијум хлоридом, баријум хлоридом и калцијум хлоридом.

Различите методе екстракције и сушења, односно инкапсулације (лиофилизација и спреј сушење), утицале су на физичко-хемијске карактеристике добијених екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата, што је потврђено резултатима добијеним приликом анализе садржаја укупних полифенола, флавоноида, шећера и пептида, расподеле величина честица, зета потенцијала, насипне густине и растворљивости, као и применом инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (*FTIR*), скенирајуће електронске микроскопије (*SEM*) и диференцијалне скенирајуће калориметрије (*DSC*). Процес лиофилизације је очувао већу количину полифенола и флавоноида, док је након спреј сушења садржај шећера био већи него у лиофилизованим паралелама. Термичка стабилност и растворљивост лиофилизованих инкапсулата (велике честице неправилног облика) биле су значајно веће него стабилност и растворљивост спреј осушених паралела. Са друге стране, код спреј осушених честица (мале униформне сфере и псеудо-сфере) уочене су стабилизирајуће интеракције између инкапсулираних компонената и носача, тј. желатина, и већа насипна густина. *FTIR* анализа је потврдила присуство угљених хидрата, полифенола, флавоноида, монотерпена и карбоксилата у екстрактима, као и успешну инкорпорацију екстраката у желатинске микрокапсуле. У Францовој дифузионој ћелији, на собној температури лиофилизоване желатинске микрочестице су оствариле већи отпор дифузији и последично ослободиле мању

количину полифенола, док су на 37°C спреј осушене желатинске микросфере показале већи отпор дифузији и спорије ослобађање полифенола.

Кључне речи: *Thymus serpyllum*, полифеноли, оптимизација процеса екстракције, хемијска карактеризација, биолошка активност, инкапсулација

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Биохемијско инжењерство и биотехнологија

УДК број:

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION PROCESS OF *THYMUS SERPYLLUM* L. HERB, BIOLOGICAL ACTIVITIES AND ENCAPSULATION OF EXTRACTS

Summary

Thymus serpyllum L. (Lamiaceae), well-known as wild thyme, is a perennial subshrub, abundant in polyphenols compounds, which possess antioxidant, antimicrobial, antihypertensive, antispasmodic, antiinflammatory, anticarcinogenic, anti-allergic and anxiolytic properties. The optimization of extraction represents the first step in obtaining the maximum yield of active compounds from plant sources, which are safe and natural alternative to synthetic components. Polyphenols instability during food processing, distribution or storage, and in the gastrointestinal tract, limits their activity and potential health benefits. The encapsulation of polyphenols can overcome the drawbacks of their instability, alleviate unpleasant tastes or flavors, and improve the bioavailability and half-life of the compounds.

The aims of this doctoral dissertation were (1) optimization of polyphenols extraction from wild thyme herb, (2) chemical and biological characterization of obtained extracts and (3) gelatin encapsulation of extracts.

The optimization of extraction was carried out through varying factors of interest, particle size, solid-to-solvent ration, solvent type, extraction time and extraction procedures (maceration, heat-, ultrasound- and microwave-assisted extraction). The optimal conditions for achieving the highest content of polyphenols differed depending on used extraction method. The highest content of total polyphenols was detected in the extracts obtained using microwave-assisted extraction.

Using LC/DAD/MS, 9 polyphenolic compounds were identified in selected wild thyme extract: 6,8-di-C-glucosylapigenin, chlorogenic acid, 6-hydroxyluteolin 7-O-glucoside, caffeic acid, luteolin 7-O-glucuronide, apigenin glucuronide, salvianolic acid K, rosmarinic acid and salvianolic acid I. According to the HPLC/DAD analysis, their concentrations differed depending on used extraction procedure.

Antioxidant activity was confirmed in three tests (ABTS, DPPH and β-carotene bleaching methods), whereas antimicrobial potential was shown against all investigated stains (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica* and *Candida albicans*). In the experimental procedure on the isolated rat ileum, the extracts have shown spasmolytic effect on spontaneous contractions and contractions induced by acetylcholine, potassium, barium and calcium chloride.

Different extraction techniques and drying/encapsulation methods (lyophilization and spray drying) have influenced physical-chemical characteristics of the obtained pure wild thyme extracts and gelatin encapsulated extracts. It was confirmed by the results obtained in the analyses of total polyphenols, flavonoids, sugars and peptides, particle size distribution, zeta potential, bulk density and solubility, as well as using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and differential scanning calorimetry (DSC). The process of lyophilization has preserved a larger amount of polyphenols and flavonoids, whereas spray dryied extracts possessed higher content of sugars in comparison to lyophilized parallels. Thermal stability and solubility of lyophilized encapsulated extracts (large particles of irregular shape) were significantly higher in comparison to stability and solubility of spray dried parallels. On the other hand, stabilizing interactions between encapsulated compounds and a carrier, ie. gelatin, and higher bulk density were noticed in spray dried particles (small uniform spheres and pseudo-spheres). FTIR analysis confirmed the presence of carbohydrates, polyphenols, flavonoids, monoterpenes and carboxylates in extracts, as well as successful incorporation of extracts into gelatin microcapsules. In Franz diffusion cell at room temperature, lyophilized gelatin microparticles provided increase of diffusion resistance and consequently released a smaller amount of polyphenols, whereas at 37°C spray dried gelatin microspheres have shown higher diffusion resistance and slower release of polyphenols.

Key words: *Thymus serpyllum*, polyphenols, optimization of extraction, chemical characterization, biological activity, encapsulation

Scientific field: Technological Engineering

Scientific discipline: Biochemical Engineering and Biotechnology

UDC number:

САДРЖАЈ

1. УВОД

1.1. Мајчина душица (*Thymus serpyllum* L.)

Фамилија Lamiaceae, односно фамилија уснатица, која обухвата 200 родова и око 3.000 биљних врста, представља фамилију космополита богатих етарским уљима и полифенолним једињењима. У флори Србије постоји око 30 родова и 147 врста биљака које припадају фамилији уснатица. Уснатице су ароматичне зељасте биљке или грмови са четвртастим стаблом и цветовима скупљеним у дихазијуме. Листови су им најчешће наспрамни и прости, а плод је мерикарпијум и распада се на четири орашице. Етарска уља, од којих потиче арома ових биљака, налазе се у жлезданим трихомама (Јанчић, 2005). Економски значај поменуте фамилије биљака огледа се кроз употребу њених ароматичних врста као лековитих, зачинских и украсних биљака, као и кроз примену етарских уља и екстраката у различитим гранама индустрије (Николић и сар., 2014; Rababah и сар., 2010). Род *Thymus*, који припада фамилији уснатица, обухвата око 350 биљних врста, са великим бројем подврста, варијетета, субваријетета и форми. Специфичност рода *Thymus* се огледа у значајном полиморфизму у морфолошким карактеристикама и хемијском саставу његових биљних врста. Утврђено је да биљне врсте рода *Thymus*, због хемијског полиморфизма, постоје у неколико хемотипова: гераниол, цитрал, линалоол, (Е)-кариофилен, карвакрол, тимол, α-терпинил ацетат и гермакрен. У нашој флори заступљено је око 30 врста поменутог рода, међу којима су најпознатије врсте *Thymus serpyllum* и *T. vulgaris*. Важно је напоменути да су под називом *Serpylli herba* обухваћене све дивље *Thymus* врсте (Горуновић и Лукић, 2011; Јарић и сар., 2015).

Мајчина душица (*T. serpyllum* L.), која припада породици Lamiaceae и роду *Thymus*, јесте вишегодишња зељаста биљка, чије се збијено и густо бусење састоји од полеглих, врло танких, местимично за земљу прираслих, црвено-мрких изданака и врежа из којих се дижу многобројни усправни огранци (слика 1.1). Одатле и долази назив *serpyllum*, што на грчком језику значи пузати. Биљка је висока око 20-30 cm. Стабљика је при основи одрвенела, полегла и са ње се развијају адвентивни корени, док се на врху завршава розетом листова. Цветне гране се развијају дуж стабла и равномерно су прекривене жлезданим длакама.

Листови су мали, чврсти, крути, јајасти и голи, са израженим средњим нервом. Цвасти су лоптасте, чашица је длакава и двоусната, док је круница такође двоусната и најчешће ружичаста и љубичаста. Цела биљка је пријатног и врло ароматичног мириса и укуса. Цвета од почетка јуна до јесени (Јанчић, 2005; Farooqi и сар., 2005). Најчешће се користи надземни део биљке у цвету за добијање инфуза, декокта, тинктура, екстраката и етарског уља (Aziz и Rehman, 2008; Горуновић и Лукић, 2011; Кулишић и сар., 2006; Miron и сар., 2011). Расте спонтано у флори Медитерана, Азије, северне и централне Европе (Николић и сар., 2014; Farooqi и сар., 2005). Добро успева на камењару, песковитом тлу, брежуљцима и падинама, на посним рубовима шума, малим ливадским мравињацима, плиткој земљи поред путева, као и на другим сувим и сунчаним местима. Потребно јој је доста топлоте и сунца и зато добро опстаје на каменитим површинама, где се из земље ослобађа велика количина топлоте (Горуновић и Лукић, 2011; Туцаков и Михајлов, 1977).

Слика 1.1. Мајчина душица (*Thymus serpyllum* L.)

1.2. Традиционална примена мајчине душице

Употреба ароматичног и лековитог биља у исхрани и терапији датира још из доба старих Египћана, Грка и Римљана (Roby и сар., 2013). Фитотерапија је представљала први облик медицине који је човек познавао и једини облик ублажавања и лечења болести, све до појаве синтетских лекова у XIX веку. Напретком хемије и популаризацијом синтезе лекова, синтетска једињења су у потпуности заменила природне агенсе. Ипак, крајем XX века човек и наука се поново окрећу природи, фитотерапији, органској храни и козметици због појаве великог броја токсичних, канцерогених и других нежељених ефеката синтетских молекула (Viuda-Martos и сар., 2010; Радојковић, 2012; Costa и сар., 2012). Биљке синтетишу и складиште велики број различитих биохемијских производа попут протеина, шећера, витамина, влакана, етарских уља и полифенолних једињења, који данас налазе широку примену у прехрамбеној и фармацеутској индустрији, због чега се биљке називају „хемијским златним рудницима“ (Roby и сар., 2013). Управа за храну и лекове Сједињених Америчких Држава, односно *Food and Drug Administration* (*FDA*), објавила је списак више од 150 биљака које су безбедне за људску употребу (*FDA*, 2015). Босиљак, мајоран, оригано, рузмарин, жалфија, лаванда, тимијан и мајчина душица само су неке од биљака које се налазе на овој листи (прилог 1).

На тржишту постоје различите врсте биљних производа: биљни лекови, традиционални биљни лекови, дијететски и козметички производи, који садрже један или више биљних екстраката. Биљни лек садржи искључиво активне састојке једне или више супстанци биљног порекла, један или више биљних препарата или њихову комбинацију. Под биљним препаратима се подразумевају млевене или спрашене биљне супстанце, тинктуре, екстракти, уља, сокови добијени пресовањем и прерађени ексудати. Поменути производи се стављају у промет након потврђеног фармацеутског квалитета, терапијске ефикасности и безбедности. Са друге стране, традиционални биљни лек може бити заснован на научним принципима и резултат је традиције или других традиционалних терапијских приступа (Закон о лековима и медицинским средствима, 2010). Додатно, да би се производиле квалитетне биљне сировине, препарати и лекови, важна је имплементација стандарда Добре праксе, који садрже смернице везане за гајење и сакупљање лековитог биља, примарну прераду, чување и транспорт, контролу квалитета и поступке идентификације биљног материјала (Вулета и сар., 2012).

У традиционалној медицини, херба мајчине душице улази у састав великог броја биљних лековитих формулација попут сирупа, тинктура, инфуза, чајева и декокта (Aziz и Rehman, 2008; Miron и сар., 2011; Николић и сар., 2014; *PDR for*

Herbal Medicines, 2004). Фармаколошки списи који датирају из XV века сведоче о употреби мајчине душице у терапији главобоља узрокованих прехладом и ларингитисом, као и у лечењу обољења респираторног, гастроинтестиналног и урогениталног тракта (Јарић и сар., 2014). Током XVI и XVII века врста *T. serpyllum* се користила орално у терапији маларије и епилепсије (Adams и сар., 2012). Надземни део биљке има дугу традицију употребе као антихелминтик, антисептик, дијафоретик, диуретик, аналгетик и експекторанс (Aziz и Rehman, 2008; Туцаков и Михајлов, 1977). На Балканском полуострву, мајчина душица се употребљава као седатив, као агенс за снижавање нивоа холестерола у крви и побољшање периферне циркулације и као имуностимуланс (Mustafa и сар., 2015; Реџић, 2007). Због својих спазмолитичних својстава, у Индији се мајчина душица користи код менструалних поремећаја и болова (Gairola и сар., 2014). У кинеској медицини употребљава се код наузеје, дијареје, флатуленције, кашља, зубобоље, свраба и болова (Чанчаревић и сар., 2013). Због антимикробних и антитусичних својстава, херба мајчине душице се традиционално користи код прехлада, фарингитиса и кашља (Туцаков и Михајлов, 1977; Hussain и сар., 2013). Херба врсте *T. serpyllum* може да се користи свежа за израду сока, или сува, као део чајних мешавина за респираторна обољења (Ковачевић, 2004). Јак декокт мајчине душице ублажава симптоме код великог кашља и омогућава разређивање секрета код бронхитиса и астме, што овој биљци даје посебно место у третману обољења респираторног система (Kayani и сар., 2014). У традиционалној медицини се мајчина душица користи као стомахик и карминатив, јер има способност да спречава ферментацију и ослобађање гаса, помаже варење и повећава апсорпцију хранљивих материја (*PDR for Herbal Medicines*, 2004; Туцаков и Михајлов, 1977). Употреба мајчине душице која није доказана, али се ослања на њену дугогодишњу примену, јесте у терапији обољења бубрега и бешике, код дисменореје и колика (*PDR for Herbal Medicines*, 2004). Забележена је и екстерна примена ове биљне врсте код екцема, рана и прекомерног знојења, док су се купке, етарско уље и алкохолни екстракти користили код реуме, ишијаса и уганућа (Aziz и Rehman, 2008; Kozuharova и сар., 2013; Mati и Boer, 2011; *PDR for Herbal Medicines*, 2004). Због свог пријатног и ароматичног укуса, као и антисептичне активности, врста *T. serpyllum* се користи у изради пасти за зубе и течности за испирање уста (Николић и сар., 2014). Такође, декокт хербе може помоћи у превенцији опадања косе (Aziz и Rehman, 2008). Последњих година расте интересовање за испитивање лековитих својстава мајчине душице, зато што биљка представља високо квалитетну сировину, богату етарским уљем и биолошки активним полифенолним једињењима, која могу ући у састав различитих формулација у фармацеутској, козметичкој, прехрамбеној и хемијској индустрији (Јарић и сар., 2015).

1.3. Фармаколошка својства мајчине душице

Последњих неколико година научна јавност усмерава истраживања ка природним молекулима и биљном свету, који представља непресушан и недовољно истражен извор биолошки и фармаколошки активних принципа. Природни производи биљака налазе широку примену у производњи лекова, дијететских суплемената и функционалне хране, која поред нутритивних својстава испољава и фармаколошке и физиолошке ефекте, што је од великог значаја у превенцији настанка обољења. Зато је испитивање биолошких и фармаколошких активности и хемијска карактеризација биљних врста од изузетног научног и практичног значаја, јер представља есенцијални корак у добијању потентних, биолошки активних природних производа (Кулишић и сар., 2006; Николић и сар., 2014; Pinelo и сар., 2005; Хоржић и сар., 2009). Испитивањем хемијског састава и биолошких активности природних производа коришћених у традиционалној медицини, идентификоване су и изоловане различите фармаколошки активне материје, које се и данас користе у фармакотерапији. Међу њима су дигоксин, кардиотонични гликозид врсте *Digitalis lanata*, индикован код хроничне срчане инсуфицијенције и поремећаја срчаног ритма; атропин, алкалоид врсте *Atropa belladonna*, који се користи као мидријатик у дијагностици и терапији запаљенских процеса увеалног тракта; скополамин, алкалоид биљака фамилије Solanaceae, заступљен у терапији контракција глатке мускулатуре гастроинтестиналног и урогениталног тракта; морфин, алкалоид врсте *Papaver somniferum*, у употреби као опиоидни аналгетик; ацетилсалицилна киселина, дериват хидроксибензојеве киселине из коре врсте

Salix alba, са широким спектром деловања као аналгетик, антипиретик, антиинфламаторни агенс и инхибитор агрегације тромбоцита; кинин, алкалоид коре *Cinchona* spp., коришћен у терапији маларије (Ковачевић, 2004; Rang и сар., 2005; Heinrich и сар., 2014).

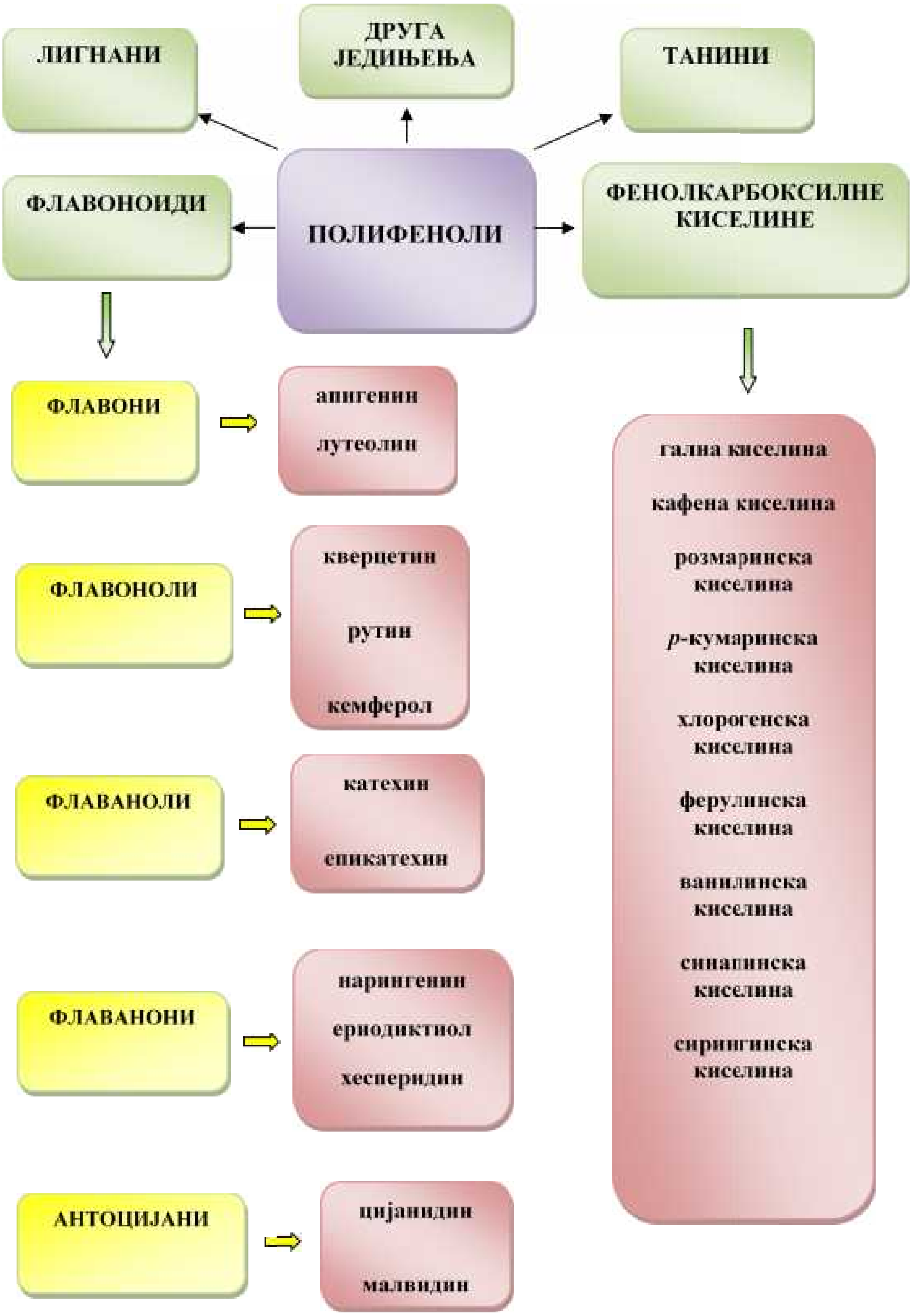
Хемијски састав и концентрација фармаколошки активних принципа врсте *T. serpyllum* варирају у зависности од географског положаја, станишта, климатских услова, стадијума развоја биљке и периода сакупљања (Senatore, 1996). Садржај етарског уља мајчине душице варира у великој мери, од 0,1 до 1% (Петровић и сар., 2013). Главна компонента поменутог етарског уља јесте карвакрол, затим следе борнеол, изобутил ацетат, кариофилен, 1,8-цинеол, цитрал, цитронелал, цитронелол, *p*-цимен, гераниол, геранил ацетат, линалол, линалил ацетат, α-пинен, γ-терпинен, α-терпинеол, терпинил ацетат и тимол (*PDR for Herbal Medicines*, 2004). Карвакрол и тимол, изомери присутни у етарском уљу мајчине душице, припадају групи монотерпенских полифенола са снажном антиоксидативном и антимикробном активношћу (Amorati и сар., 2013; Zheng и Wang, 2001). Поред етарског уља, мајчина душица садржи фенолкарбоксилне киселине, флавоноиде, тритерпене и танине (*PDR for Herbal Medicines*, 2004).

Захваљујући експекторантној активности хербе мајчине душице, индикативно подручје у коме је одобрена њена употреба јесте терапија кашља и бронхитиса (*PDR for Herbal Medicines*, 2004). Студија која је обухватила испитивање потенцијалног антихипертензивног ефекта водених екстраката врсте *T. serpyllum*, код спонтано хипертензивних и нормотензивних пацова, показала је да болус инјекција екстракта смањује систолни и дијастолни крвни притисак и укупни периферни отпор, без утицаја на поменуте параметре код нормотензивних пацова (Михаиловић-Станојевић и сар., 2013). Захваљујући имуномодулаторним својствима, екстракти мајчине душице остварују антиинфламаторни ефекат на експерименталним моделима колитиса код глодара (Algieri и сар., 2014). Додатно, експерименти на животињама су показали да екстракти врсте *T. serpyllum* остварују ефекат повратне спреге на нивоу хипофизе, што је слично дејству хормона тироидне жлезде (*PDR for Herbal Medicines*, 2004). У две одвојене студије, водени и метанолни екстракти мајчине душице су остварили цитотоксичну активност на ћелијским линијама хуманог карцинома дојке, уз индукцију апоптозе и инхибицију ДНК метилтрансферазе и хистонске деацетилазе, ензима који узрокују промене на молекулу ДНК и хромозомима (Berdowska и сар., 2013; Bozkurt и сар., 2012). Испитивањем утицаја етарског уља врсте *T. serpyllum* на ћелијске линије канцера плућа, желуца, дебелог црева, грлића материце и дојке, показана је снажна антитуморска активност поменуте биљне компоненте (Николић и сар., 2014). Такође, етарско уље мајчине душице има способност инхибиције пролиферације ћелија фибробласта и хормон-зависног карцинома простате (Hussain и сар., 2013). Етарско уље, водени и етанолни екстракти мајчине душице показују инхибиторну активност према ацетилхолинестерази, одговорној за хидролизу неуротрансмитера (Mata и сар., 2007). Снажна антиоксидативна активност етарског уља и водених екстраката врсте *T. serpyllum* показана је у неколико студија (Кулишић и сар., 2006; Miron и сар., 2011; Николић и сар., 2014; Hussain и сар., 2013). Додатно, доказано је да биљни препарати врсте *T. serpyllum* инхибирају бакром индуковану оксидацију липопротеина мале густине (Кулишић и сар., 2007). Етарско уље добијено из хербе мајчине душице поступком хидродестилације показало је значајно бољу способност неутрализације *DPPH* радикала, у поређењу са синтетским антиоксидансима бутилхидроксианизолом и бутилхидрокситолуеном (Петровић и сар., 2013). Поређењем *in vitro* антиоксидативне и антимикробне активности етарских уља различитих врста рода *Thymus*, добијени су следећи резултати: етарско уље мајчине душице је показало најбољу антиоксидативну активност у неутрализацији слободног *DPPH* радикала, највећи редукциони потенцијал у трансформацији Fe^{3+} у Fe^{2+} и највиши степен инхибиције оксидативне деградације β-каротена, као и најснажнију активност против *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* (Николић и сар., 2014). Поред тога, етарско уље мајчине душице је инхибирало раст Грам-негативних бактерија *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* и *Proteus mirabilis* (Левић и сар., 2011; Николић и сар., 2014). Додатно, при испитивању ефеката на *Bacillus subtilis* и *Klebsiella pneumoniae* уочена је значајна бактерицидна активност етарског уља врсте *T. serpyllum* (Rasooli и Mirmostafa, 2002). Ипак, Грам-негативне бактерије су резистентније на антимикробну активност етарских уља и екстраката, у поређењу са Грам-позитивним бактеријама (Левић и сар., 2011; Moreno и сар., 2006). Испитивање антимикотичне активности различитих екстракта врсте *T. serpyllum* довело је до следећих резултата: хексански екстракт је показао значајну активност против *Fusarium solani*, етилацетатни екстракт је остварио значајну антифунгалну активност према *Aspergillus flavus*, док је метанолни екстракт показао умерену активност против *Microsporum canis* (Aziz и Rehman, 2008). Поред тога, метанолни екстракт мајчине душице умерено инхибира раст следећих сојева гљивица: *Alternaria species*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *F. solani* и *F. moniliforme* (Rehman и сар., 2009). Приликом испитивања утицаја етарског уља врсте *T. serpyllum* на раст и продукцију микотоксина *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* и *A. niger*, примећен је снажан инхибиторни ефекат на поменуте гљивице присутне у храни, захваљујући синергистичном и кумулативном ефекту компонената етарског уља. Тиме је отворен пут употреби етарског уља и полифенолних једињења мајчине душице у прехрамбеној и фармацеутској индустрији, у циљу замене синтетских антимикотика (Соколић-Михалак и сар., 2012). Поред свих досад поменутих активности, врста *T. serpyllum* такође апсорбује ултравиолетно зрачење, што омогућава примену њених екстраката у кремовима и лосионима за сунчање и козметичким производима који успоравају процес старења (Lee и сар., 2011). Пошто употреба конвенционалних репелената и пестицида има негативан утицај на људе и животну средину, етарско уље мајчине душице, које поседује репелентну и инсектицидну активност, представља ефикасну и природну алтернативу синтетским компонентама (Amer и Mehlhorn, 2006; Singh и Singh, 1991).

1.4. Секундарни метаболизам и полифеноли

Док примарни метаболизам биљне ћелије подразумева процесе фотосинтезе, трансформацију глукозе до полисахарида, синтезу аминокиселина и масних киселина, уз даље формирање пептида/протеина и липида, секундарни метаболизам се дефинише као скуп метаболичких путева у којима настају једињења која немају енергетски значај. Стога компоненте које настају у секундарном метаболизму нису директно укључене у раст, развој и репродукцију биљног организма. Ипак, биљно царство производи више од 100.000 секундарних метаболита, које карактеришу хемијска разноврсност и многобројна биолошка и фармаколошка својства. Наиме, дуго се сматрало да су поменута једињења споредни продукти метаболизма биљне ћелије, без икаквог значаја за биљни организам. Касније се дошло до веома важних сазнања да секундарни метаболити представљају саставне делове ензимских система и система заштите биљног организма, као и инактивиране облике и депое штетних продуката метаболизма биљне ћелије. Синтезом различитих биоактивних једињења биљка гради одбрамбени систем против биљоједа, микроорганизама, ултравиолетног зрачења, као и других штетних фактора спољашње средине. Додатно, секундарни метаболити служе као атрактанти и сигналне компоненте за привлачење животиња, које врше опрашивање и расејавање плодова и семена биљака. Производи секундарног метаболизма су одабрани, развијени и усавршени дугим процесом еволуције. Свака биљна врста уноси специфичност у своје биосинтетске путеве присуством или активношћу различитих ензима и супстрата. Управо се секундарни метаболити сматрају механизмом адаптације биљне врсте на различите факторе средине, чиме је омогућен опстанак врсте. Највеће групе секундарних метаболита биљака су алкалоиди, полифеноли, поликетиди, терпеноиди, стероиди, балзами, смоле и биљне гуме. Поменута једињења (агликони) глукозидном везом остварују комплексе са шећерима, при чему настају хетерозиди, глукозиди или гликозиди (Verma и Shukla, 2015; Wink, 2016; Ковачевић, 2004). Када је дефинисана структура првих једињења изолованих из биљних извора владало је мишљење да само глукоза учествује у њиховој изградњи. Касније је утврђено да различите мономерне и олигомерне пентозе и хексозе такође могу да граде хетерозиде, али да је активност хетерозида повезана са хемијском природом агликона (Ковачевић, 2004).

Полифенолне компоненте представљају велику хетерогену групу секундарних метаболита биљака, укључујући фенолкарбоксилне киселине, флавоноиде, кумарине, лигнане, танине, стилбене, антраноиде, нафтодиантроне и друга једињења (слика 1.2).



Слика 1.2. Подела полифенола и најзначајнији представници група

Полифеноли у својој структури имају један или више ароматичних прстенова са једном или више хидроксилних група. Могу се наћи у слободном облику (агликони), везани са шећерном компонентом (гликозиди) или у комплексу са органским киселинама, аминима и липидима (Verma и Shukla, 2015; Петровић и сар., 2009). Дистрибуција полифенола у биљном ткиву, целуларним и субцелуларним структурама није униформна, јер су хидросолубилни полифеноли углавном заступљени у ћелијским вакуолама, док се већина флавоноида и хидрофобних полифенола налази у ћелијском зиду са протеинима и полисахаридима (Naczk и Shahidi, 2006). У биљном организму полифеноли обављају низ функција: делују као антиоксиданси, антимикробни агенси, фоторецептори, репеленти хербивора, визуелни атрактанти инсеката и као заштитни агенси од прекомерног ултравиолетног зрачења (Pietta, 2000; Fang и сар., 2002; Heim и сар., 2002). Додатно, полифеноли повезани са различитим ћелијским структурама доприносе чврстоћи ћелијског зида, имају важну улогу у регулацији ћелијског раста и морфогенезе, као и у одговору ћелије на стрес попут зрачења, загађења ваздуха, високих температура, повреда и патогена (Naczk и Shahidi, 2006). Фенолкарбоксилне киселине обухватају сва једињења која поред ароматичног прстена садрже најмање једну карбоксилну и једну хидроксилну групу. Деле се на деривате хидроксибензојеве и хидроксициметне киселине. Најзначајније хидроксибензојеве киселине су гална и салицилна киселина, док у природи као представници хидроксициметне групе доминирају кафена, *p*-кумаринска, ферулинска и синапинска киселина. Хлорогенска и розмаринска киселина, које припадају групи хидроксициметне киселине, карактеристичне су за фамилију Lamiaceae и још се називају псеудотанини или танини уснатица. Ферулинска и *p*-кумаринска киселина, као главне фенолкарбоксилне киселине ћелијског зида, стварају везе са полисахаридима, омогућавајући адхезију ћелија, формирање лигнана и термичку стабилност (Ковачевић, 2004; Naczk и Shahidi, 2006). Још једну велику групу полифенола чине флавоноиди, чији назив потиче од латинске речи *flavus*, што значи жут, јер су у прошлости флавоноиди били саставни делови екстраката коришћених за бојење тканина у жуто. Касније су у групу флавоноида сврстана безбојна, плаво, љубичасто и црвено обојена једињења, која поседују два бензенова прстена спојена C-3 мостом. У зависности од оксидације C-3 моста, флавоноиди се деле у две групе: флавоноиди у ужем смислу, тј. деривати бензо-γ-пирона – флавони, флавоноли, дихидрофлавони (флавонони), дихидрофлавоноли (флаванонoли) и изофлавоноиди, и флавоноиди у ширем смислу – катехини, леукоантоцијанидини, антоцијанидини, халкони и аурони (Boros и сар., 2010; Петровић и сар., 2009).

Главни извори полифенолних компонената у људској исхрани јесу воће, поврће, легуминозе, житарице, орашасти плодови и зачинске биљке (Boros и сар., 2010; Mustafa и Turner, 2011). Полифенолима се приписују многобројни благотворни ефекти на људски организам и сматра се да је искључиво агликонски део молекула заслужан за те активности (Ковачевић, 2004; Shahidi и Ambigaipalan, 2015). Примећено је да инциденца кардиоваскуларних обољења и ендотелне дисфункције има нижу вредност у области Медитерана, где се исхрана базира на ароматичним биљкама, богатим антиоксидативним полифенолним једињењима. Екстракти поменутих биљака повећавају продукцију ендотелног фактора релаксације – азот моноксида (NO) и простациклина који спречавају појаву ендотелне дисфункције (Grande и сар., 2004; Михаиловић-Станојевић и сар., 2013). Антиоксидативном активношћу и „хватањем“ слободних радикала полифеноли смањују ниво оксидованих липида у крви, док редукцијом агрегације еритроцита и инхибицијом агрегације тромбоцита штите крвне судове. Тако делују кардиопротективно, спречавајући настанак атеросклерозе, аритмије и хипертензије (Boros и сар., 2010; Вајић и сар., 2015; Hossain и сар., 2011; Costa и сар., 2015). Такође, на нивоу централног нервног система испољавају анксиолитични ефекат (Boros и сар., 2010). Полифеноли показују хепатопротективну, антиинфламаторну, антидијаројичну и антиулкусну активност, што омогућава њихову примену у обољењима гастроинтестиналног тракта (Boros и сар., 2010; Galván D’Alessandro и сар., 2012; Proestos и сар., 2005; Hossain и сар., 2011). Њихова антимикробна активност (антибактеријска, антифунгална и антивирална) може бити искоришћена у прехрамбеној и фармацеутској индустрији, као замена синтетским конзервансима и лековима (Boros и сар., 2010; Singh и сар., 2016). Супресијом пролиферације и индукцијом апоптозе туморских ћелија полифеноли показују антитуморску активност (Singh и сар., 2016). Додатно, у ћелији стимулишу ДНК репаративни механизам (Li и сар., 2010). Биљке богате полифенолним једињењима поседују способност апсорпције штетног ултравиолетног зрачења, упоредиву са хемијским блокаторима (Lee и сар., 2011). Показано је да полифенолне компоненте инхибирају хумани имунодефицијентни вирус, хумани симплекс вирус и глукозилтрансферазу бактерије *S. mutans* (Proestos и сар., 2005). Данас наука посвећује доста пажње проучавању хемијске структуре и биолошких активности фенолкарбоксилних киселина, што отвара бројне могућности за проширење њихове примене у прехрамбеној и фармацеутској индустрији. Фенолкарбоксилне киселине инхибирају ензимске системе, посебно липидну пероксидазу, због чега се могу користити као антиоксиданси и антиинфламаторни агенси. Додатно, хетерозиди фенолкарбоксилних киселина се користе код поремећаја функције јетре и као холагози и холеретици (Ковачевић, 2004; Munin и Edwards-Lévy, 2011; Петровић и сар., 2009). Флавоноидима се приписује хемостатичко дејство (смањују пермеабилност зидова капилара), као и антиинфламаторна, хепатопротективна, антитуморска, антимикробна, антивирусна, антиалергијска, антиулцерозна и антиоксидативна активност (Boros и сар., 2010; Горуновић и Лукић, 2011; Munin и Edwards-Lévy, 2011). Они остварују и кардиопротективне ефекте инхибирајући ензимске системе и делујући хипогликемијски (Горуновић и Лукић, 2011; Munin и Edwards-Lévy, 2011; Rice-Evans и сар., 1995).

Полифеноли присутни у прехрамбеним производима доприносе њиховој боји, укусу, мирису и оксидативној стабилности (Naczk и Shahidi, 2006). Вредности већине параметара квалитета хране временом опадају, под утицајем великог броја фактора попут кисеоника, светлости, температуре и микроорганизама. Промена укуса и мириса уља и масти присутних у намирницама настаје због продукције алдехида, кетона, оксида и слободних радикала, као и због бактеријских ензима, који доводе до настанка испарљивих масних киселина кратког ланца. Оксидација масти, уља, липосолубилних витамина и есенцијалних масних киселина доприноси губитку квалитета намирница, промени у њиховој боји, текстури и конзистенцији, уз настанак токсичних продуката (Fayad и сар., 2013). Додатно, фактор који највише ограничава рок трајања намирница јесте раст микроорганизама (плесни, бактерије и гљивице). Да би се спречили поменути проблеми, прехрамбена индустрија у процесу производње користи велики број синтетских антиоксиданаса и конзерванаса (Costa и сар., 2012). Ароматичне биљке, захваљујући антиоксидативним и антимикробним својствима полифенола, представљају предмет истраживања хемијске, фармацеутске и прехрамбене индустрије, у циљу проналажења замена синтетским адитивима (Boros и сар., 2010). Њихова потенцијална употреба у прехрамбеним и фармацеутским производима би довела до елиминације штетних ефеката дуготрајног конзумирања синтетских адитива и испуњења захтева потрошача да се синтетски продукти замене природним, који се сматрају квалитетним и безбедним (Viuda-Martos и сар., 2010; Costa и сар., 2012).

1.5. Полифеноли као антиоксиданси

Оксидација представља есенцијалну реакцију која обезбеђује енергију за покретање већине биолошких процеса у живим организмима. Са друге стране, реакција оксидације је један од најважнијих путева настанка слободних радикала у храни, лековима и живим организмима (Moon и Shibamoto, 2009). Људски организам у борби против слободних радикала користи урођени одбрамбени механизам, у форми ензима супероксид дисмутазе, каталазе и глутатион пероксидазе. Међутим, у условима стреса, при патолошким променама и као одговор на присуство патогена, загађења и хемикалија, у живим организмима настају велике количине слободних радикала, које превазилазе капацитете ћелијске одбране. Том приликом настају иреверзибилна оштећења на липидима, протеинима и нуклеинским киселинама, уз последичну смрт ћелија (Ningappa и сар., 2008). Поменуте ћелијске промене доводе до убрзања процеса старења и многобројних обољења попут канцера, Алцхајмерове и Паркинсонове болести, артритиса, дијабетеса, болести јетре и кардиоваскуларног система. До неуродегенеративних обољења најчешће долази под утицајем оксидативног стреса, због осетљивости неурона на присуство слободних кисеоничних радикала, који узрокују пероксидацију незасићених масти. Поред тога, антиоксидативни капацитет мозга је знатно слабији него код других органа, те присуство радикала иницира каскадне реакције које доводе до смрти нервних ћелија (Andreescu и сар., 2011; Mata и сар., 2007; Parejo и сар., 2002). Оксидативни стрес има кључну улогу и у патогенези различитих кардиоваскуларних обољења као што су атеросклероза, исхемија срца, хипертензија, кардиомиопатија, срчана хипертрофија и конгестивна срчана инсуфицијенција. Слободни радикали врше модификације на фосфолипидима и протеинима (пероксидацијом и оксидацијом тиолних група), што доводи до промена у пермеабилности мембрана и функцијама ћелијских протеина и органела, као и прекида на фосфолипидном двослоју, уз последичну дисфункцију миоцита. Такође, оксидација липопротеина мале густине, недостатак ендотелног фактора релаксације и инфламација изазвана слободним кисеоничним радикалима доводе до ендотелне дисфункције, која стоји у основи већине кардиоваскуларних обољења (Valko и сар., 2007; Михаиловић-Станојевић и сар., 2013). Доказано је да су дијабетес мелитус и хипергликемија повезани са нарушеним балансом у синтези радикала и антиоксидативног потенцијала ћелије. Такође, и хипергликемија стимулише настанак слободних кисеоничних радикала преко оксидативне фосфорилације, аутооксидације глукозе, липооксигеназе и азот моноксид синтетазе (Valko и сар., 2007; Mata и сар., 2007; Rahimi и сар., 2005). Слободни радикали изазивају дисбаланс у ћелијском редокс потенцијалу и стимулишу промене на генетском материјалу, што представља важан корак у настанку оксидативних лезија на молекулу ДНК и у карциногенези (Andreescu и сар., 2011; Löliger, 1991). Загађења, дувански дим, инфекције и алергени у респираторном тракту повећавају продукцију слободних радикала, који оштећују епителне ћелије, узрокују хиперреактивност бронхија, стимулишу ослобађање хистамина из мастоцита и секрецију мукуса. Зато у патогенези хроничних обољења респираторног система, попут астме и хроничне опструктивне болести плућа, постоји снажна инфламација удружена са дисбалансом у синтези оксиданаса и антиоксиданаса. Обољења ока (катаракта, глауком) такође настају због оксидативног стреса изазваног токсинима и ултравиолетним зрачењем. Настали слободни радикали праве оштећења на протеинима и ензимима, чиме се нарушава равнотежна концентрација Na^+, K^+ и Ca^{2+} и мења интраокуларни притисак (Andreescu и сар., 2011; Parejo и сар., 2002).

Антиоксиданси су једињења која имају способност да успоре или инхибирају оксидацију липида, протеина и других молекула, спречавајући иницијацију или пропагацију ланчаних реакција оксидације. Када ензимски механизми не функционишу или су недовољно ефикасни, као у случају оксидативног стреса, антиоксиданси мале молекулске масе, као заштитни агенси, могу да редукују оштећења настала оксидацијом у људском организму (Moon и Shibamoto, 2009; Ouariachi и сар., 2014). Постоје две основне категорије антиоксиданаса, природни и синтетски. Групи природних антиоксиданаса припадају аскорбинска киселина, α-токоферол, каротеноиди, полифеноли и селен, док су бутилхидроксианизол, бутилхидрокситолуен и галати антиоксиданси синтетског порекла (Zheng и Wang, 2001; Shukla и сар., 2009). Биљке синтетишу велики број антиоксидативних компонената, у различитим концентрацијама и различитих физичко-хемијских карактеристика. Да би се биљна једињења дефинисала као антиоксиданси, морају да задовоље два услова – да присутни у малим концентрацијама могу да одложе, успоре или спрече деловање слободних радикала и да новонастали радикал буде стабилан (Shahidi и Wanasundara, 1992; Halliwell и Gutteridge, 1990). Природне полифенолне компоненте могу да спрече оштећења изазвана слободним радикалима захваљујући идеалној структури и редукујућем потенцијалу, који им даје посебну улогу у адсорпцији и неутрализацији супероксид анјона (O_2^-), азот оксида (NO^-), пероксида и других слободних радикала. Снажну антиоксидативну активност остварују „хватањем“ слободних радикала, хелирањем метала и интеракцијама са липидним мембранама, протеинима и нуклеинским киселинама (Zheng и Wang, 2001; Shukla и сар., 2009). Код дегенеративних обољења изазваних слободним радикалима, полифенолни антиоксиданси остварују превентивне и терапеутске ефекте смањењем оксидативног стреса и оштећења у ћелијама. Различити природни антиоксиданси, међу којима су α-токоферол и полифеноли, могу да спрече оксидацију протеина, липидну пероксидацију и настанак слободних кисеоничних радикала у неуронима, што им даје важно место у будућој терапеутској стратегији против оксидативног стреса присутног у неуродегенеративним обољењима (Mata и сар., 2007; Parejo и сар., 2002). Фенолкарбоксилне киселине, флавоноиди и антоцијани смањују ризик од кардиоваскуларних обољења, редукујући оксидативни стрес. Поменута једињења утичу на различите ћелијске активности, повећавајући антиоксидативни капацитет крвне плазме и биорасположивост ендотелног фактора релаксације, смањујући концентрацију липида у крви, неутралишући слободне радикале, редукујући интрацелуларно стварање слободних кисеоничних радикала и делујући антиинфламаторно (Boros и сар., 2010; Горуновић и Лукић, 2001; Grande и сар., 2004). Ови природни антиоксиданси инхибицијом пролиферације, индукцијом апоптозе, супресијом инфламације и блокадом нуклеарног фактора к, могу очувати нормалну ћелијску регулацију и спречити канцерогене промене (Andreescu и сар., 2011; Горуновић и Лукић, 2001; Löliger, 1991). Фитопротектанти са антиоксидативном активношћу (флавоноиди, танини, лигнани, кумарини) помажу у превенцији дијабетеса и његових компликација (ретинопатија, неуропатија, нефропатија), смањењем настанка оксидативног стреса, спречавањем липидне пероксидације и инхибицијом ензима (Andreescu и сар., 2011; Rahimi и сар., 2005; Хоржић и сар., 2009). Полифеноли индукују биосинтезу глутатиона, који као антиоксиданс спречава настанак оштећења на важним ћелијским компонентама. Како је глутатион главни антиоксиданс респираторног система, стимулација његове синтезе полифенолима може бити корисна у третману хроничне опструктивне болести плућа (Flores и сар., 2012). Такође, флавоноиди редукују симптоме астме својим антиоксидативним, антиалергијским и антиинфламаторним својствима. Они неутралишу слободне радикале азота, смањују ослобађање хистамина, инхибирају метаболизам арахидонске киселине и продукцију цитокина (Andreescu и сар., 2011; Горуновић и Лукић, 2001; Munin и Edwards-Lévy, 2011). Различите клиничке студије су показале протективну улогу флавоноида, антоцијана и стилбена са антиоксидативном и антиинфламаторном активношћу у обољењима ока (Andreescu и сар., 2011; Parejo и сар., 2002). Захваљујући својој антиоксидативној активности, естри фенолкарбоксилних киселина су били ефикасни у лечењу ендометриозе, која се повезује са неплодношћу (Andreescu и сар., 2011). Третмани природним антиоксидансима повећавају отпорност коже на оксидативни стрес и могу успорити процес старења коже (Andreescu и сар., 2011; Lee и сар., 2011).

Поред улога које остварују у људском организму и у лечењу различитих обољења, антиоксиданси се додају и намирницама које садрже масти и уља у циљу спречавања промене боје и настанка непријатног, ужеглог мириса и укуса производа. Ове промене у намирницама настају услед оксидативних процеса иницираних присуством оксиданаса, микроорганизама, зрачења и високе температуре. Антиоксиданс који се додаје прехрамбеним производима мора да задовољи неколико захтева: да је 100% чиста супстанца која не интереагује са компонентама хране или паковања и не мења физичке и сензорне карактеристике производа, да је нетоксичан, да се лако хомогенизује у производ и да не захтева присуство катализатора за активност (Shahidi и Ambigaipalan, 2015). Адитиве, попут пигмената, појачивача укуса, антиоксиданаса и конзерванаса, уколико су природног порекла, потрошачи сматрају безбедним, квалитетним и прихватљивим (Viuda-Martos и сар., 2010; Shukla и сар., 2009). Ипак, у развијеним земљама закон налаже да се ураде неопходни тестови за било који адитив како би се утврдило да није штетан по људско здравље и како би се одредила минимална концентрација која остварује жељену функцију, а да је притом безбедна за дуготрајну употребу у исхрани. Такође, имена свих адитива морају да се наведу у спецификацији производа. Вреди поменути да је 2007. године употребљено близу милион тона индустријских антиоксиданаса и потрошено 2.400.000.000 евра, што сведочи о важности овог адитива у прехрамбеној индустрији (Fayad и сар., 2013). Етарска уља и екстракти богати полифенолима су познати по способности да спрече оксидацију липида у храни донирањем водоника или електрона слободном радикалу, чиме заустављају ланчану реакцију у иницијалној фази и побољшавају квалитет и нутритивну вредност намирнице (Ouariachi и сар., 2014; Shukla и сар., 2009). Компоненте етарског уља, посебно полифеноли, додати директним мешањем или облагањем производа, могу да зауставе или успоре оксидацију и аутооксидацију различитих органских једињења и тиме продуже рок трајања намирнице. Када довољна количина полифенола дође у контакт са незасићеним липидима, долази до прекида ланчане реакције оксидације, скраћивања дужине ланца и редукције степена оксидације (Amorati и сар., 2013). Алкохолни екстракти који садрже флавоноиде и друге полифеноле показују снажну антиоксидативну активност у биљним уљима и мастима, без промена у физичким и сензорним карактеристикама ових производа. Уз улогу антиоксиданаса, екстракти дају специфичан укус уљу, те могу бити коришћени и као арома у намирницама (Fayad и сар., 2013). Недавно је откривено да употреба зачина са антиоксидативним деловањем (каранфилић, цимет, оригано, ђумбир, бибер, паприка и бели лук) у току термичке обраде меса, резултује редукцијом оксидације меса и *in vivo* смањењем концентрације малонилалдехида (производа липидне пероксидације полинезасићених масних киселина), што потврђује доказе о благотворним ефектима зачинског биља на људско здравље, посебно данас када се исхрана базира на намирницама богатим мастима (Li и сар., 2010).

Разноврсност и комплексност природне мешавине полифенолних компонената у различитим биљним екстрактима отежава карактеризацију сваке компоненте, као и процену и упоређивање њихових антиоксидативних активности и биолошког потенцијала (Zheng и Wang, 2001; Costa и сар., 2015). Доказано је да је антиоксидативни капацитет полифенолних једињења уско повезан са њиховом структуром (Rice-Evans и сар., 1997). Галнa киселина (3,4,5-трихидроксибензојева киселина) сматра се дериватом бензојеве киселине који има најјачи антиоксидативни потенцијал. Монохидроксибензојеве киселине са хидроксилном групом у *o* и *p* положају не поседују антиоксидативну активност, јер немају особине донора водоника. За разлику од њих, *m*-хидроксибензојева киселина показује снажне антиоксидативне ефекте. Инкорпорацијом метиленске групе између ароматичног прстена и карбоксилне групе долази до повећања антиоксидативног капацитета, јер слаби утицај -COOH групе. Поред тога, етиленска група, додата између фенилне и карбоксилне групе, повећава редукциона својства хидроксициметних киселина. Такође, *o* супституција хидроксилне групе другом електрон-донорском групом, попут алкил или метокси групе, повећава антиоксидативни потенцијал фенолкарбоксилних киселина. Глукозилација флавоноида редукује антиоксидативни капацитет једињења, у поређењу са слободним агликоном. Познато је да се антиоксидативна ефикасност флавоноида повећава са бројем хидроксилних група супституисаних у прстену Б, где *o*-дихидрокси структура омогућава већу стабилност насталог радикала и учествује у делокализацији електрона (Zheng и Wang, 2001; Rice-Evans и сар., 1995). Међутим, постоје и биљке чија се антиоксидативна активност приписује непознатим једињењима или синергистичном деловању више компонената (Zheng и Wang, 2001). Велики број студија је показао да постоји позитивна линеарна корелација између садржаја полифенола и антиоксидативног капацитета биљке (Zheng и Wang, 2001; Miron и сар., 2011; Хоржић и сар., 2012). Етарска уља и екстракти биљака представљају важан извор природних антиоксиданаса, односно алтернативу синтетским компонентама, којима се приписују токсични и мутагени ефекти (Zheng и Wang, 2001; Ningappa и сар., 2008; Ouariachi и сар., 2014; Shukla и сар., 2009).

1.6. Полифеноли као антимикробни агенси

Пре модерних антибиотика у борби против бактерија, посебно у терапији кашља и бронхитиса, користили су се биљни екстракти и етарска уља, инкорпорирани у фармацеутске формулације попут сирупа, масти и препарата за инхалацију (Fayad и сар., 2013). Од 1940. године развој синтетских лекова ефикасних против бактеријских инфекција, а истовремено безбедних за примену, унео је револуционарне промене у терапију, драстично смањујући морбидитет и морталитет узрокован инфективним обољењима. Ипак, неколико деценија касније због промена које су уследиле у генетском материјалу микроорганизама, примена природних препарата поново заузима важно место у терапији. Будући да савремена медицина настоји да комплексне болести лечи једним синтетским молекулом, појава резистенције микроорганизама на велики број антимикробних агенаса указује на мане оваквог приступа лечењу. Појава феномена резистенције је била очекивана због принципа еволуције који одређују да се сви организми генетски адаптирају на промене у окружењу. Тиме је дошло до озбиљних ограничења расположивих опција за терапију многих инфективних обољења. Када се у лечењу комплексних инфекција користе фитопрепарати, због заједничког и синергистичног дејства више различитих активних принципа биљке, смањује се могућност настанка резистенције микроорганизама на антимикробне агенсе (Левић и сар., 2011; Радојковић, 2012; Rang и сар., 2005). Додатно, раније студије показују да полифеноли могу да се користе у комбинацији са антибиотицима како би појачали њихову ефикасност и смањили дозу антибиотика (Singh и сар., 2016).

Поред фармакотерапијске примене, антимикробни агенси (углавном синтетски) у великој мери се користе у прехрамбеној индустрији, у циљу спречавања раста патогена и микроорганизама који изазивају кварење хране

(Viuda-Martos и сар., 2010). Патогене бактерије које су најчешће идентификоване у намирницама јесу *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella enteritidis* и *K. pneumoniae*, док је од гљивица најчешћа *C. albicans* (Singh и сар., 2016). У идеалном случају, комерцијалне технике за конзервирање хране би требало да повећају квалитет и рок трајања производа, уз минималан утицај на саму намирницу. Ради постизања тог циља развијене су различите методе које подразумевају примену високог притиска, електричних импулса и зрачења. Ипак, не могу се све поменуте технике конзервирања употребити за упаковане прехрамбене производе (López и сар., 2007). Из тог разлога прехрамбена индустрија посеже за хемијским конзервансима, који при свакодневном конзумирању могу штетно утицати на здравље људи (Viuda-Martos и сар., 2010; Fayad и сар., 2013). Самим тим, у данашње време расте интересовање за употребу природних екстраката и етарских уља, као антимикробних агенаса у намирницама (Al-Fatimi и сар., 2010; Николић и сар., 2014; Tepe и сар., 2004).

Полифеноли (фенолкарбоксилне киселине, флавоноиди, танини) показују антибактеријску активност против патогених и непатогених бактеријских сојева, попут *E. coli*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. faecalis* и *Listeria* spp. (Viuda-Martos и сар., 2010; Daglia, 2012; Shafaghat и сар., 2014; Toplan и сар., 2017; Fayad и сар., 2013; Friedman и сар., 2004). Тимол и карвакрол, важне полифенолне компоненте етарских уља, представљају најактивнија антимикробна једињења која делују синергистично (Левић и сар., 2011; Tepe и сар., 2004). Етарска уља врста *Origanum vulgare* и *T. vulgaris*, која садрже велике количине тимола и карвакрола остварују значајан антимикробни ефекат према *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. enterica*, *S. typhimurium* и *S. aureus* (Левић и сар., 2011). Фенолкарбоксилне киселине, попут кафене и розмаринске киселине, својим антибактеријским својствима омогућавају употребу биљних екстраката у средствима за дезинфекцију, у течностима за испирање усне дупље и гргљање, као и у пастама за зубе (Николић и сар., 2014; Fayad и сар., 2013). Флаван-3-оли (катехин и његови деривати) и флавоноли (кверцетин и његови деривати) показују *in vitro* инхибицију раста неколико бактеријских сојева: *Vibrio cholerae*, *S. mutans*, *Clostridium perfringes*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. acidophilus* и *Chlamydia pneumoniae*

(Daglia, 2012). Такође, показано је да су Грам-позитивне бактерије осетљивије на полифенолне екстракте у односу на Грам-негативне сојеве (Proestos и сар., 2005).

1.7. Полифеноли као спазмолитици

Спазмолитици представљају природне или синтетске компоненте које изазивају релаксацију глатке мускулатуре респираторног, гастроинтестиналног, билијарног и урогениталног тракта, директно или инхибицијом парасимпатикуса. Контракције глатке мускулатуре настају у болестима црева, попут синдрома иритабилног колона, дивертикулозе, дијареје и констипације, затим у болестима жучних путева и бронхијалној астми (Rang и сар., 2005). Приликом дуготрајне употребе синтетских лекова у третману ових обољења долази до испољавања нежељених ефеката на различитим системима органа. Стога употреба природних биљних лекова и чајева у терапији поменутих обољења заузима веома важно место (Guo и сар., 2014).

Познато је да биљни секундарни метаболити попут флавоноида релаксирају глатке мишиће гастроинтестиналног тракта, аорте, трахеје и утеруса. С обзиром на то да утичу на холинергичке M_3 и хистаминске H_1 рецепторе, флавоноиди доводе до смањења контракција индукованих хистамином, што омогућава њихову примену у третману бронхијалне астме (Melzig и сар., 2001). Слично флавоноидима, кумарини релаксирају глатку мускулатуру кардиоваскуларног система инхибицијом мобилизације интрацелуларног Ca^{2+}, смештеног у норадреналин-осетљиве структуре (Dussossoy и сар., 2016). Једињења заступљена у биљним врстама фамилије Lamiaceae (флавони и гликозиди флавона) испољавају спазмолитични ефекат активацијом никотинских рецептора, простагландина и Ca^{2+} канала, а инхибирају и контракције узроковане ацетилхолином, хистамином и баријумовим јонима (Бранковић и сар., 2011; Ventura-Martínez и сар., 2017). Полифеноли *Thymus* spp., тимол и карвакрол, такође поседују способност релаксације глатке мускулатуре (Engelbertz и сар., 2012). Кверцетин, гликозиди кверцетина и танини показују спазмолитичну активност механизмом инхибиције контракција изазваних ацетилхолином и калијумовим јонима (Tona и сар., 2000).

1.8. Екстракција полифенола

Будући да је већину секундарних метаболита биљака веома скупо или чак немогуће синтетисати у лабораторији, најбоља опција за њихово издвајање и концентрисање јесте екстракција из природних извора (Skaria и сар., 2007). Процес екстракције представља технолошку операцију одвајања фармаколошки и биолошки активних једињења биљних и животињских ткива од неактивних или инертних компонената, применом селективних растварача и стандардних метода. Екстракти су препарати течне (течни екстракти и тинктуре), получврсте (меки екстракти и олеорезине) или чврсте конзистенције (суви екстракти), који се обично добијају из осушеног биљног или животињског материјала (Вулета и сар., 2012). При екстракцији биљног материјала, у првој фази долази до квашења, растварања и брзог преноса компонената из разорених ћелија, механизмом турбулентне дифузије. Након периода брзе екстракције следи спора дифузија састојака из интактних биљних ћелија и пренос масе молекулском дифузијом (Јовановић и сар., 2017; Ћујић и сар., 2016). Прелазак активних супстанци из биљног материјала у екстракт је директно пропорционалан дифузионом коефицијенту, додирној површини дроге и растварача, концентрационом градијенту и времену екстракције, а обрнуто пропорционалан дебљини дифузионог слоја (Вулета и сар., 2012). Циљ екстракције може да буде екстракција укупних екстрактивних материја или екстракција одређене компоненте. Узимајући у обзир сазнања о широком спектру биолошких активности полифенола и њиховој примени у великом броју грана индустрије, данас се интензивно испитују фактори који утичу на екстракцију полифенола. Фактори који значајно утичу на принос екстрахованих полифенола јесу карактеристике биљног материјала (услови узгајања, период сакупљања, део биљке, степен уситњености биљне дроге), однос дрога:растварач, врста растварача (вехикулум), време екстракције, температура, притисак, pH, као и изабрана метода екстракције (Дент и сар., 2013; Јовановић и сар., 2017). Будући да се полифенолне компоненте разликују по својој структури, није могуће установити стандардизовану процедуру која ће омогућити екстракцију већине полифенола из сваког биљног извора (Јовановић и сар., 2017). Зато оптимизација процеса екстракције представља есенцијални корак у изоловању полифенолних једињења, због њихове структурне и физичко-хемијске разноврсности у различитим природним изворима (Буцић-Којић и сар., 2011).

Приликом израде биљних екстраката неопходно је изабрати квалитетну биљну дрогу, погодну методу екстракције, потребну опрему за извођење поступка екстракције и одговарајући растварач. Највећа количина биљног материјала који се користи за израду екстраката добија се организованом, плантажном производњом, чиме се смањује утицај спољашњих фактора, омогућава оптималан раст и развој биљне врсте и обезбеђује довољна количина биљне сировине уједначеног квалитета, уз истовремену заштиту природних ресурса (Вулета и сар., 2012). Последњих година су актуелне такозване „зелене“ методе екстракције, које подразумевају потрошњу мале количине растварача (еколошки прихватљивог), кратко време екстракције и висок принос жељених компонената (Јовановић и сар., 2017; Kivilompolo и Hyötyläinen, 2009; Mustafa и Turner, 2011).

Традиционалне методе за израду екстраката биљних дрога обухватају мацерацију, перколацију и дигестију. Мацерација представља једнократну екстракцију прописно уситњене дроге прописаним растварачем на собној температури. Предност ове екстракционе технике огледа се у једноставности и употреби хладног растварача, што је чини погодном за екстракцију термолабилних једињења. Ипак, време екстракције је дуго и потребне су велике количине растварача за бољи принос екстракције. Дужина трајања мацерације може бити различита, најчешће од 4 до 10 дана, уз мешање 3 пута дневно, јер мировање доводи до смањења брзине дифузије активних принципа. Дифузија траје док се не изједначе концентрације активних супстанци интрацелуларно и екстрацелуларно. Настала равнотежа се ремети интензивним мешањем у току целокупног процеса екстракције, чиме се време скраћује на 10-30 минута. Интензивним мешањем долази до раста концентрационог градијента у растварачу и убрзања дифузије, уз последично повећање приноса екстракције. Важно је напоменути да код мацерације није могуће исцрпљивање материјала и потпуна екстракција. Зато се двострука мацерација примењује код биљне дроге грубе конзистенције, остварујући већи степен искоришћења материјала, јер се већ екстрахована дрога прелива свежим растварачем и долази до поновног успостављања концентрационог градијента (Вулета и сар., 2012). Приликом примене повишене температуре повећава се ефикасност екстракције на следећи начин – оштећење биљне ћелије доводи до повећања пермеабилности мембране и кидања међумолекулских веза (полифеноли-липопротеини), чиме се повећава растворљивост активних супстанци, убрзава термичко кретање молекула у течној фази и кинетика екстракције. Важно ограничење ове методе су физичко-хемијске карактеристике активних принципа, јер није могућа њена примена код биљног материјала са термолабилним компонентама. Наведене традиционалне процедуре екстракције имају неколико недостатака: низак принос, дуго време екстракције, потрошња велике количине биљне дроге и растварача и последично негативан утицај на животну средину (Miron и сар., 2011; Mustafa и Turner, 2011).

Последњих година све више је заступљена употреба модерних техника екстракције попут екстракције ултразвучним таласима, микроталасима, суперкритичним флуидом и течне екстракције под притиском, у циљу скраћивања времена екстракције, смањења потрошње растварача, повећања приноса екстракције и побољшања квалитета екстраката (Wang и Weller, 2006). Екстракција ултразвучним таласима представља економичну, једноставну и ефикасну алтернативу конвенционалним методама екстракције, уз употребу ултразвучног купатила или ултразвучне сонде. Ултразвучни таласи омогућавају стварање мехурића у екстракционом медијуму и изазивају пораст температуре и негативног притиска. Мехурићи расту и пуцају, што доводи до промена на чврстој површини биљног материјала. Поменути механички и термички ефекти изазивају оштећење ћелијских зидова, ослобађање ћелијског садржаја, већи продор растварача унутар биљног матрикса и интензивирање преноса масе (Kivilompolo и Hyötyläinen, 2009). Главне предности употребе ултразвука у чврсто-течној екстракцији јесу повећање приноса екстракције и бржа кинетика (Deng и сар., 2015; Хоржић и сар., 2012). Екстракција микроталасима омогућава брзу испоруку енергије целокупној запремини растварача и биљног материјала, уз последично загревање и течне и чврсте фазе. Вода унутар биљне ћелије апсорбује енергију микроталаса, што доводи до унутрашњег загревања и оштећења ћелије. Поменуте промене олакшавају десорпцију компонената из матрикса и повећавају отпуштање активних принципа у екстракциони медијум. Такође, миграција растворених јона повећава продирање растварача у биљни материјал и тиме додатно повећава ефикасност микроталасне екстракције. Са економског и практичног становишта екстракција микроталасима има водеће место из неколико разлога: веома кратко време екстракције, мале количине употребљеног растварача и велики принос (Wang и Weller, 2006).

С обзиром на то да се већина биљних екстраката користи за прехрамбене и фармацеутске производе, избор растварача за екстракцију представља важан корак. Избор растварача зависи од карактеристика биљног материјала, физичко-хемијских карактеристика жељених активних принципа и примењене методе екстракције. Идеалан растварач поседује следеће особине: селективност, физиолошку индиферентност, нетоксичност, незапаљивост, хемијску инертност, погодан вискозитет и ниску цену. Такође, у идеалним условима, да би се постигла висока чистоћа екстракта и селективност, активни принципи би требало да имају добру растворљивост у одабраном вехикулуму, док су друге компоненте нерастворљиве или минимално растворљиве у њему. Најчешће коришћена екстракциона средства су вода, етанол, метанол, пропиленгликол, ацетон, етар, хлороформ и масна уља (Вулета и сар., 2012; Јовановић и сар., 2016; Mustafa и Turner, 2011). Због разноврсности полифенола и разлика у поларности, широк спектар растварача се користи за њихову екстракцију: вода, етанол, метанол, ацетон, етилацетат и хексан (Aziz и Rehman, 2008; Вајић и сар., 2015; Kivilompolo и Hyötyläinen, 2009). Са токсиколошке тачке гледишта, у прехрамбеној и фармацеутској индустрији вода и етанол су безбеднији и погоднији од других вехикулума, тако да се у процесу екстракције најчешће користе њихове мешавине (Tauchen и сар., 2015). У зависности од растворљивости жељених компонената, потребно је одредити оптималан однос воде и етанола. Вода екстрахује велики број фармаколошки активних принципа биљних дрога, али и велику количину баласних материја. Поред тога, погодна је средина за развој микроорганизама и настанак оксидативних и хидролитичких реакција, које изазивају деградацију активних материја. Такође, вода изазива интензивно бубрење биљног материјала, те активни принципи заостају у дроги и слабо се екстрахују. Због високе тачке кључања, уклањање воде из добијених екстраката представља дуг и неекономичан процес, који угрожава стабилност активних састојака. Са друге стране, етанол је високо селективан растварач, који не доводи до бубрења ћелијских мембрана. Изазива таложење протеина и инхибира ензимску деградацију активних принципа. Има ниску тачку кључања, те је стога олакшано његово уклањање из екстраката. Ипак, и етанол поседује неколико недостатака: лаку запаљивост, високу цену и могуће присуство нечистоћа попут метанола (Вулета и сар., 2012).

Када је потребна екстракција одређених компонената, важно је дефинисати однос дроге и растварача и време екстракције како би принос био највећи. Време екстракције зависи од молекулске масе активних и баласних материја. Уколико је молекулска маса активних принципа мања од молекулске масе баласних материја, време екстракције ће бити краће, јер активна материја брзо дифундује. У случају велике молекулске масе активних компонената, процес екстракције се продужава због отежане дифузије (Јовановић и сар., 2016). Такође, од вискозитета средине, односно од вискозитета растварача и количине присутних баласних материја (слузи и смола), зависи брзина дифузије активних принципа. Повећан вискозитет средине доводи до смањења брзине дифузије због ометаног кретања честица (Вулета и сар., 2012).

Слика 1.3. Екстракти мајчине душице добијени применом различитих растварача и односа дрога:растварач

1.9. Инкапсулација полифенола

Повећана тежња за применом полифенола у прехрамбеној и фармацеутској индустрији, због њихових благотворних ефеката на људско здравље и на квалитет хране, отвара нова поглавља у истраживањима полифенола. Полифенолне компоненте, попут антоцијана, деривата хидроксибензојеве и хидроксициметне киселине, флаванона и флавонола, представљају фотосензитивне и термолабилне компоненте, осетљиве на оксидацију, ензиме и промену pH. Поред тога, због слабе растворљивости у води, биорасположивост полифенола је веома ниска. Тек мала количина орално примењених полифенола се апсорбује, како због ниске пермеабилности и растворљивости, тако и због осетљивости полифенола на различите pH вредности, ензиме и хранљиве материје присутне у гастроинтестиналном тракту. Додатно, већина поменутих молекула делује адстрингентно и има горак укус, што ограничава њихову примену у намирницама и фармацеутским препаратима за оралну употребу (Munin и Edwards-Lévy, 2011). Како ефикасност и примена полифенолних једињења зависе од очувања њихове стабилности, биоактивности и биорасположивости, неопходна је инкапсулација поменутих активних принципа у различите носаче. Инкапсулацијом се ефикасно превазилазе поменути недостаци, уз испоруку и модификовано ослобађање активних принципа на циљном месту. Главни циљ инкапсулације јесте заштита жељене компоненте од утицаја светлости, влаге, температуре, кисеоника, ензима и промене pH, уз последично продужење рока трајања крајњег производа и обезбеђивање контролисаног ослобађања инкапсулиране супстанце (Белшчак-Цвитановић и сар., 2011; Fang и Bhandari, 2010).

Технике инкапсулације полифенола подразумевају спреј сушење, инкапсулацију у липозоме, наноинкапсулацију, лиофилизацију, емулзификацију, коацервацију, ко-кристализацију, инклузионо комплексирање, екструзију, као и многе друге методе (Баланч и сар., 2015; Gharsallaoui и сар., 2007; Истенич и сар., 2015; Munin и Edwards-Lévy, 2011; Fang и Bhandari, 2010). Лиофилизација представља процес сушења у вакууму, при веома ниским температурама уз очување термолабилних једињења присутних у почетној сировини, док низак садржај влаге у крајњем производу гарантује микробиолошку стабилност и трајно конзервирање производа (Иванчевић и сар., 2012). Код таквог начина сушења, смањењем притиска и додавањем довољне количине топлоте, замрзнута вода из узорка директно прелази из чврстог стања у гас, односно долази до сублимације. Изузев дугог периода дехидратације (око 20 сати), лиофилизација јесте једноставна техника за инкапсулацију природних арома и лековитих компонената (Fang и Bhandari, 2010). Спреј сушење представља технику превођења течног узорка у суви прах, која може бити примењена на широк спектар материјала, како у прехрамбеној, тако и у фармацеутској индустрији, за добијање лековитих сировина, ексципијенаса или микрокапсула (Bruschi и сар., 2003). Будући да је спреј сушење економична и континуирана операција и да произведене честице имају добар квалитет, поменута метода је најчешће коришћена микроинкапсулациона техника у прехрамбеној индустрији за припремање сувих и стабилних адитива и арома (Gharsallaoui и сар., 2007; Munin и Edwards-Lévy, 2011). Материјали који се користе као носачи у инкапсулацији спреј сушењем морају да поседују добру растворљивост у води, стабилност на повишеној температури, способност емулзификације и формирања филма. Постоји доста материјала који задовољавају поменуте захтеве, али је број материјала дозвољених за употребу у намирницама ограничен (Gharsallaoui и сар., 2007). За инкапсулацију спреј сушењем најчешће се користе угљени хидрати (малтодекстрин и полисахариди соје), гуме (гума арабика), протеини (протеини млека и желатин) и друге супстанце, у којима ће жељена компонента бити хомогенизована (Gharsallaoui и сар., 2007; Fang и Bhandari, 2010). Протеини захваљујући свом амфифилном карактеру, физичко-хемијским и функционалним карактеристикама представљају добар избор материјала приликом микроинкапсулације спреј сушењем (Gharsallaoui и сар., 2007). Поред тога, протеини интереагују са полифенолним компонентама преко водоничних веза и хидрофобних интеракција (Јакобек, 2015). Желатин, као протеин растворљив у води, има способност да формира зид микрочестице током спреј сушења. Додатно, у поређењу са малтодекстрином, малтозом и манитолом, желатин поседује боље карактеристике везане за ефикасну инкапсулацију жељене компоненте, захваљујући високом нивоу емулзификације, високој стабилности и тенденцији стварања густе мреже након спреј сушења. Такође, желатин представља компоненту чија је примена у намирницама и фармацеутским производима дозвољена (Gómez-Mascaraque и сар., 2015; Gharsallaoui и сар., 2007).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Први циљ истраживања у оквиру докторске дисертације биће **оптимизација процеса екстракције полифенола из херба мајчине душице**, варирањем следећих параметара: степен уситњености биљне дроге, однос дрога:растварач, врста растварача, време и метода екстракције (мацерација, екстракција на повишеној температури, у ултразвучном купатилу, ултразвучном сондом и микроталасима). Због физичко-хемијске разноврсности полифенолних једињења није могуће установити стандардизован метод који би омогућио екстракцију велике количине полифенолних компонената из сваке биљне врсте. Стога, да би се постигао највећи принос полифенола у екстрактима, неопходно је извршити оптимизацију фактора од интереса за сваки појединачни биљни извор. Употребом статистичког софтвера и статистичких алатки (анализа варијансе и експериментални дизајн) биће одређени фактори који значајно утичу на принос екстракције, међуфакторске интеракције и нивои параметара при којима се добијају екстракти са највећим садржајем полифенола. Додатно, биће испитан утицај одабраних фактора на принос укупних флавоноида мајчине душице.

Затим ће бити урађена **хемијска карактеризација екстраката врсте *T. serpyllum*** применом две методе: течна хроматографија-масена спектроскопија (енгл. *liquid chromatography-mass spectrometry*, *LC/DAD/MS*) и високо ефикасна течна хроматографија (енгл. *high-performance liquid chromatograpy*, *HPLC*/*DAD*).

Биолошка карактеризација екстраката мајчине душице ће подразумевати **испитивање антиоксидативне, антимикробне и спазмолитичне активности**, у циљу откривања могуће примене полифенола мајчине душице у прехрамбеним, козметичким и фармацеутским производима. Антиоксидативна активност ће бити испитана применом три теста (*ABTS*, *DPPH* и тест инхибиције оксидативне деградације β-каротена), која су заснована на различитим принципима, са циљем да се добије обухватнија слика о антиоксидативном потенцијалу екстраката врсте *T. serpyllum*. Антимикробна активност одабраних екстраката биће испитана на следећим микроорганизмима: *B. cereus*, *E. faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *Yersinia enterocolitica* и *C. albicans* применом микродилуционог теста. На изолованом илеуму пацова биће тестирана спазмолитична активност одабраних екстраката, применом модела спонтаних контракција, контракција изазваних ацетилхолином, калијум хлоридом, баријум хлоридом и калцијум хлоридом.

Будући да је предмет истраживања биљна врста са дугом традицијом употребе, један од циљева дисертације јесте дефинисање **састава и деловања екстраката мајчине душице** како би се употребом поменутих екстраката могао осигурати довољан унос биолошки активних једињења која потенцијално позитивно утичу на људско здравље.

Додатно, кроз дисертацију ће се **развити систем у коме ће полифеноли бити инкапсулирани у желатинске микрочестице**, што ће обезбедити њихову физичку и хемијску стабилност, као и отпуштање на циљном месту, ради даљег коришћења у прехрамбеној и фармацеутској индустрији. Инкапсулација екстраката мајчине душице у желатин биће спроведена применом две технике: лиофилизације и спреј сушења. Такође, биће урађена хемијска карактеризација, одређивање приноса, антиоксидативног потенцијала, расподеле величина честица и зета потенцијала, испитивање морфолошких и термичких карактеристика лиофилизованих и спреј осушених екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата, као и праћење кинетике отпуштања полифенолних компонената и одређивање коефицијената дифузије и отпора дифузији полифенола, у циљу добијања микрочестица најбољих карактеристика.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Биљни материјал

Биљни материјал коришћен у експерименталном раду представља осушени надземни део биљке у цвету врсте *T. serpyllum*. Биљна дрога је комерцијални производ Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“, Београд, Србија. Према Југословенској фармакопеји (2000), сува херба је уситњена у индустријском млину *UMČ 30* (Биљотехника, Србија) применом сита 3 и просејана кроз одговарајућа сита, при чему је добијено 5 степена уситњености (0,3, 0,5, 0,7, 0,9 и 1,5 mm). Степен уситњености представља дужину странице отвора одговарајућег сита изражену у милиметрима (Фармакопеја СФРЈ, 1984). За потребе експеримента коришћени су степени уситњености 0,3, 0,7 и 1,5 mm, са циљем да се обухвате најмање честице, честице средње величине и највеће честице биљне дроге.

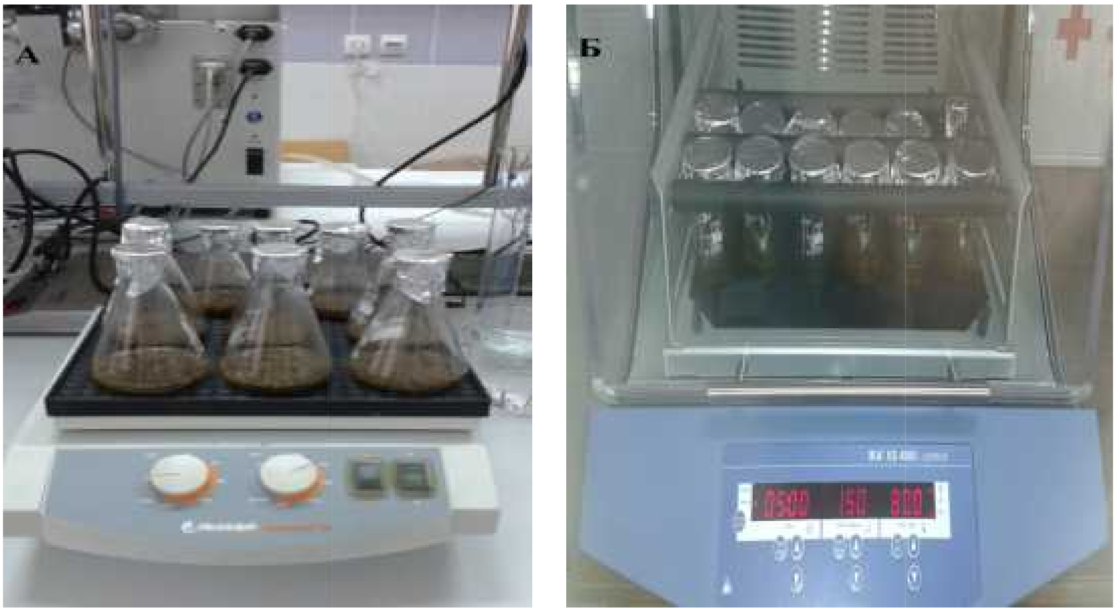
3.2. Методе екстракције мајчине душице

3.2.1. Мацерација

Екстракција хербе мајчине душице методом мацерације изведена је на шејкеру *Unimax 1010* (*Heidolph*, Немачка), на собној температури, при брзини мешања од 150 обртаја у минути (слика 3.1A), коришћењем три степена уситњености биљне дроге (0,3, 0,7 и 1,5 mm), три односа дрога:растварач (1:10, 1:20 и 1:30), четири врсте растварача (30, 50 и 70% етанол и вода) и пет времена екстракције (5, 15, 30, 60 и 90 минута). У стаклене ерленмајере (100 mL) је одмерено 2,50 g, 1,25 g и 0,83 g биљног материјала, у зависности од односа дрога:растварач и додато 25 mL одговарајућег растварача. Ерленмајери су покривени алуминијумском фолијом у циљу заштите екстраката од светлости и спречавања испаравања етанола. Добијени екстракти су профилтрирани у нормални суд кроз филтер папир (0,45 µm) и прописно допуњени одговарајућим растварачем до 25 mL. Сви екстракти су припремљени у трипликату и чувани у фрижидеру до будућих анализа.

3.2.2. Екстракција на повишеној температури

Екстракција на повишеној температури је изведена коришћењем истих нивоа фактора (степен уситњености, однос дрога:растварач и врста растварача) као у случају мацерације, уз примену три времена екстракције (5, 15 и 30 минута) на 80°C, при брзини мешања од 150 обртаја у минути у инкубатор шејкеру који омогућава контролисану температуру окружења, *KS 4000i control* (*IKA*, Немачка) (слика 3.1Б). Процедура израде екстраката је изведена на исти начин као у претходно описаном процесу мацерације.



Слика 3.1. (А) Мацерација и (Б) екстракција на повишеној температури

3.2.3. Екстракција ултразвучним таласима

3.2.3.1. Екстракција у ултразвучном купатилу

Екстракција ултразвучим таласима применом ултразвучног купатила *Bandelin Sonorex Digitec* (*Bandelin electrosonics*, Немачка) фреквенције 35 kHz изведена је употребом истих степена уситњености, односа дрога:растварач, врсте растварача и времена екстракције као у случају претходно описане екстракције на повишеној температури (слика 3.2А).

3.2.3.2. Екстракција ултразвучном сондом

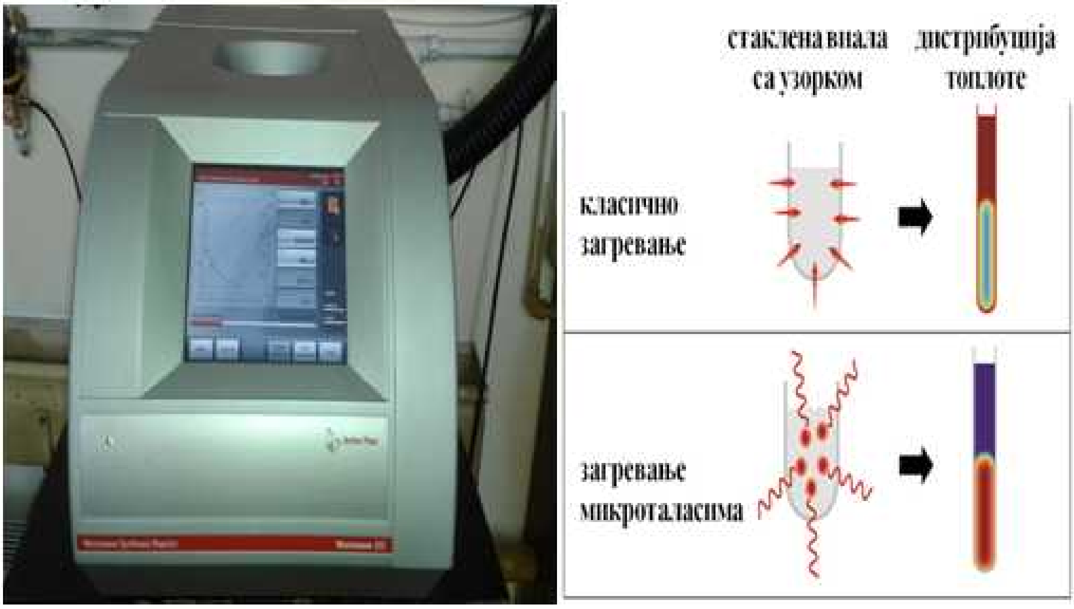
Екстракција ултразвучном сондом је изведена употребом два уређаја која су се разликовала по снази процесора, димензијама титанијумског наставка сонде, амплитуди и времену екстракције. Прва коришћена сонда је имала процесор од 200 W са конвертером од 20 kHz и титанијумски наставак од 13 mm, *Ultrasonic Homogenizer HD 2200* (*Bandelin*, Немачка). Коришћени су степени уситњености 0,3, 0,7 и 1,5 mm, односи дрога:растварач 1:10, 1:20 и 1:30, време екстракције 3, 7 и 10 минута и 30% етанол као екстракциони медијум, при амплитуди од 65%.

Слика 3.2. Екстракција ултразвучним таласима: (А) ултразвучно купатило и (Б) ултразвучна сонда

Ипак, због бољих карактеристика друге сонде (процесор од 750 W са конвертером од 20 kHz и титанијумски наставак дијаметра 19 mm), могућности примене веће амплитуде и дужег времена екстракције, уз виши принос полифенола, оптимизација процеса екстракције ултразвучом сондом настављена је применом уређаја *Sonics Vibra Cell* (*Sonics and Materials*, САД) (слика 3.2Б). Коришћени су нивои фактора као у случају претходно описане екстракције на повишеној температури и у ултразвучном купатилу. Биљна дрога (10 g, 5 g и 3,33 g, у зависности од односа дрога:растварач) екстрахована је са 100 mL одговарајућег растварача (већа запремина је коришћена због техничких карактеристика ултразвучне сонде). Додатно, стаклена чаша са узорком је била урођена у лед да би се спречило прегревање узорка и посуде. Екстракти су профилтрирани кроз филтер папир употребом вакуума и допуњени растварачем до 100 mL.

3.2.4. Екстракција микроталасима

За екстракцију микроталасима коришћен је микроталасни реактор *Monowave 300* (*Anton Paar*, Аустрија) (слика 3.3). Екстракција је изведена у затвореним стакленим виалама од 20 mL при температури од 200ºC, брзини мешања 600 обртаја у минути и степену уситњености биљне дроге 0,3 mm, док су варирани параметри били однос дрога:растварач (1:10-1:40), врста растварача (0-60% етанол) и време микроталасне екстракције (10-190 секунди). У виале је одмерена одређена количина биљног материјала у зависности од односа дрога:растварач и додато 10 mL одговарајућег растварача. Екстракти су профилтрирани кроз филтер папир и допуњени до 10 mL у нормалном суду.



Слика 3.3. Уређај за екстракцију микроталасима и шематски приказ дејства микроталаса

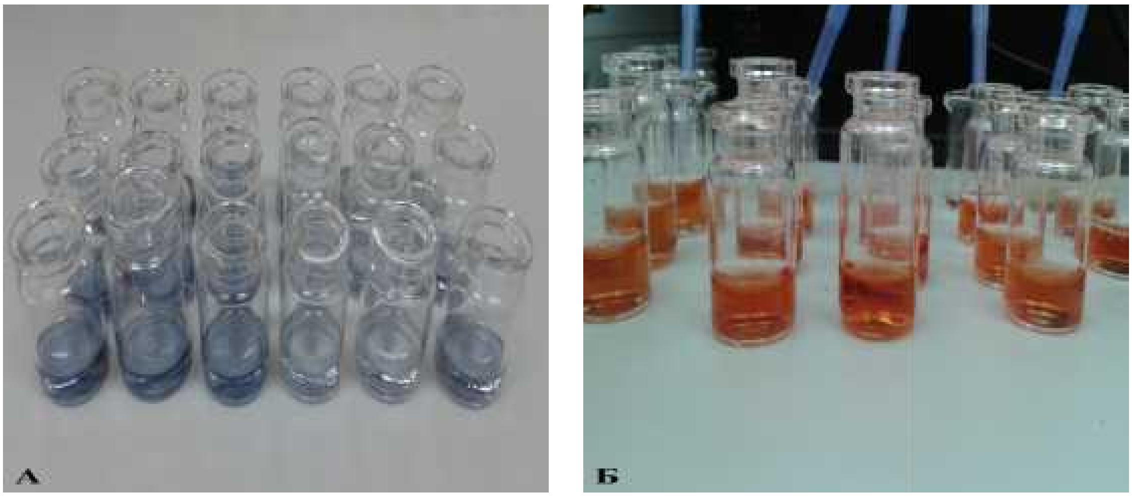
3.3. Метода одређивања садржаја укупних полифенола

Садржај укупних полифенола етанолних и водених екстраката врсте *T. serpyllum*, као и сувих екстраката и желатинских инкапсулата екстраката добијених лиофилизацијом и спреј сушењем, одређен је спектрофотометријски, употребом модификоване Фолин-Чиклтеу методе, која се заснива на реакцији полифенола и Фолин-Чиклтеу реагенса (фосфоволфрамова и фосфомолибденска киселина) у благо алкалним условима (слика 3.4А). У датој реакцији долази до оксидације полифенола, док се фосфоволфрамова и фосфомолибденска киселина редукују, при чему настају стабилни, плаво обојени оксиди (Skotti и сар., 2014). Прописно разблажен узорак (20 µL) додат је у 1,5 mL дестиловане воде и помешан са 100 µL претходно разблаженог Фолин-Чиклтеу реагенса (однос реагенса и дестиловане воде 1:2). Затим је додато 300 µL 20% воденог раствора натријум карбоната и након мешања је запремина допуњена дестилованом водом до 2 mL. Након двосатне инкубације у мраку на собној температури апсорбанце су измерене на 765 nm, у спектрофотометру *UV Spectrophotometer UV-1800* (*Shimadzu*, Јапан), где су извршена сва наредна спектрофотометријска мерења. Приликом мерења апсорбанце коришћена је слепа проба следећег састава: дестилована вода, растварач употребљен у екстракцији (у случају екстракта), Фолин-Чиклтеу реагенс и раствор натријум карбоната, у истом односу као у узорцима. Сваки узорак је припремљен у три паралелне пробе. За израду калибрационе криве коришћени су раствори галне киселине (100-700 mg/L). Резултати садржаја укупних полифенола у течним екстрактима су изражени као милиграм галне киселине по литру екстракта [mg *GAE*/L], док су за суве екстракте и инкапсулате изражени као милиграм галне киселине по граму сувог екстракта, односно инкапсулата [mg *GAE*/g].

3.4. Метода одређивања садржаја укупних флавоноида

Садржај укупних флавоноида у одабраним екстрактима врсте *T. serpyllum*, као и у лиофилизованим и спреј осушеним екстрактима и желатинским инкапсулатима екстраката, одређен је колориметријском методом (Barros и сар.,

2007) (слика 3.4Б). Прописно разблажен узорак (250 µL) помешан је са 5% раствором натријум нитрита (75 µL) и дестилованом водом (1,25 mL). Након 5 минута додато је 150 µL 10% раствора алуминијум хлорида и у 6. минуту 1M раствор натријум хидроксида (500 µL). Потом је смеша допуњена дестилованом водом до 3 mL. Апсорбанце раствора су измерене на 510 nm у односу на слепу пробу (сви реагенси осим екстракта/инкапсулата). Катехин монохидрат је коришћен за израду калибрационе криве (50-300 mg/L). Резултати за течне екстракте су изражени као милиграм катехина по литру екстракта [mg *CE*/L], а за суве екстракте и инкапсулате изражени су као милиграм катехина по граму сувог екстракта, односно инкапсулата [mg *CE*/g].



Слика 3.4. Одређивање садржаја (А) укупних полифенола и (Б) укупних флавоноида

3.5. Метода одређивања садржаја укупних шећера

Садржај укупних шећера у лиофилизованим и спреј осушеним екстрактима мајчине душице одређен је методом фенол-сумпорне киселине (DuBois и сар., 1956). Прво су екстракти растворени у дестилованој води до концентрације од 0,3 mg/mL. Потом је 0,2 mL тог раствора помешано са дестилованом водом (0,2 mL), 5% раствором фенола (0,4 mL) и концентрованом сумпорном киселином (2 mL). Након 30 минута апсорбанца смеше је измерена на 490 nm, уз слепу пробу (раствор свих реагенаса без екстракта/инкапсулата). За израду стандардне криве коришћена је глукоза (0,02-0,5 g/L), а резултати су изражени у процентима [%].

3.6. Метода одређивања садржаја укупних пептида

Садржај укупних пептида сувих екстраката мајчине душице добијених лиофилизацијом и спреј сушењем одређен је Бредфордовом методом, која се заснива на употреби Комази плаве боје за коју се везују пептиди (Kruger, 1994). Бредфордов реагенс је припремљен растварањем 50 mg Комази плаве боје у 25 mL 96% етанола и 50 mL 85% фосфорне киселине, уз додавање дестиловане воде до укупне запремине од 500 mL. Растворени екстракти (100 µL раствора концентрације 5 mg/mL) помешани су са 5 mL Бредфордовог реагенса и након 15 минута инкубације апсорбанца је измерена на 595 nm, у односу на слепу пробу (Бредфордов реагенс и дестилована вода). На основу апсорбанце познатих концентрација албумина (50-200 µg/mL) направљена је калибрациона крива, из које су очитане концентрације пептида у узорцима и резултати су изражени у процентима [%].

3.7. Хемијска карактеризација екстраката мајчине душице

3.7.1. Течна хроматографија-масена спектроскопија (*LC/DAD/MS*)

Идентификација индивидуалних фенолкарбоксилних киселина и флавоноида у одабраном течном екстракту мајчине душице (0,3 mm степен уситњености, 1:30 однос дрога:растварач, 50% етанол и 15 минута екстракције) изведена је методом течне хроматографије-масене спектроскопије (*LC/DAD/MS*) на уређају *Agilent MSD TOF* повезаним са *Agilent 1200 series HPLC* и реверзно-фазном аналитичком колоном *Lichrospher RP-18*, димензија 250 x 4 mm и величином честица од 5 µm (*Agilent*, Данска). Мобилна фаза А се састојала од 0,2% воденог раствора сирћетне киселине, док је мобилна фаза Б био ацетонитрил. Инјекциона запремина узорка је била 2 µL, при брзини елуирања од 1,4 mL/min, пратећи следећи градијент: 0-2 min 5-20% Б, 2-20 min 20-55% Б, 20-25 min 55-80% Б и 25-27 min 80-100% Б. Масени спектри су добијени употребом *Agilent ESI-MSD TOF*. Проток гаса (N_2) био је 12 L/min, при притиску од 45 psig и температури 350°C. За електроспреј јонизацију (*ESI*) параметри су били негативна јонска поларност, напон капиларе 4000 V, напон фрагментора 140 V, скимер 60 V и опсег маса 100-3200 m/z. Молекулска маса једињења је одређена мерењем њихових депротонованих молекулских јона, употребом *time-of-flight* (*TOF*) масеног спектрометра, док је молекулска формула одређена употребом *Molecular Feature Extractor* програма.

3.7.2. Високо ефикасна течна хроматографија (*HPLC*/*DAD*)

Квалитативна и квантитативна анализа одабраних екстраката мајчине душице је изведена методом високо ефикасне течне хроматографије (*HPLC*/*DAD*) на течном хроматографу *Agilent series 1200 RR HPLC* (*Agilent*, Данска) са *DAD* детектором и истом аналитичком колоном, мобилним фазама и градијентом елуирања као у *LC/DAD/MS* методи. Инјекциона запремина је била 10 µL, проток 0,8 mL/min и детекција на 280 и 330 nm. Течни екстракти мајчине душице подвргнути *HPLC*/*DAD* анализи били су одабрани на основу највећег садржаја полифенола након мацерације, екстракције на повишеној температури и ултразвучним таласима. Лиофилизовани екстракти (добијени мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури, ултразвучном сондом и микроталасима), чија ће спазмолитична активност бити испитана на изолованом илеуму пацова, такође су анализирани *HPLC*/*DAD* методом. Идентификација кафене и розмаринске киселине се заснивала на поређењу ретенционог времена и УВ спектра ових једињења и аутентичних стандарда, а флавоноиди су идентификовани према њиховим карактеристичним УВ спектрима. Одређивање садржаја кафене и розмаринске киселине је урађено употребом калибрационих крива аутентичних стандарда, док су идентификовани флавоноиди одређени као еквиваленти лутеолин 7-глукозида или апигенин 7-глукозида, а салвианолна киселина као еквивалент розмаринске киселине. Све анализе су урађене у трипликату и резултати су приказани у микрограмима по милилитру екстракта [µg/mL] за течне узорке и у микрограмима по милиграму екстракта [µg/mg] за лиофилизоване узорке.

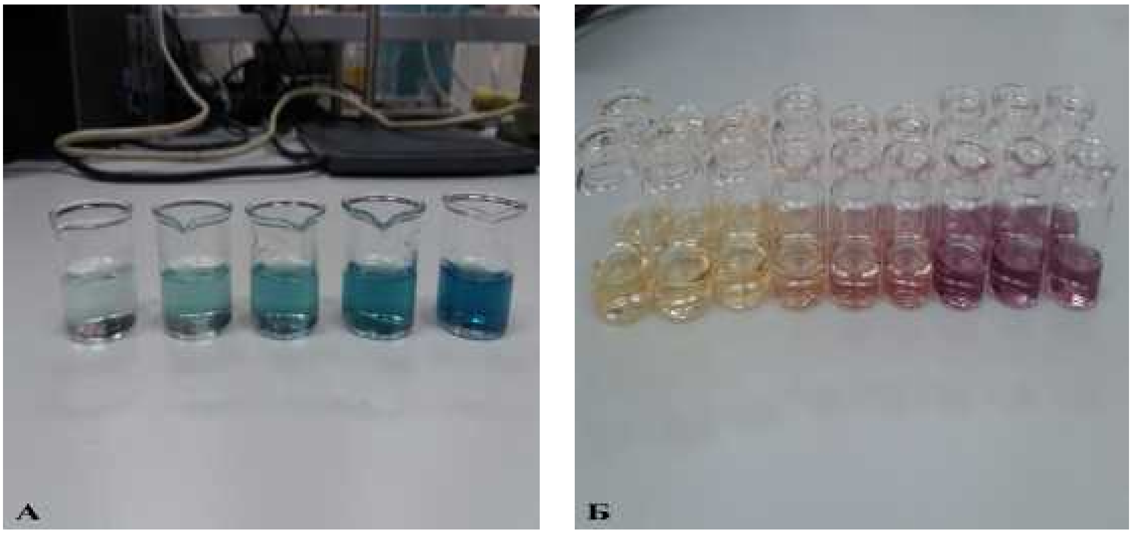
3.8. Методе испитивања антиоксидативне активности

3.8.1. *ABTS* метода

Прва метода коришћена за испитивање антиоксидативне активности етанолних, водених и сувих екстраката врсте *T. serpyllum* и њихових желатинских инкапсулата заснована је на редукцији плаво-зеленог радикал-катјона 2,2’-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине), односно $ABTS^{\cdot+}$ (слика 3.5А). Услед реакције полифенола са *ABTS* радикалом, тј. услед оксидације полифенола, долази до обезбојавања *ABTS* реагенса. Обезбојавање је интензивније што је садржај полифенола у узорку већи. Познато је да $ABTS^{\cdot+}$ настаје у великој количини под утицајем калијум-пероксодисулфата ($K_2S_2O_8$) као оксидујућег агенса (Re и сар., 1999). Зато је раствор *ABTS* радикала припремљен мешањем воденог раствора *ABTS* реагенса (0,019 g *ABTS* реагенса у 5 mL дестиловане воде) са 88 µL раствора $K_2S_2O_8$ (0,378 g $K_2S_2O_8$ у 10 mL дестиловане воде). Припремљен раствор, заштићен алуминијумском фолијом, остављен је 24 часа у фрижидеру. На дан анализе раствор је разблажен етанолом, тако да апсорбанца раствора износи 0,70 ± 0,02. Апсорбанце раствора и узорака су измерене на 734 nm. Прво је измерена апсорбанца контроле која се састојала од 2 mL раствора *ABTS* радикала и 20 µL растварача коришћеног за екстракцију (у случају екстракта) или воде (у случају желатинског инкапсулата). Затим је 20 µL узорка разблаженог одговарајућим растварачем (однос 1:10, 100 µL узорка и 900 µL растварача) помешано у кивети са 2 mL раствора *ABTS* реагенса и након 6 минута измерена је апсорбанца. Раствор 2 mL 96% етанола и 20 µL растварача употребљеног у екстракцији коришћен је као слепа проба. Сваки узорак је припремљен у три понављања. За израду калибрационе криве коришћен је *Trolox* (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-аскорбинска киселина) у концентрацији 0,2-1 mM. Резултати антиоксидативне активности течних екстраката су изражени као милимол *Trolox*-а по милилитру екстракта [mmol *Trolox*/mL], док су за лиофилизоване и спреј осушене екстракте и желатинске инкапсулате екстраката вредности представљене као милимол *Trolox*-а по граму сувог екстракта, односно инкапсулата [mmol *Trolox*/g].

3.8.2. *DPPH* метода

DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) метода је најчешће коришћен антиоксидативни тест, како због једноставности извођења експеримента, тако и због високе осетљивости. *DPPH*· је стабилни, тамнољубичасти радикал, чији је апсорпциони максимум на 517 nm. Приликом реакције *DPPH* радикала са другим радикалима, електронима, водониковим атомима или антиоксидансима, тамнољубичаста боја преко светлољубичасте прелази у жуту, у зависности од концентрације присутних антиоксиданаса (слика 3.5Б). Испитивање антиоксидативне активности екстраката/инкапсулата овом методом подразумева редукцију радикала од стране полифенолних антиоксидативних компонената присутних у узорку и обезбојавање љубичастог раствора (Miguel, 2010; Хоржић и сар., 2009). При извођењу поменутог теста прво је припремљен раствор *DPPH* у етанолу, концентрације око 37 mg/mL, тако да апсорбанца контроле износи око 0,8. Контрола подразумева 2,8 mL етанолног раствора *DPPH* и 200 µL растварача који је коришћен за добијање екстраката или 200 µL воде у случају желатинских инкапсулата екстраката. У кивети је одмерено 200 µL раствора узорка одговарајуће концентрације и потом додато 2,8 mL претходно припремљеног етанолног раствора *DPPH*. Након инкубације од 20 минута у мраку на собној температури измерена је апсорбанца контроле и апсорбанца узорка на 517 nm, у односу на слепу пробу (сви растварачи у одговарајућем односу без екстракта/инкапсулата и раствора *DPPH*). Сваки узорак је припремљен у три понављања. Проценат неутрализације је добијен на следећи начин: (А контроле - А узорка) x 100/А контроле. Резултат је изражен као IC_{50} [mg/mL], односно концентрација екстракта/инкапсулата која неутралише 50% слободног *DPPH* радикала. IC_{50} вредност се израчунава помоћу једначине криве, добијене као резултат зависности различитих концентрација једног екстракта/инкапсулата и израчунатог процента неутрализације за сваку концентрацију. Нижа IC_{50} вредност означава високу антиоксидативну активност.



Слика 3.5. Одређивање антиоксидативне активности (А) *ABTS* и (Б) *DPPH* методом

3.8.3. Тест инхибиције оксидативне деградације β-каротена

Антиоксидативна способност екстраката мајчине душице да инхибирају оксидативну деградацију β-каротена испитана је у емулзији β-каротен-линолна киселина (Barros и сар., 2007). Анализи су подвргнути лиофилизовани екстракти са највећим садржајем укупних полифенола из сваке методе екстракције. Прво је 2 mg β-каротена растворено у 10 mL хлороформа да би затим 2 mL тог раствора било пренето у тиквицу округлог дна (100 mL). Након што је хлороформ упарен на 40°C под вакуумом у уређају *Heizbad Hei-VAP* (*Heidolph*, Немачка) (слика 3.6А), 40 mg линолне киселине, 400 mg емулгатора *Tween 40* и 100 mL дестиловане воде додато је у тиквицу и емулзификација је обављена на магнетној мешалици *RTC basic* (*IKA*, Немачка). Аликвот емулзије (4,5 mL) је пренесен у епрувете које су садржале различите концентрације екстраката. Садржај епрувета је измешан на вортексу *Lab dancer* (*IKA*, Немачка) и апсорбанца у нултом времену је измерена на 470 nm, у односу на слепу пробу (сви реагенси осим β-каротена). Након инкубације на 50°C у воденом купатилу *Waterbath WNB* (*Memmert*, Немачка), апсорбанце узорака су мерене у интервалима од 20 минута, док се боја контролног узорка није променила. Инхибиција липидне пероксидације је израчуната следећом једначином: инхибиција = (садржај β-каротена након 2 сата/иницијални садржај β-каротена) x 100. Све анализе су урађене у трипликату и антиоксидативна активност је изражена као проценат инхибиције липидне пероксидације, односно проценат очуваног β-каротена [%].

3.9. Метода испитивања антимикробне активности

Минимална инхибиторна (*MIC*) и минимална бактерицидна/фунгицидна концентрација (*MBC/MFC*) лиофилизованих екстраката мајчине душице (узорци са највећим садржајем укупних полифенола из сваке методе екстракције) одређене су микродилуционим тестом (Петровић и сар., 2016; *CLSI*, 2015). Антимикробни потенцијал екстраката испитан је на четири Грам-позитивна и три Грам-негативна бактеријска соја, као и на једном соју гљивица: *B. cereus* 10876, *E. faecalis* 29212, *L. monocytogenes* 19115, *S. aureus* 6538, *E. coli* 25922, *S. enteritidis* 13076, *Y. enterocolitica* 27729 и *C. albicans* 10259. Испитивање је изведено у стерилним микротитарским плочама са 96 бунарчића (*Sarstedt*, Немачка). Лиофилизовани екстракти су растворени у 5% воденом раствору диметил сулфоксида да би се покрио опсег концентрација екстракта од 0,01 до 20 mg/mL, док је 0,0075% 2,3,5-трифенилтетразолин хлорид додат у суспензију као инидикатор раста микроорганизама. Позитивна контрола раста је био 5% диметил сулфоксид у одговарајућем медијуму. Плоче са бактеријским културама су инкубиране на 37°C у току 24 сата, а плоче са културом гљивица на 32°C током 48 сати. Након инкубације, најнижа концентрација екстракта у којој није био видљив раст микроорганизама (одсуство црвеног обојења) узета је као *MIC* вредност [mg/mL]. *MBC/MFC* је одређена серијском субкултивацијом узорака узетих из сваког бунарчића где није било раста микроорганизама. Узорци су пренети у микроплоче које су садржале одговарајући медијум. Највеће разблажење узорка, односно најнижа концентрација која није дала видљив раст микроорганизама узета је за *MBC/MFC* вредност [mg/mL]. Амоксицилин трихидрат и флуконазол су коришћени у паралелном експерименту за контролу осетљивости тестираних бактеријских и гљивичних култура.

3.10. Метода испитивања спазмолитичне активности

Испитивање спазмолитичне активности одабраних екстраката врсте *T. serpyllum* изведено је *in vitro* у три експериментална модела: спонтане контракције, контракције изазване ацетилхолином и калијум хлоридом (KCl) на изолованом илеуму пацова. Илеум представља завршни и најдужи део танког црева прекривен микровилима, које су задужене за апсорпцију хранљивих материја (Beckett и сар., 1981). Анализи су подвргнути лиофилизовани екстракти са највећим садржајем полифенола добијени мацерацијом, повишеном температуром, ултразвучном сондом и микроталасима. Екстракт који је показао најбољу спазмолитичну активност у претходна три модела испитан је у додатна два експериментална модела: утицај на контракције изазване баријум хлоридом ($BaCl_2$) и калцијум хлоридом ($CaCl_2$).

Све експерименталне процедуре на животињама су биле у складу са *European Council Directive, Directive 2010/63/EU* и одобрене од стране Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Нишу, Србија (број 12-2466-3). Албино пацови, соја Вистар, мушког пола (200-250 g) узети су из Научно-истраживачког центра Медицинског факултета Универзитета у Нишу, Србија. Животиње су чуване у стандардним лабораторијским условима, храњене стандардним гранулама, уз слободан приступ храни и води.

Животиње су прво анестезиране етром и из абдомена је исечен дистални део илеума дугачак 2 cm. Затим је изоловани илеум постављен у купатило за изоловане органе (10 mL), у Тиродов раствор (37°C, pH 7,4, мешавина 5% угљен-диоксида у кисеонику), између две кукице од нерђајућег челика. Промене интестиналне активности су измерене употребом система *TSZ-04-E, Spell Iso* (*Experimetria Ltd*, Мађарска). Растворени лиофилизовани екстракти мајчине душице и контрола су додати директно у купатило за изоловани орган. Шест сегмената изолованог илеума је коришћено за сваки експеримент (Ostad и сар., 2001). Први део експеримента се односио на спонтане, ритмичне контракције илеума пацова. Након периода стабилизације илеум је третиран одабраним екстрактима мајчине душице (0,01-3 mg/mL). Папаверин је коришћен као позитивна контрола (0,01-3 mg/mL). Релаксирајући ефекат екстраката је изражен као проценат контролне контрактилности без екстракта [%]. У другом делу експеримента, контракције илеума су стимулисане повећавањем концентрације ацетилхолина (5-1500 nM), који је додаван кумулативно, до добијања криве максималне контрактилности. Контракције су регистроване у присуству екстракта мајчине душице (1 и 3 mg/mL), док је атропин коришћен као позитивна контрола (140 nM). У трећем делу експеримента, контракције илеума су индуковане раствором KCl (80 mM), након чега су екстракти додавани кумулативно у купатило за изоловане органе (0,01-3 mg/mL). Верапамил је коришћен као позитивна контрола (0,01-3 mg/mL). Релаксација изолованог илеума у присуству екстракта или антагониста изражена је као проценат максималне контрактилности индуковане ацетилхолином или KCl [%]. Након сваког дела експеримента ткиво је испрано свежим Тиродовим раствором и остављено да се адаптира у току 10 минута. Екстракт са најбољом спазмолитичном активношћу испитан је у две додатне анализе: утицај екстракта, у концентрацији 1 и 3 mg/mL, на контракције изазване $BaCl_2$ и $CaCl_2$. $BaCl_2$ је коришћен за индукцију контракција у концентрацији 3-900 µM, док је концентрација $CaCl_2$ коришћена за изазивање контракција била 0,01-3 mM. Приликом испитивања утицаја екстракта на контракције индуковане $CaCl_2$, као позитивна контрола коришћен је верапамил (0,01-3 mg/mL). Релаксација изолованог сегмента танког црева пацова у присуству екстракта или антагониста изражена је као проценат максималне контрактилности индуковане $BaCl_2$ или $CaCl_2$ [%].

3.11. Методе инкапсулације екстраката мајчине душице у желатин

3.11.1. Процес лиофилизације

Течни екстракти са највишим приносом полифенола из свих пет метода екстракције (мацерација, екстракција на повишеној температури, у ултразвучном купатилу, ултразвучном сондом и микроталасима) подвргнути су процесу лиофилизације. Прво је течним екстрактима уклоњен етанол употребом вакуум упаривача *Hei-VAP Advantage* (*Heidolph*, Немачка), при температури од 40-45°C, притиску од 50 mbar и брзини ротације од 150 обртаја у минути (слика 3.6А). Поменути течни екстракти планирани за инкапсулацију помешани су са 5%

желатина (50 mL екстракта из ког је уклоњен етанол и 2,5 g желатина) и смеша је хомогенизована на магнетној мешалици *RTC basic* (*IKA*, Немачка), при температури од 40°C. Затим су чисти екстракти и екстракти са 5% желатина замрзнути на -80°C у току једног сата у уређају *LAB11/EL19LT* (*Elcold*, Данска). Поступком лиофилизације у уређају *Beta 2-8 LD plus* (*Christ*, Немачка), на -75°C, при притиску од 0,011 mbar, у периоду од 24 часа, затим на -65°C, при притиску од 0,054 mbar, у додатном сату, добијени су суви екстракти и желатински инкапсулати екстраката мајчине душице (слика 3.6Б).

3.11.2. Процес спреј сушења

Процесу спреј сушења су подвргнути исти екстракти и екстракти са желатином као и у процесу лиофилизације, припремљени на идентичан, претходно описан начин. Спреј сушење чистих екстраката и екстраката са 5% желатина обављено је на уређају *Mini Spray Dryer B-290* (*Büchi*, Швајцарска), при улазној температури од 140°C, излазној температури од 72-75°C, протоку течности од 8 mL/min и протоку гаса од 600 L/h (слика 3.6В).

Слика 3.6. (А) Вакуум упаривач, (Б) лиофилизатор и (В) уређај за спреј сушење

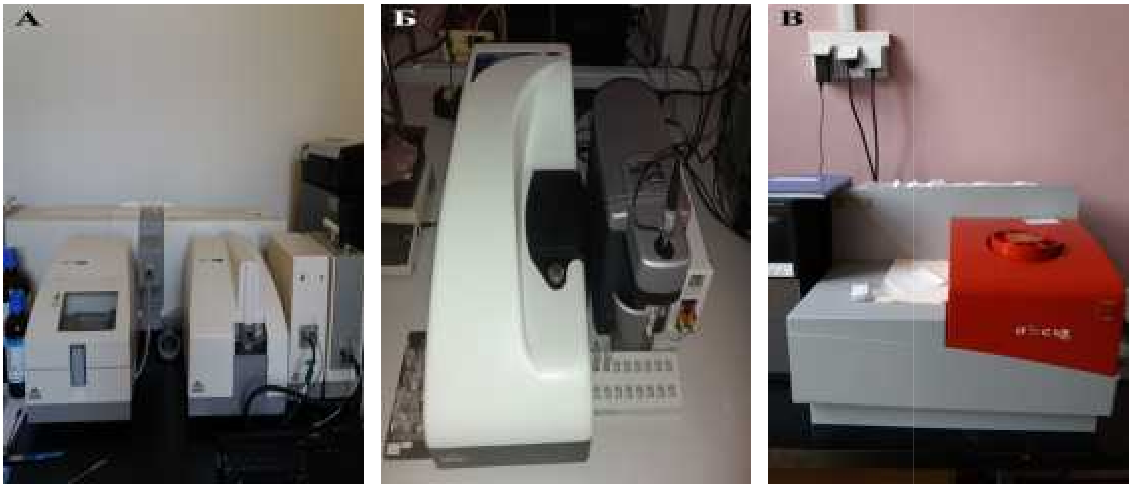
3.12. Карактеризација сувих и инкапсулираних екстраката мајчине душице

3.12.1. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (*FTIR*)

У циљу испитивања утицаја методе екстракције и методе сушења/инкапсулације на хемијске карактеристике сувих екстраката и желатинских инкапсулата екстраката примењена је метода инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (енгл. *Fourier transform infrared spectroscopy*, *FTIR*). *FTIR* спектри лиофилизованих и спреј осушених екстраката мајчине душице, желатина и инкапсулата екстраката, формирани су применом *FTIR* спектрофотометра *IRAffinity-1* (*Shimadzu*, Јапан). Прво су узорци припремљени као KBr пелете на хидрауличној преси и потом анализирани при резолуцији од 4 cm^{-1} и у опсегу 4000-500 cm^{-1}.

3.12.2. Одређивање расподеле величина честица и зета потенцијала

Расподела величина честица лиофилизованих и спреј осушених желатинских инкапсулата екстраката мајчине душице одређена је методом дифракције ласерске светлости на уређају *Mastersizer 2000* (*Malvern*, Уједињено Краљевство), уз коришћење сувих узорака. Резултати су представљени преко запреминских пречника у микрометрима [μm] (слика 3.7А).



Слика 3.7. (А) уређај за одређивање величине честица, (Б) уређај за одређивање зета потенцијала и (В) уређај за испитивање термичких карактеристика

Фотон корелациона спектроскопија примењена је у циљу одређивања зета потенцијала лиофилизованих и спреј осушених чистих екстраката врсте *T. serpyllum* и њихових желатинских инкапсулата у уређају *Zetasizer* (*Malvern*, Уједињено Краљевство) повезаним са софтверским пакетом *Zetasizer Software* (*Malvern*, Уједињено Краљевство) (слика 3.7Б). Мерење је изведено у воденом медијуму на температури од 25ºC у капиларним ћелијама, *DTS 1070* и резултати су изражени у миливолтима [mV].

3.12.3. Скенирајућа електронска микроскопија (*SEM*)

Морфологија носача коришћеног за инкапсулацију, тј. желатина, чистих екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата (лиофилизованих и спреј осушених) испитана је применом скенирајуће електронске микроскопије (енгл. *scanning elektron mycroscopy*, *SEM*) на микроскопу *JSM-6390LV* (*JEOL*, Јапан), уз претходно наношење злата на уређају *SCD 005* (*BAL-TEC*, Немачка). Том приликом коришћени су различити напони (10 и 15 kV) и увеличања (200, 1000 и 5000 пута), што је наглашено на микрографијама.

3.12.4. Одређивање насипне густине и растворљивости сувих екстраката и инкапсулата

Насипна густина лиофилизованих и спреј осушених екстраката и инкапсулата одређена је након што је маса узорка (30 g) подељена запремином коју је узорак заузео у мензури од 100 mL (Европска фармакопеја, 2014; Калушевић и сар., 2017). Приликом испитивања растворљивости сувих екстраката и инкапсулата прво је растворена маса узорка (0,5 g) у 50 mL дестиловане воде, уз константно мешање на магнетној мешалици *RTC basic* (*IKA*, Немачка) на собној температури у току 30 минута при брзини од 150 обртаја у минути (Европска фармакопеја, 2014). Након тога је сваки узорак центрифугиран 5 минута при брзини од 3000 обртаја у минути у уређају *Centrifuge 5430R* (*Eppendorf*, Немачка). Затим је супернатант осушен у сушници *Memmert 30-1060* (*Memmert GmbH*, Немачка) на 105ºC до константне масе (око 2 сата). На основу добијене и почетне масе узорака одређена је растворљивост екстраката и желатинских инкапсулата екстраката и резултати су изражени у процентима [%].

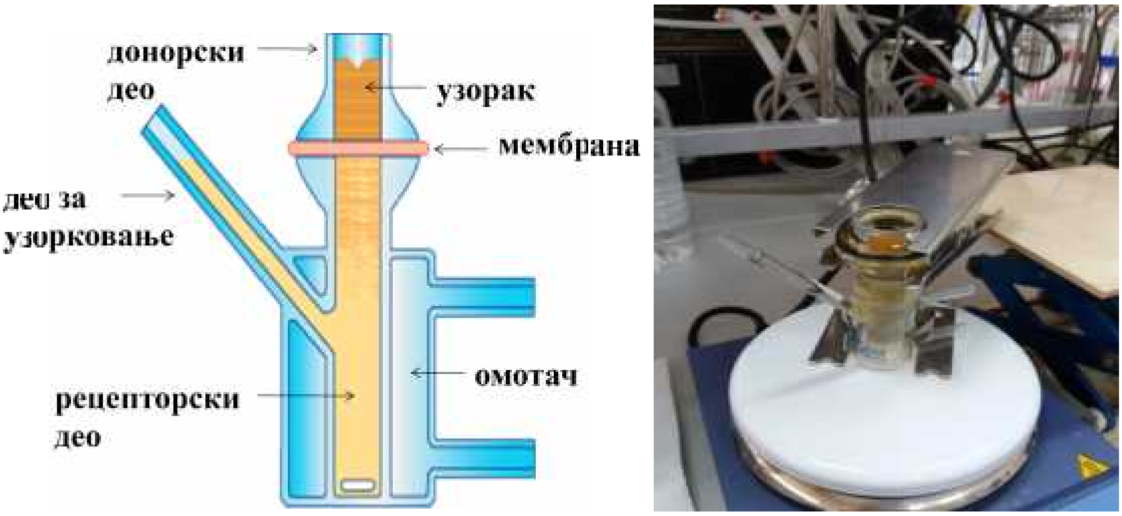
3.12.5. Диференцијална скенирајућа калориметрија (*DSC*)

Термичке карактеристике лиофилизованих и спреј осушених узорака (желатина, чистих екстраката добијених повишеном температуром и микроталасима и њихових желатинских инкапсулата) испитане су применом диференцијалне скенирајуће калориметрије (енгл. *differential scanning calorimetry*, *DSC*). У алуминијумским посудама (30 µL) одмерено је 0,5-2 mg сувог узорка. Посуде су херметички затворене и извршена је анализа узорака у уређају *DSC131 Evo* (*SETARAM Instrumentation*, Француска) који је претходно калибрисан индијумом (слика 3.7B). Празна алуминијумска посуда коришћена је као референтни узорак. У исто време су референтна посуда и посуда са узорком постављене у комору уређаја и термостатиране 5 минута на 30°C. Затим је вршено загревање коморе од 30 до 300°C константном брзином од 10°C/min. Струја азота имала је проток од 20 mL/min. Базна линија је одређена када су обе алуминијумске посуде биле празне и подвргнуте истим условима. Одузимање базне линије и одређивање вредности енталпије [J/g] изведено је употребом софтверског програма *CALISTO PROCESSING*.

3.12.6. Испитивање кинетике отпуштања полифенола, одређивање коефицијента дифузије и отпора

Кинетика отпуштања полифенола из лиофилизованих и спреј осушених екстраката мајчине душице добијених повишеном температуром и њихових желатинских инкапсулата испитана је у стандардној Францовој дифузионој ћелији (*PermeGear*, САД) (слика 3.8).

Четири репрезентативна узорка (са највећим садржајем полифенола) изабрана су за *in vitro* праћење отпуштања полифенолних компонената у водени медијум. Експеримент је изведен на собној температури и на 37°C.



Слика 3.8. Францова дифузиона ћелија

Донорски и рецепторски део ћелије били су раздвојени ацетатно-целулозном мембраном (величина пора 0,2 μm, пречник 47 mm, дебљина 0,21 mm). Рецепторски део, чија је запремина 20 mL, био је опремљен магнетним зрном како би се раствор константно мешао. Пре почетка сваког експеримента ћелија је термостатирана у току 30 минута на собној температури, односно на 37°C, уз употребу дестиловане воде, која је коришћена и као флуид у ком се прати отпуштање полифенола. С обзиром на то да мембрана има период прилагођавања условима у којима се налази, неопходно је урадити њено термостатирање како би се избегао овај период у току експеримента. У донорски део је унето 1 mL раствора екстракта (50 mg/mL), у случају чистог екстракта, и око 1 g гела (200 mg/mL), у случају желатинског инкапсулата екстракта, док је рецепторски део био испуњен дестилованом водом. Током експеримента узимано је 800 μL узорка из рецепторског дела у различитим временским размацима, при чему је иста количина дестиловане воде враћана у рецепторски део ћелије. Узорци из рецепторског дела су узимани различитом динамиком зависно од дужине експеримента. Кинетика отпуштања полифенола из чистих екстраката праћена је током 4 сата, док је отпуштање полифенола из желатинских инкапсулата праћено 24 сата. Концентрација полифенола у узорцима одређена је спектрофотометријски претходно описаном Фолин-Чиклтеу методом (поглавље 3.3). Добијени резултати су даље анализирани како би се одредили коефицијенти дифузије и отпори преносу масе полифенола из екстраката и њихових желатинских инкапсулата.

3.13. Статистичка анализа

Статистичка обрада свих података урађена је у статистичком софтверу *STATISTICA 7.0*. Подаци у табелама и графицима су приказани као средња вредност ± стандардна девијација, док су разлике сматране статистички значајним при $p < 0,05$.

Процес екстракције полифенола применом мацерације, повишене температуре и ултразвучних таласа оптимизован је употребом анализе варијансе (*one-way ANOVA*) праћене вишеструким интервалним Данкановим тестом и експерименталног дизајна, *full factorial design*, у циљу добијања највећег приноса полифенола из хербе мајчине душице. Независне варијабле су биле степен уситњености, однос дрога:растварач, врста растварача, време и метода екстракције, док је садржај укупних полифенола био зависна варијабла. Прво су резултати обрађени употребом анализе варијансе, у циљу испитивања утицаја оперативних услова на принос екстракције. Затим је коришћен вишеструки интервални Данканов тест како би се испитале разлике између аритметичких средина ($p < 0,05$). *One-way ANOVA*, праћена Данкановим тестом, примењена је у циљу испитивања значајности утицаја услова екстракције (степен уситњености, однос дрога:растварач, врста растварача, време и метода екстракције) на принос укупних полифенола у екстрактима ($p < 0,05$). Два нивоа сваког испитаног фактора која су дала највише вредности укупних полифенола била су изабрана за даљи експериментални дизајн. Експериментални дизајн, као скуп математичких и статистичких алатки је користан у развоју, унапређењу и оптимизацији процеса екстракције, у ком на принос полифенола (зависна варијабла) утиче неколико фактора (независне варијабле). Поред тога, експериментални дизајн омогућава испитивање интеракција између фактора, са циљем да се постигне најефикаснија оптимизација процеса екстракције и последично повећање садржаја полифенола у екстрактима врсте *T. serpyllum*.

У циљу уштеде материјала, енергије и времена, оптимизација процеса екстракције микроталасима урађена је применом другачије статистичке методе. Експериментални дизајн, *central composite design*, са 16 експерименталних тачака коришћен је за испитивање везе између зависних (одговор) и независних варијабли (фактори), као и за одређивање оптималних услова микроталасне екстракције. Наиме, фактори коришћени приликом оптимизације процеса микроталасне екстракције били су однос дрога:растварач, врста растварача и време екстракције, при чему је сваки фактор кодиран на пет нивоа према следећој једначини:

$$X_i = \frac{x_i - x_o}{\Delta x_i} \qquad (3.1)$$

где је X_i кодирана вредност варијабле; x_i реална вредност варијабле; x_o реална вредност независне варијабле у централној тачки; Δx_i степен промене варијабле. Зависне варијабле су биле садржај укупних полифенола, садржај укупних флавоноида и антиоксидативна активност одређена *ABTS* и *DPPH* тестом и њихове вредности су измерене за сваку експерименталну тачку. Модел полинома другог реда коришћен је за проверу поклапања резултата и за предвиђање одговора:

$$Y = \beta o + \sum_{i=1}^{n} \beta_{ii} X_i + \sum_{i=1}^{n} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i<j}}^{n} \sum_{j=2}^{n} \beta_{ii} X_i X_j \qquad (3.2)$$

где су X_1, X_2, …, X_n фактори, Y одговор, β_o, β_i, β_{ii} и β_{ij} регресиони коефицијенти исечка, линеарног, квадратног и модела интеракција. Ниво поклапања је процењен применом коефицијента корелације R^2.

Утврђивање статистичке значајности разлика у резултатима добијеним у свим осталим примењеним методама (одређивање садржаја укупних флавоноида, шећера и пептида, антиоксидативне и спазмолитичне активности екстраката, приноса, зета потенцијала, насипне густине и растворљивости сувих екстраката и инкапсулата, величине честица инкапсулата) извршено је употребом анализе варијансе (*one-way ANOVA*) и Данкановог теста.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Оптимизација процеса екстракције мајчине душице

Приликом оптимизације процеса мацерације, екстракције на повишеној температури и ултразвучним таласима, у циљу добијања екстраката мајчине душице богатих полифенолима, коришћена је анализа варијансе (*one-way ANOVA*) праћена Данкановим тестом како би се одредила значајност утицаја услова екстракције на принос укупних полифенола (табела 4.1).

Табела 4.1. Прелиминарни резултати утицаја нивоа испитаних фактора на садржај укупних полифенола у екстрактима мајчине душице, добијених мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и ултразвучним таласима

		Садржај укупних полифенола [mg *GAE*/L]			
Фактор	Ниво	Технике екстракције			
		Мацерација	**Повишена температура**	**Ултразвучно купатило**	**Ултразвучна сонда**
Степен уситњености [mm]	0,3	$18{,}1 \pm 4{,}6^{а}$	$22{,}1 \pm 4{,}8^{а}$	$21{,}7 \pm 5{,}8^{а}$	$22{,}8 \pm 6{,}2^{а}$
	0,7	$17{,}1 \pm 4{,}5^{б}$	$19{,}0 \pm 4{,}0^{б}$	$18{,}5 \pm 5{,}5^{б}$	$21{,}5 \pm 4{,}5^{а}$
	1,5	$15{,}0 \pm 3{,}2^{в}$	$18{,}3 \pm 4{,}6^{б}$	$17{,}5 \pm 4{,}8^{б}$	$21{,}2 \pm 6{,}4^{а}$
Однос дрога: растварач	1:10	$13{,}7 \pm 2{,}9^{в}$	$15{,}1 \pm 2{,}3^{в}$	$16{,}0 \pm 4{,}0^{в}$	$16{,}9 \pm 2{,}8^{в}$
	1:20	$17{,}7 \pm 3{,}8^{б}$	$20{,}6 \pm 3{,}1^{б}$	$19{,}6 \pm 5{,}4^{б}$	$23{,}1 \pm 4{,}4^{б}$
	1:30	$18{,}8 \pm 4{,}4^{а}$	$23{,}6 \pm 4{,}1^{а}$	$22{,}1 \pm 5{,}8^{а}$	$27{,}5 \pm 4{,}1^{а}$
Врста растварача [% етанола]	30	$17{,}3 \pm 3{,}6^{б}$	$19{,}3 \pm 4{,}0^{б}$	$20{,}9 \pm 4{,}8^{а}$	$22{,}5 \pm 5{,}4^{б}$
	50	$19{,}6 \pm 4{,}8^{а}$	$22{,}6 \pm 5{,}4^{а}$	$22{,}1 \pm 3{,}0^{а}$	$24{,}9 \pm 4{,}8^{а}$
	70	$15{,}3 \pm 4{,}0^{в}$	$19{,}2 \pm 4{,}1^{б}$	$21{,}6 \pm 5{,}2^{а}$	$22{,}2 \pm 4{,}4^{б}$
	вода	$14{,}8 \pm 3{,}3^{в}$	$18{,}2 \pm 4{,}2^{в}$	$15{,}3 \pm 2{,}2^{б}$	$18{,}6 \pm 4{,}2^{в}$
Време екстракције [минути]	5	$13{,}1 \pm 2{,}4^{б}$	$18{,}4 \pm 4{,}2^{б}$	$17{,}4 \pm 5{,}1^{в}$	$21{,}6 \pm 5{,}4^{а}$
	15	$17{,}0 \pm 4{,}3^{а}$	$20{,}6 \pm 4{,}6^{а}$	$19{,}2 \pm 5{,}1^{б}$	$23{,}1 \pm 6{,}2^{а}$
	30	$17{,}8 \pm 4{,}2^{а}$	$20{,}3 \pm 5{,}2^{а}$	$21{,}1 \pm 6{,}1^{а}$	$22{,}8 \pm 5{,}7^{а}$
	60	$18{,}1 \pm 4{,}1^{а}$	-	-	-
	90	$17{,}6 \pm 4{,}4^{а}$	-	-	-

Вредности са истим словом (а-в) у експоненту у свакој колони показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0{,}05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест); *GAE*, еквивалент галне киселине

Независне варијабле (фактори) биле су степен уситњености биљне дроге (0,3, 0,7 и 1,5 mm), однос дрога:растварач (1:10, 1:20 и 1:30), врста растварача (30, 50 и 70% етанол и вода) и време екстракције (5, 15, 30, 60 и 90 минута за мацерацију и 5, 15 и 30 минута за екстракцију на повишеној температури и ултразвучним таласима). Два нивоа сваког посматраног фактора која су дала највећи принос екстракције, односно највећи садржај полифенола, изабрана су за следећи корак статистичке анализе, експериментални дизајн – *full factorial design*. Додатно, *one-way ANOVA* и тродимензионални дијаграми коришћени су да покажу утицај одабраних фактора поменутих процеса екстракције на концентрацију укупних флавоноида.

Са друге стране, приликом оптимизације процеса екстракције микроталасима, поново у циљу добијања екстракта мајчине душице са највећим садржајем полифенола, коришћен је експериментални дизајн, *central composite design*, и три фактора: однос дрога:растварач (X_1: 1:10-1:40), врста растварача (X_2: 0-60% етанола) и време екстракције (X_3: 10-190 секунди), при чему је сваки фактор кодиран на пет нивоа (табела 4.2).

Табела 4.2. Праве и кодиране вредности фактора у оптимизацији микроталасне екстракције мајчине душице (модел одзивне површине)

	Фактори		
	Однос дрога:растварач X_1	**Врста растварача [% етанола] X_2**	**Време екстракције [секунде] X_3**
Кодови		Праве вредности	
-1,68	1:40	0	10
-1	1:25	12	46
0	1:16	30	100
1	1:12	48	154
1,68	1:10	60	190

Такође, анализа варијансе и вишеструки интервални Данканов тест примењени су у циљу испитивања утицаја технике екстракције на садржај укупних полифенола.

4.1.1. Утицај степена уситњености на садржај укупних полифенола

Степен уситњености биљног материјала значајно утиче како на резултате и принос екстракције, тако и на појаву техничких проблема у току самог процеса екстракције и процеса филтрирања (Вулета и сар., 2012; Dandena и сар., 2014). Утицај величине честица хербе мајчине душице (0,3, 0,7 и 1,5 mm) на садржај укупних полифенола у свим методама екстракције, осим у екстракцији микроталасима, приказан је у табели 4.1. Највише вредности укупних полифенола у екстрактима постигнуте су применом честица дијаметра 0,3 mm, у све четири технике екстракције (мацерација – 18,1 mg *GAE*/L; повишена температура – 22,1 mg *GAE*/L; ултразвучно купатило – 21,7 mg *GAE*/L; ултразвучна сонда – 22,8 mg *GAE*/L), док је најнижи принос екстракције добијен употребом степена уситњености 1,5 mm. У екстрактима добијеним мацерацијом примећено је статистички значајно повећање садржаја укупних полифенола са смањењем величине честица. При екстракцији на повишеној температури и у ултразвучном купатилу најмање честице су дале екстракте са статистички значајно већим садржајем полифенола, док се екстракти добијени применом степена уситњености 0,7 и 1,5 mm нису статистички разликовали у приносу полифенола. У екстракцији ултразвучном сондом није примећена статистички значајна разлика између анализираних нивоа овог фактора. Такође, приликом екстракције ултразвучном сондом слабијих карактеристика, мањим титанијумским наставком и нижом амплитудом (процесор од 200 W, наставак од 13 mm и 65% амплитуда), степен уситњености није имао статистички значајан утицај на садржај полифенола (0,3 mm – 17,5 mg *GAE*/L; 0,7 mm – 17,6 mg *GAE*/L; 1,5 mm – 16,7 mg *GAE*/L). Уколико интерни пренос масе у односу на екстерни представља доминантан механизам у процесу екстракције, степен уситњености биљног материјала може значајно утицати на принос екстракције (Rai и сар., 2016). Највећа концентрација полифенола у екстрактима се углавном постиже употребом најфинијих честица, зато што значајним разарањем структуре биљног материјала долази до повећања активне површине и бољег контакта биљне дроге и растварача (Silva и сар., 2007). Према литературним подацима, када се максималне вредности укупних полифенола добијају употребом највишег степена уситњености, односно када постоји највећи број разорених ћелија, то указује да конвективни пренос масе има доминантан ефекат (Милошевић и сар., 2011). Такође, важно је напоменути да расподела полифенола унутар биљног ткива, ћелија и ћелијских структура није униформна (Naczk и Shahidi, 2006). Повећањем броја разорених биљних ћелија долази до пораста коефицијента дифузије и повећања брзине процеса екстракције. Тако се већим степеном уситњености за краће време добија боље исцрпљење биљног материјала (Вулета и сар., 2012; Galván D'Alessandro и сар., 2012). Међутим, употреба веома малих фрагмената може узроковати техничке проблеме у току мешања и каснијег филтрирања екстраката. Зато је важно испитати величину честица која ће обезбедити најбољи принос екстракције, а уједно спречити појаву техничких проблема (Dandena и сар., 2014; Silva и сар., 2007). Претходна истраживања екстракције полифенола показују да смањењем величине честица листа врсте *Ginkgo biloba*, коре врсте *Punica granatum* и семена врсте *Vitis vinifera* долази до повећања садржаја укупних полифенола (Милошевић и сар., 2011; Pinelo и сар., 2005; Çam и Hişil, 2010). Додатно, температура и величина честица, као и њихова интеракција, имају значајан утицај на кинетику екстракције (Silva и сар., 2007). Према литератури, повећањем температуре бележи се повећање садржаја полифенола током екстракције најмањих честица љуспи врсте *Petroselinum crispum* и семена врсте *V. vinifera* (Буцић-Којић и сар., 2007; Luthria, 2008). Приликом полифенолне екстракције плода врсте *Aronia melanocarpa* у ултразвучном купатилу највећи садржај полифенола је добијен применом најситнијих честица (Dandena и сар., 2014). Као што је претходно поменуто, само у екстракцији ултразвучном сондом није постојала статистички значајна разлика између испитаних нивоа степена уситњености (приликом примене обе поменуте врсте сонде). Ова појава може бити објашњена механизмом екстракције ултразвучним таласима велике амплитуде и фреквенције, који укључује смањење величине честица биљног материјала (око 5%), оштећење ћелијског зида и модификацију микроструктуре, олакшан улазак растварача у биљне ћелије и тренутни излазак полифенолних компонената у екстракциони медијум, узрокован кавитацијом и термалним ефектима, без обзира на иницијалну величину честица (Both и сар., 2014; Deng и сар., 2015).

Узимајући у обзир да су највеће вредности садржаја укупних полифенола постигнуте употребом степена уситњености 0,3 mm, потом употребом 0,7 mm, ови нивои фактора су изабрани за даљи *full factorial design* у оптимизацији мацерације, екстракције на повишеној температури и ултразвучним таласима.

Приликом оптимизације процеса екстракције микроталасима коришћен је другачији статистички приступ, тако да је у прелиминарној анализи (*one-way ANOVA* и Данканов тест) испитан утицај степена уситњености (0,3, 0,7 и 1,5 mm) на принос полифенола мајчине душице, док су однос дрога:растварач, врста растварача и време били константни (1:30, 50% етанол и 15 секунди). Резултати су показали да не постоји статистички значајна разлика у концентрацији полифенола у екстрактима добијеним употребом различитих величина честица биљног материјала (0,3 mm – 35,0 mg *GAE*/L; 0,7 mm – 34,8 mg *GAE*/L; 1,5 mm – 34,5 mg *GAE*/L), тако да је за даљу оптимизацију процеса микроталасне екстракције коришћен степен уситњености 0,3 mm. Према литературним подацима, приликом микроталасне екстракције врсте *Pinus pinaster*, у приносу полифенола није постојала статистички значајна разлика између честица величине 0,4-1 mm, док је највећи садржај полифенола добијен применом најмањих честица, < 0,1 mm (Chupin и сар., 2015). Литературни подаци такође показују да се најбоља ефикасност микроталасне екстракције полифенола листа врсте *Hippophae rhamnoides* и плода врсте *A. melanocarpa* постиже степеном уситњености мањим од 0,5 mm (Asofiei и сар., 2016; Dandena и сар., 2014).

4.1.2. Утицај односа дрога:растварач на садржај укупних полифенола

С обзиром на то да циљ екстракције може да буде екстракција укупних екстрактивних материја или екстракција одређене компоненте, потребно је дефинисати однос дрога:растварач и дужину екстракције како би принос жељене компоненте био највећи (Вулета и сар., 2012). Резултати утицаја различитих односа дрога:растварач (1:10, 1:20 и 1:30) на ефикасност мацерације, екстракције на повишеној температури и ултразвучним таласима приказани су у табели 4.1. Максималан принос полифенола је постигнут применом односа дрога:растварач 1:30 у свим претходно поменутим техникама екстракције (мацерација – 18,8 mg

GAE/L; повишена температура – 23,6 mg *GAE*/L; ултразвучно купатило – 22,1 mg *GAE*/L; ултразвучна сонда – 27,5 mg *GAE*/L). У свакој поменутој техници принос полифенола је био нижи са смањењем запремине растварача (1:10 < 1:20 < 1:30). Разлог може бити у великој количини биљне дроге (код односа 1:10), која узрокује повећање вискозитета и последично инхибира дифузију полифенола кроз екстракциони медијум (Вулета и сар., 2012). Исти тренд је примећен и у екстракцији ултразвучном сондом слабијих карактеристика, са мањим титанијумским наставком и нижом амплитудом, где је однос дрога:растварач такође статистички значајно утицао на принос екстракције (1:10 – 13,5 mg *GAE*/L; 1:20 – 16,6 mg *GAE*/L; 1:30 – 20,1 mg *GAE*/L). Резултати експеримента показују да се сви тестирани нивои односа дрога:растварач у све четири поменуте методе екстракције статистички значајно разликују. Ове разлике у екстрактима добијеним мацерацијом могу бити објашњене високом растворљивошћу полифенола у водено-алкохолним растворима, посебно када су у гликозидној форми, што омогућава већи степен дифузије при примени веће количине растварача (Дент и сар., 2013; Ковачевић, 2004; Mustafa и Turner, 2011). Иначе, један од недостатака мацерације као технике екстракције јесте потреба за већом запремином растварача да би се постигао бољи принос екстракције (Вулета и сар., 2012). У екстракцији на повишеној температури, већи садржај полифенола у случају веће количине растварача може бити објашњен чињеницом да висока температура узрокује смањење вискозитета растварача, побољшава дифузију и пренос масе молекула, чиме се убрзава екстракција, интензивира ослобађање полифенола у екстракциони медијум и брзо достиже засићење растварача (Mustafa и Turner, 2011). Даље, статистичке разлике између односа дроге и растварача у ултразвучној екстракцији (примена ултразвучног купатила и обе ултразвучне сонде) највероватније постоје због разарања биљног ткива проузрокованог ултразвучним таласима. Према Paz и сар. (2015), узрокујући промене у биљном материјалу (оштећење ћелијског зида, смањење величине честица и повећање контактне површине), ултразвук повећава и пренос масе, продирање растварача у ћелије, дифузију секундарних метаболита и тиме последично доводи до бржег засићења медијума. Са друге стране, у случају присуства велике количине биљног материјала (однос 1:10) долази до слабљења ултразвучних таласа и смањења њиховог простирања, чиме је активни део ограничен само на зону у близини ултразвучне сонде (Wang и Weller, 2006). У све четири претходно поменуте методе екстракције, повећање односа дрога:растварач спречава засићење екстракционог медијума и тиме повећава принос екстракције. Неколико студија је показало да се садржај укупних полифенола брзо повећава са повећањем односа дроге и растварача, како на собној температури, тако и употребом повишене температуре или ултразвучних таласа (Буцић-Којић и сар., 2007; Galván D’Alessandro и сар., 2012; Yang и Zhang, 2008; Paz и сар., 2015; Ћујић и сар., 2016).

Будући да је критеријум за избор нивоа фактора за наредне статистичке анализе у оптимизацији мацерације, екстракције на повишеној температури и ултразвучним таласима био максималан садржај укупних полифенола, односи 1:20 и 1:30 су били укључени у наредни експериментални дизајн.

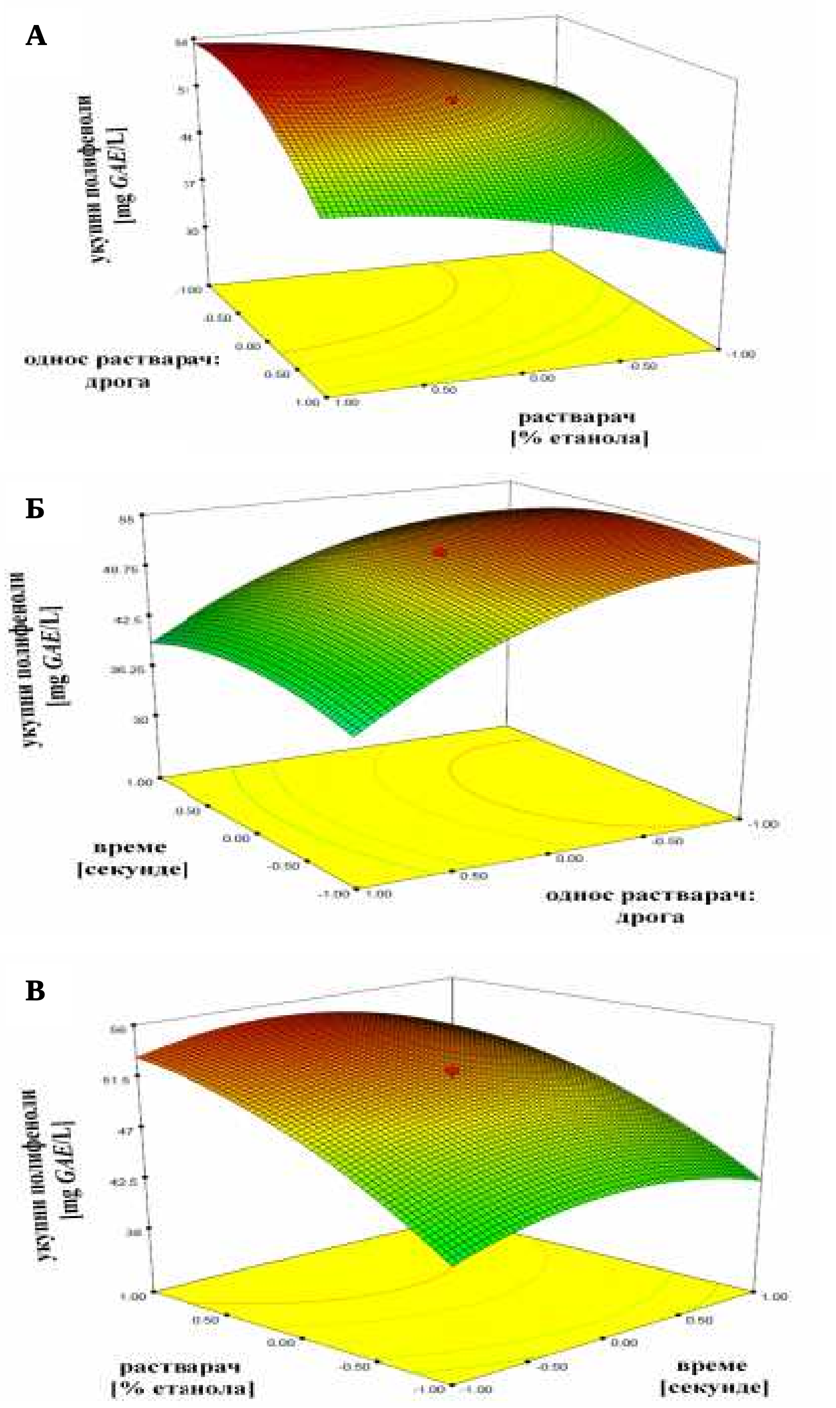
Утицај односа дрога:растварач, врсте растварача и времена на садржај полифенола у оптимизацији процеса микроталасне екстракције мајчине душице процењен је помоћу регресионих коефицијената и статистичке значајности приказаних у табели 4.3. Коефицијенти регресије су добијени применом методе најмањих квадрата. Примењен математички модел је био адекватан и високо значајан ($p < 0,01$), са великом вредношћу коефицијента корелације ($R^2 = 0,993$).

Табела 4.3. Коефицијенти регресије и статистичке значајности у оптимизацији микроталасне екстракције мајчине душице

Фактори		**Коефицијент регресије**	**СД**	***p***
Садржај укупних полифенола		51,7	1,7	0,0007
Линеарни модел	X_1	-6,340	0,640	< 0,0001
	X_2	5,100	0,640	0,0002
	X_3	-0,300	0,640	0,6525
Квадратни модел	X_1^2	-3,780	0,770	0,0028
	X_2^2	-2,040	0,770	0,0387
	X_3^2	-2,400	0,770	0,2110
Интеракције	X_1X_2	0,011	0,830	0,9897
	X_1X_3	0,380	0,830	0,6632
	X_2X_3	-0,530	0,830	0,5489

X_1, однос дрога:растварач; X_2, врста растварача; X_3, време; СД, стандардна девијација

Графички прикази комбинованих ефеката односа растварач:дрога, врсте растварача и времена микроталасне екстракције на принос укупних полифенола мајчине душице представљени су на слици 4.1.



Слика 4.1. Ефекти фактора на садржај укупних полифенола у микроталасној екстракцији мајчине душице: (А) однос растварач:дрога и врста растварача, (Б) однос растварач:дрога и време и (В) врста растварача и време; *GAE*, еквивалент галне киселине

Као што је приказано у табели 4.3, однос дрога:растварач у микроталасној екстракцији је статистички значајно утицао на садржај полифенола, како у линеарном моделу првог реда ($p < 0,0001$), тако и у квадратном моделу другог реда ($p < 0,01$). Повећање односа дрога:растварач узроковало је повећање приноса полифенола, што се такође може видети на слици 4.1А и 4.1Б. Милутиновић и сар. (2015) су такође показали да повећањем односа дрога:растварач у микроталасној екстракцији долази до повећања садржаја укупних полифенола врсте *Achillea millefolium*, захваљујући ефикаснијем квашењу биљног материјала. Повећање дифузионог коефицијента и изласка полифенола из разорених биљних ћелија под утицајем микроталаса води брзом засићењу екстракционог медијума, тако да се повећањем запремине растварача остварује боље искоришћење биљног материјала (Wang и Weller, 2006; Chupin и сар., 2015).

4.1.3. Утицај врсте растварача на садржај укупних полифенола

Растворљивост супстанце у растварачу зависи од физичко-хемијских особина супстанце, природе растварача и температуре, док избор растварача за екстракцију зависи од природе биљне дроге и активних супстанци, као и од примењене методе екстракције (Вулета и сар., 2012). Ефекат четири растварача различитих поларности (30, 50 и 70% етанол и вода) на садржај укупних полифенола мајчине душице у мацерацији, екстракцији на повишеној температури и ултразвучним таласима приказан је у табели 4.1. Иницијално, у експеримент је био укључен још један растварач (96% етанол), али је принос укупних полифенола био веома низак у поређењу са свим осталим растварачима. Будући да би његова варијација допринела доношењу погрешних претпоставки у даљој статистичкој анализи, подаци за 96% етанол нису коришћени за даља истраживања (прилог 2). Максималан принос полифенола постигнут је употребом 50% етанола у свим претходно поменутим техникама екстракције (мацерација – 19,6 mg *GAE*/L; повишена температура – 22,6 mg *GAE*/L; ултразвучно купатило – 22,1 mg *GAE*/L; ултразвучна сонда – 24,9 mg *GAE*/L). У свакој методи екстракције, вода је дала најнижи принос укупних полифенола, док у мацерацији није било статистички значајне разлике између воде и 70% етанола. Према литератури, у бинарним системима један растварач може да повећа растворљивост полифенола, док други може да побољша десорпцију (Mustafa и Turner, 2011). Количина воде у овим смешама има значајан утицај на полифенолну екстракцију, док додатак чак и малих количина етанола резултује смањењем диелектричне константе екстракционог медијума и последично омогућава лакше раздвајање молекула растварача и улазак активних супстанци између њих (Pompeu и сар., 2009). Добијени резултати указују да већина полифенола мајчине душице има релативно високу поларност и да се поменути полифеноли првенствено екстрахују смешом етанола и воде, посебно када су у гликозидној форми. Такође, додавање мале количине воде у органски растварач узрокује стварање поларнијег медијума и кидање водоничних веза, чиме се олакшава екстракција полифенола. Таква смеша растварача може да екстрахује полифеноле са оба краја поларности – високо и ниско поларне компоненте (Uma и сар., 2010). Поред тога, вода омогућава квашење биљног материјала, чиме се повећава контактна површина биљне дроге и растварача (Yang и Zhang, 2008). Приказани резултати су у складу са запажањима Costa и сар. (2012), где је 50% етанол био најефикаснији растварач за екстракцију антиоксидативних полифенола врсте *Thymus lotocephalus*. Miron и сар. (2011) су највећи принос укупних полифенола из мајчине душице добили употребом мешавине етанол:вода (1:1), на 100°C. Поред тога, Mustafa и Turner (2011) су показали да се поларност растварача значајно смањује применом високе температуре током процеса екстракције, што чини воду и етанол погодним растварачима за поларне, умерено поларне и неполарне органске компоненте. Chizzola и сар. (2008) су утврдили да се најбољи принос укупних полифенола из *Thymus* врста постиже применом 60% етанола, у поређењу са другим односима етанола и воде, док је 96% етанол екстраховао минималне количине полифенола приликом екстракције у воденом и ултразвучном купатилу.

Према садржају укупних полифенола у екстрактима мајчине душице, најбољи резултати су постигнути применом 50% етанола, затим применом 30 и 70% етанола у мацерацији, екстракцији на повишеној температури и ултразвучним таласима. Узимајући у обзир резултате анализе варијансе, која је показала да не постоји статистички значајна разлика између 30 и 70% етанолних екстраката, као и због цене растварача, за даљи експериментални дизајн су изабрани 30 и 50% етанол.

Утицај врсте растварача на садржај полифенола у екстрактима мајчине душице добијеним микроталасима процењен је помоћу регресионих коефицијената и статистичке значајности приказаних у табели 4.3. Проценат етанола у екстракционом медијуму статистички је значајно утицао на принос полифенола у линеарном моделу првог реда (p < 0,001) и у квадратном моделу другог реда (p < 0,05). Повећање концентрације етанола до 48% узроковало је пораст приноса полифенола у екстрактима, као што се може видети на слици 4.1А и 4.1В. Према литературним подацима, у микроталасној екстракцији повећање концентрације етанола узрокује повећање приноса полифенола врста *A. millefolium* и *Myrtus communis*, што је објашњено поларношћу растварача и диелектричном константом (Dahmoune и сар., 2015; Милутиновић и сар., 2015). Повећање диелектричне константе, које настаје додавањем воде у етанол, омогућава апсорпцију енергије микроталаса. Ипак, веће количине воде доводе до смањеног расипања топлоте у екстракционој смеши, чиме се смањује и ефикасност микроталасне екстракције (Милутиновић и сар., 2015). Додатно, највећи принос микроталасне екстракције и највећи садржај полифенола врсте *A. melanocarpa* постигнут је применом 50% етанола, након чега долази до пада приноса полифенола са даљим повећањем процента етанола (Симић и сар., 2016).

4.1.4. Утицај времена екстракције на садржај укупних полифенола

Време екстракције представља важан параметар који треба испитати у оптимизацији процеса екстракције, у циљу изоловања жељених компонената и смањења енергетских трошкова (Вулета и сар., 2012; Galván D’Alessandro и сар., 2012). Утицај времена екстракције на принос полифенола је испитан у мацерацији на пет нивоа (5, 15, 30, 60 и 90 минута), док је код екстракције на повишеној температури и ултразвучним таласима коришћено три нивоа (5, 15 и 30 минута) и добијени резултати су приказани у табели 4.1. У прелиминарним анализама ове докторске дисертације, при фиксираним условима мацерације (степен уситњености од 0,7 mm, однос дрога:растварач 1:20 и 50% етанол), у 120. и 150.

минуту примећен је благи пад у садржају укупних полифенола (27,4 и 27,0 mg *GAE*/L, у односу на 27,7 mg *GAE*/L након 90 минута), што је у складу са литературним подацима, где је дуже време екстракције из врста *Salvia officinalis* и *Lawsonia inermis* дало нижи принос полифенола (Дент и сар., 2013; Uma и сар., 2010). Из тог разлога, оптимизација процеса мацерације настављена је применом времена од 5 до 90 минута. Такође, прелиминарно је испитан утицај 60 и 90 минута екстракције на повишеној температури, при фиксираним условима (степен уситњености од 0,3 mm, однос дрога:растварач 1:30 и 50% етанол), где је примећен значајан пад у вредности укупних полифенола у екстрактима врсте *T. serpyllum* (28,4 и 28,1 mg *GAE*/L, у односу на 30,4 и 31,1 mg *GAE*/L након 15 и 30 минута), што је у складу са резултатима студије која се бавила екстракцијом полифенола зеленог чаја на 80°C (Meterc и сар., 2007). Због тога, дужина екстракције на повишеној температури у даљој оптимизацији процеса није прелазила 30 минута. Поред тога, под истим условима прелиминарно је уочен и пад вредности укупних полифенола након 60 и 90 минута екстракције у ултразвучном купатилу (25,8 и 26,1 mg *GAE*/L, у односу на 26,4 mg *GAE*/L након 30 минута), тако да је у изради будућих екстраката максимално време ултразвучне екстракције било 30 минута, што је у складу са временима коришћеним при екстракцији полифенола жутог чаја у ултразвучном купатилу и ултразвучном сондом (Хоржић и сар., 2012). Након добијања екстраката мајчине душице и мерења садржаја укупних полифенола, максималан принос је одређен у екстрактима после 60 минута мацерације (18,1 mg *GAE*/L), 30 минута екстракције у ултразвучном купатилу (21,1 mg *GAE*/L) и 15 минута екстракције повишеном температуром и ултразвучном сондом (20,6, односно 23,1 mg *GAE*/L). Сви етанолни и водени екстракти врсте *T. serpyllum* добијени након петоминутне екстракције представљали су слаб извор полифенолних компонената. Због слабијих карактеристика прве коришћене сонде, тестирана су три краћа периода екстракције (3, 7 и 10 минута), при чему није примећен статистички значајан утицај времена на принос полифенола (3 минута – 17,1 mg *GAE*/L; 7 минута – 16,8 mg *GAE*/L; 10 минута – 16,3 mg *GAE*/L). Разлог може бити у исувише кратким временима екстракције, између којих није могла да се уочи статистички значајна разлика. Према Фиковом закону дифузије, продужењем времена екстракције количина екстрахованих полифенола се повећава (Вајић и сар., 2015). Екстракција у ултразвучном купатилу прати поменути тренд, где је принос полифенола растао са временом екстракције, при чему се могу приметити статистички значајне разлике у сва три времена екстракције. Добијени резултати су у складу са претходним сазнањима, где је највећа количина антиоксидативних компонената врсте *Zizyphus lotus* добијена након 30 минута ултразвучне екстракције (Hammi и сар., 2015). Према резултатима осталих метода екстракције (мацерација, екстракција на повишеној температури и ултразвучном сондом), није било статистички значајне разлике између различитих времена, изузев у петоминутној мацерацији и екстракцији на повишеној температури, које су се статистички значајно разликовале од других времена. Разлог може бити у постојању два нивоа у полифенолној екстракцији: иницијално повећање концентрације полифенола на почетку процеса (првих 15 минута), праћено спором екстракцијом у наставку (Јовановић и сар., 2017; Ћујић и сар., 2016). У току екстракције ултразвучном сондом (обе претходно поменуте сонде) утицај времена на принос полифенола није био статистички значајан. Добијени резултати су упоредиви са закључцима аутора Fecka и Turek (2008), где није постојала значајна разлика у временима екстракције (15 и 30 минута) у топлим воденим и метанолним екстрактима врста *T. serpyllum* и *T. vulgaris*. Додатно, Дент и сар. (2013) су приметили да време екстракције не утиче на садржај полифенола у екстрактима врсте *S. officinalis*, док Vergara-Salinas и сар. (2012) указују да време 5-30 минута не показује статистички значајан утицај на екстракцију полифенола врсте *T. vulgaris* при повишеној температури. Поред тога, утицај времена није био статистички значајан у мацерацији и ултразвучној екстракцији полифенола листа врсте *Urtica dioica* (Вајић и сар., 2015). Висока температура и дуго време екстракције заједно могу да редукују принос полифенола, како због термолабилности и осетљивости полифенола на ензимску и оксидативну деградацију у воденој фази, тако и због полимеризације нерастворних компонената (Vergara-Salinas и сар., 2012). Продужено време ултразвучне екстракције такође може да деградира екстраховане природне антиоксидансе и наруши квалитет екстракта, стварањем слободних радикала применом ултразвучних таласа (Хоржић и сар., 2012).

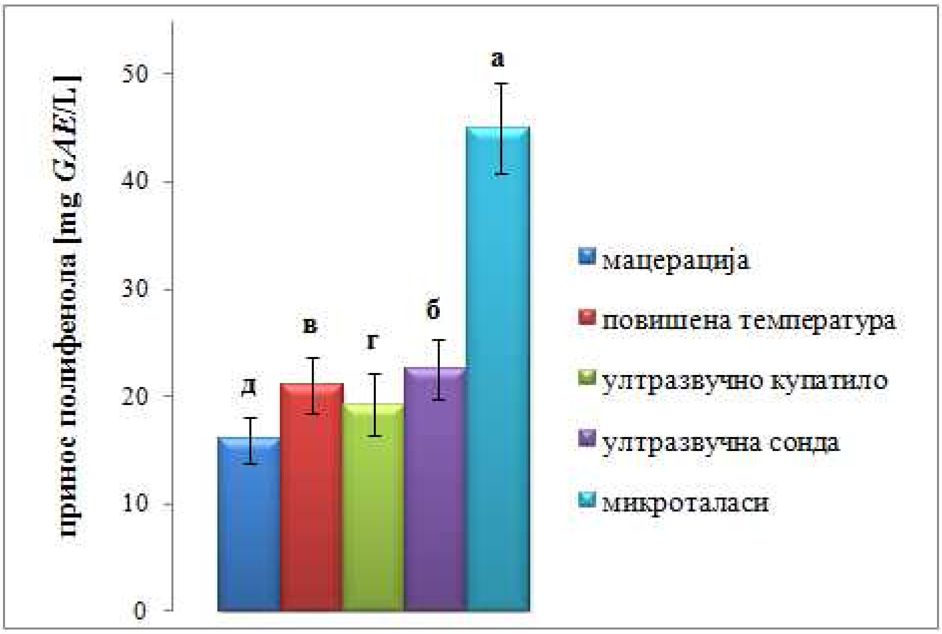
Будући да су екстракти добијени повишеном температуром и ултразвучним таласима имали највиши ниво полифенола након 15 и 30 минута, ова два времена су изабрана за наредни експериментални дизајн. Иако је највећи садржај укупних полифенола добијен након 60 минута мацерације, временски интервали од 15 и 30 минута су изабрани за даље анализе, зато што није било статистички значајне разлике између времена екстракције после 15 минута, као и због уштеде енергије.

Време микроталасне екстракције (10-190 секунди) није статистички значајно утицало на концентрацију полифенола у екстрактима, ни у линеарном моделу првог реда (p > 0,5), ни у квадратном моделу другог реда (p > 0,1) (табела 4.3. и слика 4.1Б и 4.1В). Једна од предности микроталасне екстракције у односу на конвенционалне методе јесте краће време неопходно за екстракцију једињења из биљних извора. Према литературним подацима, велика снага микроталаса за кратко време може да омогући разарање ћелијског зида и побољша дифузију супстанци у екстракциони медијум. Поред тога, дуже време и бољи принос микроталасне екстракције не значе нужно велики садржај жељених компонената, јер долази до ослобађања веће количине баласних материја попут липида, протеина и полисахарида (Симић и сар., 2016). У складу са тим, оптимално време за микроталасну екстракцију полифенола врсте *A. millefolium* било је 33 секунде, док је за врсту *A. melanocarpa* оптимално било најкраће тестирано време од 5 минута (Милутиновић и сар., 2015; Симић и сар., 2016). Такође, приликом микроталасне екстракције листа врсте *M. communis* у првих 60 секунди долази до повећања приноса полифенола, да би након 90 секунди био уочен пад у садржају полифенола (Dahmoune и сар., 2015).

4.1.5. Утицај технике екстракције на садржај укупних полифенола

Како различите методе екстракције делују на биљни материјал различитим механизмима, екстракти добијени применом различитих процедура имају другачије физичко-хемијске карактеристике и биолошке активности.

У прелиминарним истраживањима ове докторске дисертације испитан је утицај различитих вредности повишене температуре (40, 60 и 80°C) на садржај укупних полифенола мајчине душице, при фиксираним условима екстракције: степен уситњености од 0,3 mm, однос дрога:растварач 1:20, 50% етанол и време 15 минута. Добијени закључци прелиминарне анализе (40°C – 26,5 mg *GAE*/L; 60°C – 27,8 mg *GAE*/L; 80°C – 30,7 mg *GAE*/L) били су у складу са литературним подацима, где је принос укупних полифенола ароматичних биљака такође растао са порастом температуре (Miron и сар., 2011). Из тог разлога, за добијање екстраката на повишеној температури коришћена је температура од 80°C. Принос укупних полифенола у екстрактима добијеним повишеном температуром био је виши него у екстрактима добијеним мацерацијом за сваки посматрани ниво фактора (табела 4.1). Чак у првих 5 минута екстракције на 80°C садржај полифенола је порастао за 40%, у поређењу са екстрактима добијеним на собној температури. Додатно, сличне количине полифенола су забележене након 60 минута мацерације и 5 минута екстракције на повишеној температури (18,1, односно 18,4 mg *GAE*/L). Употреба термалне енергије побољшава ефикасност екстракције разарањем ћелијских структура, што води повећању пермеабилности ћелијске мембране и раскидању веза између секундарних метаболита и биљног матрикса (полифеноли са липопротеинима) и узрокује повећање растворљивости полифенола, као и интензивирање преноса масе (Mustafa и Turner, 2011). Повећање температуре растварача доводи до смањења површинског напона и последичног квашења биљног материјала, чиме се постиже већа ефикасност екстракције (Vergara-Salinas и сар., 2012). Смањена вискозност медијума на повишеној температури омогућава растварачу да продре у биљни матрикс, што резултује побољшаним и убрзаним процесом екстракције (Miron и сар., 2011). Добијени резултати овог испитивања су у складу са претходно публикованим извештајима, где је повишена температура имала позитиван утицај на принос полифенолних компонената у водено-алкохолним екстрактима биљака фамилије Lamiaceae (Дент и сар., 2013; Miron и сар., 2011). Hossain и сар. (2011) су указали да температура представља доминантан фактор у повећању приноса укупних полифенола врста *Rosmarinus officinalis, O. majorana* и *O. vulgare*. На слици 4.2, где су приказани приноси полифенола добијени применом свих испитаних техника екстракције (мацерација, екстракција на повишеној температури, ултразвучним таласима и микроталасима), може се видети да је принос полифенола у екстрактима добијеним на повишеној температури статистички значајно већи него у екстрактима добијеним мацерацијом и у ултразвучном купатилу. Узимајући у обзир индустријске захтеве, попут високог приноса жељене компоненте за краће време, примена повишене температуре у екстракцији полифенола из мајчине душице има предност над мацерацијом и екстракцијом у ултразвучном купатилу.



Слика 4.2. Графички приказ утицаја различитих метода екстракције на принос укупних полифенола мајчине душице; различита слова у свакој колони (а-д) показују да постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p < 0{,}05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест); *GAE*, еквивалент галне киселине

Садржај укупних полифенола добијених екстракцијом у ултразвучном купатилу, у поређењу са екстрактима добијеним мацерацијом, био је виши на сваком нивоу посматраних фактора (табела 4.1). Након 5 минута екстракције у ултразвучном купатилу, вредност садржаја полифенола је била за 33% већа него након петоминутне мацерације. Може се уочити да су сличне концентрације полифенола добијене након 5 минута екстраховања у ултразвучном купатилу и 15 и 30 минута мацерације. Познато је да ултразвучна екстракција поседује способност да значајно скрати време и повећа принос екстракције из великог броја природних производа (Sun и сар., 2011). Ипак, слика 4.2. показује да је по питању приноса полифенола екстракција у ултразвучном купатилу била боља само од мацерације.

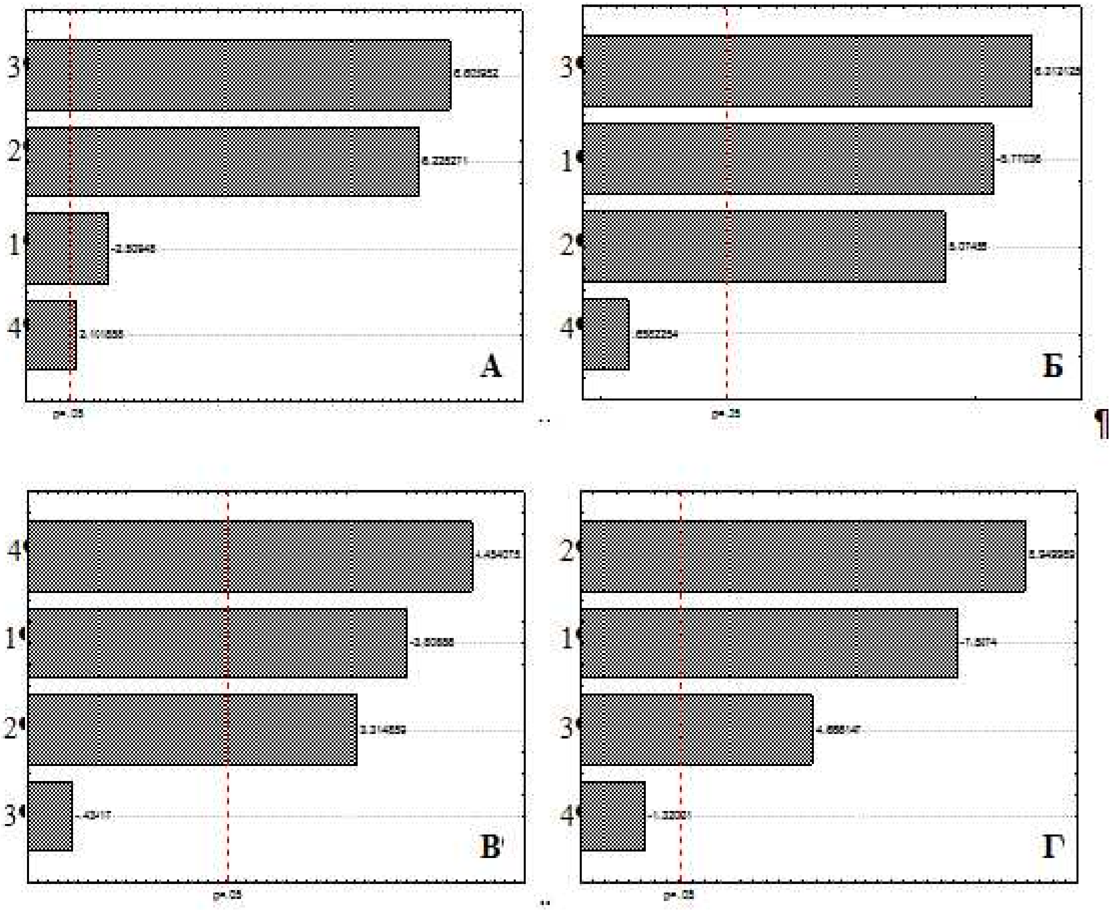
У прелиминарним експериментима ове докторске дисертације, испитан је утицај три нивоа амплитуде ултразвучне сонде (20, 50 и 80%, покривајући цео опсег уређаја) на принос полифенола мајчине душице, док су остали фактори били константни: степен уситњености од 0,3 mm, однос дрога:растварач 1:30 и 50% етанол у току 15 минута (20% – 14,6 mg *GAE*/L; 50% – 23,4 mg *GAE*/L; 80% – 27,7 mg *GAE*/L). Као што се може видети из приложених података, максималан одговор је добијен при амплитуди од 80%, што је у складу са литературним подацима где је такође повећање амплитуде ултразвучне сонде до 80% довело до повећања приноса екстракције (Хоржић и сар., 2012). Стога је у даљој оптимизацији процеса екстракције коришћена само амплитуда од 80%. Резултати у табели 4.1. показују да је садржај укупних полифенола био већи у екстрактима добијеним ултразвучном сондом, у поређењу са екстрактима добијеним мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и у ултразвучном купатилу, на свим посматраним нивоима фактора. Након 5 минута екстракције ултразвучном сондом количина укупних полифенола је порасла за 64,3% у односу на исте екстракте добијене мацерацијом, 18,4% у односу на ултразвучно купатило и 17,3% у односу на повишену температуру. Садржај укупних полифенола након петоминутне екстракције ултразвучном сондом био је већи него након 60 минута мацерације. Наиме, ова појава може да се објасни механизмом дејства ултразвучних таласа, који изазивају циклусе експанзије и компресије док путују кроз медијум и као механичке вибрације долазе до унутрашњости биљних ћелија и последично разарају биљну структуру. Тиме ултразвучни таласи интензивирају пренос масе и ослобађање полифенола у медијум за краћи временски период (Wang и Weller, 2006). Са друге стране, једна од карактеристика мацерације као технике екстракције јесте дуго време неопходно да би се добио већи принос активних принципа, при чему никада не долази до потпуног исцрпљења биљног материјала (Вулета и сар., 2012). Додатно, према литературним подацима, већи садржај полифенола жутог чаја је добијен применом ултразвучне сонде, у поређењу са повишеном температуром и ултразвучним купатилом (Хоржић и сар., 2012). Веома висок садржај биоактивних материја у екстрактима добијеним применом ултразвучне сонде за краће време, у поређењу са конвенционалним методама екстракције, приказан је у неколико студија (Both и сар., 2014; Galván D'Alessandro и сар., 2012; Tchabo и сар., 2015; Хоржић и сар., 2012). Слика 4.2. такође показује статистички значајно већи принос полифенола у екстрактима добијеним применом ултразвучне сонде у поређењу са мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и у ултразвучном купатилу. Екстракција ултразвучном сондом у односу на конвенционалне технике има низ предности: повећање приноса екстракције, побољшање квалитета екстракта и брза кинетика, као веома важно својство за индустријске захтеве. У односу на уређаје за друге савремене методе екстракције (екстракција при повишеном притиску или суперкритичним флуидом), ултразвучна сонда није скуп инструмент и њиме се лако рукује. Додатно, било који растварач може бити коришћен за ултразвучну екстракцију великог броја фармаколошки и биолошки активних принципа, као и за термолабилне супстанце (Wang и Weller, 2006). Стога екстракција ултразвучном сондом представља високо ефикасну технику за екстракцију биолошки активних полифенолних компонената из хербе мајчине душице, у поређењу са конвенционалним процедурама.

У прелиминарној студији ове докторске дисертације, приликом микроталасне екстракције испитан је утицај различитих температура (60-200°C), при фиксираним условима: степен уситњености од 0,3 mm, однос дрога:растварач 1:30 и 50% етанол у току 15 секунди (од 25,1 mg *GAE*/L на 60°C до 45,1 mg *GAE*/L на 200°C). Највећи принос микроталасне екстракције (највећи садржај полифенола и антиоксидативни капацитет) добијен је на 200°C, што је у складу са литературним подацима, где су највиши принос полифенола и најбоља антиоксидативна активност екстраката врсте *T. vulgaris* постигнути екстракцијом на 200°C (Vergara-Salinas и сар., 2012). Као што се може видети на слици 4.2, принос полифенола након микроталасне екстракције био је највећи, статистички значајно виши него код осталих метода екстракције. Наиме, микроталаси имају способност да продиру у биљни материјал и интереагују са поларним молекулима воде, стварајући топлоту и притисак, који изазивају разарање ћелијских структура, уз последично ослобађање велике количине секундарних метаболита у екстракциони медијум (Bouras и сар., 2015; Wang и Weller, 2006; Chupin и сар., 2015). Додатно, велика количина хидрофобних полифенола се налази са протеинима и полисахаридима у ћелијском зиду, који бива разорен под дејством микроталаса, чиме је омогућен излазак и поменутих полифенола у екстракциони медијум (Симић и сар., 2016; Naczk и Shahidi, 2006). Применом микроталаса у екстракцији полифенола остварује се значајна уштеда времена и потрошеног растварача, уз повећање приноса екстракције. Такође, важно је напоменути да се микроталасима могу екстраховати и поларне и неполарне компоненте (Chupin и сар., 2015). Поменута метода екстракције има низ предности у поређењу са конвенционалним техникама: извођење процеса без присуства светлости и кисеоника, смањење потрошње органског растварача и скраћење времена екстракције захваљујући повишеној температури и притиску, уз висок принос екстракције (Chupin и сар., 2015). Са становишта заштите животне средине и становишта прехрамбене и фармацеутске индустрије, које захтевају безбедне и високо квалитетне производе, уз примену „зелених“ метода екстракције, које су притом брзе и аутоматизоване, микроталасна екстракција представља методу избора за добијање квалитетних екстраката мајчине душице, са високим приносом полифенола (Bouras и сар., 2015).

4.1.6. Експериментални дизајн

Експериментални дизајн, као статистичка алатка, примењен је у циљу добијања комбинације фактора од интереса, која ће дати највећи принос полифенола врсте *T. serpyllum*, применом мацерације, екстракције на повишеној температури, ултразвучним таласима и микроталасима.

У мацерацији, екстракцији на повишеној температури и ултразвучним таласима, пратећи резултате *one-way ANOVA* анализе, степен уситњености – 0,3 и 0,7 mm, однос дрога:растварач – 1:20 и 1:30, врста растварача – 30 и 50% етанол и време екстракције – 15 и 30 минута (сви посматрани фактори на два нивоа), уведени су у експериментални дизајн, *full factorial design*, у циљу оптимизације процеса екстракције који ће дати највиши принос укупних полифенола из хербе мајчине душице. У првом факторском дизајну, експериментални дизајн на два нивоа (*Plackett-Burman*), сва четири посматрана фактора представљена кроз два одабрана нивоа формирала су 2^4 *full factorial design*. Сврха ове анализе јесте утврђивање фактора који имају статистички значајан ефекат на зависну варијаблу, односно садржај укупних полифенола. Парето дијаграми на слици 4.3. представљају све факторе који утичу на принос полифенолних компонената мајчине душице у мацерацији, екстракцији на повишеној температури и ултразвучним таласима (1, степен уситњености; 2, однос дрога:растварач; 3, врста растварача; 4, време екстракције). Дужине хоризонталних барова су директно пропорционалне апсолутној вредности процењеx ефеката, док испрекидана линија представља минималну вредност статистички значајног ефекта на принос полифенола (95% интервал поузданости).



Слика 4.3. Парето дијаграми утицаја фактора на принос полифенола у екстрактима мајчине душице: (А) мацерација, (Б) екстракција на повишеној температури, (В) у ултразвучном купатилу и (Г) ултразвучном сондом; 1 – степен уситњености; 2 – однос дрога:растварач; 3 – врста растварача; 4 – време екстракције

Као што се може видети на слици 4.3А, врста растварача (фактор 3) и однос дрога:растварач (фактор 2) представљају најзначајније факторе за принос полифенола у мацерацији, док степен уситњености (фактор 1) и време екстракције (фактор 4) имају мањи утицај. Слично, у оптимизацији полифенолне екстракције из листа врсте *U. dioica*, избор растварача је значајно утицао на принос полифенола, док време екстракције није било статистички значајно (Вајић и сар., 2015). Поред тога, однос дрога:растварач је био други важан параметар за добијање високог приноса укупних полифенола из осушеног плода врсте *A. melanocarpa* употребом мацерације, док време екстракције није показало статистичку значајност (Ћујић и сар., 2016). На основу слике 4.3Б, може се закључити да је врста растварача фактор који има доминантан ефекат на принос екстракције при повишеној температури, праћен степеном уситњености и односом дрога:растварач, док време екстракције није имало статистички значајан утицај на концентрацију екстрахованих полифенола мајчине душице. Добијени резултати су у складу са литературним подацима, где је врста екстракционог медијума значајно утицала на полифенолну екстракцију повишеном температуром из врста *R. officinalis*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *Inga edulis* и *L. inermis* (Silva и сар., 2007; Uma и сар., 2010; Hossain и сар., 2011). Додатно, величина честица биљног материјала и однос дрога:растварач утицали су на количину екстрахованих полифенолних компонената врсте *P. crispum*, док са друге стране није било статистички значајних разлика у приносу полифенола при примени различитих времена екстракције (Luthria, 2008). Слика 4.3В показује утицај посматраних фактора на екстракцију полифенола у ултразвучном купатилу и може се приметити другачији тренд него у претходне две методе екстракције. Време екстракције овде представља фактор са највећим утицајем на садржај укупних полифенола и праћено је степеном уситњености и односом дрога:растварач. Приказани резултати су у складу са литературним подацима, где време екстракције, степен уситњености и однос дрога:растварач имају статистички значајан утицај на ефикасност ултразвучне екстракције (Galván D’Alessandro и сар., 2012; Здравковић и сар., 2012; Sun и сар., 2011; Hammi и сар., 2015). Са друге стране, у поменутој методи врста растварача није показала статистички значајан утицај на принос полифенола. Приликом екстракције полифенолних компонената врсте *S.*

officinalis, повећање етанолне фракције у води није имало позитиван утицај на садржај полифенола, при чему су максималне вредности добијене применом 30% етанола (Дент и сар., 2013). На слици 4.3Г приказан је утицај посматраних фактора на екстракцију ултразвучном сондом, где су однос дрога:растварач, степен уситњености и врста растварача биле варијабле које су највише утицале на концентрацију екстрахованих полифенола. У овом случају, дужина екстракције није имала статистички значајан ефекат на принос полифенола. Добијени резултати су упоредиви са резултатима приноса екстракције врсте *Jatropha dioica*, где је однос дрога:растварач био најважнији фактор који утиче на концентрацију полифенола у ултразвучној екстракцији, док је удео етанола био на другом месту по значајности. Такође, у истој студији, време екстракције је показало слаб ефекат на концентрацију полифенола из врсте *Eucalyptus camaldulensis* (Paz и сар., 2015). Додатно, у ултразвучној екстракцији полифенола коре врсте *Citrus sinensis*, однос етанола и воде показао је значајан утицај на принос жељених компонената (Khan и сар., 2010). Разлика између екстракције у ултразвучном купатилу, на коју време има значајан утицај, и екстракције ултразвучном сондом, где време екстракције након 15 минута не утиче на већи принос полифенола, може бити објашњена температуром узорака. Приликом екстракције ултразвучном сондом узорак и посуда су хлађени ледом, тако да није долазило до значајног повећања температуре узорка. У току екстракције у ултразвучном купатилу није било хлађења, тако да је дошло до појаве двоструког ефекта: утицаја ултразвучних таласа и повишене температуре на биљни материјал, при чему је настављен значајан излазак полифенола у екстракциони медијум и након 15 минута екстракције. У овом случају, механички и термички ефекти заједно узрокују оштећење ћелијског зида, излазак ћелијског садржаја и бољу пенетрацију растварача у биљни матрикс (Deng и сар., 2015; Хоржић и сар., 2012). Поред тога, већа снага ултразвучних таласа сонде доприноси брзом разарању биљне структуре, интензивнијем изласку полифенола у медијум и настанку засићења, док је код ултразвучног купатила потребно више времена за поменуте ефекте. Ипак, након 30 минута није било повећања садржаја полифенола ни у екстракцији изведеној у ултразвучном купатилу, јер тада највероватније настаје изједначавање концентрације активних принципа у биљном материјалу и у медијуму. У мацерацији, екстракцији на повишеној температури и ултразвучном сондом, време екстракције је представљало фактор који најмање утиче на принос укупних полифенола. Из тог разлога, за поменуте методе тај фактор је искључен из даље оптимизације процеса екстракције и оптимално време је подешено на 15 минута. Поред тога, краће време екстракције је прихватљиво са индустријског аспекта уштеде енергије. С обзиром на то да је приликом екстракције у ултразвучном купатилу најмање релевантан фактор за добијање екстраката богатих полифенолима био проценат етанола у екстракционом медијуму, односно врста растварача, поменути фактор је искључен из даље оптимизације процеса екстракције овом техником и као оптимални растварач је узет 30% етанол. Додатно, мање количине етанола су прихватљивије са становишта безбедности и трошкова, како у прехрамбеној, тако и у фармацеутској индустрији.

У следећем факторском дизајну, експериментални подаци из претходне анализе (2^4 *full factorial design*) уведени су у 2^3 *full factorial design*, са три независне варијабле које су имале статистички значајан ефекат на садржај полифенола, при чему је свака варијабла била на два нивоа. У мацерацији, екстракцији на повишеној температури и ултразвучном сондом те три варијабле су биле степен уситњености, однос дрога:растварач и врста растварача, док су у методи екстракције у ултразвучном купатилу поменуте варијабле биле степен уситњености, однос дрога:растварач и време екстракције. Нови *full factorial design* (2^3) примењен је у циљу испитивања утицаја фактора на садржај полифенола и добијања оптималних услова за постизање највишег приноса полифенола из хербе врсте *T. serpyllum*. Додатно, представљени 2^3 статистички модел омогућава испитивање интеракција између фактора. Ефекти и одговарајући регресиони коефицијенти фактора, као и интеракције између фактора приказани су у табели 4.4. Резултати 2^3 *full factorial design*, са експериментално добијеним и предвиђеним вредностима садржаја укупних полифенола, представљени су у табели 4.5а, за мацерацију, екстракцију на повишеној температури и ултразвучном сондом и у табели 4.5б, за екстракцију у ултразвучном купатилу.

Табела 4.4. Статистичка анализа оптимизације процеса екстракције мајчине душице: мацерација, екстракција на повишеној температури и ултразвучним таласима (2^3 *full factorial design*)

	Ефекат	**Стандардна девијација**	**Коефицијент регресије**	**Стандардна девијација коефицијента**	***p***
Мацерација					
Садржај укупних полифенола			22,442	0,253	0,000
Главни фактори					
Степен уситњености [mm] (1)	-1,354	0,507	-0,677	0,253	0,016
Однос дрога:растварач (2)	3,967	0,507	1,984	0,253	0,000
Врста растварача [% етанола] (3)	2,850	0,507	1,425	0,253	0,000
Интеракције два фактора					
1 и 2	-0,475	0,507	-0,238	0,253	0,362
1 и 3	-0,528	0,507	-0,264	0,253	0,312
2 и 3	-0,707	0,507	-0,354	0,253	0,181
Повишена температура					
Садржај укупних полифенола			24,525	0,215	0,000
Главни фактори					
Степен уситњености [mm] (1)	-3,755	0,429	-1,877	0,215	0,000
Однос дрога:растварач (2)	1,261	0,429	0,631	0,215	0,009
Врста растварача [% етанола] (3)	4,400	0,429	2,200	0,215	0,000
Интеракције два фактора					
1 и 2	-1,613	0,429	-0,807	0,215	0,002
1 и 3	0,567	0,429	0,284	0,215	0,204

2 и 3	-0,470	0,429	-0,235	0,215	0,289
Ултразвучно купатило					
Садржај укупних полифенола			24,850	0,162	0,000
Главни фактори					
Степен уситњености [mm] (1)	-4,601	0,325	-2,300	0,162	0,000
Однос дрога:растварач (2)	2,612	0,325	1,306	0,162	0,000
Време екстракције [минути] (3)	4,894	0,325	2,447	0,162	0,000
Интеракције два фактора					
1 и 2	-2,337	0,325	-1,169	0,162	0,000
1 и 3	0,434	0,325	0,217	0,162	0,199
2 и 3	0,784	0,325	0,392	0,162	0,027
Ултразвучна сонда					
Садржај укупних полифенола			27,226	0,260	0,000
Главни фактори					
Степен уситњености [mm] (1)	-3,077	0,521	-1,539	0,260	0,000
Однос дрога:растварач (2)	5,050	0,521	2,525	0,260	0,000
Врста растварача [% етанола] (3)	1,805	0,521	0,903	0,260	0,003
Интеракције два фактора					
1 и 2	-1,263	0,521	-0,631	0,260	0,027
1 и 3	-0,941	0,521	-0,470	0,260	0,089
2 и 3	-0,424	0,521	-0,212	0,260	0,426

Као што се може видети у табели 4.4, однос дрога:растварач је био најзначајнији фактор за екстракцију полифенола мацерацијом, праћен врстом растварача и степеном уситњености. Са друге стране, интеракције између фактора нису биле значајне у поменутој методи екстракције. При повишеној температури, концентрација етанола је представљала најдоминантнији фактор. Други важан фактор за постизање максималног приноса полифенола је био степен уситњености биљног материјала, праћен значајном интеракцијом између степена уситњености и односа дрога:растварач. Поменута интеракција указује да ефекат величине честица на садржај полифенола није исти на свим нивоима односа дрога:растварач. Додатно, однос дрога:растварач је значајно утицао на принос полифенола, али је дата вредност ефекта била нижа него код врсте растварача и степена уситњености. Експериментални резултати добијени екстракцијом у ултразвучном купатилу указују да је време екстракције најзначајнији фактор који утиче на ефикасност, праћен степеном уситњености, односом дрога:растварач, интеракцијом између степена уситњености и односа дрога:растварач, као и интеракцијом између времена екстракције и односа дрога:растварач. У поменутој методи екстракције, утицаји степена уситњености и времена екстракције на принос полифенола нису исти на свим нивоима односа дрога:растварач, тако да ефекат ова два фактора зависи од употребљеног односа биљног материјала и растварача. Приликом екстракције ултразвучном сондом однос дрога:растварач је имао највећи утицај на садржај полифенола, праћен степеном уситњености и врстом растварача, чије су апсолутне вредности утицаја биле ниже. Интеракција између степена уситњености и односа дрога:растварач била је статистички значајна, као у случају екстракције повишеном температуром.

Према резултатима приказаним у табели 4.5а, највиша концентрација полифенола (измерена вредност) у све три методе екстракције (мацерација, екстракција на повишеној температури и ултразвучном сондом) постигнута је при следећим условима: највећи степен уситњености (0,3 mm), највећи однос дрога:растварач (1:30) и однос воде и етанола у екстракционом медијуму 1:1 (50% етанол). Такође, статистички модел је предвидео максималну ефикасност екстракције под истим условима. Најнижи принос у све три поменуте методе добијен је у комбинацији величине честица од 0,7 mm, односа дрога:растварач 1:20 и 30% етанола. Под истим условима, статистички модел је предвидео минималан садржај полифенола у екстрактима добијеним овим техникама екстракције.

Табела 4.5а. Резултати утицаја одабраних фактора на садржај укупних полифенола екстраката мајчине душице добијених мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и ултразвучном сондом, представљени као добијене и предвиђене вредности (2^3 *full factorial design*)

			Садржај укупних полифенола [mg *GAE*/L]					
			Технике екстракције					
Величина честица	Однос д:р	% EtOH	**Мацерација**		**Повишена температура**		**Ултразвучна сонда**	
Нивои фактора			ДВ	ПВ	ДВ	ПВ	ДВ	ПВ
0,3 mm	1:20	30	18,8	18,9	23,1	22,8	23,6	24,0
0,3 mm	1:20	50	23,0	22,9	26,8	27,1	27,6	27,2
0,3 mm	1:30	30	24,1	24,0	25,9	26,2	31,2	30,8
0,3 mm	**1:30**	**50**	**26,6**	**26,7**	**29,8**	**29,5**	**32,7**	**33,1**
0,7 mm	1:20	30	18,6	18,5	19,8	20,1	23,5	23,1
0,7 mm	1:20	50	21,4	21,5	25,8	25,5	24,0	24,4
0,7 mm	1:30	30	22,6	22,7	20,5	20,2	27,0	27,4
0,7 mm	1:30	50	24,4	24,3	24,4	24,7	28,2	27,8

GAE, еквивалент галне киселине; д:р, дрога:растварач; EtOH, етанол, ДВ, добијене вредности, ПВ, предвиђене вредности

Табела 4.5б приказује највећи измерен садржај полифенола у екстракту добијеном у ултразвучном купатилу при следећим условима: величина честица од 0,3 mm, однос дрога:растварач 1:30 и време екстракције од 30 минута. Максималну вредност садржаја полифенола у екстрактима из ултразвучног купатила модел предвиђа под истим условима као и за измерене вредности. Најнижу ефикасност поменута метода екстракције је имала приликом употребе степена уситњености 0,7 mm и односа дрога:растварач 1:20 након 15 минута. Под тим условима добија се и најмања предвиђена вредност укупних полифенола. Будући да су разлике између предвиђених и добијених вредности у све четири технике екстракције биле минималне (1-2%), *full factorial design* представља адекватан модел за оптимизацију процеса екстракције полифенолних компонената из хербе врсте *T. serpyllum*.

Табела 4.5б. Резултати утицаја одабраних фактора на садржај укупних полифенола екстраката мајчине душице добијених у ултразвучном купатилу, представљени као добијене и предвиђене вредности (2^3 *full factorial design*)

			Садржај укупних полифенола [mg *GAE*/L]	
			Техника екстракције	
Величина честица [mm]	Однос д:р	Време [минути]	**Ултразвучно купатило**	
Нивои фактора			Добијене вредности	Предвиђене вредности
0,3	1:20	15	22,5	22,8
0,3	1:20	30	26,8	26,5
0,3	1:30	15	27,3	27,0
0,3	**1:30**	**30**	**31,9**	**32,2**
0,7	1:20	15	20,5	20,1
0,7	1:20	30	24,4	24,7
0,7	1:30	15	19,3	19,6
0,7	1:30	50	26,1	25,7

GAE, еквивалент галне киселине; д:р, дрога:растварач

Приликом оптимизације процеса екстракције микроталасима коришћен је другачији експериментални дизајн, *central composite design*, и три фактора кодирана на пет нивоа: однос дрога:растварач (X_1: 1:10-1:40), врста растварача (X_2: 0-60% етанол) и време екстракције (X_3: 10-190 секунди). Кодиране вредности фактора, добијене и предвиђене вредности одговора (садржај укупних полифенола) на свих пет нивоа дизајна представљене су у табели 4.6.

Експериментални подаци садржаја полифенола након микроталасне екстракције се уклапају у квадратни модел одзивне површине. Применом модела одзивне површине установљено је да се максималан принос укупних полифенола у микроталасној екстракцији постиже применом односа дрога:растварач 1:23 и 48% етанола након 87 секунди. Под тим условима предвиђена вредност садржаја укупних полифенола је била 57,6 mg *GAE*/L, док је добијена вредност износила 58,1 mg *GAE*/L.

Табела 4.6. Кодиране вредности фактора са добијеним и предвиђеним вредностима одговора у оптимизацији микроталасне екстракције мајчине душице (*central composite design*)

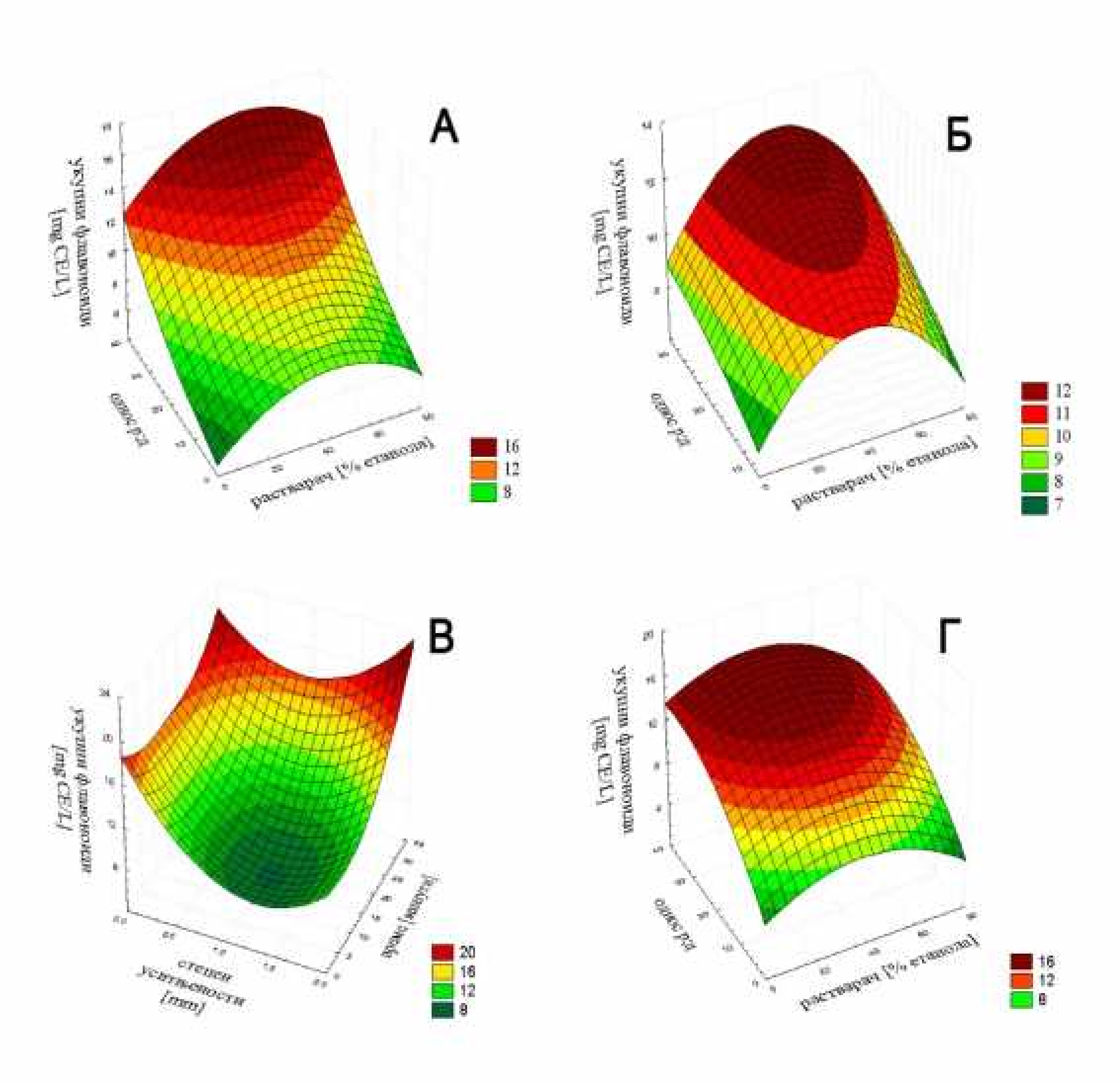
Фактори				Одговори	
				Садржај укупних полифенола [mg *GAE*/L]	
	X_1	**X_2**	**X_3**	Добијене вредности	Предвиђене вредности
1	0,00	0,00	0,00	51,0 ± 2,2	51,7
2	-1	1	1	53,5 ± 4,7	53,7
3	-1	1	-1	54,0 ± 5,3	56,2
4	0,00	-1,68	0,00	38,3 ± 2,3	37,4
5	1,00	-1,00	1,00	33,3 ± 2,0	32,7
6	0,00	1,68	0,00	55,7 ± 3,1	54,5
7	0,00	0,00	-1,68	48,8 ± 5,5	45,5
8	-1	-1	1	44,4 ± 0,2	44,6
9	-1	-1	-1	42,8 ± 3,7	44,9
10	1	-1	-1	30,2 ± 3,0	31,4
11	0	0	1,68	43,2 ± 3,6	44,4
12	0	0	0	52,1 ± 2,2	52,9
13	1	1	1	42,4 ± 3,2	41,8
14	1	1	-1	41,4 ± 3,2	42,7
15	1,68	0	0	34,4 ± 4,5	30,4
16	-1,68	0	0	53,8 ± 2,9	51,7

X_1, однос дрога:растварач; X_2, врста растварача; X_3, време; *GAE*, еквивалент галне киселине

4.1.7. Утицај одабраних фактора на садржај укупних флавоноида

С обзиром на то да флавоноиди имају велики удео у садржају укупних полифенола екстраката, као и у њиховим биолошким активностима, важно је испитати утицај фактора екстракције на принос флавоноида. Утицај односа дрога:растварач (1:10, 1:20 и 1:30) и врсте растварача (30, 50 и 70% етанол и вода) на садржај укупних флавоноида испитан је у екстрактима врсте *T. serpyllum* добијеним у мацерацији, екстракцији на повишеној температури и ултразвучном сондом, док су степен уситњености (0,3 mm) и време екстракције (15 минута) били константни. Приликом екстракције у ултразвучном купатилу испитан је утицај различитог степена уситњености (0,3, 0,7 и 1,5 mm) и времена екстракције

(5, 15 и 30 минута) на принос флавоноида, док су однос дрога:растварач и врста екстракционог медијума били константни (1:30 и 30% етанол). Одабир фактора, чији је утицај на екстракцију флавоноида испитан, извршен је на основу резултата добијених у 2^4 експерименталном дизајну (Парето дијаграми на слици 4.3). Резултати утицаја различитих фактора на садржај флавоноида графички су приказани на слици 4.4. употребом статистичког програма *STATISTICA 7.0*.



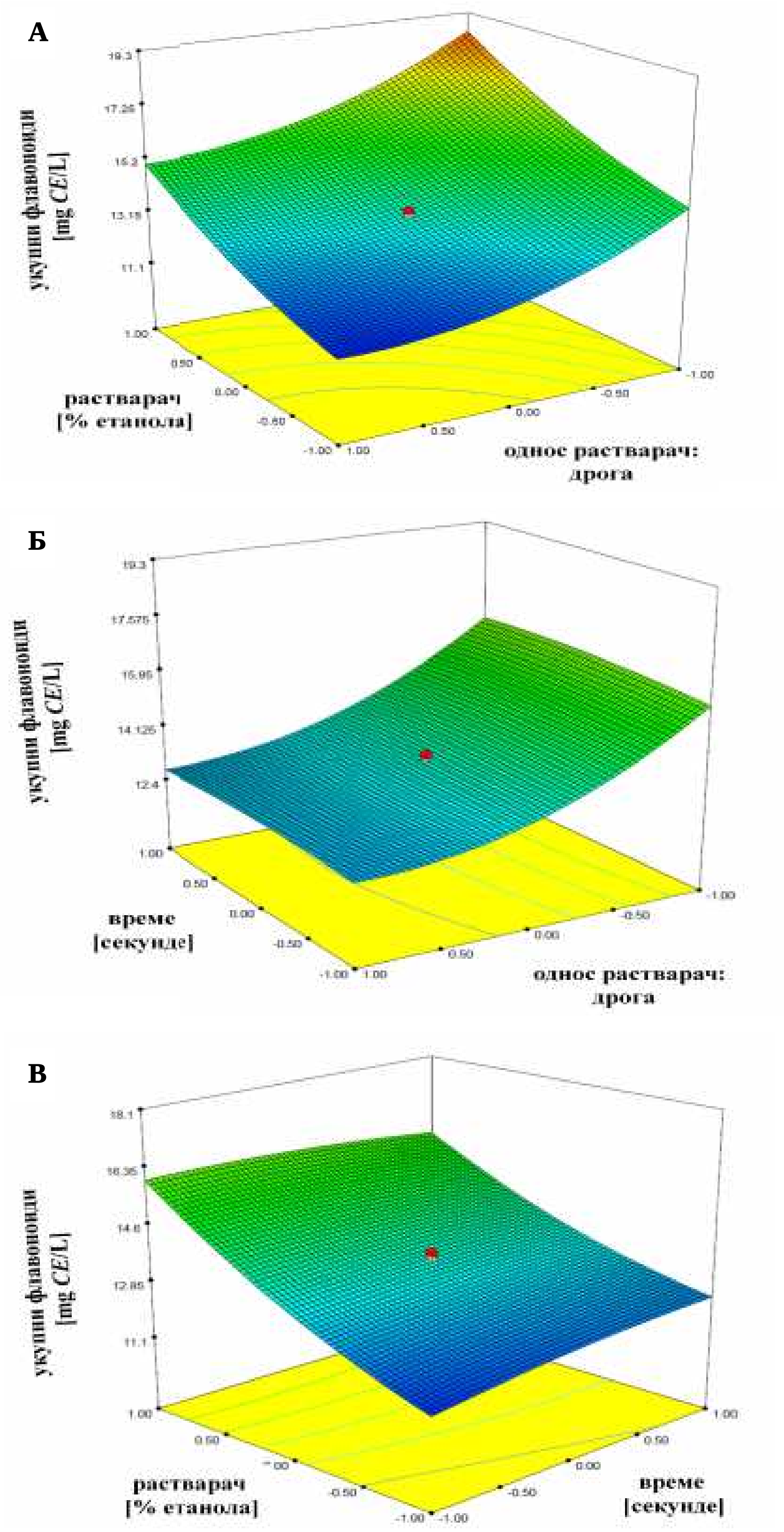
Слика 4.4. Графички приказ ефеката односа растварач:дрога и врсте растварача на садржај укупних флавоноида у екстрактима мајчине душице: (А) мацерација, (Б) повишена температура и (Г) ултразвучна сонда и (В) ефеката степена уситњености и времена екстракције у ултразвучном купатилу; *CE*, еквивалент катехина

Слика 4.4. показује да приликом мацерације (А), екстракције на повишеној температури (Б) и ултразвучном сондом (Г), однос дрога:растварач има значајан утицај на принос флавоноида мајчине душице. Концентрација укупних флавоноида је расла са повећањем запремине растварача, што је у складу са претходно одређеним садржајем полифенола и литературним подацима (Yang и Zhang, 2008). Поред тога, у ове три методе екстракције највиши принос флавоноида је постигнут употребом 50% етанола (мацерација – 13,2 mg *CE*/L; повишена температура – 11,9 mg *CE*/L; ултразвучна сонда – 15,9 mg *CE*/L), док је најнижи принос измерен у воденим екстрактима, као и код полифенолног садржаја (мацерација – 8,4 mg *CE*/L; повишена температура – 8,4 mg *CE*/L; ултразвучна сонда – 12,7 mg *CE*/L). У литературним подацима, најбоља екстракција флавоноида је постигнута са водено-етанолним екстракционим медијумом, како употребом конвенционалних метода екстракције, тако и употребом ултразвучне сонде (Хоржић и сар., 2012). Резултати студије која се бавила екстрактима биљака фамилије Lamiaceae показали су низак принос катехина као представника флавоноида у воденим екстрактима мајчине душице (Кулишић и сар., 2006). Са друге стране, доказано је да принос флавоноида достиже високе вредности применом 50% етанола, зато што етанол интереагује са флавоноидима преко нековалентних веза, обезбеђујући им брзу дифузију у екстракциони медијум (Буцић-Којић и сар., 2011; Singh и сар., 2012).

Слика 4.4B приказује тренд повећања садржаја флавоноида са продужењем времена екстракције у ултразвучном купатилу, као и са смањењем величине честица биљног материјала. Највећи принос флавоноида достигнут је употребом величине честица од 0,3 mm након 30 минута (16,8 mg *CE*/L), док су величина честица од 1,5 mm и време екстракције од 5 минута дали најниже концентрације флавоноида (8,3 mg *CE*/L), као и у случају садржаја полифенола. Према литературним подацима, у воденим и етанолним екстрактима жутог чаја, најмањи принос флавоноида је одређен након 3 минута екстракције у ултразвучном купатилу, док су вредности након 15 и 30 минута биле значајно веће (Хоржић и сар., 2012). Што се тиче утицаја технике екстракције на принос флавоноида, у екстрактима добијеним ултразвучном сондом количина укупних флавоноида је била статистички значајно виша него при употреби мацерације и повишене температуре, између којих није било статистички значајне разлике (мацерација – 11,2 mg *CE*/L; повишена температура – 10,7 mg *CE*/L; ултразвучна сонда – 13,7 mg

CE/L). Резултати садржаја флавоноида у посматраним екстрактима су у складу са претходним закључцима, где је највећа концентрација флавоноида жутог чаја добијена употребом ултразвучне сонде, у поређењу са конвенционалним техникама екстракције (Хоржић и сар., 2012). Silva и сар. (2007) су такође указали на негативан утицај високе температуре на принос флавоноида у екстрактима. Ниже вредности садржаја укупних флавоноида добијене у екстракцији на повишеној температури указују на већу осетљивост флавоноида на високе температуре него на ултразвучне таласе. Приказани резултати фаворизују употребу ултразвучних таласа у екстракцији мајчине душице, посебно за добијање екстраката богатих флавоноидима.

Слика 4.5. приказује комбиноване ефекте односа дрога:растварач, врсте растварача и времена микроталасне екстракције на садржај укупних флавоноида мајчине душице. Повећањем односа дрога:растварач у екстракционом медијуму долази до значајног повећања садржаја флавоноида у екстрактима. Могући разлог ове појаве јесте већа запремина екстракционог медијума који раствара већу количину флавоноида, што доводи до бољег приноса екстракције (Zhang и сар., 2013). Повећање процента етанола у екстракционом медијуму доводи до значајног повећања концентрације флавоноида у екстрактима. Врста растварача представља важан параметар у микроталасној екстракцији, јер утиче на апсорпцију микроталасне енергије и растворљивост жељених компонената (Zhang и сар., 2013). Добијени резултати су у складу са литературним подацима где је највећи принос флавоноида врсте *A. millefolium* постигнут повећањем односа дрога:растварач и удела етанола у екстракционом медијуму (Милутиновић и сар., 2015). Поред тога, приликом екстракције флавоноида врсте *Epimedium sagittatum* повећање удела етанола до 60% узроковало је значајно повећање садржаја флавоноида у екстрактима, док је са даљим повећањем процента етанола дошло до пада приноса флавоноида. У истој студији је потврђено да се повећањем односа дрога:растварач повећава концентрација флавоноида у екстрактима (Zhang и сар., 2013). Време екстракције у микроталасном реактору није имало статистички значајан утицај на садржај укупних флавоноида мајчине душице, што је у складу са резултатима добијеним приликом испитивања садржаја полифенола.



Слика 4.5. Ефекти фактора на садржај укупних флавоноида у микроталасној екстракцији мајчине душице: (А) однос растварач:дрога и врста растварача, (Б) однос растварач:дрога и време и (В) врста растварача и време; *CE*, еквивалент катехина

4.2. Резултати хемијске карактеризације екстраката мајчине душице (*LC/DAD/MS* и *HPLC/DAD*)

У циљу хемијске карактеризације екстраката мајчине душице примењене су две хроматографске методе: *LC/DAD/MS* и *HPLC*/*DAD* метода.

Употребом *LC/DAD/MS* методе, у изабраном екстракту мајчине душице идентификовано је девет полифенолних компонената (табела 4.7). Према добијеним УВ спектрима, полифеноли су класификовани у две групе: деривати кафене киселине и флавоноиди. Деривати кафене киселине идентификовани у поменутом екстракту су хлорогенска, кафена, розмаринска и салвианолна киселина (K и I). Са друге стране, идентификовани флавоноиди су 6,8-ди-*C*-глукозилапигенин, 6-хидроксилутеолин 7-*O*-глукозид, лутеолин 7-*O*-глукуронид и апигенин-глукуронид. Спектрални подаци о идентификованим компонентама су у складу са литературним подацима (Beer и сар., 2011; Kozics и сар., 2013; Peng и сар., 2003).

HPLC/*DAD* метода је примењена у циљу одређивања садржаја идентификованих појединачних фенолкарбоксилних киселина и флавоноида у одабраним екстрактима мајчине душице. Резултати су приказани у табели 4.8а за течне екстракте и табели 4.8б за лиофилизоване екстракте коришћене у методи за испитивање спазмолитичне активности. *HPLC* хроматограми одабраних течних екстраката мајчине душице представљени су у прилогу 3.

У свим течним екстрактима најдоминантнија фенолкарбоксилна киселина била је розмаринска киселина, праћена салвианолном киселином (K и I). Концентрација кафене киселине је била знатно мања, док је хлорогенска киселина била присутна у траговима. Boros и сар. (2010) су такође показали да је розмаринска киселина доминантна компонента у *Thymus* врстама. Са аспекта концентрације флавоноида у течним екстрактима, највећи садржај су имали деривати лутеолина (лутеолин 7-*O*-глукуронид и 6-хидроксилутеолин 7-*O*-глукозид), праћени апигенин-глукуронидом, док је 6,8-ди-*C*-глукозилапигенин био присутан у ниским концентрацијама, што је у складу са литературним подацима (Boros и сар., 2010; Miron и сар., 2011; Fecka и Turek, 2008).

Табела 4.7. Идентификовани полифеноли у одабраном течном екстракту мајчине душице са молекулским масама и формулама (*LC/DAD/MS* метода)

				DAD		*MS*	
Пик	**Ретенционо време [минути]**	**Једињења**	**Класа једињења**	**λ_{max} [nm]**	**Врсте**	**Маса**	**Молекулска формула**
1	6,93	6,8-ди-*C*-глукозил апигенин	флавоноиди	236, 278, 326	M-H, 2M-H	594,2	$C_{27}H_{30}O_{15}$
2	6,96	хлорогенска киселина	деривати кафене киселине	302sh, 324	M-H, M+HCOO, 2M-H	354,1	$C_{16}H_{18}O_9$
3	8,27	6-хидрокси лутеолин 7-*O*-глукозид	флавоноиди	284, 342	M-H, 2M-H	464,1	$C_{21}H_{20}O_{12}$
4	8,33	кафена киселина	деривати кафене киселине	300sh, 328	M-H, 2M-H	180,0	$C_9H_8O_4$
5	9,57	лутеолин 7-*O*-глукуронид	флавоноиди	256, 268sh, 342	M-H, M+HCOO, M+Cl, 2M-H	462,1	$C_{21}H_{18}O_{12}$
6	11,12	апигенин-глукуронид	флавоноиди	268, 334	M-H, 2M-H	446,1	$C_{21}H_{18}O_{11}$
7	11,44	салвианолна киселина К	деривати кафене киселине	286, 332	M-H, M+HCOO, 2M-H	556,1	$C_{27}H_{24}O_{13}$
8	11,75	розмаринска киселина	деривати кафене киселине	294, 330	M-H, M+HCOO, M+Cl, 2M-H	360,1	$C_{18}H_{16}O_8$
9	12,44	салвианолна киселина I	деривати кафене киселине	294, 326	M-H	538,1	$C_{27}H_{22}O_{12}$

Највећи садржај 6-хидроксилутеолин 7-*О*-глукозида, лутеолин 7-*О*-глукуронида, кафене, салвианолне киселине К, розмаринске и салвианолне киселине I, одређен је у течном екстракту добијеном ултразвучном сондом. Са друге стране, течни екстракт добијен на повишеној температури имао је највећи садржај апигенин-глукуронида, док је концентрација 6,8-ди-*C*-глукозилапигенина била иста код узорака добијених повишеном температуром и ултразвучном сондом.

Табела 4.8а. Концентрације идентификованих полифенола у одабраним течним екстрактима мајчине душице (*HPLC/DAD* метода)

	Концентрација идентификованих полифенола [μg/mL]			
	Технике екстракције			
Идентификована једињења	**Мацерација**	**Повишена температура**	**Ултразвучно купатило**	**Ултразвучна сонда**
6,8-ди-*C*-глукозилапигенин	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,02
хлорогенска киселина	у траговима	у траговима	у траговима	у траговима
6-хидрокси лутеолин 7-*O*-глукозид	0,53 ± 0,06	0,66 ± 0,07	0,57 ± 0,08	**0,78 ± 0,05**
кафена киселина	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,01	**0,16 ± 0,02**
лутеолин 7-*O*-глукуронид	1,48 ± 0,11	1,89 ± 0,22	2,01 ± 0,11	**2,04 ± 0,15**
апигенин-глукуронид	0,34 ± 0,04	**0,38 ± 0,05**	0,28 ± 0,04	0,29 ± 0,03
салвианолна киселина K	0,77 ± 0,11	0,93 ± 0,13	0,66 ± 0,08	**0,97 ± 0,06**
розмаринска киселина	3,73 ± 0,32	4,06 ± 0,43	2,77 ± 0,22	**4,18 ± 0,21**
салвианолна киселина I	0,97 ± 0,08	0,94 ± 0,14	1,14 ± 0,07	**1,21 ± 0,14**

У одабраним лиофилизованим екстрактима врсте *T. serpyllum* такође је компонента са највећим садржајем била розмаринска киселина, праћена лутеолин 7-*O*-глукуронидом. Примећен је нижи садржај салвианолне киселине (K и I) и 6-хидроксилутеолин 7-*O*-глукозида, праћен значајно нижим концентрацијама кафене киселине и апигенин-глукуронида. Флавоноид 6,8-ди-*C*-глукозилапигенин био је присутан у веома ниским концентрацијама, док је у поменутим екстрактима хлорогенска киселина примећена у траговима. Ипак, за разлику од течних екстраката, садржај кафене киселине у лиофилизованим екстрактима био је већи него садржај апигенин-глукуронида и 6,8-ди-*C*-глукозилапигенина. Занимљиво је да долази до промене у уделу одређених једињења након процеса лиофилизације.

Тако лутеолин 7-*О*-глукуронид, салвианолна киселина I, 6-хидроксилутеолин 7-*О*-глукозида, а посебно кафена киселина, имају већи удео у осушеним екстрактима, него у течним узорцима. Са друге стране, удео флавоноида апигенин-глукуронида и 6,8-ди-*С*-глукозилапигенина се смањио након процеса сушења. Лиофилизован екстракт добијен мацерацијом имао је највећи садржај 6-хидроксилутеолин 7-*О*-глукозида, лутеолин 7-*О*-глукуронида, кафене, розмаринске и салвианолне киселине (К и I). Највећи садржај 6,8-ди-*С*-глукозилапигенина забележен је у лиофилизованим екстрактима добијеним повишеном температуром и ултразвучном сондом, као у случају течних екстраката. Са друге стране, највећа концентрација апигенин-глукуронида одређена је у лиофилизованом екстракту добијеном микроталасима.

Табела 4.8б. Концентрације идентификованих једињења у одабраним лиофилизованим екстрактима мајчине душице (*HPLC/DAD* метода)

	Концентрација идентификованих полифенола [µg/g]			
	Технике екстракције			
Идентификована једињења	**Мацерација**	**Повишена температура**	**Ултразвучна сонда**	**Микроталаси**
6,8-ди-*С*-глукозилапигенин	0,42 ± 0,03	0,62 ± 0,04	0,62 ± 0,05	0,09 ± 0,01
хлорогенска киселина	у траговима	у траговима	у траговима	у траговима
6-хидрокси лутеолин 7-*О*-глукозид	**6,45 ± 0,52**	6,23 ± 0,42	6,07 ± 0,36	0,45 ±
кафена киселина	**3,29 ± 0,19**	3,04 ± 0,24	3,27 ± 0,32	2,43 ± 0,21
лутеолин 7-*О*-глукуронид	**18,57 ± 2,11**	18,08 ± 1,02	17,77 ± 1,5	1,11 ±
апигенин-глукуронид	1,68 ± 0,14	1,50 ± 0,12	1,62 ± 0,2	**2,51 ± 0,18**
салвианолна киселина К	**6,47 ± 0,54**	6,14 ± 0,58	6,45 ± 0,49	0,00
розмаринска киселина	**31,60 ± 2,8**	29,72 ± 2,1	30,43 ± 3,1	10,13 ± 1,5
салвианолна киселина I	**9,31 ± 0,84**	8,76 ± 0,68	9,10 ± 0,84	0,00

4.3. Биолошке активности екстраката мајчине душице

4.3.1. Антиоксидативна активност екстраката мајчине душице

Антиоксидативни капацитет екстраката мајчине душице испитан је употребом три теста (*ABTS*, *DPPH* и тест инхибиције оксидативне деградације β-каротена). Узимајући у обзир да су сва три теста заснована на различитим принципима и реакцијама, могуће је добити различите резултате антиоксидативне активности екстраката и бољи увид у њихова антиоксидативна својства.

У мацерацији, екстракцији на повишеној температури и ултразвучним таласима, утицај степена уситњености (0,3, 0,7 и 1,5 mm), односа дрога:растварач (1:10, 1:20 и 1:30), врсте растварача (30, 50 и 70% етанол и вода) и времена екстракције (5, 15, 30, 60 и 90 минута за мацерацију и 5, 15 и 30 минута за екстракцију на повишеној температури и ултразвучним таласима) на антиоксидативну активност екстраката испитану у *ABTS* и *DPPH* тестовима, приказан је у табелама 4.9а и 4.9б.

Табела 4.9а. Утицај услова екстракције на антиоксидативну активност екстраката мајчине душице добијених мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и ултразвучним таласима (***ABTS*** тест)

Фактор	Ниво	**Антиоксидативна активност [mmol *Trolox*/mL]**			
		Технике екстракције			
		Мацерација	**Повишена температура**	**Ултразвучно купатило**	**Ултразвучна сонда**
Степен уситњености [mm]	0,3	10,5 ± 1,5^{а}	11,9 ± 1,8^{а}	13,1 ± 1,7^{а}	11,3 ± 1,0^{а}
	0,7	10,4 ± 1,6^{а}	11,0 ± 1,0^{а}	10,5 ± 1,4^{б}	10,1 ± 0,4^{б}
	1,5	10,2 ± 1,6^{а}	9,9 ± 0,6^{б}	7,8 ± 1,0^{в}	8,5 ± 1,5^{в}
Однос дрога: растварач	1:10	8,3 ± 1,2^{в}	8,3 ± 1,3^{в}	8,5 ± 1,0^{в}	7,7 ± 1,8^{в}
	1:20	11,2 ± 1,3^{б}	11,1 ± 1,1^{б}	10,6 ± 1,7^{б}	10,5 ± 0,7^{б}
	1:30	13,3 ± 1,9^{а}	13,4 ± 1,4^{а}	12,7 ± 1,9^{а}	11,7 ± 1,0^{а}
Врста растварача [% етанола]	30	11,4 ± 1,3^{б}	11,9 ± 0,8^{а}	10,7 ± 1,5^{а}	10,3 ± 0,4^{б}
	50	13,0 ± 1,3^{а}	12,8 ± 1,4^{а}	11,2 ± 1,8^{а}	11,7 ± 1,1^{а}
	70	11,1 ± 1,4^{б}	12,1 ± 1,1^{а}	10,8 ± 2,2^{а}	11,0 ± 0,7^{аб}
	вода	8,2 ± 0,8^{в}	6,8 ± 1,2^{б}	9,1 ± 1,2^{б}	6,8 ± 4,2^{в}
Време екстракције [минути]	5	8,5 ± 1,2^{в}	10,2 ± 0,2^{б}	9,6 ± 1,8^{б}	9,7 ± 0,4^{а}
	15	10,6 ± 1,3^{б}	10,7 ± 0,6^{б}	10,8 ± 1,7^{а}	10,1 ± 1,2^{а}
	30	11,4 ± 1,2^{аб}	11,8 ± 0,2^{а}	10,9 ± 1,8^{а}	10,1 ± 0,7^{а}
	60	12,0 ± 1,1^{а}	-	-	-
	90	12,0 ± 1,4^{а}	-	-	-

Вредности са истим словом у експоненту (а-в) у свакој колони показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

Табела 4.9б. Утицај услова екстракције на антиоксидативну активност екстраката мајчине душице добијених мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и ултразвучним таласима (***DPPH*** тест)

Фактор	Ниво	**Антиоксидативна активност IC_{50} [mg/mL]**			
		Технике екстракције			
		Мацерација	**Повишена температура**	**Ултразвучно купатило**	**Ултразвучна сонда**
Степен уситњености [mm]	0,3	$3,4 \pm 0,7^{а}$	$3,0 \pm 0,3^{а}$	$2,1 \pm 0,3^{а}$	$2,7 \pm 0,2^{а}$
	0,7	$3,4 \pm 0,4^{а}$	$3,5 \pm 0,5^{аб}$	$2,7 \pm 0,4^{б}$	$2,8 \pm 0,5^{а}$
	1,5	$3,8 \pm 0,6^{б}$	$3,7 \pm 0,1^{б}$	$2,8 \pm 0,3^{б}$	$2,9 \pm 0,4^{а}$
Однос дрога: растварач	1:10	$4,3 \pm 0,9^{б}$	$4,2 \pm 0,3^{б}$	$3,1 \pm 0,4^{б}$	$3,2 \pm 0,1^{б}$
	1:20	$3,3 \pm 0,3^{а}$	$3,3 \pm 0,7^{а}$	$2,5 \pm 0,3^{а}$	$2,7 \pm 0,4^{а}$
	1:30	$3,1 \pm 0,4^{а}$	$2,8 \pm 0,6^{а}$	$2,3 \pm 0,2^{а}$	$2,5 \pm 0,3^{а}$
Врста растварача [% етанола]	30	$3,7 \pm 0,1^{в}$	$2,5 \pm 0,2^{а}$	$2,4 \pm 0,2^{а}$	$2,4 \pm 0,6^{б}$
	50	$2,7 \pm 0,4^{а}$	$2,3 \pm 0,4^{а}$	$2,3 \pm 0,2^{а}$	$2,0 \pm 0,1^{а}$
	70	$3,4 \pm 0,1^{б}$	$2,4 \pm 0,1^{а}$	$2,4 \pm 0,3^{а}$	$2,0 \pm 0,2^{а}$
	вода	$4,3 \pm 0,3^{г}$	$4,5 \pm 1,2^{б}$	$3,2 \pm 0,4^{б}$	$4,7 \pm 0,8^{в}$
Време екстракције [минути]	5	$4,4 \pm 0,4^{б}$	$3,6 \pm 0,2^{б}$	$2,9 \pm 0,3^{б}$	$3,0 \pm 0,4^{а}$
	15	$3,4 \pm 0,3^{а}$	$3,6 \pm 0,3^{б}$	$2,6 \pm 0,3^{а}$	$2,7 \pm 0,4^{а}$
	30	$3,2 \pm 0,2^{а}$	$3,0 \pm 0,2^{а}$	$2,5 \pm 0,4^{а}$	$2,8 \pm 0,7^{а}$
	60	$3,2 \pm 0,4^{а}$	-	-	-
	90	$3,5 \pm 0,4^{а}$	-	-	-

Вредности са истим словом (а-г) у експоненту у свакој колони показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест); IC_{50}, концентрација екстракта која неутралише 50% слободног *DPPH* радикала

Приликом мацерације, степен уситњености није утицао на способност екстраката да неутралишу слободан *ABTS* радикал, док је екстракт добијен применом честица од 1,5 mm показао статистички значајно нижи степен неутрализације *DPPH* радикала (табеле 4.9а и 4.9б). На повишеној температури, у оба теста, честице величине 0,3 и 0,7 mm дале су екстракте са значајно бољом антиоксидативном активношћу, у поређењу са степеном уситњености од 1,5 mm. У оба теста, најбоља антиоксидативна активност екстраката из ултразвучног купатила постигнута је применом степена уситњености 0,3 mm, док је најнижа антиоксидативна активност забележена у екстрактима добијеним применом честица од 1,5 mm. У поменутим екстрактима, у *ABTS* тесту видљива је статистички значајна разлика између различитих нивоа степена уситњености, док у неутрализацији *DPPH* радикала није било статистички значајне разлике између 0,7 и 1,5 mm, као и у случају садржаја укупних полифенола (поглавље 4.1.1). Приликом екстракције ултразвучном сондом, у *ABTS* тесту, највећи антиоксидативни капацитет је поседовао екстракт добијен применом честица величине 0,3 mm, док су најнижу антиоксидативну активност показали екстракти са биљним материјалом степена уситњености 1,5 mm. Ипак, приликом неутрализације слободног *DPPH* радикала, величина честица није статистички значајно утицала на антиоксидативни капацитет екстраката добијених ултразвучном сондом, што је у складу са поменутим садржајем укупних полифенола (поглавље 4.1.1).

У мацерацији, екстракцији на повишеној температури и ултразвучним таласима степен уситњености 0,3 mm дао је екстракте са највећим антиоксидативним капацитетом, док су екстракти добијени применом честица од 1,5 mm показали нижи степен антиоксидативне активности. Добијени резултати су у складу са садржајем укупних полифенола и литературним подацима, где је оптимална величина честица за максималну антиоксидативну активност екстраката врсте *Quercus robur* била 0,5 mm (Bouras и сар., 2015).

Утицај услова микроталасне екстракције: степен уситњености (0,3, 0,7 и 1,5 mm), однос дрога:растварач (1:10, 1:12, 1:16, 1:25 и 1:40), врста растварача (12, 30, 48 и 60% етанол и вода) и време (10, 46, 100, 154 и 190 секунди) на антиоксидативни капацитет екстраката мајчине душице, испитан у *ABTS* и *DPPH* методама, приказан је у табели 4.9в.

Као што се може видети у табели 4.9в, приликом неутрализације слободних *ABTS* и *DPPH* радикала, у екстрактима добијеним микроталасима није било статистички значајне разлике између различитих степена уситњености, што је у складу са претходно приказаним вредностима укупних полифенола (поглавље 4.1.1). Према литературним подацима, приликом микроталасне екстракције антиоксидативних компонената врсте *P. pinaster* величина честица биљног материјала није имала статистички значајан утицај на принос поменутих једињења (Chupin и сар., 2015).

Табела 4.9в. Утицај услова микроталасне екстракције на антиоксидативну активност екстраката мајчине душице (***ABTS*** и ***DPPH*** тест)

Фактор	Ниво	**Антиоксидативна активност**	
		***ABTS* [mmol *Trolox*/mL]**	***DPPH*** IC_{50} **[mg/mL]**
Степен уситњености [mm]	0,3	20,7 ± 0,5^{а}	1,2 ± 0,1^{а}
	0,7	19,9 ± 1,3^{а}	1,1 ± 0,0^{а}
	1,5	19,8 ± 1,1^{а}	1,1 ± 0,1^{а}
Однос дрога: растварач	1:10	15,6 ± 0,6^{г}	2,1 ± 0,2^{в}
	1:12	15,2 ± 1,8^{г}	1,8 ± 0,4^{в}
	1:16	18,6 ± 1,3^{в}	1,6 ± 0,2^{б}
	1:25	20,2 ± 1,2^{б}	1,3 ± 0,1^{а}
	1:40	24,9 ± 0,2^{а}	1,3 ± 0,0^{а}
Врста растварача [% етанола]	12	15,1 ± 1,3^{б}	1,8 ± 0,4^{бв}
	30	19,7 ± 1,1^{а}	1,6 ± 0,2^{б}
	48	20,3 ± 0,9^{а}	1,5 ± 0,3^{б}
	60	21,8 ± 0,5^{а}	1,1 ± 0,1^{а}
	вода	12,4 ± 0,4^{в}	1,9 ± 0,1^{в}
Време екстракције [секунде]	10	19,0 ± 1,2^{а}	1,5 ± 0,3^{а}
	46	17,3 ± 2,4^{а}	1,7 ± 0,4^{а}
	100	18,9 ± 1,5^{а}	1,6 ± 0,4^{а}
	154	18,1 ± 0,7^{а}	1,6 ± 0,3^{а}
	190	19,6 ± 1,5^{а}	1,6 ± 0,0^{а}

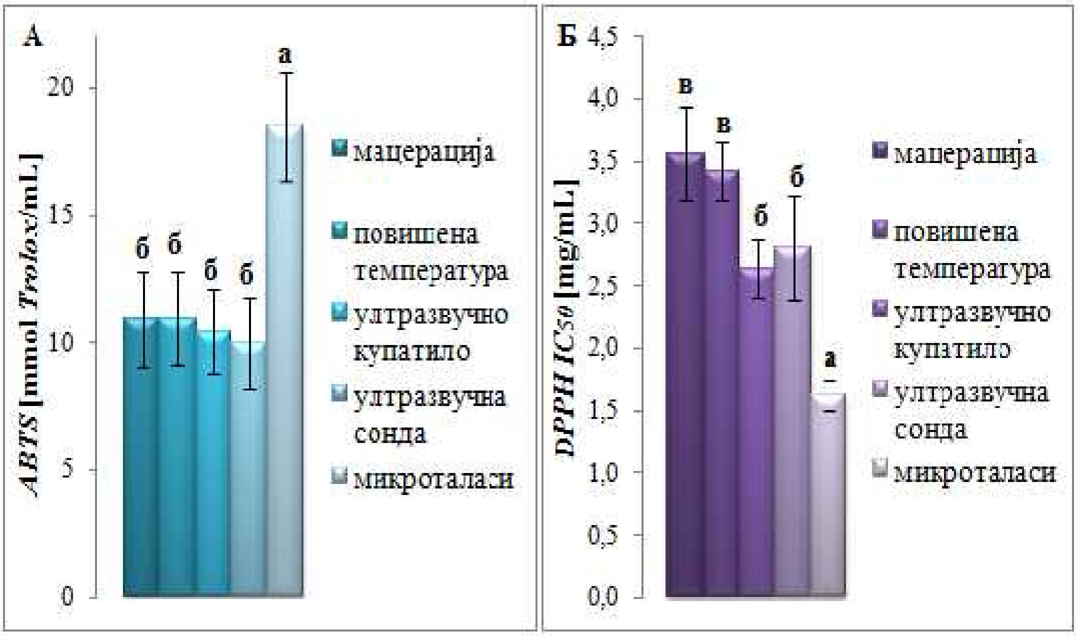
Вредности са истим словом (а-г) у експоненту у свакој колони показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест); IC_{50}, концентрација која неутралише 50% слободног радикала

Као што је приказано у табели 4.9а, у *ABTS* тесту антиоксидативна активност екстраката мајчине душице добијених мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и ултразвучним таласима расла је са повећањем запремине растварача, тако да је најбољи резултат постигнут при односу дрога:растварач 1:30, а најлошији при односу 1:10, што је у складу са садржајем полифенола (поглавље 4.1.2). Са друге стране, у поменутим техникама екстракције приликом неутрализације *DPPH* радикала није постојала статистички значајна разлика између 1:20 и 1:30 односа, док је приликом примене веће количине биљног материјала (однос 1:10) антиоксидативна активност била значајно нижа (табела 4.9б). Приликом микроталасне екстракције, повећање односа дрога:растварач довело је до повећања антиоксидативног капацитета екстраката, тако да су најбољу антиоксидативну активност остварили екстракти добијени применом односа дрога:растварач 1:40, док је најслабија активност показана при односима 1:10 и 1:12, у оба антиоксидативна теста (табела 4.9в). Ипак, приликом поменуте технике екстракције, *DPPH* тест није показао статистички значајну разлику између односа 1:30 и 1:40. Према литературним подацима, способност екстракта врсте *Z. lotus* да неутралише слободне радикале такође је расла са порастом односа дрога:растварач (Hammi и сар., 2015).

У мацерацији 50% етанолни екстракти су показали највећи антиоксидативни капацитет, док су водени екстракти имали најмању антиоксидативну активност, у оба теста (табеле 4.9а и 4.9б). Приликом екстракције на повишеној температури није било статистички значајне разлике између антиоксидативних активности различитих етанолних екстраката, док је водени екстракт показао статистички значајно мањи антиоксидативни капацитет, у оба теста. Такође, између етанолних екстраката добијених у ултразвучном купатилу није постојала статистички значајна разлика у способности неутрализације *ABTS* и *DPPH* радикала, док су водени екстракти имали значајно нижу антиоксидативну активност, што је у складу са претходно приказаним резултатима приноса полифенола (поглавље 4.1.3). Етанолни екстракти (50 и 70%) добијени ултразвучном сондом нису се међусобно разликовали по питању неутрализације слободних *ABTS* и *DPPH* радикала, док су водени екстракти поново показали значајно нижи ниво антиоксидативне активности. Додатно, у оба теста, водени екстракти из микроталасног реактора показали су најслабију антиоксидативну активност, док су 60% етанолни екстракти постигли највећи антиоксидативни капацитет (табела 4.9в). Ипак, у *ABTS* тесту није постојала статистички значајна разлика у антиоксидативном потенцијалу између микроталасних екстраката добијених применом 30, 48 и 60% етанола, док резултати *DPPH* теста указују да не постоји значајна разлика између 12, 30 и 48% етанола. Miron и сар. (2011) су такође показали да је антиоксидативна активност етанолних екстраката мајчине душице била виша у односу на водене екстракте, док статистички значајних разлика између 25, 50 и 75% етанолних екстраката није било.

Екстракти мајчине душице добијени након петоминутне мацерације били су лош извор антиоксидативних полифенолних компонената, док је са продуженим временом екстракције расла антиоксидативна активност (табеле 4.9а и 4.9б). Ипак, у *ABTS* тесту тренд је био следећи: $5 < 15 \leq 30 \leq 60$ и 90. У *DPPH* тесту уочено је да након 15, 30, 60 и 90 минута није било статистички значајне разлике у антиоксидативном капацитету, што је у складу са претходно измереним приносом полифенола (поглавље 4.1.4). Приликом екстракције на повишеној температури, у оба теста, екстракти са највећим антиоксидативним капацитетом добијени су након 30 минута, док између 5 и 15 минута није било статистички значајне разлике. Екстракти добијени након 30 минута екстракције у ултразвучном купатилу показали су статистички значајно бољу антиоксидативну активност, у поређењу са екстрактима добијеним након 5 минута, док између 15 и 30 минута екстракције није било статистички значајне разлике. Приликом полифенолне екстракције жутог чаја, најмањи антиоксидативни капацитет је поседовао екстракт добијен након троминутне ултразвучне екстракције, док је највиша антиоксидативна активност постигнута у 30. минуту екстракције (Хоржић и сар., 2012). Време није статистички значајно утицало на антиоксидативни капацитет екстраката добијених ултразвучном сондом, а такав је био случај и са приносом полифенола (поглавље 4.1.4). Време микроталасне екстракције такође није статистички значајано утицало на антиоксидативни потенцијал екстраката (табела 4.9в), што је у складу са добијеним резултатима садржаја укупних полифенола и флавоноида (поглавља 4.1.4 и 4.1.7).

Утицај екстраката врсте *T. serpyllum* добијених различитим методама екстракције на неутрализацију слободних *ABTS* и *DPPH* радикала, приказан је на слици 4.6. У *ABTS* тесту нису постојале разлике између екстраката добијених мацерацијом, повишеном температуром, у ултразвучном купатилу и ултразвучном сондом (10,9, 10,9, 10,0 и 10,4 mmol *Trolox*/mL), док су екстракти добијени микроталасима имали статистички значајно бољу активност у неутрализацији слободних *ABTS* радикала (18,5 mmol *Trolox*/mL). Приликом неутрализације *DPPH* радикала, екстракти добијени мацерацијом и повишеном температуром су показали значајно нижи ниво антиоксидативне активности (IC_{50} 3,6 и 3,4 mg/mL), док су у односу на њих екстракти добијени у ултразвучном купатилу и ултразвучном сондом имали већи антиоксидативни капацитет (IC_{50} 2,6 и 2,8 mg/mL). Поново су екстракти добијени у микроталасном реактору показали најснажнију антиоксидативну активност (IC_{50} 1,6 mg/mL), што је у складу са највећим садржајем полифенола присутним у поменутим екстрактима (поглавље 4.1.5).

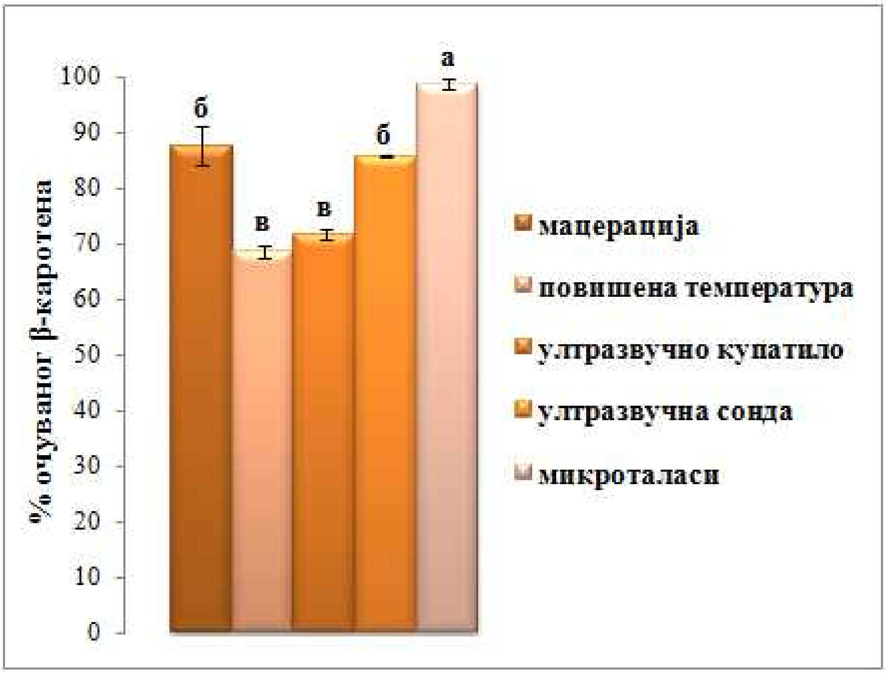


Слика 4.6. Графички приказ утицаја екстраката мајчине душице на неутрализацију слободних (А) *ABTS* и (Б) *DPPH* радикала; различита слова у свакој колони (а-в) показују да постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p < 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест); IC_{50}, концентрација која неутралише 50% слободног радикала

Miron и сар. (2011) су показали да фенолкарбоксилне киселине (розмаринска, ванилинска, *p*-кумаринска и хлорогенска киселина) и флавоноиди (лутеолин-глукуронид, ериодиктиол-глукуронид и апигенин-глукуронид) имају важну улогу у укупном антиоксидативном капацитету мајчине душице.

Утицај лиофилизованих екстраката мајчине душице (екстракти са највећим садржајем полифенола из свих испитаних техника екстракције) на инхибицију оксидативне деградације β-каротена приказан је графички на слици 4.7.

Највећу ефикасност у супресији оксидативне деградације, у емулзији β-каротена и линолне киселине, показао је екстракт добијен микроталасима, где је степен очуваног β-каротена износио 99%, статистички значајно више него код осталих метода екстракције. Поред тога, екстракти добијени мацерацијом и ултразвучном сондом остварили су значајну антиоксидативну активност у поменутом тесту, инхибирајући деградацију β-каротена за 88%, односно за 86%. Са друге стране, екстракти добијени повишеном температуром и у ултразвучном купатилу сачували су 69%, односно 72% β-каротена, статистички значајно мање него претходно поменути екстракти.



Слика 4.7. Графички приказ утицаја екстраката мајчине душице на инхибицију оксидативне деградације β-каротена; различита слова у свакој колони (а-в) показују да постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p < 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

Екстракт мајчине душице добијен микроталасима очувао је већи проценат β-каротена, чак и у поређењу са етарским уљима тимијана и босиљка (Saccheti и сар., 2004). Према Николић и сар. (2014), етарско уље мајчине душице је показало најбољу антиоксидативну активност у инхибицији оксидативне деградације β-каротена, при поређењу активности етарских уља различитих врста рода *Thymus*. Према литературним подацима, неполарни антиоксиданси испољавају јачу антиоксидативну активност у емулзијама, јер се концентришу на додирној површини липида и ваздуха, обезбеђујући висок ниво заштите (Кулишић и сар., 2006).

4.3.2. Антимикробна активност екстраката мајчине душице

Антимикробна активност пет одабраних лиофилизованих екстраката мајчине душице (екстракти са највећим садржајем укупних полифенола из сваке примењене технике екстракције) испитана је на четири Грам-позитивне и три Грам-негативне бактерије (*B. cereus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* и *Y. enterocolitica*), као и на једном соју гљивица (*C. albicans*). Резултати антимикробног потенцијала лиофилизованих екстраката у микродилуционом тесту приказани су у табели 4.10.

Табела 4.10. Антимикробна активност одабраних екстраката мајчине душице (микродилуциони тест)

Врсте микроорганизама	Технике екстракције									
	Мацерација		**Повишена температура**		**Ултразвучно купатило**		**Ултразвучна сонда**		**Микроталаси**	
	MIC [mg/mL]	*MBC*/*MFC* [mg/mL]	*MIC* [mg/mL]	*MBC*/*MFC* [mg/mL]	*MIC* [mg/mL]	*MBC*/*MFC* [mg/mL]	*MIC* [mg/mL]	*MBC*/*MFC* [mg/mL]	*MIC* [mg/mL]	*MBC*/*MFC* [mg/mL]
Bacillus cereus	**0,313**	2,5	1,25	2,5	0,625	5	1,25	5	0,625	5
Enterococcus faecalis	0,313	5	0,313	5	0,313	5	0,313	5	0,313	**2,5**
Listeria monocytogenes	0,625	2,5	0,625	2,5	0,625	2,5	1,25	2,5	**0,313**	5
Staphylococcus aureus	1,25	**1,25**	1,25	10	1,25	10	1,25	10	**0,625**	5
Escherichia coli	5	5	5	5	5	5	5	5	**2,5**	10
Salmonella enteritidis	2,5	5	5	5	5	5	5	5	2,5	**2,5**
Yersinia enterocolitica	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25	10	1,25	5	1,25	10
Candida albicans	20	/	20	/	20	/	20	/	**10**	/

MIC, минимална инхибиторна концентрација; *MBC*/*MFC*, минимална бактерицидна/фунгицидна концентрација

Екстракти врсте *T. serpyllum* су показали антибактеријску активност против свих испитаних бактеријских сојева. Методом мацерације добијен је екстракт чија антибактеријска активност прати следећи тренд: *B. cereus* и *E. faecalis* > *L. monocytogenes* > *S. aureus* и *Y. enterocolitica* > *S. enteritidis* > *E. coli*. Поменути екстракт је имао најснажнију бактерицидну активност према *S. aureus*, затим *L. monocytogenes*, *B. cereus* и *Y. enterocolitica*, док је при вишим концентрацијама остварена бактерицидна активност према *E. faecalis*, *E. coli* и *S. enteritidis*. Екстракт добијен на повишеној температури у најмањој концентрацији инхибира раст *E. faecalis* > *L. monocytogenes* > *S. aureus*, *B. cereus* и *Y. enterocolitica* > *E. coli* и *S. enteritidis*. Најбоља бактерицидна активност овог екстракта остварена је против *L. monocytogenes*, *B. cereus* и *Y. enterocolitica*, при истим концентрацијама као у мацерацији, док је против *E. faecalis*, *E. coli* и *S. enteritidis* бактерицидна активност била слабија. При највишој тестираној концентрацији поменутог екстракта остварен је бактерицидни ефекат против *S. aureus*, што је било потпуно другачије од екстракта добијеног мацерацијом, који најбољу бактерицидну активност показује управо против овог бактеријског соја. Екстракт добијен у ултразвучном купатилу био је најефикаснији у инхибицији раста *E. faecalis* > *L. monocytogenes* и *B. cereus* > *S. aureus* и *Y. enterocolitica* > *E. coli* и *S. enteritidis*. Најснажнија бактерицидна активност овог екстракта примећена је против соја *L. monocytogenes*. Додатно, екстракт је показао исту бактерицидну активност против *E. faecalis*, *B. cereus*, *E. coli* и *S. enteritidis*, док је бактерицидни ефекат био постигнут највећом тестираном концентрацијом против *S. aureus* (идентично као код повишене температуре) и *Y. enterocolitica*. Као у случају претходне три методе екстракције, ултразвучном сондом је добијен екстракт који је најснажнију антибактеријску активност остварио против *E. faecalis* > *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* и *Y. enterocolitica* > *E. coli* и *S. enteritidis*. Највећа бактерицидна активност екстракта добијеног ултразвучном сондом постигнута је против *L. monocytogenes*, док је најлошија примећена код *S. aureus*. У оба случаја поменути екстракт се није разликовао од екстракта добијеног при повишеној температури. Умерена бактерицидна активност је остварена против *E. faecalis*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis* и *Y. enterocolitica*. Екстракти добијени деловањем микроталаса најснажније су инхибирали раст *L.*

monocytogenes и *E. faecalis* > *S. aureus* и *B. cereus* > *Y. enterocolitica* > *E. coli* и *S. enteritidis* (при нижим концентрацијама него код екстраката добијених повишеном температуром и ултразвучним таласима). Бактерицидна активност према *E. faecalis* и *S. enteritidis* је била остварена у нижој концентрацији него код претходно поменутих метода екстракције. Са друге стране, слабија бактерицидна активност је примећена против *S. aureus*, *L. monocytogenes* и *B. cereus*, док је при релативно високим концентрацијама бактерицидни ефекат остварен против *E. coli* и *S. enteritidis*. Сви испитани екстракти су при истим ниским концентрацијама инхибирали раст бактеријског соја *E. faecalis*, док су најотпорније на ово дејство екстраката биле *E. coli* и *S. enteritidis*. Ипак, узорак добијен микроталасном екстракцијом при нижим концентрацијама у односу на остале екстракте инхибирао је раст две поменуте бактерије. Најбољу антибактеријску активност против *B. cereus* и бактерицидну активност против *S. aureus* остварио је екстракт добијен мацерацијом, статистички значајно бољу у поређењу са свим осталим испитаним екстрактима. Са друге стране, екстракт добијен микроталасима испољио је најбољу бактерицидну активност против *E. faecalis* и *S. enteritidis*, у поређењу са свим поменутим екстрактима. Ови закључци су веома важни због познатог повећања инциденце метицилин-резистентног *S. aureus* и мултирезистентне *E. coli*, како у храни, тако и у клиничким условима (Singh и сар., 2016). Према претходним студијама, етарско уље мајчине душице је показало највећу антибактеријску активност управо против *E. faecalis* и *S. aureus* (Николић и сар., 2014). Al-Fatimi и сар. (2010) су приказали снажну антибактеријску активност екстраката врсте *Thymus laevigatus* против соја *S. aureus*, уз умерену активност против *E. coli*. Слични резултати су постигнути алкохолним екстрактима врсте *T. vulgaris* (Fayad и сар., 2013).

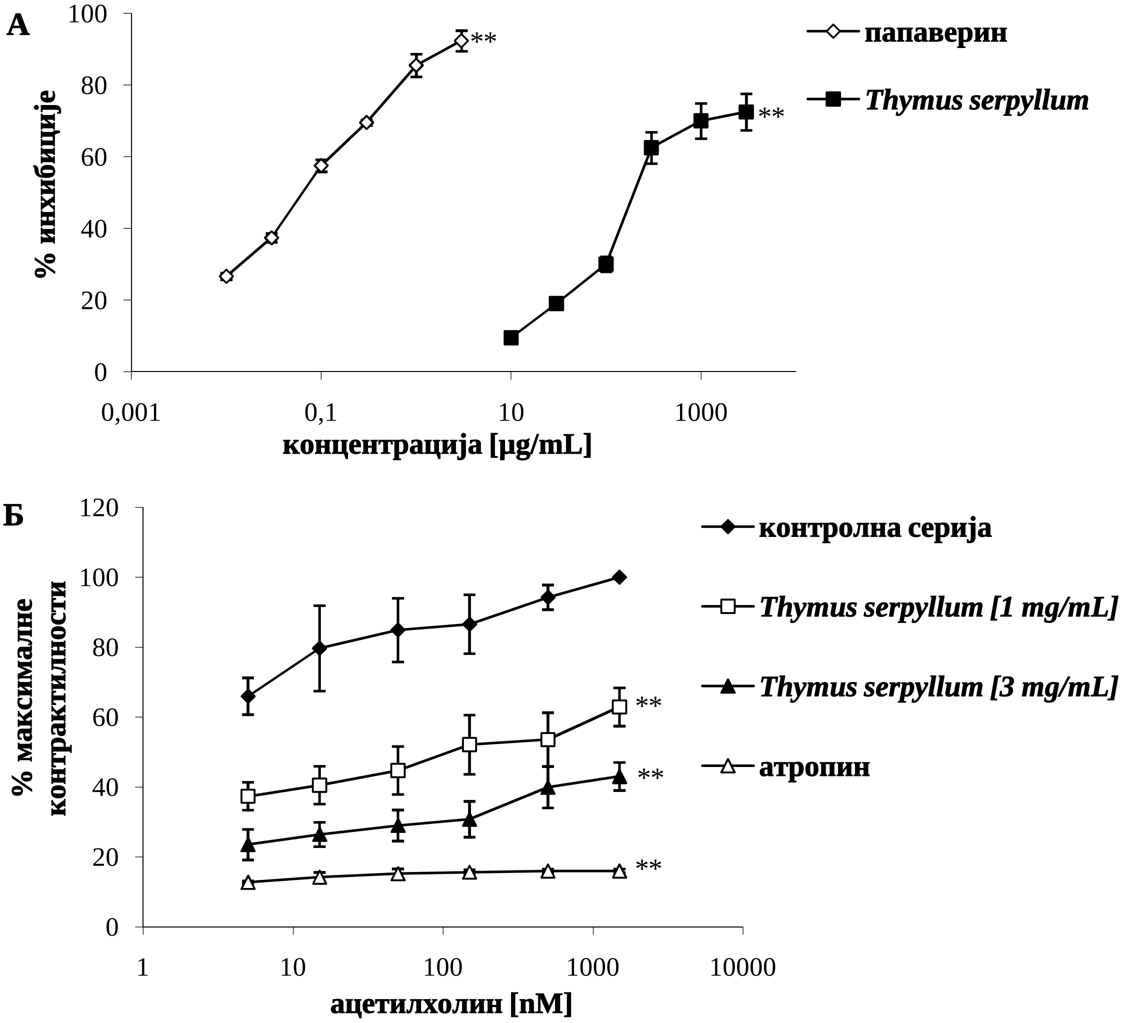
По питању антимикотичног ефекта, сви испитани екстракти мајчине душице су инхибирали раст соја *C. albicans* у релативно високој концентрацији (екстракт добијен микроталасима при концентрацији од 10 mg/mL, остали екстракти у концентрацији од 20 mg/mL), док ниједан екстракт није показао фунгицидно дејство у испитаним концентрацијама. Према литературним подацима, метанолни екстракти мајчине душице остварују умерену антимикотичну активност против *C. albicans* (Aziz и Rehman, 2008).

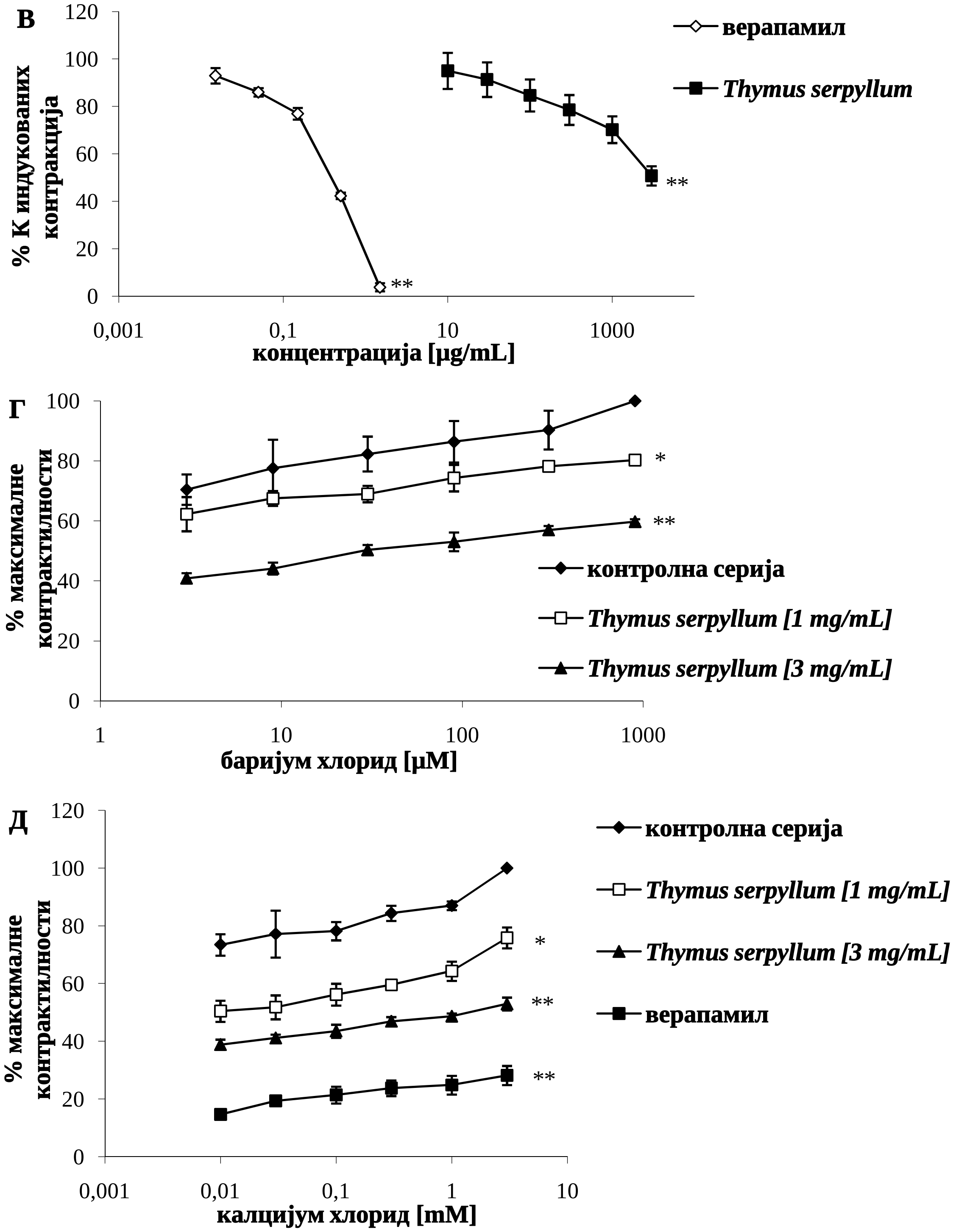
Полифенолне компоненте могу да утичу на раст и метаболизам микроорганизама у зависности од своје структуре и концентрације (Daglia, 2012; Rodríguez Vaquero и сар., 2007). Фенолкарбоксилне киселине испољавају антибактеријску активност против Грам-позитивних (*S. aureus* и *L. monocytogenes*) и Грам-негативних бактерија (*E. coli* и *P. aeruginosa*). Најдоминантнија фенолкарбоксилна киселина присутна у екстрактима мајчине душице јесте розмаринска киселина (естар кафене и 3,4-дихидроксифенил млечне киселине), која поседује различите биолошке активности попут антиоксидативне, антивирусне, антибактеријске, антиинфламаторне, антиканцерогене и имуностимулативне (Parnham и Kesselring, 1985; Petersen и Simmonds, 2003; Costa и сар., 2015). Розмаринска киселина је такође главна антимикробна компонента присутна у екстракту врсте *R. officinalis*, који остварује снажнију антибактеријску активност према Грам-позитивним, у односу на Грам-негативне бактерије (Moreno и сар., 2006). Метанолни екстракт врсте *Salvia veneris*, са розмаринском киселином као главном полифенолном компонентом, показује антимикробну активност против једног од највирулентнијих патогена у храни, *L. monocytogenes*, затим против *B. cereus*, *S. aureus* и *Candida* spp. (Toplan и сар., 2017). Хидроксициметне киселине, међу којима је кафена киселина (такође присутна у екстракту мајчине душице), инхибирају *E. coli* и *S. aureus* у релативно малој концентрацији (1 mg/mL), у односу на хидроксибензоеве киселине. Поменути ефекат остварују захваљујући мање поларном молекулу и олакшаном проласку кроз мембрану бактеријске ћелије (Rodríguez Vaquero и сар., 2007; Singh и сар., 2016). Захваљујући антибактеријском својству розмаринске и кафене киселине, екстракти ароматичних биљака представљају главне састојке зубних пасти и антисептичних течности за испирање усне дупље (Fayad и сар., 2013). Важно је напоменути да кафена киселина испољава и антимикотичну активност против *C. albicans* (Singh и сар., 2016). У поређењу са другим полифенолима, флавоноиди поседују шири спектар и снажнију антимикробну активност, захваљујући способности да неутралишу бактеријске токсине и да инхибирају формирање биофилма (Daglia, 2012). Значајна антимикробна активност екстраката врсте *Daucus littoralis* против *S. aureus* и *C. albicans* може бити повезана са флавоноидним компонентама које укључују лутеолин, такође присутан у већим количинама у екстракту мајчине душице (Yousefbeyk и сар., 2014). Поред тога, антибактеријска активност екстракта врсте *Achillea tenuifolia* против *B. subtilis* и *E. faecalis* је у корелацији са садржајем флавоноида, посебно деривата лутеолина (Shafaghat и сар., 2014). Екстракт врсте *Satureja thymbra*, богат флавонима лутеолином и апигенином, показује антибактеријску активност против Enterobacteriaceae spp. и *Pseudomonas* spp., док екстракт исте биљке богат розмаринском и салвианолном киселином поседује боља антиоксидативна својства (Choulitoudi и сар., 2016). С обзиром на комплексан хемијски састав, антибактеријска активност *Thymus* spp. приписује се присуству неколико типова једињења: фенолкарбоксилним киселинама, флавоноидима и taнинима. Ова једињења поседују хидроксилне групе и имају способност да формирају водоничне везе са молекулима воде у бактеријској ћелији (Al-Fatimi и сар., 2010; Ulukanli и сар., 2011; Fayad и сар., 2013). Додатно, хидрофобне флавоноидне компоненте интереагују са ћелијском мембраном бактерије и на тај начин испољавају антибактеријску активност (Choulitoudi и сар., 2016). Полифеноли коагулишу протеине ћелијског зида бактерије и деградирају ензиме укључене у бактеријски метаболизам неопходан за деобу ћелија (Fayad и сар., 2013). Према литературним подацима, биљни екстракти су ефикаснији против Грам-позитивних бактерија, у односу на Грам-негативне сојеве, што је показано и у случају испитаних екстраката мајчине душице (Moreno и сар., 2006; Toplan и сар., 2017).

4.3.3. Спазмолитична активност екстраката мајчине душице

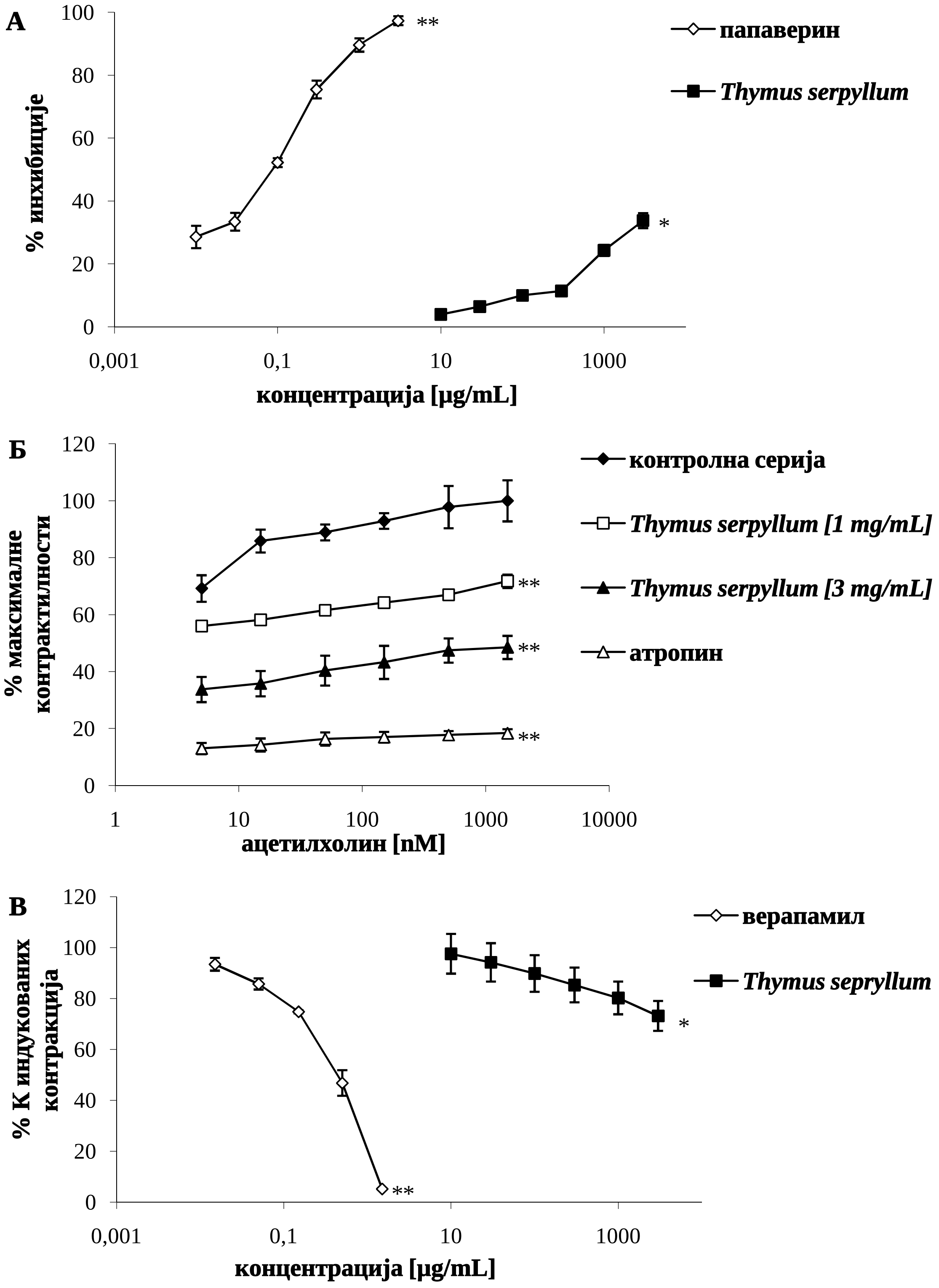
Како се мајчина душица традиционално користи у обољењима гастоинтестиналног тракта, на моделу изолованог илеума пацова испитана је спазмолитична активност одабраних екстраката. Резултати испитивања спазмолитичне активности четири лиофилизована екстракта врсте *T. serpyllum* (екстракти са највећим садржајем полифенола добијени мацерацијом, повишеном температуром, ултразвучном сондом и микроталасима) приказани су на сликама 4.8-4.11.

Приказани резултати указују да постоји спазмолитична активност свих испитаних екстраката мајчине душице. Ови екстракти изазивају инхибицију спонтаних контракција изолованог илеума пацова на дозно-зависан начин. Максимални инхибиторни ефекат свих испитаних екстраката мајчине душице на спонтане контракције остварен је применом концентрације од 3 mg/mL, уз коришћење папаверина као позитивне контроле (0,01-3 mg/mL). Папаверин је значајно редуковао интестинални базални тонус, на дозно-зависан начин ($p < 0,01$), инхибирајући фосфодиестеразу и улазак калцијума у ћелију (Rang и сар., 2005). Екстракт добијен мацерацијом остварио је највећи проценат инхибиције спонтаних контракција изолованог илеума, чак 72,5 ± 4,3% (слика 4.8А, $p < 0,01$), док су екстракти добијени повишеном температуром и ултразвучном сондом остварили статистички значајно мању инхибицију: 33,8 ± 2,8%, односно 33,1 ± 3,7% (слике 4.9А и 4.10А, $p < 0,05$), као и екстракт добијен микроталасима, чији је ефекат релаксације био најмањи: 24,7 ± 4,3% (слика 4.11А, $p < 0,05$).

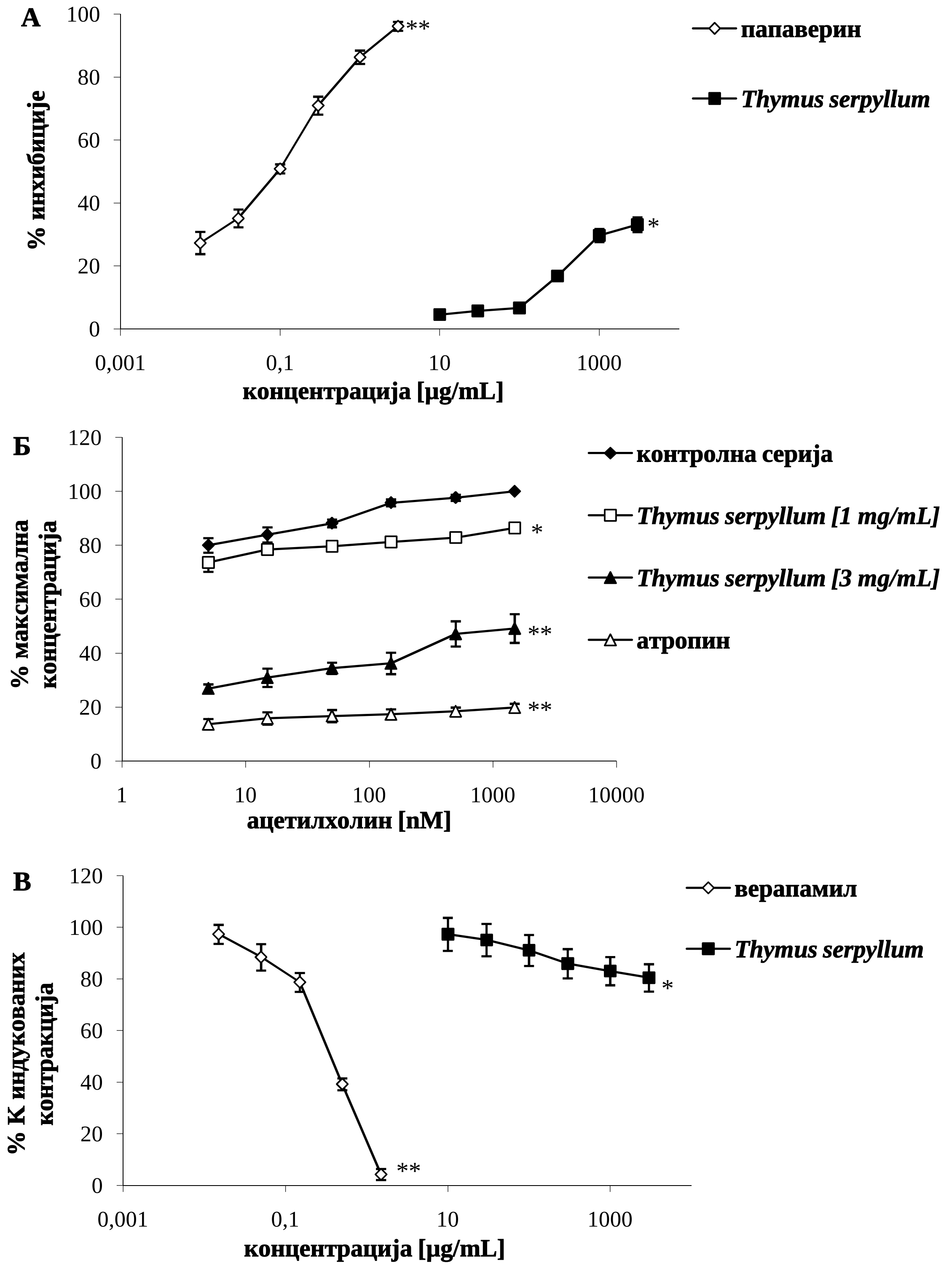




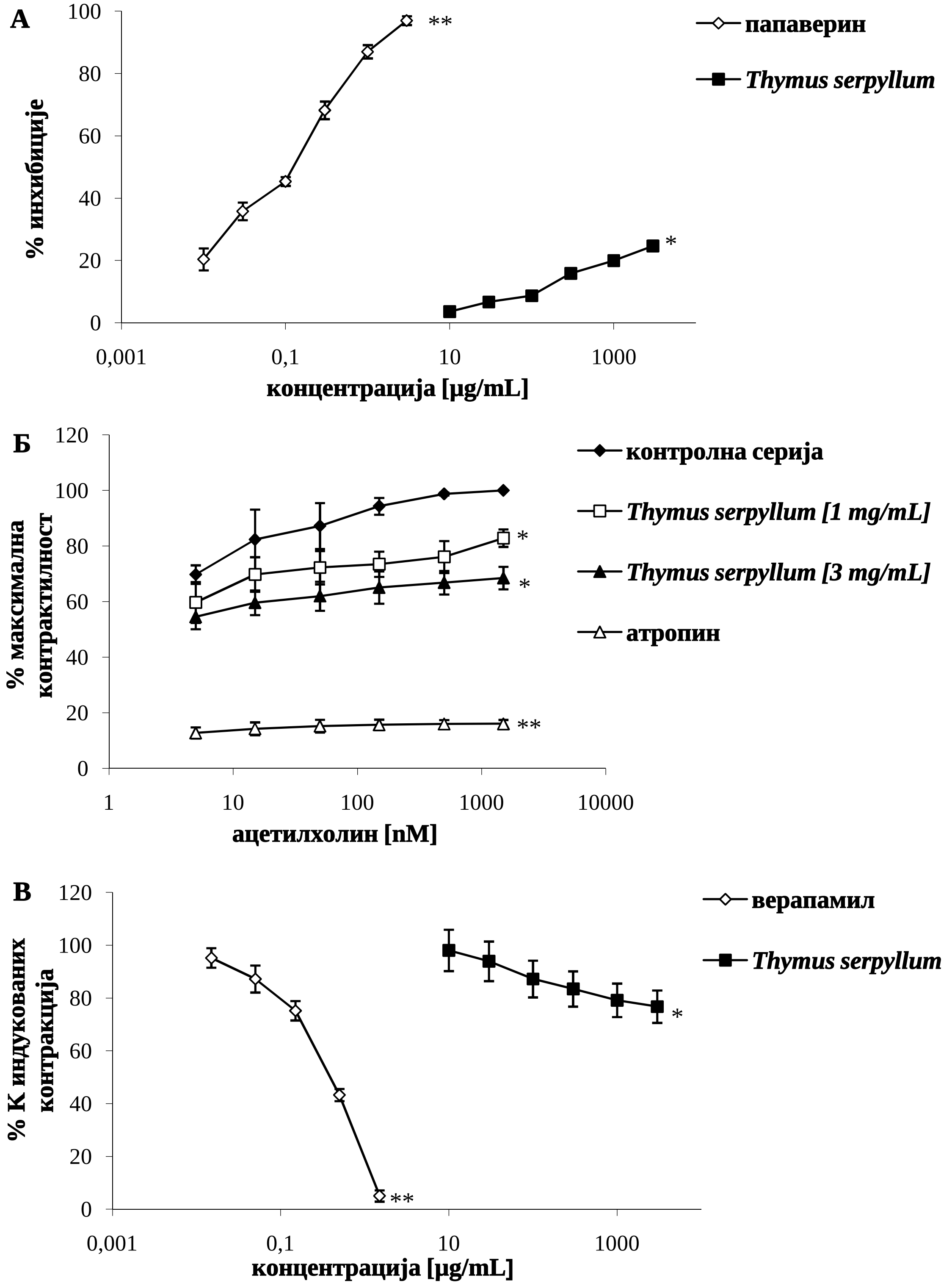
Слика 4.8. Спазмолитична активност екстракта мајчине душице добијеног мацерацијом: (А) ефекат екстракта и папаверина на спонтане контракције изолованог илеума пацова, (Б) ефекат екстракта и атропина на контракције изазване ацетилхолином, (В) ефекат екстракта и верапамила на контракције изазване калијум хлоридом, (Г) ефекат екстракта на контракције изазване баријум хлоридом, (Д) ефекат екстракта и верапамила на контракције изазване калцијум хлоридом (n = 6, *p < 0,05, **p < 0,01)



Слика 4.9. Спазмолитична активност екстракта мајчине душице добијеног повишеном температуром: (А) ефекат екстракта и папаверина на спонтане контракције изолованог илеума пацова, (Б) ефекат екстракта и атропина на контракције изазване ацетилхолином, (В) ефекат екстракта и верапамила на контракције изазване калијум хлоридом (n = 6, $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$)



Слика 4.10. Спазмолитична активност екстракта мајчине душице добијеног ултразвучном сондом: (А) ефекат екстракта и папаверина на спонтане контракције изолованог илеума пацова, (Б) ефекат екстракта и атропина на контракције изазване ацетилхолином, (В) ефекат екстракта и верапамила на контракције изазване калијум хлоридом (n = 6, *p < 0,05, **p < 0,01)



Слика 4.11. Спазмолитична активност екстракта мајчине душице добијеног микроталасима: (А) ефекат екстракта и папаверина на спонтане контракције изолованог илеума пацова, (Б) ефекат екстракта и атропина на контракције изазване ацетилхолином, (В) ефекат екстракта и верапамила на контракције изазване калијум хлоридом (n = 6, *p < 0,05, **p < 0,01)

Вредност IC_{50} (концентрација екстракта потребна за инхибицију 50% спонтаних контракција) за екстракт добијен мацерацијом била је 0,28 mg/mL, повишеном температуром: 9,1 mg/mL, ултразвучном сондом: 6,7 mg/mL и микроталасима: 16,2 mg/mL. Наиме, екстракт добијен мацерацијом показао је статистички значајно бољу спазмолитичну активност при спонтаним контракцијама изолованог илеума пацова.

У циљу испитивања могућих механизама спазмолитичне активности екстраката мајчине душице, контракције изолованог илеума индуковане су на два различита начина: применом ацетилхолина и KCl.

Ацетилхолин (5-1500 nm), као главни ексцитаторни неуротрансмитер у висцеларној глаткој мускулатури, индуковао је дозно-зависне контракције изолованог илеума пацова. Контракције глатке мускулатуре гастроинтестиналног тракта стимулисане ацетилхолином остварују се преко мускаринских рецептора, кроз два различита механизма. Један механизам подразумева активацију неселективних јонских канала у плазма мембрани, уз последичну деполаризацију мембране и улазак Ca^{2+} јона кроз волтажно-зависне Ca^{2+} канале (Биговић и сар., 2010). Други механизам укључује индукцију *G* протеин трансдукционог сигнала, који узрокује повећано ослобађање интрацелуларног калцијума, деполаризацију мембране и контракцију интестиналне мускулатуре (Бранковић и сар., 2011; Broadley и Kelly, 2001). Сви испитани екстракти (1-3 mg/mL) показали су значајну дозно-зависну редукцију контрактилности изазване повећавањем концентрације ацетилхолина. Поред тога, атропин, као неселективни блокатор мускаринских рецептора, узроковао је значајну инхибицију контракција индукованих ацетилхолином ($p < 0,01$) (Rang и сар., 2005). Екстракт добијен мацерацијом је редуковао контракције изазване ацетилхолином до 62,9 ± 5,5% максималне контрактилности, при концентрацији од 1 mg/mL, док је редукција ишла до 43,0 ± 4,0% максималне контрактилности, при концентрацији од 3 mg/mL (слика 4.8Б, $p < 0,01$). Добијени резултати су били статистички значајно бољи него код екстраката добијених другим методама екстракције. Екстракт добијен повишеном температуром такође је остварио статистички значајну редукцију контракција изазваних ацетилхолином, на дозно-зависан начин. При концентрацији 1 mg/mL поменутог екстракта редукција је ишла до 71,8 ± 2,2% максималне контрактилности, а при концентрацији од 3 mg/mL до 48,5 ± 7,2% максималне контрактилности (слика 4.9Б, $p < 0,01$). Ефекат редукције контракција изазваних ацетилхолином код екстракта добијеног ултразвучном сондом био је 86,4 ± 1,7% максималне контрактилности ($p < 0,05$) при концентрацији 1 mg/mL, а 49,2 ± 5,3% максималне контрактилности ($p < 0,01$) при концентрацији од 3 mg/mL (слика 4.10Б). Контракције индуковане ацетилхолином редуковане су до 82,9 ± 3,1% максималне контрактилности применом екстракта добијеног микроталасима у концентрацији од 1 mg/mL и 68,5 ± 2,4% максималне контрактилности при концентрацији 3 mg/mL (слика 4.11Б, $p < 0,05$). Ипак, инхибиторни ефекат свих испитаних екстраката мајчине душице на контракције изазване ацетилхолином био је мањи у поређењу са ефектом атропина, као антагонисте мускаринских рецептора. Након испирања, контрактилност изолованог илеума је враћена на почетне вредности. Стога се спазмолитични ефекат екстракта може приписати реверзибилној блокади мускаринских рецептора.

Високе концентрације K^+ јона (80 mM) узрокују тоничне контракције изолованог илеума пацова отварањем волтажно-зависних Ca^{2+} канала (Godfrain и сар., 1986; Rang и сар., 2005). Контракције изолованог илеума изазване KCl значајно су смањене у присуству екстраката мајчине душице. Максимални инхибиторни ефекат свих испитаних екстраката мајчине душице на контракције индуковане K^+ јонима остварен је применом концентрације од 3 mg/mL, уз коришћење верапамила као позитивне контроле (0,01-3 mg/mL). Верапамил, који блокира улазак Ca^{2+} у ћелију кроз калцијумске канале на волтажно-зависан начин, остварује значајан ефекат на инхибицију контракција изазваних KCl ($p < 0,01$) (Rang и сар., 2005). Екстракт добијен мацерацијом остварио је редукцију поменутих контракција до 50,8 ± 6,6%, при концентрацији 3 mg/mL (слика 4.8В, $p < 0,01$). При истој концентрацији, екстракт добијен повишеном температуром постигао је смањење контракција илеума до 73,1 ± 3,5% (слика 4.9В, $p < 0,05$), док је екстракт добијен ултразвучном сондом редуковао контракције изазване K^+ јонима до 80,5 ± 4,0% (слика 4.10В, $p < 0,05$). Екстракт добијен микроталасима при концентрацији од 3 mg/mL достигао је редукцију K^+ индукованих контракција до 76,7 ± 8,4% (слика 4.11В, $p < 0,05$). Екстракт добијен мацерацијом је показао значајно снажнији спазмолитични ефекат на контракције изазване калијумом, у односу на остале испитане екстракте, који су имали сличну спазмолитичну активност. Према литературним подацима, биљни екстракти инхибирају контракције настале услед повећане концентрације K^+ јона и делују као блокатори уласка калцијума у ћелију (Gilani и сар., 2006). Чињеница да су сви испитани екстракти мајчине душице показали значајан ефекат на релаксацију глатке мускулатуре, у присуству великих концентрација K^+ јона, наводи на закључак да је спазмолитично дејство екстраката условљено блокадом Ca^{2+} канала.

Сви испитани екстракти мајчине душице показали су значајну спазмолитичну активност на дозно-зависан начин у моделу спонтаних контракција и контракција изазваних ацетилхолином и K^+ јонима. Добијени резултати су у складу са литературним подацима, који указују на реверзибилно и дозно-зависно антагонистично дејство екстракта тимијана на контракције мускулатуре изазване Ba^{2+} јонима, карбахолом, хистамином и простагландином *F(2α)* (Meister и сар., 1999).

С обзиром на најбољи спазмолитични ефекат који је показао у сва три експериментална модела (редукција спонтаних контракција и контракција изазваних ацетилхолином и KCl), екстракт добијен мацерацијом је додатно испитан на моделу контракција индукованих $BaCl_2$ и $CaCl_2$. Према литературним подацима, баријум узрокује деполаризацију мембране ћелија глатке мускулатуре и отвара волтажно-зависне Ca^{2+} канале, омогућавајући улазак Ca^{2+} јона у ћелију (Karaki и сар., 1986). Ефекат поменутог екстракта на редукцију контракција изазваних $BaCl_2$ остварен је до 80,3 ± 1,3% максималне контрактилности ($p < 0,05$) при концентрацији 1 mg/mL, а 59,7 ± 0,8% максималне контрактилности ($p < 0,01$) при концентрацији од 3 mg/mL (слика 4.8Г). Додатно, остварена је редукција контракција индукованих $CaCl_2$ до 75,8 ± 3,6% максималне контрактилности ($p < 0,05$) при концентрацији од 1 mg/mL и 52,9 ± 2,3% максималне контрактилности ($p < 0,01$) при концентрацији од 3 mg/mL (слика 4.8Д). Поред тога, верапамил је узроковао значајну инхибицију контракција индукованих $CaCl_2$ ($p < 0,01$). Инхибиторни ефекат екстракта мајчине душице добијеног мацерацијом на контракције изазване $CaCl_2$ био је мањи у поређењу са ефектом верапамила, као блокатора Ca^{2+} канала. Добијени резултати потврђују закључак да екстракт мајчине душице остварује спазмолитично дејство на глатку мускулатуру илеума блокадом Ca^{2+} канала и спречавањем уласка Ca^{2+} јона, који би изазвали контракцију глаткомишићних ћелија. Будући да је *HPLC*/*DAD* метода показала да највећи садржај флавоноида 6-хидроксилутеолин 7-*O*-глукозида и лутеолин 7-*O*-глукуронида поседује лиофилизован екстракт добијен мацерацијом, овим једињењима се могу приписати спазмолитична својства екстракта мајчине душице. Добијени резултати и закључци су у складу са литературним подацима, који говоре о спазмолитичној активности флавоноида попут апигенина, лутеолина и кверцетина на изолованом илеуму, оствареној кроз блокаду Ca^{2+} канала и антихолинергичну активност (Gilani и сар., 2006; Lemmens-Gruber и сар., 2006; Fleer и Verspohl, 2007). Додатно, екстракти *Thymus* spp. су показали спазмолитичну активност на моделу глатке мускулатуре трахеје пацова, захваљујући синергистичном деловању тимола, карвакрола и лутеолина (Engelbertz и сар., 2012).

4.4. Лиофилизовани и спреј осушени екстракти мајчине душице и њихови желатински нкапсулати

Један од циљева докторске дисертације било је добијање сувих екстраката мајчине душице, ради повећања њихове стабилности, очувања билошке активности, лакшег складиштења и дистрибуције, као и прецизнијег дозирања. У ту сврху су добијени течни екстракти осушени применом две различите методе: лиофилизације и спреј сушења. Поред тога, у циљу боље заштите екстраката, маскирања горког укуса полифенола и добијања формулације која ће омогућити контролисано отпуштање полифенола, екстракти су инкапсулирани у желатин, применом две горе поменуте методе.

4.4.1. Анализа садржаја полифенола, флавоноида, шећера и пептида и антиоксидативне активности сувих екстраката и инкапсулата

Лиофилизовани и спреј осушени екстракти и желатински инкапсулати екстраката мајчине душице били су подвргнути одређивању приноса сувог производа, садржаја укупних полифенола и укупних флавоноида и испитивању антиоксидативне активности. Додатно, одређен је садржај шећера и пептида у чистим лиофилизованим и спреј осушеним екстрактима мајчине душице.

Принос сувих екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата варирао је у зависности од примењене методе екстракције (мацерација, екстракција на повишеној температури, у ултразвучном купатилу, ултразвучном сондом и микроталасима) и методе сушења (лиофилизација и спреј сушење). Резултати приноса сувих екстраката и желатинских инкапсулата, приказани су у табелама 4.11а и 4.11б.

Табела 4.11а. Принос сувих екстраката мајчине душице

	Принос екстракта [g/L]	
Метода екстракције	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Мацерација	$4{,}26 \pm 1{,}20^{\text{б}, 1}$	$3{,}30 \pm 0{,}50^{\text{в}, 2}$
Повишена температура	$4{,}59 \pm 1{,}10^{\text{б}, 1}$	$3{,}95 \pm 0{,}20^{\text{б}, 2}$
Ултразвучно купатило	$4{,}65 \pm 0{,}00^{\text{б}, 1}$	$2{,}91 \pm 0{,}10^{\text{в}, 2}$
Ултразвучна сонда	$4{,}61 \pm 0{,}90^{\text{б}, 1}$	$3{,}09 \pm 0{,}30^{\text{в}, 2}$
Микроталаси	$8{,}74 \pm 2{,}70^{\text{а}, 1}$	$7{,}72 \pm 1{,}00^{\text{а}, 2}$

Вредности са истим словом (а-в) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0{,}05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

Приноси лиофилизованог и спреј осушеног екстракта добијеног микроталасима били су статистички значајно већи у поређењу са осталим екстрактима (табела 4.11а). Разлог већег приноса микроталасне екстракције лежи у механизму дејства микроталаса који доводе до значајног разарања биљне структуре и последичног изласка велике количине жељених компонената, али и баласних материја (протеина, шећера и липида) у екстракциони медијум (Симић и сар., 2016). Приноси лиофилизованих екстраката добијених мацерацијом, повишеном температуром и ултразвучним таласима нису се статистички значајно разликовали. Приликом спреј сушења принос екстракта добијеног на повишеној температури био је статистички значајно виши него код мацерације и екстракције ултразвучним таласима. У свим методама екстракције, процес лиофилизације је дао статистички значајно већи принос сувог екстракта, у поређењу са спреј сушењем. Разлог се налази у сложености структуре уређаја за спреј сушење и последично великих губитака екстракта на зидовима циклона (слике 3.6В и 4.12А). Будући да у процесу лиофилизације нема кретања екстракта кроз систем, значајни губици узорака нису забележени (слика 3.6Б).

Табела 4.11б. Принос сувих желатинских инкапсулата екстраката мајчине душице

	Принос инкапсулата [g/L]	
Узорак	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Желатин	23,5 ± 2,7^{1}	13,2 ± 1,5^{2}
Мацерација + желатин	29,9 ±2,7$^{\text{а}, 1}$	17,0 ± 0,0$^{\text{в}, 2}$
Повишена температура + желатин	29,1 ± 0,2$^{\text{а}, 1}$	18,1 ± 0,9$^{\text{б}, 2}$
Ултразвучно купатило + желатин	29,3 ± 0,1$^{\text{а}, 1}$	17,6 ± 0,3$^{\text{бв}, 2}$
Ултразвучна сонда + желатин	29,8 ± 0,0$^{\text{а}, 1}$	17,5 ± 1,0$^{\text{бв}, 2}$
Микроталаси + желатин	30,2 ± 0,6$^{\text{а}, 1}$	20,1 ± 0,1$^{\text{а}, 2}$

Вредности са истим словом (а-в) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

У циљу добијања већих приноса и повећања стабилности активних компонената екстраката, пре процеса сушења чистим екстрактима је додато 5% желатина. Након примене желатина, приноси лиофилизованих инкапсулата екстраката из свих метода екстракције се нису статистички значајно разликовали (табела 4.11б). Уколико се анализира принос самих екстраката (присутних у желатинском инкапсулату), код свих метода екстракције је дошло до повећања приноса, осим код екстракта добијеног микроталасима. Код екстраката добијених мацерацијом и ултразвучном сондом, повећање приноса након додавања желатина, било је најизраженије, за 48,8%, односно за 37%, док је код екстраката добијених на повишеној температури и у ултразвучном купатилу повећање приноса било ниже, за 21,7%, односно 19,1%. Занимљиво је да код лиофилизованог инкапсулираног екстракта добијеног микроталасима долази до смањења приноса самог екстракта за 23%. Са друге стране, спреј осушен желатински инкапсулат екстракта добијеног микроталасима имао је статистички значајно већи принос него инкапсулати екстраката добијених другим методама екстракције. Ипак, принос самих екстраката (присутних у желатинском инкапсулату) повећао се код свих метода екстракције осим код екстракције микроталасима. Екстракти добијени ултразвучним таласима остварили су најзначајније повећање приноса инкапсулацијом у желатин, за 51,7% екстракт добијен у ултразвучном купатилу и за 38,7% екстракт добијен ултразвучном сондом. Екстракти добијени мацерацијом и повишеном температуром имали су значајно ниже повећање, за 15%, односно 22,5%, док је инкапсулиран екстракт из микроталасног реактора поново имао мањи принос него чист екстракт, за 10,4%. И поред присуства желатина, приноси екстраката, односно инкапсулата, након спреј сушења били су статистички значајно нижи него приликом лиофилизације. Ипак, на зидовима циклона уређаја за спреј сушење примећено је мање задржавање, тј. лепљење поменутих желатинских инкапсулата екстраката него што је био случај са чистим екстрактима (слика 4.12Б).

Слика 4.12. Циклон уређаја за спреј сушење: (А) након сушења чистог екстракта мајчине душице и (Б) након сушења желатинског инкапсулата екстракта

Концентрације укупних полифенола и укупних флавоноида у сувим екстрактима мајчине душице и њиховим желатинским инкапсулатима приказане су у табелама 4.12а и 4.12б.

Садржај укупних полифенола у лиофилизованим екстрактима био је највећи у екстракту добијеном на повишеној температури, док се код осталих екстраката садржај није статистички значајно разликовао без обзира на примењену методу екстракције (табела 4.12а). Након спреј сушења екстракт из ултразвучног купатила је садржао статистички значајно ниже концентрације полифенола, у односу на све друге екстракте. Концентрације укупних полифенола екстраката осушених лиофилизацијом и спреј сушењем нису се статистички значајно разликовале, осим код екстракта добијеног повишеном температуром, где је лиофилизован узорак поседовао статистички значајно већу количину полифенола.

Табела 4.12а. Садржај укупних полифенола и укупних флавоноида у сувим екстрактима мајчине душице

	Укупни полифеноли [mg *GAE*/g]		**Укупни флавоноиди [mg *CE*/g]**	
Метода екстракције	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Мацерација	19,8 ± 1,5$^{б, 1}$	21,3 ± 0,4$^{а, 1}$	11,5 ± 0,5$^{аб, 1}$	10,0 ± 0,3$^{аб, 2}$
Повишена температура	22,3 ± 1,8$^{а, 1}$	20,8 ± 0,4$^{а, 2}$	11,7 ± 0,6$^{аб, 1}$	10,4 ± 0,5$^{а, 2}$
Ултразвучно купатило	19,2 ± 0,9$^{б, 1}$	18,7 ± 0,0$^{б, 1}$	11,4 ± 1,0$^{аб, 1}$	9,7 ± 0,0$^{б, 2}$
Ултразвучна сонда	20,9 ± 1,1$^{б, 1}$	21,7 ± 0,6$^{а, 1}$	12,0 ± 1,1$^{а, 1}$	10,0 ± 0,5$^{аб, 2}$
Микроталаси	19,7 ± 1,4$^{б, 1}$	21,8 ± 1,6$^{а, 1}$	9,8 ± 0,3$^{в, 1}$	9,4 ± 0,2$^{в, 1}$

Вредности са истим словом (а-в) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0{,}05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест); *GAE*, еквивалент галне киселине; *CE*, еквивалент катехина

Уколико се упореди садржај полифенола у течном екстракту са садржајем полифенола осушеног екстракта уочава се губитак поменутих активних принципа након процеса сушења. Према литературним подацима, процеси лиофилизације и спреј сушења изазивају драстично смањење полифенолних гликозида у односу на њихов садржај у свежем биљном материјалу (Abascal и сар., 2005). Ипак, процес лиофилизације је очувао већи проценат полифенола из полазног екстракта у односу на спреј сушење. Објашњење лежи у термолабилности полифенола, тако да у току спреј сушења које се обавља на високој температури долази до значајне деградације полифенолних компонената. Поред тога, значајан губитак полифенола настаје због кретања честица кроз систем за спреј сушење и њиховог задржавања на циклону уређаја (слике 3.6В и 4.12А). Занимљиво је да су екстракти добијени мацерацијом, повишеном температуром и ултразвучним таласима након сушења имали мањи пад у вредности садржаја полифенола него екстракт добијен микроталасима. Разлог овако значајног смањења почетне количине полифенола може се наћи у већем садржају шећера присутним у лиофилизованим и спреј осушеним микроталасним екстрактима (табела 4.13). Шећери доприносе лепљењу честица за зидове посуда у лиофилизатору и за зидове уређаја за спреј сушење, чиме се велики губитак полифенола приписује њиховом задржавању на поменутим деловима система.

Највећи садржај укупних флавоноида након лиофилизације забележен је у екстракту добијеном ултразвучном сондом ≥ мацерација, повишена температура и ултразвучно купатило > микроталаси (табела 4.12а). Након спреј сушења, садржај укупних флавоноида у екстрактима прати следећи тренд: повишена температура ≥ мацерација и ултразвучна сонда ≥ ултразвучно купатило > микроталаси. Након процеса лиофилизације, екстракти добијени мацерацијом, повишеном температуром и ултразвучним таласима имали су статистички значајно већи садржај флавоноида у односу на исте екстракте осушене методом спреј сушења. Разлог лежи у термолабилности флавоноида, који су у процесу спреј сушења изложени улазној температури од 140°C. Такође, приликом микроталасне екстракције, због изложености температури од 200°C, долази до деградације флавоноида, чиме поменути екстракти након обе методе сушења (између којих у овом случају нема значајне разлике) заузимају најниже место по питању садржаја флавоноида.

Процес сушења је такође утицао на смањење садржаја флавоноида у односу на почетну концентрацију присутну у течном екстракту.

Код лиофилизованих инкапсулираних екстраката садржај полифенола следи тренд: повишена температура ≥ мацерација и микроталаси ≥ ултразвучни таласи (табела 4.12б). Након спреј сушења, највећу количину полифенола садржао је инкапсулиран екстракт из микроталасног реактора, затим повишена температура ≥ ултразвучни таласи ≥ мацерација. Статистички значајних разлика у приносу полифенола након различитих метода сушења није било код инкапсулираних екстраката добијених ултразвучном сондом и микроталасима, док је код осталих инкапсулираних екстраката процес лиофилизације очувао већи проценат полифенола.

Табела 4.12б. Садржај укупних полифенола и укупних флавоноида у сувим желатинским инкапсулатима екстраката мајчине душице

	Укупни полифеноли [mg *GAE*/g]		**Укупни флавоноиди [mg *CE*/g]**	
Метода екстракције	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Мацерација + желатин	6,9 ± 0,1$^{аб, 1}$	5,3 ± 0,1$^{в, 2}$	3,0 ± 0,1$^{б, 1}$	2,4 ± 0,0$^{б, 2}$
Повишена температура + желатин	7,4 ± 0,4$^{а, 1}$	5,7 ± 0,2$^{б, 2}$	3,3 ± 0,1$^{а, 1}$	2,8 ± 0,1$^{а, 2}$
Ултразвучно купатило + желатин	6,6 ± 0,0$^{б, 1}$	5,5 ± 0,3$^{бв, 2}$	3,0 ± 0,0$^{б, 1}$	2,4 ± 0,0$^{б, 2}$
Ултразвучна сонда + желатин	6,4 ± 0,7$^{б, 1}$	5,6 ± 0,5$^{бв, 1}$	2,8 ± 0,3$^{б, 1}$	2,5 ± 0,2$^{б, 2}$
Микроталаси + желатин	7,2 ± 0,8$^{аб, 1}$	7,7 ± 0,2$^{а, 1}$	3,1 ± 0,0$^{б, 1}$	3,0 ± 0,2$^{а, 2}$

Вредности са истим словом (а-в) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест); *GAE*, еквивалент галне киселине; *CE*, еквивалент катехина

Као и код чистих екстраката, тако и код желатинских инкапсулата екстраката процес сушења доводи до смањења садржаја полифенола у односу на почетни садржај у течном екстракту. С тим што је смањење код инкапсулата било значајно мање него код чистих екстраката. Уколико се упореди смањење почетног садржаја полифенола након лиофилизације или спреј сушења код чистих екстраката и код њихових желатинских инкапсулата долази се до следећег закључка – процес инкапсулације је омогућио заштиту осетљивих полифенолних структура од утицаја фактора присутних у процесу сушења (промена притиска, ниска и висока температура). Поред тога, желатин је смањио лепљење честица за зидове циклона и тиме смањио губитак полифенола због њиховог заостајања на деловима уређаја (слика 4.12Б). Важно је напоменути да и поред присуства желатина процес спреј сушења доводи до већег смањења и губитка почетног садржаја полифенола, него што је то случај са процесом лиофилизације.

Након инкапсулације у желатин, у случају лиофилизације, вредност укупних флавоноида је била највећа код екстракта добијеног на повишеној температури (табела 4.12б). Концентрације флавоноида у осталим лиофилизованим инкапсулатима екстраката нису се међусобно разликовале. Спреј осушени инкапсулирани екстракти добијени на повишеној температури и у присуству микроталаса показали су највећи садржај укупних флавоноида, статистички значајно већи од осталих спреј осушених инкапсулата. У складу са тим, занимљиво је да чист микроталасни екстракт након спреј сушења има најмањи принос флавоноида, док је желатин утицао на заштиту осетљивих компонената екстракта, попут флавоноида, чиме је постигнуто да инкапсулирани микроталасни екстракт поседује највећу концентрацију поменутих једињења.

Додавање желатина у течне екстракте утицало је на бољу заштиту осетљивих флавоноидних компонената, те је смањење почетног садржаја флавоноида у сувим инкапсулатима било мање него у чистим екстрактима.

Садржај укупних шећера и укупних пептида у чистим екстрактима мајчине душице, добијеним различитим методама екстракције и осушеним процесом лиофилизације или спреј сушења, приказан је у табели 4.13.

Највећи садржај укупних шећера је забележен у екстракту добијеном микроталасима, у обе методе сушења, с тим што је проценат био статистички значајно већи након спреј сушења у односу на лиофилизацију. Специфичност микроталасне екстракције се огледа у значајном разарању биљне ћелије уз последични излазак биљних шећера у екстракциони медијум (Симић и сар., 2016). У односу на микроталасни екстракт, статистички значајно нижи проценат шећера је измерен у лиофилизованим екстрактима добијеним мацерацијом и ултразвучним таласима, док је најнижа концентрација шећера одређена у лиофилизованом екстракту добијеном на повишеној температури. По питању садржаја шећера, статистичке разлике између спреј осушених екстраката добијених мацерацијом, повишеном температуром и ултразвучним таласима није било.

Табела 4.13. Садржај укупних шећера и пептида у сувим екстрактима мајчине душице

	Укупни шећери [%]		**Укупни пептиди [%]**	
Метода екстракције	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Мацерација	30,5 ± $0{,}0^{б,\ 2}$	31,4 ± $0{,}3^{б,\ 1}$	6,6 ± $0{,}2^{бв,\ 1}$	6,7 ± $0{,}2^{б,\ 1}$
Повишена температура	27,3 ± $0{,}2^{в,\ 2}$	31,4 ± $0{,}8^{б,\ 1}$	6,9 ± $0{,}1^{б,\ 1}$	6,3 ± $0{,}1^{бв,\ 2}$
Ултразвучно купатило	30,0 ± $0{,}0^{б,\ 2}$	31,4 ± $0{,}0^{б,\ 1}$	5,2 ± $0{,}1^{г,\ 2}$	5,7 ± $0{,}3^{в,\ 1}$
Ултразвучна сонда	30,0 ± $0{,}6^{б,\ 2}$	31,3 ± $0{,}5^{б,\ 1}$	6,4 ± $0{,}1^{в,\ 1}$	6,4 ± $0{,}2^{б,\ 1}$
Микроталаси	32,5 ± $1{,}0^{а,\ 2}$	34,7 ± $0{,}4^{а,\ 1}$	8,5 ± $0{,}2^{а,\ 1}$	7,7 ± $0{,}3^{а,\ 2}$

Вредности са истим словом (а-г) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0{,}05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

Додатно, у свим екстрактима садржај укупних шећера је био статистички значајно већи након спреј сушења него након лиофилизације. Према литератури, угљени хидрати добро подносе спреј сушење на повишеној температури, тако да се успешно користе приликом инкапсулације природних компонената овом методом (Gharsallaoui и сар., 2007). Релативно висок проценат шећера у анализираним екстрактима одговара литературним подацима, који говоре да угљени хидрати обично чине и више од половине укупних биљних компонената. Поред важних улога у метаболизму биљне ћелије, ови биомолекули омогућавају толеранцију на низак садржај воде у току сазревања семена, као и структурну стабилност различитих макромолекула (Kafeel и сар., 2008). Иако су шећери пронађени у ткивима већине биљака, само у шећерној трсци и репи су присутни у довољним концентрацијама за њихову ефикасну екстракцију (Worku и Wunes, 2014). Највећи број биљних врста садржи веће количине шећера у махунама и лишћу, док садржај депонованих шећера у семенима варира у зависности од стадијума развоја биљке (Kafeel и сар., 2008).

Екстракт из микроталасног реактора такође је имао статистички значајно већи принос пептида у поређењу са свим осталим методама екстракције, након обе технике сушења. Између екстраката добијених мацерацијом, повишеном температуром и ултразвучном сондом разлике у проценту пептида биле су минималне, док је принос пептида био статистички значајно нижи у екстракту из ултразвучног купатила, у обе методе сушења. Висока температура присутна у микроталасном реактору доводи до слабљења и водоничних веза и електростатичких интеракција између поларних група протеина и водене фазе мембране, чиме је омогућено њихово лакше отпуштање у екстракциони медијум (Pavan, 2013). Додатно, већина протеина се заједно са хидрофобним полифенолима и полисахаридима налази у ћелијском зиду, који се деградира под утицајем микроталаса (Симић и сар., 2016; Naczk и Shahidi, 2006). Примена две различите методе сушења није статистички значајно утицала на садржај укупних пептида у екстрактима добијеним мацерацијом, ултразвучном сондом и микроталасима. Са друге стране, екстракт добијен повишеном температуром је након лиофилизације имао статистички виши принос пептида него након спреј сушења, док је екстракт из ултразвучног купатила садржао већи проценат пептида након спреј сушења у односу на лиофилизован екстракт. То може бити објашњено присуством шећера у већој количини у спреј осушеном екстракту добијеном у ултразвучном купатилу у односу на његову лиофилизовану паралелу, јер шећери омогућавају заштиту осетљивих протеинских структура у току процеса сушења (Zhao и сар., 2013; Izutsu и сар., 2004; Schwegman и сар., 2007). Ипак, у свим екстрактима проценат пептида је био мали (< 10%), што је у складу са литературним подацима који потврђују релативно малу количину протеина у биљном ткиву. Биосинтеза протеина најчешће почиње као одговор биљне ћелије на стрес којем је изложена, попут суше, ниске или високе температуре и хемијских загађивача (Kosakivska и сар., 2008). Притом, протеини из биљних извора се тешко екстрахују. Разлог лежи у присуству интерферирајућих компонената, као што су велике количине депонованих полисахарида, липида и других контаминаната, који узрокују деградацију или модификацију протеина. Затим, целулозни ћелијски зид и вакуоле, који чине већински део ћелије, ометају екстракцију, као и присуство протеаза и оксидативних ензима, који након разарања ћелијских структура долазе у контакт са протеинима и доводе до њихове деградације. Зато оптимална концентрација протеина у екстракту захтева ефикасно уклањање непротеинских супстанци из биљног материјала, као и методу прилагођену специфичном биљном органу и биљној врсти (Павоковић и сар., 2012).

Резултати антиоксидативног капацитета лиофилизованих и спреј осушених екстраката врсте *T. serpyllum* (добијених различитим техникама екстракције) и њихових желатинских инкапсулата, остварени у *ABTS* и *DPPH* тесту, приказани су у табелама 4.14а. и 4.14б.

Приликом неутрализације слободног *ABTS* радикала није било статистички значајне разлике између различитих екстраката мајчине душице након обе методе сушења (табела 4.14а). Додатно, техника сушења није статистички значајно утицала на антиоксидативни потенцијал узорака. Добијени резултати су у складу са садржајем укупних полифенола екстраката, који се такође међусобно нису значајно разликовали (табела 4.12а). Приликом екстракције на повишеној температури долази до деградације антиоксидативних полифенола, јер је познато да одређене групе флавоноида и фенолкарбоксилних киселина представљају термосензитивне компоненте (Fang и Bhandari, 2010). Ултразвук механичким и термичким ефектима повећава принос полифенола, али локално повећање температуре и настанак слободних радикала применом ултразвучних таласа доводе до деградације одређеног процента антиоксидативних једињења (Kivilompolo и Hyötyläinen, 2009; Хоржић и сар., 2012). Иако повећањем притиска и температуре микроталаси доводе до повећања растворљивости биоактивних компонената у екстракционом медијуму, висока температура утиче на смањење антиоксидативног капацитета екстраката (Dahmoune и сар., 2015; Mustapa и сар., 2015). У томе може бити разлог сличне антиоксидативне моћи сувих екстраката добијених мацерацијом, повишеном температуром, ултразвучним таласима и микроталасима.

У *DPPH* методи, уочен је статистички бољи антиоксидативни потенцијал лиофилизованог екстракта добијеног ултразвучном сондом ≥ повишена температура, ултразвучно купатило и микроталаси ≥ мацерација (табела 4.14а). Важно је напоменути да су дати резултати у складу са резултатима укупних флавоноида, чија је концентрација била највиша у лиофилизованом екстракту добијеном ултразвучном сондом (табела 4.12а). Након спреј сушења статистички значајно бољу антиоксидативну активност имао је екстракт добијен микроталасима ≥ повишена температура и ултразвучни таласи ≥ мацерација. У случају свих тестираних екстраката, лиофилизовани екстракти су остварили бољу антиоксидативну активност као донори атома водоника или електрона слободном *DPPH* радикалу у односу на екстракте добијене спреј сушењем. Разлог може бити у високој улазној температури (140°C) присутној у уређају за спреј сушење, која изазива значајну деградацију термолабилних антиоксидативних компонената.

Табела 4.14а. Антиоксидативни капацитет сувих екстраката мајчине душице (***ABTS*** и ***DPPH*** тест)

	***ABTS* тест [mmol *Trolox*/g]**		***DPPH* тест IC_{50} [mg/mL]**	
Метода екстракције	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Мацерација	14,8 ± 1,3$^{а, 1}$	13,6 ± 1,6$^{а, 1}$	0,18 ± 0,00$^{б, 1}$	0,23 ± 0,00$^{б, 2}$
Повишена температура	14,0 ± 0,7$^{а, 1}$	13,9 ± 1,0$^{а, 1}$	0,17 ± 0,00$^{аб, 1}$	0,22 ± 0,00$^{аб, 2}$
Ултразвучно купатило	14,3 ± 1,1$^{а, 1}$	13,3 ± 0,7$^{а, 1}$	0,17 ± 0,00$^{аб, 1}$	0,22 ± 0,00$^{аб, 2}$
Ултразвучна сонда	14,5 ± 1,1$^{а, 1}$	13,4 ± 0,9$^{а, 1}$	0,16 ± 0,02$^{а, 1}$	0,22 ± 0,00$^{аб, 2}$
Микроталаси	13,9 ± 1,6$^{а, 1}$	14,1 ± 1,2$^{а, 1}$	0,17 ± 0,01$^{аб, 1}$	0,21 ± 0,02$^{а, 2}$

Вредности са истим словом (а-б) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

Лиофилизовани инкапсулирани екстракти су показали следећи тренд у неутрализацији слободног *ABTS* радикала: микроталаси ≥ мацерација и повишена температура ≥ ултразвучни таласи (табела 4.14б). Са друге стране, у поменутом тесту, након спреј сушења инкапсулирани екстракт добијен микроталасима показао је статистички значајно бољу антиоксидативну активност у односу на све друге инкапсулиране екстракте, између којих није било значајне разлике. Статистички значајна разлика између антиоксидативног потенцијала инкапсулираних екстраката осушених различитим методама уочена је код мацерације, повишене температуре и ултразвучне сонде, где је процес лиофилизације сачувао више антиоксидативних компонената у односу на спреј сушење. Познато је да улазна температура гаса приликом спреј сушења значајно утиче на полифеноле, деградирајући их и смањујући антиоксидативни капацитет екстракта (Fang и Bhandari, 2010).

Табела 4.14б. Антиоксидативни капацитет сувих желатинских инкапсулата екстраката мајчине душице (***ABTS*** и ***DPPH*** тест)

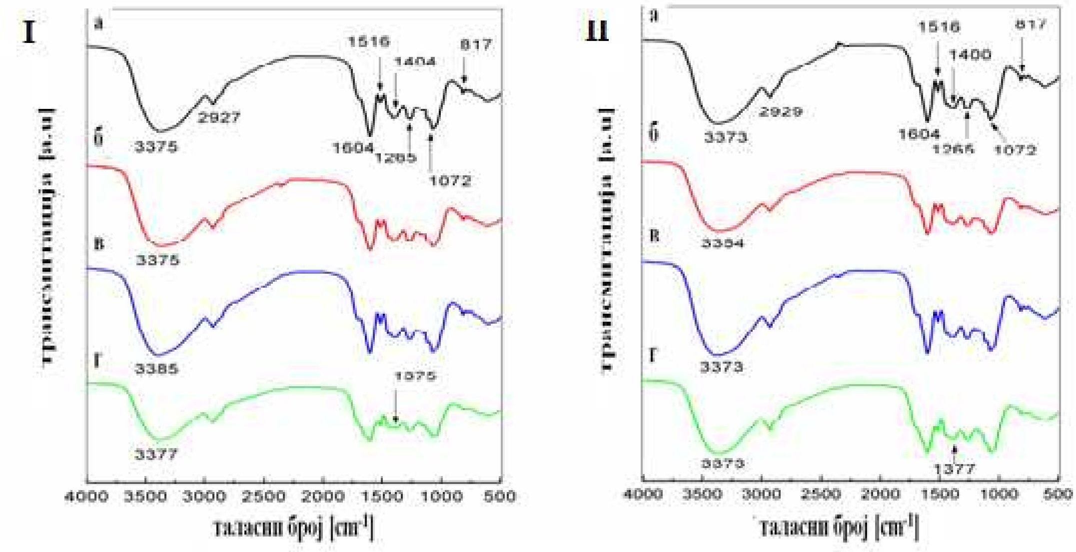
	***ABTS* тест [mmol *Trolox*/g]**		***DPPH* тест IC_{50} [mg/mL]**	
Метода екстракције	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Мацерација + желатин	4,2 ± 0,3$^{\text{аб}, 1}$	2,7 ± 0,9$^{\text{б}, 2}$	1,05 ± 0,12$^{\text{б}, 1}$	0,92 ± 0,02$^{\text{аб}, 1}$
Повишена температура + желатин	4,3 ± 0,4$^{\text{аб}, 1}$	3,3 ± 0,6$^{\text{б}, 2}$	0,79 ± 0,06$^{\text{а}, 1}$	0,80 ± 0,04$^{\text{а}, 1}$
Ултразвучно купатило + желатин	3,6 ± 1,0$^{\text{б}, 1}$	3,0 ± 1,2$^{\text{б}, 1}$	0,98 ± 0,09$^{\text{б}, 1}$	1,04 ± 0,22$^{\text{б}, 1}$
Ултразвучна сонда + желатин	3,5 ± 0,2$^{\text{б}, 1}$	3,1 ± 0,3$^{\text{б}, 2}$	0,82 ± 0,02$^{\text{а}, 1}$	0,79 ± 0,02$^{\text{а}, 1}$
Микроталаси + желатин	4,8 ± 1,0$^{\text{а}, 1}$	5,2 ± 0,3$^{\text{а}, 1}$	1,00 ± 0,05$^{\text{б}, 1}$	0,84 ± 0,18$^{\text{а}, 1}$

Вредности са истим словом (а-б) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0{,}05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

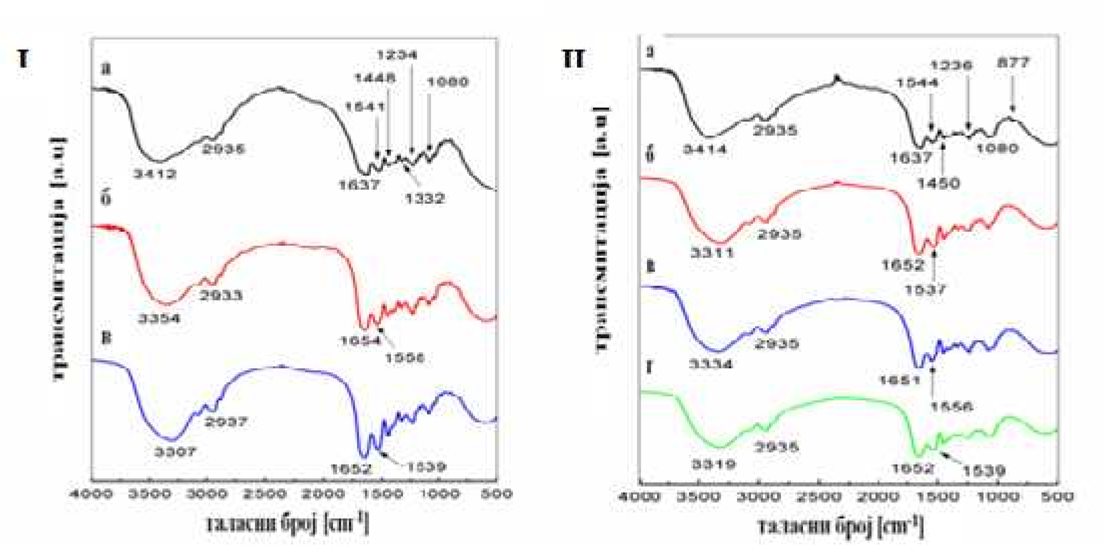
Инкапсулирани лиофилизовани екстракти добијени повишеном температуром и ултразвучном сондом показали су највећи антиоксидативни потенцијал у неутрализацији *DPPH* радикала у односу на друге инкапсулиране екстракте између којих није било статистички значајне разлике (табела 4.14б). Са друге стране, након спреј сушења, антиоксидативна активност инкапсулираних екстраката, у *DPPH* тесту, пратила је следећи тренд: повишена температура, ултразвучна сонда и микроталаси ≥ мацерација ≥ ултразвучно купатило. У односу на чисте екстракте где је спреј сушење редуковало антиоксидативни потенцијал према *DPPH* радикалу, инкапсулација у желатин је довела до тога да не постоји статистички значајна разлика између антиоксидативног капацитета инкапсулираних екстраката осушених различитим техникама. Тиме је остварен један од циљева инкапсулације – заштита полифенолних антиоксиданаса од деградације на повишеној температури.

4.4.2. *FTIR* спектри сувих екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата

FTIR анализа узорака урађена је у циљу испитивања утицаја методе екстракције и методе инкапсулације на хемијске карактеристике сувих екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата. Додатно, извршена је анализа носача, односно желатина коришћеног у процесу инкапсулације. *FTIR* спектри лиофилизованих и спреј осушених екстраката мајчине душице (добијених мацерацијом, повишеном температуром, ултразвучном сондом и микроталасима) приказани су на слици 4.13а. *FTIR* спектри желатина и лиофилизованих и спреј осушених инкапсулата екстраката (добијених повишеном температуром и микроталасима) приказани су на слици 4.13б.



Слика 4.13а. *FTIR* спектри: (I) лиофилизовани и (II) спреј осушени екстракти мајчине душице, добијени (а) мацерацијом, (б) повишеном температуром, (в) ултразвучном сондом и (г) микроталасима



Слика 4.13б. *FTIR* спектри: (I) желатин: (а) основни, (б) лиофилизован и (в) спреј осушен, (II) инкапсулирани екстракти добијени повишеном температуром, (а) лиофилизован и (б) спреј осушен и микроталасима, (в) лиофилизован и (г) спреј осушен

У *FTIR* спектрима екстраката добијених различитим методама екстракције и накнадно осушених лиофилизацијом или спреј сушењем (слика 4.13а) може се уочити неколико трака са изразитим интензитетом, попут траке на око 1604 cm^{-1}, која вероватно потиче од COO- вибрација у молекулима полисахарида (Schulz и Baranska, 2007), док је трака на око 1072 cm^{-1} блиска позицијама траке која потиче од C-OH вибрација у присутним угљеним хидратима (Lu и сар., 2011). Трака на око 2927-2929 cm^{-1} потиче од C-H вибрација и по својој позицији одговара истој вибрацији идентификованој у екстракту зеленог чаја (Белшчак-Цвитановић и сар., 2015). Највеће промене у спектрима екстраката су уочене у позицијама трака које потичу од вибрација OH група (спектрални регион 3000-3600 cm^{-1}). Ове разлике се пре свега могу довести у везу са условима сушења, али и хемијским саставом екстраката, који зависи и од методе екстракције. Трака која се код свих екстраката налази на 1516 cm^{-1} највероватније потиче од екстрахованих флавоноида (Heneczkowski и сар., 2001). Трака на 1265 cm^{-1} уочена у спектрима осушених екстраката може се довести у везу са полифенолним компонентама биљке (C–C–O вибрације) (Schulz и Baranska, 2007). Трака мањег интензитета на око 817 cm^{-1} у узорцима осушених екстраката могла би се довести у везу са присутним монотерпенима (C-H вибрације) (Schulz и Baranska, 2007). Промене у *FTIR* спектрима екстраката добијених различитим поступцима екстракције су релативно мале. Код узорка добијеног микроталасном екстракцијом уочава се трака на 1377 cm^{-1} уместо траке са максимумом на око 1400 cm^{-1}, која вероватно потиче од присутних монотерпена (Schulz и Baranska, 2007). Трака на око 1400-1404 cm^{-1} би могла потицати од карбоксилата (Rastogi и Arunachalam, 2011).

Како би се испитао утицај процеса сушења на носач, желатин је растворен у истој концентрацији као у инкапсулатима, без додатка екстракта, а затим је под истим условима лиофилизован, односно спреј осушен и анализиран *FTIR* спектроскопијом (слика 4.13бI). Уочено је више карактеристичних трака у *FTIR* спектрима желатина, а као најважније су траке везане за структуру протеина: 1637 cm^{-1} (амид I, C=O вибрације) и 1541 cm^{-1} (амид II, N-H вибрације) (Jin и сар., 2015; Saarai и сар., 2012). Трака са максимумом на око 2935 cm^{-1} потиче од C-H вибрација истезања, док се још могу уочити траке на 1448 cm^{-1}, 1332 cm^{-1} и 1080 cm^{-1}, које су у литератури описане код желатина, а потичу највероватније од C-O вибрација (Saarai и сар., 2012) или, пак, од карбоксилних група из аминокиселина (траке приближно у опсегу 1300-1450 cm^{-1}) (Kim и сар., 2005). Амид III трака (N-H вибрације) може се уочити на око 1234 cm^{-1} (Jin и сар., 2015). Промене на *FTIR* спектрима носача у односу на полазни (основни) желатин су уочљиве пре свега у области вибрација OH група (3700-3000 cm^{-1}), што је вероватно последица нарушавања структуре и међумолекулских веза, које настаје у процесу сушења. Друге промене су у спектралној области амидних трака, где се уочавају пре свега промене у позицији амид I траке код празних носача (нова позиција на око 1654 cm^{-1}), као и промена позиције амид II траке (нова позиција на 1558 cm^{-1}) код желатина који је лиофилизован. У литератури се могу наћи подаци о утицају процеса лиофилизације на структуру протеина. Schwegman и сар. (2007) су показали да лиофилизација, али и смрзавање, могу да утичу на секундарну структуру протеина, што је уочено преко промена у позицији амид I траке. Исти аутори су такође показали да се додатком манитола и сахарозе може смањити утицај процеса сушења, тј. лиофилизације, на структуру протеина. И други аутори су пратили утицај лиофилизације на секундарну структуру протеина, при чему су дошли до сличних закључака о утицају додавања појединих шећера на очување структуре протеина (Izutsu и сар., 2004). Што се тиче разлика између утицаја лиофилизације и спреј сушења на структуру желатина, промене су видљиве код позиција трака које потичу од OH група, као и у позицији амид II траке. Као што је већ речено, различити начини сушења вероватно утичу другачије на међумолекулске интеракције, што утиче и на промене позиције траке која потиче од OH групе. Интересантно, позиција амид II траке код спреј осушеног желатина се није драстично мењала у односу на полазни (нативни) желатин. Zhao и сар. (2013) су утврдили да се структура протеина мења у зависности од тога да ли су протеини лиофилизовани или спреј осушени. Према истим ауторима, спреј осушени протеини су имали бољу растворљивост, док су лиофилизовани протеини показали бољу термичку стабилност.

Након инкапсулације, *FTIR* спектри узорака добијених лиофилизацијом и спреј сушењем показали су готово искључиво траке које потичу од носача, тј. желатина (слика 4.13бII). Од промена које се могу уочити у спектрима, у односу на чист носач, пре свега се издвајају померања трака које потичу од OH група (3700-3000 cm^{-1}), као и померање код позиција амид I и амид II трака код лиофилизованог инкапсулата екстракта добијеног повишеном температуром. С друге стране, спреј осушен инкапсулат екстракта добијеног микроталасима није показао значајнија одступања у тракама које потичу од желатина. Важно је напоменути да је микроталасни екстракт имао већи садржај угљених хидрата и протеина у односу на остале екстракте (табела 4.13). Као што је раније истакнуто, у литератури се могу наћи подаци о позитивном утицају додатка шећера на очување структуре протеина током процеса лиофилизације. Могуће је да су присутни угљени хидрати у узорку добијеном микроталасима на исти начин утицали на структуру желатина. С друге стране, *FTIR* спектри узорака добијених спреј сушењем нису показали значајније одступање у позицијама трака које потичу од желатина, што је генерално у сагласности са резултатима добијеним за чист носач. Што се тиче интеракције између носача и компонената екстраката, тешко је из добијених *FTIR* спектара извести неки јасан закључак. Наиме, приликом мешања и растварања желатина у екстрактима (пре инкапсулације) није примећено формирање талога или замућења. Ово указује да иако постоје, интеракције желатин-екстракт највероватније нису пресудно утицале на формирање инкапсулата.

Чињеница да у *FTIR* спектрима инкапсулата доминира желатин може да указује на добро формирање заштитног омотача око компонената екстракта. Наравно, треба узети у обзир и да је додата знатна количина желатина пре саме инкапсулације, што такође има утицаја на *FTIR* спектре инкапсулата. Medina-Torres и сар. (2016) су закључили да појава трака у *FTIR* спектру које готово искључиво потичу од носача указује на ефикасно обавијање активних компонената и самим тим њихову бољу заштиту.

4.4.3. Расподела величина честица и зета потенцијал

У циљу испитивања величине и униформности лиофилизованих и спреј осушених честица, као и њихове стабилности, кроз одређивање зета потенцијала, коришћене су методе дифракције ласерске светлости и фотон корелационе спектроскопије.

Величина и расподела величина честица желатинских инкапсулата екстраката мајчине душице добијених мацерацијом, повишеном температуром, ултразвучним таласима и микроталасима представљене су преко запреминских пречника и дате су у табели 4.15а и 4.15б.

Величина честица лиофилизованих желатинских инкапсулата екстраката мајчине душице прати следећи тренд: микроталаси < повишена температура < мацерација < ултразвучни таласи (табела 4.15а). По питању униформности поменутих узорака, односно мере апсолутног одступања од средине расподеле, највећу униформност је имао инкапсулат екстракта добијеног микроталасима > повишена температура > мацерација и ултразвучно купатило > ултразвучна сонда.

Величина честица спреј осушених инкапсулата екстраката следи тренд: повишена температура и ултразвучно купатило < мацерација и микроталаси < ултразвучна сонда (табела 4.15б). Код униформности поменутих инкапсулата уочен је следећи тренд: ултразвучно купатило и микроталаси > повишена температура и ултразвучна сонда > мацерација.

Табела 4.15а. Расподела величина честица <u>лиофилизованих</u> желатинских инкапсулата екстраката мајчине душице (дифракција ласерске светлости)

Узорак	d_{10} [μm]	d_{50} [μm]	d_{90} [μm]	униформност	*SPAN* фактор
Мацерација + желатин	62,569	176,771	374,656	0,548	1,765
Повишена температура + желатин	49,593	150,776	343,468	0,639	1,949
Ултразвучно купатило + желатин	82,970	223,068	464,107	0,527	1,709
Ултразвучна сонда + желатин	85,092	214,976	429,864	0,498	1,604
Микроталаси + желатин	30,221	129,865	337,964	0,734	2,370

d, средњи масени пречник запреминске расподеле; d_{10}, d_{50} и d_{90}, 10%, 50% и 90% узорка мање од те вредности; *SPAN* фактор, ширина расподеле

Табела 4.15б. Расподела величина честица <u>спреј осушених</u> желатинских инкапсулата екстраката мајчине душице (дифракција ласерске светлости)

Узорак	d_{10} [μm]	d_{50} [μm]	d_{90} [μm]	униформност	*SPAN* фактор
Мацерација + желатин	2,087	8,540	23,051	0,855	2,455
Повишена температура + желатин	1,912	7,863	21,825	0,961	2,533
Ултразвучно купатило + желатин	1,977	7,961	21,633	1,01	2,469
Ултразвучна сонда + желатин	2,135	8,082	22,765	0,971	2,553
Микроталаси + желатин	2,019	8,534	23,617	1,05	2,531

d, средњи масени пречник запреминске расподеле; d_{10}, d_{50} и d_{90}, 10%, 50% и 90% узорка мање од те вредности; *SPAN* фактор, ширина расподеле

Након обе методе сушења највеће честице је поседовао инкапсулиран екстракт добијен ултразвучном сондом. Величина честица спреј осушених инкапсулата је била далеко мања и униформност значајно већа него код лиофилизованих паралела. Према литературним подацима, инкапсулати добијени спреј сушењем имају униформну расподелу величина честица (10-100 µm), док се лиофилизацијом добијају честице непредвидивог облика и величине (Munin и Edwards-Lévy, 2011; Fang и Bhandari, 2010).

Вредности зета потенцијала лиофилизованих и спреј осушених екстраката мајчине душице и њихових инкапсулата одређене су у циљу испитивања стабилности узорака. Вредности зета потенцијала измерене применом фотон корелационе спектроскопије приказане су у табелама 4.16а и 4.16б.

Апсолутна вредност зета потенцијала екстракта добијеног микроталасима у обе методе сушења била је статистички значајно мања у поређењу са осталим екстрактима, што указује на лошију стабилност поменутог екстракта (табела 4.16а). Статистички највећу апсолутну вредност зета потенцијала и последично бољу стабилност показао је екстракт добијен мацерацијом након обе методе сушења. Апсолутне вредности зета потенцијала лиофилизованих екстраката следиле су тренд: мацерација > повишена температура и ултразвучни таласи > микроталаси.

Табела 4.16а. Зета потенцијал сувих екстраката мајчине душице (фотон корелациона спектроскопија)

	Зета потенцијал [mV]	
Метода екстракције	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Мацерација	-18,7 ± 0,8$^{\text{а, 1}}$	-18,3 ± 0,4$^{\text{а, 1}}$
Повишена температура	-16,3 ± 0,1$^{\text{б, 1}}$	-14,7 ± 0,1$^{\text{в, 2}}$
Ултразвучно купатило	-17,1 ± 0,6$^{\text{б, 1}}$	-14,8 ± 0,0$^{\text{в, 2}}$
Ултразвучна сонда	-15,8 ± 0,8$^{\text{б, 1}}$	-15,7 ± 0,1$^{\text{б, 1}}$
Микроталаси	-7,9 ± 0,2$^{\text{в, 1}}$	-7,9 ± 0,3$^{\text{г, 1}}$

Вредности са истим словом (а-г) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

Након спреј сушења, апсолутне вредности зета потенцијала имале су следећи тренд: мацерација > ултразвучна сонда > повишена температура и ултразвучно купатило > микроталаси (табела 4.16а). Додатно, није било статистички значајне разлике у вредностима зета потенцијала екстраката осушених лиофилизацијом и спреј сушењем, осим код екстраката добијених повишеном температуром и у ултразвучном купатилу, где су лиофилизовани узорци показали статистички већу апсолутну вредност зета потенцијала.

Додавањем желатина у екстракт долази до значајног смањења апсолутне вредности зета потенцијала, односно смањења стабилности система, у односу на чист екстракт (табела 4.16б).

Табела 4.16б. Зета потенцијал сувих желатинских инкапсулата екстраката мајчине душице (фотон корелациона спектроскопија)

	Зета потенцијал [mV]	
Метода екстракције	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Желатин	-3,4 ± 0,2$^{\text{а, 1}}$	-1,9 ± 0,3$^{\text{а, 2}}$
Мацерација + желатин	-2,5 ± 0,1$^{\text{в, 1}}$	-1,7 ± 0,1$^{\text{а, 2}}$
Повишена температура + желатин	-2,9 ± 0,1$^{\text{б, 1}}$	-1,7 ± 0,1$^{\text{а, 2}}$
Ултразвучно купатило + желатин	-2,9 ± 0,2$^{\text{б, 1}}$	-1,4 ± 0,1$^{\text{б, 2}}$
Ултразвучна сонда + желатин	-2,6 ± 0,2$^{\text{бв, 1}}$	-1,8 ± 0,1$^{\text{а, 2}}$
Микроталаси + желатин	-2,0 ± 0,1$^{\text{г, 1}}$	1,0 ± 0,1$^{\text{в, 2}}$

Вредности са истим словом (а-г) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

Апсолутна вредност зета потенцијала самог желатина је била већа него код инкапсулата екстраката. Ипак, након спреј сушења додатак екстраката добијених мацерацијом, повишеном температуром и ултразвучном сондом није статистички значајно смањио апсолутну вредност зета потенцијала чистог желатина. Према литературним подацима, зета потенцијал нативног желатина износи -5,6 mV при pH 7, јер негативно наелектрисана COO^- група, која је изгубила H^+, доминира у односу на позитивно наелектрисане бочне ланце желатина, што резултује негативним вредностима зета потенцијала (Roy и сар., 2017). Након сушења долази до смањења апсолутне вредности зета потенцијала желатина, зато што процеси лиофилизације и спреј сушења нарушавају структуру и стабилност протеина, односно желатина, у овом случају (Zhao и сар., 2013).

Инкапсулиран екстракт добијен микроталасима у обе методе сушења показује статистички значајно ниже апсолутне вредности зета потенцијала, као и у случају чистог екстракта (табела 4.16б). Након лиофилизације, апсолутне вредности зета потенцијала инкапсулираних екстраката прате тренд: повишена температура и ултразвучно купатило ≥ ултразвучна сонда ≥ мацерација > микроталаси, а након спреј сушења: мацерација, повишена температура и ултразвучна сонда > ултразвучно купатило > микроталаси. У случају свих инкапсулираних екстраката, апсолутна вредност зета потенцијала је статистички значајно већа након лиофилизације него након спреј сушења. Према добијеним резултатима може се закључити да су лиофилизовани желатински инкапсулати стабилнији него спреј осушени, што је у складу са резултатима студије која се бавила променама које настају у протеинима након различитих метода сушења, где су лиофилизовани протеини показали бољу стабилност (Zhao и сар., 2013).

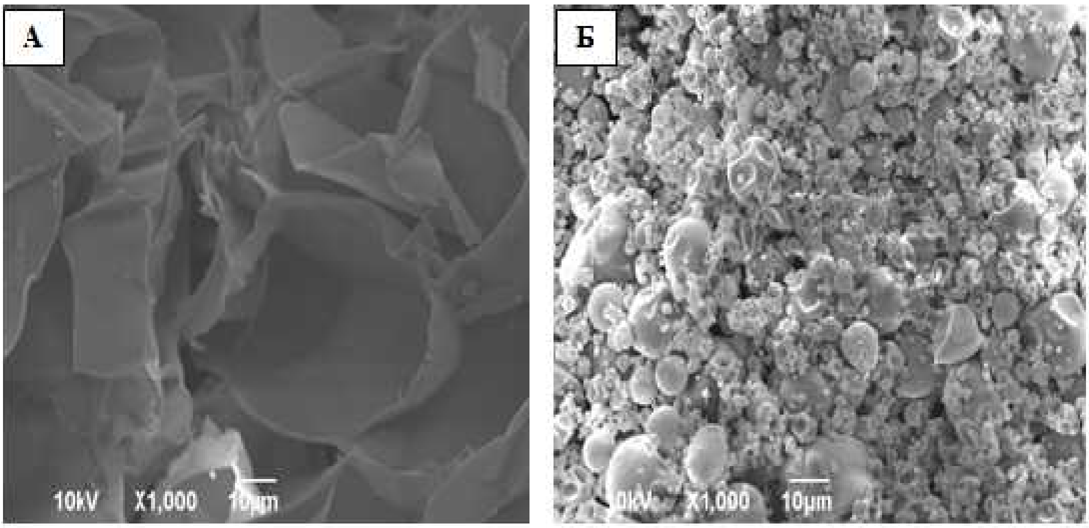
4.4.4. Морфолошке карактеристике сувих екстраката и инкапсулата

Макроскопски изглед лиофилизованог и спреј осушеног желатина, екстракта мајчине душице (добијеног на повишеној температури) и његових желатинских инкапсулата приказан је на слици 4.14.

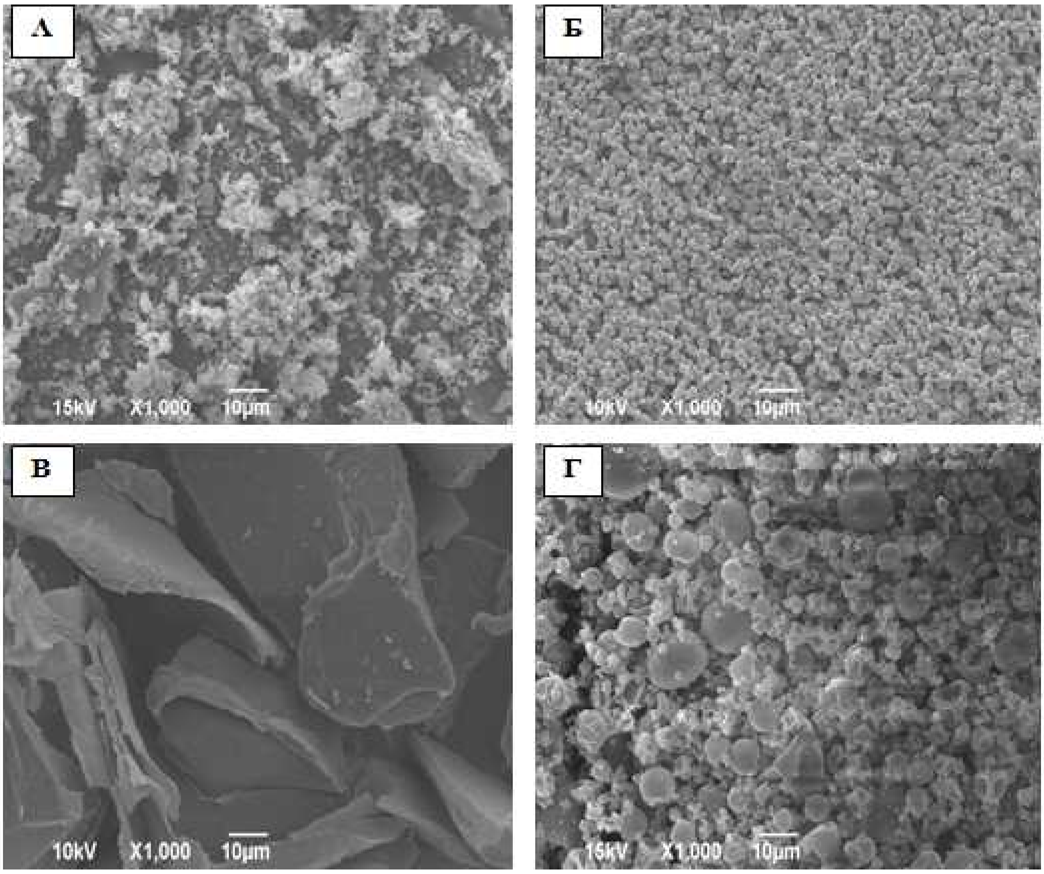
Методе лиофилизације и спреј сушења у случају чистих екстраката на макроскопском нивоу дају прахове сличних карактеристика, док су код самог желатина и желатинских инкапсулата уочљиве значајне разлике. Након лиофилизације желатина и желатинских инкапсулата екстраката добијају се чврсте структуре облика суда у ком се врши процес лиофилизације, које се након тога уситњавају у млину, при чему настају волуминозни прахови са честицама видљиво различите морфологије и величине. Са друге стране, спреј сушење даје хомогени светлији фини прах желатина и желатинских инкапсулата екстраката са знатно ситнијим честицама.

Слика 4.14. Макроскопски приказ: (А) лиофилизованог и спреј осушеног желатина, (Б) спреј осушеног и лиофилизованог желатинског инкапсулата екстракта мајчине душице, (В) спреј осушеног и лиофилизованог екстракта мајчине душице

SEM анализа чистог желатина, чистих екстраката врсте *T. serpyllum* (добијених на повишеној температури и у микроталасном реактору) и њихових желатинских инкапсулата након лиофилизације и спреј сушења приказана је на сликама 4.15а-в.

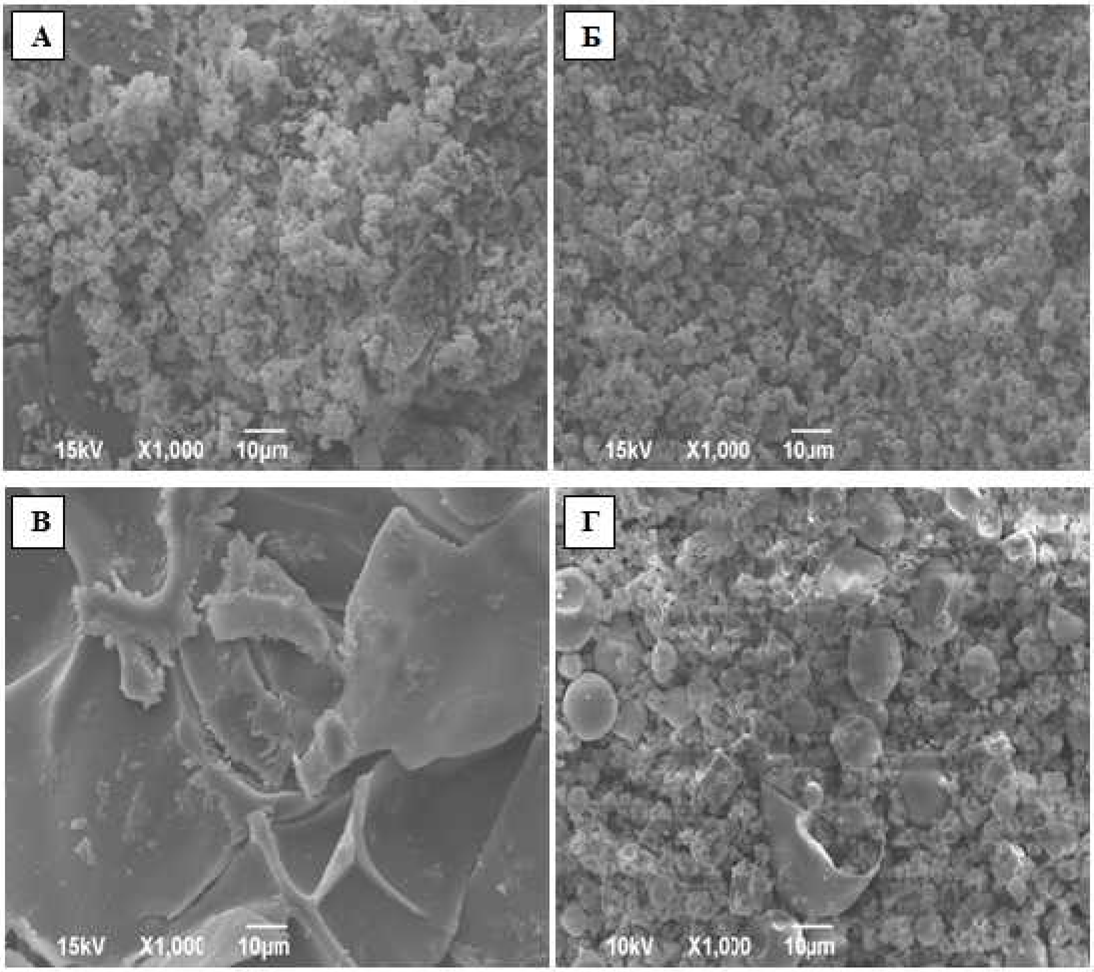


Слика 4.15а. Микроскопски приказ: (А) желатина након лиофилизације и (Б) желатина након спреј сушења; скенирајућа електронска микроскопија



Слика 4.15б. Микроскопски приказ: (А) екстракта мајчине душице добијеног на **повишеној температури** и (В) његовог желатинског инкапсулата након лиофилизације; (Б) екстракта добијеног на повишеној температури и (Г) његовог желатинског инкапсулата након спреј сушења; скенирајућа електронска микроскопија

Према литературним подацима, већина микрокапсула су мале сферичне честице дијаметра између неколико микрометара и неколико милиметара. Међутим, неретко се дешава да микрокапсуле немају много сличности са једноставним сферама (Gharsallaoui и сар., 2007). Величина и облик формираних микрокапсула зависе од материјала и метода које се користе за њихову припрему. У зависности од физичко-хемијских карактеристика језгра и зида микрочестице, као и технике микроинкапсулације, честице могу бити једноставне сфере, честице које садрже језгро неправилног облика, вишеједарне честице са једним омотачем и честице са неколико омотача (Gharsallaoui и сар., 2007; Fang и Bhandari, 2010).



Слика 4.15в. Микроскопски приказ: (А) екстракта мајчине душице добијеног **микроталасима** и (В) његовог желатинског инкапсулата након лиофилизације; (Б) екстракта добијеног микроталасима и (Г) његовог желатинског инкапсулата након спреј сушења; скенирајућа електронска микроскопија

Као што се може видети на сликама 4.15а-в, процес лиофилизације је дао честице неправилног облика и код чистог желатина, чистих екстраката и инкапсулата, док је спреј сушење формирало мале честице сферичног и псеудо-сферичног облика, са неравном површином. Према литератури, инкапсулиране честице добијене спреј сушењем најчешће имају сферичну морфологију, док се лиофилизацијом добијају честице непредвидиве форме (Munin и Edwards-Lévy, 2011; Fang и Bhandari, 2010). Gómez-Mascaraque и сар. (2015) су показали да веће концентрације желатина (20%) након електроспреј сушења формирају влакна, док су псеудо-сферичне честице карактеристичне за ниже концентрације желатина (5-

8%). Додатак екстракта мајчине душице није утицао на морфолошке карактеристике микрочестица желатина, као што је био случај и у инкапсулацији (-)-епигалокатехин галата у желатин (Gómez-Mascaraque и сар., 2015).

4.4.5. Насипна густина и растворљивост сувих екстраката и инкапсулата

Како су карактеристике попут насипне густине и растворљивости сувих честица веома важне са аспекта њихове примене у прехрамбеним, фармацеутским и козметичким производима, за испитивање насипне густине и растворљивости лиофилизованих и спреј осушених екстраката врсте *T. serpyllum* и њихових желатинских инкапсулата примењене су фармакопејске процедуре.

Као што се може видети у табелама 4.17а и 4.17б, највећу насипну густину су поседовали екстракти добијени микроталасима и њихови желатински инкапсулати у обе методе сушења.

Табела 4.17а. Насипна густина и растворљивост сувих екстраката мајчине душице

	Насипна густина [mg/cm^3]		**Растворљивост [%]**	
Метода екстракције	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Мацерација	125,0 ± 1,8$^{г, 2}$	200,0 ± 3,3$^{г, 1}$	80 ± 4$^{а, 1}$	84 ± 2$^{а, 1}$
Повишена температура	140,0 ± 2,4$^{б, 2}$	235,5 ± 4,7$^{б, 1}$	78 ± 3$^{а, 1}$	76 ± 2$^{в, 1}$
Ултразвучно купатило	130,5 ± 1,0$^{в, 2}$	215,0 ± 4,1$^{в, 1}$	78 ± 2$^{а, 1}$	80 ± 1$^{б, 1}$
Ултразвучна сонда	113,5 ± 2,5$^{д, 2}$	211,0 ± 3,5$^{в, 1}$	82 ± 4$^{а, 1}$	80 ± 2$^{б, 1}$
Микроталаси	200,0 ± 3,1$^{а, 2}$	275,5 ± 6,7$^{а, 1}$	64 ± 3$^{б, 1}$	60 ± 4$^{г, 1}$

Вредности са истим словом (а-д) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

Поменути екстракти садрже веће количине шећера и пептида у поређењу са екстрактима добијеним другим методама екстракције (поглавље 4.4.1), што доприноси већој насипној густини (табела 4.17а). Сам носач, односно желатин, имао је најмању насипну густину, док је додатак екстракта узроковао повећање поменутог параметра, посебно код лиофилизованих узорака, где је повећање насипне густине инкапсулата у односу на чист желатин ишло од 2,5 до 3,8 пута (табела 4.17б). Поред тога, насипна густина спреј осушених екстраката и инкапсулата била је статистички значајно већа у односу на насипну густину њихових лиофилизованих паралела. Разлог лежи у бољем и компактнијем паковању морфолошки правилнијих и мањих честица добијених спреј сушењем, у односу на честице неправилног облика добијене лиофилизацијом (поглавља 4.4.3. и 4.4.4). Додатно, желатински инкапсулати су након лиофилизације били подвргнути процесу млевења, који је дао велике честице непредвидивог и неправилног облика, што је допринело лошијем паковању прахова и последично мањој насипној густини.

Табела 4.17б. Насипна густина и растворљивост сувих желатинских инкапсулата екстраката мајчине душице

	Насипна густина [mg/cm^3]		**Растворљивост [%]**	
Метода екстракције	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**	**Лиофилизација**	**Спреј сушење**
Желатин	$36,0 \pm 0,2^{\text{д, 2}}$	$150,0 \pm 0,3^{\text{д, 1}}$	$48 \pm 2^{\text{в, 1}}$	$40 \pm 1^{\text{а, 2}}$
Мацерација + желатин	$128,0 \pm 4,0^{\text{б, 2}}$	$156,0 \pm 2,2^{\text{в, 1}}$	$61 \pm 1^{\text{а, 1}}$	$32 \pm 2^{\text{вг, 2}}$
Повишена температура + желатин	$133,5 \pm 3,4^{\text{б, 2}}$	$157,0 \pm 0,8^{\text{в, 1}}$	$56 \pm 3^{\text{б, 1}}$	$31 \pm 1^{\text{г, 2}}$
Ултразвучно купатило + желатин	$113,5 \pm 2,0^{\text{в, 2}}$	$154,0 \pm 1,2^{\text{вг, 1}}$	$44 \pm 1^{\text{г, 1}}$	$37 \pm 1^{\text{б, 2}}$
Ултразвучна сонда + желатин	$90,5 \pm 0,8^{\text{г, 2}}$	$162,5 \pm 1,9^{\text{б,1}}$	$44 \pm 2^{\text{г, 1}}$	$34 \pm 1^{\text{в, 2}}$
Микроталаси + желатин	$137,5 \pm 2,2^{\text{а, 2}}$	$175,5 \pm 2,7^{\text{а, 1}}$	$58 \pm 1^{\text{б, 1}}$	$32 \pm 3^{\text{вг, 2}}$

Вредности са истим словом (а-д) у свакој колони и истим бројем у експоненту (1-2) у сваком реду показују да не постоји статистички значајна разлика (n = 3, $p > 0,05$, *one-way ANOVA*, Данканов тест)

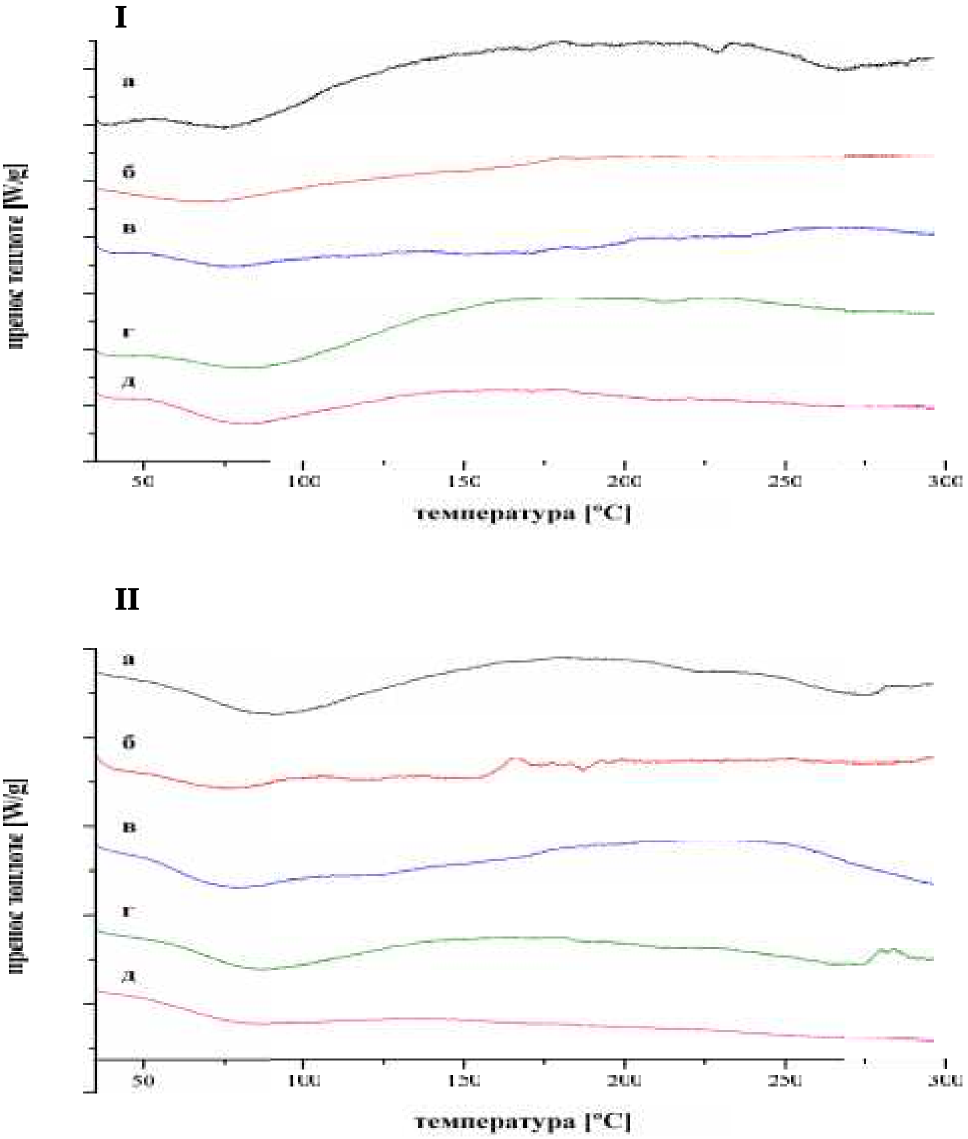
Растворљивост лиофилизованих екстраката добијених мацерацијом, повишеном температуром и ултразвучним таласима није се међусобно разликовала, док је екстракт добијен микроталасима показао статистички значајно мању растворљивост (табела 4.17а). Спреј осушен екстракт добијен мацерацијом показао је најбољу растворљивост, док је екстракт из микроталасног реактора поново имао статистички значајно нижу вредност овог параметра. Разлог може биту у претходно поменутој већој количини протеина и шећера у односу на друге екстракте (поглавље 4.4.1). Према литературним подацима, лошија растворљивост микроталасног екстракта се објашњава присуством у води нерастворних баласних материја (полисахарида, протеина и липида), које се ослобађају као последица прекомерног разарања биљне структуре микроталасима (Симић и сар., 2016). Статистички значајних разлика у растворљивости екстраката осушених лиофилизацијом и спреј сушењем није било.

Желатински инкапсулати су показали нижи степен растворљивости у односу на екстракте (табела 4.17б). Лиофилизован инкапсулиран екстракт добијен мацерацијом показао је статистички значајно бољу растворљивост у односу на носач и друге инкапсулате. Спреј осушен желатин имао је статистички значајно већу растворљивост у поређењу са спреј осушеним инкапсулатима, чија је растворљивост такође била значајно нижа у односу на њихове лиофилизоване паралеле. Мања растворљивост спреј осушеног желатина и желатинских инкапсулата у односу на њихове лиофилизоване паралеле може бити објашњена стварањем агрегата, које је карактеристично за мале честице правилног облика, као што су микросфере добијене спреј сушењем. За разлику од њих, велике честице неправилних облика добијене након лиофилизације и процеса млевења немају тенданцију стварања агрегата, те самим тим показују бољу растворљивост. Према литературним подацима, агрегација може утицати на стопу растварања честица (Liu и сар., 2008).

4.4.6. Термичке карактеристике сувих екстраката и инкапсулата

У циљу добијања информација о термичкој стабилности екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата, као и о интеракцијама између инкапсулираних компонената и носача, односно желатина, примењена је *DSC* метода. Поред тога, *DSC* представља корисну методу за праћење промена у термичким карактеристикама носача након инкапсулације жељених једињења. Познавање промена у поменутим карактеристикама веома је важно са аспекта производње инкапсулата (Баланч и сар., 2015). *DSC* термограми лиофилизованог и спреј осушеног желатина, екстраката (добијених повишеном температуром и микроталасима) и њихових желатинских инкапсулата приказани су на слици 4.16. Вредности температуре фазног прелаза и промене енталпије приказане су у табели 4.18.

Као што је приказано на *DSC* термограмима и у табели 4.18, лиофилизован и спреј осушен желатин има ендотермни пик на 80°C, односно на 89,5°C, што је у складу са литературним подацима, где се ендотермни пик желатина појављује на 85°C (Li и сар., 2008). Поред тога, код лиофилизованог желатина се могу уочити три мала додатна ендотермна пика, на 170,5°C, 181,4°C и 196,5°C, а код спреј осушеног желатина два додатна пика, на 223,1°C и 272,7°C (слика 4.16, криве а). Код лиофилизованог и спреј осушеног екстракта добијеног повишеном температуром, ендотермни пикови се појављују на нижим температурама него код њихових паралела добијених микроталасима (слика 4.16, криве б и в, и табела 4.18). Микроталасни екстракти поседују већу количину протеинских и угљенохидратних компонената, те стога и бољу термичку стабилност у поређењу са екстрактима добијеним на повишеној температури (поглавље 4.4.1). Додатно, код обе врсте екстраката, спреј осушени узорци имају пикове на вишим температурама, у односу на лиофилизоване паралеле. Према претходно приказаним резултатима, спреј осушени екстракти су поседовали већи садржај угљених хидрата, посебно екстракт добијен микроталасима (поглавље 4.4.1). Наиме, шећери присутни у екстрактима су утицали на очување секундарне структуре протеина, те самим тим и на термичку стабилност сувих екстраката, што је потврђено различитим студијама (Izutsu и сар., 2004; Schwegman и сар., 2007). Поред тога, код спреј осушеног екстракта добијеног повишеном температуром уочљиви су додатни пикови на 116,8°C и 187,3°C, као и код лиофилизованог екстракта добијеног микроталасима, на 172,2°C и 236,2°C (слика 4.16, криве б и в). Ендотермни пикови лиофилизованог и спреј осушеног инкапсулата екстракта добијеног повишеном температуром појављују се на значајно вишој температури у односу на њихове паралеле добијене микроталасима (слика 4.16, криве г и д, и табела 4.18). Такође, температура фазног прелаза је виша код лиофилизованих инкапсулата обе врсте екстраката у поређењу са спреј осушеним узорцима.



Слика 4.16. *DSC* термограми лиофилизованих (I) и спреј осушених узорака (II): (а) желатин, екстракт мајчине душице добијен – (б) повишеном температуром и (в) микроталасима, желатински инкапсулат екстракта добијеног – (г) повишеном температуром и (д) микроталасима; *DSC*, диференцијална скенирајућа калориметрија

Табела 4.18. Температура фазног прелаза и промена енталпије сувих екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата (диференцијална скенирајућа калориметрија)

Узорак		**Температура [°C]**			**ΔH [J/g]**
		почетак пика	**пик**	крај пика	
Повишена температура	лиофилизација	36,0	**67,4**	111,5	**69,9**
	спреј сушење	49,9	**74,4**	106,6	**46,5**
Микроталаси	лиофилизација	50,4	**74,3**	138,1	**68,8**
	спреј сушење	45,0	**81,4**	181,1	**202,5**
Желатин	лиофилизација	53,2	**80,0**	124,0	**137,6**
	спреј сушење	40,2	**89,5**	162,1	**309,7**
Повишена температура + желатин	лиофилизација	53,8	**91,8**	144,4	**145,1**
	спреј сушење	48,2	**86,6**	145,8	**161,8**
Микроталаси + желатин	лиофилизација	52,2	**81,8**	148,1	**120,3**
	спреј сушење	43,5	**81,5**	131,8	**147,9**

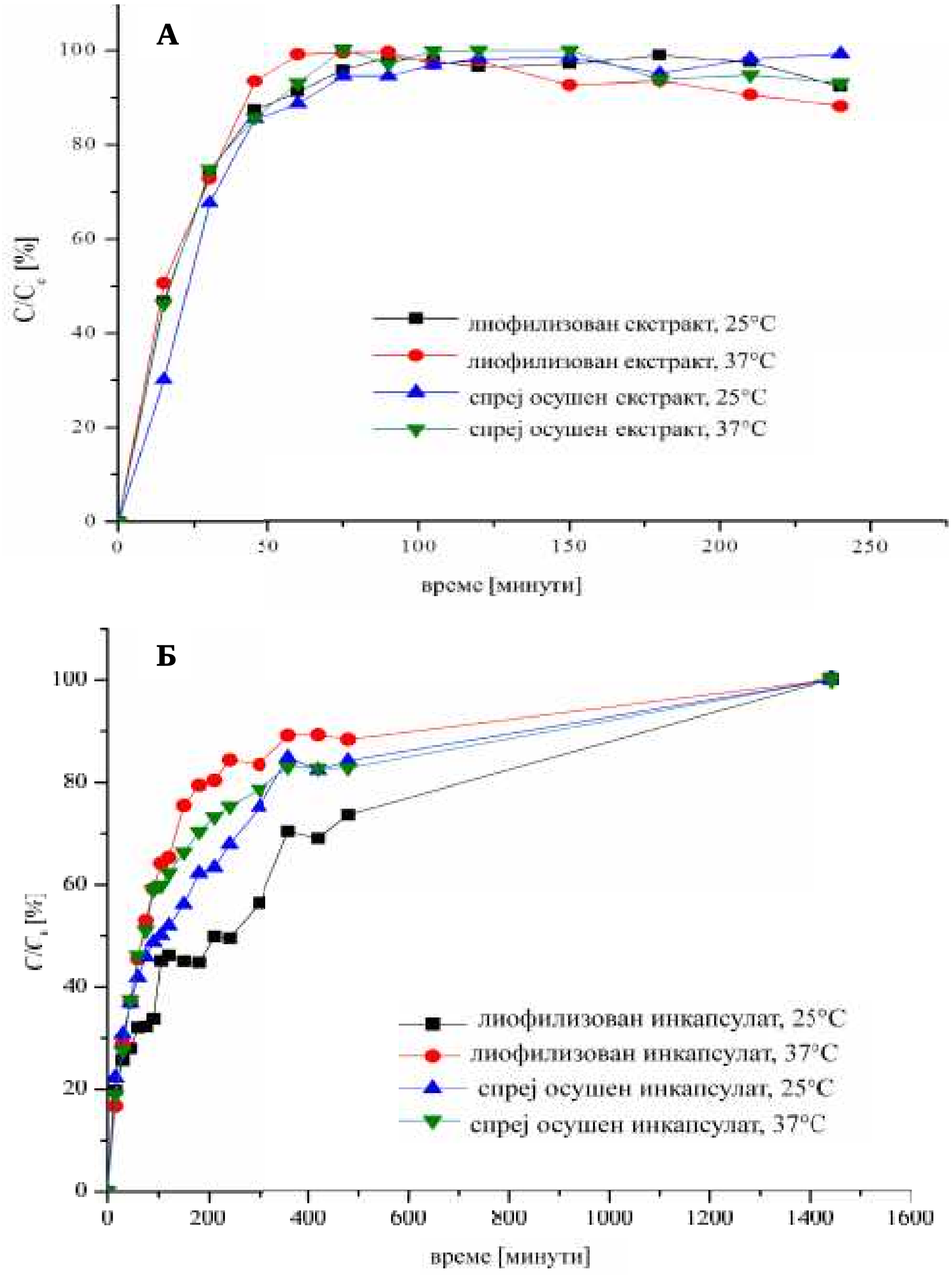
С обзиром на то да се код лиофилизованих желатинских инкапсулата екстраката пикови налазе на вишим температурама, посебно код екстракта добијеног повишеном температуром, може се закључити да су поменути узорци термички стабилнији. То може бити објашњено природом протеинског носача и протеина присутних у екстрактима, јер су Zhao и сар. (2013) показали да лиофилизовани протеини поседују бољу термичку стабилност у поређењу са спреј осушеним протеинима. Додатно, према претходно приказаним резултатима садржаја протеина, обе врсте екстраката су поседовале већи проценат протеина након лиофилизације него након спреј сушења (поглавље 4.4.1). Код лиофилизованог инкапсулата екстракта добијеног повишеном температуром, на 211,2°C уочава се један додатни пик, који потиче од желатина, код спреј осушене паралеле на 186,4°C и 272,6°C уочавају се два додатна пика, где први највероватније потиче од самог екстракта, а други од желатина, док се на термограму који одговара лиофилизованом инкапсулираном екстракту добијеном микроталасима појављује додатни пик на 210,5°C (слика 4.16, криве г и д).

Вредности промене енталпије код лиофилизованих екстраката добијених повишеном температуром и микроталасима биле су сличне, док је након спреј сушења екстракт добијен микроталасима имао значајно вишу вредност промене енталпије (табела 4.18). Вредности промене енталпије желатина и инкапсулата екстраката биле су значајно веће него код чистих екстраката. Лиофилизовани и спреј осушени инкапсулати екстракта добијеног повишеном температуром поседовали су више вредности промене енталпије него паралеле добијене микроталасима. У свим узорцима након процеса спреј сушења вредности промене енталпије биле су веће него након лиофилизације, осим код екстракта добијеног повишеном температуром. Према литературним подацима, високе вредности промене енталпије указују на присуство стабилизирајућих интеракција између инкапсулираних компонената и носача (Wu и сар., 2012).

4.4.7. Кинетика отпуштања полифенола, коефицијент дифузије и отпор дифузији

Један од циљева инкапсулације полифенола јесте добијање производа са модификованим ослобађањем активних принципа. Из тог разлога применом Францове ћелије испитано је отпуштање полифенола мајчине душице из сувих екстраката и њихових желатинских инкапсулата. Кинетика отпуштања полифенола из чистих лиофилизованих и спреј осушених екстраката мајчине душице (добијених на повишеној температури) и њихових желатинских инкапсулата праћена на собној температури и на 37°C приказана је на слици 4.17. Резултати су представљени као зависност C/C_e од времена, где је C концентрација полифенола у тренутку мерења, а C_e равнотежна концентрација полифенола.

Према добијеним резултатима може се закључити да се дифузија полифенола из чистих лиофилизованих и спреј осушених екстраката одвијала брзо (слика 4.17А). На собној температури, концентрација полифенола у рецепторском делу достигла је плато након 90 минута код лиофилизованог екстракта, а код спреј осушеног екстракта већ након 75 минута. С обзиром на то да се растворљивост лиофилизованог и спреј осушеног екстракта није статистички значајно разликовала, постизање платоа у различитим временима може бити објашњено присуством веће количине полифенола у лиофилизованом узорку (поглавље 4.4.1). Са друге стране, при 37°C код лиофилизованог екстракта плато је достигнут у 60. минуту, док је код спреј осушене паралеле било потребно 75 минута за настанак платоа. Познато је да виша температура узрокује повећање растворљивости полифенола и бржу дифузију (Mustafa и Turner, 2011).



Слика 4.17. Кинетика отпуштања полифенола из (А) сувих екстраката мајчине душице и (Б) њихових желатинских инкапсулата, праћена на 25°C и 37°C; *C*, концентрација полифенола у тренутку мерења; C_e, равнотежна концентрација полифенола

Дифузија полифенола из лиофилизованих и спреј осушених желатинских инкапсулата била је очекивано спорија, те је плато достигнут након 360 минута у свим узорцима, при обе експерименталне температуре (слика 4.17Б). Са слике је такође уочљиво да током првих 200 минута експеримента на собној температури, лиофилизован инкапсулат отпусти око 50% полифенола, док спреј осушен инкапсулат отпусти око 65% полифенола. Са друге стране, при 37°C након 200 минута, спреј осушен инкапсулат је отпустио око 75% полифенола, док је лиофилизован инкапсулат отпустио око 80% полифенола у истом временском интервалу.

Према Другом Фиковом закону дифузије, у посматраном систему промена концентрације са временом пропорционална је градијенту концентрације, при чему је константа пропорционалности коефицијент дифузије (*D*), који је карактеристика компоненте и система у коме се одвија дифузија:

$$\frac{\partial}{\partial} = D\ \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \qquad (4.1)$$

где је *C* концентрација компоненте која дифундује, а *z* растојање у правцу дифузије. У датом експерименту коришћена је Францова дифузиона ћелија као ћелија са дијафрагмом и уколико се претпостави да флукс кроз дијафрагму веома брзо достиже вредност флукса при стационарним условима, флукс компоненте (*J*) износи:

$$\mathrm{J} = \frac{D}{\delta}(C_d - C_r) \qquad (4.2)$$

где је *K* коефицијент расподеле, *δ* дебљина слоја у ком се одвија дифузија, а C_d и C_r концентрације компоненте у донорском и рецепторском делу. Масени биланси дају следеће изразе:

$$V_d\ \frac{dC_d}{d} = -P \cdot J \qquad (4.3)$$

$$V_r\ \frac{dC_r}{d} = P \cdot J \qquad (4.4)$$

где је *P* површина дијафрагме, а V_d и V_r запремине донорског и рецепторског дела ћелије. Комбинацијом једначина (4.2), (4.3) и (4.4) добија се израз:

$$\frac{d}{d}(C_d - C_r) = D\ \ (C_d - C_r) \qquad (4.5)$$

где је β геометријска константа и карактеристика је одређене ћелије која се користи:

$$\beta = \frac{P}{\delta}\left(\frac{1}{V_d} + \frac{1}{V_r}\right) \qquad (4.6)$$

У датом експерименту $\beta = 2{,}49 \cdot 10^4$ m^2. Почетни услов за поменути систем јесте:

$$t = 0 \qquad C_d - C_r = C_d^0 - C_r^0 \qquad (4.7)$$

Када се изведе интеграција једначине (4.6) уз наведени почетни услов, добија се једначина за одређивање коефицијента дифузије:

$$\frac{C_d - C_r}{C_d^0 - C_r^0} = e^{-\beta} \qquad (4.8)$$

која се може превести у облик:

$$\beta \quad = \ln\left(\frac{C_d^0 - C_r^0}{C_d - C_r}\right) \qquad (4.9)$$

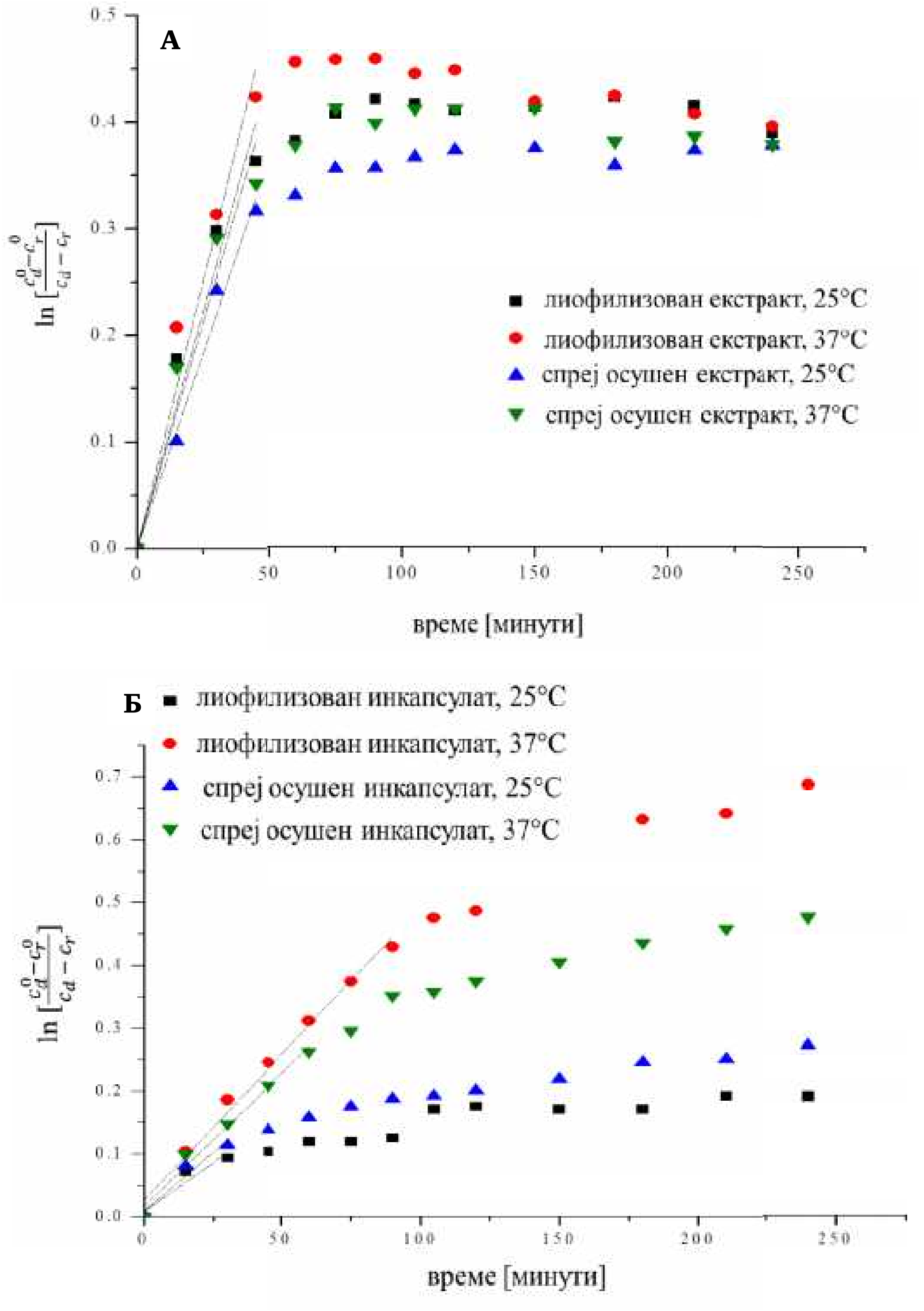
На основу концентрације компоненте у донорском и рецепторском делу ћелије током времена, могуће је одредити коефицијент дифузије. У датом експерименту дифузиони коефицијенти су одређени из нагиба линеарног дела кривих формираних из зависности $\ln\left(\frac{C_d^0 - C_r^0}{C_d - C_r}\right)$ од времена (слика 4.18), где су C^0_d и C^0_r почетне концентрације полифенола у донорском и рецепторском делу, а C_d и C_r концентрације полифенола у донорском и рецепторском делу у датом тренутку. Вредности дифузионих коефицијената приказане су у табели 4.19.

Додатно, укупни отпор преносу масе (R) израчунат је према једначини:

$$R = \frac{\delta}{D} \qquad (4.10.)$$

Вредности тако израчунатих отпора дате су у табели 4.19.

Резултати указују да је отпор преносу масе код спреј осушених екстраката био значајно већи у односу на лиофилизоване екстракте, посебно на собној температури (табела 4.19). Молекули шећера (присутни у већој количини у спреј осушеном екстракту) везују се за структуру полифенола, посебно флавоноида, стварајући комплексна једињења. Промена структуре и планарности молекула, као и прерасподела хидроксилних група узрокују промене како у активностима, тако и у дифузији полифенола (Јакобек, 2015).



Слика 4.18. Дифузија полифенола из (А) сувих екстраката мајчине душице и (Б) њихових желатинских инкапсулата, на 25°C и 37°C, апроксимирана Другим Фиковим законом дифузије; c^0_d и c^0_r, почетна концентрација полифенола у донорском и рецепторском делу; c_d и c_r, концентрација полифенола у донорском и рецепторском делу у датом тренутку

Табела 4.19. Коефицијенти дифузије и отпори дифузији полифенола из сувих екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата, праћени у Францовој дифузионој ћелији на 25°C и 37°C

Узорак	**δ [mm]**	***D*** **[m^2/s]**	***R*** **[s/m]**
лиофилизован екстракт, 25°C	2,04	$6{,}89\cdot10^{-9}$	$2{,}96\cdot10^{5}$
лиофилизован екстракт, 37°C	2,04	$6{,}69\cdot10^{-9}$	$3{,}05\cdot10^{5}$
спреј осушен екстракт, 25°C	2,04	$4{,}68\cdot10^{-9}$	$4{,}35\cdot10^{5}$
спреј осушен екстракт, 37°C	2,04	$6{,}02\cdot10^{-9}$	$3{,}39\cdot10^{5}$
лиофилизован инкапсулат, 25°C	2,02	$2{,}34\cdot10^{-9}$	$8{,}62\cdot10^{5}$
лиофилизован инкапсулат, 37°C	2,02	$3{,}41\cdot10^{-9}$	$5{,}92\cdot10^{5}$
спреј осушен инкапсулат, 25°C	2,02	$2{,}74\cdot10^{-9}$	$7{,}36\cdot10^{5}$
спреј осушен инкапсулат, 37°C	2,02	$3{,}08\cdot10^{-9}$	$6{,}56\cdot10^{5}$

δ, дебљина слоја у ком се одвија дифузија; *D*, коефицијент дифузије; *R*, укупни отпор преносу масе

Као што је и било очекивано, код спреј осушеног инкапсулата, желатин је узроковао повећање отпора за 69-94%, док је код лиофилизованог инкапсулата повећање отпора дифузији било скоро 3 пута у односу на чист екстракт. На собној температури, код лиофилизованог инкапсулата је забележен већи отпор преносу масе и последично мање ослобађање полифенола у односу на спреј осушену паралелу, док је при температури од 37°C отпор био већи код спреј осушеног инкапсулата, уз ослобађање мање количине полифенола у односу на лиофилизован узорак.

5. ЗАКЉУЧАК

Испитивања у оквиру докторске дисертације обухватила су оптимизацију процеса екстракције полифенола хербе мајчине душице, хемијску и биолошку карактеризацију добијених екстраката и инкапсулацију одабраних екстраката у желатинске микрочестице. У складу са постављеним циљевима и на основу приказаних резултата изведени су следећи закључци:

- Различити процесни параметри могу имати мањи или већи утицај на процес екстракције (са аспекта приноса полифенола) у зависности од саме технике екстракције, јер свака метода има специфичан механизам којим делује на биљни материјал и екстракциони медијум. Приликом оптимизације процеса екстракције, применом анализе варијансе и Данкановог теста, утврђено је да степен уситњености, однос дрога:растварач и врста растварача статистички значајно утичу на принос полифенола у екстрактима добијеним мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и ултразвучном сондом, док се време није показало као статистички значајан параметар. Приликом екстракције у ултразвучном купатилу, степен уситњености, однос дрога:растварач и време су статистички значајно утицали на принос полифенола, док различит удео етанола у екстракционом медијуму није показао статистички значајан ефекат. У микроталасној екстракцији однос дрога:растварач и врста растварача су остварили статистички значајан утицај на садржај полифенола, док се степен уситњености и време нису показали као статистички значајни фактори. Додатно, принос полифенола применом различитих метода екстракције је пратио следећи тренд: микроталаси > ултразвучна сонда > повишена температура > ултразвучно купатило > мацерација.
- Применом експерименталног дизајна утврђено је да се највећи принос полифенола у екстрактима добијеним мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и ултразвучном сондом добија следећом комбинацијом фактора: степен уситњености од 0,3 mm, однос дрога:растварач 1:30 и 50% етанол. Највиша концентрација полифенола

постигнута је при следећим условима у ултразвучном купатилу: величина честица од 0,3 mm, однос дрога:растварач 1:30 и време екстракције 30 минута. Максимални принос укупних полифенола у микроталасној екстракцији постиже се применом односа дрога:растварач 1:23 и 48% етанола након 87 секунди.

- У екстрактима добијеним мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и ултразвучном сондом, садржај укупних флавоноида је растао са порастом односа дрога:растварач и са повећањем удела етанола у екстракционом медијуму. При екстракцији у ултразвучном купатилу постоји тренд повећања приноса флавоноида са продужењем времена екстракције и са смањењем величине честица биљног материјала. Повећање односа дрога:растварач и процента етанола у екстракционом медијуму довело је до значајног повећања садржаја флавоноида у екстрактима добијеним микроталасима, док време није имало статистички значајан утицај.
- Употребом *LC/DAD/MS* методе идентификовано је девет полифенолних компонената класификованих у две групе: деривати кафене киселине (хлорогенска, кафена, розмаринска и салвианолна киселина К и I) и флавоноиди (6,8-ди-*C*-глукозилапигенин, 6-хидроксилутеолин 7-*O*-глукозид, лутеолин 7-*O*-глукуронид и апигенин-глукуронид).
- *HPLC*/*DAD* метода је показала да је у течним екстрактима најдоминантнија фенолкарбоксилна киселина била розмаринска киселина, праћена салвианолном киселином К и I. По питању флавоноида у течним екстрактима, највећи садржај су имали деривати лутеолина (лутеолин 7-*O*-глукуронид и 6-хидроксилутеолин 7-*O*-глукозид), праћени апигенин-глукуронидом. Највећи садржај 6-хидроксилутеолин 7-*O*-глукозида, лутеолин 7-*O*-глукуронида, кафене, салвианолне киселине К, розмаринске и салвианолне киселине I, одређен је у течном екстракту добијеном ултразвучном сондом. У лиофилизованим екстрактима, компонента са највећим садржајем била је розмаринска киселина, праћена лутеолин 7-*O*-глукуронидом. Лиофилизован екстракт добијен мацерацијом имао је

највећи садржај 6-хидроксилутеолин 7-*O*-глукозида, лутеолин 7-*O*-глукуронида, кафене, розмаринске и салвианолне киселине (К и I).

- Способност екстраката врсте *T. serpyllum*, добијених различитим методама екстракције, да изврше неутрализацију слободног *ABTS* радикала, следи тренд: микроталаси >> мацерација, повишена температура и ултразвучни таласи, а при неутрализацији *DPPH* радикала: микроталаси >> ултразвучни таласи > мацерација и повишена температура. Додатно, највећу ефикасност у супресији оксидативне деградације β-каротена показао је екстракт добијен микроталасима > мацерација и ултразвучна сонда > повишена температура и ултразвучно купатило.
- Екстракти мајчине душице су показали антибактеријску активност против свих испитаних бактеријских сојева (*B. cereus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* и *Y. enterocolitica*). Са аспекта антимикотичног ефекта, екстракти су инхибирали раст соја *C. albicans* у релативно високој концентрацији, док ниједан екстракт није показао фунгицидно дејство у испитаним концентрацијама. Екстракт добијен мацерацијом остварио је највећи антибактеријски ефекат против *B. cereus* и најбољи бактерицидни ефекат против *S. aureus*. Екстракт добијен микроталасима показао је најбољу антимикробну активност против *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans*, као и највећу бактерицидну активност против *S. enteritidis*.
- Сви испитани екстракти мајчине душице остварили су значајну спазмолитичну активност на изолованом илеуму пацова на дозно-зависан начин у моделу спонтаних контракција и контракција изазваних ацетилхолином и K^+ јонима. Најбољи спазмолитични ефекат у сва три експериментална модела показао је екстракт добијен мацерацијом. Поменути екстракт остварио је и редукцију контракција индукованих $BaCl_2$ и $CaCl_2$, тако да се може извести закључак да екстракт мајчине душице остварује спазмолитично дејство блокадом Ca^{2+} канала и спречавањем уласка Ca^{2+} јона у глатку мишићну ћелију.
- У свим методама екстракције, процес лиофилизације је дао статистички значајно већи принос инкапсулата, у поређењу са спреј сушењем. Ипак, на

зидовима циклона уређаја за спреј сушење примећено је мање задржавање инкапсулата, у поређењу са чистим екстрактима.

- Код инкапсулираних екстраката добијених мацерацијом, повишеном температуром и у ултразвучном купатилу, процес лиофилизације је очувао већи проценат полифенола у односу на спреј сушење. Лиофилизовани инкапсулати су поседовали већи садржај флавоноида у поређењу са спреј осушеним паралелама.
- Највећи садржај укупних шећера је забележен у екстракту добијеном микроталасима, у обе методе сушења, с тим што је проценат био значајно виши након спреј сушења у односу на лиофилизацију. Поменути екстракт имао је статистички значајно већи принос пептида, након обе технике сушења, с тим што је проценат био виши након лиофилизације.
- Приликом неутрализације *ABTS* радикала, лиофилизовани инкапсулирани екстракти добијени мацерацијом, повишеном температуром и ултразвучном сондом поседовали су већи антиоксидативни капацитет у односу на спреј осушене паралеле. Према резултатима добијеним у *DPPH* тесту, инкапсулација у желатин је довела до тога да не постоји статистички значајна разлика између антиоксидативног капацитета инкапсулираних екстраката осушених различитим техникама.
- Траке *FTIR* спектара лиофилизованих и спреј осушених екстраката указују на присуство угљених хидрата, полисахарида, полифенолних компонената, флавоноида, монотерпена и карбоксилата. *FTIR* спектри инкапсулата показали су готово искључиво траке које потичу од желатина, што указује на ефикасно обавијање активних компонената екстраката и самим тим њихову бољу заштиту.
- Величина честица спреј осушених инкапсулата је била далеко мања и униформност значајно већа него код лиофилизованих паралела. У случају свих инкапсулираних екстраката апсолутна вредност зета потенцијала је била статистички значајно већа након лиофилизације него након спреј сушења, што указује на бољу стабилност лиофилизованих узорака.
- Процес лиофилизације је дао честице неправилног облика, док је спреј сушење формирало мале честице сферичног и псеудо-сферичног облика, са

неравном површином. Насипна густина спреј осушених инкапсулата била је статистички значајно већа у односу на насипну густину њихових лиофилизованих паралела, док је растворљивост била значајно мања.

- *DSC* анализа је показала да се код лиофилизованих желатинских инкапсулата екстраката ендотермни пикови налазе на вишим температурама, посебно код екстракта добијеног повишеном температуром, те се може закључити да су поменути узорци термички стабилнији у односу на спреј осушене. У свим узорцима након процеса спреј сушења вредности промене енталпије биле су веће него након лиофилизације, што указује на присуство стабилизирајућих интеракција између инкапсулираних компонената и носача, тј. желатина.
- Приликом праћења кинетике отпуштања полифенола у Францовој дифузионој ћелији, на собној температури код лиофилизованог инкапсулата забележен је већи отпор преносу масе и последично мање ослобађање полифенола, док је при температури од 37°C отпор био већи код спреј осушеног инкапсулата, уз ослобађање мање количине полифенола у односу на лиофилизовану паралелу.
- Карактеризацијом лиофилизованих и спреј осушених екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата утврђено је да процес лиофилизације има неколико предности у односу на спреј сушење: већи принос сувог производа, већи проценат очуваних полифенолних компонената, посебно флавоноида, вишу апсолутну вредност зета потенцијала, бољу термичку стабилност и дуже ослобађање полифенола из инкапсулата на собној температури. Са друге стране, спреј сушењем настају мале, униформне честице, бољих морфолошких карактеристика и веће насипне густине, уз појаву стабилизирајућих интеракција између желатина и инкапсулираних компонената, као и дужег ослобађања полифенола из инкапсулата на 37°C.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. Abascal K., Ganora L., Yarnell E., 2015. The effect of Freeze-drying and its Implications for Botanical Medicine: A Review. Phytotherapy Research 19, 655-660.
2. Adams M., Schneider S.V., Kluge M., Kessler M., Hamburger M., 2012. Epilepsy in the renaissance: a survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. Journal of Ethnopharmacology 143, 1-13.
3. Aziz S., Rehman H., 2008. Studies on the Chemical Constituents of *Thymus serpyllum*. Turkish Journal of Chemistry 32, 605-614.
4. Al-Fatimi M., Wurster M., Schröder G., Lindequist U., 2010. *In vitro* Antimicrobial, Cytotoxic and Radical Scavenging Activities and Chemical Constituents of the Endemic *Thymus laevigatus* (Vahl). Records of Natural Products 4, 49-63.
5. Algieri F., Rodriguez-Nogales A., Garrido-Mesa N., Zorrilla P., Burkard N., Pischel I., Sievers H., Benedek B., Feistel B., Walbroel B., Rodriguez-Cabezas M.E., Galvez J., 2014. Intestinal anti-inflammatory activity of the *Serpylli herba* extract in experimental models of rodent colitis. Journal of Crohn’s and Colitis 8, 775-788.
6. Amer A., Mehlhorn H., 2006. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae. Parasitology Research 99, 466-472.
7. Amorati R., Foti M., Valgimigli L., 2013. Antioxidant Activity of Essential Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 10835-10847.
8. Andreescu S., Hepel M., Sen S., Chakraborty R., 2011. Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Theraphy. American Chemical Society, Вашингтон, САД, 1-33.
9. Asofiei I., Calinescu I., Trifan A., David J.G., Gavrila A.I., 2016. Microwave-Assisted Batch Extraction of Polyphenols from Sea Buckthorn Leaves. Chemical Engineering Communications 203, 1547-1553.
10. Баланч Б., Ота А., Ђорђевић В., Шентјурц М., Недовић В., Бугарски Б., Поклар Улрих Н., 2015. Resveratrol-loaded liposomes: Interaction of resveratrol with phospholipids. European Journal of Lipid Science and Technology 117, 1615-1626.
11. Barros L., Baptista P., Ferreira I., 2007. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. Food and Chemical Toxicology 45, 1731-1737.

12. Beer D., Joubert E., Malherbe C., Brand J., 2011. Use of countercurrent chromatography during isolation of 6-hydroxyluteolin-7-*O*-β-glucoside, a major antioxidant of *Athrixia phylicoides*. Journal of Chromatography A 1218, 6179-6186.

13. Белшчак-Цвитановић А., Стојановић Р., Манојловић В., Комес Д., Јурановић Циндрић И., Недовић В., Бугарски Б., 2011. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. Food Research International 44, 1094-1101.

14. Белшчак-Цвитановић А., Левић С., Калушевић А., Шпољарић И., Ђорђевић В., Комес Д., Мршић Г., Недовић В., 2015. Efficiency Assessment of Natural Biopolymers as Encapsulants of Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Bioactive Compounds by Spray Drying. Food Bioprocess Technology 8, 2444-2460.

15. Benkhalti F., Prost J., Paz E., Perez-Jimenez F., El Modafar C., El Boustani E., 2002. Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. Nutrition Research 22, 1067-1075.

16. Berdowska I., Zielinski B., Fecka I., Kulbacka J., Saczko J., Gamian A., 2013. Cytotoxic impact of phenolic from Lamiaceae species on human breast cancer cells. Food Chemistry 141, 1313-1321.

17. Beckett B.S., 1981. Illustrated Human and Social Biology. Oxford University Press, New York, USA, 54.

18. Биговић Д., Бранковић С., Китић Д., Раденковић М., Јанковић Т., Шавикин К., Живановић С., 2010. Relaxant effect of the ethanol extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on isolated rat ileum contractions. Molecules 15, 3391-3401.

19. Bozkurt E., Atmaca H., Kisim A., Uzunoglu S., Uslu R., Karaca B., 2012. Effects of *Thymus serpyllum* extract on cell proliferation, apoptosis and epigenetic events in human breast cancer cells. Nutrition and Cancer 64, 1245-1250.

20. Bok S.-H., Son K.-H., Jeong T.-S., Kwon B.-M., Kim Y.-K., Choi D., Kim S.-U., Bae K.-H., Park Y.-B., Choi M.-S., Hwang I., Moon S.-S., Kwon Y.-K., Ahn J.-A., Lee E.-S., 1998. Hesperidin and hesperetin as 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase inhibitor. Korea Institute Of Science And Technology, US 5763414 A.

21. Boros B., Jakabová S., Dörnyei Á., Horváth G., Pluhár Z., Kilár F., Felinger A., 2010. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. Journal of Chromatography A 1217, 7972-7980.

22. Both S., Chemat F., Strube J., 2014. Extraction of polyphenols from black tea - Conventional and ultrasound assisted extraction. Ultrasonic Sonochemistry 21, 1030-1034.

23. Bouras M., Chadni M., Barba F., Grimi N., Bals O., Vorobiev E., 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus* bark. Industrial Crops and Products 77, 590-601.

24. Бранковић С., Китић Д., Раденковић М., Вељковић С., Јанковић Т., Шавикин К., Здунић Г., 2011. Spasmolytic Activity of the Ethanol Extract of *Sideritis raeseri* spp. *raeseri* Boiss. & Heldr. on the Isolated Rat Ileum Contractions. Journal of Food Medicine 14, 495-498.

25. Broadley K.J., Kelly D.R., 2001. Muscarinic receptor agonists and antagonists. Molecules 6, 142-193.

26. Bruschi M., Cardoso M., Lucchesi M., Gremião M., 2003. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. International Journal of Pharmaceutics 264, 45-55.

27. Буцић-Којић А., Планинић М., Томас С., Мујић И., Билић М., Велић Д., 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. Journal of Food Engineering 81, 236-242.

28. Буцић-Којић А., Планинић М., Томас С., Мујић И., Билић М., Велић Д., 2011. Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L.). Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 61, 195-199.

29. Вајић У.-Ј., Грујић-Милановић Ј., Живковић Ј., Шавикин К., Гођевац Д., Милорадовић З., Бугарски Б., Михаиловић-Станојевић Н., 2015. Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. Industrial Crops and Products 74, 912-917.

30. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mayur M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39, 44-84.

31. Wang L., Weller C., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology 17, 300-312.

32. Ventura-Martínez R., Rodríguez R., González-Trujano M.E., Ángeles-López G., Déciga-Campos M., Gómez C., 2017. Spasmogenic and spasmolytic activities of *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* and *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* methanolic extracts on the guinea pig ileum. Journal of Ethnopharmacology 196, 58-65.

33. Vergara-Salinas J., Pérez-Jiménez J., Torres J.L., Agosin E., Pérez-Correa J., 2012. Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 10920-10929.

34. Verma N., Shukla S., 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants 2, 105-113.

35. Wink N., 2016. Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification. Encyclopedia of Evolutionary Biology. Elsevier, САД, 1-9.

36. Viuda-Martos M., El Gendy A., Sendra E., Fernández-López J., El Razik A., Omer A., Pérez-Alvarez A., 2010. Chemical Composition and Antioxidant and Anti-*Listeria* Activities of Essential Oils Obtained from Some Egyptian Plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 9063-9070.

37. Worku B.D., Wunesh S.T., 2014. Quantitative Determination of Sugar Levels in Natural Plants of Cactus Pear (*Opuntia ficus indica*) and Votre-Coach Alimantaire Cultivated in Adigrat, North of Ethiopia. International Journal of Innovation and Scientific Research 10, 125-134.

38. Wu R., Dai J., Wu F., Zhang X., Li W., Wang Y., 2012. Competitive molecular interaction among paeonol-loaded liposomes: Differential scanning calorimetry and synchrotron X-ray diffraction studies. International Journal of Pharmaceutics 438, 91-97.

39. Вулета Г., Милић Ј., Савић С., 2012. Фармацеутска технологија. Фармацеутски факултет Универзитета у Београду, Београд, Србија, 207-224.

40. Gairola S., Sharma J., Bedi Y.S., 2014. A cross-cultural analysis of Jammu, Kashmir and Ladakh (India) medicinal plant use. Journal of Ethnopharmacology 155, 925-986.

41. Galván D’Alessandro L.G., Kriaa K., Nikov I., Dimitrov K., 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. Separation and Purification Technology 93, 42-47.

42. Gilani A., Khan A., Ghayur M., 2006. Ca^{2+} antagonist and cholinergic activities explain the medicinal use of olive in gut disorders. Nutrition Research 26, 277-283.

43. Gilani A., Khan A., Ghayur M., Ali S., Herzig J., 2006. Antispasmodic effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) is mediated predominantly through K^{+}-channel activation. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 99, 365-373.

44. Godfrain T., Miller R., Wibo M., 1986. Calcium antagonism and calcium entry blockade. Pharmacological Reviews 38, 312-416.

45. Gómez-Mascaraque L., Lagarón J.M., López-Rubio A., 2015. Electrosprayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods. Food Hydrocolloids 49, 42-52.

46. Горуновић М., Лукић П., 2011. Фармакогнозија. Завод за графичку технику ТМФ-а, Београд, Србија, 450-452.

47. Grande S., Bogani P., Saizieu A., Schueler G., Galli C., Visioli F., 2004. Vasomodulating potential of Mediterranean wild plant extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 5021-5026.

48. Guo H., Zhang J., Gao W., Qu Z., Liu C., 2014. Anti-diarrhoeal activity of methanol extract of *Santalum album* L. in mice and gastrointestinal effect on the contraction of isolated jejunum in rats. Journal of Ethnopharmacology 154, 704-710.

49. Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Food Research International 40, 1107-1121.

50. Daglia M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology 23, 174-181.

51. Dandena A., Zuka L., Kostova M., 2014. Natural antioxidants in black chokeberry marc extracts depending on the extraction method. Foodbalt 2014, 324-326.

52. Dahmoune F., Nayak B., Moussi K., Remini H., Madani K., 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. Food Chemistry 166, 585-595.

53. Deng Y., Zhao Y., Padilla-Zakour O., Yang G., 2015. Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. Industrial Crops and Products 74, 803-809.

54. Дент М., Драговић-Узелац В., Пенић М., Брнчић М., Босиљков Т., Левај Б., 2013. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. Food Technology and Biotechnology 51, 84-91.

55. Du G., Sun L., Zhao R., Du L., Song J., Zhang L., He G., Zhang Y., Zhang J., 2016. Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. Pharmacology and Therapeutics 162, 23-34.

56. DuBois M., Gilles K., Hamilton J., Robers P., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28, 350-356.

57. Dussossoy E., Bichon F., Bony E., Portet K., Brat P., Vaillant F., Michel A., Poucheret P., 2016. Pulmonary anti-inflammatory effects and spasmolytic properties of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). Journal of Ethnopharmacology 192, 264-272. Југословенска фармакопеја, 2000. Савезни завод за заштиту и унапређење здравља, Београд, Србија, 134.

58. Европска фармакопеја, 2014. Савет Европе, Стразбур, Француска.

59. Engelbertz J., Lechtenberg M., Studt L., Hensel A., Verspohl E., 2012. Bioassay-guided fractionation of a thymol-deprived hydrophilic thyme extract and its antispasmodic effect. Journal of Ethnopharmacology 141, 848-853.

60. Ertas A., Boga M., Yilmaz M.A., Esil Y., Tel G., Temel H., Hasimi N., Gazioglu I., Ozturk M., Ugurlu P., 2015. A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid. Industrial Crops and Products 67, 336-345.

61. Закон о лековима и медицинским средствима, 2010. Службени гласник РС бр. 30/2010, Београд, Србија.

62. Здравковић А., Станојевић Љ., Станковић М., Цакић М., Николић В., Николић Љ., Илић Д., 2012. Утицај оперативних услова и технике екстракције на принос, кинетику и састав водено-етанолних екстраката из листа коприве (*Urtica dioica* L.). Савремене технологије 1, 30-37.

63. Zhao Q., Xiong H., Selomulya C., Chen D.X., Huang S., Ruan X., Zhou Q., Sun W., 2013. Effects of Spray Drying and Freeze Drying on the Properties of Protein Isolate from Rice Dreg Protein. Food and Bioprocess Technology 6, 1759-1769.

64. Zhang H.-F., Zhang X., Yang X.-H., Qiu N.-X., Wang Y., Wang Z.-Z., 2013. Microwave assisted extraction of flavonoids from cultivated *Epimedium sagittatum*: Extraction yield and mechanism, antioxidant activity and chemical composition. Industrial Crops and Products 50, 857-865.

65. Zheng W., Wang S., 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 5165-5170.

66. Иванчевић С., Митровић Д., Бркић М., 2012. Специфичности сушења воћа лиофилизацијом. Економика пољопривреде 59, 461-471.

67. Izutsu K., Aoyagi N., Kojima S., 2004. Protection of Protein Secondary Structure by Saccharides of Different Molecular Weights during Freeze-Drying. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 52, 199-203.

68. Истенич К., Баланч Б., Ђорђевић В., Беле М., Недовић В., Бугарски Б., Поклар Улрих Н., 2015. Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles. Journal of Food Engineering 167, 196-203.

69. Јакобек Л., 2015. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. Food Chemistry 175, 556-567.

70. Yang Y., Zhang F., 2008. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. Ultrasonics Sonochemistry 15, 308-313.

71. Јанчић Р., 2005. Ботаника фармацеутика. Службени лист СРЈ, Београд, Србија, 214-218.

72. Јарић С., Митровић М., Караџић Б., 2014. Plant resources used in Serbian medieval medicine. Ethnobotany and Ethnomedicine. Genetic Resources and Crop Evolution 61, 1359-1379.

73. Јарић С., Митровић М., Павловић П., 2015. Review of Ethnobotanical, Phytochemical, and Pharmacological Study of *Thymus serpyllum* L. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015, 1-10.

74. Jin W., Xu W., Ge H., Li Y., Li B., 2015. Polyphenol-gelatin nanoparticles as reductant and stabilizer for one-step synthesis of gold nanoparticles and their interfacial behavior. RSC Advances 5, 26496-26503.

75. Јовановић А., Ђорђевић В., Здунић Г., Шавикин К., Пљевљакушић Д., Бугарски Б., 2016. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Thymus serpyllum* and its antioxidant activity. Хемијска индустрија 70, 391-398.

76. Јовановић А., Ђорђевић В., Здунић Г., Пљевљакушић Д., Шавикин К., Гођевац Д., Бугарски Б., 2017. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. Separation and Purification Technology 179, 369-380.

77. Yousefbeyk F., Gohari A.R., Hashemighahderijani Z., Ostad S.N., Salehi Sourmaghi M.H., Amini M., Golfakhrabadi F., Jamalifar H., Amin G., 2014. Bioactive Terpenoids and Flavonoids from *Daucus littoralis* Smith subsp. *hyrcanicus* Rech.f, an Endemic Species of Iran. Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Teheran University of Medical Science 22, 12.

78. Југословенска фармакопеја, 2000. Савезни завод за заштиту и унапређење здравља, Београд, Србија, 134.

79. Juturu V., 2014. Polyphenols and Cardiometabolic Syndrome. Polyphenols in Human Health and Disease. Academic press, Elsevier, САД, 1067-1076.

80. Kayani S., Ahmad M., Zafar M., Sultana S., Khan M.P., Ashraf M.A., Hussain J., Yaseen G., 2014. Ethnobotanical uses of medicinal plants for respiratory disorders among the inhabitants of Gallies-Abbottabad, Northern Pakistan. Journal of Ethnopharmacology 156, 47-60.

81. Калушевић А., Левић С., Чалија Б., Пантић М., Беловић М., Павловић В., Бугарски Б., Милић Ј., Жилић С., Недовић В., 2017. Microencapsulation of anthocyanin-rich black soybean coat extract by spray drying using maltodextrin, gum Arabic and skimmed milk powder. Journal of Microencapsulation, DOI: 10.1080/02652048.2017.1354939

82. Karaki H., Satake N., Shibata S., 1986. Mechanism of barium-induced contraction in the vascular smooth muscle of rabbit aorta. British Journal of Pharmacology 88, 821-826.

83. Kafeel A., Zafar I.K., Zahid A.S., Muhammad I., Irfan M., Ehsan E.V., 2008. Evaluation of available sugars in plant species indigenous to Soone valley (Punjab) Pakistan. Pakistan Journal of Botany 40, 1877-1883.

84. Kivilompolo M., Hyötyläinen T., 2009. On-line coupled dynamic sonication-assisted extraction-liquid chromatography for the determination of phenolic acids in Lamiaceae herbs. Journal of Chromatography A 1216, 892-896.

85. Kim H.W., Knowles J.C., Kim H.E., 2005. Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research Part A 72A, 136-145.

86. Ковачевић Н., 2004. Основи фармакогнозије. Српска школска књига, Београд, Србија.

87. Kozics K., Klusová V., Srančiková A., Mučaji P., Slameňová D., Hunáková Ľ., Kusznierewicz B., Horváthová E., 2013. Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells. Food Chemistry 141, 2198-2206.

88. Kozuharova E., Lebanova H., Getov I., Benbassat N., Napier J., 2013. Descriptive study of contemporary status of the traditional knowledge on medicinal plants in Bulgaria. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 7, 185-198.

89. Kosakivska I., Klymchuk D., Negretzky V., Bluma D., Ustinova A., 2008. Stress Proteins and Ultrastructural Characteristics of Leaf Cells of Plants with Different Types of Ecological Strategies. *General* and *Applied Plant Physiology 34, 405-418.*

90. Kruger N., 1994. Methods in Molecular Biology, Basic Protein and Peptide protocols. Humana press, New York, USA.

91. Кулишић Т., Драговић-Узелац В., Милош М., 2006. Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. Food Technology and Biotechnology 44, 485-492.

92. Кулишић Т., Кришко А., Драговић-Узелац В., Милош М., Пифат Г., 2007. The effect of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. International Journal of Food Science and Nutrition 58, 87-93.

93. Khan M.K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A.S., Dangles O., Chemat F., 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. Food Chemistry 119, 851-858.

94. Левић Ј., Чабаркапа И., Тодоровић Г., Павков С., Средановић С., Галоња Т., Костадиновић Љ., 2011. *In vitro* antibacterial activity of essential oils from plant family Lamiaceae. Romanian Biotechnological Letters 16, 6034-6041.

95. Lee M.-K., Moon S., Lee S.-E., Bok S.-H., Jeong T.-S., Park Y., Choi M.-S., 2003. Naringenin 7-*O*-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol-fed rats. Bioorganic & Medicinal Chemistry 11, 393-398.

96. Lee C.J., Chen L.G., Chang T.L., Ke W. M., Lo Y.F., Wang C.C., 2011. The correlation between skin-care effects and phytochemical content in Lamiaceae plants. Food Chemistry 124, 833-841.

97. Lemmens-Gruber R., Marchart E., Rawnduzi P., Engel N., Benedek B., Kopp B., 2006. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* s.l. on isolated guinea pig ilea. Arzneimittelforschung 56, 582-588.

98. Li D., Oh Y.-K., Lim S.-J., Kim J., Yang H., Sung J., Yong C., Choi H.-G., 2008. Novel gelatin microcapsule with bioavailability enhancement of ibuprofen using spray-drying technique. International Journal of Pharmaceutics 355, 277-284.

99. Li Z., Hennig S.M., Zhang Y., Zerlin A., Li L., Gao K., Lee R., Karp H., Thames G., Bowerman S., Heber D., 2010. Antioxidant-rich spice added to hamburger meat during cooking results in reduced meat, plasma, and urine malonaldehyde concentrations. The American Journal of Clinical Nutrition 91, 1180-1184.

100. Liu J., Aruguete D., Jinschek J., Rimstidt D., Hochella M., 2008. The non-oxidative dissolution of galena nanocrystals: Insights into mineral dissolution rates as a function of grain size, shape, and aggregation state. Geochimica et Cosmochimica Acta 72, 5984–5996.

101. Löliger J., 1991. The use of antioxidants in food. Free radicals and food additives. Taylor & Francis, London, UK, 129-150.

102. López P., Sánchez C., Battle R., Nerín C., 2007. Vapor-Phase Activities of Cinnamon, Thyme, and Oregano Essential Oils and Key Constituents against Foodborne Microorganisms. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 4348-4356.

103. López de Lacey A., Pérez-Santín E., López-Caballero E., Montero P., 2014. Biotransformation and resulting biological properties of green tea polyphenols produced by probiotic bacteria. LWT - Food Science and Technology 58, 633-638.

104. Lu X., Wang J., Al-Qadiri H.M., Ross C.F., Powers J.R., Tang J., Rasco B.A., 2011. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. Food Chemistry 129, 637-644.

105. Luthria D., 2008. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. Food Chemistry 107, 745-752.

106. Masamoto Y., Ando H., Murata Y., Shimoishi Y., Tada M., Takahata K., 2003. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 67, 631-634.

107. Mata A.T., Proença C., Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araújo M.E.M., 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portugese food spices. Food Chemistry 103, 778-786.

108. Mati E., Boer H., 2011. Ethnobotany and trade of medicinal plants in the Qaysari Market, Kurdish Autonomous Region, Iraq. Journal of Ethnopharmacology 133, 490-510.

109. Medina-Torres L., Santiago-Adame R., Calderas F., Gallegos-Infante J.A., González-Laredo R.F., Rocha-Guzmán N.E., Núñez-Ramírez D.M., Bernad-Bernad M.J., Manero O., 2016. Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glauscescens*) with maltodextrin. Industrial Crops and Products 90, 1-8.

110. Meister A., Bernhardt G., Christoffel V., Buschauer A., 1999. Antispasmotic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. Planta Medica 65, 512-516.

111. Melzig M.F., Pertz H.H., Krenn L., 2001. Anti-inflammatory and spasmolytic activity of extracts from *Droserae Herba*. Phytomedicine 8, 225-229.

112. Meterc D., Petermann M., Weidner E., 2007. Extraction of green tea and drying with a high pressure spray process. Хемијска индустрија 61, 222-228.

113. Miguel M.G., 2010. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A short Review. Molecules 15, 9252-9287.

114. Милошевић С., Лепојевић Ж., Зековић З., Видовић С., 2011. Determination of extraction conditions of *Ginkgo biloba* L. leaves by supercritical CO_2 using response surface methodology. Хемијска индустрија 65, 147-157.

115. Милутиновић М., Радовановић Н., Ћоровић М., Шилер-Маринковић С., Рајилић-Стојановић М., Димитријевић-Бранковић С., 2015. Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust. Industrial Crops and Products 77, 333-341.

116. Miron T.L., Plaza M., Bahrim G., Ibáñez E., Herrero M., 2011. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. Journal of Chromatography A 1218, 4918-4927.

117. Михаиловић-Станојевић Н., Белшчак-Цвитановић А., Грујић-Милановић Ј., Иванов М., Јововић Ђ., Бугарски Д., Милорадовић З., 2013. Antioxidant and Antihypertensive Activity of Extract from *Thymus serpyllum* L. in Experimental Hypertension. Plant Foods for Human Nutrition 68, 235-240.

118. Moon J.-K., Shibamoto T., 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 1655-1666.

119. Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.A., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free Radical Research 40, 223-231.

120. Munin A., Edwards-Lévy F., 2011. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. Pharmaceutics 3, 793-829.

121. Mustapa A., Martin Á., Mato R., Cocero M.J., 2015. Extraction of phytocompounds from medicinal plant *Clinacanthus nutans* Lindau by microwave-assisted extraction and supercritical carbon dioxide extraction. Industrial Crops and Products 74, 83-94.

122. Mustafa A., Turner C., 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. Analytica Chimica Acta 703, 8-18.

123. Mustafa B., Hajdari A., Pieroni A., Pulaj B., Koro X., Quave C.L., 2015. A cross-cultural comparison of folk plant uses among Albanians, Bosnians, Gorani and Turks living in south Kosovo. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 11.

124. Naczk M., Shahidi F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41, 1523-1542.

125. Николић М., Гламочлија Ј., Ferreira I.C.F.R., Calhelha R.C., Fernandes A., Марковић Т., Марковић Д., Giweli A., Соковић М., 2014. Chemical composition,

antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. Industrial Crops and Products 52, 183-190.

126. Ningappa M., Dinesha R., Srinivas L., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry lear (*Murraya koenigii* L.) extracts. Food Chemistry 106, 720-728.

127. Ojeda D., Jímenez-Ferrer E., Zamilpa A., Herrera-Arellano A., Tortoriello J., Alvarez L., 2010. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. Journal of Ethnopharmacology 127, 7-10.

128. Ostad S.N., Soodi M., Shariffzadeh M., Khorshidi N., Marzban H., 2001. The effect of fennel essential oil on uterine contraction as a model for dysmenorrhea, pharmacology and toxicology study. Journal of Ethnopharmacology 76, 299-304.

129. Ouariachi E., Hamdani I., Bouyanzer A., Hammouti B., Majidi L., Costa J., Paolini J., Chetouani A., 2014. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 4, 281-286.

130. Pavan, 2013. Determination of total protein content and soluble sugar in wheat crop. International Journal of Research in Science And Technology 2.

131. Павоковић Д., Крижник Б., Крсник-Расол М., 2012. Evaluation of Protein Extraction Methods for Proteomic Analysis of Non-Model Recalcitrant Plant Tissues. Croatica Chemica Acta 85, 177-183.

132. Paz J.W., Márquez D.M., Ávila G.M., Cerda R.B., Aguilar C., 2015. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. Ultrasonics Sonochemistry 22, 474-481.

133. Parejo A., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J., Codina C., 2002. Comparison between the Radical Scavenging Activity and Antioxidant Activity of Six Distilled and Nondistilled Mediterranean Herbs and Aromatic Plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 6882-6890.

134. Park S.-Y., Bok S.-H., Jeon S.-M., Park Y., Lee S.-J., Jeong T.-S., Choi M.-S., 2002. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. Nutrition Research 22, 283-295.

135. Parnham M.J., Kesselring K., 1985. Rosmarinic acid. Drugs of the Future 10, 756-757.

136. *PDR for Herbal Medicines*, 2004. Thomson PDR, New Jersy, USA, 882.

137. Peng Z.F., Strack D., Baumert A., Subramaniam R., Goh N.K., Chia T.F., Tan S.N., Chia L.S., 2003. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. Phytochemistry 62, 219-228.

138. Petersen M., Simmonds M., 2003. Rosmarinic acid. Phytochemistry 62, 121-125.

139. Петровић П., Вундук Ј., Клаус А., Козарски М., Никшић М., Жижак Ж., Вуковић Н., Шекуларац Г., Дрманић С., Бугарски Б., 2016. Biological potential of puffballs: A comparative analysis. Journal of Functional Foods 21, 36-49.

140. Петровић С., Максимовић З., Кундаковић Т., 2009. Анализа састојака биљних дрога. Фармацеутски факултет Универзитета у Београду, Београд, Србија, 11-31.

141. Петровић С., Ристић М., Бабовић Н., Лазић М., Францишковић М., Петровић С., 2013. Хемијски састав и антиоксидативна активност етарског уља *Thymus serpyllum* L. Хемијска индустрија 68, 389-397.

142. Pietta P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products 63, 1035-1042.

143. Pinelo M., Fabbro P., Manzocco L., Nuñez M.J., Nicoli M.C., 2005. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. Food Chemistry 92, 109-117.

144. Pompeu D.R., Silva E.M., Rogez H., 2009. Optimization of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. Bioresource Technology 100, 6076-6082.

145. Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas G.-J.E., Komaitis M., 2005. RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 1190-1195.

146. Rababah T., Banat F., Rababah A., Ereifej K., Yang W., 2010. Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolics, Antioxidant Activities and Anthocyanin of Oregano, Thyme, Terebinth, and Pomegranate. Journal of Food Science 75, 626-632.

147. Радојковић М., 2012. Екстракти дуда (*Morus* spp., Morasceae), састав, деловање и примена. Докторска дисертација, Технолошки факултет, Универзитет у Новом Саду, Србија.

148. Rai A., Mohanty B., Bhargava R., 2016. Supercritical extraction of sunflower oil: A central composite design for extraction variables. Food Chemistry 192, 647-659.

149. Rang H., Dale M., Ritter J., Moore P., 2005. Фармакологија. Дата статус, Београд, Србија.

150. Rasooli I., Mirmostafa S., 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. Fitoterapia 73, 244-250.

151. Rastogi L., Arunachalam J., 2011. Sunlight based irradiation strategy for rapid green synthesis of highly stable silver nanoparticles using aqueous garlic (*Allium sativum*) extract and their antibacterial potential. Materials Chemistry and Physics 129, 558-563.

152. Rahimi R., Nikfar S., Larijani B., Abdollahi M., 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. Biomedicine & Pharmacotherapy 59, 365-373.

153. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26, 1231-1237.

154. Rehman A., Mannan A., Inayatullah S., Akhtar Z., Qayyum M., Mirza B., 2009. Biological evaluation of wild thyme (*Thymus serpyllum*). Pharmaceutical biology 47, 628-633.

155. Реџић С.С., 2007. The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina. Collegium Antropologicum 31, 869-890.

156. Rice-Evans C., Miller N., Paganga G., 1995. Structure-antioxidant activity, relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine 7, 933-956.

157. Rice-Evans C., Miller N., Paganga G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science 2, 152-159.

158. Roby M.H.H., Sarhan M.A., Selim K.A., Khalel K.I., 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris*

L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Industrial Crops and Products 43, 827-831.

159. Rodríguez Vaquero M.J., Alberto M.R., Manca de Nadra M.C., 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. Food Control 18, 93-101.

160. Roy J., Salaün F., Giraud S., Ferri A., Guan J., 2017. Surface behavior and bulk properties of aqueous chitosan and type-B gelatin solutions for effective emulsion formulation. Carbohydrate Polymers 173, 202-214.

161. Saarai A., Sedlacek T., Kasparkova V., Kitano T., Saha P., 2012. On the Characterization of Sodium Alginate/Gelatine-Based Hydrogels for Wound Dressing. Journal of Applied Polymer Science 126, E79-E88.

162. Saccheti G., Medici A., Maietti S., Radice M., Muzzoli M., Manfredini S., Braccioli E., Bruni R., 2004. Composition and Functional Properties of the Essential Oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in Comparison with Commercial Essential Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 3486-3491.

163. Senatore F., 1996. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, 1327-1332.

164. Silva E.M., Rogez H., Larondelle Y., 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. Separation and Purification Technology 55, 381-387.

165. Симић В., Рајковић К., Стојичевић С., Величковић Д., Николић Н., Лазић М., Карабеговић И., 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. Separation and Purification Technology 160, 89-97.

166. Singh B., Sharma H., Sarkar B., 2012. Optimization of extraction of antioxidant from wheat bran (*Triticum* spp.) using response surface methodology. Journal of Food Science and Technology 49, 294-308.

167. Singh D., Singh A.K., 1991. Repellent and insecticidal properties of essential oils against housefly, *Musca domestica* L. International Journal of Topical Insect Science 12, 487-491.

168. Singh D., Banerjee S., Porter T., 2009. Green and black tea extracts inhibit HMG-CoA reductase and activate AMP kinase to decrease cholesterol synthesis in hepatoma cells. The Journal of Nutritonal Biochemistry 20, 816-822.

169. Singh J.P., Kaur A., Singh N., Nim L., Shevkani K., Kaur H., Arora D.S., 2016. *In vitro* antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Szyzgium cumini*) fruit polyphenols. LWT - Food Science and Technology 65, 1025-1030.

170. Skaria B., Joy P., Mathew S., Mathew G., Joseph A., Joseph R., 2007. Aromatic plants. New India Publishing Agency, New Delhi, India, 1-9.

171. Skotti E., Anastasaki A., Kanellou G., Polissiou M., 2014. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. Industrial Crops and Products 53, 46-54.

172. Соколић-Михалак Д., Фреце Ј., Славица А., Делаш Ф., Павловић Х., Марков К., 2012. The effects of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oil component against ochratoxin-producing *Aspergilli*. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology 63, 457-462.

173. Sun Y., Liu Z., Wang J., 2011. Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim. Separation and Purification Technology 78, 49-54.

174. Shafaghat A., Pirfarshi F., Shafaghatlonbar M., 2014. Luteolin derivatives and antimicrobial activity of *Achillea tenuifolia* Lam. methanol extract. Industrial Crops and Products 62, 533-536.

175. Shahidi F., Wanasundara P.K.J., 1992. Phenolic antioxidants. Critical Reviews on Food Science and Nutrition 32, 67-103.

176. Shahidi F., Ambigaipalan P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. Journal of Functional Food 18, 820-897.

177. Shukla S., Mehta A., Bajpai V., Shukla S., 2009. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Food and Chemical Toxicology 47, 2338-2343.

178. Shukla S., Mehta A., John J., Singh S., Mehta P., Vyas S.P., 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. Food and Chemical Toxicology 47, 1848-1851.

179. Schwegman J.J., Carpenter J.F., Nail L.S., 2007. Infrared Microscopy for *In Situ* Measurement of Protein Secondary Structure during Freezing and Freeze-Drying. Journal of Pharmaceutical Sciences 96, 179-195.

180. Schulz H., Baranska M., 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. Vibrational Spectroscopy 43, 13-25.

181. Tauchen J., Doskocil I., Caffi C., Lulekal E., Marsik P., Havlik J., Van Damme P., Kokoska L., 2015. *In vitro* antioxidant and anti-proliferative activity of Ethiopian medicinal plant extracts. Industrial Crops and Products 74, 671-679.

182. Tepe B., Daferera D., Sökmen M., Polissiou M., Sökmen A., 2004. *In Vitro* Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Various Extracts of *Thymus eigii*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 1132-1137.

183. Tona L., Kambu K., Ngimbi N., Mesia K., Penge O., Lusakibanza M., Cimanga K., Bruyne T., Apers S., Totte J., Pieters L., Vlietinck A.J., 2000. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. Phytomedicine 7, 31-38.

184. Toplan G.G., Kurkcuoglu M., Goger F., İşcan G., Ağalar H.G., Mat A.M., Baser K.H.C., Koyuncu M., Sariyar G., 2017. Composition and biological activities of *Salvia veneris* Hedge growing in Cyprus. Industrial Crops and Products 97, 41-48.

185. Туцаков Ј., Михајлов М., 1977. Медицинска флора Овчара, Каблара и Јелице. Српска академија наука и уметности, Београд, Србија, 58-78.

186. Tchabo W., Ma Y., Engmann F., Zhang H., 2015. Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology. Industrial Crops and Products 63, 214-225.

187. Ћујић Н., Шавикин К., Јанковић Т., Пљевљакушић Д., Здунић Г., Ибрић С., 2016. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. Food Chemistry 194, 135-142.

188. Ulukanli Z., Cigremis Y., Ilcim A., 2011. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of acetone and methanol extracts from *Thymus leucotrichus* (Lamiaceae). European Review for Medical and Pharmacological Sciences 15, 649-657.

189. Uma D.B., Ho C.W., Wan Aida W.M., 2010. Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolic Compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) Leaves. Sains Malaysiana 39, 119-128.

190. Fayad N.K., Hamad O., Al-Obaidi S., Al-Noor T.H., Ezzat M.O., 2013. Water And Alcohol Extraction Of Thyme Plant (*Thymus vulgaris*) And Activity Study Against Bacteria, Tumors And Used As Anti-Oxidant In Margarine Manufacture. Innovative Systems Design and Engineering 4, 41-51.

191. Fang Z., Bhandari B., 2010. Encapsulation of polyphenols - a review. Trends in Food Science & Technology 21, 510-523.

192. Fang Y.Z., Yang S., Wu G., 2002. Feer radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition 18, 872-879.

193. Фармакопеја СФРЈ, 1984. Савезни завод за здравствену заштиту, Београд, Србија.

194. Farooqi A.A., Sreeramu B.S., Srinivasappa K.N., 2005. Cultivation of Spice Crops. Universities Press, Hyderabad, India, 404-407.

195. *FDA*, 2015. FDA website, https://www.fda.gov/

196. Fecka I., Turek S., 2008. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. Food Chemistry 108, 1039-1053.

197. Fleer H., Verspohl E., 2007. Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. Phytomedicine 14, 409-414.

198. Flores G., Dastmalchi K., Dabo A.J., Whalen K., Pedraza-Peñalosa P., Foronjy R.F., D'Armiento J.M., Kennelly E.J., 2012. Antioxidants of therapeutic relevance in COPD from the neotropical blueberry *Anthopterus wardii*. Food Chemistry 131, 119-125.

199. Friedman M., Henika P.R., Levin C.E., Mandrell R.E., 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 6042-6048.

200. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. Archives of Biochemistry and Biophysics 280, 1-8.

201. Hammi K.M., Jdey A., Abdelly C., Majdoub H., Ksouri R., 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. Food Chemistry 184, 80-89.

202. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal Nurition Biochemistry 13, 572-584.

203. Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E.M., 2004. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Elsevier Science Ltd., Spain.

204. Heneczkowski M., Kopacz M., Nowak D., Kuźniar A., 2001. Infrared Spectrum Analysis od Some Flavonoids. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research 58, 415-420.

205. Хоржић Д., Комес Д., Белшчак-Цвитановић А., Ковачевић-Ганић К., Ивековић Д., Карловић Д., 2009. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. Food Chemistry 115, 441-448.

206. Хоржић Д., Режек Јамбрак А., Белшчак-Цвитановић А., Комес Д., Лелас В., 2012. Comparison of Conventional and Ultrasound Assisted Extraction Techniques of Yellow Tea and Bioactive Composition of Obtained Extracts. Food and Bioprocess Technology 5, 2858-2870.

207. Hossain M.B., Barry-Ryan C., Martin-Diana A.B., Brunton N.P., 2011. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. Food Chemistry 126, 339-346.

208. Hügel H., Jackson N., May B., Zhang A., Xue C., 2016. Polyphenol protection and treatment of hypertension. Phytomedicine 23, 220-231.

209. Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Latif S., Sherazi S.T.H., Ahmad A., Worthington J., Sarker S.D., 2013. Chemical composition and bioactivity studies of essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora. LWT - Food Science and Technology 50, 185-192.

210. Çam M., Hişil Y., 2010. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. Food Chemistry 123, 878-885.

211. *CLSI*, 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 15th informational supplement. CLSI document M100-S15PA, USA.

212. Costa D.C., Costa H.S., Albuquerque T.G., Ramos F., Castilho M.C., Sanches-Silva A., 2015. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. Trends in Food Science & Technology 45, 336-354.

213. Costa P., Gonçalves S., Valentão P., Andrade P., Coelho N., Romano A., 2012. *Thymus lotocephalus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. Food Chemistry 135, 1253-1260.

214. Chen L.G., Chang W.L., Lee C.J., Lee L.T., Shih C.M., Wang C.C., 2009. Melanogenesis inhibition by gallotannins from Chinese galls in B16 mouse melanoma cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin 32, 1447-1452.

215. Chizzola R., Michitsch H., Franz C., 2008. Antioxidative Properties of *Thymus vulgaris* Leaves: Comparison of Different Extracts and Essential Oil Chemotypes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 6897-6904.

216. Cho I., Ahn J., Kim S., Choi M., Ha T., 2008. Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. Biochemical and Biophysical Research Communications 367, 190-194.

217. Choulitoudi E., Bravou K., Bimpilas A., Tsironi T., Tsimogiannis D., Taoukis P., Oreopoulou V., 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of *Satureja thymbra* in gilthead seabream fillets edible coating. Food and Bioproducts Processing 100, 570-577.

218. Chupin L., Maunu S.L., Reynaud S., Pizzi A., Charrier B., Charrier-EL Bouhtoury F., 2015. Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization. Industrial Crops and Products 65, 142-149.

219. Чанчаревић А., Бугарски Б., Шавикин К., Здунић Г., 2013. Biological activity and ethnomedicinal use of *Thymus vulgaris* and *Thymus serpyllum*. Лековите сировине 33, 3-17.

7. ПРИЛОЗИ

7.1. Прилог 1. Извод из списка биљака безбедних за људску употребу (Управа за храну и лекове Сједињених Америчких Држава, односно *Food and Drug Administration* – *FDA*)

[Code of Federal Regulations]
[Title 21, Volume 3]
[Revised as of April 1, 2015]
[CITE: 21CFR182.20]

TITLE 21--FOOD AND DRUGS
CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
SUBCHAPTER B--FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION (CONTINUED)

PART 182 -- SUBSTANCES GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE

Subpart A--General Provisions

Sec. 182.20 Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates).

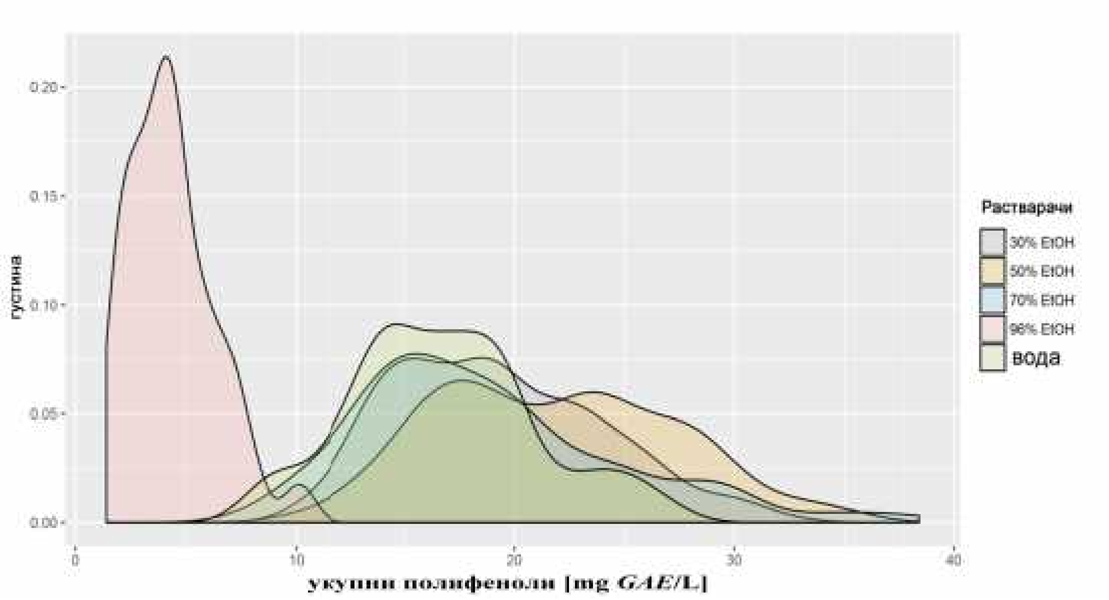
Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates) that are generally recognized as safe for their intended use, within the meaning of section 409 of the Act, are as follows:

Common name	**Botanical name of plant source**
Basil	*Ocimum basilicum* L.
Lavender	*Lavandula officinalis* Chaix.
Lavender, spike	*Lavandula latifolia* Vill.
Lavandin	Hybrids between *Lavandula officinalis* Chaix and *Lavandula latifolin* Vill.
Lemon	*Citrus limon* (L.) Burm. f.
Lemon grass	*Cymbopogon citratus* DC. and *Cymbopogon lexuosus* Stapf.

Lemon peel	*Citrus limon* (L.) Burm. f.
Lime	*Citrus aurantifolia* Swingle.
Marjoram, sweet	*Majorana hortensis* Moench.
Menthol	*Mentha* spp.
Orange leaf	*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.
Orange, sweet	Do.
Origanum	*Origanum* spp.
Paprika	*Capsicum annuum* L.
Parsley	*Petroselinum crispum* (Mill.) Mansf.
Pepper, black	*Piper nigrum* L.
Pepper, white	Do.
Peppermint	*Mentha piperita* L.
Rosemary	*Rosmarinus officinalis* L.
Sage	*Salvia officinalis* L.
Sage, Greek	*Salvia triloba* L.
Sage, Spanish	*Salvia lavandulaefolia* Vahl.
Spike lavender	*Lavandula latifolia* Vill.
Tea	*Thea sinensis* L.
Thyme	*Thymus vulgaris* L. and *Thymus zygis* var. *gracilis* Boiss.
Thyme, white	Do.
Thyme, wild or creeping	*Thymus serpyllum* L.

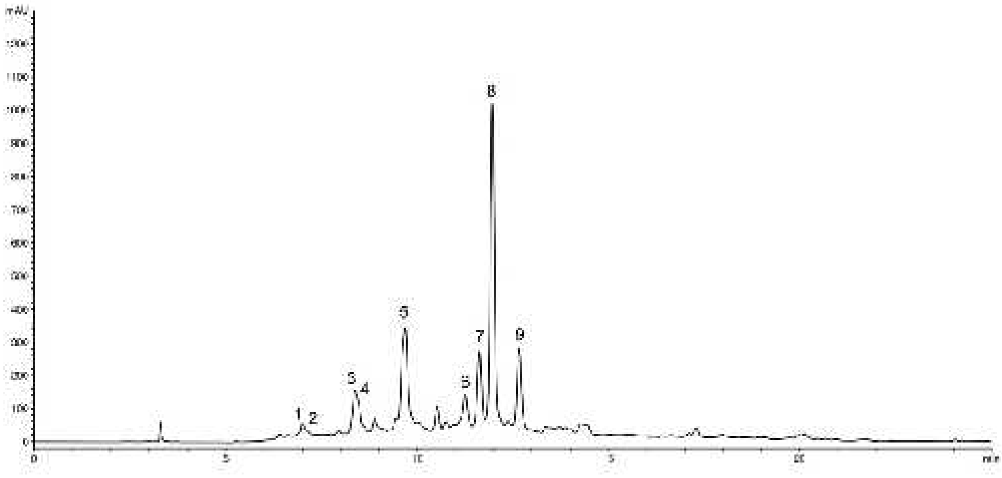
[42 FR 14640, Mar. 15, 1977, as amended at 44 FR 3963, Jan. 19, 1979; 47 FR 29953, July 9, 1982; 48 FR 51613, Nov. 10, 1983; 50 FR 21043 and 21044, May 22, 1985]

7.2. Прилог 2. Графички приказ садржаја укупних полифенола мајчине душице екстрахованих различитим растварачима (30, 50, 70 и 96% етанол и вода)

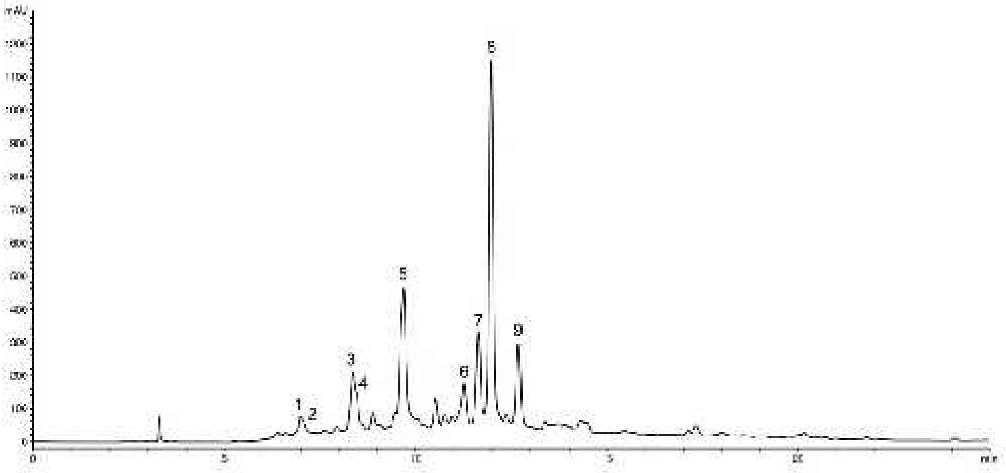


GAE, еквивалент галне киселине; EtOH, етанол

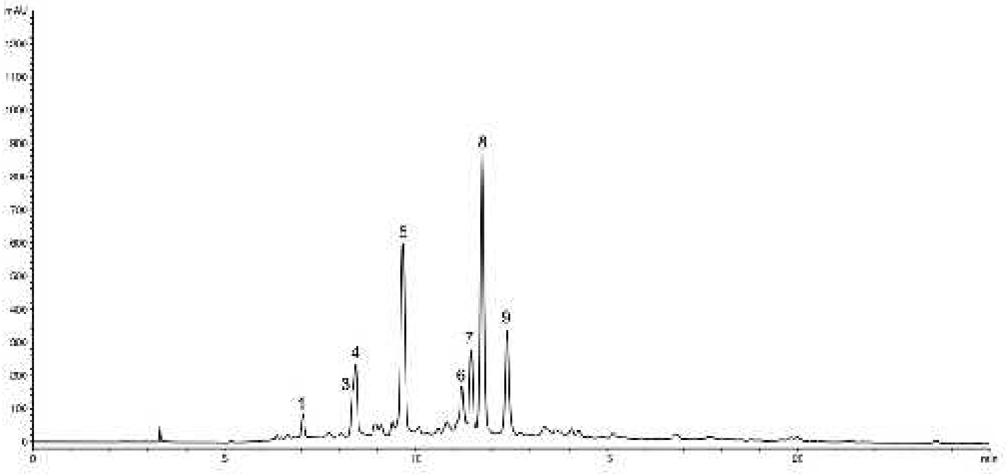
7.3. Прилог 3. Хроматограми одабраних течних екстраката мајчине душице добијених различитим методама екстракције; А, мацерација; Б, повишена температура; В, ултразвучно купатило; Г, ултразвучна сонда; (1) 6,8-ди-*C*-глукозилапигенин, (2) хлорогенска киселина, (3) 6-хидроксилутеолин 7-*O*-глукозид, (4) кафена киселина, (5) лутеолин 7-*O*-глукуронид, (6) апигенин-глукуронид, (7) салвианолна киселина К, (8) розмаринска киселина и (9) салвианолна киселина I; *HPLC/DAD*



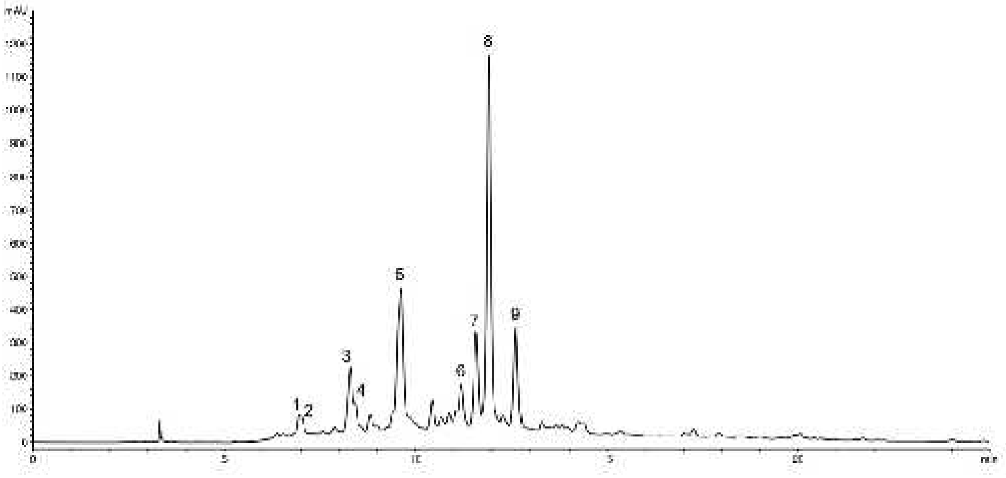
Б


mAU
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
min
1
2
3
4
5
6
7
8
9

В


mAU
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
min
1
3
4
5
6
7
8
9

Г


mAU
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
min
1
2
3
4
5
6
7
8
9

САДРЖАЈ СЛИКА

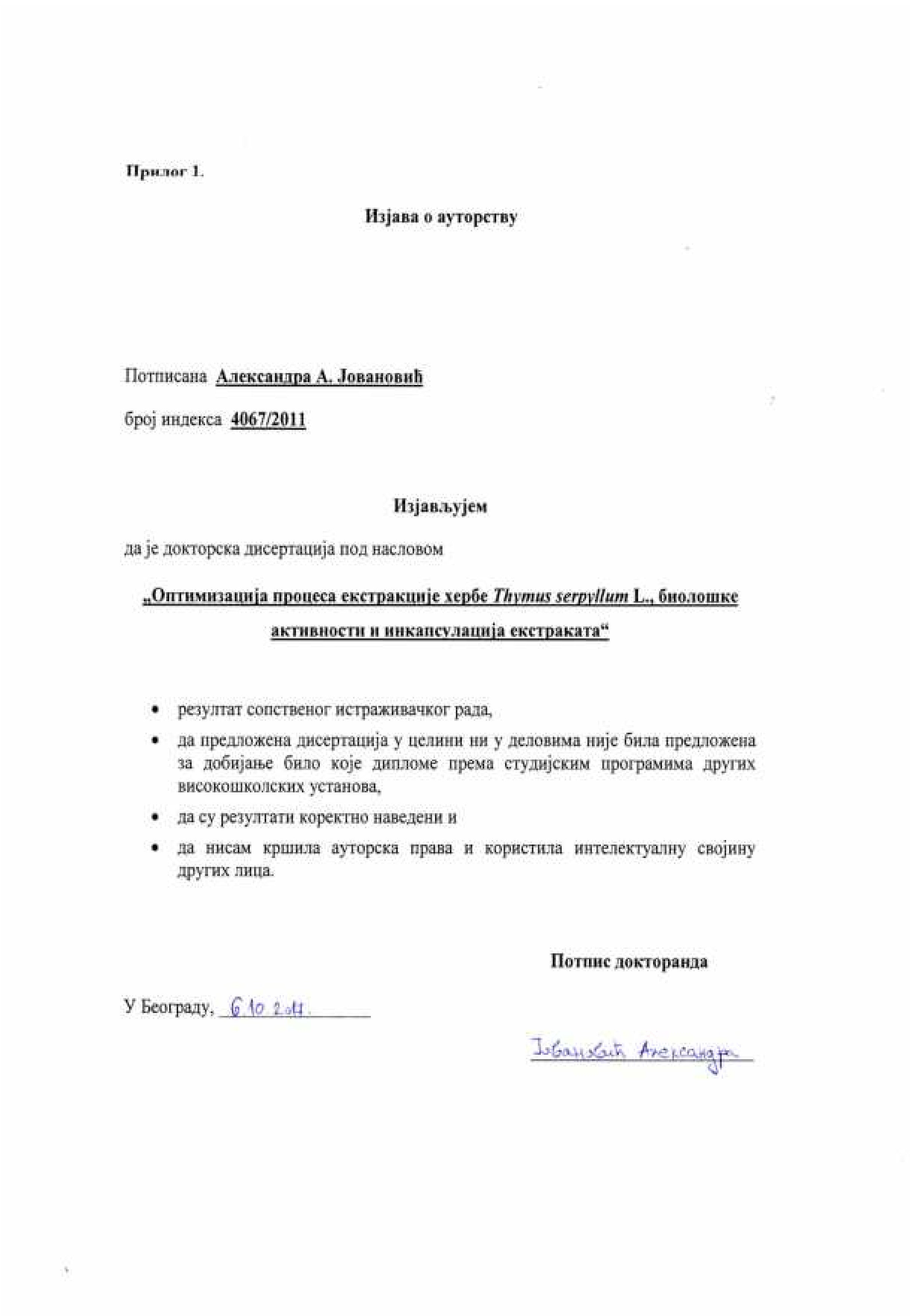
САДРЖАЈ ТАБЕЛА

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Александра А. Јовановић (рођ. Чанчаревић), магистар фармације, рођена је 21.01.1987. у Београду, Република Србија. Основне академске студије на Фармацеутском факултету у Београду уписала је 2006, где је дипломирала у јулу 2011. са просечном оценом 9,10. Докторске студије на Технолошко-металуршком факултету у Београду уписала је 2011. на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија под менторством проф. др Бранка Бугарског. Испите предвиђене планом и програмом, као и завршни испит под називом „Оптимизација процеса екстракције из мајчине душице (*Thymus serpyllum*)“ на докторским студијама је положила са просечном оценом 10,00.

Од децембра 2011. запослена је као истраживач приправник у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, ИИИ 46010. Звање истраживач сарадник стекла је у октобру 2015. Такође, као истраживач укључена је у билатерални пројекат са Словенијом, под називом „Липозоми обложени биополимерима као нови системи за доставу природних фенолних компонената“, 2016/2017.

Резултате свог досадашњег научноистраживачког рада објавила је у укупно 12 публикација, од тога два (2) рада у часописима међународног значаја, од којих један (1) рад публикован у врхунском међународном часопису (М21) и један (1) рад публикован у међународном часопису (М23); један (1) рад у часопису националног значаја (М52); шест (6) саопштења са међународних скупова штампаних у целини (М33) и три (3) саопштења са међународних скупова штампаних у изводу (М34).



Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана **Александра А. Јовановић**

број индекса **4067/2011**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

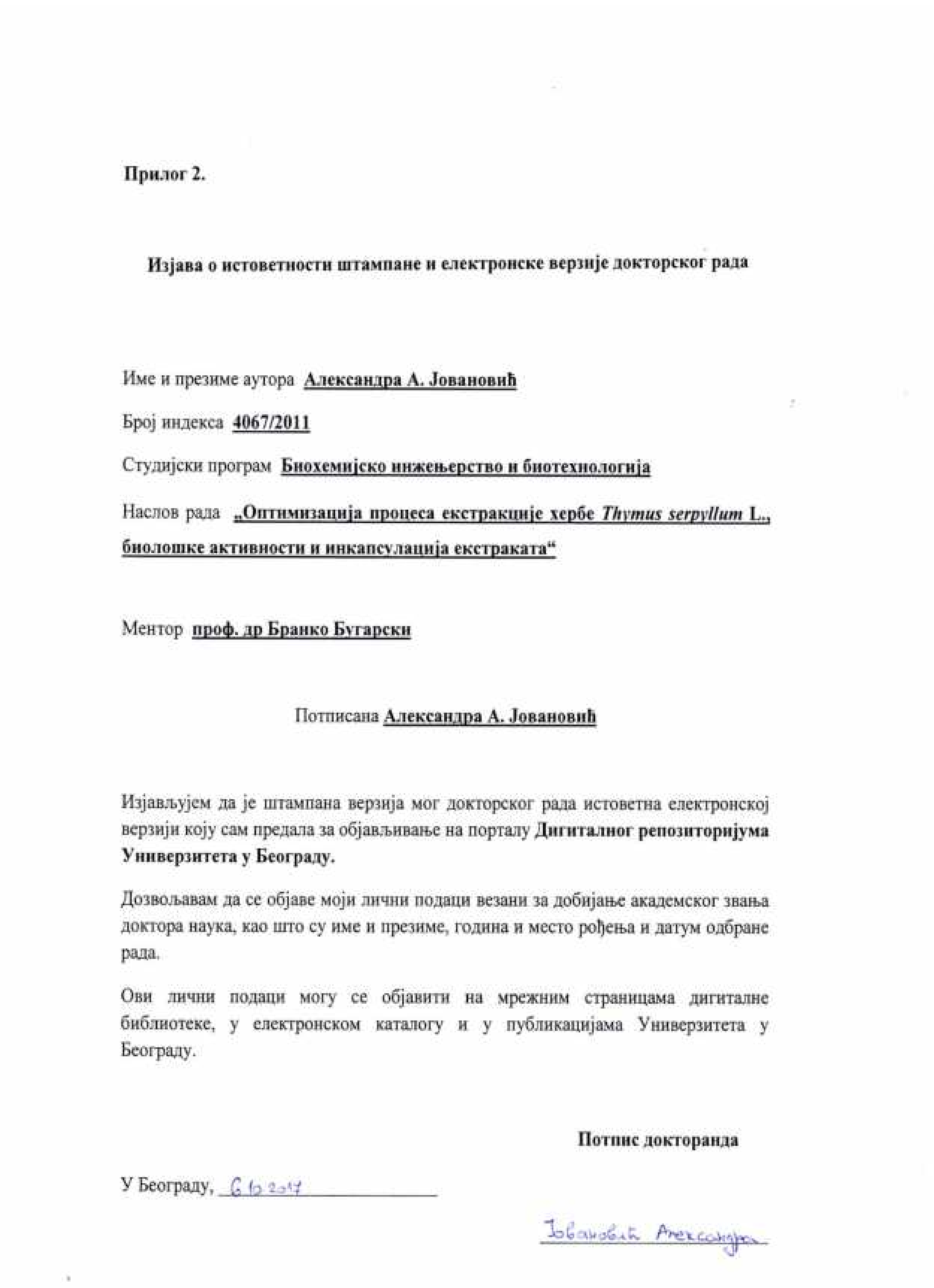
„Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстраката“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 6.10.2017.

Јовановић Александра



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Александра А. Јовановић**

Број индекса **4067/2011**

Студијски програм **Биохемијско инжењерство и биотехнологија**

Наслов рада **„Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстраката“**

Ментор **проф. др Бранко Бугарски**

Потписана **Александра А. Јовановић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

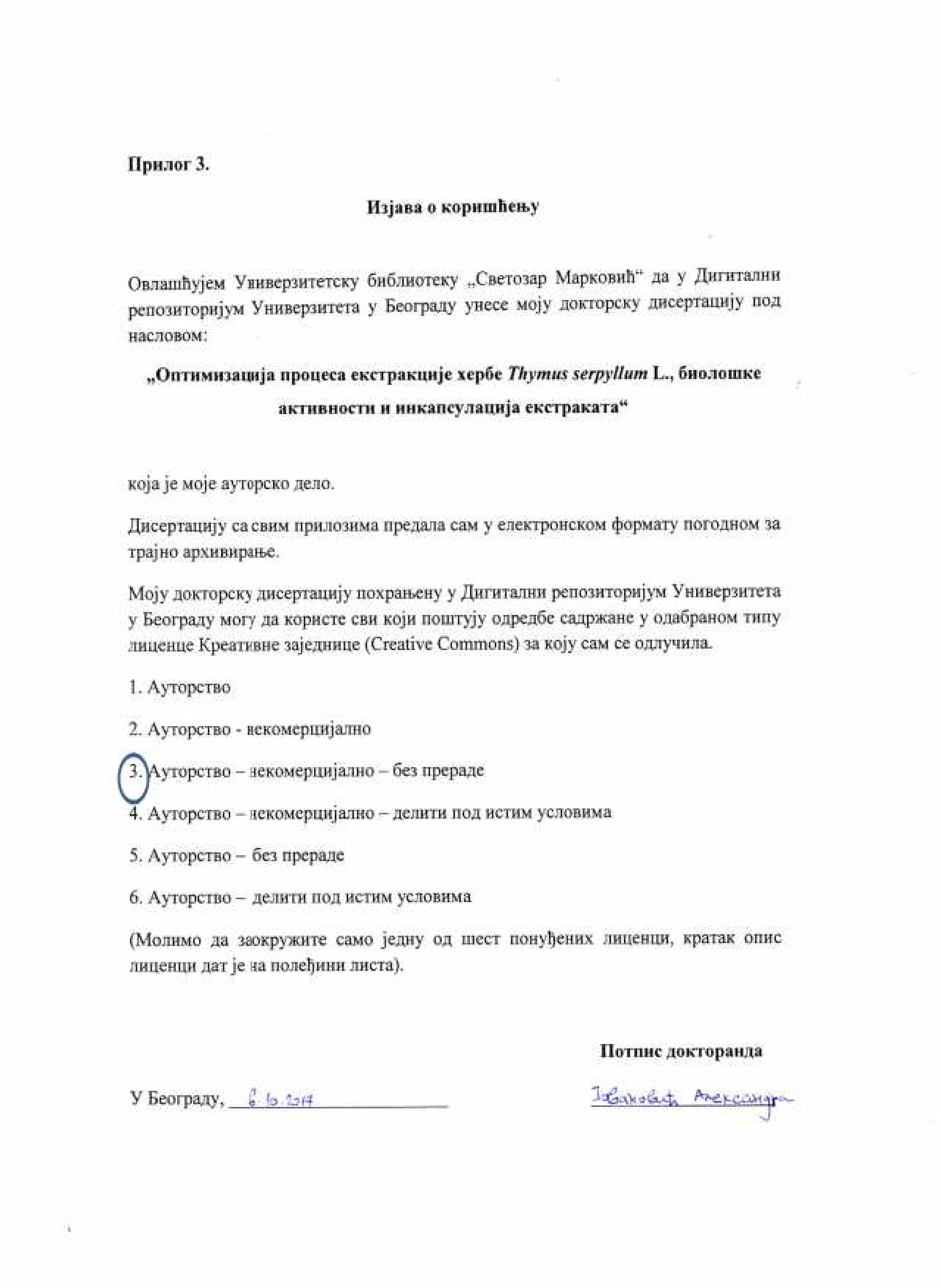
Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

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

Потпис докторанда

У Београду, 6 6 2017

Јовановић Александра



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстраката"

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

[✓ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде]

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 6.10.2017

Јовановић Александра