
LEK. SIROV.	God. XXXIII	Broj 33	Str. 107 – 110	Beograd 2013.
LEK. SIROV.	Vol. XXXIII	No. 33	PP. 107 – 110	Belgrade 2013.

Prikaz doktorske teze – Ph.D. Thesis prewiev *Rukopis prihvaćen: 17.12.2013.*
UDC: 615.322:582.998.16

**KARAKTERIZACIJA SUVIH EKSTRAKATA CVASTI SMILJA,
Helichrysum plicatum DC. I ISPITIVANJE NJIHOVE ANTIOKSIDATIVNE,
CITOTOKSIČNE, SPAZMOLITIČKE I ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI**

Dubravka Bigović

Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Tadeuša Košćuška 1, 110000
Beograd, Srbija

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je karakterizacija suvih ekstrakata cvasti smilja, *Helichrysum plicatum* DC. i ispitana njihova antioksidativna, citotoksična, spazmolitička i antimikrobna aktivnost. Posebna pažnja posvećena je pronalaženju korelacija između hemijskog sastava i farmakoloških aktivnosti suvih ekstrakata u cilju utvrđivanja mogućih aktivnih supstanci ili aktivnih markera.

U okviru preformulacionih ispitivanja, biljna droga cvasti smilja - *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) je precizno definisana, identifikovana i ispitana. Suvi ekstrakti dobijeni su ekstrakcijom usitnjene biljne droge, primenom metode trostruke perkolacije, prečišćavanjem dobijenog tečnog ekstrakta metodom re-ekstrakcije i uparavanjem pod vakuumom. U toku procesa ekstrakcije varirana su tri faktora: stepen usitjenosti biljne droge, vrsta ekstragensa (40%, 50%, 60% etanol) i vrsta rastvarača za re-ekstrakciju (5:5, 9:1, 100:0 etilacetat:etanol; v:v), na tri nivoa.

Razvijena je HPTLC fingerprintna metoda za brzu i pouzdanu identifikaciju glikozida i aglikona flavonoida, prisutnih u biljnoj drogi i ekstraktima. Njihova identifikacija je bazirana na različito obojenim fluorescentnim mrljama uz primenu standarda i urađena tentativna LC-UV-MS analiza ekstrakata dobijenih re-ekstrakcijom.

U okviru hemijske karakterizacije suvih ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) određivan je sadržaj ukupnih fenola u svim uzorcima ekstrakata.

Sadržaj naringenina, apigenina i kempferola, određivan je metodom tečne hromatografije u hidrolizovanim i nehidrolizovanim uzorcima suvih ekstrakata, uz primenu standarda.

Optimizacija procesa ekstrakcije, bazirana na analizi uticaja faktora je pokazala različite optimalne oblasti izvođenja ekstrakcije u zavisnosti od cilja koji

je postavljen u ekstrakciji. U cilju povećanja prinosa suvih ekstrakata, optimizacija procesa ekstrakcije se zasniva na uticaju varirajućih faktora (stepena usitnjenosti biljne droge, vrste ekstragensa i vrste rastvarača za re-ekstrakciju) na prinose ekstrakata.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka suvih ekstrakata je vršeno na bazi sposobnosti redukcije DPPH radikala.

Citotoksična aktivnost odabranih ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) i standarda naringenin, apigenin i kempferol je ispitivana *in vitro* na tri vrste humanih malignih ćelija i to: ćelije adenokarcinoma grlića materice HeLa, ćelije karcinoma prostate PC3 i ćelije mijeloidne leukemije K 562.

Vršeno je *in vitro* ispitivanja spazmolitičke aktivnosti odabranog ekstrakta *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) na izolovanom tankom crevu pacova i to spazmolitički efekat na spontane kontrakcije tankog creva i kontrakcije indukovane acetilholinom, histaminom, barijum jonom i kalijum jonom.

Antimikrobna aktivnost odabranog ekstrakta *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) ispitivana je *in vitro* mikrodilucionom metodom na 20 mikroorganizama, uključujući bakterije, plesni i fitopatogene gljive.

Rezultati ispitivanja hemijskog sastava i farmakološke aktivnosti ekstrakata *Helichrysi flos* (biološki izvor *Helichrysum plicatum* DC.) ukazuju na potencijalne aktivne supstance, odnosno aktivne markere za standardizaciju ekstrakta *Helichrysi flos* (biološki izvor *H. plicatum* DC.).

Prezentovani rezultati potvrđuju primenu biljne vrste *H. plicatum* DC. u tradicionalnoj medicini i ukazuju na sličnost sa *H. arenarium* (L.) Moench, a takođe, predstavljaju dobru osnovu za naredna ispitivanja.

Ključne reči: smilje, *Helichrysum plicatum*, optimizacija procesa ekstrakcije, fenolna jedinjenja, flavonoidi, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost, citotoksična aktivnost, spazmolitička aktivnost.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija, farmakognozija

**CHARACTERIZATION OF DRY EXTRACTS OF EVERLASTING
INFLORESCENCES, *Helichrysum plicatum* DC., AND ASSAYING THEIR
ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC, SPASMOLYTIC AND ANTIMICROBIAL
ACTIVITY**

Dubravka Bigović

Institute for Medicinal Plant Research „Dr Josif Pančić“, Tadeuša Košćuška 1, 110000
Belgrade, Republic of Serbia.

SUMMARY

In this doctoral dissertation, the characterization of dry extracts of everlasting inflorescences, *Helichrysum plicatum* DC., and assay of their antioxidant, cytotoxic, spasmolytic and antimicrobial activity were carried out. Special attention was paid to investigation of correlation between chemical composition and pharmacological effects of dry extracts to determine potentially active substances or active markers.

In the preformulation study, the herbal drug *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) was precisely defined, identified and tested. The dry extracts were prepared from powdered herbal drug by triple percolation method and purification of obtained liquid extracts by means of re-extraction method and vacuum evaporation. The following factors varied in the extraction procedures at three levels: degree of fineness of herbal drug, type of extragens (40%, 50%, 60% ethanol/water ratio) and re-extraction solvent (5:5, 9:1, 100:0 ethylacetate/ethanol ratio; v/v).

The HPTLC fingerprint method was developed for rapid and reliable identification of glycosides and aglicone flavonoids present in the herbal drugs and extracts *H.plicatum*. This identification was based on the color fluorescence, and application of the standards and the tentative LC-UV-MS analysis of purified extracts.

In the chemical characterization of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) dry extracts, the total content of phenols has been determined in all extract samples.

Naringenin, apigenin and kaempferol content was determined by HPLC methods in hydrolyzed and nonhydrolysed samples of dry extracts, and by application of standards. Extraction process optimization, based on factor analysis, showed different optimum extraction performance depending on the extraction target. In order to increase the dry extract yields, the extraction process optimization was based on the influence of various factors (degree of fineness of herbal drug, type of extragens and re-extraction solvent) on the extraction yields.

Antioxidant activity of dry extract samples was evaluated on the basis of the ability of DPPH radical reduction.

Cytotoxic activity of selected extracts of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) and standard substances (naringenin, apigenin and kaempferol) was tested *in vitro* on three types of human cancer cells: Cervix Aden carcinoma Hela cells, PC3 prostate cancer cell lines and myelogenous leukemia K562 cells.

The *in vitro* spasmolytic activity of selected extract of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.), assayed on isolated rat ileum, spasmolytic effect of dry extract on spontaneous ileum contractions and contractions induced by acetylcholine, histamine, barium and potassium ions.

Antimicrobial activity of selected extract of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) was tested by *in vitro* micro dilution method against 20 microorganisms, including bacterias, pests and phytopathogene yeasts.

The results of *Helichrysi flos* (*Helichrysum plicatum* DC.) chemical composition and pharmacological activity analyses indicated on potential active substances or active markers used for *H.flos* extract standardization (biological source *Helichrysum plicatum* DC.).

The results, as demonstrated above, justify the traditional use of *Helichrysum plicatum* DC., and indicate the similarity to *H. arenarium* (L.) Moench, which could be considered as a good basis for further investigations.

Key words: everlasting, *Helichrysum plicatum*, extraction process optimization, phenols compounds, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity, cytotoxic activity, spasmolytic activity.

Scientific field: Pharmacy

Scientific discipline: Pharmaceutical technology, pharmacognosy